

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5763344号
(P5763344)

(45) 発行日 平成27年8月12日 (2015. 8. 12)

(24) 登録日 平成27年6月19日 (2015. 6. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/10 (2006. 01)

C O 7 K 16/10 Z N A

C 1 2 N 15/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 C

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 S

請求項の数 24 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-538953 (P2010-538953)
 (86) (22) 出願日 平成20年12月17日 (2008. 12. 17)
 (65) 公表番号 特表2011-505867 (P2011-505867A)
 (43) 公表日 平成23年3月3日 (2011. 3. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2008/003952
 (87) 国際公開番号 W02009/081285
 (87) 国際公開日 平成21年7月2日 (2009. 7. 2)
 審査請求日 平成23年12月14日 (2011. 12. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/006, 066
 (32) 優先日 平成19年12月17日 (2007. 12. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510169572
 メディカル リサーチ カウンシル テク
 ノロジー
 イギリス国 ロンドン ダブリューシー 1
 エイチ 9エルティー, タヴィストック
 スクウェア 7-12, リントン ハ
 ウス
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 マシューズ, デイビッド ジェイ.
 イギリス国 ロンドン エヌダブリュー7
 1エーディー, ミル ヒル, パート
 ンホール レーン 1-3
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合するヒト化抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号：10、配列番号：13、及び配列番号：18 からなる群から選択される可変重鎖ドメインと、配列番号：19 の可変軽鎖ドメインとを含むヒト化抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

可変重鎖ドメインが配列番号：13 の配列を含む、請求項 1 に記載のヒト化抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

その抗原結合断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、s c F v、F v、及びダイアボディからなる群から選択される請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片の可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインをコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸。

【請求項 5】

請求項 4 のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる核酸。

【請求項 6】

請求項 4 の核酸を含むベクター。

【請求項 7】

ベクターが可変重鎖ドメイン及び／又は可変軽鎖ドメインをコードする核酸に作用可能に結合した発現コントロール配列を更に含む請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 6 のベクターを含む組換え細胞。

【請求項 9】

細胞が真核生物細胞である請求項 8 に記載の組換え細胞。

【請求項 10】

真核生物細胞が CHO 細胞である請求項 9 に記載の組換え細胞。

【請求項 11】

ヒト化抗体又はその抗原結合断片を製造する方法であって、請求項 4 の核酸を含む組換え細胞を、コードされる可変重鎖ドメイン及び／又は可変軽鎖ドメインが細胞によって発現されるように増殖させ；発現されたヒト化抗体又はその抗原結合断片を回収することを含んでなる方法。

【請求項 12】

回収したヒト化抗体又はその抗原結合断片を単離し、及び／又は精製することを更に含む請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片と薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を含有する薬学的組成物。

【請求項 14】

請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片と、該ヒト化抗体又はその抗原結合断片を投与するための指示書を含んでなるキット。

【請求項 15】

ヒトにおける C 型肝炎ウイルス感染を治療又は予防するための医薬であって、請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片の有効量を含む医薬。

【請求項 16】

その抗原結合断片が、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab')₂ 断片、scFv、Fv、及びダイアボディからなる群から選択される請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 17】

C 型肝炎ウイルス感染が急性 C 型肝炎ウイルス感染である請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 18】

C 型肝炎ウイルス感染が慢性 C 型肝炎ウイルス感染である請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 19】

C 型肝炎ウイルス感染の治療がウイルス負荷を低減させることを含む請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 20】

第二治療剤を投与することを更に含む請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 21】

C 型肝炎ウイルスに対して請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片の中和活性の効能を改善又は亢進させる薬剤を同定するためのアッセイ方法であって、

(a) 試験される薬剤に上記ヒト化抗体又はその抗原結合断片を接触させ；
(b) 該薬剤が C 型肝炎の感染力を中和するヒト化抗体又はその抗原結合断片の効能を改善又は亢進させるかどうかを決定する工程を含むアッセイ方法。

【請求項 22】

試料中の C 型肝炎ウイルスの存在又は不在を決定する方法であって、請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片の使用を含む方法。

【請求項 23】

請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片に患者の試料を接触させる工程を含む請求

10

20

30

40

50

項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

ヒトにおける C 型肝炎ウイルス感染を治療又は予防するための薬学的組成物の製造における、請求項 1 のヒト化抗体又はその抗原結合断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願とのクロスリファレンス

この出願は、出典明示によりその全体がここに援用される 2007 年 12 月 17 日出願の米国仮出願第 61/006066 号の優先権を主張する。

10

【0002】

発明の分野

この発明は、親マウスモノクローナル抗体の HCV 感染に対する広い範囲の阻害効果を保持する治療用ヒト化抗体及びその断片とその使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

HCV は、フラビウイルス科に属する陽性一本鎖 RNA ウイルスである。それは非 A 型非 B 型肝炎ウイルスの主要な原因である。HCV はおよそ 2 億人の人々が感染しており、現在の推定によれば、3 百万もの人々が毎年新たに感染していることが示唆されている。感染者のおよそ 80% がウイルスの除去に失敗し；慢性の感染により、重篤の慢性肝疾患、肝硬変及び肝細胞癌になる場合がしばしばある。慢性感染に対する現在の治療法は効果的ではなく、予防及び治療ワクチンを開発するという急を要する必要性が存在している。

20

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのエラープローン性とインビボでの高い複製率のために、HCV は高度の遺伝的変動を示す。HCV は 6 種の遺伝学的に区別される遺伝子型に分類でき、ヌクレオチドレベルでそれぞれおよそ 30% 及び 15% 異なる少なくとも 70 のサブタイプに更に細分類される。ワクチン開発のための重要な挑戦は、ウイルス遺伝子型及びサブタイプに保存されている保護エピトープを同定することである。この問題は中和反応の自然の標的であるエンベロプタンパク質が最も可変性のタンパク質の二つであるという事実によって複雑化されている。

【0004】

30

エンベロプタンパク質 E1 及び E2 は、細胞結合及び移入の原因である。それらは、N 末端外部ドメインと C 末端疎水性膜アンカーを有する N 結合グリコシル化膜貫通タンパク質である。インビトロの発現実験では、E1 及び E2 タンパク質が非共有結合ヘテロ二量体を形成することは示され、これがウイルス表面上の機能的複合体であることが提案されている。効率的な培養系がないため、ウイルス移入の正確な機構は知られていない。とは言うものの、単離された一次肝細胞及び細胞株への移入には細胞表面レセプター CD81 及びスカベンジャーレセプタークラス B1 型 (SR-B1) との相互作用を必要とするが、これらのレセプターだけではウイルス移入を可能にするには十分ではないとの多くの証拠がある。

現在の証拠から、細胞媒介性免疫が急性感染におけるウイルス複製のクリアランス及び制御において中心をなすことが示唆される。しかしながら、動物感染のような感染の代替モデル及び細胞及びレセプター結合アッセイは急性及び慢性双方の感染における抗体の潜在的な役割にハイライトを当てた。驚くことではないが、中和抗体はリニアエピトープと立体構造的エピトープの双方を認識する。広い中和能力を示す抗体の大部分は E2 内の立体構造的エピトープに対するものである。保存された立体構造的エピトープを認識する抗体の誘導はワクチン設計に極めて関連しているが、可変領域は免疫優性であると思われるので、これは困難である可能性が高い。一つの免疫優性リニアエピトープは E2 の第一の高頻度可変領域内に存在する (HVR1)。保存された HVR1 ミモトープの使用が制限された特異性の問題を解消するために提案されているが、このアプローチが成功するかどうかはまだ分からない。

40

50

【 0 0 0 5 】

H V R 1 の直ぐ下流の領域は多くのエピトープを含んでいる。残基 4 1 2 - 4 2 3 を包含し、モノクローナル抗体 A P 3 3 によって定まる一つのエピトープは、C D 8 1 と、可溶型 E 2、E 1 E 2 及びウイルス様粒子を含む E 2 のある範囲の提示の間の相互作用を阻害する。Owsianka A. 等 J Gen Virol 82:1877-83 (2001)。

国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 0 4 4 9 号は、A P 3 3 と命名されたモノクローナル抗体が H C V の 6 つの既知の遺伝子型 1 - 6 の各々に結合しそれを中和することができることを教示している。従って、A P 3 3 が標的とするエピトープは H C V の遺伝子型 1 - 6 の全てと交差反応性であることが推定され、それが抗 H C V リガンドの標的で、また抗 H C V 抗体を生産するための免疫原であることを示している。

10

A P 3 3 はマウス抗体であり、よって複数投与に対して治療的に使用される場合、ヒト患者においてヒト抗マウス抗原反応 (H A M A) を生じせしめる可能性がある。従って、A P 3 3 の交差反応性を共有するがヒト患者において減少した抗原性を有する抗体に対する必要性が存在している。

【 発 明 の 概 要 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、H C V 感染に対して広範囲の阻害効果を保持する改善された治療的ヒト化抗体に関する。A P 3 3 のヒト化は技術的に問題があることが示され、ヒト化 A P 3 3 の生産が次の開発に至った。

A P 3 3 モノクローナル抗体のヒト化中に、本発明者等は、ヒト化可変軽鎖ドメインの乏しい発現レベルに関する問題に遭遇した。マウス軽鎖にはヒトオルソログが存在しない。L 1 ループはヒトカッパ鎖に一致させることができず、これは通常はヒト化過程の重要な成分である。潜在的なスプライシング部位変異の除去及びリーダー配列の交換のような可変軽鎖ドメインに対する幾つかの修飾にも拘わらず、これらの修飾の何れも、たとえばかかる修飾が過去では発現レベルの改善に効果的であると報告されていてもバックグラウンドを越える発現レベルの回復には効果的ではなかった。驚いたことに、発明者等は、ここで R K 2 b と命名された可変軽鎖ドメインを最終的に同定したが、これはよく発現するだけでなく、良好な軽鎖結合活性も有している。

20

【 0 0 0 7 】

本発明者等はまた 4 7 位における W の保持がヒト化可変重鎖ドメインの最適な活性のために必要であることを発見した。これは、マウス (キメラ) 抗体において 4 7 位のアミノ酸が W (ヒト残基) か Y (マウス残基) かどうかは重要であるとは思われないので、驚くべきことである。ヒト化可変重鎖ドメインでは、4 7 位のアミノ酸は最適な活性のためには W でなければならない。直接比較すると、他の重要なフレームワーク残基の全て、つまり、副尺及び正準残基は、最適な活性のためにはマウスドナー残基に変異される必要がある。

30

本発明者等は、ここに記載のヒト化抗体は H C V 感染の阻害について A P 3 3 と少なくとも同じほど効果的であることを驚いたことに更に発見した。通常は、抗体がヒト化されると、C D R を囲む環境を形成するマウスフレームワークのヒトフレームワークとの置換のために活性の低下が予想される。しかしながら、本発明では、マウスフレームワークの置換は活性の増加を生じた。有利には、本発明の抗体はヒト化に伴う利点 (例えばヒト患者において免疫原性を低減させる) を有しているばかりでなく、H C V 種に対する交差反応性を中和させるといふ広域特性を保持している。

40

【 0 0 0 8 】

従って、第一の態様では、配列番号 : 6、配列番号 : 7、配列番号 : 1 9、又は配列番号 : 2 0 の何れかに記載のアミノ酸配列を含む又はそれからなるヒト化 A P 3 3 抗体の可変軽鎖ドメインが提供される。ある実施態様では、ヒト化 A P 3 3 抗体の可変軽鎖ドメインは C 型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合する。

第二の態様では、配列番号 : 3 に記載のアミノ酸配列を含む又はそれからなるヒト化 A P 3 3 抗体の可変重鎖ドメインが提供される。配列番号 3 は、ヒトフレームワークに移植

50

されたマウス C D R を表す。有利には、ヒトフレームワークは、マウスゲノム中の等価な位置に一致させるために、その位置 30、48、67、71、78 及び 94 の一又は複数での逆突然変異によって修飾される。

適切には、アミノ酸変異は置換、例えば S 30 T、I 48 M、V 67 I、V 71 R、F 78 Y 及び R 94 L である。上記において、マウス残基は二番目に、ヒト残基は最初に表される；よって、ヒト化手順において、残基 30 は元の A P 33 フレームワークでは T であり、用いられるヒトフレームワークでは S であり、逆突然変異されたヒト化抗体フレームワークでは T である。

【0009】

ある実施態様では、可変重鎖ドメイン配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、又は配列番号：18 の何れかに記載のアミノ酸配列を含む又はそれからなる。ある実施態様では、ヒト化 A P 33 抗体の可変重鎖ドメインは C 型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合する。

10

第三の態様では、発明の第一の態様に記載された可変軽鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片が提供される。

ある実施態様では、可変軽鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片は C 型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合する。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は抗原結合断片である。

第四の態様では、本発明の第二の態様の可変重鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片が提供される。ある実施態様では、可変重鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片は C 型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合する。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は抗原結合断片である。

20

【0010】

第五の態様では、軽鎖と重鎖を含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片が提供され、ここで軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域は上の第一及び第二の態様に定義された通りである。ある実施態様では、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片は C 型肝炎ウイルス E 2 タンパク質に結合する。ある実施態様では、そのヒト化抗体断片は、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、s c F v、F v、及びダイアボディからなる群から選択される。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は抗原結合断片である。

30

第六の態様では、可変軽鎖ドメインをコードする核酸配列が提供される。

適切には、可変軽鎖ドメインをコードする核酸配列は、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：39、又は配列番号：40 の何れかに記載の配列を含む又はそれからなる。

第七の態様では、可変重鎖ドメインをコードする核酸配列が提供される。

適切には、可変重鎖ドメインは、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、又は配列番号：38 の何れかに記載の配列を含む又はそれからなる。

【0011】

40

第八の態様では、ここに記載のヒト化抗体又はヒト化抗体断片をコードする核酸又はアミノ酸配列が提供される。

第九の態様では、ここに記載の核酸配列に相補的な核酸配列が提供される。

第十の態様では、ここに記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能な核酸配列が提供される。

第十一の態様では、ここに記載の核酸配列を含むコンストラクト又はベクターが提供される。ある実施態様では、ベクターは、可変重鎖領域及び/又は可変軽鎖領域をコードする核酸に作用可能に連結された発現コントロール配列を更に含む。適切には、上記ベクターは発現ベクターである。ある実施態様では、第十一の態様のコンストラクト又はベクターを含む組換え細胞が提供される。ある実施態様では、細胞は真核生物細胞である。ある

50

実施態様では、真核生物細胞はCHO細胞である。

【0012】

第十二の態様では、ここに記載の可変重鎖をコードするアミノ酸配列が提供される。

第十三の態様では、ここに記載のヒト化抗体又はヒト化抗体断片をコードするアミノ酸配列が提供される。

第十四の態様では、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、又は配列番号：20の何れかに記載の配列を含むアミノ酸配列が提供される。

【0013】

第十五の態様では、(a)(i)先の態様に記載の可変軽鎖ドメインをコードする第一発現ベクターと可変重鎖ドメインをコードする第二発現ベクターか；(ii)先の態様に記載の可変軽鎖ドメインと可変重鎖ドメインの双方をコードする単一の発現ベクターの何れかで形質転換された宿主細胞を提供し；(b)各鎖が発現される条件下で上記宿主細胞を培養し；(c)場合によっては発現された鎖を組み立てて形成されるヒト化抗体を単離する工程を含む、ヒト化抗体の調製方法が提供される。

ある実施態様では、第八の態様の核酸を含む組換え細胞を、コードされた可変重鎖領域及び/又は可変軽鎖領域が細胞によって発現されるように増殖させ；発現されたヒト化抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、ヒト化抗体又はその抗原結合断片を製造する方法が提供される。ある実施態様では、該方法は、回収されたヒト化抗体又はその抗原結合断片を単離し、及び/又は精製することを更に含む。

【0014】

第十六の態様では、この方法によって得られた又は得ることができるヒト化抗体が提供される。

第十七の態様では、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤と、活性成分として、ここに記載されたヒト化抗体又はヒト化抗体断片を含有する薬学的組成物が提供される。

第十八の態様では、ここに記載のヒト化抗体又はヒト化抗体断片又は薬学的組成物の使用を含むC型肝炎ウイルス感染の治療及び/又は予防のための方法が提供される。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は急性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は慢性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染の治療は、ウイルス負荷及び/又はウイルス力価を低減させることを含む。ある実施態様では、該方法は第二の治療剤を投与することを更に含む。

適切には、C型肝炎ウイルス感染の治療及び/又は予防のための方法は、有効量のヒト化抗体又はそのヒト化抗体又は薬学的組成物をそれを必要とする患者に投与することを含む。

【0015】

第十九の態様では、患者におけるC型肝炎ウイルス感染の治療及び/又は予防に使用されるヒト化抗体又はその断片又は薬学的組成物が提供される。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は急性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は慢性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染の治療における使用は、ウイルス負荷及び/又はウイルス力価の低減を含む。

第二十の態様では、患者におけるC型肝炎ウイルス感染の治療及び/又は予防のための組成物の製造におけるヒト化抗体又はその断片又は薬学的組成物の使用が提供される。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は急性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染は慢性C型肝炎ウイルス感染である。ある実施態様では、C型肝炎ウイルス感染の治療は、ウイルス負荷及び/又はウイルス力価の低減を含む。ある実施態様では、使用は、第二の治療剤を投与することを更に含む。

【0016】

第二十一の態様では、(a)ヒト化抗体又はその断片を提供し；(b)上記ヒト化抗体又はその断片を試験される薬剤に接触させ；(c)C型肝炎ウイルスの感染力の中和にお

10

20

30

40

50

けるヒト化抗体又はその断片の効果を改善又は亢進するかどうかを決定する工程を含む、
C型肝炎ウイルスに対するヒト化抗体又はその断片の中和活性の効果を改善又は亢進する
薬剤を同定するためのアッセイ方法が提供される。

ある実施態様では、C型肝炎ウイルスに対してヒト化抗体又はその抗原結合断片の中和
活性の効果を改善又は亢進する薬剤を同定するためのアッセイ方法であって、(a)上記
ヒト化抗体又はその抗原結合断片を試験される薬剤と接触させ、(b)該薬剤がC型肝炎
の感染性を中和するヒト化抗体又はその抗原結合断片の効果を改善又は亢進するかどうか
を決定する工程を含む方法がここに提供される。ある実施態様では、該薬剤は適切なコン
トロールと比較してC型肝炎ウイルスの感染力を中和するヒト化抗体又はその抗原結合断
片の効果を改善又は亢進する。ある実施態様では、適切なコントロールは、薬剤の不存在
下でのヒト化抗体又はその断片である。

10

【0017】

第二十二の態様では、この方法によって得られた又は得ることができる薬剤が提供され
る。

第二十三の態様では、試料中におけるC型肝炎ウイルスの存在を決定するための方法で
あって、ここに記載のヒト化抗体又はヒト化抗体断片の使用を含む方法がまた提供される
。

適切には、該方法は、患者からの試料をヒト化抗体又はヒト化抗体断片に接触させる工
程を含む。ある実施態様では、該方法は適切なコントロールと比較することを更に含む。
ある実施態様では、適切なコントロールは、HCVを認識しない抗体である。ある実施態
様では、適切なコントロールはHCVを含んでいることが知られている試料である。

20

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1はAP33ミモトープH6へのヒト化及びキメラ抗体の結合を示す。ヒト化
重鎖及び軽鎖に対するキメラ抗体の相対的結合性を比較するために、COS7細胞に一連
のキメラ及びヒト化重鎖及び軽鎖コンストラクトを形質移入し、上清を用いてミモトープ
H6への結合を比較した。キメラ(Vh/Vl)及びヒト化抗体RHb-h/RK2bc
及びRHA/RK2bc又はヒト化及びキメラ抗体RHA/Vl、RHb-h/Vl又は
Vh/RK2bcの混合物に対するミモトープペプチドH6の結合をELISAによって
測定した。

30

【図2】図2はペプチドH6に対するAP33RHIの結合を示す。重鎖界面残基Q39
がペプチドH6への最適以下の結合の原因であるかどうかを決定するために、ヒト化重鎖
RHI(Q39K)の結合をELISAによって測定した。COS7細胞に一連のキメラ
及びRHI重鎖及びRK2b軽鎖コンストラクトを形質移入し、上清を用いてミモトープ
H6への結合を比較した。キメラ(Vh/Vl)及びヒト化抗体RHb-h、RHI/R
K2bc及びヒト化及びキメラ抗体RHFVl又はRHb-h/Vlの混合物へのミモ
トープペプチドH6の結合をELISAによって測定した。

【図3】図3A-BはE2ペプチドへのキメラ及びヒト化抗体の結合を示す。ヒト化抗体
RHb-h/Vlへのキメラ抗体の相対的結合性を比較するために、COS7細胞に一連
のキメラ及びヒト化抗体コンストラクトを形質移入した。抗体上清にELISAを施し、
表5に記載のペプチドに対する結合を比較した。

40

【図4】図4はH6ペプチドに対するRK2変異体の結合を示す。ヒト化軽鎖RK2が機
能するのに必要な変異の最小数を、軽鎖RK2、RK2b、及びRK2cとのRHb-g
の結合を比較することによって決定した。キメラ抗体Vh/Vlを、過去の実験に対する
コンパレータとして含めた。COS7細胞に一連のキメラ及びヒト化抗体コンストラクト
を形質移入した。E2ペプチドに対する抗体上清の結合(表5)をELISAによって測
定した。

【図5】図5A-Iは、ヒト化重鎖VC変異体に対するE2ペプチドの結合を示す。ヒト
化重鎖RHb-hが機能するのに必要な変異の最小数を、逆突然変異させられた重鎖RH
-B、RH-C、RH-D、RH-E、RH-F、RH-G及びRH-HとのRHb-h

50

の結合を比較することによって決定した。キメラ抗体V_h/V_lを過去の実験に対するコンパレータとして含め、ヒト化軽鎖R_{K2bc}を使用して全てのヒト化重鎖と対形成させた。COS7細胞に一連のキメラ及びヒト化抗体コンストラクトを形質移入した。E2ペプチドに対する抗体上清の結合(表5)をELISAによって測定した。

【図6】図6A-Eは、正規化されたデータを使用するE2ペプチドへのヒト化抗体VC変異体の結合の比較を示す。図5のデータを、各データセットをH6結合の割合として正規化することによって更に解析し、各遺伝子型を一緒にグループ化した。

【図7】図7A-Eは、ヒト化AP33抗体がHCVpp感染を阻害することを示している。広範な遺伝子型から誘導されたHCVppのキメラAP33又はヒト化抗体の中和。Hu_h-7細胞の感染前に、HCVppを異なった濃度の精製キメラAP33又はヒト化抗体と共に37℃で1時間ブレインキュベートした。抗体の中和活性を感染力価の阻害割合として表す。

【図8】図8A-Bは、遺伝子型5由来のHCVppのキメラAP33又はヒト化抗体による中和を示す。HCVppを、Hu_h-7細胞の感染前に異なった濃度の精製キメラAP33又はヒト化抗体と共に37℃で1時間ブレインキュベートした。抗体の中和活性は感染力価の阻害パーセントとして表される。二つの別個の実験からの結果を示す。

【図9】図9はAP33のCDRの上面図を示すAP33の分子モデルを示す。透明なConnolly面は褐色の親油性領域を示す。Vernier及びcanonical残基はテーパーのスティックとして示される。図は上からCDRを見下ろしている。ループH1、H2、L3、及びL1は共同して親油性である谷形状の構造を形成する。

【図10】図10はAP33のCDRの底面図を示すAP33の分子モデルを示す。透明なConnolly面は褐色の親油性領域を示す。Vernier及びcanonical残基はテーパースティックとして示される。

【図11】図11A-Eは、AP33変異体Y47F及びY47WのE2ペプチドへの結合を示す。AP33のキメラ重鎖の変異残基Y47の影響。表5に示されるE2ペプチドの結合を使用して、野生型重鎖AP3と変異体Y47F及びY47Wを比較した。COS7細胞に一連のキメラ及び変異体抗体コンストラクトを形質移入した。E2ペプチドに対する抗体上清の結合をELISAによって測定した。データは、各データセットをH6結合のパーセントとして正規化し、各遺伝子型をグループ化することによって操作した。

【図12】図12はAP33変異体Y47F及びY47WによるHCVpp感染の阻害を示している。1a遺伝子型から誘導されたHCVppのキメラAP33又はヒト化抗体による中和。Hu_h-7細胞の感染前に、HCVppを、異なった濃度の精製キメラAP33又はヒト化抗体と共に37℃で1時間ブレインキュベートした。抗体の中和活性は感染力価の阻害パーセントとして表される。

【図13】図13(61/006066の表7に既出)は、ドナー配列とのAP33 H及びL鎖中のVernier、Canonical及び界面残基の比較を示す。「Vern/CDR」は、vernier残基(v)及びCDR(---)を示す。淡い灰色の強調部分はCDRを示す。白いテキストで黒い強調部分は、VCI残基を示す。太字のテキストで暗灰色の強調部分は、AP33及びS67826、X61125、AB064133、AB064072及びAY68527に見出されたVCI残基間の差を示す。

【図14】図14(61/006066の表8に既出)はAP33V_H及び選択されたヒトV_H遺伝子中のVCI残基の比較を示す。20のヒトV_H配列が最善のVCIスコアを持ち、AP33V_Hと比較してマッチしたCDR1及び2サイズを有する。「.」はAP33V_H中のものと同じの残基を示す。白のテキストで黒の強調部分は、潜在的なドナーフレームワークが異なる部位を示している。VCI/FWスコアは、AP33V_Hと同一のVCI又はFW残基の数を示している。淡い灰色の強調部分、太字テキストの暗灰色の強調部分、及び太字テキストの非強調部分は、それぞれ非保存的、保存的、及び許容可能なcanonical代替残基を示す。

【図15】図15(61/006066の表9に既出)は、選択されたV_Hタンパク質配列とのAP33V_Hの比較を示す。これは図14におけるように20のヒトV_H配列の比

10

20

30

40

50

較である。灰色の強調部分はP r o残基を示す。太字テキストの暗灰色の強調部分はC y s残基を示す。

【図16】図16(61/006066の表10に既出)は最善の4つのヒトV_H配列のC l u s t a l Wアラインメントを示す。白テキストでの黒の強調部分はC D Rを示しており、灰色の強調部分及び暗灰色の強調部分で太字テキストの部分はC D Rの外側のドナー候補間の差を示している。

【図17】図17A - B(61/006066の表11に既出)はA P 3 3 R H Aリーダー選択とS i g n a l Pの結果をV H 4 - 5 9リーダー及びS 6 7 8 2 6 F W 1 [1 4]と共に示す。

【図18】図18A - B(61/006066の表12に既出)はA P 3 3 R H Aタンパク質及びDNA配列の生成を示す。図18AはA P 3 3 R H Aタンパク質配列移植を示し、図18BはA P 3 3 R H A DNA配列移植を示す。暗灰色の強調部分で太字のテキストはC D Rを示す。

【図19】図19(61/006066の表14に既出)はA P 3 3 R H AのDNA及びタンパク質配列を示す。淡い灰色ボックスは潜在的スプライス部位を取り除くヌクレオチド変化を示す。

【図20】図20(61/006066の表15に既出)は、生殖系列ヒトV K遺伝子、A P 3 3 V KのV遺伝子セグメントのみ及びヒト生殖系列遺伝子とのA P 3 3 V K比較を示す。ヒト生殖系列V遺伝子とのA P 3 3 V Kの比較は、このC D R 1長が如何なるヒトV K遺伝子によっても表されないことを示している。ヒト生殖系列 遺伝子は同じサイズのC D R 1ループを有していない。C D R 1ループは黒の強調部分と白のテキストで示される。強調された及び/又は太字の残基は、短いC D R 1ループを持つV遺伝子の保存プロリンと長いループのものの間の差を強調している。

【図21】図21(61/006066の表16に既出)は、同じC D R 1サイズを有するヒトV KのV C Iスコアを示す。データベースに見出されたマッチしたc a n o n i c a lループ長を持つ6のみの「ヒト」V K配列がファージ又はヒト化抗体であった。「.」はA P 3 3 V K中のものと同じの残基を示す。V C I / F WスコアはA P 3 3 V Kと同一のV C I又はF W残基の数を示している。A P 3 3 K中の白文字の黒色強調部分は非保存残基を示している。

【図22】図22(61/006066の表17に既出)は高V C Iスコアを持つヒトV K(異なったC D R 1長を含む)を示す。20のヒトV K配列が最善のV C Iスコアを持ち、A P 3 3 V Hと比較してマッチしたC D R 2サイズを有する。「.」はA P 3 3 V K中のものと同じの残基を示す。V C I / F Wスコアは、A P 3 3 V Kと同一のV C R又はF W残基の数を示している。A P - 3 3 K中の白文字で黒の強調部分は、潜在的なドナーフレームワークが異なる部位を示している。

【図23A】図23A(61/006066の表18Aに既出)は、非マッチC D R 1サイズのA P 3 3 V K及びヒトV K配列を示す。C y s、P r o及びC D Rは、それぞれ太字テキストでの暗灰色の強調部分、白テキストでの黒色強調部分、及び淡い灰色の強調部分によって示される。

【図23B】図23B(61/006066の表18Bに既出)は非マッチC D R 1サイズのヒト配列とA P 3 3 V KのC l u s t a l Wアラインメントを示す。A P 3 3との残基の同一性は破線で示され、灰色はC D Rとその長さの差を強調する。白テキストでの黒色強調部分はV C I残基の差を示し、太字テキストの灰色はX 6 1 1 2 5又はA Y 6 8 5 2 7 9中の非保存的变化である。X 6 1 1 2 5のF W 4 K L E I Nは非常に希で、シーケンシングアーチファクトである可能性があり、K L E I Kでありうる。A P 3 3中のK L E I Kは共通のモチーフである。

【図24】図24(61/006066の表19に既出)は、長いC D R 1を有するA P 3 3 V K及び非V K 4ヒトV K配列のV C Iを示す。20のヒトV K非V K 4配列が最善のV C Iスコアを有し、A P 3 3 V Kと比較してマッチしたC D R 2サイズと長いC D R 1を有する。V C I / F Wスコアは、A P 3 3 V Kと同一のV C I又はF W残基の数を示

10

20

30

40

50

している。

【図25】図25(61/006066の表20に既出)は、大きなCDR1を有するAP33VK及びヒトVK非VK4配列を示す。Cys、Pro及びCDRは、それぞれ太字のテキストで暗灰色の強調、白いテキストで黒の強調、及び淡い灰色の強調によって示す。

【図26】図26(61/006066の表21に既出)は、大きなCDR1を有するAP33VK及び非VK4ヒト配列のClustalWアラインメントを示す。AP33VKと同一の残基は破線によって示されている。上の7つの配列において、保存的变化及び非保存的变化は暗灰色である。CDRは淡い灰色である。

【図27】図27(61/006066の表22に既出)は、ヒトフレームワークX61125及びAY685279を使用するAP33RKAの設計を示す。予想されたシグナルプロテアーゼ切断はVKIV-B3リーダーとX61125-ATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCAGCTCTGGCTCTCCGGcGCCAGATGTを持つ[20]を生じる。

【図28】図28(61/006066の表23に既出)は、予想されたシグナルプロテアーゼ切断[21]で、VKI-012/02リーダー及びAY685279-ATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCAGCTCTGGCTCTCTCCGGcGCCAGATGTを持つ結果を生じる。

【図29】図29(61/006066の表24に既出)は予想されたシグナルプロテアーゼ切断結果[22]をVKII-A17リーダーとAB064133FW1と共に示す。

【図30】図30A及びB(61/006066の表25に既出)はAP33RKA配列の生成を示す。図30AはAP33RKAタンパク質配列移植を示す。図30BはAP33RKA DNA配列移植をVKIVB3リーダーと共に示す。CDRを強調する。

【図31】図31A-B(61/006066の表26に既出)はAP33RK2配列の生成を示す。図31AはAP33RK2タンパク質配列移植を示す。図31BはAP33RK2 DNA配列の生成を示す。CDRを強調する。

【図32】図32A-B(61/006066の表27に既出)はAP33RK3配列の生成を示す。図32AはAP33RK3タンパク質配列移植を示す。図32BはAP33RK3 DNA配列生成を示す。CDRを強調する。

【図33】図33(61/006066の表28に既出)はAP33RK4 DNA配列生成を示す。CDRを強調する。

【図34】図34A-D(61/006066の表29に既出)は、リーダーと共にAP33RKA、AP33RK2、AP33RK3、及びAP33RK4 DNA配列を示す。CDRを強調する。

【図35】図35(61/006066の表30に既出)は、リーダーと共にAP33RKAのDNA及びタンパク質配列を示す。淡い灰色のボックスは、潜在的スプライス部位又は望まれないBamHI部位を除去するために変化させられたヌクレオチドを表す。

【図36】図36(61/006066の表31に既出)は、リーダーと共にAP33RK2のDNA及びタンパク質配列を示す。淡い灰色のボックスは、潜在的スプライス部位又は望まれないBamHI部位を除去するために変化させられたヌクレオチドを表す。

【図37】図37(61/006066の表32に既出)は、AP33RK3コンストラクトのDNA及びタンパク質配列を示す。NB AP33RLBは逆突然変異させられた二つのVCIを有している。スプライス部位はこれによって生成されない。

【図38】図38(61/006066の表33に既出)はAP33RK4コンストラクトのDNA及びタンパク質配列を示す。

【図39】図39Aは感染パーセントで測定されたCon1 HCVppのAP33及びRH-C/RK2b中和を示す。図39Bは、感染パーセントで測定されたJ6HCVppのAP33及びRH-C/RK2b中和を示す。図39Cは、Con1及びJ6HCVppを使用するAP33及びRH-C/RK2bのEC₅₀(µg/ml)を示す。

10

20

30

40

50

【図40】図40Aは感染パーセントで測定されたCon1HCVccのAP33及びRH-C/RK2b中和を示す。図40Bは、感染パーセントで測定されたJ6HCVccのAP33及びRH-C/RK2b中和を示す。図40Cは、Con1及びJ6HCVccを使用するAP33及びRH-C/RK2bのEC₅₀($\mu\text{g/ml}$)を示す。

【図41】図41AはRH-C/RK2b及び10%の正常なヒト血清(NHS)又は慢性HCV感染患者からの血清(CHCHS-1及びCHCHC-2)の存在下でCon1HCVppを使用する中和アッセイの結果を示す。図41Bは、吸光度(A₄₅₀)によって測定した、GTIb(Con1)ELE2形質移入293T細胞からの可溶化物を使用するELISAによるCon1HCV ELE2反応性抗体に対するNHS、CHCHS-1、CHCHS-2、及びRH-C/RK2bの結合レベルを示している。

【図42A】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42B】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42C】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42D】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42E】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42F】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【図42G】表8のヒト化抗体可変鎖のアミノ酸及びヌクレオチド配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

抗体

抗体は全て免疫グロブリン折り畳みに基づいて様々な構造を有する天然に生じる免疫グロブリン分子である。例えば、IgG抗体、例えばAP33は、機能的抗体を形成するためにジスフイド結合している2つの「重」鎖と2つの「軽」鎖を有している。各重鎖と軽鎖自体は「定常」(C)及び「可変」(V)領域を含む。V領域は抗体の抗原結合特異性を決定する一方、C領域は免疫エフェクターとの非抗原特異的相互作用において構造的サポートを与え機能する。抗体又は抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性は、抗体又はその断片が特定の抗原に特異的に結合する能力である。

抗体の抗原結合特異性は、V領域の構造的特性によって決定される。可変性は可変ドメインの110アミノ酸スパンに均一に分布はしていない。代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と呼ばれる極端に可変性の短い領域によって分離された15-30のアミノ酸のフレームワーク領域(FRs)と呼ばれる相対的に不変の伸展からなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ4つのFR領域を含み、多くの場合、シート構造に連結し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する3つのCDRによって連結されたシート配置になっている。各鎖の高頻度可変領域はFR領域に極めて近接して保持されており、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に関与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接には関与しないが、抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。

【0020】

ある実施態様では、高頻度可変領域は抗原結合の起因となるアミノ酸残基である。高頻度可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基(例えばV_L中のおよそ残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)の付近と、V_H中のおよそ31-35B(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)の付近(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(例えば、V_L中の残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)とV_H中の26-32(H1)、52A-55(H2)及び96-101(H3)(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含む。

【 0 0 2 1 】

各 V 領域は典型的には 3 つの相補性決定領域（それぞれが「高頻度可変ループ」を含む「CDR」と、適切な高次構造で CDR を保持し提示するためにそれらの間に散在した少なくとも 3 つ、好ましくは 4 つのフレームワーク領域を含むであろう。古典的な 4 本鎖抗体、例えば AP33 は、V_H 及び V_L ドメインが協働して定める抗原結合部位を有している。ある種の抗体、例えばラクダ及びサメ抗体は、軽鎖を欠き、重鎖のみによって形成される結合部位に依存する。結合部位が重鎖又は軽鎖によって形成され、V_H と V_L の間に協働がない単ドメイン操作免疫グロブリンを調製することができる。

10

本明細書と特許請求の範囲を通して、特に明記しない限りは、免疫グロブリン重鎖の正常ドメイン中の残基の番号付けは、ここに出典を明示して援用する Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) の E U インデックスのものである。「Kabat の E U インデックス」とはヒト IgG1 E U 抗体の残基番号付けを意味する。配列又は他の番号付けシステムを特に示さない限りは、V 領域内の残基は Kabat 番号付けに従って番号付けをする。

【 0 0 2 2 】

ここに記載される抗体又は抗体断片は単離され、又はどの程度でも精製されうる。ここで使用される場合、「単離された」は、抗体又は抗体断片がその天然の環境から取り除かれたことを意味する。ある実施態様では、その自然環境の汚染成分は、抗体の診断又は治療への使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、抗体は、(1) ローリー (Lowry) 法により定量して、95 重量%の抗体より多くなるほど、最も好ましくは 99 重量%より多くなるまで、(2) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N 末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも 15 の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは、(3) クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での SDS-PAGE による均一性が得られるように十分な程度まで精製される。抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製されるであろう。

20

「精製された」とは、抗体又は抗体断片の純度が増加し、その天然の環境で存在するよりもより純粋な形態で存在するようになった、及び / 又は最初に合成された及び / 又は実験室条件下で増幅されたことを意味する。純度は相対的な用語であり、必ずしも絶対純度を意味するものではない。

30

【 0 0 2 3 】

抗体「エフェクター機能」は抗体の Fc 領域 (天然配列 Fc 領域又はアミノ酸配列変異体 Fc 領域) に帰因するその生物学的活性を意味する。抗体エフェクター機能の例は、C1q 結合及び補体依存性細胞傷害性 (CDC) ; Fc レセプター結合 ; 抗体依存性細胞媒介細胞傷害 (ADCC) ; 食作用 ; 細胞表面レセプターのダウンレギュレーション (例えば B 細胞レセプター) ; 及び B 細胞活性化を含む。

40

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又は「ADCC」は、ある種の細胞傷害性細胞 (例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球、及びマクロファージ) 上に存在する Fc レセプター (FcR) に結合した分泌 Ig がこれらの細胞傷害性エフェクター細胞を抗原担持標的細胞に特異的に結合させ、ついで細胞毒で標的細胞を死滅せしめる細胞毒性の一形態を意味する。抗体は細胞傷害性細胞を「備え」、かかる死滅化に絶対的に必要とされる。ADCC を媒介する一次細胞である NK 細胞は、FcRII のみを発現する一方、単球は FcRI、FcRII 及び FcRIII を発現する。造血性細胞での FcR の発現は、Ravetch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象分子の ADCC 活性を評価するためには、米国特許第 550036

50

2号又は第5821337号又は米国特許第6737056(Presta)に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核球(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA), 95:652-656(1998)に開示されたような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

【0024】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。好ましくは、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMC及びNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は例えば血液のような天然源から単離されうる。

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを表す。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。更に、好ましいFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース阻害モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)の概説を参照)。FcRはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRもここにおける「FcR」なる用語によって包含される。該用語はまた胎児への母性IgGの移動(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節の原因である新生児レセプターFcRnもまた含む。

【0025】

国際公開第00/42072号(Presta)にFcRへの結合を向上または減弱させた抗体変異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

FcRnへの結合親和性について、一実施態様では、抗体のEC50又は見かけのKd(pH6.0での)は100nM、より好ましくは10nMである。FcRIII(F158; すなわち低親和性アイソタイプ)への増加した結合親和性について、一実施態様では、EC50又は見かけのKdは10nMであり、FcRIII(V158; 高親和性)について、EC50又は見かけのKdは3nMであった。FcRnへの結合の測定方法は知られており(例えばGhetie 1997, Hinton 2004を参照)、以下に記載される。インビボでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換ヒト細胞株、又はFc変異形ポリペプチドを投与された霊長類においてアッセイすることができる。ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体は、IgGFc内にアミノ酸変異を更に含んでおり、野生型IgGFcを有する抗体よりも少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、より好ましくは少なくとも100倍、好ましくは少なくとも125倍、更により好ましくは少なくとも150倍から約170倍に亢進したヒトFcRnへの結合親和性を示す。

【0026】

「補体依存性細胞傷害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的細胞を溶解するこ

10

20

30

40

50

とを意味する。古典的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、その同族抗原と結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているようにして実施することができる。

Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米国特許第6194551号及び国際公開第99/51642号に記載されている。それらの特許文献の内容は、出典明示によって特にここに援用する。またIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

ここで使用される場合、ここでの値又はパラメータについての「約」という記載は、その値又はパラメータ自体に関する変動を含む(また記述する)。例えば、「約X」との記載は「X」の記載を含む。

10

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「or」及び「the」には、明らかな別の記載がない限り複数形も含まれる。ここに記載の発明の態様及び変形例には、態様及び変形例「からなる」及び/又は「から本質的になる」が含まれる。

【0027】

ヒト化抗体

本発明はAP33に基づくヒト化抗HCV抗体を提供する。一般に、該抗体は少なくとも3つの認識可能なCDR又は高頻度可変ループと、少なくとも3つ、好ましくは4つのフレームワーク領域を含み、HCV E2タンパク質に結合する能力を保持している。該抗体はまた軽鎖定常領域及び/又は重鎖定常領域、好ましくは双方を含む。

20

「ヒト化抗体」なる用語は、少なくとも一つのヒト化抗体鎖(つまり、少なくとも一つのヒト化軽鎖又は重鎖 - 例えば少なくとも一つのヒト化可変軽鎖又は可変重鎖)を含む抗体を意味する。

【0028】

「ヒト化抗体鎖」(つまり、「ヒト化免疫グロブリン軽鎖」又は「ヒト化免疫グロブリン重鎖」)なる用語は、(実質的に)アクセプターヒト抗体からの可変フレームワーク領域及び実質的に非ヒトドナー抗体(例えばマウス抗体)からの相補性決定領域(CDR)(例えば少なくとも一つのCDR、好ましくは2つのCDR、より好ましくは3つのCDR)を含む可変領域を有し、場合によってはヒト由来の定常領域(例えば軽鎖の場合には少なくとも一つの定常領域又はその一部と、重鎖の場合は好ましくは3つの定常領域)を更に含む抗体鎖(つまりそれぞれ軽鎖又は重鎖)を意味する。また、アクセプターフレームワークの一又は複数の残基は結合親和性を増大させるためにドナーフレームワーク中に存在する残基に一致するように変異されうる。

30

【0029】

「ヒト化可変領域」(例えば「ヒト化軽鎖可変領域」又は「ヒト化重鎖可変領域」)なり用語は、実質的にヒト抗体からの可変フレームワーク領域と実質的に非ヒト抗体からの相補性決定領域(CDR)を含む可変領域を意味する。

非ヒトドナー抗体は、AP33と命名されたモノクローナル抗体であるか又はそれから誘導される。AP33モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、European Collection of Cell Culturesでのブタペスト条約下での寄託対象である(ECACC, CAMR Porton Down, Salisbury, Wiltshire. SP4 9JG; 寄託日: 2006年1月27日; 受託番号05122101)。

40

【0030】

ヒト化抗体はマウス又はキメラ抗体よりも免疫原性が少ない。キメラ抗体は、ヒト定常領域に結合した非ヒト抗体可変領域の全体を含む抗体である。よって、キメラ抗体では、可変領域は非ヒトドナー由来であり、定常領域はヒトである。キメラ抗体とそれらを作製する方法は例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6841-6855 (1984)に記載されている。それらはマウスモノクローナル抗体よりも免疫原性が少ない場合があるが、キメラ抗体の投与には、抗体の非ヒト部分に対するヒト免疫応答(HAMA)が伴う。キメラ抗体は

50

またヒト補体を活性化させA D C Cを媒介する能力のような適当な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共に適当な抗原結合特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによって生産されうる。一例は異なったアイソタイプのものとのF c領域の置換である。

【0031】

ヒト化抗体は、ヒト「アクセプター」抗体からのフレームワーク領域に結合した非ヒト「ドナー」抗体からのC D Rを含む抗体であるC D R移植抗体を含む。一般に、C D R移植抗体は、非ヒトドナー由来のものよりもヒトアクセプターヒト抗体由来の可変領域（フレームワーク）配列を含むので、キメラ抗体よりもよりヒト抗体配列を含む。よって、例えば、本発明のC D R移植ヒト化抗体は、ヒト抗体のフレームワーク領域（例えばヒト抗体のF R - 1、F R - 2、又はF R - 3）又は場合によってはヒト抗体の全フレームワーク領域の殆ど又は全て由来の連続アミノ酸配列（例えば約5以上、10以上、又は更には15以上の連続アミノ酸残基）を含む重鎖を含みうる。C D R移植抗体とそれらを製造するための方法はNature, 321: 522-525 (1986)に記載されている。ヒト化抗体を生産するために使用できる方法はまた例えば米国特許第5721367号及び同第6180377号に記載されている。

【0032】

ある実施態様では、ヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域残基が、マウス、ラット、ウサギ、又は所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の高頻度可変領域残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント又はアクセプター抗体）である。ある実施態様では、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域（F R）残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの変更は結合親和性のような抗体の性能を更に洗練するためになされる。ある実施態様では、ヒト化抗体は、F R領域は結合親和性を改善する一又は複数のアミノ酸置換を含みうるが、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリン配列のものに対応し、全てあるいは実質的に全てのF R領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものに対応する少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ある実施態様では、F R中のこれらアミノ酸置換の数はH鎖において6以下であり、L鎖において3以下である。ある実施態様では、ヒト化抗体は、また免疫グロブリン定常領域（F c）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。更なる詳細は、Jones等、Nature 321:522-525 (1986) ; Reichmann等、Nature 332:323-329 (1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。

【0033】

C D R移植抗体は、C D R環境の破壊のため結合活性の喪失を被りうる。これを部分的に是正するために、C D R移植に、抗原結合活性を回復させるために設計されたフレームワーク領域への変異を補充しうる。例えば欧州特許出願公開第0239400号を参照のこと。

ヒト化抗体は、ある種の溶媒暴露アミノ酸残基を置換してその免疫原性を減少させ又はその機能を亢進するように操作されたヒト化抗体である「ベニヤ(veneered)抗体」でありうる。ベニヤ化は非ヒトフレームワーク領域中の溶媒暴露残基を同定し、それらの少なくとも一つをヒトフレームワーク領域からの対応する表面残基と置換することを含みうる。ベニヤ化は任意の適切な操作技術によって達成することができる。

【0034】

ヒト化抗体は異種抗体でありうる。異種抗体は互いに結合された二以上の抗体又は抗体結合断片（F a b）であり、各抗体又は断片は異なった特異性を有している。

抗体、ヒト化抗体、ヒト操作抗体、及びその調製方法についての詳細は、Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001に見出すことができる。抗体のヒト化に対する更なる詳細は例えばQueen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国

10

20

30

40

50

特許第 5 5 3 0 1 0 1 号、米国特許第 5 5 8 5 0 8 9 号、米国特許第 5 6 9 3 7 6 1 号、米国特許第 5 6 9 3 7 6 2 号、国際公開第 9 0 / 0 7 8 6 1 号、及び米国特許第 5 2 2 5 5 3 9 号にまとめられている。

【 0 0 3 5 】

一実施態様では、配列番号： 6、配列番号： 7、配列番号： 1 9、又は配列番号： 2 0 の何れかに記載のアミノ酸配列を含むヒト化 A P 3 3 抗体の可変軽鎖ドメインが提供される。

他の実施態様では、配列番号 3 の位置 3 0、4 8、6 7、7 1、7 8 及び 9 4 にアミノ酸変異を含むヒト化 A P 3 3 抗体の可変重鎖ドメインが提供される。

アミノ酸変異は、一又は複数のアミノ酸残基の置換によって得ることができる。ある状況では、欠失又は挿入が許容されうる。変異は、例えば部位特異的突然変異誘発のような標準的な技術を使用して実施することができる。

適切には、アミノ酸変異は置換である。

他の実施態様では、可変重鎖ドメインは従って配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、又は配列番号： 1 8 の何れかに記載のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 6 】

可変軽鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片もまた提供される。

可変重鎖ドメインを含むヒト化抗体又はヒト化抗体断片もまた提供される。

軽鎖及び重鎖を含み、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域がここに定義された通りであるヒト化抗体又はヒト化抗体断片がまた提供される。

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、及び配列番号： 1 8 からなる群から選択された可変重鎖ドメインと、配列番号： 6、配列番号： 7、配列番号： 1 9、及び配列番号： 2 0 からなる群から選択された可変軽鎖ドメインを含む。

【 0 0 3 7 】

ある実施態様では、可変重鎖ドメインは、配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、及び配列番号： 1 8 からなる群から選択され、可変軽鎖ドメインは配列番号： 6 である。ある実施態様では、可変重鎖ドメインは、配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、及び配列番号： 1 8 からなる群から選択され、可変軽鎖ドメインは配列番号： 7 である。ある実施態様では、可変重鎖ドメインは、配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、及び配列番号： 1 8 からなる群から選択され、可変軽鎖ドメインは配列番号： 1 9 である。ある実施態様では、可変重鎖ドメインは配列番号： 1 3 であり、可変軽鎖ドメインは配列番号： 1 9 である。ある実施態様では、可変重鎖ドメインは、配列番号： 1 0、配列番号： 1 1、配列番号： 1 2、配列番号： 1 3、配列番号： 1 4、配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、及び配列番号： 1 8 からなる群から選択され、可変軽鎖ドメインは配列番号： 2 0 である。

【 0 0 3 8 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片は H C V に結合する。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、H C V E 2 タンパク質、可溶性 H C V E 2 タンパク質、又は H C V E 1 タンパク質及び H C V E 2 タンパク質のヘテロ二量体に結合可能である。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は H C V E 2 タンパク質に結合する。ある実施態様では、H C V E 2 タンパク質は、遺伝子型 1（例えば、遺伝子型 I a 及び遺伝子型 I b）、遺伝子型 2（例えば、遺伝子型 2 a、遺伝子型 2 b、遺伝子型 2 c）、遺伝子型 3（例えば、遺伝子型 3 a）、遺伝子型 4、遺伝子型 5、及び遺伝子型 6 からなる群から選択される H C V 遺伝子型の一又は複数由来である。ある実施態様では

、ヒト化抗体又はその断片はC D 8 1とのH C V E 2タンパク質の相互作用を阻害する。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は細胞中へのH C Vの移入を防止及び／又は阻害する。ある実施態様では、細胞は肝臓細胞、例えば、肝細胞である。

【 0 0 3 9 】

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、1 - 1 0 0 n Mの結合親和性をもって可溶型H C V E 2タンパク質に結合する。ある実施態様では、結合親和性は、1 - 1 0 n M、1 0 - 5 0 n M、又は5 0 - 1 0 0 n Mの何れかのおよその間である。ある実施態様では、結合親和性は約5 n M又は約5 0 n Mである。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、1 - 1 0 0 n Mの間の結合親和性をもってH C V E 1 / H C V E 2ヘテロ二量体に結合する。ある実施態様では、結合親和性は1 - 1 0 n M、1 0 - 5 0 n M、又は5 0 - 1 0 0 n Mの何れかのおよその間である。ある実施態様では、結合親和性は約5 n M又は約5 0 n Mである。ある実施態様では、抗体の結合親和性は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220 (1980)に記載のスクヤッチャード解析によって決定することができる。

【 0 0 4 0 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片はH C V感染を阻害する。ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片はH C V偽粒子(H C V p p)感染を阻害する。適切には、ここに記載のヒト化抗体は、H C V偽粒子感染を阻害可能であり、ここで、H C V p p中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価のI C 5 0は、遺伝子型1 (1 a H 7 7 2 0) に対しては少なくとも約0 . 0 3 2であり；遺伝子型1 (1 A 2 0 . 8) に対しては少なくとも約1 . 6であり；遺伝子型1 (1 B 5 . 2 3) に対しては少なくとも約0 . 9であり；遺伝子型2 (2 B 1 . 1) に対しては少なくとも約3であり；遺伝子型3 a (F 4 / 2 - 3 5) に対しては少なくとも約0 . 4 1であり；遺伝子型4 (4 . 2 1 . 1 6) に対しては少なくとも約0 . 4 1であり；遺伝子型6 (6 . 5 . 8) に対しては少なくとも約0 . 4 1であり；遺伝子型5 (5 . 1 5 . 1 1) に対しては少なくとも0 . 0 5 3である。ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片はH C V偽粒子感染を阻害することができ、ここで、H C V p p中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価のI C 5 0は、遺伝子型1 (I a H 7 7 2 0) に対して約0 . 4 1未満、約0 . 1 3 7未満、又は約0 . 3 2未満、遺伝子型1 (1 A 2 0 . 8) に対して約1 . 6、遺伝子型1 (1 B 5 . 2 3) に対して約0 . 9、遺伝子型2 (2 B 1 . 1) に対して約3、遺伝子型2 (2 a J F H 1) に対して約0 . 6 4、遺伝子型2 (2 A 2 . 4) に対して約0 . 5 1、遺伝子型3 (3 a F 4 / 2 - 3 5) に対して約0 . 4 1未満、遺伝子型4 (4 . 2 1 . 1 6) に対して約0 . 4 1未満、遺伝子型5 (5 . 1 5 . 1 1) に対して約0 . 0 5 3、又は遺伝子型6 (6 . 5 . 8) に対して約0 . 4 1未満の何れかである。

【 0 0 4 1 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体はH C V p p感染を阻害することができ、ここでH C V p p中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価のE C ₅₀は、遺伝子型I bに対して少なくとも約0 . 5 1 1であり、遺伝子型2 aに対して少なくとも約0 . 7 9 3である。

適切には、H C V p p中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価のI C 9 0は、遺伝子型1 (I a H 7 7 2 0) に対して少なくとも約0 . 6であり；遺伝子型1 (1 A 2 0 . 8) に対して少なくとも約1 5であり；遺伝子型1 (1 B 5 . 2 3) に対して少なくとも約8 . 3であり；遺伝子型2 (2 B 1 . 1) に対して少なくとも約1 5であり；遺伝子型3 a (D 4 / 2 - 3 5) に対して少なくとも約2 . 1 5であり；遺伝子型4 (4 . 2 1 . 1 6) に対して少なくとも約0 . 9 2であり；遺伝子型6 (6 . 5 . 8) に対して少なくとも約1 . 8であり；遺伝子型5 (5 . 1 5 . 1 1) に対して少なくとも0 . 8 2である。ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片はH C V偽粒子感染を阻害することができ、ここで、H C V p p中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価のI C 9 0は、遺伝子型1 (I a H 7 7

20) に対して約 0.41、約 2.4、又は約 0.6 未満であり、遺伝子型 1 (1A20.8) に対して約 1.5 未満であり、遺伝子型 1 (1B5.23) に対して約 8.3 未満であり、遺伝子型 2 (2B1.1) に対して約 1.5 より大きく、遺伝子型 2 (2aJFH1) に対して約 7 より大きく、遺伝子型 2 (2A2.4) に対して約 0.51 より大きく、遺伝子型 3 (3aF4/2-35) に対して約 0.41 未満であり、遺伝子型 4 (4.21.16) に対して約 6 未満であり、遺伝子型 5 (5.15.11) に対して約 0.82 未満であり、又は遺伝子型 6 (6.5.8) に対して約 1.8 未満の何れかである。

【0042】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片は組換え細胞培養誘導 HCV (HCVcc) 感染を阻害する。ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体は、HCVcc 感染を阻害することができ、ここで、HCVpp 中和アッセイによって判断される上記ヒト化抗体の存在下での感染力価の EC₅₀ は、遺伝子型 Ib に対して少なくとも約 0.72 であり、又は遺伝子型 2a に対して少なくとも約 1.7 である。

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は上記特性の一又は複数を示す。

【0043】

抗体工学

抗体の改変のための幾つかの技術は当該分野で知られている。一般に、抗体は、ドナー (非ヒト) 抗体由来の CDR をアクセプター (ヒト) 抗体フレームワークに移すことによって免疫原性が少なくされる；この手順は CDR 移植又はヒト化として知られている。この手順の不利な点は、ドナー及びアクセプターフレームワーク間の差異の結果として、結合活性が損なわれるか又は失われる場合があることである。更に、ある量の免疫原性は CDR 自体によって保持されうる。ペニヤ化、表面再構成 (resurfacing)、SDR 移送及び脱免疫を含む様々な相補的及び代替的技術がこれらの問題に対処するために提案されている。

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体は、非ヒトのソースからそれに導入された一又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と呼ばれ、これは典型的には「移入」可変ドメインに由来する。ヒト化は、本質的にヒト抗体の対応する配列を高頻度可変領域配列で置換することにより、Winter 及び共同研究者 (Jones 等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann 等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven 等, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)) の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4816567 号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基と、場合によっては幾つかの FR 残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

【0044】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽鎖及び重鎖何れも、抗体をヒトの治療用途を意図する場合、抗原性及び HAMA 応答 (ヒト抗マウス抗体) を減らすために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯類の配列に最も近いヒト V ドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク領域 (FR) をヒト化抗体に受け入れる (Sims 等 *J. Immunol.* 151:2296(1993); Chothia 等 *J. Mol. Biol.* 196:901(1987))。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列から得られた特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを数種の異なるヒト化抗体に使用することができる (Carter 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta 等 *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

【0045】

抗体は、抗原に対する高い親和性及びその他の望ましい生物学的特性を保持してヒト化されることが更に重要である。この目的を達成するために、好ましい方法では、親の配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び様々な概念上のヒト化産物を分析す

るプロセスにより、ヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の可能な三次元立体配置的構造を図解し表示するコンピュータプログラムが利用可能である。このような表示を調べることで、候補免疫グロブリン配列が機能する際に残基が果たすと思われる役割を分析することができ、つまり候補免疫グロブリンのその抗原に対する結合能に影響する残基を分析することができる。このようにして、レシピエント及び移入配列からFR残基を選択して組み合わせることにより、所望の抗体特性、例えば標的抗原に対する親和性の増大を達成することができる。一般に、高頻度可変領域残基は、抗原の結合への影響に直接的且つ最も実質的に関わっている。

抗体ヒト化は、例えば、欧州特許出願公開第460167号、欧州特許出願公開第682040号、米国特許第5530101号、米国特許第5585089号、米国特許第5693761号、米国特許第5693762号、米国特許第5766886号、米国特許第5821337号、米国特許第5859205号、米国特許第5886152号、米国特許第5887293号、米国特許第5955358号、米国特許第6054297及びUS6180370に記載されている。これらの方法は全て、抗原結合特異性を付与する原因のアミノ酸残基がヒト抗体可変領域のフレームワーク領域内に組み込まれるように抗体の可変領域を再設計することを含む。

【0046】

ある場合、非ヒト抗体の免疫原性部分はヒト抗体由来の残基によって置き換えられる（例えば米国特許第5712120号）。あるいは、抗体可変ドメインの表面上の残基を非ヒト可変ドメインを「表面再構成」するためにヒト抗体由来の残基によって置き換えることができる（例えば米国特許第5639641号）。表面再構成はPadlan（1991，欧州特許出願公開第0519596号）によって示唆され、「ペニヤ化」とも呼ばれる。この手順において、第一の（CDRのソース・ドナーの等価物）抗体の溶媒露出残基を第二の（「アクセプター」）抗体由来の残基によって置き換えられる。典型的には、第二抗体はヒト抗体である。溶媒隔絶残基、CDR、ドメイン間接触残基、及びCDRに直ぐに隣接する残基は全て第一の抗体におけるように残る。この方策は、完全な抗原結合活性を補助する第一抗体からの充填及び界面相互作用の全てを保持しながら第二抗体の表面を模倣するものである。これは、B細胞エピトープの数を減少させなければならない、（幾らかのTエピトープをまた減少させ、低い免疫原性に至らしめる。

【0047】

溶媒露出残基は、抗体の高分解能構造の検査によって同定される。ヒト化に関連する抗体の他の領域：CDRと接触し、マウス及びヒト抗体間で異なる埋もれた残基（齧歯類残基が使用される場合）；双方のドメインに対してCDRの近くに位置し抗原結合に所定の役割を果たしうるN末端領域；長い距離でさえる役割を担っている場合がまたある静電的相互作用。置換される表面残基の選択は、第一の抗体可変ドメインと第二の種由来の利用可能な配列のもの（個々か又はコンセンサス配列）の間の相溶性一致によって決定される。

米国特許第5639641号及び欧州特許出願公開第0592106A1号は表面再構成の代替法を記載している。ここで、第二の種のものに改変されなければならない溶媒露出残基がPadlanのものと類似の手順を使用するが、各位置に対して平均的な到達性を得る多数の構造を解析して、同定される。あるレベルを越える到達性を有する残基を調べ、抗体が使用される種からの抗体からのものと変えられる。置換される残基の選択は、全体の相溶性を有する抗体から又は溶媒露出残基のみを考慮して最も高い相溶性を持つ抗体からでありうる。

【0048】

国際公開第93/17105号及び米国特許第5766886号に記載されたヒト化法は、ヒト等価物に通常は安全に改変されうる低リスクの残基を同定する。これらの残基は溶媒露出性の傾向があり、よって、溶媒露出残基だけが変更されれば、この方法は表面再構成法に類似するものになるであろう。

表面再構成又はペニヤ化抗体を提供する正味の効果を有する2つの更なる手順が記載されている；欧州特許出願公開第0438310A1号及び欧州特許出願公開第0519596A1号を参照のこと。

更なる技術は、免疫応答に対するTの助けが利用できないか低減され、導入された抗体に対して最小の免疫応答を導くようにT細胞エピトープを同定し除去する（「デトープ(detope)」と呼ばれる）ことを探求している（米国特許第5712120号；欧州特許出願公開第0699755A2号）。B細胞エピトープがこの方法で無効にされる。

【0049】

抗体ヒト化技術はまた「Antibody Engineering」(Kontermann及びDhubel編), 40章 p567-592 (O'Brien及びJones)に教唆されている。

ある実施態様では、ヒト化抗体は、免疫コンジュゲートを生産するために一又は複数の細胞傷害剤と場合によってはコンジュゲートされる抗体断片、例えばFabでありうる。あるいは、ヒト化抗体は完全長抗体、例えば完全長IgG1抗体でありうる。

【0050】

抗体断片

本発明の範囲内としてまた考えられるものは、選択された標的に結合可能な抗体断片 - 例えばヒト化抗体断片 - で、Fv、ScFv、Fab'、F(ab')₂、dAbs、キメラ、CDR移植、及びヒト化抗体を含む操作された抗体、ファージディスプレイ又は代替技術を使用して製造された人工的に選択された抗体である。小断片、例えばdAbs、Fv、及びScFvは、その小さいサイズとその結果としての優れた組織分布のために診断及び治療用途に有利な性質を有している。

ある実施態様では、抗体断片は、完全長抗体の一部、一般にはその抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0051】

ある実施態様では、「Fv」は、完全な抗原-認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域ドメインの二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体の断片が提供される。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は抗原結合断片である。ある実施態様では、ヒト化抗体の抗原結合断片はHCVE2タンパク質、可溶性HCVE2タンパク質、又はHCVE1タンパク質とHCVE2タンパク質のヘテロ二量体に結合可能である。ある実施態様では、HCVE2タンパク質は、遺伝子型1（例えば、遺伝子型Ia及び遺伝子型Ib）、遺伝子型2（例えば、遺伝子型2a、遺伝子型2b、遺伝子型2c）、遺伝子型3（例えば、遺伝子型3a）、遺伝子型4、遺伝子型5、及び遺伝子型6からなる群から選択されるHCVE遺伝子型の一又は複数からのものである。

【0052】

典型的には、これらの断片は、少なくとも10⁻⁷、より典型的には10⁻⁸又は10⁻⁹の親和性での抗原への特異的結合性を示す。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は、1 - 100 nMの結合親和性で可溶性HCVE2タンパク質に結合する。ある実施態様では、結合親和性は、1 - 10 nM、10 - 50 nM、又は50 - 100 nMの何れかのおおよその間である。ある実施態様では、結合親和性は約5 nM又は約50 nMである。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、1 - 100 nMの結合親和性でHCVE1 / HCVE2ヘテロ二量体に結合する。ある実施態様では、結合親和性は1 - 10 nM、

10 - 50 nM、又は50 - 100 nMの何れかのおおよその間である。ある実施態様では、結合親和性は約5 nM又は約50 nMである。ある実施態様では、抗体の結合親和性は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220 (1980)に記載されたスキッチャード解析によって決定することができる。

ある実施態様では、これらの断片はここに記載のAP33モノクローナル抗体又はヒト化抗体と同じHCV中和活性を(実質的に)示す。ヒト化抗体断片は、別個の重鎖、軽鎖、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、及びFvを含む。断片は組換えDNA技術又はインタクトな免疫グロブリンの酵素的又は化学的分離によって生産される。

【0053】

ある実施態様では、ヒト化抗体断片は機能的断片である。ここに記載のヒト化抗体の「機能的断片」、例えばヒト化AP33抗体の機能的断片は、それらが誘導されるインタクトな完全長分子と実質的に同じ親和性をもってHCVへの結合を保持し、ここに記載のもののようなインビトロ又はインビボアッセイで測定して生物学的活性を示す断片である。ある実施態様では、機能的断片は、HCVpp及び/又はHCVcc中和アッセイによって示されるようにHCVを中和し、及び/又は阻害する。ある実施態様では、ヒト化抗体断片はCD81とのHCV E2タンパク質の相互作用を防止し及び/又は阻害する。ある実施態様では、ヒト化抗体断片は細胞中へのHCVの移入を防止及び/又は阻害する。ある実施態様では、細胞は肝臓細胞、例えば、肝細胞である。

【0054】

様々な技術が抗体断片の生産のために開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク分解消化を介して誘導された(例えばMorimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); 及びBrennan等, Science, 229:81 (1985)を参照)。しかしながら、これらの断片は今は組換え宿主細胞によって直接生産されうる。Fab、Fv及びScFv抗体断片は全て大腸菌中で発現され、分泌され得、よって多量のこれらの断片の容易な生産が可能になる。抗体断片は上で検討した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収され得、化学的にカップリングされてF(ab')₂断片を形成する(Carter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。他のアプローチによれば、F(ab')₂断片は組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含む増加したインビボ半減期を持つFab及びF(ab')₂断片は米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片の生産のための他の技術は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択される抗体は一本鎖Fv断片(scfv)である。国際公開第93/16185号; 米国特許第5571894号; 及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscfvは接触領域を欠くインタクトな結合部位を有する唯一の種である; よって、それらはインビボ使用での減少した非特異的結合に適している。sFv融合タンパク質はsFvのアミノ又はカルボキシ末端の何れかでエフェクタータンパク質の融合体を生じるように構築されうる。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。例えば米国特許第5641870号に記載されているように、抗体断片はまた「直鎖状抗体」でありうる。かかる直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性でありうる。抗原結合抗体断片は、インタクトな免疫グロブリンの酵素的又は化学的分離によって生産されうる。断片はまた組換えDNA技術によって生産することができる(例えば、King等, 1992 Biochem. J. 281, 317-323; Carter等, 1992 Biotechnology 10, 163-167)。選択された断片をコードする核酸セグメントは、関連した制限酵素での完全長コード化配列の消化によって、又は新規合成によって生産される。

【0055】

例えば、F(ab')₂断片は、Harlow及びLane (1988 "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に記載されたもののような標準方法を使用してpH3.0 - 3.5でのペプシンでのタンパク分解消化によってIgG分子から得ることができる。

Fab断片は、制限された還元によりF(ab')₂断片から、又は還元剤の存在下で

のパパインでの消化によって全抗体から得ることができる。

ヒト化抗体は当業者に明らかな多くの方法で特徴付けることができる。これらには、E L I S Aのような技術によるその濃度の、及びS D S - P A G Eによる抗体純度の、物理的測定が含まれる。また、ポリペプチドの効能は、E L I S A、表面プラズモン共鳴法(例えばB I A c o r e)又は免疫蛍光アッセイのように、溶液中又は固相系においてH C V E 2糖タンパク質への分子の結合を検出することによって、決定されうる。より特定のには、ポリペプチドの中和能は、例えばH C V p p及びH C V c c中和アッセイのような、ここに記載のようなH C V p p中和アッセイにおいて6つの既知の遺伝子型を表すH C V試料に対して試験することができる。

【0056】

10

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、H C Vの2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とH C V結合部位とが結合しうる。二重特異性抗体はまた細胞に細胞傷害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はH C V結合アーム及び細胞傷害剤(例えば、サポリン、抗インターフェロン- α 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばF(a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第96/16673号には、二重特異性抗E r b B 2 /抗F c R I I I抗体が記載されており、米国特許第5837234号には、二重特異性抗E r b B 2 /抗F c R I抗体が開示されている。二重特異性抗E r b B 2 /F c抗体は国際公開第98/02463号に示されている。米国特許第5821337号は、二重特異性抗E r b B 2 /抗C D 3抗体を教示するものである。

20

【0057】

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTraunecker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

30

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。好ましくは、該融合は、少なくともヒンジの一部、C_{H2}及びC_{H3}領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_{H1})を、融合の少なくとも一つに存在させることが好ましい。免疫グロブリン重鎖の融合体と、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

40

【0058】

このアプローチ法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造

50

は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

米国特許第5731168号に記載されている他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC_{H3}ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第二の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0059】

二特異性抗体は架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合しうる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公開第91/00360号、国際公開第92/00373号及び欧州特許出願公開第03089号)への用途が提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は任意の簡便な架橋方法によって作製できる。適切な架橋剤は当該分野において周知であり、多くの架橋法と共に米国特許第4676980号に記載されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)はインタクトな抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。生産された二重特異性抗体は酵素の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。

【0060】

最近の進歩により大腸菌からF a b'-S H断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体を形成する。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体F(a b')₂分子の産生について記述している。各々のF a b'断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。従って、形成された二重特異性抗体は、E r b B 2レセプターを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト乳房腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従っ

て、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 $F_v(sF_v)$ ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片の作製方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照のこと。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

【0061】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオでは、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここでの好ましい多価抗体は3から約8(しかし好ましくは4つ)の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖は $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ を有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖は、 $VH-CH1$ -可動性リンカー- $VH-CH1-Fc$ 領域鎖;又は $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 領域鎖を有し得る。ここでの多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドを更に有する。ここでの多価抗体は、例えば約2から約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。ここで考えられる軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを含み、場合によってはCLドメインを更に含む。

【0062】

他のアミノ酸配列修飾

ここに記載されたHCV結合抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び/又は生物学的特性を向上させることができれば望ましい。ヒト化AP33抗体のような抗HCV抗体のアミノ酸配列変異体は、抗HCV抗体の核酸に適切なヌクレオチド変化を導入して、又はペプチド合成により調製されうる。そのような修飾は、抗HCV抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望する特徴を有していれば、欠失、挿入及び置換をどのように組合せてもよい。またアミノ酸変化はグリコシル化部位の数又は位置のような、抗HCV抗体の翻訳後プロセスを変化させうる。

突然変異誘発に好ましい位置である抗HCV抗体のある残基又は領域の同定に有益な方法は、Cunningham及びWells Science, 244:1081-1085(1989)に開示されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の、又は負に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニン又はポリアラニン)で置換され、アミノ酸のHCV抗原との相互作用に影響を与える。ついで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、更なる又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定される必要はない。例えば、与えられた部位における突然変異のパフォーマンスを分析するために、標的コドン又は領域においてalaスキャニング又はランダム突然変異誘発を実施し、発現した抗HCV抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

【0063】

アミノ酸配列挿入には、１残基から１００以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ末端融合及び／又はカルボキシ末端融合、並びに単一又は複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例には、Ｎ末端メチオニル残基を持つ抗ＨＣＶ抗体又は細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗ＨＣＶ抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えばＡＤＥＰＴのための)酵素への抗ＨＣＶ抗体のＮ末端又はＣ末端の融合が含まれる。

他のタイプの変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗ＨＣＶ抗体中に異なった残基により置換される少なくとも一のアミノ酸残基を有する。置換突然変異について関心ある部位は高度可変領域を含むが、ＦＲ改変もまた考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して以下の表に示す。そのような置換が生物学的活性の変化をもたらすならば、表中に「例示的置換」と名前を付けた、又はアミノ酸クラスに関連して以下に更に記載されるより実質的な変化が、導入され得、産物がスクリーニングされうる。

【 ０ ０ ６ ４ 】

表 1.

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 ０ ０ ６ ５ 】

抗体の生物学的性質における実質的修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖の嵩の維持についてのその効果が有意に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, 2版, pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) :

(１) 無極性 : A l a (A) , V a l (V) , L e u (L) , I l e (I) , P r o (P) , P h e (F) , T r p (W) , M e t (M)

(2) 無電荷極性: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K), Arg (R), His (H)

【0066】

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる:

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性の親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

(3) 酸性: Asp、Glu;

(4) 塩基性: His、Lys、Arg;

(5) 鎖配向に影響する残基: Gly、Pro;

(6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【0067】

抗HCV抗体の適切な高次構造を維持することに関与していない任意のシステイン残基も、一般的には、セリンと置換して、分子の酸化的安定性を改善し、異常な架橋を防いでもよい。逆に、システイン結合をその抗体に付加して、その安定性を改善してもよい(特に抗体がFv断片などの抗体断片である場合)。

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えばヒト化抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して改善された生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6-7部位)を変異させて各部位においてあらゆる可能なアミノ酸置換を生成させる。このようにして生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とHCVの間の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体がひとたび生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

【0068】

抗体のアミノ酸変異体の他の型は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更する。ヒト化抗体又はその断片は非アミノ酸部分を含みうる。例えば、ヒト化抗体又はその断片はグリコシル化されうる。かかるグリコシル化は宿主細胞又は宿主生物中でのヒト化抗体又はその断片の発現中に天然に生じうるか、又はヒト介入から生じる慎重な修飾でありうる。変更とは、抗体に見い出される一又は複数の糖鎖部分の欠失、及び/又は抗体に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの

10

20

30

40

50

糖類のうち一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いることができる。

【0069】

グリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のもの)を含むように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

アミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で知られた様々な方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された変異体もしくは抗HCV抗体の非変異体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

エフェクター機能に関して、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)及び/又は補体依存性細胞傷害性(CDC)を向上させるために、本発明の抗体を修飾することが望ましい場合がある。これは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸置換を導入することで達成されうる。あるいは又は加えて、Fc領域にシステイン残基を導入することによってこの領域での鎖間のジスルフィド結合形成が起こりうる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は改善された内部移行能及び/又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照のこと。抗腫瘍活性が亢進されたホモ二量体抗体もまたWolff等, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製されうる。あるいは、抗体を二重Fc領域を持つように操作して、それによって補体媒介性溶解及びADCC能を亢進した。Stevenenson等, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

米国特許出願公開第2006/0067930号に記載されているように、抗体の血清半減期を増大させるために、アミノ酸改変を抗体中に行うことができる。

【0070】

他の抗体修飾

抗体の他の修飾がここで考察される。例えば、抗体は様々な非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーに結合されうる。また抗体は、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)にコロイド状薬物送達系(例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol A.編(1980)に開示されている。

加えてもしくはあるいは、ヒト化抗体又はその断片に他の化学修飾を施してもよい。一つのそのような望ましい修飾は一又は複数のポリエチレングリコール(PEG)部分の付加である。ペグ化はインビボで様々な抗体断片の半減期を有意に増大させることが示されている(Chapman 2002 Adv. Drug Delivery Rev. 54, 531-545)。しかしながら、抗体断片の無作為のペグ化は抗原に対する断片の結合親和性に非常に致命的な影響を持ちうる。これを避けるためには、ペグ化をヒト化抗体又はその断片の特定の標的残基に限定することが望ましい(Knight等, 2004 Platelets 15, 409-418及び上掲のChapmanを参照)。

【0071】

所望の性質を持つ抗体のスクリーニング

ある種の生物学的特徴を有する抗体は実験実施例に記載のようにして選択することができる。

興味ある抗体が結合するHCV E2タンパク質上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするためには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labo

10

20

30

40

50

ratory, Ed Harlow及びDavid Lane (1988)に記載されたもののような常套的な交差ブロックアッセイを実施することができる。このアッセイは、試験抗体が本発明の抗HCV E2抗体と同じ部位又はエピトープに結合するかどうかを決定するために使用することができる。あるいは、又は加えて、エピトープマッピングを当該分野で知られている方法によって実施することができる。例えば、抗体配列を例えばアラニンスキャニングによって変異誘発させ接触残基を同定することができる。変異体抗体は正しい折り畳みを確実にするためにポリクローナル抗体との結合について最初に試験される。異なった方法では、HCV E2タンパク質の異なった領域に対応するペプチドを、試験抗体又は試験抗体群及び特徴付けられた又は既知のエピトープの抗体との競合アッセイで使用することができる。

【0072】

10

ある実施態様では、抗体はまたHCV感染を中和するその能力についてスクリーニングすることができる。ある実施態様では、HCV感染の中和はここに記載されたHCV偽型粒子(HCVpp)中和アッセイに基づいている。HCVppはレトロウイルス又はレンチウイルスコア粒子に組み込まれた未修飾のHCVエンベローブ糖タンパク質からなる。HCVppはHCVエンベローブタンパク質依存式で肝細胞腫細胞株及び肝細胞に感染する。HCVpp内にパッケージされたマーカー遺伝子の存在により、抗体媒介性中和の迅速で信頼性のある決定が可能になる。ある実施態様では、HCV感染の中和は、ここに記載のヒト肝細胞腫細胞株に感染する組換え細胞培養誘導HCV(HCVcc)中和アッセイに基づいている。

【0073】

20

II. ポリヌクレオチド

本発明はまたポリヌクレオチドを提供する。ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼによりポリマー中に取り込まれうる任意の基質でありうる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含みうる。もし存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組立ての前後に付与されうる。

例えば、ポリヌクレオチドは、軽鎖又は重鎖のような全免疫グロブリン分子鎖をコードしうる。完全な重鎖は、重鎖可変領域(VH)ばかりでなく重鎖定常領域(CH)を含み、これは典型的には3つの定常ドメイン： C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} ；及び「ヒンジ」領域を含む。ある状況では、定常領域の存在が望ましい。例えば、抗体がHCV感染細胞を死滅させることが望まれる場合、完全な定常領域の存在は補体を活性化させるために望ましい。しかしながら、他の状況では、完全な定常領域の存在は望ましくない場合がある。

【0074】

30

ポリヌクレオチドは可変軽鎖及び/又は可変重鎖をコードしうる。

ポリヌクレオチドによってコードされうる他のポリペプチドは、抗原結合抗体断片、例えば単ドメイン抗体(「dAbs」)、Fv、scFv、Fab'及びF(ab')₂及び「ミニボディ」を含む。ミニボディは(典型的には)CH1及びCK又はCLドメインが切り取られた二価抗体断片である。ミニボディは一般的な抗体より小さいので、それらは臨床/診断用途では良好な組織浸透を達成するはずであるが、dAbsのような一価抗体断片よりも高い結合親和性を保持しなければならない二価である。従って、内容が矛盾しない限り、ここで使用される「抗体」なる用語は抗体分子全体ばかりでなく、上で検討したタイプの抗原結合抗体断片もまた包含する。

40

コードされたポリペプチドは典型的にはAP33のものと同一又は実質的に同一のCDR配列を有している一方、フレームワーク領域はヒト由来であるAP33のものとは異なる。よって、本発明のポリヌクレオチドは、AP33の重鎖及び/又は軽鎖(適切な場合)に対してここに記載された重鎖及び/又は軽鎖可変領域を有するポリペプチドを好ましくはコードする。コードされるポリペプチドが部分的な又は完全な重鎖及び/又は軽鎖定

50

常領域を含む場合、これはまた有利にはヒト由来のものである。

好ましくは、コードされるポリペプチドのフレームワーク領域の少なくとも一つ、最も好ましくはフレームワーク領域の各々は、ヒト化抗体の結合活性を増加させるために、A P 3 3 のものよりも類似するようにするヒトアクセプターに対するアミノ酸置換を含む。

【 0 0 7 5 】

好ましくは、コードされたポリペプチド中に存在する各フレームワークは、対応するヒトアクセプターフレームワークに対して少なくとも一つのアミノ酸置換を含む。よって、例えば、フレームワーク領域は、アクセプターフレームワーク領域に対して、全体で 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 のアミノ酸置換を含みうる。有利には、変異は、マウス A P 3 3 フレームワーク内の等価な位置に存在する残基に一致させるための逆突然変異である。好ましくは、6 の逆突然変異が重鎖及び軽鎖の一においてなされる。

10

適切には、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは、単離され、及び／又は精製されうる。ある実施態様では、ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは、単離されたポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドである。単離されたなる用語は、分子がその通常の又は自然の環境から除去され又は分離されており、又はそれがその通常の又は自然の環境では存在しないような形で製造されたことを示すものである。ある実施態様では、ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは精製されたポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドである。精製されたという用語は、少なくとも幾らかの汚染分子又は物質が除去されたことを示すものである。

20

【 0 0 7 6 】

適切には、ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは、関連したポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドが組成物中に存在する支配的な（つまり最も豊富な）ポリヌクレオチド又はポリペプチドを構成するように、実質的に精製される。

本発明は従ってここに記載された重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインをコードする挿入断片を含む組換え核酸を用いる。定義では、そのような核酸は、コード化一本鎖核酸、上記コード化核酸とそれに対する相補的核酸からなる二重鎖核酸、又はこれらの相補的（一本鎖）核酸自体を含む。

修飾はまた A P 3 3 抗体の重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインの外側に作製することもできる。そのような変異体核酸は、一又は複数のヌクレオチドが同じアミノ酸をコードする新しいコドンを持つ他のヌクレオチドによって置き換えられるサイレント変異でありうる。そのような変異体配列は縮重配列でありうる。縮重配列は元々コードされていたアミノ酸配列の変化を生じないで他のヌクレオチドによって限られない数のヌクレオチドが置き換えられる点で遺伝暗号の意味内で変性される。そのような縮重配列は、重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインの最適な発現を得るために特定の宿主、特に酵母、最近又は哺乳動物細胞によって好まれるその異なった制限部位及び／又は特定のコドンの頻度のために有用でありうる。

30

【 0 0 7 7 】

配列同一性又は配列相同性

本発明は、ここに定義された特定の性質を有するポリペプチドのアミノ酸配列又はそのようなポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列と配列同一性又は配列相同性の度合いを有する配列（以下「相同配列」と称す）の使用を包含する。ここで、「ホモログ」なる用語は、対象のアミノ酸配列及び対象のヌクレオチド配列とある相同性を有しているものを意味する。ここで、「相同性」なる用語は、「同一性」と等しくできる。

40

相同のアミノ酸配列及び／又はヌクレオチド配列は機能的活性を保持し及び／又は抗体の活性を亢進するポリペプチドを提供し及び／又はコードしなければならない。

【 0 0 7 8 】

本文脈では、相同配列は、対象配列と少なくとも 75、85、又は 90 % 同一であり、好ましくは少なくとも 95 又は 98 % 同一でありうるアミノ酸配列を含むものである。典型的には、相同体は対象アミノ酸配列と同じ活性部位等を含むであろう。相同性は類似性

50

(つまり、類似の化学的性質/機能を有しているアミノ酸残基)によってもまた考慮されるが、本発明の文脈では、配列同一性によって相同性を表現するのが好ましい。

本文脈において、相同配列は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(対象配列)と少なくとも75、85、又は90%同一であり、好ましくは少なくとも95又は98%同一でありうるヌクレオチド配列を含むものである。典型的には、相同体は対象配列と活性部位等をコードする同じ配列を含むであろう。相同性は類似性(つまり、類似の化学的性質/機能を有しているアミノ酸残基)によってもまた考慮されるが、本発明の文脈では、配列同一性によって相同性を表現するのが好ましい。

【0079】

相同性の比較は、目によって、又はより普通には直ぐに利用できる配列比較プログラムを用いて実施されうる。これら市販のコンピュータプログラムは二以上の配列間の相同性%を計算できる。

相同性%は近接配列にわたって計算されうる。つまり、一つの配列が他の配列と整列され、一配列中の各アミノ酸を、他の配列中の対応するアミノ酸と、一時に一残基で、直接比較する。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。典型的には、そのようなギャップなしのアラインメントは比較的短い数の残基に対してのみ実施される。

【0080】

これは非常に簡単で一貫した方法であるが、何か同一の配列対において、例えば一つの挿入又は欠失が次のアミノ酸残基をアラインメントから外れるようにし、よって全体のアラインメントが実施される場合に相同性%に大きな減少を潜在的に生じせしめることを考慮することに失敗している。従って、殆どの配列比較法は、過度に全体の相同性スコアにペナルティを課さないで可能な挿入及び欠失を考慮する最適なアラインメントをつくるように設計される。これは、局所的相同性を最大にすることを試みるために配列アラインメント中に「ギャップ」を挿入することによって達成される。

【0081】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同じ数の同一のアミノ酸に対して、-二つの比較した配列間での高い関連性を反映する-できる限り少ないギャップの配列アラインメントが多くギャップのものよりも高いスコアを達成するように、アラインメントで生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てる。ギャップの存在に対して相対的に高いコストを、ギャップ内にそれぞれの続く残基に小さいペナルティを負担させる「アフインギャップコスト」が典型的には使用される。これは最も一般的に使用されるギャップスコアシステムである。高いギャップペナルティはもちろんより少ないギャップの最適化されたアラインメントをつくり出す。殆どのアラインメントプログラムはギャップペナルティを変更することを許容している。しかしながら、配列比較のためにそのようなソフトウェアを使用する場合、デフォルト値を使用するのが好ましい。

【0082】

従って、最大の相同性%の計算は、先ずギャップペナルティを考慮に入れて、最適なアラインメントをつくり出すことを必要とする。そのようなアラインメントを実施するための適切なコンピュータプログラムはVector NTI (Invitrogen Corp.)である。配列比較を実施することができるソフトウェアの例は、限定されるものではないが、例えばBLASTパッケージ(Ausubel等, (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4版 - 18章参照)、BLAST2 (FEMS Microbiol Lett 174(2): 247-50 (1999); FEMS Microbiol Lett 177(1): 187-8(1999)を参照)、FASTA(Altschul等, J. Mol. Biol. 403-410 (1990))及びALIGNXを含む。少なくともBLAST、BLAST2及びFASTAはオフライン及びオンラインサーチに利用できる(Ausubel等, (1999) 7-58から7-60頁参照)。

【0083】

最終の相同性%は、同一性の面から測定することができるが、アラインメント法自体は典型的には全てか無かの対比較に基づいてはいない。その代わりに、化学的類似性又は進化的距離に基づく各ペアワイズ比較にスコアを割り当てるスケール化した類似性スコアマ

10

20

30

40

50

トリックスが一般に使用される。一般的に使用されるそのようなマトリックスの一例は、B L O S U M 6 2 マトリックス - B L A S T プログラムスーツのデフォルトマトリックスである。V e c t o r N T I プログラムは、公的なデフォルト値か又は供給されるならばあつらえられたシンボル比較表（更なる詳細は使用者用マニュアルを参照）の何れかを一般に使用する。幾つかの応用では、V e c t o r N T I パッケージに対するデフォルト値を使用することが好ましい。

【 0 0 8 4 】

あるいは、相同性パーセントは、C L U S T A L に類似のアルゴリズムに基づいて V e c t o r N T I (Invitrogen Corp.) における多重アラインメント特性を使用して計算することができる (Higgins DG & Sharp PM, Gene 73(1), 237-244 (1988))。

ひとたびソフトウェアが最適なアラインメントをつくり出したならば、相同性%、好ましくは配列同一性%を計算することができる。ソフトウェアは典型的には配列比較の一部としてこれを実施し、数値結果を生成する。

配列同一性を決定する場合にギャップペナルティが使用されるならば、好ましくは次のパラメータがペアワイズアラインメントに使用される。表 2 を参照のこと。

表2

BLASTに対して	
ギャップオープン	0
ギャップ伸張	0

CLUSTALに対して	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	Kトリプル
ギャップペナルティ	15	10	
ギャップ伸張	6.66	0.1	

【 0 0 8 5 】

一実施態様では、C L U S T A L は上で定義されたようなギャップペナルティ及びギャップ伸長を用いて使用することができる。

適切には、ヌクレオチド配列に関する同一性の度合いは、少なくとも 2 0 の近接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 3 0 の近接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 4 0 の近接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 5 0 の近接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 6 0 の近接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 0 0 の近接ヌクレオチドに対して決定される。

適切には、ヌクレオチド配列に関する同一性の度合いは、配列全体に対して決定される。

【 0 0 8 6 】

ハイブリダイゼーション

更なる態様では、ここに記載されたヌクレオチド配列にハイブリダイズ（例えば特異的にハイブリダイズ）可能な核酸配列が提供される。

ここで使用される「ハイブリダイゼーション」なる用語は、「核酸のストランドが塩基対形成を通して相補的ストランドと一緒にになるプロセスを含む。ハイブリダイゼーションの条件は、Berger及びKimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されているように、核酸結合複合体の融解温度 (T_m) に基づいており、以下に説明される定まった「ストリンジェンシー」を付与する。

最大のストリンジェンシーは典型的には約 5 以下の T_m で生じ；高ストリンジェンシーは約 5 から 1 0 以下の T_m；中程度のストリンジェンシーは約 1 0 から 2 0 以下の T_m；及び低ストリンジェンシーは約 2 0 から 2 5 以下の T_m である。当業者には理解されるように、最大のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは同一のヌクレオチド配列を同定し又は検出するために使用することができる一方、中程度の（又は低

い) ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは類似の又は関連した配列を同定し又は検出するために使用することができる。

【0087】

適切には、ここに記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能な核酸配列は、ここに記載のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下（例えば、 50 及び $0.2 \times SSC \{ 1 \times SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na_3 \text{シトレート } pH 7.0 \}$ でハイブリダイズ可能な配列である。

適切には、ここに提示されたヌクレオチド配列に高ストリンジェントな条件下（例えば、 65 及び $0.1 \times SSC \{ 1 \times SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na_3 \text{シトレート } pH 7.0 \}$ でハイブリダイズ可能な核酸配列である。

10

【0088】

本発明はまた本発明のヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能な配列に相補的であるヌクレオチド配列（ここに提示されたものの相補的配列を含む）に関する。

また本発明の範囲内に含まれるものは、中程度から最大のストリンジェンシーの条件下でここに提示されたヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列である。

【0089】

III. 組換え抗体の発現

また提供されるものは、ヒト化AP33抗体のようなここに記載された抗HCV抗体及びその断片をコードする単離された核酸、該核酸を含むベクター及び宿主細胞、及び該抗体の生産のための組換え技術である。ここに記載の抗体は組換え発現によって生産することができる。

20

ここに記載された軽鎖及び重鎖可変領域をコードする核酸を場合によっては定常領域に結合させ、発現ベクター中に挿入する。軽鎖及び重鎖を、同じ又は異なった発現ベクター中でクローニングすることができる。免疫グロブリン鎖をコードするDNAセグメントを、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクター中の制御配列に作用可能に連結させる。発現制御配列は、限定しないが、プロモーター（例えば、天然に付随するか異種性のプロモーター）、シグナル配列、エンハンサーエレメント、及び転写終結配列を含む。

適切には、発現制御配列は、真核生物宿主細胞（例えば、COS細胞 - 例えばCOS7細胞 - 又はCHO細胞）を形質転換し又は形質移入することができるベクター中の真核生物プロモーター系である。ベクターが適切な宿主中にひとたび導入されたならば、宿主がヌクレオチド配列の高レベルの発現、及び交差反応抗体の収集と精製に適した条件下に維持される。

30

これらの発現ベクターはエピソームとして又は宿主染色体DNAの一体部分として宿主生物中で典型的に複製可能である。

【0090】

選択遺伝子成分 - 一般に、発現ベクターは、典型的には、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするために選択可能マーカー（例えばアンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性又はネオマイシン耐性）を含む（例えば、Itakura等、米国特許第4704362号を参照）。ある実施態様では、選択遺伝子は、（a）例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、又はテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、（b）栄養要求性欠陥を補い、又は（c）例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

40

選択スキームの一例では、宿主細胞の増殖を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換される細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、ヒト化AP33抗体のようなここに記載の抗HCV抗体をコードする核酸の捕捉にコンピテントな細胞の同定を可能にす

50

るもの、例えば D H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び I I I、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

【 0 0 9 1 】

例えば、D H F R 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート (M t x) を含む培地において形質転換体の全てを培養することで最初に同定される。野生型 D H F R が用いられる場合に適切な宿主細胞は D H F R 活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞株 (例えば A T C C C R L - 9 0 9 6) である。

あるいは、ここに記載の抗体をコードする D N A 配列、野生型 D H F R 遺伝子、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (A P H) のような他の選択可能マーカーと共に形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞 (特に内在性 D H F R を含む野生型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシンあるいは G 4 1 8 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーに対する選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第 4 9 6 5 1 9 9 号を参照のこと。

【 0 0 9 2 】

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である (Stinchcomb 等, Nature, 282:39(1979))。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 第 4 4 0 7 6 号あるいは P E P 4 - 1 のようなトリプトファン内で増殖する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977) 。酵母宿主細胞ゲノムに t r p 1 破壊が存在することは、ついでトリプトファンの不存在下における増殖による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 欠損酵母株 (A T C C 2 0 6 2 2 あるいは 3 8 6 2 6) は、L e u 2 遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

また、1.6 μ m の円形プラスミド p K D 1 由来のベクターは、クルイヴェロマイシス (Kluyveromyces) 酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え仔ウシキモシンの大規模生産のための発現系が K.ラクティス (lactis) に対して報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株による組換え体成熟ヒト血清アルブミンの分泌のための安定した複数コピー発現ベクターもまた開示されている。Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【 0 0 9 3 】

シグナル配列成分 - ここに記載の抗 H C V 抗体、例えばヒト化 A P 3 3 抗体は、組換え的に直接ばかりでなく、好ましくはシグナル配列又は成熟タンパク質又はポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種ポリペプチドとの融合体ポリペプチドとしても生産することができる。好ましく選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる (つまり、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものである。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1 p p、又は熱安定エンテロトキシン I E リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列と置換できる。酵母の分泌では、天然シグナル配列を、例えば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー (サッカロミセス (Saccharomyces) 及びクルベロマイセス (Kluyveromyces) 因子リーダー)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルピカンス (C. albicans) グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第 9 0 / 1 3 6 4 6 号に記載のシグナルによって置換されうる。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用できる。

そのような前駆体領域の D N A を、ヒト化 A P 3 3 抗体のようなここに記載の抗 H C V 抗体をコードする D N A に読み枠を一致させてライゲートさせる。

【 0 0 9 4 】

複製起点 - 発現ベクターとクローニングベクターは共にベクターが一又は複数の選択された宿主細胞で複製するようにする核酸配列を含んでいる。一般に、クローニングベクターでは、この配列は、ベクターを宿主染色体 D N A とは独立に複製させるものであり、複

10

20

30

40

50

製起点又は自己複製配列を含む。そのような配列は様々な細菌、酵母、及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 からの複製起点は殆どのグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミド起点は酵母に対して適しており、様々なウイルス起点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V) が哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点成分は哺乳動物発現ベクターには必要ではない (S V 4 0 起点はただそれが初期プロモーターを含んでいるので典型的に使用される)。

【0095】

プロモーター成分 - 発現及びクローニングベクターは宿主生物によって認識されヒト化 A P 3 3 抗体のようなここに記載の抗体をコードする核酸に作用可能に結合しているプロモーターを通常含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、p h o A プロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c プロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモーターもまた抗 H C V 抗体をコードする D N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S . D .) 配列を含むであろう。

真核生物に対してのプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ 2 5 から 3 0 塩基上流に位置する A T リッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から 7 0 から 8 0 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである C N C A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルでありうる A A T A A A 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクター中に適切に挿入される。

【0096】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

増殖条件によって制御される転写の更なる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼに対するプロモーター領域、及びマルトース及びガラクトース利用の原因である酵素である。酵母発現に使用する適したベクター及びプロモーターは欧州特許出願公開第 7 3 6 5 7 号に更に記載されている。酵母エンハンサーもまた酵母プロモーターと共に有利に使用される。

【0097】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからのヒト化 A P 3 3 抗体のようなここに記載の抗 H C V 抗体の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、最も好ましくはサルウイルス 4 0 (S V 4 0) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、又は異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合性である限り、調節される。

S V 4 0 ウイルスの初期及び後期プロモーターは、S V 4 0 ウイルスの複製起点を更に含む S V 4 0 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主中で D N A を発現させる系が、米国特許第 4 4 1 9 4 4 6

10

20

30

40

50

号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞中でのヒト インターフェロン c D N A の発現について、Reyes等, Nature, 297: 598-601(1982)を参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0098】

エンハンサーエレメント成分 - より高等の真核生物によるヒト A P 3 3 抗体のようなここに記載の抗 H C V 抗体をコードしている D N A の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の S V 4 0 エンハンサー(100 - 270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサーエレメントについては、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、H C V 結合抗体コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0099】

転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びm R N A の安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのD N A 又はc D N A の5'、時には3'の非翻訳領域から一般に入手できる。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

ポリヌクレオチド配列(例えば、可変重鎖及び/又は可変軽鎖コード化配列及び任意成分の発現制御配列)を含むベクターは、細胞宿主のタイプに応じて変わるよく知られた方法によって宿主細胞に移入されうる。例えば、塩化カルシウム形質移入が一般に原核生物宿主に対して利用され、リン酸カルシウム処理、電気穿孔法、リポフェクション、微粒子銃又はウィルスベースの形質移入が他の細胞宿主に対して使用されうる。一般にはSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2版, 1989)を参照。哺乳動物細胞を形質転換させるために使用される他の方法は、the use of ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔法、及びマイクロインジェクションの使用を含む(一般には、上掲のSambrook等を参照)。トランスジェニック動物の生産に対しては、導入遺伝子を受精した卵母細胞中に微量注入することができ、又は胚性幹細胞のゲノム中に導入することができ、かかる細胞の核を除核した卵母細胞中に移すことができる。

【0100】

重鎖及び軽鎖を別個の発現ベクターにクローニングしたとき、ベクターを同時形質移入して発現させ、インタクトな免疫グロブリンのアセンブリを得る。ひとたび発現されると、全抗体、個々の軽鎖及び重鎖、又は他の免疫グロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、H P L C 精製、ゲル電気泳動等(一般的にはScopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)を参照)を含む当該分野の標準的な手順に従って精製することができる。少なくとも約90から95%の均一性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98から99%又はそれ以上の均一性が、薬学的用途のため、最も好ましい。

【0101】

コンストラクト

本発明はここに記載のポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクトを更に提供する。

典型的には、コンストラクトは、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの適切な宿主中における発現を可能にする発現ベクターである。コンストラクトは、例えば次のものの一又は複数を含みうる：宿主中で活性なプロモーター；一又は複数の調節配列、例えばエンハンサー；複製起点；及びマーカー、好ましくは選択可能マーカー。宿主は真核生物又は原核生物宿主でありうるが、真核生物（特に哺乳動物）宿主が好ましいであろう。適切なプロモーターの選択は明らかに使用される宿主細胞にある程度依存するが、ヒトウイルス、例えばHSV、SV40、RSV等からのプロモーターを含みうる。数多くのプロモーターが当業者に知られている。

コンストラクトは、3つの軽鎖高頻度可変ループ又は3つの重鎖高頻度可変ループを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みうる。あるいは、ポリヌクレオチドは、3つの重鎖高頻度可変ループ及び適切な長さの適切に可動性のリンカーによって結合させられた3つの軽鎖高頻度可変ループを含むポリペプチドをコードしうる。他の可能性は、単一のコンストラクトが軽鎖ループを含むものと重鎖ループを含むものの2つの別個のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みうることであり得る。別個のポリペプチドは独立に発現され得るか又は単一の共通のオペロンの一部を形成しうる。

【0102】

コンストラクトは、一又は複数の調節特性、例えばエンハンサー、複製起点、及び一又は複数のマーカー（選択可能等）を含みうる。コンストラクトは、プラスミド、酵母人工染色体、酵母ミニ染色体の形態を取り得、又はウイルス、特に弱毒ウイルス又はヒトに対して非病原性の類似物のゲノムの全て又は一部に組み込まれうる。

コンストラクトは、哺乳動物、好ましくはヒトの患者に安全に投与するために簡便に製剤化されうる。典型的には、それらは複数のアリコートで提供され、各アリコートは少なくとも一の正常な成人ヒト患者の効果的な免疫化のために十分なコンストラクトを含む。

コンストラクトは液体又は固形形態で提供され得、好ましくは、使用前に滅菌された水が典型的には再水和させられる凍結乾燥粉末として提供される。

コンストラクトは、コンストラクトの投与に応じて（例えば特異的抗体力価によって測定して）患者の免疫応答を増大させる効果を有するアジュバント又は他の成分と共に製剤化されうる。

【0103】

ベクター

「ベクター」なる用語は発現ベクター及び形質転換ベクター及びシャトルベクターを含む。

「発現ベクター」なる用語はインビボ又はインビトロ発現可能なコンストラクトを意味する。

「形質転換ベクター」なる用語は、該種のものであり得、又は異なった種のものでありうる一実体から他の実体に移され得るコンストラクトを意味する。コンストラクトがある種から他の種へ移され得る場合、例えば大腸菌プラスミドから細菌、例えばバシラス属に移される場合、形質転換ベクターはしばしば「シャトルベクター」と呼ばれる。それは大腸菌プラスミドから植物のアグロバクテリウムへ移すことができるコンストラクトでさえありうる。

【0104】

ベクターは、本発明で包含されるポリペプチドの発現をもたらすために以下の記載の適切な宿主細胞中に形質転換されうる。よって、更なる態様では、本発明は、本発明で使用するポリペプチドを調製するための方法であって、上に記載の発現ベクターで形質転換され又はそれが形質移入された宿主細胞を、ポリペプチドをコードするコード配列のベクターによる発現がもたらされる条件下で培養し、発現されたポリペプチドを回収することを含む方法を提供する。

ベクターは、例えば複製起点、場合によっては上記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター及び場合によってはプロモーターの制御因子を有するプラスミド、ウイルス又はファージベクターでありうる。

ベクターは当該分野でよく知られている一又は複数の選択可能なマーカー遺伝子を含むうる。

【0105】

宿主細胞

本発明は、ここに記載のポリヌクレオチド又はコンストラクトを含む宿主細胞 - 例えばインビトロ宿主細胞 - を更に提供する。宿主細胞は、例えば細菌、酵母又は他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞でありうる。

本発明は、本発明に係るポリペプチドを製造するように遺伝子操作されたトランスジェニック多細胞宿主生物をまた提供する。生物は例えばトランスジェニック哺乳類生物（例えばトランスジェニックヤギ又はマウス株）でありうる。

10

【0106】

大腸菌は使用することができる一原核生物宿主である。他の微生物宿主は、桿菌、例えばバチルス・スプチリス、及び他の腸内細菌科、例えばサルモネラ、セラチア、及び様々なシュードモナス種を含む。これらの原核生物宿主には、典型的には宿主細胞と適合性がある発現制御配列（例えば複製起点）を含む発現ベクターを作製することができる。また、任意の数の様々なよく知られたプロモーターが存在し、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ラクタマーゼプロモーター、又はファージからのプロモーター系ある。典型的には、プロモーターは、場合によってはオペレーター配列と共に発現を制御し、転写及び翻訳を開始させ完了させるためのリボソーム結合部位配列等を有する。

20

他の微生物、例えば酵母を発現に使用することができる。サッカロミセスは好ましい酵母宿主であり、発現制御配列（例えば、プロモーター）、複製起点、終結配列等を所望に応じて有する適切なベクターを含む。典型的なプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の解糖酵素を含む。誘導性酵母プロモーターは、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソチトクロムC、及びマルトース及びガラクトース利用の原因の酵素を含む。

【0107】

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養をまた用いて、ここに記載のヒト化抗体又はその断片を発現し、生産することができ、ある場合には好ましい（Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)を参照）。ある実施態様に対しては、真核生物細胞（例えば、COS7細胞）が好ましいが、これは異種タンパク質（例えばインタクトな免疫グロブリン）を分泌可能な多くの適切な宿主細胞株が当該分野で開発されているためであり、CHO細胞株、様々なCos細胞株、HeLa細胞、好ましくはミエローマ細胞株、又は形質転換されたB細胞又はハイブリドーマを含む。

30

ある実施態様では、宿主細胞は脊椎動物宿主細胞である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；ハムスター乳児腎細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）又はCHO-DP-12株；マウスのセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；サル腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA, ATCC CCL 2）；イヌ腎細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；パッファローラット肝細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳房腫瘍細胞（MMT060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)）；MRC5細胞；FS4細胞；及びヒト肝癌株（Hep G2）である。

40

【0108】

あるいは、抗体コード化配列を導入遺伝子中に取り込み、トランスジェニック動物のゲ

50

ノム内に導入し、続いてトランスジェニック動物の乳中で発現させることができる（例えばDeboer等，米国特許第5741957号、Rosen，米国特許第5304489号、及びMeade等，米国特許第5849992号を参照）。適切な導入遺伝子は、カゼイン又はラクトグロブリンのような乳腺特異的遺伝子由来のエンハンサー及びプロモーターに作用可能に連結した軽鎖及び／又は重鎖のコード配列を含む。

あるいは、ここに記載の抗体はトランスジェニック植物（例えばタバコ、トウモロコシ、ダイズ及びアルファルファ）において生産することができる。改善された「植物抗体」ベクター(Hendy等(1999) J. Immunol. Methods 231:137-146)及び形質転換性作物種の増加と組み合わせた精製方策が、かかる方法を、ヒト及び動物の治療法のためばかりでなく、工業的用途（例えば触媒抗体）のために組換え体免疫グロブリンを生産する実際的で効果的な手段にした。更に、植物生産抗体は安全で効果的であることが示され、動物誘導材料の使用を回避する。更に、植物及び哺乳動物細胞生産抗体のグリコシル化パターンの差は抗原結合又は特異性に殆ど又は全く影響を持たない。また、毒性又はHAMMAは、植物由来の分泌性二量体IgA抗体の局所経口投与を受ける患者には観察されなかった(Larrick等(1998) Res. Immunol. 149:603-608を参照)。

【0109】

完全長抗体、抗体断片、及び抗体融合タンパク質は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされていない場合、例えば治療用抗体が細胞傷害剤（例えば毒素）にコンジュゲートされ、免疫コンジュゲート自体が腫瘍細胞破壊に効果を示す場合、細菌中で生産することができる。完全長抗体はより大なる循環半減期を有している。大腸菌中での生産は速く、より費用効率が高い。細菌中での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、発現及び分泌を最適化するための翻訳開始領域(TIR)及びシグナル配列を記載している米国特許第5648237号(Carter等)、米国特許第5789199号(Joly等)、及び米国特許第5840523号(Simmons等)（これらの特許は出典明示によりここに援用される）を参照のこと。発現後、抗体は可溶性画分の大腸菌細胞ペーストから単離され、アイソタイプに応じて例えばプロテインA又はGカラムを通して精製することができる。最終の精製は、例えばCHO細胞中で発現された抗体を精製するためのプロセスと同様に実施することができる。

ヒト化AP33抗体のようなグリコシル化抗HCV抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。数多くのバキュロウイルス株及び変異株及びスポドブレタ・フルギベルダ(イモムシ)、ネッタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコのような宿主からの対応する許容可能な昆虫宿主細胞が同定されている。形質移入のための様々なウイルス株が公的に入手でき、例えば、オートグラファ・カルフォニカNPVのL-1変異株及びカイコNPVのBm-5株であり、かかるウイルスを、特にスポドブレタ・フルギベルダ細胞の形質移入のために、本発明に係るここでのウイルスとして使用することができる。

【0110】

抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔に生産され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生産される場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。Carter等, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の単離方法を記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の存在下で約30分間解凍する。細胞細片は遠心分離で除去できる。抗体が培地に分泌される場合、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はミリポアPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の増殖を防止してもよい。

【 0 1 1 1 】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテイン A の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリン F c ドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark 等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss 等, EMBO J. 5: 16 571575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリックスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成できるものより早い流量及び短い処理時間を可能にする。抗体が C_H3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM 樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上での SEPHAROSETM クロマトグラフィー (例えばポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される抗体に応じて利用可能である。

10

予備的精製工程に続いて、興味ある抗体及び汚染物質を含む混合液に、pH 約 2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度 (例えば約 0.025 M 塩) の溶出緩衝液を用いて低 pH 疎水性作用クロマトグラフィーを施すことができる。

20

【 0 1 1 2 】

I V . 抗体コンジュゲート

抗体は細胞傷害剤、例えば毒素又は放射性同位体とコンジュゲートされうる。ある実施態様では、毒素はカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウリスタチン E 及びその類似体又は誘導体が好ましい。

好ましい薬剤 / 毒素には、DNA 阻害剤、微小管重合化又は脱重合化阻害剤及び代謝阻害剤を含む。細胞傷害性剤の好ましいクラスには、例えば、酵素阻害剤、例としてジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、及びチミジル酸合成酵素阻害剤、DNA 干渉物質、DNA 切断物質、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリンファミリー薬剤、ピンカ剤、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞傷害性ヌクレオシド、プテリジンファミリー剤、ジイネネス (diynenes)、ポドフィロトキシン、及び分化誘導物質を含む。好ましい薬剤 / 毒素には、DNA 阻害剤、微小管重合化または脱重合化阻害剤及び代謝阻害剤を含む。細胞傷害性剤の好ましいものには、例えば、酵素阻害剤、例としてジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、及びチミジル酸合成酵素阻害剤、DNA 干渉物質、DNA 切断物質、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリンファミリー剤、ピンカ剤、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞傷害性ヌクレオシド、プテリジンファミリー剤、ジイネネス (diynenes)、ポドフィロトキシン、及び分化誘導物質を含む。そのクラスの特に有用なメンバーには、例としてメトトレキセート、メトプテリン (methopterin)、ジクロロメトトレキセート (dichloromethotrexate)、5 - フルオロウラシル、6 - メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、ロイロシン (leurosine)、ロイロシデイン (leurosideine)、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、N - (5, 5 - ジアセトキシペンチル) ドキソルビシン、モルフォリノ - ドキソルビシン、1 - (2 - クロエチル) - 1, 2 - ジメタンスルホニルヒドラジド、N⁸ - アセチルスぺルミジン、アミノプテリンメトプテリン、エスペラマイシン、マイトマイシン C、マイトマイシン A、アクチノマイシン、ブレオマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、タリソマイシン、ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体、例としてエトポシド又はエトポシドリン酸塩、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、タキソール、タキソテレ、レチノイン酸、酪酸、N⁸ - アセチルスぺルミジン、カンプトテシン、カリケアマイシン、プリオスタチン、セファロスタチン、アンサマイトシン、アクトシン、メイタンシノイド、例として DM - 1、メイタン

30

40

50

シン、メイタンシノール、N - デスメチル - 4 , 5 - デセボキシメイタンシノイド、C - 19 - デクロロメイタンシノイド、C - 20 - ヒドロキシメイタンシノール、C - 20 - デメトキシメイタンシノール、C - 9 - SHメイタンシノール、C - 14 - アルコキシメチルメイタンシノール、C - 14 - ヒドロキシまたはアセチルオキシメチルメイタンシノール、C - 15 - ヒドロキシノアセチルオキシメイタンシノール、C - 15 - メトキシメイタンシノール、C - 18 - N - デメチルメイタンシノール及び4 , 5 - デオキシメイタンシノール、アウリスタチン、例としてアウリスタチンE、M、PHE及びPE；ドロスタチン、例としてドロスタチンA、ドロスタチンB、ドロスタチンC、ドロスタチンD、ドロスタチンE（20 - エピ及び11 - エピ）、ドロスタチンG、ドロスタチンH、ドロスタチンI、ドロスタチン1、ドロスタチン2、ドロスタチン3、ドロスタチン4、ドロスタチン5、ドロスタチン6、ドロスタチン7、ドロスタチン8、ドロスタチン9、ドロスタチン10、deo - ドロスタチン10、ドロスタチン11、ドロスタチン12、ドロスタチン13、ドロスタチン14、ドロスタチン15、ドロスタチン16、ドロスタチン17、及びドロスタチン18；セファロスタチン、例としてセファロスタチン1、セファロスタチン2、セファロスタチン3、セファロスタチン4、セファロスタチン5、セファロスタチン6、セファロスタチン7、25' - エピ - セファロスタチン7、20 - エピ - セファロスタチン7、セファロスタチン8、セファロスタチン9、セファロスタチン10、セファロスタチン11、セファロスタチン12、セファロスタチン13、セファロスタチン14、セファロスタチン15、セファロスタチン16、セファロスタチン17、セファロスタチン18、及びセファロスタチン19を含む。

10

20

【0113】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ*Maytenus serrata*から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに援用する。

30

【0114】

メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含む免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに援用する。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。

40

例えば米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari等 Cancer Research 52: 127-131 (1992)に開示されたものを含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するための多くの連結基が存在している。連結基は、上記特許に開示されたジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不

50

安定基、又はエステラーゼ不安定基を含み、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0115】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])及びジスルフィド結合をもたらすN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、一般的なカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノール類似体のC-3位で形成される。

【0116】

興味ある他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされたヒト化AP33抗体のような抗HCV抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブピコモル濃度で二重鎖DNA破壊を生じせしめうる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全てAmerican Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 $_1^I$ 、 $_2^I$ 、 $_3^I$ 、N-アセチル- $_1^I$ 、PSAG及び $_1^I$ (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方とも、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって、抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞傷害効果が大きく向上する。

【0117】

放射性同位元素

HCV感染細胞を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含んでもよい。放射性コンジュゲートした抗HCV抗体の生産のために様々な放射性同位元素が利用される。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位元素が含まれる。コンジュゲートが診断用に使われる場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージング、MRIとしても知られている)用のスピン標識、例えばまたヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射又は他の標識は、既知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を

使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90 はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN 法 (Fraker 等 (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) は、ヨウ素-123 の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) に記載されている。

【0118】

抗体と細胞傷害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン (IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミダート HCL)、活性エステル類 (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類 (例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta 等, Science 238:1098 (1987) に記載されているようにして調製することができる。炭素-14 標識 1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸 (MX-DTPA) が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第 94/11026 号を参照のこと。リンカーは細胞中の細胞傷害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」でありうる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari 等, Cancer Research, 52: 127-131 (1992); 米国特許第 5208020 号) が使用され得る。

【0119】

V. 薬学的組成物

本発明において有用な薬学的組成物は治療的に有効な量のヒト化抗体又はその断片と薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤 (その組合せを含む) を含有しうる。

薬学的組成物はヒト及び獣医用医薬でのヒト又は動物への使用のためのものであり、典型的には薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤の任意の一又は複数を含む。治療用途のための許容可能な担体又は希釈剤は製薬分野でよく知られており、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) に記載されている。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー; アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤; 保存料 (例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチル又はベンジルアルコール; メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; 及び m-クレゾール); 低分子量 (約 10 残基未満) のポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸; グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物; EDTA 等のキレート化剤; スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖; ナトリウム等の塩形成対イオン; 金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質複合体); 及び/又は TWEENTM、PLURONICTM 又はポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0120】

薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、投与の意図された経路及び標準的薬学的実務に関して選択することができる。薬学的組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤として、- 又はこれらに加えて -、任意の適切なバインダー、滑剤、懸濁剤、コート剤又

は可溶化剤を含みうる。

保存料、安定化剤、染料及び更には香味料を薬学的組成物に提供することができる。保存料の例は、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及び p - ヒドロキシ安息香酸のエステルを含む。抗酸化剤及び懸濁剤をまた使用してもよい。

異なったデリバリー系に依存して異なった組成物 / 製剤条件がありうる。例を挙げると、本発明において有用な薬学的組成物は、製剤化されて、ミニポンプを使用して又は粘膜経路によって、例えば鼻用スプレー又は吸入のためのエアゾールとして又は摂取可能な溶液として、又は組成物が注射可能な形態に製剤化される非経口的に、例えばデリバリーでは、静脈内、筋肉内又は皮下経路によって投与されうる。あるいは、製剤は多数の経路によって投与されるように設計されうる。

10

【 0 1 2 1 】

ヒト化抗体又はその断片

ヒト化抗体又はその断片はシクロデキストリンとの併用でまた使用されうる。シクロデキストリンは薬剤分子と封入及び非封入複合体を形成することが知られている。薬剤 - シクロデキストリン複合体の形成は、溶解度、解離速度、生物学的利用能及び / 又は薬剤分子の安定性特性を改変しうる。薬剤 - シクロデキストリン複合体は殆どの投薬形態及び投与経路に対して一般に有用である。薬剤との複合体化を行わしめる代替法として、シクロデキストリンを補助添加剤として、例えば担体、希釈剤又は可溶化剤として使用することができる。 、 、 及び シクロデキストリンが最も一般的に使用されており、適切な例は国際公開第 9 1 / 1 1 1 7 2 号、国際公開第 9 4 / 0 2 5 1 8 号及び国際公開第 9 8 / 5 5 1 4 8 号に記載されている。

20

薬学的組成物はまた所望されるならばリポソーム、ミクロスフィア、又は他のポリマーマトリックス中に導入することもできる。例えばリン脂質又は他の脂質からなるリポソームは、作製及び投与が比較的簡単な非毒性で、生理学的に許容可能で、代謝可能な担体である。

【 0 1 2 2 】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させうる。このような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences 16 版, Osol, A. 編 (1980) に開示されている。

30

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の適切な例は、アンタゴニストを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第 3 7 7 3 9 1 9 号)、L-グルタミン酸と エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば LUPRON DEPOSITTM (乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

40

【 0 1 2 3 】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

ヒト化抗体又はその断片は、治療されている患者においてインサイツでさえ調製されうる。この点、上記ヒト化抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列は、上記タンパク質が上記ヌクレオチド配列から発現されるように非ウイルス技術(例えば、リポソームの使用により)及び / 又はウイルス技術(例えば、レトロウイルスベクターの使用によって)送達されうる。

薬学的組成物はここに記載の方法の何れかにおいて使用されうる。

50

薬学的組成物は、H C V 感染の発症を予防し又は低減 / 減少させるために H C V に感染しやすい患者（例えばヒト）に使用されうる。

【 0 1 2 4 】

薬学的組成物は、H C V に既に感染した患者（例えばヒト）に、つまり H C V 感染を治療するために、使用されうる。かかる治療は、肝臓移植を受ける感染患者を含む急性又は慢性感染者である患者からのウイルスの排除を容易にしうる。

よって、更なる態様では、本発明は、C 型肝炎ウイルス感染の治療及び / 又は予防のための方法であって、ヒト化抗体又はヒト化抗体断片又は薬学的組成物の使用を含む方法を提供する。適切には、有効量のヒト化抗体又はそのヒト化抗体又は薬学的組成物が患者に投与される。ある実施態様では、ヒト化抗体又はヒト化抗体断片は、限定するものではないが、H C V 感染の一又は複数の症状又は H C V 感染の側面を寛解させることを含む有益な臨床結果を生じるために治療的に有効量で投与される。ある実施態様では、ヒト化抗体又はヒト化抗体断片は、H C V のウイルス力価及び / 又はウイルス負荷を低減させるために治療的に有効な量で投与される。

【 0 1 2 5 】

患者における C 型肝炎ウイルス感染の治療及び / 又は予防に使用されるヒト化抗体又はその断片又は薬学的組成物がまた提供される。

患者における C 型肝炎ウイルス感染の治療及び / 又は予防のための組成物の製造におけるヒト化抗体又はその断片又は薬学的組成物の使用がまた提供される。

抗体は、例えば免疫血清の形態で投与され得、又はより好ましくは精製された組換え又はモノクローナル抗体でありうる。所望の特異性を有する血清又はモノクローナル抗体を製造する方法は常套的であり、当業者にはよく知られている。当業者であれば、抗体を、例えば注射、挿管、座剤を介して、経口的又は局所的（その後者は受動的でありうる）、例えば抗体を含む軟膏又は粉剤の直接的適用、又は例えば鼻用スプレー又は吸入剤を使用する能動的なものの含む様々な経路で投与することができることは分かる。抗体はまた望まれるならば組成物の一成分が適切な噴霧剤である局所スプレーとして投与することもできる。

【 0 1 2 6 】

ここに記載のヒト化抗体及びその断片は、既知の方法に従って、例えば静脈内投与により、例えば、ボラスとして又は所定の時間にわたる連続注入によって、皮下、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、関節内、滑液嚢内、くも膜下腔内、又は吸入経路で、一般には静脈内又は皮下投与によって、投与することができる。

好ましくは、投与される抗体は実質的に精製される（例えば S D S - P A G E によって判断して、好ましくは少なくとも 9 5 % の均一性、より好ましくは少なくとも 9 7 % の均一性、最も好ましくは少なくとも 9 8 % の均一性）。

適切には、受動免疫治療法は、簡便には、ここに記載のヒト化抗体又はその断片の投与、及び / 又は他の抗ウイルス治療化合物との併用での抗体の投与を含みうる。最近、このような受動免疫法は H I V 感染を安全に治療するために使用されている（Armbruster 等, J. Antimicrob. Chemother. 54, 915-920 (2004) ; Stiegler 及び Katinger, J. Antimicrob. Chemother. 51, 757-759 (2003) ）。

【 0 1 2 7 】

本発明の能動又は受動免疫法は、上述のコンセンサスペプチドエピトープのものに対して幾つかのアミノ酸差異を含む非常に希な変異体分離株（例えば以下の U K N 5 . 1 4 . 4 によって実証されているもの）を除いて、H C V の遺伝子型 1 - 6 の何れかのウイルスでの感染に対して個体を保護又は治療することを可能にするはずである。

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は第二の治療剤との併用で投与されうる。ある実施態様では、第二の治療剤は抗ウイルス剤である。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、第二の治療剤と組み合わせられて、それと連続して、それと同時に、それと逐次的に、それとローテーションされて、又はそれと間欠的に投与される。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片と第二の治療剤の併用投与は、H C V の一又は複数の症

状を寛解させ、ウイルス力価及び／又はウイルス負荷を低減させ、及び／又は抑制し、及び／又はヒト化抗体又はその断片又は第二治療剤単独での治療よりもHCVを予防する。

【0128】

VI. 診断

また更なる態様では、試料中のHCVの存在を決定し又は検出するための診断試験装置及び方法が提供される。該装置は、試薬として、ここに記載の一又は複数のヒト化抗体又はその断片を含みうる。抗体は例えば固形担体（例えばマイクロタイターアッセイプレート、又は特定の支持体）に固定され得、試料（例えば血液又は血清試料又は他の臨床検体 - 例えば肝臓生検）からHCV粒子を「捕捉する」ように機能する。捕捉されたウイルス粒子はついで例えば捕捉ウイルス粒子に結合する更なる標識試薬を添加することによって検出されうる。簡便には、アッセイはELISA、特にサンドウィッチタイプのELISAの形態を採りうるが、免疫クロマトグラフィー又はディップスティックタイプアッセイを含む任意の他のアッセイ形態も原理的には採用できる（例えばラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット）。

診断目的に対しては、ここに記載のヒト化抗体又はその断片は標識されても又は未標識でもよい。未標識抗体は他の標識抗体（第二抗体）との併用で使用できる。あるいは、抗体は直接標識されうる。広範囲の標識を用いることができ、例えば放射性核種、蛍光、酵素、酵素基質、酵素共因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）等である。数多くのタイプのイムノアッセイが利用でき、当業者によく知られている。

【0129】

ここに記載のヒト化抗体又はその断片は遺伝子型1 - 6の何れかからのHCVに結合できるので、アッセイ装置及び対応する方法はこれらの遺伝子型の何れか由来のHCVを試料中に検出することができるはずである。

ある実施態様では、試料はコントロール試料と比較される。ある実施態様では、コントロール試料は、HCVに感染していることが知られている個体からのものである。ある実施態様では、個体は、遺伝子型1（例えば、遺伝子型Ia及び遺伝子型Ib）、遺伝子型2（例えば、遺伝子型2a、遺伝子型2b、遺伝子型2c）、遺伝子型3（例えば、遺伝子型3a）、遺伝子型4、遺伝子型5、及び遺伝子型6からなる群から選択される一又は複数のHCV遺伝子型に感染していることが知られている。ある実施態様では、コントロール試料はHCVに感染していないことが知られている個体からのものである。

【0130】

ある実施態様では、記載された治療方法の何れも、ここに記載のヒト化抗体又はその断片の何れかによる試料中のHCVの決定又は検出に基づいている。ここで使用される場合、「に基づく」は、（1）ここに記載の患者の特性を評価し、決定し、又は測定すること（及び好ましくは治療を受けるのに適した対象を選択すること）と；（2）ここに記載の治療を投与することを含む。

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片での治療に適した又は適していない（不適である）個体を同定する方法が提供される。

【0131】

薬剤

更なる態様では、ここに記載のヒト化抗体又はその断片の中和活性の効能を改善又は亢進する薬剤を同定するためのアッセイ方法が提供される。

ここに提供されるものは、C型肝炎ウイルスに対するヒト化抗体又はその断片の中和活性の効能を改善又は亢進する薬剤を同定するためのアッセイであって、（a）試験される薬剤に上記ヒト化抗体又はその抗原結合断片を接触させ；（b）薬剤がC型肝炎ウイルスの感染力を中和するヒト化抗体又はその断片の効能を改善又は亢進するかどうかを決定する工程を含むアッセイである。

ある実施態様では、C型肝炎ウイルスに対するヒト化抗体又はその断片の中和活性の効能を改善又は亢進する薬剤の能力をコントロールと比較する。ある実施態様では、コントロールは、薬剤の不存在下でのヒト化抗体又はその断片である。ある実施態様では、コン

トロールは、プラシーボ、例えば水、生理食塩水、砂糖水等とのヒト化抗体又はその断片である。

【 0 1 3 2 】

ここで使用される場合、「薬剤」なる用語は、単一の物質であり得、又は物質の組合せでありうる。

薬剤は、有機化合物又は他の化学物質でありうる。薬剤は、天然であれ人工であれ、任意の適した供給源から得ることができるか、それによって生産される化合物でありうる。薬剤はアミノ酸分子、ポリペプチド、又はその化学的誘導体、又はそれらの組合せでありうる。薬剤は更にはポリヌクレオチド分子であり得、これはセンス又はアンチセンス分子でありうる。薬剤は抗体でさえありうる。

10

薬剤は、ペプチド、並びに他の化合物、例えば小有機分子を含みうる化合物のライブラリーから設計され又は得られうる。

【 0 1 3 3 】

例を挙げると、薬剤は天然の物質、生物学的巨大分子、又は細菌、真菌、又は動物（特に哺乳動物）細胞又は組織から作製された抽出物、有機又は無機分子、合成薬剤、半合成薬剤、構造又は機能模倣剤、ペプチド、ペプチド模倣薬、誘導体化剤、全タンパク質から切断されたペプチド、又は合成的に（例えば例を挙げると、ペプチド合成機を使用するか、組換え技術又はその組合せによって）合成されたペプチド、組換え体薬剤、抗体、天然又は非天然薬剤、融合タンパク質又はその等価物及びその変異体、誘導体又は組合せでありうる。

20

【 0 1 3 4 】

典型的には、薬剤は有機化合物であろう。典型的には、有機化合物は二以上のヒドロカルビル基を含む。ここで、「ヒドロカルビル基」なる用語は、少なくともCとHを含み、一又は複数の他の適切な置換基を含んでいてもよい基を意味する。かかる置換基の例は、ハロ - 、アルコキシ - 、ニトロ - 、アルキル基、環状基等を含みうる。置換基が環状基である可能性に加えて、置換基の組合せが環状基を形成しうる。ヒドロカルビル基が一を越えるCを含んでいるなら、その炭素は必ずしも互いに結合している必要はない。例えば、炭素の少なくとも2つは適切な元素又は基を介して結合しうる。よって、ヒドロカルビル基はヘテロ原子を含みうる。適切なヘテロ原子は当業者に明らかであり、例えば硫黄、窒素及び酸素を含む。ある用途では、好ましくは、薬剤は少なくとも一つの環状基を含む。環状基は多環式基、例えば非縮合多環式基でありうる。ある用途では、薬剤は他のヒドロカルビル基に結合した上記環状基の少なくとも一つを含む。

30

薬剤はハロ基を含みうる。ここで、「ハロ」はフルオロ、クロロ、ブロモ又はヨードを意味する。

薬剤は、非分岐又は分岐鎖でありうる、アルキル、アルコキシ、アルキレン及びアルケニレン基の一又は複数を含みうる。

【 0 1 3 5 】

V I I . 治療用途

ヒト化抗HCV抗体及びその断片又はこれを含む薬剤学的組成物は、HCV感染の低減、排除又は阻害に有用であり、少なくとも部分的にHCV感染によって特徴付けられる任意の病理症状を治療するために使用することができる。ヒト化抗体及びその断片及び/又は薬剤学的組成物は、HCV感染を治療するために使用することができるヒト化抗体及びその断片及び/又は薬剤学的組成物はHCV感染を予防するために方法においてもまた使用することができる。

40

「C型肝炎ウイルス」又は「HCV」なる用語は当該分野でよく理解されており、フラビウイルス科のヘパシウイルス属のメンバーであるウイルスを意味する。HCVは陽性ストランドRNAゲノムを持つおよそ55 - 65 nm直径の脂質エンベロープウイルスである。C型肝炎ウイルス種は各遺伝子型内に幾つかのサブタイプを有する6つの遺伝子型（1 - 6）に分類される。ある実施態様では、患者は遺伝子型1（例えば、遺伝子型I a及び遺伝子型I b）、遺伝子型2（例えば、遺伝子型2 a、遺伝子型2 b、遺伝子型2 c）

50

、遺伝子型 3（例えば、遺伝子型 3 a）、遺伝子型 4、遺伝子型 5、及び遺伝子型 6 からなる群から選択される一又は複数の H C V 遺伝子型に感染する。北米では、遺伝子型 I a が支配的で、1 b、2 a、2 b、及び 3 a が続く。欧州では、遺伝子型 1 b が支配的で、2 a、2 a、2 b、2 c、及び 3 a が続く。遺伝子型 4 及び 5 はほぼもっぱらアフリカで見出される。

【 0 1 3 6 】

ここに提供されるものは、有効量のここに記載のヒト化抗体断片を投与することを含むヒトの C 型肝炎ウイルス感染を治療する方法である。ある実施態様では、「治療」又は「治療する」は、臨床結果を含む有益な又は望ましい結果を得るためのアプローチである。この発明の目的に対して、益な又は望ましい臨床結果は、限定されないが、次のものの一又は複数を含む：疾患から生じる一又は複数の症状の減少、疾患の程度の減少、疾患の安定化（例えば、疾患の悪化の防止又は遅延化）、疾患の進行の遅延化又は減速化、疾患状態の寛解、疾患を治療するために必要とされる一又は複数の他の医薬の用量の減少、及び / 又は生活の質の増加。

【 0 1 3 7 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗 H C V 抗体及びその断片又はこれを含有する薬学的組成物は急性 H C V 感染の治療方法において有用である。ある実施態様では、急性 H C V 感染の治療は、急性 H C V 感染を減少させ、除去し、又は阻害することを含む。ここで使用される「急性 C 型肝炎ウイルス感染」又は「急性 H C V 感染」なる用語は、H C V 感染後の最初の 6 ヶ月を意味する。ある実施態様では、急性 H C V 感染の患者は如何なる症状も発しない（つまり、急性 H C V 感染の症状がない）。急性 H C V 感染の患者の 60 % から 70 % は、急性期の間、症状を発しない。ある実施態様では、急性 H C V 感染の患者は症状を発する。ある実施態様では、ここに記載の治療方法は、急性 H C V 感染の一又は複数の症状を寛解（例えば発症の低減、期間の低減、重篤度の低減又は減少）させる。急性期症状を経験しない少数の患者では、症状は一般に穏やかで非特異的であり、希にしか C 型肝炎の特定の診断に至らない。急性 C 型肝炎感染の症状は、食欲減少、疲労、腹痛、黄疸、痒み、及びインフルエンザ様症状を含む。ある実施態様では、急性 H C V 感染の患者は遺伝子型 1 の H C V に感染する。遺伝子型 1 の急性 H C V インジェクション中の治療は慢性感染に必要とされる治療時間の半分で 90 % を越える成功率を有している。

【 0 1 3 8 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗 H C V 抗体及びその断片又はこれを含有する薬学的組成物は、慢性 H C V 感染を治療する方法において有用である。ある実施態様では、慢性 H C V 感染の治療は、慢性 H C V 感染の低減、除去、又は阻害を含む。ここで使用される「慢性 C 型肝炎ウイルス感染」又は「慢性 H C V 感染」なる用語は、6 ヶ月を越えて続いている H C V 感染を意味する。ある実施態様では、ここに記載の治療方法は、慢性 H C V 感染の一又は複数の症状を寛解（例えば発生率の低減、期間の低減、重篤度の低減又は減少）させる。慢性 H C V 感染の症状には、疲労、顕著な体重減少、インフルエンザ様症状、筋肉痛、関節痛、間欠低悪性度発熱、痒み、睡眠障害、腹痛（特に右上腹部）、食欲変化、嘔気、下痢、胃腸障害、認知変化、鬱病、頭痛、及び気分変動が含まれる。ひとたび慢性 H C V が肝硬変に進行したならば、減少した肝機能又は増加した肝循環圧（門脈圧亢進症として知られる症状）の何れかによって引き起こされる徴候及び症状が現れうる。肝硬変の可能な徴候及び症状には、腹水、挫傷及び出血傾向、骨痛、静脈瘤（特に胃及び食道のもの）、脂肪便（脂肪便症）、黄疸、及び肝性脳症として知られる認知障害症候群が含まれる。ある実施態様では、慢性 H C V 感染は肝細胞癌（H C C）となりうる。慢性 H C V 感染は更に慢性活動性 H C V 感染及び慢性遷延性 H C V 感染の二つのタイプ（その何れか又は双方がここに提供される治療方法に含まれる）に分けることができる。慢性活動性 H C V 感染は肝臓に活動性損傷を生じる H C V である。慢性遷延性 H C V 感染は、前に存在している損傷は存在しうるけれども肝臓に現在は損傷を生じない慢性 H C V 感染である。

【 0 1 3 9 】

ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片を、肝移植術の前、同時、又はその後に H C V 感染患者に投与することができる。

何れかの治療方法の幾つかの実施態様では、ここに記載のヒト化抗 H C V 抗体及びその断片又はこれを含む含有する薬学的組成物は、H C V 感染の一又は複数の側面を抑制することを含む治療方法において有用である。ある実施態様では、H C V 感染は慢性 H C V 感染である。ある実施態様では、H C V 感染は急性 H C V 感染である。ある実施態様では、ここに記載の方法は、H C V 不随の研究室所見（例えば、血液中の A L A T、A S T、及び G G T P レベル）、ウイルス複製、ウイルス力価、ウイルス負荷、又はウイルス血症を抑制する。

【 0 1 4 0 】

ある実施態様では、ここに記載の方法はウイルス力価を抑制又は低減する。「ウイルス力価」は当該分野で知られており、与えられた生物学的試料中のウイルスの量を示す。ある実施態様では、ここに記載の方法はウイルス血症を抑制又は低減する。「ウイルス血症」は当該分野では血流中のウイルスの存在及び / 又は血液又は血清試料中のウイルス力価として知られている。ある実施態様では、ここに記載の方法は、ウイルス負荷を抑制し又は低減する。「ウイルス負荷」はヒトの血液中における C 型肝炎ウイルスの量を意味する。C 型肝炎ウイルス負荷試験（ウイルス R N A 試験又は H C V R N A 試験として知られている）の結果は通常、国際単位 / m L (I U / m L) 又は R N A コピー / m L として表される。1 0 0 万 I U / m L 以上の C 型肝炎ウイルス負荷の患者は高ウイルス負荷を有していると考えられる。ウイルス量（例えば、ウイルス力価又はウイルス負荷）は、限定するものではないが、ウイルス核酸の量、ウイルス粒子の存在、複製単位 (R U)、プラーク形成単位 (P F U) を含む様々な測定によって示される。一般に、血液及び尿のような流体試料では、ウイルス量は、ミリリットルのような単位流体当たりで決定される。組織試料のような固形試料では、ウイルスの量は、グラムのような重量単位当たりで決定される。ウイルスの量を決定するための方法は当該分野で知られており、またここに記載される。

【 0 1 4 1 】

ある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体及びその断片及び / 又は薬学的組成物で治療された患者には急速な H C V 感染進行のリスクがある。H C V 疾患進行の速度に影響を及ぼすことが報告されている因子には、年齢（年齢の増加により速い進行が伴う）、性別（男性では女性よりも疾患進行が速い）、飲酒量（疾患進行の増加速度を伴う）、H I V 同時感染（顕著に増加した速度の疾患進行を伴う）、及び脂肪肝（肝細胞中の脂肪の存在が疾患進行の増加速度に関連している）が含まれる。

何れかの方法の幾つかの実施態様では、患者は抗 H C V 抗体をつくる。ある実施態様では、抗 H C V 抗体は検出可能であり、例えば抗 H C V 抗体は E L I S A によって検出可能である。ある実施態様では、患者によって生産される抗 H C V 抗体は中和抗体である。ある実施態様では、患者によって生産される抗 H C V 抗体は非中和抗体である。

【 0 1 4 2 】

ここに記載されたヒト化抗体及びその断片及び / 又は薬学的組成物はまた H C V 感染を予防するための方法で使用することができる。ある実施態様では、ヒト化抗体及びその断片及び / 又は薬学的組成物は、H C V に感染しやすい患者において H C V 感染を予防するための方法で使用することができる。ある実施態様では、ヒト化抗体及びその断片及び / 又は薬学的組成物は、また H C V に暴露され又は潜在的に暴露される患者において H C V 感染を予防するための方法で使用することができる。H C V への「暴露」とは、H C V 感染を生じうる H C V との遭遇又は潜在的な遭遇を示す。一般に、暴露された患者は、H C V が伝染しうる経路によって H C V に暴露されている患者である。ある実施態様では、患者は、H C V 感染の患者の血液あるいは H C V に感染したか又は感染していない患者の血液（つまり、血液暴露の H C V 感染状態が未知）に暴露されるか又は潜在的に暴露されている。H C V はしばしば血液から血液の接触によって伝染する。ある実施態様では、患者は、限定しないが、血液製剤（例えば、輸血）、「針刺し」事故、薬剤針の共有、コカ

10

20

30

40

50

インドラッグ、性交渉の相手、医原性メディカル又は歯科暴露、ボディピアッシング及び刺青に使用される針、又は母親がHCV感染の子供によって、HCVに暴露され又は潜在的に暴露されている。予防方法のある実施態様では、ここに記載のヒト化抗体及びその断片は投与される。HCVへの暴露又は潜在的暴露のとき、又は約一日、一週間、又は一ヶ月の何れか以内に投与される。

【0143】

ここに記載の方法の何れかのある実施態様では、患者はヒト又はチンパンジーである。ある実施態様では、患者はヒトである。HCVはヒトとチンパンジーのみに感染する。

ここに記載の方法の何れかのある実施態様では、該方法は、ヒト化抗体又はその断片を第二治療剤と組み合わせて投与することを含む。ある実施態様では、第二治療剤は抗ウイルス治療剤である。ある実施態様では、該方法は、ヒト化抗体又はその断片を、第二の治療剤と組み合わせて、それと連続して、それと同時に、それと逐次的に、それとローテーションで、又はそれと間欠的に投与することを含む。ある実施態様では、該方法は、ヒト化抗体又はその断片と第二の治療剤の組合せを投与することを含み、HCVの一又は複数の症状を寛解させ、ウイルス力価及び/又はウイルス負荷を低減させ、及び/又は抑制し、及び/又はヒト化抗体又はその断片又は第二治療剤単独での治療よりもHCVを予防する。

【0144】

何れかの方法の幾つかの実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、及び配列番号：18からなる群から選択される可変重鎖ドメインと、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：19、及び配列番号：20からなる群から選択される可変軽鎖ドメインを含む。ある実施態様では、ヒト化抗体の断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、Fv、及びダイアボディからなる群から選択される。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片はHCVに結合する。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、HCV E2タンパク質、可溶型HCV E2タンパク質、又はHCV E1タンパク質及びHCV E2タンパク質のヘテロ二量体に結合可能である。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片はHCV E2タンパク質に結合する。ある実施態様では、HCV E2タンパク質は、遺伝子型1（例えば、遺伝子型Ia及び遺伝子型Ib）、遺伝子型2（例えば、遺伝子型2a、遺伝子型2b、遺伝子型2c）、遺伝子型3（例えば、遺伝子型3a）、遺伝子型4、遺伝子型5、及び遺伝子型6からなる群から選択されるHCV遺伝子型の一又は複数からのものである。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、CD81とのHCV E2タンパク質の相互作用を阻害する。ある実施態様では、ヒト化抗体又はその断片は、細胞中へのHCVの進入を防止し及び/又は阻害する。ある実施態様では、細胞は肝臓細胞、例えば、肝細胞である。

【0145】

VIII. 治療経過のモニタリング

HCV感染に罹っているか又は罹りやすい患者において治療をモニターする方法、つまり患者に投与されている治療の経過をモニターするための方法がまた提供される。該方法は、症状のある患者についての治療的処置と症状のない患者に対する予防的処置の双方をモニターするために使用することができる。特に、該方法は受動免疫をモニター（例えば投与された抗体のレベルを測定）するために有用である。

幾つかの方法は、所定投薬量の薬剤を投与する前に、患者における例えばHCV感染のレベル又はプロファイルのベースライン値を決定し、これを治療後のプロファイル又はレベルの値と比較することを含む。簡便には、HCV感染のレベル又はプロファイルは、ここに記載のヒト化抗体又はその断片を用いて決定することができる。レベル又はプロファイルにおける有意な増加（つまり、かかる測定の平均からの一標準偏差として表される同じ試料の反復測定における実験的誤差の典型的な差よりも大きい）はポジティブな治療結果（つまり、薬剤の投与が所望の応答を達成したこと）を示している。免疫応答の値が有

意には変化しないか又は減少しないならば、ネガティブな治療結果が示される。

【 0 1 4 6 】

I X . 臨床試験

単一用量の第 I 相試験を、患者、好ましくはヒトにおけるここに記載のその断片又はそれを含有する薬学的組成物の安全性を決定するために実施することができる。ヒト化抗体又はその断片は、異なった患者に、推定される効能レベルの約 0 . 0 1 から始めて、有効なマウス投薬量の約 1 0 倍のレベルに達するまで 3 の倍数ずつ増加させて、投与される。

治療効果を決定するために第 I I 相試験を更に実施することができる。H C V 感染の患者が選択される。他の選択基準は、患者が試験期間中、生存する見込みがあり、妨害する同時投与の医薬の使用のような複雑化させる問題を含んでいないことである。疾患進行は患者の血液プロファイルを使用してモニターすることができる。ベースライン測定に続いて、患者は治療を受け始める。患者は無作為化され、ヒト化抗体又はその断片又はブラシーボの何れかで盲検態様で処置される。効果は、ブラシーボ群に対しての処置群における H C V 感染の進行の有意な減少によって決定される。

【 0 1 4 7 】

X . キット及び製造品

選択された抗原の存在又は細胞活性からの保護又はその検出において抗体と共に使用されるキットがまた供給されうる。よって、単独で、又は所望の細胞型に対して特異的な更なる抗体と併用されて、通常は容器中に凍結乾燥形態で、ヒト化抗体又はその断片が提供されうる。

標識又は毒素にコンジュゲートされうるか、又は未コンジュゲートの抗体が、バッファー、例えばトリス、リン酸塩、炭酸塩等、安定剤、殺生物剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等と共にキットに含められる。一般に、これらの材料は抗体の量に基づいて少なくとも約 5 重量 % で存在し、通常は再び抗体濃度に基づいて少なくとも約 0 . 0 0 1 重量 % の全量で存在する。しばしば、活性成分を希釈するために不活性な増量剤又は賦形剤を含めることが望ましく、ここで、賦形剤は全組成物の約 1 から 9 9 重量 % で存在しうる。

本発明はまた診断キット、例えば研究、検出及び / 又は診断キットを提供する。かかるキットは典型的にはここに記載のヒト化抗体又はその断片を含む。適切には、抗体が標識されるか、又は二次標識試薬がキットに含められる。好ましくは、キットには、例えばインビボイメージングアッセイを実施するための、意図された用途を実施するための指示書がラベリングされる。

【 0 1 4 8 】

ある実施態様では、キットは、パッケージ挿入物を含む。パッケージ挿入物とは、治療製品の市販パッケージに常套的に含められる指示書を意味し、適応症、使用法、用量、投与法、禁忌及び / 又はそのような治療製品の使用に関する注意に関する情報を含む。一実施態様では、パッケージ挿入物は、組成物が H C V 感染を治療するために使用されることを示している。ある実施態様では、パッケージ挿入物は、ここに記載の治療、予防、又は診断の方法の何れかにヒト化抗体又はその断片を使用するための指示書を提供する。

ここで提供されるものは、ここに記載のヒト化抗体又はその断片を含む製造品である。ある実施態様では、製造品は、容器と該容器上に又はそれに付随したラベル又はパッケージ挿入物を含む。適切な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されうる。容器は、症状を診断するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。また、製造品は更に注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第二の容器を具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【 0 1 4 9 】

X I . 一般的組換えDNA法技術

本発明は、別段の記載がない限り、一般的な化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学を用い、これは当業者の能力内にある。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, 及びT. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2版, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M.等. (1995及び定期補遺; Current Protocols in Molecular Biology, 9, 13, 及び16章, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, 及びA. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; 及び、D. M. J. Lilley及びJ. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Pressを参照のこと。これらの一般的テキストの各々は出典明示によりここに援用される。

10

【0150】

本発明は、本発明の実施に際して当業者を補助するものを意味し、本発明の範囲の限定を決して意図するものではない実施例によって更に説明される。

【実施例】

【0151】

本発明の純粋な例示であることを意図し、よって本発明を限定するものと決して考えるべきではない実施例がまた上で検討された発明の態様及び実施態様を記載し詳述する。上記実施例及び詳細な記載は例証のために提供されるもので、限定のためではない。

20

【0152】

実施例1

材料と方法

ヒト化V遺伝子のクローニング

重鎖V領域(実施例2を参照)を、HindIII及びApaI制限酵素部位を介してpG1D200中にクローニングした。同様に、軽鎖V領域を、HindIII及びBamHI部位を介してpKN100中にクローニングした。pG1D200ベクターを、マルチコア(Promega)制限消化バッファー中の20単位のHindIII及びApaIを用いて37℃で2時間、5µgのDNAを消化させることによってライゲーションのために調製した。ついで、1単位のエピアルカリホスファターゼを37℃で30分加え、65℃で20分間不活性化した。ついで、ベクター調製物を製造者の指示書に従ってQiaquick(Qiagen)カラムで精製した。ベクターを50µlに溶離させた。同様に、pKN100ベクターを、バッファーE(Promega)中の20単位のHindIII及びBamHIを用いて37℃で1時間、5µgのDNAを消化させることによって調製した。DNAをエピアルカリホスファターゼで処理し、上述のようにして精製した。変異体V領域を含むV領域DNAは、ベクターpGA4又はpGA1でGENARTから供給された。挿入断片DNA(およそ4ug)を上述のようにして消化させ、重鎖及び軽鎖断片をゲル電気泳動によってベクターから精製した。適切なバンドをゲルから切除し、Qiaquickカラム(Qiagen)で精製し、製造者の指示書に従って50µlで溶離させた。ライゲーションは、1×リガーゼバッファー(Promega)及び10単位のリガーゼ(Promega)中の1又は3µlの挿入断片DNAと1µlのベクターを混合することによって実施した。反応を14℃で一晩インキュベートし、2.5µlを50µlのDH5αコンピテント細胞(Invitrogen)を形質転換するために使用した。

30

40

【0153】

部位特異的突然変異誘発

キメラ重鎖変異体AP33_Y47W及びY47Fを除いて、部位特異的突然変異誘発はGENART社に外部委託することによって実施した。キメラ重鎖突然変異誘発は次のオリゴヌクレオチドを使用して実施した：

AP33_Y47F_F: AATAAACTTGAGTTCATGGGATACATAAGT

50

AP33_Y47F_R: ACTTATGTATCCCATGAACTCAAGTTTATT

AP33_Y47W_F: GAATAAACTTGAGTGGATGGGATACATAAG

AP33_Y47W_R: CTTATGTATCCCATCCACTCAAGTTTATTC。

【0154】

突然変異誘発PCR反応は、20 ngのVH-pGLD200（キメラ重鎖コンストラクト）及びI x Fusionマスターミックス（NEB）と組み合わせて、0.5マイクロモル濃度の最終濃度でオリゴヌクレオチドを使用した。PCR条件は、98 で30秒間、ついで12サイクルの98 で10秒間、55 で15秒間、72 で2分15秒間であった。PCR反応が完了したところで、20単位のDpnIを37 で1時間、各PCR反応に加えた。2 µlのPCR消化混合物を用いて、50 µlのXL-Iブルーコンピテント細胞（Stratagene）を形質転換した。

10

組換えキメラ及びヒト化重鎖RHA、RHbcdefgh（RHb-h）及びヒト化軽鎖RKA及びRK2bcを、抗体発現ベクターpGLD200及びpKNIOO中にそれぞれクローニングした。プラスミドDNAを、適切なQiagenプラスミド精製キットを使用して調製した。

【0155】

電気穿孔法

Cos7細胞を増殖させ、トランスフェクション前の日に1:3に分割した。対数期Cos7細胞をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、PBS中 10^7 細胞/mlで再懸濁させ、700 µlの細胞を電気穿孔キュベット（Bio-Rad）中に分注した。それぞれ5 µgの重鎖及び軽鎖コンストラクトを細胞と混合し、1.9 KV及び25 µFで電気穿孔した。細胞を室温に10分間放置して回収し、10 cm²組織培養プレート上のGlutamax（Invitrogen）/10% FCS / ペニシリン500 U / ml / ストレプトマイシン500 µg / mlを含む8 mlのDMEMに加えた。上清を3日後に収集し、抗体濃度をELISAによって分析した。

20

【0156】

IgG1 ELISA

Maxisorpプレートを0.4 µg / mlのヤギ抗ヒトIgG抗体で被覆し、4で1ヶ月以上保存した。使用前に、プレートを、PBS / 0.02%のTween 20（v / v）で3回洗浄した後、PBS / 0.02%のTween 20（v / v）/ 0.2%（w / v）BSAでブロックした。プレートを前のようにして洗浄し、試料上清を、倍希釈を使用して所定の濃度範囲にわたって添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートを前のようにして洗浄し、1:5000希釈でヤギ抗ヒト 軽鎖ペルオキシダーゼコンジュゲート（Sigma）と共にインキュベートした。プレートを前のようにして洗浄した後、150 µlのKブルーワン-ステップ基質（Neogen）を加えた。10分後、反応を、50 µlのレッドストップ溶液（Neogen）を用いて停止させ、光学密度を655 nmで測定した。

30

【0157】

ペプチドELISA

ELISAプレート（Nunc Maxisorp）をストレプトアバジン（Sigma S0677）（100 mMのNa₂HPO₄、50 mMのクエン酸pH 5.0中10 µg / ml、100 µl / ウェル）で被覆し、1ヶ月まで4 で保存した。使用前に、プレートを、PBS / 0.1%（v / v）のTween 20で3回洗浄し、37 で1時間、200 µlのPBS / 2% BSA（w / v）でブロックした。ついで、プレートを前のようにして洗浄し、100 µlのペプチド（SECバッファー中0.5 µg / ml）を37 で1時間添加した。全ペプチドはビオチン化リンカー配列GSGK-ビオチンを含んでいた。プレートを前のようにして洗浄し、100 µlの抗体上清をSECバッファー中で連続2倍希釈して加え、1時間インキュベートした。プレートを前のようにして洗浄し、1:5000希釈（100 µl / ウェル）のHRPコンジュゲート抗ヒト 抗体（Sigma）と共に37 で1時間インキュベートした。プレートを前のようにして洗浄し

40

50

、150 μ l の TMB ワンステップ K - ブルー 基質 (Neogen) を 10 分 加え、室温で暗所に保存した。反応を 50 μ l の レッドストップ (Neogen) で 停止させた。光学密度を 655 nm で測定した。

【0158】

HCVpp 感染アッセイのための抗体の調製

HCVpp 実験を実施するために、COS7 細胞トランスフェクション上清からの抗体を精製し、プロテイン A 精製によって濃縮した。各キメラ又はヒト化抗体に対して、Prosep-vA ビーズ (Millipore) を再懸濁させ、400 μ l を 10 ml の使い捨てクロマトグラフィーカラム (Pierce) に加え、20 ml の PBS で洗浄した。COS7 トランスフェクション上清 (およそ 150 ml) を重力流下でカラムに加えた。ついで、カラムを PBS (20 ml) で洗浄し、0.5 ml の Immunopure IgG 溶離バッファー (Pierce) で溶離させた。溶離物を 20 μ l の 1 M の トリス / HCL (pH 7.6) で中和させ、3 リットルの PBS 中 0.5 ml の Slide-A-Lyser (Pierce) で 4 で一晩透析した。

10

【0159】

HCV 偽粒子感染アッセイ

遺伝子型 1、2、3、4、及び 6 に対する HCVpp を、HCV 糖タンパク質配列。MLV gag-pol 及びルシフェラーゼレポーターをコードするプラスミドを HEK 細胞に形質移入することによって作製し、ついで条件培地を濃縮し、20% スクロースのクッションを通して超遠心分離によって部分的に精製した。Owsianka A. 等, J Virol 79: 11095-104 (2005) を参照。遺伝子型 5 に対する HCVpp を、遺伝子型 5 偽粒子の感染性に悪影響を与えたので、スクロース勾配を通しての部分的な精製工程を省いたことを除いて、同様にして作製した。細胞培養培地中での各抗体の 3 倍希釈を HCVpp と混合し、抗体 / HCVpp 混合物を 37 で 1 時間 インキュベートし、ついで 3 組のウェル中のヒト hepatoma Huh-7 標的細胞に加えた。37 での 4 時間の インキュベーション後に、接種材料を除去し、新鮮培地で置き換えた。3 日後、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。複数のウェルを、抗体の不存在下で HCVpp に感染させ、全ての結果をこの「抗体なし」コントロールのパーセントとして表す。次の実験で使 用した HCV の遺伝子型を表 3 に示す。

20

【0160】

30

表3(過去の61/006066の表1):HCVの遺伝子型とキメラ及びヒト化抗体のIC50及びIC90

実験 1								
遺伝子型	1a H77 20		2a JFH1		3a F4/2-35			
IC 単位 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90		
Vh/VI	<0.137	0.31	1.1	9.31	0.48	3.2		
RH B- H/RK2b	<0.41	0.73	2.7	22.1	1.15	8.3		
RH -C/RK2b	<0.41	<0.41	0.64	7	<0.41	2.15		
RH -H/RK2b	<0.41	1	3	26	0.67	8.3		
実験 2								
遺伝子型	1a H77 20		2A2.4		4.21.16		6.5.8	
IC 単位 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90
RH B- H/RK2b	0.08	1	1.7	20	0.33	3.64	<0.41	3.7
RH-C/RK2b	<0.0137	0.24	0.51	6	<0.41	0.92	<0.41	1.8
RH-H/RK2b	0.06	1.2	3.33	26.67	0.33	5.3	0.79	18
Vh/VI	0.018	0.28	0.88	6.67	<0.137	0.83	<0.137	3.7
実験 3								
遺伝子型	1a H77 20		1A20.8		1B5.23		2B1.1	
IC 単位 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90
Vh/VI	0.03	0.43	1.1	11.5	1.15	11	3	>15
RH-C/RK2b	0.032	0.6	1.6	15	0.9	8.3	3	>15
実験 4								
遺伝子型	5.15.11							
IC 単位 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50	IC90						
Vh/VI	0.088	1.11						
RH-C/RK2b	0.053	0.82						
RH-H/RK2b	0.37	8						

【 0 1 6 1 】

A P 3 3 分子モデリング

R C S B タンパク質データベース中において A P 3 3 に対して最も近い V H 及び V K 構造は、それぞれ 1 D Q D _ H (8 4 % 同一性) 及び 1 E G J _ L (9 1 % 同一性) であった。1 D Q D _ H V H 及び 1 E G J _ L V K 構造を単一のテンプレート構造中に組み合わせた。A P 3 3 配列 (表 4) を、組み合わせたテンプレート配列とアラインさせた。重鎖及び 軽鎖 C D R 長は、H 3 ループを除いて A P 3 3 のものと同であった。A P 3 3 のホモロジーモデルは、M o d e l e r ソフトウェアを使用し、この組み合わせたテンプレートに基づいて生成させた。Fiser A. 等, Protein Sci 9:1753-73 (2000) ; Fiser A. 及び Sali A., Methods Enzymol 374:461-91 (2003) ; 及び Sali A. 及び Blundell T L., J Mol Biol 234:779-815 (1993) を参照のこと。

【 0 1 6 2 】

表4(過去の61/006, 066の表2): AP33抗体のモデル化に使用した重鎖及び軽鎖タンパク質配列

AP33_H (117 アミノ酸)
EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYYN
LSLRSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCALITTTTYAMDYWGQGTSTVTS
AP33_L (111 アミノ酸)
NIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDGYGNSFLHWFQQKPGQPPKLLIYLASNLS
GVPARFSGSGSRDTFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNVDPWTFGGGTKLEIK

10

【 0 1 6 3 】

結果

H C V は 6 の 遺 伝 子 型 に 属 し て い る と 記 載 さ れ て い る が、更 に サ ブ 遺 伝 子 型 に 細 分 さ れ る。感 染 し た 個 体 は 最 初 の 感 染 か ら 由 来 し た 一 群 の 変 異 遺 伝 子 型 を 有 し て い る。A P 3 3 が 結 合 す る H C V タ ン プ ク 質 E 2 タ ン プ ク 質 の 領 域 が 通 常 は H C V 遺 伝 子 型 の 間 で 保 存 さ れ、A P 3 3 抗 体 が 交 差 遺 伝 子 型 特 異 性 を 示 し て い る。従 っ て、ヒ ト 化 A P 3 3 が 種 交 差 反 応 性 を 保 持 す る こ と を 確 保 す る こ と が 重 要 で あ っ た。

ヒ ト 化 抗 体 を 試 験 す る 最 も 効 果 的 な 方 法 は、H u h - 7 細 胞 の H C V 偽 粒 子 感 染 の プ ロ ッ キ ン グ を 示 す A P 3 3 (Yagnik A.T. 等, Proteins 40:355-66 (2000)) を 用 い て 実 施 さ れ た 実 験 を 複 製 す る こ と で あ っ た。し か し な が ら、偽 粒 子 感 染 研 究 は、ヒ ト 化 プ ロ セ ス 中 に 生 成 さ れ る 多 数 の 変 異 体 に 適 用 さ れ る な ら ば、ロ ジ ス テ ィ ッ ク な 問 題 を 引 き 起 こ し た で あ る っ 比 較 的 多 量 の 抗 体 を 必 要 と し た。従 っ て、ペ プ チ ド E L I S A 解 析 を 用 い て、様 々 な H C V 遺 伝 子 型 に 対 し て 抗 体 変 異 体 の 初 期 ス ク リ ー ニ ン グ を 実 施 し た。

20

【 0 1 6 4 】

D 3 ペ プ チ ド は、H C V 遺 伝 子 型 の 間 に 保 存 さ れ て い る と し て、Anonymous, J Viral Hepatology 6:35-47 (1999) に よ っ て 同 定 さ れ た 配 列 で あ る；ペ プ チ ド B 1、C 1、H 3 及 び G 3 は、代 替 の H C V 遺 伝 子 型 変 異 体 を 表 し、ペ プ チ ド H 6 は フ ェ ー ジ デ ィ ス プ レ イ に よ っ て 同 定 さ れ た A P 3 3 に 対 す る ミ モ ト ー プ で あ る。こ れ ら の ペ プ チ ド の 各 々 は、ヒ ト 化 の 成 功 を 測 定 す る た め の プ ロ ー プ と し て 使 用 し た。配 列 を 表 5 に 示 す。

30

表5(過去の61/006, 066の表3): ヒト化AP33の結合分析に使用したペプチド

ペプチド	名称	遺伝子型
QLINTNGSWHINGSGK-ビオチン	D3	全て
N.....GSGK-ビオチン	B1	2b
.....V.GSGK-ビオチン	C2	1a
.....S.....GSGK-ビオチン	H3	2a, 4
..V.....GSGK-ビオチン	G3	1a,3
VELRNLLGGTWRPGSGK-ビオチン	H6	ミモトープ

40

【 0 1 6 5 】

実施例 2 - A P 3 3 R H A に 対 す る ヒ ト V H フ レ ー ム ワ ー ク の 選 択

A P 3 3 V H の V e r n i e r、C a n o n i c a l 及 び V L 界 面 残 基 (V C I 残 基) と 最 も 高 い 同 一 性 を 有 し、同 じ サ イ ズ の C D R 1 及 び 2 を 有 す る ヒ ト V H 配 列 を 図 1 4 に 示 し、最 適 な ド ナ ー フ レ ー ム ワ ー ク を 選 択 す る た め に 使 用 す る。Foote J. 及 び Winter G., J Mol Biol 224:487-99 (1992) 及 び Chothia C. 等, J Mol Biol 186:651-63 (1985) を 参 照 の こ と。F W 同 一 性 ス コ ア を ま た 示 す。A 0 3 9 0 7、D 1 . 3 マ ウ ス 抗 リ ゾ チ ム V H を 除 い て、ヒ ト 化 抗 体、マ ウ ス 抗 体 又 は s c F v で あ る 配 列 を ま た 省 い た。界 面 残 基 は、C D R か ら 離 れ て 埋 め ら れ る 傾 向 が あ る 一 方、V e r n i e r 及 び C a n o n i c a l 残 基 は C D R に 近 く な る 傾 向 が あ る。

50

全体的 V C I 同一性に関して、U 8 6 5 2 5 が最も高いスコアを有していた (V C I スコアに対して 1 7 のうち 1 4 と、フレームワークに対して 8 6 のうち 8 0) (図 1 4)。上の 1 8 のヒト配列は全て 1 4 の V C I スコアを有している一方、フレームワークのスコアは 8 6 のうち 6 1 以下から変化した。マウス抗体配列と比較したときに最も保存性が少なかった V C I 残基の差は 7 1 位と 9 4 位 (K a b a t 番号付け) でであった。

【 0 1 6 6 】

完全なヒト V H 配列 (図 1 5 及び 1 6) の解析は、U 8 6 5 2 5、S 6 7 8 2 6、4 2 0 7 1、4 2 0 6 9、4 2 0 6 8、S 6 7 8 2 7 が F W において希な C y s 又は P r o 残基を有していなかったことを示した。しかしながら、U 8 6 5 2 5 は S 6 7 8 2 6 よりもより非保存的な残基差を含んでいた (つまり、残基 2 3、4 0、8 1、及び 9 2 : 図 1 6 の番号付けを使用)。従って、C L L リンパ腫の患者から取り出された S 6 7 8 2 6 抗体 V H (Mierau R. 等, Rheumatol Int 12:23-31 (1992)) を、ドナーマウス A P 3 3 V H C D R に対するフレームワークアクセプターとして作用するものとして選択して、A P 3 3 R H A を生産した。図 1 3 は A P 3 3 H と S 5 6 8 2 7 の間の比較を示す。

【 0 1 6 7 】

実施例 3 - A P 3 3 R H A のためのリーダー配列の選択

最初のヒト化は、A P 3 3 V H からアクセプター S 6 7 8 2 6 K a b a t F W 1、2、3、4 への K a b a t C D R 1、2 及び 3 の移植である (図 1 8)。この配列は、S 6 7 8 2 6 と最も近い配列同一性を有している生殖系列遺伝子 V H 4 - 5 9 からのシグナルペプチドの付加を必要とする (図 1 7)。我々は、このリーダー (図 1 7) が、S 6 7 8 2 6 F W 1 配列に先行する場合シグナルペプチダーゼで切断することを確認するために S i g n a l P (Foote J. 及び Winter G., J Mol Biol 224:487-99 (1992)) (V2.0.b2) サーバーを使用した。図 1 8 は、A P 3 3 C D R をヒト F W 中に挿入することによって A P 3 3 R H A タンパク質と D N A 配列を生成することを示している。そのリーダーを含む A P 3 3 R H A の D N A 配列を以下に示す (6 1 / 0 0 6 0 6 6 の表 1 3 に既出) :

```
ATGAAACATCTGTGGTTCTTCTTCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTCTGTC
Ccaggtgcagctgcaggagtcgggccccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtgact
ccatcagtAGTGGTTACTGGAAACatccggcagcccccaggaggagggcactggagtgataggaTACATA
AGTTACAGTGGTAGCACTTACTACAATCTATCTCTCAGAAGTcgggtcaccatatac
agtagacacgtctaagaaccagttctccctgaggctgagctctgtgaccgctgcggacacggccatgtattactgtgcgagaAT
TACTACGACTACCTATGCTATGGACTACTggggccaaggaccacgggcaccgtctcc
```

A P 3 3 R H A のリーダーを伴う D N A 配列。イタリックの大文字テキストはリーダー配列を示し、小文字テキストは F W を示し、大文字太字は C D R 配列を示す。

V H 4 - 5 9 シグナルペプチドを含む A P 3 3 R H A の完全なタンパク質及び D N A 配列は図 1 9 に示す。

【 0 1 6 8 】

実施例 4 - A P 3 3 R K A 及び A P 3 3 R K 2 のためのヒト V K フレームワークの選択

A P 3 3 K とのヒト生殖系列 V K 遺伝子の比較により、C D R 1 に対して同じ c a n o n i c a l ループ長を持つものがないことが明らかになった (図 2 0)。ヒト軽鎖遺伝子の我々のデータベースから正しい C D R 1 ループ長を持つと同定された配列は、ヒト化抗体か又は s c F v s であった (図 2 1)。マッチしない C D R 1 長を持つがマッチする C D R 2 / 3 長を持ち、V e r n i e r、C a n o n i c a l 及び V H 界面残基での A P 3 3 V K と最も高い同一性 (V C I スコア) を有するヒト V K 配列を選択し、A P 3 3 V K に対する F W 同一性のそのスコアと共に図 2 2 に示す。ヒト化抗体、マウス抗体又は s c F v である配列は省略した。

図 2 3 A は A P 3 3 V K に最もマッチするヒト V K の完全配列を示す。これらの配列の C l u s t a l W アラインメントを図 2 3 B に示し、保存された残基を示す。A P 3 3、にマッチするヒト c a n o n i c a l C D R 1 ループ長がないため、我々は異なったループ C D R 1 長の 2 つのヒトフレームワークを選択する。配列 X 6 1 1 2 5 (Chothia C. 等, J Mol Biol 186:651-63 (1985)) は最も高い V C I スコアを有し、C D R 1 の 2 残基は A

10

20

30

40

50

P 3 3 より長く、8 0 位はアラニンで、A P 3 3 V K にマッチする。このため、我々はこの配列を A P 3 3 R K A を生産するための第一ドナーフレームワークとして選択する。A Y 6 8 5 2 7 9 (Ghosh S. 等, J Immunol 174:2860-9 (2005)) は A P 3 3 より短い C D R 1 の 4 - 残基を有し、8 0 位は生殖系列ファミリーに典型的なプロリンである。加えて、A Y 6 8 5 2 7 9 は高い V C I 及びフレームワークスコアを有し、その配列には希なプロリン又はシステイン残基がない。これらの基準下で、A Y 6 8 5 2 7 9 を、A P 3 3 R K 2 を生産するための第二フレームワークドナーとして選択した。

【 0 1 6 9 】

実施例 5 - A P 3 3 R K A 及び A P 3 3 R K 2 のためのリーダー配列の選択

X 6 1 1 2 5 に対する最も近いヒト生殖系列 V K 遺伝子は V K I V - B 3 であり、これは、リーダー配列の自然の選択であろう。X 6 1 1 2 6 の F W 1 と近接するこのリーダーを用いた予測的 S i g n a l P アルゴリズム (Nielsen H. 等, Protein Eng. 10: 1-6 (1997)) の使用は、シグナルプロテアーゼ切断が正しい位置でなければならないことを示している (図 2 7)。同様に、A Y 6 8 5 2 7 9 に最も近い生殖系列遺伝子は V K I - 0 1 2 / 0 2 である。再び、A Y 6 8 5 2 7 9 の F W 1 に近接する場合、V K I - 0 1 2 / 0 2 のリーダー配列は正しく切断されることが予測される (図 2 8)。

【 0 1 7 0 】

実施例 6 - A P 3 3 R K A、A P 3 3 R K 2、A P 3 3 R K 3 及び A P 3 3 R K 4 配列の生成

X 6 1 1 2 5 1 の F W 1、2、3 及び 4 間への A P 3 3 V K C D R のタンパク質及び D N A 配列の挿入を、B 3 リーダーの D N A 配列と共に (A P 3 3 R K A)、図 3 0 に示す。A Y 6 8 5 2 7 9 の F W 1、2、3 及び 4 中への A P 3 3 V K C D R のタンパク質及び D N A 配列の挿入を、V K I - 0 1 2 / 0 2 の D N A 配列と共に、図 3 1 に示す。完全な A P 3 3 R K A 及び A P 3 3 R K 2 配列をその結合した各リーダー配列と共に図 3 4 - 3 6 に示す。

二つの更なる軽鎖フレームワークを、それぞれヒト化 軽鎖 R K 3 及び R K 4 になったヒト配列 A B 0 6 4 1 3 3 及び A B 0 6 4 0 7 2 に基づいて試験した。A B 0 6 4 1 3 3 の選択は図 2 4 - 2 6 及び 2 9 に示す。V C I 残基は図 1 3 に記載される一方、R K 3 及び R K 4 双方に対するタンパク質及び D N A 配列を図 3 2 - 3 4 及び 3 7 - 3 8 に示す。R K 3 が選択されたが、それはそれが異なった生殖系列ファミリー、つまり V 5 由来であるからである。A B 0 6 4 0 7 2 は、組換え抗体コンストラクトに使用される場合、歴史的には発現が乏しいものであった K a b a t V K I V サブグループのメンバーであったけれども、この特定のヒトフレームワーク配列はヒト化抗体の一部の場合、我々の手ではよく発現することが過去に示されている。

【 0 1 7 1 】

実施例 7 - 組換え重鎖及び軽鎖の発現

組換え抗体 V 領域を C o s 7 細胞の一過性形質転換によって発現させた。キメラ A P 3 3 重鎖又は軽鎖 D N A コンストラクトをポジティブなコントロールとして使用し、適切なヒト化抗体コンストラクト鎖を同時形質移入した。最初は、未変異の R H A 及び R H b - h (全ての 7 の非保存 v e r n i e r 領域 V C 逆突然変異) 及び R K A b d 及び R K 2 b c を試験した。R K 2 b c は逆変異される共に衝突する V C 残基を有している。軽鎖 R K A は置換された 2 つの残基を有していた; V C 残基 Y 3 6 F、及び A s n は 1 0 7 位で非常に希であるので、L y s でまた置き換えられた (R K A b d)。R K A b d 発現は非常に低く、実行可能な実験及び市販レベル以下であったことが留意された (表 9)。続く実験では、表 6 に示されるように、R K A b d に潜在的なスプライス部位変異 G 3 8 0 C を除去し、リーダー B 3 から L I 1 (我々の経験から他の軽鎖遺伝子において効果的に作用した) ヘリーダー配列を交換することを含む修飾がなされた。また、他の者は、アミノ酸置換 D 9 S が V K I V 遺伝子の発現のレスキューに効果的であったことを報告した。S a l d a n h a J.W. 等 J Mol Biol Immunol 5391(22436):487709-99719 (1992) を参照のこと。これらの修飾の何れもバックグラウンドを越える発現レベルを回復させるのに効果的ではな

10

20

30

40

50

った。

【 0 1 7 2 】

表6(過去の61/006, 066の表4) :RKAに対するリーダー配列

B3 リーダー配列 DNA	ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGAT CTCTGGGGCTTACGGG
B3 リーダー配列 タンパク質	MVLQTQVFISLLLWISGAYG
L11 リーダー配列 DNA	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCT GCTCTGGCTCCCAGGCGCCAGATGT
L11 リーダー配列 タンパク質	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC

10

表9(過去の61/006, 066の表34) : ヒト化軽鎖の発現。COS7細胞に述べた抗体コンストラクトを形質移入。

重鎖 RHb-h	抗体収量	コントロール形質移入 キメラ抗体 (V _H /V _L)
RKAbd/VH	非検出	1008 ng/ml
RKAbd (リーダープラス D9S)/VH	非検出	1415 ng/ml
RK2bc/VL	389 ng/ml	3335 ng/ml
RK2bc/RHb-h	1555 ng/ml	3335 ng/ml
RK2b/RHb-h	1552 ng/ml	849 ng/ml
RK2b/RH-C	1222 ng/ml	1036 ng/ml
RK3/VH	39 ng/ml	1518 ng/ml
RK3/RHb-h	2.3 ng/ml	1518 ng/ml
RK4/RHb-h	124 ng/ml	5161 ng/ml

20

更に、代替軽鎖コンストラクト R K 3 及び R K 4 はまた極めて低い発現レベルを示している (表 9) 。 R K 2 のみがヒト化抗体を生産するのに適したレベルで発現されうる。

【 0 1 7 3 】

実施例 8 - E 2 ペプチドに対する R H b - h / R K 2 b c の結合

30

C o s 7 形質移入からの上清を用いて、ヒト化抗体 R H b - h / R K 2 b c の結合をキメラ抗体と比較した。図 1 を参照のこと。

H 6 ミモトープへの抗体結合の結果は、R H A 内に導入される v e r n i e r 領域 (Foot e J. 及び Winter G., J Mol Biol 224:487-99 (1992)) 及び canonical 残基 (Chothia C. 等, J Mol Biol 186:651-63 (1985), 及び Chothia C. 等, Nature 342:877-83 (1989)) が結合に必要であることを示唆している。抗体 R H b - h / V 1 の H 6 ペプチド結合はキメラ抗体 (V h / V 1) ポジティブコントロールに最も近く、完全にヒト化された R H b - h / R K 2 b c 抗体よりも良好であり、ヒト化軽鎖がキメラ軽鎖ほど良くないことを示唆している。これは、キメラ軽鎖 R H A / V 1 と比較された場合、R H A / R K 2 b c の特に乏しい結合によって強調される。

40

この実験からの結論は、重鎖 R H b - h が抗原結合に重要な A P 3 3 V H における構造的特徴の多くを保持しているが、ヒト化軽鎖はそれほど良好ではないことである。しかしながら、同じ L 1 ループ長を持つマウス軽鎖遺伝子のヒトオルソログの欠如はヒト化に対する潜在的な問題と予測された

【 0 1 7 4 】

実施例 9 - ヒト化重鎖界面残基 Q 3 9 によって媒介される重鎖及び軽鎖間の界面は最適以下の結合の原因ではない

軽鎖の乏しい機能のための一つの説明は、重鎖及び軽鎖間の界面残基が不適合であったことである。Chothia C. 等, J Mol Biol 186:651- 63 (1985) を参照。3 9 位の界面グルタミン残基をマウス均等物、つまり R H b - h のリジンに逆突然変異させ、新しい重鎖を

50

R H I とした。

R K 2 b c 又はキメラ軽鎖との対をなした R H I の結合は H 6 ペプチドへの結合の改善に失敗し、界面残基 Q 3 9 K が図 2 に示される最適以下の結合の原因ではないことを示唆している。

【 0 1 7 5 】

実施例 1 0 - ある範囲の E 2 ペプチドへの R H b - h の結合

異なった H C V 遺伝子型へのヒト化抗体の結合を推定するために、表 5 に示したペプチドをある範囲の E 2 変異体のための代用物として使用した。キメラ軽鎖 V 1 と対となった R H b - h のペプチド結合を図 3 B に示す。結果は、ヒト化重鎖がある範囲のペプチドに結合するが、図 3 A に示されたキメラ抗体 V h / V 1 ほど効果的ではないことを示している。確かに、ヒト化抗体はペプチド B 1 には結合しないようである。結果は、重鎖における未保存 c a n o n i c a l 及び v e r n i e r 領域残基の置換は完全な範囲のペプチド抗原結合を保持するには不十分であったことを示している。

【 0 1 7 6 】

変異体 A P 3 3 エピトープを有するペプチドが保存された変化を有しており、例えば B 1 が G 1 n を A s n に置換し、ペプチド C 2 及び G 3 が I 1 e から V a l へ置換されていることに留意することは興味深い。これらの小さい残基への保存的变化はエピトープの収縮を表しうる。これは、A P 3 3 及びヒト化抗体上の抗原接触残基が変更されてそれらにより大なる到達距離を付与するという可能性を生じる。この効果は、短いエピトープ残基を含み A P 3 3 への弱い結合を示す H C V 遺伝子型への抗体の結合を亢進させることでありうる。ヒト化抗体は B 1 ペプチドへの結合に失敗するが、この配列は H C V の感染分離体に見出されていないことに留意することがまた重要である。

【 0 1 7 7 】

実施例 1 1 - R K 2 への最小の変異の同定

未保存で、R K 2 軽鎖において変異された（変異 b (Y 3 6 F) 及び変異 c (G 6 8 R) ）ものは 2 の V C 残基のみであった。各 V C 変異をヒト等価残基 Y 3 6 及び G 6 8 に逆変異させた。結果（図 4 ）は、変異 b は軽鎖活性に必須であるが、変異 c はそうではないことを示している。

【 0 1 7 8 】

実施例 1 2 - 重鎖ヒト化に必要な最小数の V C 変化の同定

R H b - h ヒト化に必要な最小数の V C 変異残基を同定するために、表 7 及び 8 に示すように、各変異 b、c、d、e、f、g、h を元のヒト配列に逆変異させた。また図 4 2 A - G を参照のこと。

表 7 (過去の 61/006, 066 の表 5) : V C 変異の表

抗体鎖	異変名	マウス残基	ヒト残基
RK2	b	F36	Y36
RK2	c	R68	G68
RH	b (S30T)	T30	S30
RH	c (W47Y)	Y47	W47
RH	d (I48M)	M48	I48
RH	e (V67I)	I67	V67
RH	f (V71R)	R71	V71
RH	g (F78Y)	Y78	F78
RH	h (R94L)	L94	R94

表8(過去の61/006, 066の表6): ヒト化抗体変異体とその配列同定

V 遺伝子名	V 鎖名	親配列からの 変異	アミノ酸 配列番号:	核配 配列番号:
AP33H 重鎖	VH		配列番号:1	配列番号:21
AP33H 軽鎖	VI		配列番号:2	配列番号:22
AP33RHA	RHA	None	配列番号:3	配列番号:23
AP33RKA	RKA		配列番号:4	配列番号:24
AP33RKAbd	RKAbd	Y36F, N107K	配列番号:5	配列番号:25
AP33RK3	RK3		配列番号:8	配列番号:28
AP33RK4	RK4		配列番号:9	配列番号:29
RHbdefgh	RHb-h	S30T, W47Y, I48M, V67I, V71R, F78Y, R94L	配列番号:10	配列番号:30
RHcdefgh	RH-B	W47Y, I48M, V67I, V71R, F78Y, R94L	配列番号:12	配列番号:32
RHcdefgh	RH-C	S30T, I48M, V67I, V71R, F78Y, R94L	配列番号:13	配列番号:33
RHcdefgh	RH-D	S30T, W47Y, V67I, V71R, F78Y, R94L	配列番号:14	配列番号:34
RHcdefgh	RH-E	S30T, W47Y, I48M, V71R, F78Y, R94L	配列番号:15	配列番号:35
RHcdefgh	RH-F	S30T, W47Y, I48M, V67I, F78Y, R94L	配列番号:16	配列番号:36
RHcdefgh	RH-G	S30T, W47Y, I48M, V67I, V71R, R94L	配列番号:17	配列番号:37
RHcdefgh	RH-H	S30T, W47Y, I48M, V67I, V71R, F78Y	配列番号:18	配列番号:38
RHI	RHI	Q39K	配列番号:11	配列番号:31
RK2	RK2	なし	配列番号:6	配列番号:26
RK2b	RK2b	Y36F	配列番号:19	配列番号:39
RK2c	RK2c	G68R	配列番号:20	配列番号:40
RK2bc	RK2bc	Y36F G68R	配列番号:7	配列番号:27

【 0 1 7 9 】

変異の効果は、異なった型のヒト化抗体の表5に記載したペプチドへの結合を比較することによって評価した。結果を図5に示し、H6への最大結合の割合として各データセットを表すことによって正規化した。抗体RH-Fからの結果は、VC変異F(V71R)の不存在が抗体の結合に有意に影響を及ぼしたことを示唆している。従って、ヒトからマウス配列への全ての他のVC変異が存在しているにも拘わらず、71位のアルギニンは最適な結合のために執拗である。結合を検出することができた全ての場合において、RH-Fはペプチドにより弱く結合した。しかしながら、逆変異された変異体によるペプチドG3への結合はまた元の変異S30T(b)、I48M(d)及びV67I(e)が結合親和性のために重要であることを特定した。変異F78Y(g)及びR94L(h)は本質的に区別できず(RHb-h標準と比較した場合、逆変異されたときにほんの僅かだけ少ない結合を示す)、ペプチド結合に重要であるとは思われなかった。しかしながら、抗体型RH-Cは、RHb-hを含む全ての他の変異体に対してペプチドG3及びC2への結合の増加を生じた(図6)。この場合、変異c(W47Y)は存在せず、ヒトトリプトファン残基は保持されている(しかしVC変異S30T、I48M、V67I、V71R、F78Y、及びR94Lは存在している)。これを元に、重鎖変異体RH-Cを含むヒト化抗体を選択してHCVppアッセイで試験し、RHb-hと比較した。ヒト化抗体RH

- H (ここでは、変異 h (R 9 4 L) は存在しない) をまた H C V p p アッセイでの試験に含めた。R 9 4 L 変異は、H 3 ループを支持する c a n o n i c a l 及び v e r n i e r 領域残基であり、我々は、H 3 ループの破壊が H C V p p 感染の障害に悪影響を及ぼしたかどうかを決定することを希望した。これらの重鎖をヒト化軽鎖変異体 R K 2 b と同時発現させた。

【 0 1 8 0 】

実施例 1 3 - H C V 偽粒子感染アッセイ

3 つのヒト化抗体を H C V p p 感染アッセイにおいて試験した。全てのヒト化重鎖は軽鎖 R K 2 b と対形成させた。ペプチド結合データは、重鎖 R H b - h、R H - C 及び R H - H の間に殆ど差を示唆しなかったが、図 7 及び 8 に示されたデータは、R H - C が H C V p p 感染の最善のインヒビターであることを示唆していた。R H - C 抗体は、H C V p p 感染の障害についてポジティブコントロールキメラ A P 3 3 と少なくとも同様に効果的であったが、他のヒト化抗体 R H b - h 及び R H - H は有意に効果が少なかった。4 つの実験に対する I C 5 0 及び I C 9 0 は表 3 に示され、ヒト化抗体が全ての遺伝子型にわたってキメラ抗体のものと非常に類似した I C 5 0 及び I C 9 0 値を示すことを示している。

【 0 1 8 1 】

この結果は、R H - C における逆突然変異の位置 (つまり、残基位置 4 7) が v e r n i e r 残基及び界面残基の双方であり、元のヒト F W 中に見出されるトリプトファン残基が重鎖と軽鎖の間の界面を改善するか、又は H 2 ループを良好に支持するか、又は双方をなしうることを示唆している (図 9 及び 1 0) ので、予想できない。また、トリプトファン残基は図 9 に同定された親油性領域を増大しえ、おそらくは結合に寄与する。

A P 3 3 エピトープ中に存在するトリプトファン残基は、A P 3 3 結合にとって重要であることが示されている。Tarr A.W. 等, Hepatology 43:592-601 (2006) を参照のこと。マウス重鎖残基 Y 4 7 の位置は、ヒト化抗体において変異されている v e r n i e r 及び c a n o n i c a l 残基の位置をまた示している図 1 0 に示されている。Y 4 7 残基は C D R の親油性領域の直ぐ下にあり、Y 4 7 W 変異が親油性領域のベースのギャップを満たすのを補助するというのが合理的な仮説である。

【 0 1 8 2 】

Y 4 7 W 変異によって媒介される改善された結合の性質を解明するのに役立つ一つの方法は抗体 E 2 結合の動態解析である。しかしながら、我々は、R H - C 及び E 2 タンパク質環の相互作用の動態解析を実施することができなかった。H C V E 2 タンパク質は精製されると凝集体を形成する。不幸にも、これまで利用できなかった単量体 E 2 タンパク質が抗体に対する結合親和性を測定するために必要である。

ペプチド解析からのデータは、重鎖型 R H - G 及び R H - H の結合間には非常に僅かな差があることを示唆している。H C V 偽粒子実験において R H - C と組み合わせてこれらの型を試験することは興味深い。これらの残基はそれぞれ H 2 及び H 3 ループを支持するのを助けるかもしれないので、結合と障害についてポジティブな効果がありうることはもっともらしい。

【 0 1 8 3 】

実施例 1 4 - キメラ変異体 A P 3 3 Y 4 7 F 及び Y 4 7 W の分析

結合への残基 Y 4 7 の寄与を更に調査するために、2 つのキメラ重鎖変異体 Y 4 7 W 及び Y 4 7 F を作製した。これら双方の変異体はキメラ軽鎖、V 1 と関連して発現しており、H C V p p 感染アッセイ及びペプチド結合において A P 3 3 と比較した。ペプチド結合実験からのデータ (図 1 1) は、残基チロシン 4 7 をフェニルアラニン又はトリプトファンとの置換によってより疎水性にすることにより、ある種の E 2 ペプチド、特にペプチド B 1 (遺伝子型 2 a) に対する結合を改善しうることを示唆している。しかしながら、図 1 2 に示される遺伝子型 I a (分離体 1 a H 7 7 . 2 0 由来) に対する H C V p p 感染アッセイで抗体が使用される場合、Y 4 7 W 又は Y 4 7 F 変異による障害の亢進はなかった。従って、様々な遺伝子型について A P 3 3 中の Y 4 7 W 変異が一般に感染障害の抗体力

価を改善しうるかどうかを決定するためにHCVpp感染アッセイを実施する必要があるが、RH-Cにおける改善されたY47W変異がヒト化に特異的であることが結論される。

【0184】

実施例15 材料と方法

次の材料と方法を実施例15A-Cに記載の実験に対して使用した。

バキュロウイルス発現された可溶型E2(sE2)の生産

sE2発現：可溶型E2(sE2)を、過去に記載されたようにして、アミノ酸661で切断して膜貫通ドメインを欠失させることによって(sE2661)、生産した。Roccasecca, R.等, J Virol 77:1856-67 (2003)参照。sE2661をバキュロウイルストランスファクター中にクローニングし、BacPak6線形化ウイルスDNA(BD Clontech)と同時形質移入し、接着Sf-9昆虫細胞中に入れ、27℃でESF921タンパク質を含まない培地(Expression Systems, LLC)中で培養した。得られたウイルスストックを、大規模なタンパク質生産に使用する前に標準的なバキュロウイルス法を使用して2回増幅させた。製造はWave(TM)バイオリアクター(GE Bioscience)中で行った。10リットルのT.ni Pro細胞(Expression Systems, LLC)培養物を 2×10^6 細胞/mLまで増殖させ、50mLの上記のようにして調製されたウイルスストックに感染させた。上清を3000×gで15分遠心分離することによって感染後48時間で収集し、精製前に、0.2μMのフィルターを通して濾過した。

【0185】

sE2精製：10Lのバキュロウイルス上清を50mLのニッケル-NTA樹脂と共にバッチ化した。PBS+0.3MのNaCl中250mMのイミダゾールを用いて、HISタグ可溶型E2を樹脂から溶離させた。溶離物を20mMの酢酸Na, pH5.0中に希釈し、34mLのSPFFカチオン交換カラムに充填し、タンパク質を0.3MのNaClを含む酢酸塩バッファーで溶離させた。ついで、溶離物をPBS+0.15MのNaCl中の24mLのS200ゲル濾過カラムに充填し、PBSバッファー中に透析した。質量分析を使用するSource Decayでは、N末端は分泌タンパク質の予想されたN末端に一致していた。

【0186】

HCV E2に対するAP33/RH-C/RK2b親和性の決定

BIAcoreアッセイ：BIAcore A100機器での表面プラズモン共鳴(SPR)測定を用いて、抗体に対する可溶型E2(sE2)の結合に対する親和性を決定した。抗ヒトFcセンサーチップ表面上でのヒト化抗体の捕捉後に変動濃度のsE2を注入する形式を用いた。抗ヒトFc抗体は、製造者によって示唆されたように、アミン化学を使用してセンサーチップ表面に共有的に結合させた。ヒト化抗体は、30μL/分の流量で60μLの0.5μg/mL溶液を注入することによって捕捉した。sE2溶液の60μLの注入に対してセンサーグラムを集め、480sの間解離をモニターした。センサーチップ表面は、15μLのアリコート3MのMgCl2の注入によって再生し、捕捉抗体からの抗体-抗原複合体の解離が生じた。測定は、2倍の増分で1.56nMから50nMの範囲のsE2濃度で繰り返した。全ての測定は、捕捉抗E2抗体のない参照フローセルからのデータのリアルタイムの減算を含んでいた。バッファー単独の注入に対するセンサーグラムもまた減算した。流通バッファーはHepes緩衝生理食塩水、pH7.2で、温度は25℃であった。これらのデータは、動態定数を決定するために製造者によって提供されるソフトウェアを使用して、1:1のラングミュア結合モデルで解析した。

【0187】

スキャッチャード解析：

293T細胞の表面に発現されたE1E2ヘテロ二量体の一部としてのHCV E2に対するRH-C/RK2bの親和性を放射性リガンド細胞結合アッセイを使用して決定した。抗HCV抗体のRH-C/RK2b及びRH-C/RK2b Fabを、Iodogen法を使用してヨウ素化した。放射性標識抗HCV抗体を、NAP-5カラムを使用す

るゲル濾過によって遊離の $125\text{I} - \text{Na}$ から精製した。精製した $\text{RH} - \text{C} / \text{RK}2\text{b}$ 及び $\text{RH} - \text{C} / \text{RK}2\text{b} \text{ Fab}$ 抗体は、それぞれ $17.96\text{ }\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ 及び $55.21\text{ }\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ の比活性を有していた。固定濃度のヨウ素化抗体と減少濃度の連続希釈未標識抗体を含む $50\text{ }\mu\text{L}$ 容積の競合反応混合物を、 96 ウェルプレート中に配した。 293T 細胞に製造者の推奨に従って $\text{Fugene}6$ 形質移入試薬(Roche)を形質移入した。細胞に最終容積 25 mL の補充栄養無しの Freestyle 培地(Invitrogen , Gibco)中、 $25\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ のプラスミドプラス $100\text{ }\mu\text{L}$ の $\text{Fugene}6$ 試薬を形質移入した。形質移入後 48 時間で Sigma 細胞解離バッファーを使用して細胞をプレートから剥がし、結合バッファー(2% の FBS 、 50 mM の HEPES , $\text{pH}7.2$ 、及び 2 mM のアジ化ナトリウムを含む $50:50$ の $\text{DMEM} / \text{F12}$)で洗浄し、 0.2 mL の結合バッファー中 2×10^5 細胞の適切な密度で、 $50\text{ }\mu\text{L}$ の競合反応混合物に加えた。細胞を含む各競合反応物中のヨウ素化抗体の最終濃度は、 $\text{RH} - \text{C} / \text{RK}2\text{b}$ に対して $\sim 200\text{ pM}$ 、 $\text{RH} - \text{C} / \text{RK}2\text{b} \text{ Fab}$ に対して $\sim 500\text{ pM}$ であり、細胞を含む競合反応物中の未標識抗体の最終濃度は変動し、 500 nM で始まった後、 10 通りの濃度に対して $1:2$ 倍で減少する。細胞を含む競合反応物を室温で 2 時間インキュベートした。各濃度の未標識抗体に対する細胞を含む競合反応物を 3 組でアッセイした。インキュベーション後、競合反応物を Millipore マルチスクリーンフィルタープレートに移し、結合したヨウ素化抗体から遊離物を分離するために結合バッファーで $4 \times$ 洗浄した。フィルターを $\text{Wallac Wizard 1470}$ ガンマカウンター($\text{PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.}$)でカウントした。結合データを、抗体の結合親和性を決定するために Munson 及び Robard のフィッティングアルゴリズム($\text{Munson, P. J., 及びD. Rodbard, Anal Biochem 107:220-39 (1980)}$)を使用する New Ligand ソフトウェア(Genentech)を使用して評価した。

【0188】

感染細胞培養 $\text{HCV}(\text{HCVcc})$ の生産

完全長 HCVcc ゲノムをコードするプラスミドの生産： $\text{Jc1}(\text{J6} / \text{C3})$ 及び $\text{Con1} / \text{C3}$ に対する完全長 HCV ゲノムを、 NCBI データベースに記載された(J6)、 JFH-1 及び Con1 の DNA 配列[それぞれ $\text{HC-J6}(\text{CH})$ (クローン pJ6CF)、 Con1 及び JFH-1 に対して登録番号 AF177036 、 AJ238799 及び AB047639]を使用して、 Gene Oracle Inc. (Mountain View, CA)に外部委託することによって化学的に合成した。 JFH-INS2-NS5B 領域に融合した J6 及び Con1 構造領域(コア- E1-E2-p7-NS2 の一部)をコードするキメラ HCVcc ウイルスは過去に記載されたようにして生産した($\text{Pietschmann, T.等, Proc Natl Acad Sci U S A 103:7408-13 (2006)}$)。 $\text{Con1} / \text{C3}$ -ネオ HCVcc を作製するために、 $5'$ -未翻訳領域(UTR)を含み、ネオマイシン耐性遺伝子及び脳心筋炎ウイルス配列内リボソーム進入部位(EMCV IRES)エレメントが続き、 EcoRI 及び PmeI 制限部位が隣接する DNA 断片を Gene Oracle Inc. (Mountain View, CA)に外部委託して化学的に合成した。 $\text{Con1} / \text{C3}$ -ネオ HCVcc をコードするプラスミドは、 EcoRI 及び PmeI での消化によって生産した。 $\text{Jc1}(\text{J6} / \text{C3})$ 及び $\text{Con1} / \text{C3}$ -ネオ DNA 断片の双方を、独特な EcoRI 及び XbaI 制限部位を使用して pUC19 ベクター中にライゲートさせ、 pUC-Jc1 及び $\text{pUC-Con1} / \text{C3}$ -ネオを生産した。

【0189】

インビトロ転写反応： pUC-Jc1 及び $\text{pUC-Con1} / \text{C3}$ -ネオプラスミドを、 HCV ゲノムの $3'$ 末端に位置する XbaI で消化させた。 $30\text{ }\mu\text{g}$ の pUC-Jc1 及び $\text{pUC-Con1} / \text{C3}$ -ネオを、 $300\text{ }\mu\text{L}$ の最終容積中の 20 U XbaI を使用して 37°C で一晩消化させた。次の日、 RNA を、過去に記載されているように、酸フェノールを使用して抽出した。 $\text{Kapadia, S. B.等 J Virol 81:374-83 (2007)}$ 。インビトロ転写反応は、製造者の推奨に従って、 T7 Megascript キット(Ambion)を使用して実施した。 HCV RNA を、過去に記載されているようにして、フェノー

ル/クロロホルム及びエタノール沈殿を使用して抽出した。Kapadia, S. B.等, J Virol 81:374-83 (2007))を参照。RNAを-70 で保存した。

【0190】

HCVccストックの生成：Hu h - 7 . 5細胞を、37 で5%CO₂の雰囲気下で、完全ダルベッコ変法イーグル培地(c - DMEM)(10%の仔ウシ血清[FBS]、100 U / mlのペニシリン、100 mg / mlのストレプトマイシン、2 mMのL - グルタミン、及び0 . 1 mMの非必須アミノ酸を補充した)中で培養した。形質移入の日に、細胞をトリプシン処理し、Opti - MEM培地(Gibco)で2回洗浄し、Opti - MEM中に10⁷細胞/mlの最終濃度で再懸濁させた。400 µlの細胞(4 × 10⁶細胞)プラス10 µgのインビトロで転写されたJc1又はCon1 / C3 - ネオRNAを0 . 4 cmの電気穿孔キュベット(BioRad)に加えた。電気穿孔は、次のパラメータを使用し、Gene Pulser (BioRad)を使用して実施した：0 . 27 kV、100 オーム及び950 µF。キュベットを室温で10分間インキュベートして、c - DMEMを含む一つのT162フラスコ中に細胞を移す前に細胞を回復させた。細胞をトリプシン処理し、培養が要求される培養密度の80 - 90%に達したときに分割した。形質移入から3日後に上清を収集し、清澄にし、感染ウイルス力価を、過去に記載されたようにTCID₅₀計算法を使用して測定した。Lindenbach, B. D.等, Science 309:623-6 (2005)を参照のこと。上清を一定分量に分け、-70 で保存した。

10

【0191】

HCV偽粒子(HCVpp)の生産

20

プラスミド：HCV遺伝子型Ia(H77)、Ib(Con1)及び2a(J6)由来のE1及びE2糖タンパク質を発現するプラスミドを、幾分か変更して過去に記載されたようにして生産した(Hsu, M.等, Proc Natl Acad Sci U S A 100:7271-6 (2003))。簡潔に述べるとE1及びE2をコードする(そしてHCVコアのC末端からのシグナルペプチドを含む)領域をpRK哺乳動物発現ベクター中にクローニングし、発現プラスミドpRK - H77、pRK - Con1及びpRK - J6をそれぞれ生産した。8 . 9パッケージングプラスミドは元々はGreg Hannon(Cold Spring Harbor Labs) / David Baltimore(Cal Tech)からジェネンテックが獲得したものである。Zufferey等, Nature Biotechnology 15:871-875 (1997)を参照のこと。FCMV - Luc - IRES - dsREDプラスミドは、修飾されたpFUGWプラスミドであり、Cold Spring Harb or LabsのGreg Hannonからジェネンテックが得たもので、それぞれHCMVプロモーター及びIRESエレメントによって駆動されるホタルルシフェラーゼ及びDsRedをコードする。

30

【0192】

HCVppは、若干の変更をして過去に記載されたようにして(Bartosch, B.等, J Exp Med 197:633-42 (2003))、HEK293T細胞中で生産した。簡潔に述べると、2 . 5 × 10⁶の293T細胞を10 - cmプレート中に前の日に播種した。次の日に、細胞に、製造者の推奨に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を使用して、FCMV - Luc - IRES - DsRedプラスミド(5 µg)、8 . 9トランスファクター(10 µg)及びpRK - H77、pRK - Con1又はpRK - J6プラスミド(1 µg)を同時形質移入した。形質移入から6時間後に、OptiMEM培地(Invitrogen, Gibco)をc - DMEMで置換した。形質移入から2日後に、上清を収集し、清澄にし、更に超遠心分離(3000 rpmで5分)によって精製し、感染力アッセイにおいて使用した。5 × 10³のHu h - 7 . 5細胞を白壁の96ウェルプレート(Costar)に播種した。次の日に、細胞に適当な希釈のHCVppを形質導入した。感染から72時間後に、細胞を1 × 溶解バッファーに溶解させ、ルシフェラーゼ活性をLuciferase Assay System(Promega)を用い、製造者の推奨に従って測定した。

40

【0193】

HCV E2への抗体結合を決定するためのELISAアッセイ

50

E 2 可溶化物の調製：リポフェクタミン 2000 を製造者の推奨に従って使用して、293T 細胞に 10 µg の pRK-H77、pRK-Con1 又は pRK-J6 プラスミドプラスミドを一過性に形質移入した。形質移入から 48 時間後に、細胞を PBS で洗浄した後、1 µL の溶解バッファー (20 mM の Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM の NaCl; 1 mM の EDTA; 0.5 % の NP-40; 20 mM のヨードアセトアミド) に可溶化させた。可溶化物を 4 で 20 分間振とうさせながらインキュベートし、5 分間遠心分離した。ついで清澄にした上清を用いて ELISA プレートに被覆した。

【0194】

HCV E2 ELISA: ELISA アッセイを過去に記載されたようにして実施した。Owsianka, A. 等, J Virol 79:11095-104 (2005) を参照。簡潔に述べると、96 ウェル Immulon 2 プレートに、100 µL の PBS 中の 0.25 µg / ウェルのスノードロップ (*Galanthus nivalis*) レクチン (GNA, Sigma) を被覆し、室温で一晩インキュベートした。次の日に、プレートを、0.02 % の Tween-20 (PBST) を含む PBS で 3 × 洗浄し、PBST に希釈した細胞可溶化物で被覆し、室温で 2 時間インキュベートした。慢性 HCV 感染患者の血清の希釈物を 2 % の脱脂粉乳 / PBST に希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。PBST での 3 × 洗浄後、100 µL / ウェルの抗ヒト HRP 結合二次抗体を PBST 中 1:1000 の希釈で加え、室温で 1 時間インキュベートした。ウェルを PBST で 6 × 洗浄し、暗所においてウェルを室温で 30 分、100 µL の TMB の基質と共にインキュベートした。反応を、50 µL / ウェルの 0.5 M の H₂SO₄ を加えることによって停止させ、A₄₅₀ を Synergy 2 プレートリーダー (BioTek Instruments) を使用して測定した。

【0195】

HCV cc 感染アッセイ

96 ウェルプレートでの感染では、5 × 10³ HuH-7.5 細胞 / ウェルを播種した。次の日に、細胞を感染効率 (MOI) = 0.3 Jc1 又は Con1 / C3 - ネオ HCV cc に感染させた。HCV cc を中和する抗体を同定するために、抗体を c-DMEM 中で 150 µg / ml まで希釈し、7 つの 3 倍希釈の抗体を別の 96 ウェルプレートにおいて作製した。HCV cc 及び抗体希釈物を組合せ、ナイーブな HuH-7.5 細胞の接種前に 37 で 1 時間プレインキュベートした。感染から 3 日後に全 RNA を収集し、HCV RNA 複製 (HCV / GAPDH cDNA の比として測定) を、以下に記載の RT-qPCR を使用して決定した。

【0196】

HCV 感染の定量

HCV cc RNA 複製：96 ウェルプレートで実施された実験では、全 RNA を、製造者の指示書に従って、SV96 全 RNA 単離システム (Promega) を使用して抽出した。各ウェルからの RNA を 100 µL の RNase フリー水中に溶離させ、4 µL の RNA を、Taqman 逆転写試薬キット (Applied Biosystems) を使用して逆転写させた。RT-qPCR を、Taqman ユニバーサル PCR マスターミックス (Applied Biosystems) を使用し、25 µL の反応物中に 5 µL の cDNA を使用して実施した。全ての反応において、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現を、増幅効率及び正規化のための内部内在性コントロールとして決定した。HCV 及び GAPDH に対するプライマー及びプローブは次の通りである：

GT1b センスプライマー, 5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACA-S' ;
 GT1b アンチセンスプライマー, 5' -TGCACGGTCTACGAGACCTCC-S' ;
 GT1b プローブ, 6FAM-ACCCGGTCGTCCTGGCAATTCC-MGBNFQ;
 GT2a センスプライマー, 5' -CTTCACGCAGAAAGCGCCTA;
 GT2a アンチセンスプライマー, 5' -CAAGCACCTATCAGGCAGT-S' ;
 GT2a プローブ, 6FAM-TATGAGTGTCTACAGCCTC-MGBNFQ;
 GAPDH センスプライマー, 5' -GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-S' ;
 GAPDH アンチセンスプライマー, 5' -GAAGATGGTGATGGGATTTC-S' ;

GAPDHプロンプ、VIC-ATGACCCCTTCA TTGACCTC-MGBNFQ。

蛍光は7500HTリアルタイムPCR機器(Applied Biosystems, CA)を使用してモニターした。

【0197】

感染HCVccの滴定：感染細胞の上清中に存在する感染HCVccを過去に記載されているようにして測定した。Lindenbach, B. D.等, Science 309:623-6 (2005)を参照のこと。簡潔に述べると、滴定を、ポリ-L-リジン被覆96ウェルプレート中で 5×10^3 のHuh-7.5細胞を播種することによって実施した。次の日に、細胞を最終容積の100 μ L中の10倍希釈の上清と共に接種した。3日後、細胞をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定し、過去に記載されたようにして(Kapadia, S. B.等, J Virol 81:374-83 (2007))抗HCVコア抗体, C7-50 (Abcam)を用いて免疫染色した。力価は過去に記載されたようにしてReed及びMuenchの方法に従って計算した。Lindenbach, B. D.等, Science 309:623-6(2005)を参照。

【0198】

RH-C/RK2b媒介中和に対する慢性的にHCV感染した患者からの血清の効果

慢性HCV感染患者からの血清がインビトロでのHCV感染のRH-C/RK2b媒介中和をアンタゴナイズしたかどうかを決定するために、HCVpp系を使用して中和アッセイを実施した。HCVppを、10%の仔ウシ血清(FBS)、10%の正常なヒト血清(NHS)、又は10%の慢性HCV感染患者からの血清(CHCHS-1、2及び3)の何れかの存在下で37℃で1時間、異なった濃度のRH-C/RK2bと共にインキュベートした。96ウェルプレートに播種されたHuh-7.5細胞をHCVpp：抗体混合物を用いて接種した。4時間の形質導入後、培地を、10%のFBS黄ラスアッセイの残りのための栄養補助剤を含むc-DMEMと置き換えた。3日後、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を、上述のようにして測定した。抗HCV E1/E2抗体のレベルを上述のようにしてELISAを使用して決定した。

【0199】

実施例15A：RH-C/RK2bによるHCVcc及びHCVppの中和

RH-C/RK2bがHCV侵入及び感染を阻害するかどうかを決定するために、中和アッセイを、HCVpp及びHCVccの双方を使用してHuh-7.5細胞において実施した。AP33をコントロールとして使用した。RH-C/RK2bによるHCV侵入の特異的阻害を同定するために、GTIb(Con1)又はGT2a(J6)からのE1E2配列を含むHCVppをAP33又はRH-C/RK2bの存在下でインキュベートした。RH-C/RK2bはCon1及びJ6 HCVpp侵入を均等に阻害した(それぞれCon1及びJ6 HCVppに対して $EC_{50} = 0.511 \mu g/mL$ 及び $0.793 \mu g/mL$)。図39A-Cを参照のこと。また、双方のHCVpp遺伝子型のRH-C/RK2b中和はAP33で見られたものに匹敵していた(それぞれCon1及びJ6 HCVppに対して、 $EC_{50} = 1.417 \mu g/mL$ 及び $2.066 \mu g/mL$) (図39A-C)。

RH-C/RK2bが感染細胞培養ウイルス(HCVcc)を中和したかどうかを決定するために、同様の中和アッセイを、AP33及びRH-C/RK2bを用いて実施した。AP33は、複数の遺伝子型からのE1E2配列を含むHCVppについて過去に記載されたものに匹敵するレベルまでCon1及びJ6 HCVccの双方を阻害した(Owsianka, A.等, J Virol 79: 11095-104 (2005))。RH-C/RK2bはAP33に匹敵するレベルまでCon1 HCVcc感染を阻害する一方(図40A及びC)、RH-C/RK2bはAP33よりも少なくとも~4.7倍良好にJ6 HCVccを阻害した(図40B-C)。

【0200】

実施例15B：E2に対する抗HCV E2抗体の親和性の測定

更なる実験において、可溶型E2(sE2)に対するAP33及びRH-C/RK2bの親和性をBIACoreアッセイによって決定した。AP33とRH-C/RK2bは

共に同様の親和性で *sE2* に結合した (*AP33* に対して $\sim 5 - 8 \text{ nM}$ 、*RH-C/RK2b* に対して $\sim 3.8 \text{ nM}$)。それに対して、各抗体の *Fab* 断片は $\sim 50 \text{ nM}$ の親和性で *sE2* に結合した。*sE2* タンパク質の結合に加えて、*293T* 細胞の表面上に発現された *E1E2* ヘテロ二量体への *AP33* 及び *RH-C/RK2b* の結合を決定した。*E1E2* をコードするプラスミドが形質移入された *293T* 細胞はその細胞表面に機能的 *E1E2* ヘテロ二量体を発現することが知られているので、スキッチャード解析を実施して、*RH-C/RK2b* 及び *RH-C/RK2b Fab* の親和性を決定した。細胞表面に発現された *E2* に対する *RH-C/RK2b* 及び *RH-C/RK2b Fab* の親和性 (それぞれ ~ 5 及び $\sim 50 \text{ nM}$) は、上述の *BIAcore* アッセイで *sE2* で見られたものに匹敵していた。表 10 を参照のこと。

10

表10: 抗体親和性 (nM)

抗体	<i>sE2</i>	<i>E1E2</i> スキッチャード
<i>AP33</i>	5-8	
<i>AP33 Fab</i>	50	
<i>RH-C/RK2b</i>	3.8 ± 0.6	5
<i>RH-C/RK2b Fab</i>		50

【 0 2 0 1 】

実施例 15 C : 慢性 *HCV* 感染患者からの血清は *KH-C/RK2b* 媒介中和をアンタゴ

20

ナイズしない

抗 *HCV* 抗体を含む慢性患者の血清が *RH-C/RK2b* の中和能をアンタゴナイズできるかどうかを決定するために、中和アッセイを、10% の正常なヒト血清 (*NHS*) 又は慢性 *HCV* 感染患者からの血清 (*CHCHS-1* 及び *-2*) の存在下で *Con1HCVpp* を使用して実施した。*RH-C/RK2b* は、ヒト血清の供給源に拘わらず匹敵できるレベルまで *HCV* 感染を阻害した (図 41A)。これらの慢性 *HCV* 感染患者の血清が遺伝子型 1b に対する抗体を含んでいるかどうかを決定するために、*GT1b (Con1) E1E2* 感染 *293T* 細胞からの可溶化物を使用して *ELISA* アッセイを実施した。 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度で始めて 3 倍希釈の *RH-C/RK2b* をコントロールとして使用した。*E2* への結合は *NHS* では検出されなかったが、用量依存的結合は双方の慢性 *HCV* 感染患者の血清で検出されており、それらが *Con1HCV E1E2* - 反応性抗体を含んでいたことを示唆している。図 41B を参照。これらの結果は、抗 *HCV* 抗体は患者の血清中に存在しているが、インビトロで *HCV* を中和する *RH-C/RK2b* の能力を妨害しないことを示唆している。

30

【 0 2 0 2 】

文献

1. Anonymous, *J Viral Hepatology* 6:35-47 (1999)。
2. Yagnik AT 等, *Proteins* 40:355-66 (2000)。
3. Owsianka A. 等, *J Gen Virol* 82:1877-83 (2001)。
4. Patel A.H. 等, *J Gen Virol* 81:2873-83 (2000)。
5. Owsianka A. 等, *J Virol* 79:11095-104 (2005)。
6. Fiser A 等, *Protein Sci* 9: 1753-73 (2000)。
7. Fiser A. 及び Sali A., *Methods Enzymol* 374:461-91 (2003)。
8. Sali A. 及び Blundell T.L., *J Mol Biol* 234:779-815 (1993)。
9. Saldanha J.W. 等, *J Mol Biol Immunol* 5391(22436):487709-99719 (1992)。
10. Foote J. 及び Winter G., *J Mol Biol* 224:487-99 (1992)。
11. Chothia C. 等, *J Mol Biol* 186:651-63 (1985)。
12. Chothia C. 等, *Nature* 342:877-83 (1989)。
13. Tarr A. W. 等, *Hepatology* 43:592-601 (2006)。
14. Mierau R. 等, *Rheumatol Int* 12:23-31 (1992)。

40

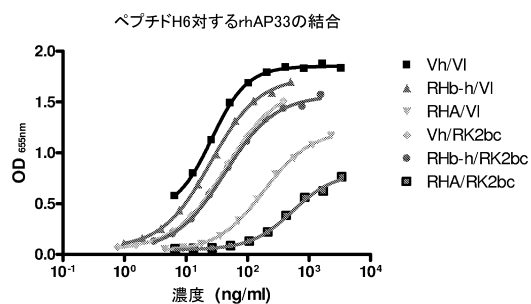
50

15. Ghosh S.等, J Immunol 174:2860-9 (2005).
 16. Nielsen H.等, Protein Eng. 10:1-6 (1997)。

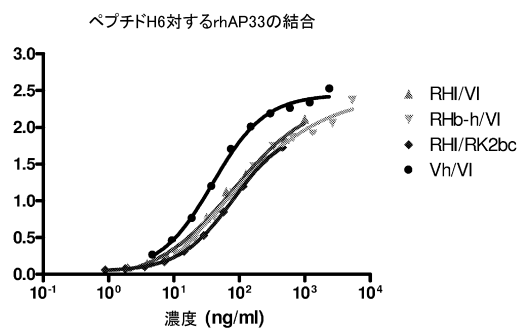
【 0 2 0 3 】

上記明細書において述べた全ての刊行物はここに出典明示により援用する。本発明の記載された方法及びシステムの様々な変更及び変形は、発明の範囲と精神から逸脱しない範囲で当業者には明らかであろう。本発明を特定の好ましい実施態様に関連して説明したが、請求項記載の発明はかかる特定の実施態様に不当に限定されるべきではないことは理解されなければならない。確かに、分子生物学又は関連分野の当業者に明らかである発明の実施形態の様々な変更は次の特許請求の範囲内に入るものである。

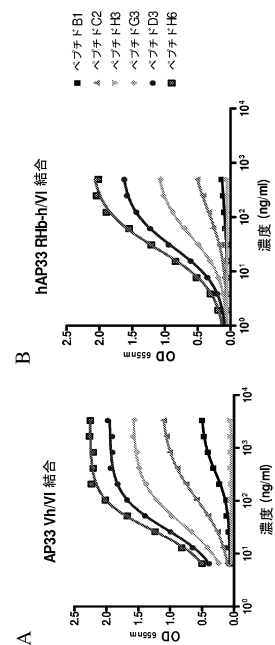
【 図 1 】



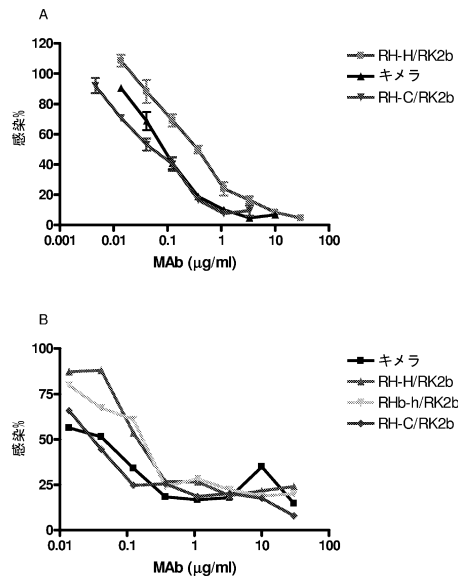
【 図 2 】



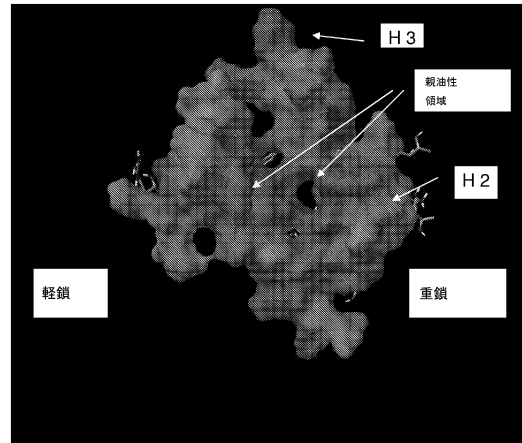
【 図 3 】



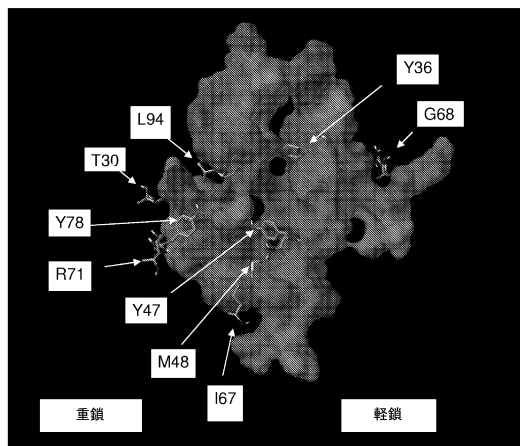
【図 8】



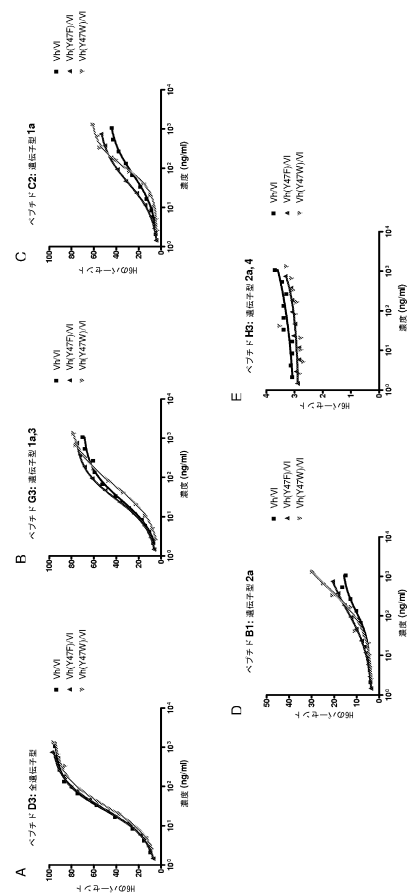
【図 9】



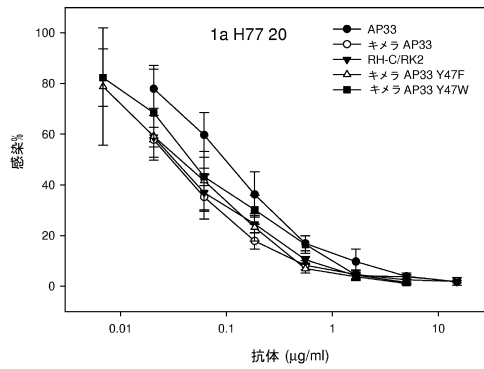
【図 10】



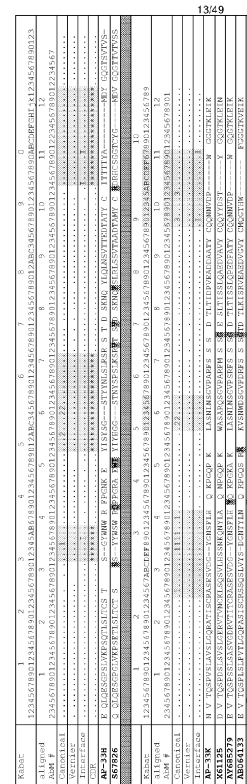
【図 11】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



一、吹糠见底

配列番号:2

【 図 1 4 】

	Canonical	残基	-1-11-1-----2--1-1
	Vernier	残基	#-----*****---+-----+
	界面	残基	-----1111-----11-
	Kabat	数	α α α α β β γ δ ε ζ η θ ι κ λ μ ν ξ ο π ρ σ τ υ φ χ ψ ω
名称	VCI	IW	
AP-33H	22	86	VVGDSTTKIKHYMGIEIRNYVALTW
U86525	14	61S.Q.WT.V.V.F.R.
S67826	14	61S.Q.WT.V.V.F.R.
42071	14	61S.Q.WT.V.V.F.R.
42069	14	61S.Q.WT.V.V.F.R.
42068	14	61S.Q.WT.V.V.F.R.
L23563	14	61R.Q.WT.V.V.F.R.
S67827	14	60S.Q.WT.V.V.F.R.
30188	14	60R.Q.WT.V.V.F.R.
42072	14	60S.Q.WT.V.V.F.R.
42070	14	60S.Q.WT.V.V.V.R.
42075	14	60S.Q.WT.V.V.F.R.
42073	14	60S.Q.WT.V.V.F.R.
42074	14	60S.Q.WT.V.V.F.R.
AJ300800	14	60G...Q.WT.V.A.E.R.
AF062169	14	59Q.WT.VMV.F.R.
AF006528	14	58F...Q.WT.V.V.F.R.
U068226	14	57V....Q.WT.V.L.F.R.
40567	14	56V....Q.WT.V.L.F.R.
AB066912	13	56G.S.Q.WT.V.V.F.R.
AB066903	13	60G.S.Q.WT.V.V.F.R.
AF062129	13	60G.S.Q.WT.V.V.F.R.

【 図 1 5 】

[illegible]

【 図 2 0 】

[illegible]

【 図 2 1 】

配列	FW スコア	VCI スコア	VCI 配列
Kabat 数			a c g t u y w v k n m l p q r s h i j o z . - x
Canonical			. .
Vernier			. .
界面			. .
AP-33K	80	17	W QPLLI GG TF F
2404	58	16	. . Y . . L I . G G T F
22255	56	15	. . . Y G
37659	68	14	L . Y G
37657	67	13	L . Y G . F
4993	55	13	L . Y G . H
S78338	67	13	. M . Y K . G

【圖 22】

配列	FW スコア	VCI スコア	VCI 配列
Kabat 数			2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
Canonical		
Vernier		
界面		
AP-33K	80	17	IIW QPIIIYGG TFYF
X61125	59	16G....
AB095284	56	15	...Y.....G...
AY685279	59	15	...Y.....G....
AY247656	58	15	...Y.....G....
AB095279	57	15	...Y.....G....
Z18845	58	15	...Y.....G....
AY685271	57	15	...Y.....G....
4752	58	15	...Y.....G....
M88499	59	15	...Y.....G....
19218	54	15	...Y.....G....
X72444	54	15	...Y.....G....
AJ399873	55	15	...Y.....G....
24310	57	15	...Y.....G....
Z37344	57	15	...Y.....G....
BC034141	55	15	...Y.....G....
AB095290	56	15	...Y.....G....
AX112586	56	15	...Y.....G....
AX044468	58	15	...Y.....G....
BC029444	56	15	...Y.....G....
26509	56	15	...Y.....G....

【 図 2 3 A 】

[illegible]

【 図 2 3 B 】

[illegible]

```

10      30      50      70
--METDILLWLLWFGSTGNVLTQSFVSLVGLSGORATISCRASGVNG--SFLHWQKQFQPKKLLYAS
SK.VLQ.QWFS...IS.AS.D...D.S...E.V.V.M.X.Q..LHRS.KONT.A..N.....W..xll125.seq
.....D.....S.S.VA.V.D.V.T...QDIS.....W.N.....K.A.....A.A..AB095284.seq
.....E.....S.S.A.V.D.V.T...Q.IS.....Y.N.....K.A.....A.A..AY685279.seq
.....E.....S.S.A.V.D.V.T.Q.QDIS.....NY.N.....K.A.....D..AY247656.seq

100      120
NENSGIPARESGSGSTWFTLIPDVEDDADNYQCO--NNVDWTFGGGKLEIK
AQ.Q..M..E.S..SSLO.E.V.V...TYSTY..Q..N
S.Q.O.S...S.SLO.E.V.V...T.SF.I..Q..R..
S.Q.O.S...S.SLO.E.F...S.YETLM..Q...
..ET..S...F..SSLO.E.FG...Y.V.Y..

AP33Kappa_chimeric.pro
xll125.seq
AB095284.seq
AY685279.seq
AY247656.seq

```

【図 24】

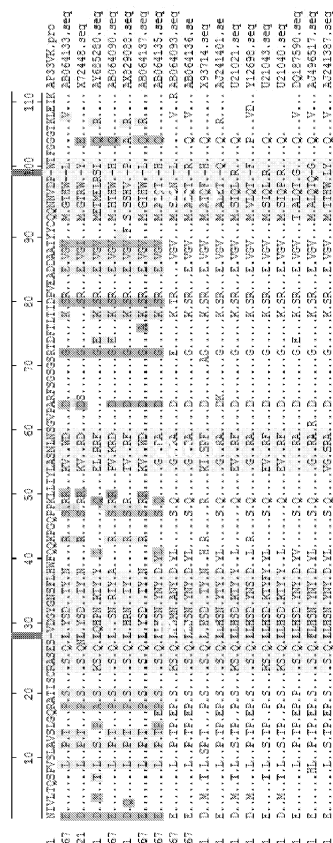
配列	VCI スコア	FW スコア	VCI 配列
Kabat 数			4 35 38 38 44 47 48 64 66 69 71 98
Canonical		
Vernier			..
界面		
AP-33K	17	80	IIWFQPLLIYGGGRTFYF
AB064133	15	60	ILWFQPLRIYGGGTFYF
X72448	15	60	ILWFQPLRIYGGGTFYF
19224	15	60	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AY685280	15	59	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AB064090	15	59	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AX829088	15	58	ILWFQPLLIYGGGTFYF
AB064137	15	58	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AB064135	15	58	ILWFQPLLIYGGGTFYF
AB064093	15	58	ILWFQPLLIYGGGTFYF
AB064136	15	57	ILWFQPLLIYGGGTFYF
X93714	15	57	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AJ241401	15	56	ILWFQPLLIYGGGTFYF
26509	15	56	ILWFQPLLIYGGGTFYF
U21021	15	56	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AJ241387	15	56	ILWFQPLLIYGGGTFYF
U21043	15	56	ILWFQPLLIYGGGTFYF
U21040	15	56	IMWFQPLLIYGGGTFYF
DQ187590	15	56	ILWFQPLLIYGGGTFYF
AJ496517	15	55	ILWFQPLLIYGGGTFYF
Y12698	15	55	IMWFQPLLIYGGGTFYF

【図 25】

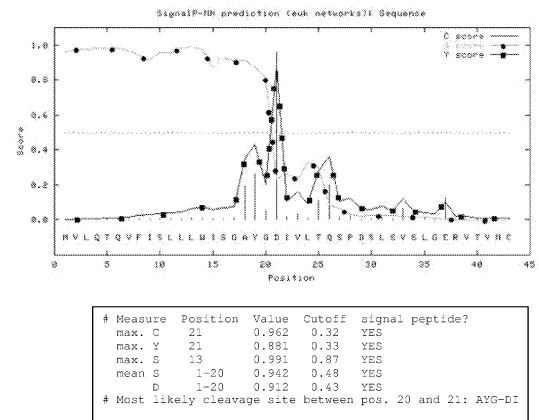
Exon. N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Canonical
Interface
AP33K	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF	IIWFQPLLIYGGGRTFYF
AB064133	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
X72448	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
19224	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AY685280	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AB064090	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AX829088	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AB064137	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AB064135	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
AB064093	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF	ILWFQPLRIYGGGTFYF
X93714	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AJ241401	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
26509	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
U21021	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF
AJ241387	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
U21043	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
DQ187590	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
AJ496517	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF	ILWFQPLLIYGGGTFYF
Y12698	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF	IMWFQPLLIYGGGTFYF

配列番号 2

【図 26】



【図 27】



【 図 3 2 】

[illegible]

A

【 図 3 3 】

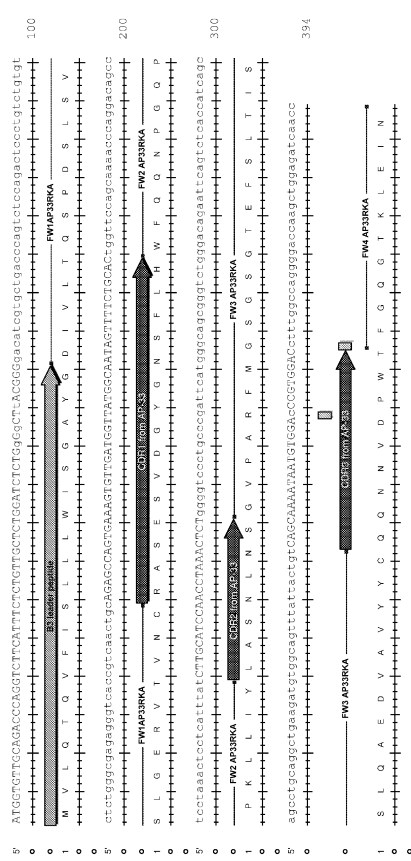
[illegible]

B

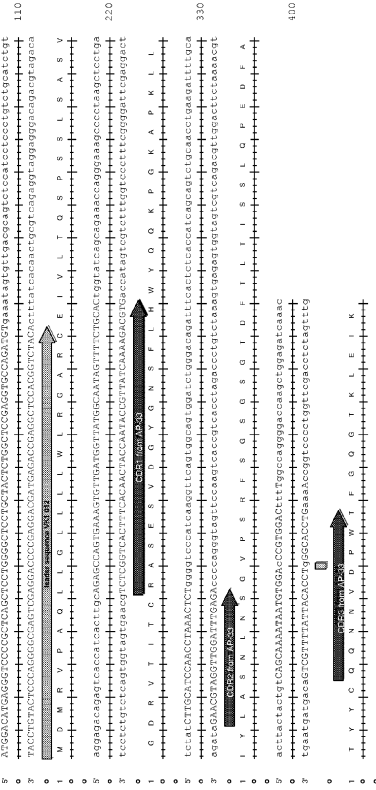
【 図 3 4 】

[illegible][illegible][illegible][illegible]

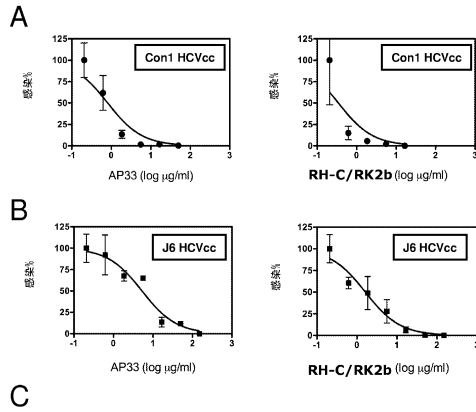
【 図 3 5 】



【図 3 6】



【 図 4 0 】



	EC ₅₀ (μg/ml)	
	AP33	RH-C/RK2b
Con1 HCVcc	0.812 (n=1)	0.72 ± 0.38 (n=2)
J6 HCVcc	8 ± 3.77 (n=7)	1.7 ± 0.3 (n=4)

【 図 4 2 A 】

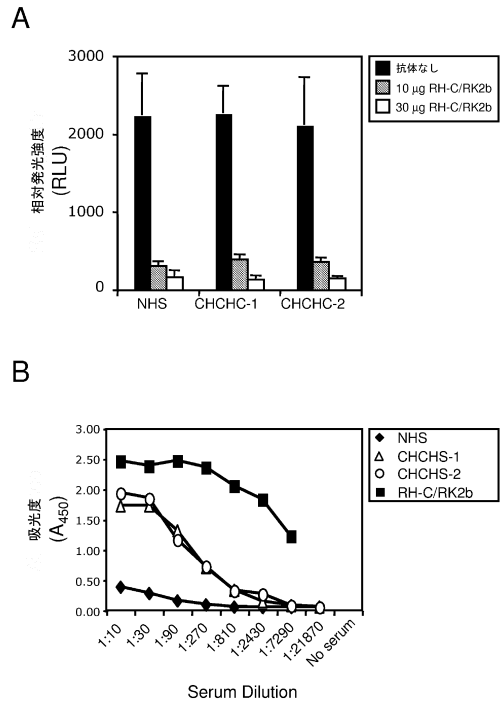
配列番号:1: AP-33重鎖のアミノ酸配列
配列番号:21: AP-33重鎖の核酸配列

[illegible]

配列番号:2:AP-33 Kカップ鎖のアミノ酸配列
配列番号:22:AP-33 Kカップ鎖の核酸配列

[illegible]

【 図 4 1 】



【 図 4 2 B 】

配列番号:3: AP33RHAのアミノ酸配列
配列番号:23: AP33RHAの核酸配列

[illegible]

配列番号:4:AP33RKAのアミノ酸配列
配列番号:24:AP33RKAの核酸配列

[illegible]

配列番号:5:AP33RKAbdのアミノ酸配列
配列番号:25:AP33RKAbdの核酸配列

[illegible]

【 図 4 2 D 】

配列番号:9:AP33RK4のアミノ酸配列
配列番号:29:AP33RK4の核酸配列

[illegible]

配列番号:10:AP33RHbcdefghのアミノ酸配列
配列番号:30:AP33RHbcdefghの核酸配列

[illegible]

配列番号:11: AP33RHIのアミノ酸配列
配列番号:31: AP33RHIの核酸配列

[illegible]

【 図 4 2 F 】

配列番号:15:RHbcdfghのアミノ酸配列
配列番号:35:RHbcdfghの核配列

[illegible]

配列番号:16:RHbcdeghのアミノ酸配列
配列番号:36:RHbcdeghの核配列

[illegible]

配列番号:17:RHbcdefhのアミノ酸配列
配列番号:37:RHbcdefhの核配列

[illegible]

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/576	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/576	Z
			G 0 1 N	33/569	H

- (72)発明者 ウィリアムズ, デイビッド ジー,
イギリス国 ロンドン エヌダブリュー7 1エーディー, ミル ヒル, パートンホール レ
ーン 1 - 3
- (72)発明者 パテル, アーヴィンド
イギリス国 グラスゴー ジー11 5ジェイアール, チャーチ ストリート, エムアールシ
ー ヴァイアロロジー ユニット

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第2006/100449(WO, A1)
HEPATOLOGY, 2006年 3月, V43 N3, P592-601

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
UniProt/GeneSeq
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)