

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5544309号
(P5544309)

(45) 発行日 平成26年7月9日(2014.7.9)

(24) 登録日 平成26年5月16日(2014.5.16)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08 Z N A
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 J
請求項の数 14 (全 95 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2010-550824 (P2010-550824)	(73) 特許権者	510032380
(86) (22) 出願日	平成21年3月10日 (2009.3.10)		セラクロン サイエンスーズ, インコ
(65) 公表番号	特表2011-518123 (P2011-518123A)		ーボレイテッド
(43) 公表日	平成23年6月23日 (2011.6.23)		アメリカ合衆国 ワシントン 98104
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/036706		, シアトル, コロンビア ストリート
(87) 国際公開番号	W02009/114560		1124, スイート 300
(87) 国際公開日	平成21年9月17日 (2009.9.17)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成23年3月11日 (2011.3.11)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/068,798	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成20年3月10日 (2008.3.10)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトメガロウイルス感染の治療および診断のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離抗CMV抗体であって、該抗体は、以下：

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列SSNGIH（配列番号57）を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISSDANDKQYADSVKG（配列番号58）を含むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列DGTCSGGNCYSGLIDY（配列番号59）を含むV_HCDR3領域；を含むV_H領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列RASQSVGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列ASIRAT（配列番号64）を含むV_LCDR2領域；(iii) アミノ酸配列HQRSNWPPLT（配列番号65）を含むV_LCDR3領域；を含むV_L領域

を含む、単離抗CMV抗体。

【請求項2】

単離抗CMV抗体であって、該抗体は、

(a) 以下：

10

20

(i) アミノ酸配列 G F T F S S (配列番号 60) を含む V_H C D R 1 領域；
(i i) アミノ酸配列 V I S S D A N D K Q (配列番号 61) を含む V_H C D R 2 領域；
(i i i) アミノ酸配列 D G T C S G G N C Y S G L I D Y (配列番号 59) を含む V_H C D R 3 領域；
を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G G Y L A (配列番号 43) を含む V_L C D R 1 領域；
(i i) アミノ酸配列 A S I R A T (配列番号 64) を含む V_L C D R 2 領域；
(i i i) アミノ酸配列 H Q R S N W P P L T (配列番号 65) を含む V_L C D R 3 領域；
を含む V_L 領域、
を含む、単離抗 C M V 抗体。

【請求項 3】

配列番号 56 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 63 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列
を含む、単離抗 C M V 抗体。

【請求項 4】

前記抗体が、C M V ウイルスの糖タンパク質 b (g B) エンベロープタンパク質のエピトープに結合する、請求項 1、2、または 3 に記載の抗 C M V 抗体。

【請求項 5】

請求項 1、2、3、または 4 に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 6】

抗ウイルス治療薬をさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記抗ウイルス治療薬が、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン (I V I G) である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

第 2 の抗 C M V 抗体をさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗体が治療薬または検出可能な標識に作動可能に連結される、請求項 1、2、3、または 4 に記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 5 に記載の組成物を含む、対象の C M V 感染を治療するための組成物。

【請求項 11】

前記組成物が、抗ウイルス治療薬とともに投与されることを特徴とする、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗ウイルス治療薬が、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン (I V I G) である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物を C M V 感染を中和するのに十分な用量で投与することを特徴とする、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項 1、2、3、または 4 に記載の抗体を含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

10

20

30

40

50

この出願は、2009年3月10日に出願された仮出願US第61/068,798号（この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、サイトメガロウイルス（CMV）感染の治療、診断、およびモニタリングに関する。本発明は、より具体的には、ヒトCMV（HCMV）特異的抗体ならびにその製造および使用に関する。かかる抗体は、CMV感染の防止および治療ならびにCMV感染の診断およびモニタリングのための薬学的組成物で有用である。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

CMVは、広範囲の罹患率および死亡率に関連する。サイトメガロウイルス（CMV）感染は一般的であり、アメリカ人の50%から85%の間で40歳までにCMVに感染すると見積もられている。CMV感染は一般に健康な成人では無症状であるにもかかわらず、高リスク群（免疫無防備状態の臓器移植レシピエントおよびHIV感染個体が含まれる）は、CMV関連疾患の発症リスクがある。さらに、CMVは、精神遅滞および発達障害を引き起こす先進国の先天性感染の重要な原因である。

【0004】

CMVは、任意の種におけるヘルペスウイルスファミリーのメンバーである。ヒトでは、CMV（HCMVとも呼ばれる）は、ヒトヘルペスウイルス5（HHV-5）と表す。CMVはヘルペスウイルスファミリーの最も大きなメンバーであり、240kbpを超える二本鎖DNAゲノムを有し、200を超える潜在的タンパク質産物をコードすることができる。単核球およびリンパ球に感染するヘルペスウイルスであるので、CMVはベータヘルペスウイルス亜科とも呼ばれる。ヒトは、CMV感染の唯一の天然宿主であるが、他の哺乳動物はCMVの他の形態に感染される。

【0005】

CMV関連疾患を罹患した患者の医学的ケアは、栄養補給、終末器官症候群（特に、免疫無防備状態の患者における肺炎）の支持療法、および特定の抗ウイルス療法からなる。CMV感染の治療または防止について少なくとも3つの抗ウイルス治療薬が米国食品医薬品局（FDA）で承認されている。これらには、ヌクレオシドであるガンシクロビル（GCV）およびシドフォビル（cidofovir）ならびにホスカルネットが含まれる。GCVは、疾患発症リスクが高い移植レシピエントにおける予防治療薬として一般的に使用される。アシクロビルはまた、実質臓器移植術の予防薬として使用されているが、生物学的利用能が低く、データによる小児における使用は支持されていない。免疫グロブリンはまた、CMV関連疾患の防止のための受動免疫として使用されている。一般に、これらの薬剤は、CMV感染の治療または防止での有効性が示されており、特に、ヌクレオシドは、重篤な副作用（貧血および他の血液の問題が含まれる）に関連する。したがって、小児におけるその使用は制限される。

【0006】

明確には、症候性CMV感染および関連疾患の治療および防止、特に小児の治療に有用な新規の薬剤が当該分野で必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、単離抗CMV抗体またはそのフラグメントであって、抗体が、I：(a) (i) アミノ酸配列SNHGIH（配列番号36）を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISSDGD D D R Y A D S V K G（配列番号37）を含むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列DGR CG E P K C Y S G L P D Y（配列番号38）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列RASQSVGGYL

10

20

30

40

50

A（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列DASNRAT（配列番号44）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列LQRNTWPPLT（配列番号45）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；I I：（a）（i）アミノ酸配列SNYGMH（配列番号48）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISDGSNEHYADSVKG（配列番号49）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列DGRCPDVNCYSGLIDY（配列番号50）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGRYLA（配列番号53）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列DASNRAT（配列番号44）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列QQRSNWPPLT（配列番号54）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；I I I：（a）（i）アミノ酸配列SSNGIH（配列番号57）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISSDANDKQYADSVKG（配列番号58）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列DGTCSGGNCYSGLIDY（配列番号59）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列ASIRAT（配列番号64）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列HQRSNWPPLT（配列番号65）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；I V：（a）（i）アミノ酸配列SNHGIH（配列番号36）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISKDG TNAHYADSVRG（配列番号68）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列EGRCIEENCYSGQIDY（配列番号69）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGRYMA（配列番号74）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列DASIRAT（配列番号75）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列QQRSSWPPLT（配列番号76）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；V：（a）（i）アミノ酸配列SNHGIH（配列番号36）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISKDG TNAHYADSVRGR（配列番号79）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列EGRCIEEKCYSGQIDY（配列番号80）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGRYMA（配列番号74）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列DASIRAT（配列番号75）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列QQRSSWPPLT（配列番号76）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；V I：（a）（i）アミノ酸配列SDYGMH（配列番号85）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISKDG T NTHYADSVRG（配列番号86）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列DGKCPDLKCYSGGLIDY（配列番号87）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列DASKRAT（配列番号92）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列HQRSSWPPLT（配列番号93）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；V I I：（a）（i）アミノ酸配列SXXGXH（配列番号95）、SXXG I H（配列番号98）、またはSXYGMH（配列番号101）を含むV_HCDR1領域；（i i）アミノ酸配列VISXDX XXXXYADSVRG（配列番号96）またはVISXDGXNXHYADSVXG（配列番号99）を含むV_HCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列DGXC SX X XCYSGLXDY（配列番号100）、EGRCIEE XCYSGQIDY（配列番号102）、またはDGXC PD X XCYSGLIDY（配列番号103）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および（b）（i）アミノ酸配列RASQSVGX Y X A（配列番号111）またはRASQSVGX Y L A（配列番号114）を含むV_LCDR1領域；（i i）アミノ酸配列XASXRAT（配列番号112）またはDASXRAT（配列番号115）を含むV_LCDR2領域；（i i i）アミノ酸配列XQRX XWPPLT（配列番号113）、HQR SXWPPLT（配列番号116）、またはQQR SXWPPLT（配列番号117）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域を含む、単離抗CMV抗体またはそのフラグメントを提供する。

10

20

30

40

50

【0008】

本発明はまた、単離抗CMV抗体またはそのフラグメントであって、抗体が、I：(a) (i) アミノ酸配列GFTFSN（配列番号39）を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISSDGDDDR（配列番号40）を含むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列DGRCGEPKCYSGLPDY（配列番号38）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列RASQSVGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列DASNRAAT（配列番号44）を含むV_LCDR2領域；(iii) アミノ酸配列LQRNTWPPLT（配列番号45）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；II：(a) (i) アミノ酸配列GLTF
SN（配列番号118）を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISSDGS
NEH（配列番号51）を含むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列DGRCPD
VNCYSGLIDY（配列番号50）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および
(b) (i) アミノ酸配列RASQSVGRYLA（配列番号53）を含むV_LCDR1
領域；(ii) アミノ酸配列DASNRAAT（配列番号44）を含むV_LCDR2領域；
(iii) アミノ酸配列QQRSNWPPLT（配列番号54）を含むV_LCDR3領域
を含むV_L領域；III：(a) (i) アミノ酸配列GFTFSS（配列番号60）を含
むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISSDANDKQ（配列番号61）を含
むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列DGTCSGGNCYSGLIDY（配列
番号59）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列R
ASQSVGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列
ASIRAT（配列番号64）を含むV_LCDR2領域；(iii) アミノ酸配列HQR
SNWPPLT（配列番号65）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；IV：(a)
(i) アミノ酸配列KFIFSN（配列番号70）を含むV_HCDR1領域；(ii) ア
ミノ酸配列VISKDGTNAH（配列番号71）を含むV_HCDR2領域；(iii)
アミノ酸配列EGRCIEENCYSGQIDY（配列番号69）を含むV_HCDR3領
域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列RASQSVGRYMA（配列番号
74）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列DASIRAT（配列番号75）
を含むV_LCDR2領域；(iii) アミノ酸配列QQRSSWPPLT（配列番号76）
を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；V：(a) (i) アミノ酸配列KFIFSN
（配列番号70）を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISKDGTNAH
（配列番号71）を含むV_HCDR2領域；(iii) アミノ酸配列EGRCIEEK
CYSGQIDY（配列番号80）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b)
(i) アミノ酸配列RASQSVGRYMA（配列番号74）を含むV_LCDR1領域；
(ii) アミノ酸配列DASIRAT（配列番号75）を含むV_LCDR2領域；(iii)
アミノ酸配列QQRSSWPPLT（配列番号76）を含むV_LCDR3領域を含む
V_L領域；VI：(a) (i) アミノ酸配列GLTFSD（配列番号88）を含むV_HC
DR1領域；(ii) アミノ酸配列VISKDGTNTH（配列番号89）を含むV_HC
DR2領域；(iii) アミノ酸配列DGKCPDLKCYSGLIDY（配列番号87）
を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列RASQS
VGGYLA（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列DASK
RAT（配列番号92）を含むV_LCDR2領域；(iii) アミノ酸配列HQRSSW
PPLT（配列番号93）を含むV_LCDR3領域を含むV_L領域；VII：(a) (i)
アミノ酸配列XXXFSX（配列番号104）またはGXTF SX（配列番号107）
を含むV_HCDR1領域；(ii) アミノ酸配列VISXDXXXXX（配列番号105）
またはVISKDGTNXH（配列番号108）を含むV_HCDR2領域；(iii)
アミノ酸配列GXGXXXXXCYSGXXDY（配列番号106）、DGXGXXXXX
CYSGLXDY（配列番号109）、またはEGRCIEEXCYSGQIDY（配列
番号110）を含むV_HCDR3領域を含むV_H領域；および(b) (i) アミノ酸配列
RASQSVGXYYA（配列番号111）またはRASQSVGXYYLA（配列番号1
14）を含むV_LCDR1領域；(ii) アミノ酸配列XASXRAT（配列番号112

10

20

30

40

50

）または D A S X R A T（配列番号 1 1 5）を含む V_L C D R 2 領域；（i i i）アミノ酸配列 X Q R X X W P P L T（配列番号 1 1 3）、H Q R S X W P P L T（配列番号 1 1 6）、または Q Q R S X W P P L T（配列番号 1 1 7）を含む V_L C D R 3 領域を含む V_L 領域を含む、単離抗 C M V 抗体またはそのフラグメントを提供する。

【0009】

本発明は、さらに、（a）配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、（b）配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、（c）配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、（d）配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、（e）配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、または f）配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む単離抗 C M V 抗体を提供する。

10

【0010】

本発明の抗 C M V 抗体は、C M V ウイルスの糖タンパク質 b（g B）エンベロープタンパク質のエピトープに結合する。本発明の 1 つの態様では、エピトープは g B、g p 1 1 6 の抗原決定基 2 部位 1 を含む。

【0011】

本発明は、1 つまたは複数の本明細書中に記載の抗体を含む組成物を提供する。一定の実施形態では、組成物はまた、抗ウイルス治療薬を含む。抗ウイルス治療薬の非限定的な例は、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン（I V I G）である。他の実施形態では、組成物は、さらに、第 2 の抗 C M V 抗体を含む。

20

【0012】

本発明は、さらに、治療薬または検出可能な標識に作動可能に連結された抗 C M V 抗体（本明細書中に記載の抗 C M V 抗体など）を提供する。

【0013】

本発明は、本明細書中に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、対象の C M V 感染の治療または防止方法を提供する。1 つの態様では、本方法は、さらに、抗ウイルス治療薬を投与する工程を含む。抗ウイルス治療薬には、以下の例が含まれるが、これらに限定されない：ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン（I V I G）。上記方法の別の態様では、抗 C M V 抗体を含む組成物を、C M V 感染を中和するのに十分な用量で C M V の曝露前または曝露後に投与する。

30

【0014】

（a）患者から得た生物サンプルを本明細書中に記載の抗体と接触させる工程、（b）生物サンプルに結合する抗体の量を検出する工程、および（c）生物サンプルに結合する抗体の量をコントロール値と比較し、これから患者中のインフルエンザウイルスの存在を決定する工程を含む、患者の C M V 感染の存在を検出するための本発明のさらなる方法を提供する。

40

【0015】

本発明はまた、本明細書中に記載の抗体を含むキットを提供する。

【0016】

あるいはまたはさらに、本発明は、サイトメガロウイルス（C M V）の糖タンパク質 g B 複合体の細胞外ドメイン中のエピトープに結合する、単離ヒトモノクローナル抗体を提供する。好ましい実施形態では、C M V はヒト C M V（H C M V）である。別の好ましい実施形態では、抗体をヒトドナー由来の B 細胞から単離する。

【0017】

本発明の一定の態様では、単離ヒトモノクローナル抗体のエピトープは C M V g B 複合体の A D - 2 領域を含む。具体的には、エピトープは C M V g B ポリペプチドのアミ

50

ノ酸70～88位を含み、ここで、アミノ酸位置の数値は配列番号30に従う。あるいは、エピトープはCMV g B複合体のアミノ酸65～93位を含み、ここで、アミノ酸位置の数値は配列番号30に従う。さらに別のエピトープはCMV g B複合体のアミノ酸60～98位を含み、ここで、アミノ酸位置の数値は配列番号30に従う。

【0018】

本発明の一定の実施形態では、本明細書中に記載のエピトープは、アミノ酸配列N E T I Y N T T L K Y G D V V G V N（配列番号32）またはN I X₃ N X₄ T X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄（配列番号33）（式中、X₁=アミノ酸EまたはT、X₂=TまたはV、X₃=YまたはR、X₄=TまたはL、X₅=LまたはA、X₆=KまたはS、X₇=YまたはV、X₈=GまたはD、X₉=DまたはF、X₁₀=VまたはS、X₁₁=VまたはQ、X₁₂=Gまたはなし、X₁₃=Vまたはなし、およびX₁₄=Nまたはなし）を全部または部分的に含む。さらなる実施形態では、エピトープは、アミノ酸配列S H R A N E T I Y N T T L K Y G D T T G T N T T K（配列番号31）を全部または一部含む。

【0019】

本発明の単離ヒトモノクローナル抗体は、2F10、2M16、2N9、3C21、4P12、5P9、または9C16である。あるいはまたはさらに、本発明は、2F10、2M16、2N9、3C21、4P12、5P9、または9C16と同一のエピトープに結合する抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、2F10、2M16、2N9、3C21、4P12、5P9、または9C16と同一のエピトープに結合する単離ヒトモノクローナル抗体を提供する。

【0020】

本発明はまた、CDR1およびCDR2を含む重鎖可変領域（V_H）を含み、前記領域がヒトIGHV3V_H生殖系列配列または前記V_H生殖系列遺伝子配列に相同な核酸配列によってコードされる、単離ヒトモノクローナル抗CMV抗体またはそのフラグメントを提供する。1つの態様では、生殖系列配列に相同な核酸配列は、IGHV3生殖系列配列に少なくとも90%相同である。本発明の抗体は、さらに、ヒトIGKV3V_L生殖系列遺伝子配列または前記V_L生殖系列遺伝子配列に相同なヌクレオチド酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（V_L）を含む。1つの態様では、V_L生殖系列配列に相同な核酸配列は、IGKV3V_L生殖系列配列に少なくとも90%相同である。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

（項目1）

単離抗CMV抗体またはそのフラグメントであって、該抗体は、以下：

I：

（a）以下、

（i）アミノ酸配列S N H G I H（配列番号36）を含むV_HCDR1領域；

（i i）アミノ酸配列V I S S D G D D D R Y A D S V K G（配列番号37）を含むV_HCDR2領域；

（i i i）アミノ酸配列D G R C G E P K C Y S G L P D Y（配列番号38）を含むV_HCDR3領域；

を含むV_H領域、および

（b）以下：

（i）アミノ酸配列R A S Q S V G G Y L A（配列番号43）を含むV_LCDR1領域；

（i i）アミノ酸配列D A S N R A T（配列番号44）を含むV_LCDR2領域；

（i i i）アミノ酸配列L Q R N T W P P L T（配列番号45）を含むV_LCDR3領域；

を含むV_L領域、

II：

（a）以下：

（i）アミノ酸配列S N Y G M H（配列番号48）を含むV_HCDR1領域；

10

20

30

40

50

(i i) アミノ酸配列 V I S S D G S N E H Y A D S V K G (配列番号 4 9) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 D G R C P D V N C Y S G L I D Y (配列番号 5 0) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G R Y L A (配列番号 5 3) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 D A S N R A T (配列番号 4 4) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 Q Q R S N W P P L T (配列番号 5 4) を含む V_L C D R 3 領域；

を含む V_L 領域、

I I I：

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 S S N G I H (配列番号 5 7) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S S D A N D K Q Y A D S V K G (配列番号 5 8) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 D G T C S G G N C Y S G L I D Y (配列番号 5 9) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G G Y L A (配列番号 4 3) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 A S I R A T (配列番号 6 4) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 H Q R S N W P P L T (配列番号 6 5) を含む V_L C D R 3 領域；

を含む V_L 領域

I V：

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 S N H G I H (配列番号 3 6) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S K D G T N A H Y A D S V R G (配列番号 6 8) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 E G R C I E E N C Y S G Q I D Y (配列番号 6 9) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G R Y M A (配列番号 7 4) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 D A S I R A T (配列番号 7 5) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 Q Q R S S W P P L T (配列番号 7 6) を含む V_L C D R 3 領域；

を含む V_L 領域、

V：

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 S N H G I H (配列番号 3 6) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S K D G T N A H Y A D S V R G R (配列番号 7 9) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 E G R C I E E K C Y S G Q I D Y (配列番号 8 0) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G R Y M A (配列番号 7 4) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 D A S I R A T (配列番号 7 5) を含む V_L C D R 2 領域；

10

20

30

40

50

(i i i) アミノ酸配列 Q Q R S S W P P L T (配列番号 7 6) を含む V_L C D R 3 領域；

を含む V_L 領域、

V I :

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 S D Y G M H (配列番号 8 5) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S K D G T N T H Y A D S V R G (配列番号 8 6) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 D G K C P D L K C Y S G L I D Y (配列番号 8 7) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G G Y L A (配列番号 4 3) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 D A S K R A T (配列番号 9 2) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 H Q R S S W P P L T (配列番号 9 3) を含む V_L C D R 3 領域；

を含む V_L 領域、

V I I :

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 S X X G X H (配列番号 9 5)、S X X G I H (配列番号 9 8)、または S X Y G M H (配列番号 1 0 1) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S X D X X X X X Y A D S V R G (配列番号 9 6) または V I S X D G X N X H Y A D S V X G (配列番号 9 9) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 D G X C S X X X C Y S G L X D Y (配列番号 1 0 0)、E G R C I E E X C Y S G Q I D Y (配列番号 1 0 2)、または D G X C P D X X C Y S G L I D Y (配列番号 1 0 3) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G X Y X A (配列番号 1 1 1) または R A S Q S V G X Y L A (配列番号 1 1 4) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 X A S X R A T (配列番号 1 1 2) または D A S X R A T (配列番号 1 1 5) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 X Q R X X W P P L T (配列番号 1 1 3)、H Q R S X W P P L T (配列番号 1 1 6)、または Q Q R S X W P P L T (配列番号 1 1 7) を含む V_L C D R 3 領域

を含む V_L 領域

を含む、単離抗 C M V 抗体またはそのフラグメント。

(項目 2)

単離抗 C M V 抗体またはそのフラグメントであって、該抗体は、

I :

(a) 以下：

(i) アミノ酸配列 G F T F S N (配列番号 3 9) を含む V_H C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 V I S S D G D D D R (配列番号 4 0) を含む V_H C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 D G R C G E P K C Y S G L P D Y (配列番号 3 8) を含む V_H C D R 3 領域；

を含む V_H 領域、および

(b) 以下：

(i) アミノ酸配列 R A S Q S V G G Y L A (配列番号 4 3) を含む V_L C D R 1 領域；

(i i) アミノ酸配列 D A S N R A T (配列番号 4 4) を含む V_L C D R 2 領域；

(i i i) アミノ酸配列 L Q R N T W P P L T (配列番号 4 5) を含む V_L C D R 3 領域

10

20

30

40

50

;
を含むV_L領域、
I I :
(a) 以下:
(i) アミノ酸配列G L T F S N (配列番号118) を含むV_H C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列V I S S D G S N E H (配列番号51) を含むV_H C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列D G R C P D V N C Y S G L I D Y (配列番号50) を含むV_H
C D R 3領域;
を含むV_H領域、および
(b) 以下:
(i) アミノ酸配列R A S Q S V G R Y L A (配列番号53) を含むV_L C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列D A S N R A T (配列番号44) を含むV_L C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列Q Q R S N W P P L T (配列番号54) を含むV_L C D R 3領域
;
を含むV_L領域、
I I I :
(a) 以下:
(i) アミノ酸配列G F T F S S (配列番号60) を含むV_H C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列V I S S D A N D K Q (配列番号61) を含むV_H C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列D G T C S G G N C Y S G L I D Y (配列番号59) を含むV_H
C D R 3領域;
を含むV_H領域、および
(b) 以下:
(i) アミノ酸配列R A S Q S V G G Y L A (配列番号43) を含むV_L C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列A S I R A T (配列番号64) を含むV_L C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列H Q R S N W P P L T (配列番号65) を含むV_L C D R 3領域
;
を含むV_L領域、
I V :
(a) 以下:
(i) アミノ酸配列K F I F S N (配列番号70) を含むV_H C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列V I S K D G T N A H (配列番号71) を含むV_H C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列E G R C I E E N C Y S G Q I D Y (配列番号69) を含むV_H
C D R 3領域;
を含むV_H領域、および
(b) 以下:
(i) アミノ酸配列R A S Q S V G R Y M A (配列番号74) を含むV_L C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列D A S I R A T (配列番号75) を含むV_L C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列Q Q R S S W P P L T (配列番号76) を含むV_L C D R 3領域
;
を含むV_L領域、
V :
(a) 以下:
(i) アミノ酸配列K F I F S N (配列番号70) を含むV_H C D R 1領域;
(i i) アミノ酸配列V I S K D G T N A H (配列番号71) を含むV_H C D R 2領域;
(i i i) アミノ酸配列E G R C I E E K C Y S G Q I D Y (配列番号80) を含むV_H
C D R 3領域;
を含むV_H領域、および
(b) 以下:
(i) アミノ酸配列R A S Q S V G R Y M A (配列番号74) を含むV_L C D R 1領域;

10

20

30

40

50

- (i i) アミノ酸配列 D A S I R A T (配列番号 75) を含む V_L C D R 2 領域；
 (i i i) アミノ酸配列 Q Q R S S W P P L T (配列番号 76) を含む V_L C D R 3 領域；
 ；
 を含む V_L 領域、
 V I I ；
 (a) 以下：
 (i) アミノ酸配列 G L T F S D (配列番号 88) を含む V_H C D R 1 領域；
 (i i) アミノ酸配列 V I S K D G T N T H (配列番号 89) を含む V_H C D R 2 領域；
 (i i i) アミノ酸配列 D G K C P D L K C Y S G L I D Y (配列番号 87) を含む V_H C D R 3 領域；
 を含む V_H 領域、および
 (b) 以下：
 (i) アミノ酸配列 R A S Q S V G G Y L A (配列番号 43) を含む V_L C D R 1 領域；
 (i i) アミノ酸配列 D A S K R A T (配列番号 92) を含む V_L C D R 2 領域；
 (i i i) アミノ酸配列 H Q R S S W P P L T (配列番号 93) を含む V_L C D R 3 領域；
 を含む V_L 領域、
 V I I I ；
 (a) 以下：
 (i) アミノ酸配列 X X X F S X (配列番号 104) または G X T F S X (配列番号 107) を含む V_H C D R 1 領域；
 (i i) アミノ酸配列 V I S X D X X X X X (配列番号 105) または V I S K D G T N X H (配列番号 108) を含む V_H C D R 2 領域；
 (i i i) アミノ酸配列 X G X C X X X X C Y S G X X D Y (配列番号 106)、D G X C X X X X C Y S G L X D Y (配列番号 109)、または E G R C I E E X C Y S G Q I D Y (配列番号 110) を含む V_H C D R 3 領域；
 を含む V_H 領域、および
 (b) 以下：
 (i) アミノ酸配列 R A S Q S V G X Y X A (配列番号 111) または R A S Q S V G X Y L A (配列番号 114) を含む V_L C D R 1 領域；
 (i i) アミノ酸配列 X A S X R A T (配列番号 112) または D A S X R A T (配列番号 115) を含む V_L C D R 2 領域；
 (i i i) アミノ酸配列 X Q R X X W P P L T (配列番号 113)、H Q R S X W P P L T (配列番号 116)、または Q Q R S X W P P L T (配列番号 117) を含む V_L C D R 3 領域
 を含む V_L 領域
 を含む、単離抗 C M V 抗体またはそのフラグメント。
 (項目 3)
 a) 配列番号 35 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 42 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列；
 b) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 52 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列；
 c) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 63 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列；
 d) 配列番号 67 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 73 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列；
 e) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 82 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列；または
 f) 配列番号 84 のアミノ酸配列を含む重鎖配列および配列番号 91 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列

10

20

30

40

50

を含む、単離抗CMV抗体。

(項目4)

上記抗体が、CMVウイルスの糖タンパク質b (gB) エンベロープタンパク質のエピトープに結合する、項目1、2、または3に記載の抗CMV抗体。

(項目5)

上記エピトープがgB、gp116の抗原決定基2部位1を含む、項目4に記載の抗CMV抗体。

(項目6)

項目1、2、3、4、または5に記載の抗体を含む組成物。

(項目7)

抗ウイルス治療薬をさらに含む、項目6に記載の組成物。

(項目8)

上記抗ウイルス治療薬が、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン (IVIg) である、項目7に記載の組成物。

(項目9)

第2の抗CMV抗体をさらに含む、項目6に記載の組成物。

(項目10)

上記抗体が治療薬または検出可能な標識に作動可能に連結される、項目1、2、3、4、または5に記載の抗体。

(項目11)

項目6に記載の組成物を対象に投与する工程を含む、該対象のCMV感染を治療または防止するための方法。

(項目12)

上記方法が、抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む、項目11に記載の方法。

(項目13)

上記抗ウイルス治療薬が、ガンシクロビル、ホスカルネット、シドフォビル、バルガンシクロビル、および静脈内免疫グロブリン (IVIg) である、項目11に記載の方法。

(項目14)

上記抗体をCMVへの曝露前または曝露後に投与する、項目11に記載の方法。

(項目15)

上記抗体をCMV感染を中和するのに十分な用量で投与する、項目11に記載の方法。

(項目16)

患者のCMV感染の存在を決定するための方法であって、

(a) 該患者から得た生物サンプルを項目1、2、3、4、または5に記載の抗体と接触させる工程、

(b) 該生物サンプルに結合する抗体の量を検出する工程、および

(c) 該生物サンプルに結合する抗体の量をコントロール値と比較し、それから該患者中のインフルエンザウイルスの存在を決定する工程、

を含む、方法。

(項目17)

項目1、2、3、4、または5に記載の抗体を含む診断キット。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A】図1は、示したヒト抗CMV抗体の可変領域のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図1Aはγ重鎖可変領域のアラインメントを示し、図1Bはκ軽鎖可変領域のアラインメントを示す。各アラインメントの下にコンセンサス配列を示す。赤色はA、D、F、W、Y、S、またはTである。淡緑色はPである。淡青色はNまたはQである。黄色はCまたはMである。非常に薄い青色はA、G、I、L、またはVである。濃青色はR、H、またはKである。これらは配列比較のための視覚的補助のみを目的とする。

【図1B】図1は、示したヒト抗CMV抗体の可変領域のアミノ酸配列のアラインメント

10

20

30

40

50

を示す。図1 Aは γ 重鎖可変領域のアラインメントを示し、図1 Bは κ 軽鎖可変領域のアラインメントを示す。各アラインメントの下にコンセンサス配列を示す。赤色はA、D、F、W、Y、S、またはTである。淡緑色はPである。淡青色はNまたはQである。黄色はCまたはMである。非常に薄い青色はA、G、I、L、またはVである。濃青色はR、H、またはKである。これらは配列比較のための視覚的補助のみを目的とする。

【図2】図2は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの2F10ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

【図3】図3は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの2M16ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

10

【図4】図4は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの2N9ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

【図5】図5は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの3C21ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

【図6】図6は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの3G7ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

20

【図7】図7は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの4P12ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

【図8】図8は、表示の競合ペプチドの存在下または非存在下でのCMV gp116エピトープAD2ペプチドへの5J12ヒト抗CMV抗体の結合を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連する蛍光を示す。

【図9】図9は、2F10ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

【図10】図10は、2M16ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

30

【図11】図11は、2N9ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

【図12】図12は、3C21ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

【図13】図13は、3G7ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

【図14】図14は、4P12ヒト抗CMV抗体によるCMVウイルスの中和を示すグラフである。グラフは、表示濃度の抗体に関連するウイルス阻害量を示す。

【図15】図15は、3つのヒト細胞株における30~0.003 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の希釈度での6つの抗HCMV抗体（上の2列）および2つのコントロール（下の1列）を使用した相対%感染性対ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）ウイルス株（VR1814）濃度の一連のグラフである。

40

【図16】図16は、ヒト線維芽細胞株における30~0.003 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の希釈度での6つの抗HCMV抗体（上の2列）および2つのコントロール（下の1列）を使用した相対%感染性対HCMVウイルス株（8818、8819、および8824）濃度の一連のグラフである。

【図17】図17は、ヒト内皮細胞株および上皮細胞株における種々の濃度での6つの抗HCMV抗体（上の2列）および2つのコントロール（下の1列）を使用した相対%感染性対HCMV臨床分離株（8819）濃度の一連のグラフである。

【図18】図18は、JH4細胞における種々の濃度での6つの抗HCMV抗体（上の2

50

列) および 2 つのコントロール (下の 1 列) を使用した相対%感染性対モルモット CMV (GPCMV) ウイルス株 (V 5 4 5 / 3 2) 濃度の一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

本発明は、一般に、サイトメガロウイルス (CMV) 感染の診断、防止、および療法での組成物およびその使用に関する。以下にさらに記載するように、本発明の例示的な組成物には、HCMV 特異的抗体ならびにそのフラグメントおよび誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【0023】

1 つの実施形態では、本発明の抗 CMV 抗体は、アミノ酸配列 SHRANETIYNT TLKYGD TTGTNTTK (配列番号 31) または NETIYNTTLKYGDVVGVN (配列番号 32) の全体または一部に結合する。最も好ましくは、本発明の抗 CMV 抗体は、アミノ酸配列 $NI X_3 NX_4 TX_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14}$ (配列番号 33) (式中、 X_1 = アミノ酸 E または T、 X_2 = T または V、 X_3 = Y または R、 X_4 = T または L、 X_5 = L または A、 X_6 = K または S、 X_7 = Y または V、 X_8 = G または D、 X_9 = D または F、 X_{10} = V または S、 X_{11} = V または Q、 X_{12} = G またはなし、 X_{13} = V またはなし、および X_{14} = N またはなし) の全体または一部に結合する。このエピトープに結合する例示的な抗 CMV モノクローナル抗体は、本明細書中に記載の抗体 2F10、2M16、2N9、4P12、5P9、9C16 である。

【0024】

本明細書中の実施例に記載の配列中の Chothia, C. ら、(1989, Nature, 342: 877-883) によって定義される CDR を含むアミノ酸をイタリック体で示し、Kabata E. A. ら、(1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U. S. Department of Health and Human Services) によるものを下線を引いた太字で示す。当業者は、抗体の可変領域内の CDR の標準的な定義方法がいくつか存在すると容易に認識するであろう。最も広く使用されている方法のうちの 2 つを本明細書中に示す。当業者はまた、CDR の他の当該分野で承認されている描写方法が本発明に含まれると容易に認識するであろう。

【0025】

2F10 抗体は、以下の配列番号 34 に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領域 (配列番号 35) および配列番号 41 に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域 (配列番号 42) を含む。

【0026】

2F10 抗体の重鎖 CDR は、Kabata 定義による以下の配列を有する: SNHGIH (配列番号 36)、VISSDGDDDRYADSVKG (配列番号 37)、および DGRCGE PKCYSGLPDY (配列番号 38)。2F10 抗体の軽鎖 CDR は、Kabata 定義による以下の配列を有する: RASQSVGGYLA (配列番号 43)、DASNRA T (配列番号 44)、および LQRNTWPPLT (配列番号 45)。

【0027】

2F10 抗体の重鎖 CDR は、Chothia 定義による以下の配列を有する: GFTFSN (配列番号 39)、VISSDGDDDR (配列番号 40)、および DGRCGE PKCYSGLPDY (配列番号 38)。2F10 抗体の軽鎖 CDR は、Chothia 定義による以下の配列を有する: RASQSVGGYLA (配列番号 43)、DASNRA T (配列番号 44)、および LQRNTWPPLT (配列番号 45)。

【0028】

2M16 抗体は、以下の配列番号 46 に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領

10

20

30

40

50

域（配列番号４７）および配列番号９４に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（配列番号５２）を含む。

【００２９】

２Ｍ１６抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＳＮＹＧＭＨ（配列番号４８）、ＶＩＳＳＤＧＳＮＥＨＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号４９）、およびＤＧＲＣＰＤＶＮＣＹＳＧＬＩＤＹ（配列番号５０）。２Ｍ１６抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＲＹＬＡ（配列番号５３）、ＤＡＳＮＲＡＴ（配列番号４４）、およびＱＱＲＳＮＷＰＰＬＴ（配列番号５４）。

【００３０】

２Ｍ１６抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＧＬＴＦＳＮ（配列番号１１８）、ＶＩＳＳＤＧＳＮＥＨ（配列番号５１）、およびＤＧＲＣＰＤＶＮＣＹＳＧＬＩＤＹ（配列番号５０）。２Ｍ１６抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＲＹＬＡ（配列番号５３）、ＤＡＳＮＲＡＴ（配列番号４４）、およびＱＱＲＳＮＷＰＰＬＴ（配列番号５４）。

10

【００３１】

２Ｎ９抗体は、以下の配列番号５５に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領域（配列番号５６）および配列番号６２に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（配列番号６３）を含む。

【００３２】

２Ｎ９抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＳＳＮＧＩＨ（配列番号５７）、ＶＩＳＳＤＡＮＤＫＱＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５８）、およびＤＧＴＣＳＧＧＮＣＹＳＧＬＩＤＹ（配列番号５９）。２Ｎ９抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＧＹＬＡ（配列番号４３）、ＡＳＩＲＡＴ（配列番号６４）、およびＨＱＲＳＮＷＰＰＬＴ（配列番号６５）。

20

【００３３】

２Ｎ９抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＧＦＴＦＳＳ（配列番号６０）、ＶＩＳＳＤＡＮＤＫＱ（配列番号６１）、およびＤＧＴＣＳＧＧＮＣＹＳＧＬＩＤＹ（配列番号５９）。２Ｎ９抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＧＹＬＡ（配列番号４３）、ＡＳＩＲＡＴ（配列番号６４）、およびＨＱＲＳＮＷＰＰＬＴ（配列番号６５）。

30

【００３４】

４Ｐ１２抗体は、以下の配列番号６６に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領域（配列番号６７）および配列番号７２に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（配列番号７３）を含む。

【００３５】

４Ｐ１２抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＳＮＨＧＩＨ（配列番号３６）、ＶＩＳＫＤＧＴＮＡＨＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号６８）、およびＥＧＲＣＩＥＥＮＣＹＳＧＱＩＤＹ（配列番号６９）。４Ｐ１２抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＲＹＭＡ（配列番号７４）、ＤＡＳＩＲＡＴ（配列番号７５）、およびＱＱＲＳＳＷＰＰＬＴ（配列番号７６）。

40

【００３６】

４Ｐ１２抗体の重鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＫＦＩＦＳＮ（配列番号７０）、ＶＩＳＫＤＧＴＮＡＨ（配列番号７１）、およびＥＧＲＣＩＥＥＮＣＹＳＧＱＩＤＹ（配列番号６９）。４Ｐ１２抗体の軽鎖ＣＤＲは、Ｃｈｏｔｈｉａ定義による以下の配列を有する：ＲＡＳＱＳＶＧＲＹＭＡ（配列番号７４）、ＤＡＳＩＲＡＴ（配列番号７５）、およびＱＱＲＳＳＷＰＰＬＴ（配列番号７６）。

【００３７】

５Ｐ９抗体は、以下の配列番号７７に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領域（配列番号７８）および配列番号８１に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（配列番号８２）を含む。

50

【0038】

5P9抗体の重鎖CDRは、Kabat定義による以下の配列を有する：SNHGIH（配列番号36）、VISKDG TNAHYADSVRGR（配列番号79）、およびEGRCIEEKCYSGQIDY（配列番号80）。5P9抗体の軽鎖CDRは、Kabat定義による以下の配列を有する：RASQSVGRYMA（配列番号74）、DASIRAT（配列番号75）、およびQQRSSWPPLT（配列番号76）。

【0039】

5P9抗体の重鎖CDRは、Chothia定義による以下の配列を有する：KFIFSN（配列番号70）、VISKDG TNAH（配列番号71）、およびEGRCIEEKCYSGQIDY（配列番号80）。5P9抗体の軽鎖CDRは、Chothia定義による以下の配列を有する：RASQSVGRYMA（配列番号74）、DASIRAT（配列番号75）、およびQQRSSWPPLT（配列番号76）。

10

【0040】

9C16抗体は、以下の配列番号83に示す核酸配列によってコードされる重鎖可変領域（配列番号84）および配列番号90に示す核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域（配列番号91）を含む。

【0041】

9C16抗体の重鎖CDRは、Kabat定義による以下の配列を有する：SDYGMH（配列番号85）、VISKDG TTNTHYADSVRG（配列番号86）、およびDGKCPDLKCYSGLIDY（配列番号87）。9C16抗体の軽鎖CDRは、Kabat定義による以下の配列を有する：RASQSVGGYLA（配列番号43）、DASKRAT（配列番号92）、およびHQRSSWPPLT（配列番号93）。

20

【0042】

9C16抗体の重鎖CDRは、Chothia定義による以下の配列を有する：GLTFSD（配列番号88）、VISKDG TTNTH（配列番号89）、およびDGKCPDLKCYSGLIDY（配列番号87）。9C16抗体の軽鎖CDRは、Chothia定義による以下の配列を有する：RASQSVGGYLA（配列番号43）、DASKRAT（配列番号92）、およびHQRSSWPPLT（配列番号93）。

【0043】

抗CMV抗体は、配列番号35、47、56、67、78、または84のアミノ酸配列を有する重鎖可変部および配列番号42、52、63、73、82、または91のアミノ酸配列を有する軽鎖可変部を含む。好ましくは、3つの重鎖CDRは、アミノ酸配列SNHGIH（配列番号36）、VISSDGD DDDRYADSVKG（配列番号37）、DGRCGEPKCYSGLPDY（配列番号38）、SNYGMH（配列番号48）、VISSDGSNEHYADSVKG（配列番号49）、DGRCPDVNCYSGLIDY（配列番号50）、SSNGIH（配列番号57）、VISSDANDKQYADSVKG（配列番号58）、DGTCSGGNICYSGLIDY（配列番号59）、VISKDG TNAHYADSVRG（配列番号68）、EGRCIEENCYSGQIDY（配列番号69）、VISKDG TNAHYADSVRGR（配列番号79）、EGRCIEEKCYSGQIDY（配列番号80）、SDYGMH（配列番号85）、VISKDG TTNTHYADSVRG（配列番号86）、DGKCPDLKCYSGLIDY（配列番号87）（Kabat法によって決定した場合）またはGFTFSN（配列番号39）、VISSDGD DDDR（配列番号40）、DGRCGEPKCYSGLPDY（配列番号38）、GLTFSN（配列番号39）、VISSDGSNEH（配列番号51）、DGRCPDVNCYSGLIDY（配列番号50）、GFTFSS（配列番号60）、VISSDANDKQ（配列番号61）、DGTCSGGNICYSGLIDY（配列番号59）、KFIFSN（配列番号70）、VISKDG TNAH（配列番号71）、EGRCIEENCYSGQIDY（配列番号69）、EGRCIEEKCYSGQIDY（配列番号80）、GLTFSD（配列番号88）、VISKDG TTNTH（配列番号89）、DGKCPDLKCYSGLIDY（配列番号87）、GLTFSN（配列番号118）

30

40

50

(Chothia法によって決定した場合)と少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれを超えて同一のアミノ酸配列を含み、3つのCDRを有する軽鎖は、アミノ酸配列RASQSVGGYLA(配列番号43)、DASNRAT(配列番号44)、LQRNTWPPLT(配列番号45)、RASQSVGRYLA(配列番号53)、QQRSNWPPLT(配列番号54)、ASIRAT(配列番号64)、HQRSNWPPLT(配列番号65)、RASQSVGRYMA(配列番号74)、DASIRAT(配列番号75)、QQRSSWPPLT(配列番号76)、DASKRAT(配列番号92)、HQRSSWPPLT(配列番号93)(Kabata法によって決定した場合)またはRASQSVGGYLA(配列番号43)、DASNRAT(配列番号44)、LQRNTWPPLT(配列番号45)、RASQSVGRYLA(配列番号53)、QQRSNWPPLT(配列番号54)、ASIRAT(配列番号64)、HQRSNWPPLT(配列番号65)、RASQSVGRYMA(配列番号74)、DASIRAT(配列番号75)、QQRSSWPPLT(配列番号76)、DASKRAT(配列番号92)、HQRSSWPPLT(配列番号93)(Chothia法によって決定した場合)と少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一のアミノ酸配列を含む。抗体はCMV gBに結合する。

10

【0044】

抗CMV抗体の重鎖は、生殖系列V(可変)遺伝子(例えば、IGHV3生殖系列遺伝子など)に由来する。

【0045】

20

本発明の抗CMV抗体は、ヒトIGHV3生殖系列遺伝子配列によってコードされる重鎖可変(V_H)領域を含む。IGHV3生殖系列遺伝子配列は、例えば、受入番号M99663、X92214、L06616、L06617、M77327、およびM77339中に示されている。本発明の抗CMV抗体は、X生殖系列遺伝子配列に少なくとも80%相同な核酸配列によってコードされるV_H領域を含む。好ましくは、核酸配列はIGHV3生殖系列遺伝子配列に少なくとも90%、95%、96%、97%相同であり、より好ましくは、IGHV3生殖系列遺伝子配列に少なくとも98%、99%相同である。抗CMV抗体のV_H領域は、IGHV3 V_H生殖系列遺伝子配列によってコードされるV_H領域のアミノ酸配列に少なくとも80%相同である。好ましくは、抗CMV抗体のV_H領域のアミノ酸配列は、IGHV3生殖系列遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列に少なくとも90%、95%、96%、97%相同であり、より好ましくは、IGHV3生殖系列遺伝子配列によってコードされる配列に少なくとも98%、99%相同である。

30

【0046】

本発明の抗CMV抗体はまた、ヒトIGKV3生殖系列遺伝子配列によってコードされる軽鎖可変(V_L)領域を含む。ヒトIGKV3 V_L生殖系列遺伝子配列は、例えば、受入番号X01668、K02768、X17264、L19271、およびL19272に示されている。あるいは、抗CMV抗体は、IGKV3生殖系列遺伝子配列に少なくとも80%相同な核酸配列によってコードされるV_L領域を含む。好ましくは、核酸配列は、IGKV3生殖系列遺伝子配列に少なくとも90%、95%、96%、97%相同であり、より好ましくは、少なくともIGKV3生殖系列遺伝子配列に少なくとも98%、99%相同である。抗CMV抗体のV_L領域は、IGKV3生殖系列遺伝子配列によってコードされるV_L領域のアミノ酸配列に少なくとも80%相同である。好ましくは、抗CMV抗体のV_L領域のアミノ酸配列は、IGKV3生殖系列遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列に少なくとも90%、95%、96%、97%相同であり、より好ましくは、IGKV3生殖系列遺伝子配列によってコードされる配列に少なくとも98%、99%相同である。

40

【0047】

他で定義しない限り、本発明と併せて使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有する。さらに、他の文脈によって必要とされない

50

限り、単数形には複数形が含まれ、複数形には単数形が含まれる。一般に、本明細書中に記載の細胞培養および組織培養、分子生物学、タンパク質およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド化学、ならびにハイブリッド形成と組み合わせて使用した用語体系およびその技術は、当該分野で周知且つ一般に使用されているものである。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）のための標準的な技術を使用する。酵素反応および精製技術を、製造者の仕様書に従って行うか、当該分野で一般的に行われているように行うか、本明細書中に記載のように行う。

【0048】

本発明の実施には、具体的に逆に示されない限り、当業者の範囲内のウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学、および組換えDNA技術の従来の方法（その多数を、例示を目的として以下に記載している）を使用するであろう。これらの技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Sambrook, ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) を参照のこと。

【0049】

本明細書中に記載の分析化学、合成有機化学、医薬品化学、および製薬化学と併せて使用される命名法ならびにその実験の手順および技術は、当該分野で周知であり、一般的に使用されている。化学合成、化学分析、医薬品、処方物、送達、および患者の治療のための標準的な技術を使用する。

【0050】

以下の定義は、本発明を理解するのに有用である。

【0051】

用語「抗体」(Ab)には、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体フラグメントが含まれる。用語「免疫グロブリン」(Ig)を、本明細書中の「抗体」と交換可能に使用する。

【0052】

「単離抗体」は、その自然環境の成分から分離および／または回収された抗体である。その自然環境の夾雑成分は、抗体の診断的または治療的使用を妨害する材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では、抗体を、(1) Lowry法によって決定した場合に95重量%超の抗体、最も好ましくは99重量%超の抗体になるまで、(2) 回転カップシークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度になるまで、または(3) クーマーシーブルー、好ましくは銀染色を使用した還元下または非還元下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製する。抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離抗体には組換え細胞内のin situでの抗体が含まれる。しかし、通常、単離抗体を、少なくとも1つの精製工程によって調製する。

【0053】

基本的な4鎖抗体ユニットは、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖

から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドと共に5つの基本ヘテロ四量体からなる。したがって、10個の抗原結合部位を含む。一方で、分泌型IgA抗体は、重合してJ鎖と共に2～5個の4鎖ユニットを含む多価集合体を形成することができる。IgGの場合、4鎖ユニットは、一般に、約150,000ダルトンである。各L鎖は1つの共有結合性ジスルフィド結合によってH鎖に連結している一方で、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて1つまたは複数のジスルフィド結合によって相互に連結する。各H鎖およびL鎖はまた、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端に可変ドメイン(V_H)、その後に各 α 鎖および γ 鎖についての3つの定常ドメイン(C_H)ならびに μ および ϵ アイソタイプについての4つの C_H ドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(V_L)、その後にその他の末端に定常ドメイン(C_L)を有する。 V_L は V_H と並列しており、 C_L は重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})と並列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間に界面を形成する。 V_H と V_L との対合により、単一の抗原結合部位を形成する。異なる抗体クラスの構造および性質については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6を参照のこと。

【0054】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、その定常ドメイン(C_L)のアミノ酸配列に基づいてカッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に異なる型の1つに割り当てられる。その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。以下の5つの免疫グロブリンクラスが存在する：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM（それぞれ、アルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)、およびミュー(μ)と指定した重鎖を有する)。 γ および α クラスは、 C_H の配列および機能の相違が比較的小さいことに基づいてサブクラスにさらに分類される。例えば、ヒトは以下のサブクラスを発現する：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2。

【0055】

用語「可変」は、Vドメインの一定のセグメントの配列が抗体間で広範に異なるという事実をいう。Vドメインは、抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を規定する。しかし、可変性は、可変ドメインの110アミノ酸スパンにわたって均一に分布していない。その代わりとして、V領域は、それぞれ9～12アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる非常に変化するより短い領域によって分離された15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変のストレッチからなる。未変性の重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ4つのFRを含み、FRはそのほとんどが3つの超可変領域と連結した β シート配置の形態をとり、それにより、超可変領域は β シート構造に連結してループを形成し、いくつかの場合 β シート構造の一部を形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって他の鎖由来の超可変領域とごく接近して相互に保持され、これが抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照のこと)。定常ドメインは抗原への抗体の結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能(抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与など)を示す。

【0056】

用語「超可変領域」は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」、すなわち「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば、残基数が V_L 中でおおよそ24～34(L1)、50～56(L2)、および89～97(L3)、および V_H 中でおおよそ31～35(H1)、50～65(H2)、および95～102(

10

20

30

40

50

H3) (Kabatナンバリングシステムに従って、ナンバリングした場合) (Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) ; および／または「超可変ループ」由来の残基 (例えば、V_L中の残基24～34 (L1)、50～56 (L2)、および89～97 (L3) およびV_H中の26～32 (H1)、52～56 (H2)、および95～101 (H3) (Chothiaナンバリングシステムに従って、ナンバリングした場合) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) ; および／または「超可変ループ」／CDR由来の残基 (例えば、V_L中の残基27～38 (L1)、56～65 (L2)、および105～120 (L3)、およびV_H中の27～38 (H1)、56～65 (H2)、および105～120 (H3) (IMGTナンバリングシステムに従って、ナンバリングした場合) (Lefranc, M. P. ら、Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. ら、Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)) を含む。任意選択的に、抗体は、1つまたは複数の以下の点に対称的挿入を有する: V_L中の28、36 (L1)、63、74～75 (L2)、および123 (L3)、およびV_H中の28、36 (H1)、63、74～75 (H2)、および123 (H3) (Ahoに従って、ナンバリングした場合) (Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)) 。

【0057】

「生殖系列核酸残基」は、定常領域または可変領域をコードする生殖系列遺伝子中に天然に存在する核酸残基を意味する。「生殖系列遺伝子」は、生殖細胞 (すなわち、卵になる運命にあるか、精子中の細胞) 中で見出されるDNAである。「生殖系列変異」は、生殖細胞または単細胞期の接合体中に生じた特定のDNAの遺伝性の変化をいい、子孫に伝達された場合、かかる変異は身体のあらゆる細胞に組み込まれる。生殖系列変異は、単一の体細胞中で獲得される体細胞変異と対照をなす。いくつかの場合、可変領域をコードする生殖系列DNA配列中のヌクレオチドが変異し (すなわち、体細胞変異)、異なるヌクレオチドに置換される。

【0058】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一の抗体の集団から得た抗体をいう。すなわち、この集団を含む各抗体は、少量で存在し得る天然に存在する可能性のある変異を除いて同一である)。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原部位に指向する。さらに、異なる決定基 (エピトープ) に指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向する。その特異性に加えて、他の抗体によって汚染されることなく合成することができるという点で、モノクローナル抗体は有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法によって抗体を産生する必要があると解釈されるべきでない。例えば、本発明で有用なモノクローナル抗体を、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975) に最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製するか、細菌細胞、真核動物細胞、または植物細胞において組換えDNA法を使用して作製することができる (例えば、米国特許第4, 816, 567を参照のこと)。また、「モノクローナル抗体」を、例えば、Clacksonら、Nature, 352:624-628 (1991) およびMarksら、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に記載の技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離する。

【0059】

モノクローナル抗体には、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種に由来するか特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列が同一であるかまたは相同である一方で、鎖の残部が別の種に由来するか別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列が同一であるかまたは相同である「キメラ」抗体およびかかる抗体

のフラグメント（所望の生物学的活性を示す限り）が含まれる（米国特許第4, 816, 567号およびMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)を参照のこと）。本発明は、ヒト抗体由来の変ドメイン抗原結合配列を提供する。したがって、特に興味深いキメラ抗体には、1つまたは複数のヒト抗原結合配列（例えば、CDR）および非ヒト抗体由来の1つまたは複数の配列（例えば、FRまたはC領域の配列）を含む抗体が含まれる。さらに、本明細書中の特に興味深いキメラ抗体には、1つの抗体クラスまたはサブクラスのヒト可変ドメイン抗原結合配列および別の配列（例えば、別の抗体クラスまたはサブクラス由来のFRまたはC領域の配列）を含むキメラ抗体が含まれる。目的のキメラ抗体には、本明細書中に記載の配列に関連するか非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）などの異なる種由来の変ドメイン抗原結合配列を含むキメラ抗体も含まれる。キメラ抗体には、霊長類化抗体およびヒト化抗体も含まれる。

10

【0060】

さらに、キメラ抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見出されない残基を含むことができる。抗体の性能をさらに精巧にするためにこれらの修飾を行う。さらに詳しくは、Jonesら、Nature 321: 522-525 (1986); Reichmannら、Nature 332: 323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。

【0061】

20

「ヒト化抗体」は、一般に、非ヒトである供給源由来のアミノ酸残基に導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有するヒト抗体であると見なされている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入」残基をいい、典型的には、この残基は「移入」可変ドメインから取る。ヒト化を伝統的には、Winter and co-workers (Jonesら、Nature, 321: 522-525 (1986); Reichman nら、Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoevenら、Science, 239: 1534-1536 (1988))の方法に従って、移入超可変領域配列を対応するヒト抗体配列の代わりに使用することによって行う。したがって、これらの「ヒト化」抗体は、実質的により小さなインタクトなヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体（米国特許第4, 816, 567号）である。

30

【0062】

「ヒト抗体」は、ヒトによって天然に産生された抗体中に存在する配列のみを含む抗体である。さらに、本発明のヒト抗体は、ヒトで天然に存在する未変性ヒト抗体であり、各重鎖および軽鎖がヒトから単離されるが、無作為にアセンブルされてあらゆる形態の天然抗体および非天然抗体が作製される組換えヒト抗体とは対照的である（ヒトから単離される組み合わせはごくわずかである）。

【0063】

具体的には、未変性のヒト抗体は、インタクトなヒト免疫系の機能の結果として天然に生じる抗体である。ヒトウイルス疾患の治療のための未変性抗体の有用性は、過免疫ヒトグロブリンを使用した経験によって確立された。未変性の抗体は、クラスとして、組換えライブラリー法（ファージまたはトランスジェニックマウス）によって得られた抗体といくつかの点で異なり、ヒト疾患の理想的な治療法になり得る異なる性質を保有する（Dessainら、Exploring the Native Human Antibody Repertoire to Create Antiviral Therapeutics in Current Topics in Microbiology and Immunology 317: 155-183 (2008), (著作権) Springer-Verlag New Yorkを参照のこと）。具体的には、ファージ由来抗体を超えるヒトB細胞から発現した未変性抗体のライブラリー特有の利点が存在する。これは、全ての元のまたは未変性の重鎖：軽鎖対合を再作製するにはファージアブ

40

50

ローチに限界があり、したがって、重要な抗体構造のファージ生成ライブラリーへの組み込みが阻止されることに起因する。したがって、高処理法によって病原体の検出、診断、治療、および療法のためのヒトB細胞から発現した高品質の未変性のヒト抗体を得ることが望ましい。

【0064】

しかし、本発明のヒト抗体は、天然に存在するヒト抗体で見出されない残基または修飾（本明細書中に記載の修飾および変異配列が含まれる）を含む。典型的には、抗体の性能をさらに精巧にするか増強するためにこれらを行う。

【0065】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位ならびにC_Lおよび少なくとも重鎖定常ドメイン（C_H1、C_H2、およびC_H3）を含む抗体である。定常ドメインは、未変性配列の定常ドメイン（例えば、ヒト未変性配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。好ましくは、インタクトな抗体は1つまたは複数のエフェクター機能を有する。

【0066】

「抗体フラグメント」には、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域が含まれる。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；二特異性抗体；線状抗体（米国特許第5,641,870号；Zapataら、Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]を参照のこと）；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が含まれる。

【0067】

句である抗体の「機能的フラグメントまたはアナログ」は、全長抗体と共通の定量的な生物学的活性を有する化合物である。例えば、抗IgE抗体の機能的フラグメントまたはアナログは、かかる分子の能力から高親和性受容体（FcεRI）に結合する能力を阻止するか実質的に軽減させるような様式でIgE免疫グロブリンに結合することができるものである。

【0068】

抗体のパパイン消化により、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメントおよび残部である「Fc」フラグメント（容易に結晶化する能力を反映した命名）が得られる。Fabフラグメントは、H鎖の可変領域ドメイン（V_H）に沿った全L鎖および1つの重鎖の第1の定常ドメイン（C_H1）からなる。各Fabフラグメントは抗原結合に関して1価である（すなわち、1つの抗原結合部位を有する）。抗体のペプシン処理により、2価の抗原結合活性を有する2つのジスルフィド連結Fabフラグメントにおおよそ対応し、依然として抗原を架橋することができる単一の巨大なF(ab')₂フラグメントが得られる。Fab'フラグメントは、C_H1ドメインのカルボキシ末端にさらなるいくつかの残基（抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインが含まれる）を有するという点でFabフラグメントと異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を保有するFab'についての本明細書中の名称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、最初に、その間にヒンジシステインを有するFab'フラグメント対として産生された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも公知である。

【0069】

「Fc」フラグメントは、ジスルフィドによって保持された両H鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能はFc領域中の配列によって決定され、このFc領域は一定の細胞型上で見出されるFc受容体（FcR）によって認識される部分でもある。

【0070】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、強固な非共有結合性に会合した1つの重鎖および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つの超可変ループ（それぞれH鎖およびL鎖由来の3つのループ）が生じる。しかし、全結合部位より親和性が低いにもかかわらず、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）でさえも抗原を認識して結合する能力を有する。

【0071】

「sFv」または「scFv」とも略される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖に連結したV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。好ましくは、sFvポリペプチドは、さらに、sFvが抗原結合のために望ましい構造を形成することができるポリペプチドリンカーをV_HドメインとV_Lドメインとの間に含む。sFvについての概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

10

【0072】

用語「二特異性抗体」は、Vドメインが鎖内対合されるのではなく鎖間対合され、それによって2価のフラグメント（すなわち、2つの抗原結合部位を有するフラグメント）が得られるようにV_HドメインとV_Lドメインとの間で短いリンカー（約5～10残基）を使用してsFvフラグメント（前段落を参照のこと）を構築することによって調製された小さな抗体フラグメントをいう。二重特異性を示す二特異性抗体は、2つの抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する2つの「クロスオーバー」sFvフラグメントのヘテロ二量体である。二特異性抗体は、例えば、欧州特許第404,097号；WO93/11161号；およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 中により完全に記載されている。

20

【0073】

「内在化する」抗体は、哺乳動物細胞上の抗原（例えば、細胞表面ポリペプチドまたは受容体）への結合の際に細胞に取り込まれる（すなわち、侵入する）抗体である。内在化抗体には、抗体フラグメント、ヒト抗体またはキメラ抗体、および抗体抱合体が含まれる。一定の治療への適用のために、in vivoでの内在化が意図される。抗体分子の内在化数は、細胞（特に、感染細胞）を死滅させるかその増殖を阻害するのに十分であるか適切である。抗体または抗体抱合体の効力に応じて、いくつかの場合、細胞への単一の抗体分子の取り込みは、抗体が結合する標的細胞を死滅させるのに十分である。例えば、一定の毒素は、抗体に抱合した毒素1分子の内在化が感染細胞の死滅に十分であるように死滅において非常に強力である。

30

【0074】

抗体が検出可能なレベル、好ましくは、約 10^4 M^{-1} 以上、約 10^5 M^{-1} 以上、約 10^6 M^{-1} 以上、約 10^7 M^{-1} 以上、または 10^8 M^{-1} 以上の親和定数K_aで抗原に反応する場合、抗体は、抗原に「免疫特異的である」か、「特異的である」か、「特異的に結合する」といわれる。その同種抗原に対する抗体の親和性はまた一般に解離定数K_Dとして示され、一定の実施形態では、 10^{-4} M 以下、約 10^{-5} M 以下、約 10^{-6} M 以下、 10^{-7} M 以下、または 10^{-8} M 以下のK_Dで結合する場合、HuM2e抗体はM2eに特異的に結合する。抗体の親和性は、従来の技術（例えば、Scatchardら、(Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))に記載の技術）を使用して容易に決定される。

40

【0075】

抗体のその抗原、細胞、または組織への結合特性を、免疫検出法（例えば、免疫蛍光ベースのアッセイ（免疫組織化学（IHC）および／または蛍光標示細胞分取（FACS）など）が含まれる）を使用して決定および評価する。

【0076】

50

指定した抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、この抗体と他の抗体とを区別する抗体の1つまたは複数の生物学的特徴を保有する抗体である。例えば、一定の実施形態では、指定した抗体の生物学的特徴を有する抗体は、指定した抗体が結合するエピトープと同一のエピトープに結合し、そして／または指定した抗体と共通のエフェクター機能を有する。

【0077】

用語「アンタゴニスト」抗体を最も広い意味で使用し、抗体が特異的に結合するエピトープ、ポリペプチド、または細胞の生物学的活性を部分的または完全に遮断、阻害、または中和する抗体が含まれる。アンタゴニスト抗体の同定方法は、候補アンタゴニスト抗体が特異的に結合するポリペプチドまたは細胞を候補アンタゴニスト抗体と接触させる工程、および通常はポリペプチドまたは細胞に関連する1つまたは複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定する工程を含む。

10

【0078】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞の断片化、および／または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成によって決定されるプログラム細胞死を誘導する抗体である。好ましくは、細胞は感染細胞である。アポトーシスに関連する細胞事象の種々の評価方法を利用可能である。例えば、ホスファチジルセリン（PS）の移行をアネキシン結合によって測定することができる。DNA断片化をDNAラダーリングによって評価することができる。DNA断片化を伴う核／クロマチン凝縮を低二倍体細胞の任意の増加によって評価する。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、アネキシン結合アッセイにおいて非処置細胞と比較してアネキシン結合を約2～50倍、好ましくは約5～50倍、最も好ましくは約10～50倍誘導する抗体である。

20

【0079】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（未変性配列のFc領域またはアミノ酸配列変異Fc領域）が原因であり得、且つ抗体アイソタイプによって異なる生物学的活性をいう。抗体エフェクター機能の例には、以下が含まれる：C1q結合および補体依存性細胞傷害性；Fc受容体結合；抗体依存性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；およびB細胞活性化。

【0080】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、一定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌型Igがこれらの細胞傷害性エフェクター細胞に抗原保有標的細胞を特異的に結合させ、その後に細胞毒素で標的細胞を死滅させることができる細胞傷害性の一形態である。抗体は細胞傷害性細胞を「武装し」、この細胞はかかる死滅に必要である。ADCC媒介のための主な細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対して、単球はFcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、in vitro ADCCアッセイ（米国特許第5,500,362号または米国特許第5,821,337号に記載のアッセイなど）を行うことができる。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が組まれる。あるいはまたはさらに、目的の分子のADCC活性を、in vivoで（例えば、Clynesら、PNAS (USA) 95:652-656 (1998)などに開示の動物モデルで）アッセイする。

30

40

【0081】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載する。一定の実施形態では、FcRは未変性配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRはIgG抗体（γ受容体）に結合するFcRであり、FcγRI、FcγRII、およびF

50

c γ R I I I サブクラスの受容体（これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび選択的スプライシングされた形態が含まれる）が含まれる。F c γ R I I 受容体には F c γ R I I A（「活性化受容体」）および F c γ R I I B（「阻害化受容体」）が含まれ、これらは主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体 F c γ R I I A は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（I T A M）を含む。阻害化受容体 F c γ R I I B は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの阻害化モチーフ（I T I M）を含む（Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997) 中の概説Mを参照のこと）。F c R は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991) ; Capelら、Immunomethods 4:25-34 (1994) ; および de Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) で概説されている。他の F c R（将来的に同定される F c R が含まれる）は、本明細書中の用語「F c R」に含まれる。この用語には、母系 I g G の胎児への輸送を担う新生児受容体 F c R n も含まれる（Guyerら、J. Immunol. 117:587 (1976) および Kimら、J. Immunol. 24:249 (1994)）。

【0082】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは複数の F c R を発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくとも F c γ R I I I を発現し、A D C C エフェクター機能を果たす。A D C C を媒介するヒト白血球の例には、P B M C、N K 細胞、単球、細胞傷害性 T 細胞、および好中球が含まれ、P B M C および N K 細胞が好ましい。エフェクター細胞は、天然供給源（例えば、血液）から単離される。

【0083】

「補体依存性細胞傷害性」または「C D C」は、補体存在下での標的細胞の溶解をいう。古典的補体経路の活性化は、補体系の第1の成分（C 1 q）のその同種抗原に結合される（適切なサブクラスの）抗体への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載の C D C アッセイを行う。

【0084】

C M V としても公知の用語「サイトメガロウイルス」は、任意の種（ヒトが含まれる）におけるヘルペスウイルスファミリーのメンバーを示す。C M V は、単核球およびリンパ球に感染するヘルペスウイルスであることから、ベータヘルペスウイルス亜科ともいう。

【0085】

用語「ヒトサイトメガロウイルスまたは H C M V」は、ヒトに感染する C M V ファミリーのメンバーを示す。H C M V は、ゲノムサイズが 230 K b p であり、70 種を超えるウイルスタンパク質をコードするベータヒトヘルペスウイルスである。H C M V を、ヒトヘルペスウイルス 5（H H V - 5）とも示す。

【0086】

感染治療を目的とした「哺乳動物」は、任意の哺乳動物（ヒト、家畜、および動物園の動物、競技動物、またはペット動物（イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなど）が含まれる）をいう。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0087】

「治療（t r e a t i n g）」または「治療（t r e a t m e n t）」または「緩和」は、治療的処置および予防的または防止的処置の療法をいい、その目的は標的にした病理学的な容態または障害を防止または遅延（軽減）することである。治療を必要とする者には、既に障害を有する者および障害を有する傾向のある者、または障害を防止すべき者が含まれる。本発明の方法に従って治療量の抗体を投与した後、患者が、以下の1つまたは複数が観察可能および／または測定可能に減少するか消滅する場合、対象または哺乳動物は、首尾よく感染症が「治療」される：感染細胞数の減少または感染細胞の非存在；総感染細胞率の減少；および／または特定の感染に関連する1つまたは複数の症状のいくらか

の範囲への緩和；罹患率および死亡率の減少、ならびに生活の質の問題の改善。疾患の首尾の良い治療および改善を評価するための上記パラメーターは、医師に周知の日常的手順によって容易に測定可能である。

【0088】

用語「治療有効量」は、対象または哺乳動物の疾患または障害を「治療する」のに有効な抗体または薬物の量をいう。「治療」の前述の定義を参照のこと。

【0089】

「慢性」投与は、長期間にわたって最初の治療効果（活性）を維持するための急性様式と対照的な連続様式での薬剤の投与をいう。「間欠」投与は、継続的に途切れることなく行わず、むしろ事実上周期的な治療である。

【0090】

1つまたは複数のさらなる治療薬「と組み合わせた」投与には、同時（併用）投与および任意の順序の連続投与が含まれる。

【0091】

「キャリア」には、使用した投薬量および濃度で曝露された細胞または哺乳動物に無毒の薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤が含まれる。しばしば、生理学的に許容可能なキャリアは、水性のpH緩衝液である。生理学的に許容可能なキャリアの例には、緩衝液（リン酸、クエン酸、および他の有機酸の緩衝液など）；抗酸化剤（アスコルビン酸が含まれる）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンなど）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる）；キレート剤（EDTAなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；および／または非イオン性界面活性剤（TWEEN（商標）ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（商標）など）が含まれる。

【0092】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞毒性薬」は、細胞の機能を阻害または防止し、そして／または細胞を破壊させる物質をいう。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン（adriamycin）、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン）、または他の挿入剤、酵素、およびそのフラグメント（核酸分解酵素、抗生物質、および毒素（細菌、真菌、植物、または動物を起源とする小分子毒素または酵素的に活性な毒素（そのフラグメントおよび／またはバリエーションが含まれる）など）、ならびに以下に開示の種々の抗腫瘍剤または抗癌剤など）が含まれることが意図される。他の細胞毒性薬を以下に記載する。

【0093】

「増殖阻害剤」は、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで細胞の増殖を阻害する化合物または組成物をいう。増殖阻害剤の例には、細胞周期の進行を遮断する薬剤（G1停止およびM期停止を誘導する薬剤など）が含まれる。古典的なM期遮断薬には、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンノレルビン、およびビンブラスチン）、タキサン、およびトポイソメラーゼIIインヒビター（ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンなど）が含まれる。G1を停止させる薬剤は、S期停止にも影響を及ぼす（例えば、DNAアルキル化剤（タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびara-Cなど））。さらなる情報を、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled “Cell cycle regu

10

20

30

40

50

lation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami ら、(W B Saunders: Philadelphia, 1995) (特に、p. 13)に見出すことができる。タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、共にイチイ由来の抗癌薬である。ヨーロッパイチイ由来のドセタキセル（タキソテル（商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセルの半合成アナログである（タキソール（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管のアセンブリを促進し、解重合の防止によって微小管を安定させ、それにより、細胞の有糸分裂が阻害される。

【0094】

10

「標識」は、「標識した」抗体を生成するために抗体に直接または間接的に抱合される検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体が検出可能であるか（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒する。

【0095】

用語「タグ化したエピトープ」は、キメラポリペプチド（「タグポリペプチド」に融合したポリペプチドが含まれる）をいう。タグポリペプチドは、抗体が作製され得るエピトープを得るのに十分であるが、依然として融合されるポリペプチドの活性を妨害しないのに十分な長さである残基を有する。タグポリペプチドはまた、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないほど十分に固有である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6個のアミノ酸残基、通常は、約8個と50個との間のアミノ酸残基（好ましくは、約10個と20との間のアミノ酸残基）を有する。

20

【0096】

「小分子」は、約500ダルトン未満の分子量を有すると定義する。

【0097】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」を、一本鎖または二本鎖のRNA、DNA、または混合ポリマーをいうために交換可能に使用する。ポリヌクレオチドには、ゲノム配列、ゲノム外の配列およびプラスミドの配列、およびポリペプチドを発現するか、発現するように適応したより小さな操作遺伝子セグメントが含まれる。

【0098】

30

「単離核酸」は、未変性配列に天然に付随する他のゲノムDNA配列ならびにタンパク質または複合体（リボゾームおよびポリメラーゼなど）から実質的に分離された核酸である。この用語は、その天然に存在する環境から取り出された核酸配列を含み、組換えまたはクローン化されたDNA単離物および化学合成されたアナログまたは異種系によって生物学的に合成されたアナログが含まれる。実質的に純粋な核酸には、核酸の単離形態が含まれる。勿論、これは、最初に単離された核酸をいい、その後人為的に単離核酸に付加された遺伝子または配列を除外しない。

【0099】

用語「ポリペプチド」は、その従来の意味で、すなわち、アミノ酸配列として使用される。ポリペプチドは、特定の長さの産物に制限されない。ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質は、ポリペプチドの定義に含まれ、他で特に示さない限り、かかる用語を交換可能に使用する。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化など）および当該分野で公知の他の修飾（共に天然に存在するか存在しない）をいわないか除外する。ポリペプチドはタンパク質全体またはそのサブシーケンスであり得る。本発明の文脈における特定の目的のポリペプチドは、アミノ酸サブシーケンス（CDRが含まれる）であり、CMVまたはCMV感染細胞に結合することができる。

40

【0100】

「単離ポリペプチド」は、同定され、その自然環境の成分から分離および／または単離されたポリペプチドである。好ましい実施形態では、単離ポリペプチドを、(1) Low

50

ry法によって決定した場合に95重量%超のポリペプチド、最も好ましくは99重量%超のポリペプチドになるまで、(2)回転カップシークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度になるまで、または(3)クーマーシブルー、好ましくは銀染色を使用した還元下または非還元下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製するであろう。ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離ポリペプチドには組換え細胞内のin situポリペプチドが含まれる。しかし、通常、単離ポリペプチドを、少なくとも1つの精製工程によって調製する。

【0101】

「未変性配列」ポリヌクレオチドは、天然由来のポリヌクレオチドと同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドである。「未変性配列」ポリペプチドは、天然(例えば、任意の種)由来のポリペプチド(例えば、抗体)と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。かかる未変性配列のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、自然から単離するか、組換え手段または合成手段によって産生する。

10

【0102】

ポリヌクレオチド「バリエーション」は、1つまたは複数の置換、欠失、付加、および/または挿入で具体的に開示されたポリヌクレオチドと典型的に異なるポリヌクレオチドである。かかるバリエーションは天然に存在するか、例えば、本明細書中に記載のように、そして/または当該分野で周知の多数の技術のいずれかを使用して1つまたは複数の本発明のポリヌクレオチド配列の修飾およびコードされたポリペプチドの1つまたは複数の生物学的

20

【0103】

ポリペプチド「バリエーション」は、1つまたは複数の置換、欠失、付加、および/または挿入で本明細書中に具体的に開示されたポリペプチドと典型的に異なるポリペプチドである。かかるバリエーションは天然に存在し得るか、例えば、本明細書中に記載のように、そして/または当該分野で周知の多数の技術のいずれかを使用して1つまたは複数の上記の本発明のポリペプチド配列の修飾およびポリペプチドの1つまたは複数の生物学的活性の評価によって合成的に生成することができる。

【0104】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造を修飾するが、所望の特徴を有するバリエーションまたは誘導ポリペプチドをコードする機能的分子が依然として得られる。本発明のポリペプチドの等価であるかさらに改良されたバリエーションまたは一部を作製するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることが望ましい場合、当業者は、典型的に、コードするDNA配列の1つまたは複数のコドンを変化させる。

30

【0105】

例えば、他のポリペプチド(例えば、抗原)または細胞に結合する能力をあまり喪失することなくタンパク質構造中の一定のアミノ酸を他のアミノ酸の代わりに使用する。タンパク質の生物学的な機能活性を定義するのはタンパク質の結合能力および結合の性質であるので、タンパク質配列中の一定のアミノ酸配列および、勿論、その基礎をなすDNAコード配列が置換されても、類似の性質を有するタンパク質を得ることができる。したがって、その生物学的有用性または活性をあまり喪失することなく、開示の組成物のペプチド配列またはこのペプチドをコードする対応DNA配列を様々に変化されることが意図される。

40

【0106】

多数の例では、ポリペプチドバリエーションは1つまたは複数の保存的置換を含む。「保存的置換」は、ペプチド化学分野の当業者によって実質的に変化すべきでないポリペプチドの二次構造およびヒドロパシー性が予想されるようにアミノ酸を類似の性質を有する別のアミノ酸の代わりに使用する置換である。

【0107】

かかる変化を得るには、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮する。タンパク質への生物

50

学的相互作用機能の付与におけるアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該分野で一般的に理解されている (K y t e a n d D o o l i t t l e , 1 9 8 2) 。アミノ酸の相対的ヒドロパシー性が得られたタンパク質の二次構造に寄与し、それにより、他の分子 (例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、および抗原など) とのタンパク質の相互作用を定義することが認められている。各アミノ酸は、その疎水性および電荷の特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている (K y t e a n d D o o l i t t l e , 1 9 8 2) 。これらの値は以下である: イソロイシン (+4.5); バリン (+4.2); ロイシン (+3.8); フェニルアラニン (+2.8); システイン/シスチン (+2.5); メチオニン (+1.9); アラニン (+1.8); グリシン (-0.4);
トレオニン (-0.7); セリン (-0.8); トリプトファン (-0.9); チロシン (-1.3); プロリン (-1.6); ヒスチジン (-3.2); グルタミン酸 (-3.5); グルタミン (-3.5); アスパラギン酸 (-3.5); アスパラギン (-3.5); リジン (-3.9); およびアルギニン (-4.5)。

10

【0108】

一定のアミノ酸を類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸と置換するが、依然として類似の生物学的活性を有するタンパク質を得ることができる (すなわち、依然として生物学的機能が等価なタンパク質を得ることができる) ことが当該分野で公知である。かかる変化を得るには、その疎水性親水性指標が±2以内のアミノ酸置換が好ましく、±1以内のアミノ酸置換が特に好ましく、±0.5以内のアミノ酸置換が特にさらにより好ましい。親水性に基づいて類似のアミノ酸の置換を有効に行うことができることも当該分野で理解されている。米国特許第4,554,101号は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されるタンパク質の最も高い局所平均親水性がタンパク質の生物学的性質と相関することを示す。

20

【0109】

米国特許第4,554,101号に詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+3.0); リジン (+3.0); アスパラギン酸 (+3.0±1); グルタミン酸 (+3.0±1); セリン (+0.3); アスパラギン (+0.2); グルタミン (+0.2); グリシン (0); トレオニン (-0.4); プロリン (-0.5±1); アラニン (-0.5); ヒスチジン (-0.5); システイン (-1.0); メチオニン (-1.3); バリン (-1.5); ロイシン (-1.8); イソロイシン (-1.8); チロシン (-2.3); フェニルアラニン (-2.5); トリプトファン (-3.4)。アミノ酸を類似の親水性値を有する別のアミノ酸の代わりに使用するが、依然として生物学的に等価な、特に免疫学的に等価なタンパク質を得ることができるという理解されている。かかる変化では、その親水性値が±2以内のアミノ酸置換が好ましく、±1以内のアミノ酸置換が特に好ましく、±0.5以内のアミノ酸置換が特にさらにより好ましい。

30

【0110】

上記で概説のように、したがって、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換の相対的類似性 (例えば、その疎水性、親水性、電荷、およびサイズなど) に基づく。種々の上記特徴を考慮する置換の例は当業者に周知であり、以下が含まれる: アルギニンおよびリジン; グルタミン酸およびアスパラギン酸; セリンおよびトレオニン; グルタミンおよびアスパラギン; ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン。

40

【0111】

アミノ酸置換を、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいてさらに行う。例えば、負電荷のアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。正電荷のアミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれる。類似の親水性値を有する非電荷極性頭部基を有するアミノ酸にはロイシン、イソロイシン、およびバリン; グリシンおよびアラニン; アスパラギンおよびグルタミン; ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。保存的变化を示し得るアミノ酸の他の基には以下が含まれる: (1) a l a、p r o、g l y、g l u、a s p

50

、g l n、a s n、s e r、t h r；(2) c y s、s e r、t y r、t h r；(3) v a l、i l e、l e u、m e t、a l a、p h e；(4) l y s、a r g、h i s；および(5) p h e、t y r、t r p、h i s。バリエーションは、非保存的変化も含むか、代わりとして非保存的変化を含むことができる。好ましい実施形態では、5個以下のアミノ酸の置換、欠失、または付加によってバリエーションポリペプチドは未変性配列と異なる。例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造、およびハイドロパシー性に及ぼす影響が最小のアミノ酸の欠失または付加によってバリエーションをさらに（または代わりとして）修飾することができる。

【0112】

ポリペプチドは、翻訳と同時にまたは翻訳後にタンパク質の輸送を指示するシグナル（またはリーダー）配列をタンパク質のN末端に含む。ポリペプチドを、ポリペプチド（例えば、ポリ-H i s）の合成、精製、または同定を容易にするためか、ポリペプチドの固体支持体への結合を増強するためにリンカーまたは他の配列にインフレームで抱合する（例えば、融合する）こともできる。例えば、ポリペプチドを免疫グロブリン F c 領域に抱合する。

【0113】

ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を比較する場合、下記のように、2つの配列中のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が最も対応するように整列させた場合に同一である場合、2つの配列は「同一である」という。典型的には、比較ウィンドウ上の配列を比較して配列が類似する局所領域を同定および比較することによって2配列間の比較を行う。「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の連続する位置（通常30～約75個、40～約50個）のセグメントをいい、そのセグメント中で2つの配列を最適にアラインメントした後に配列を同数の連続する位置の基準配列と比較する。

【0114】

デフォルトパラメーターを使用したバイオインフォマティクスソフトウェアの L a s e r g e n e s u i t e 中の M e g a l i g n プログラム (D N A S T A R, I n c. , M a d i s o n, W I) を使用して、比較のための最適な配列アラインメントを行うことができる。このプログラムは、以下の参照に記載のいくつかのアラインメントスキームを具体化する: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345–358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626–645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151–153; Myers, E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11–17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406–425; Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726–730。

【0115】

あるいは、Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482の局所同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsc

10

20

30

40

50

h (1970) J. Mol. Biol. 48:443の同一性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行プログラム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)、または検査によって比較のための最適な配列アラインメントを行う。

【0116】

%配列同一性および%配列類似性の決定に適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschulら、(1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら、(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0を、例えば、本明細書中に記載のパラメーターと共に使用して、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの%配列同一性を決定する。BLAST分析の実行ソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公的に利用可能である。

10

【0117】

1つの説明に役立つ例では、累積スコアを、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM (マッチ残基対についての報酬スコア; 常に >0) およびN (ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に <0) を使用して計算する。蓄積アラインメントスコアがその最大値から数量Xまで低下する場合、1つまたは複数の負にスコアリングされる残基アラインメントの蓄積によって累積スコアがゼロ以下になる場合、またはいずれかの配列の末端に到達した場合、各方向でのワードヒットの伸長が停止される。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度およびスピードを決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとしてワードレングス (W) 11および期待値 (E) 10、ならびにBLOSUM62スコアリング行列 (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと) アラインメント、(B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。

20

30

【0118】

アミノ酸配列のために、スコアリング行列を使用して累積スコアを計算する。蓄積アラインメントスコアがその最大値から数量Xまで低下する場合、1つまたは複数の負にスコアリングされる残基アラインメントの蓄積によって累積スコアがゼロ以下になる場合、またはいずれかの配列の末端に到達した場合、各方向でのワードヒットの伸長が停止される。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度およびスピードを決定する。

【0119】

1つのアプローチでは、「配列同一性のパーセンテージ」を、2つの最適にアラインメントされた配列を少なくとも20の位置の比較ウィンドウにわたって比較することによって決定する。ここで、2つの配列の最適なアラインメントについて基準配列 (付加または欠失を含まない) と比較した場合、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の位置は、20%以下、通常は5~15%または10~12%の付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含み得る。両配列中に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得ること、マッチした位置の数を基準配列 (すなわち、ウィンドウサイズ) 中の位置の総数で割ること、および結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって百分率を計算する。

40

【0120】

「相同性」は、配列のアラインメントおよび必要に応じた最大%相同性を達成するため

50

のギャップの導入の後に非バリエーション配列と同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列バリエーション中の残基の百分率をいう。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドのバリエーションは、本明細書中に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの相同性を有する。

【0121】

「ベクター」には、シャトルベクターおよび発現ベクターが含まれる。典型的には、プラスミド構築物は、細菌中のプラスミドのそれぞれ複製および選択のための複製起点（例えば、ColE1複製起点）および選択マーカー（例えば、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性）も含むであろう。「発現ベクター」は、細菌または真核細胞中での抗体（本発明の抗体フラグメントが含まれる）の発現に必要な調節配列または調節エレメントを含むベクターをいう。適切なベクターを以下に開示する。

【0122】

本明細書中および添付の特許請求の範囲で使用する場合、他で内容が明確に示されない限り、単数形「a」、「an」、および「the」には複数形が含まれる。

【0123】

抗体

本発明はまた、CMVおよびCMV特異的抗体（本発明のポリペプチド（実施例1に記載のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドが含まれる）、実施例1および図1に記載のアミノ酸配列、ならびにそのフラグメントおよびバリエーションが含まれる）を提供する。1つの実施形態では、抗体は、本明細書中で2F10、2M16、2N9、3C21、4P12、5P9、または9C16と表した抗体である。これらの抗体は、好ましくは、同一細胞型の非感染コントロール細胞と比較してCMV感染細胞に結合するか特異的に結合する。好ましい実施形態では、これらの抗体は、CMVの糖タンパク質B(gB)に結合する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、アミノ酸配列SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK（配列番号31）を有するCMV gp116エピトープAD2部位Iに結合する。

【0124】

当業者に理解されるように、本明細書中の抗体ならびにその調製および使用方法の一般的記載を、各抗体ポリペプチド構築物および抗体フラグメントに適用する。

【0125】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。しかし、好ましい実施形態では、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、本発明の抗体はヒト抗体である。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生方法は当該分野で公知であり、一般に、例えば、米国特許第6,824,780号に記載されている。典型的には、本発明の抗体を、以下にさらに記載のように、当該分野で利用可能なベクターおよび方法を使用して、組換え的に産生する。ヒト抗体はまた、*in vivo* 活性化B細胞によって生成される（米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照のこと）。

【0126】

ヒト抗体はまた、内因性免疫グロブリンを産生せずにヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）中で産生される。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異マウス中の抗体重鎖連結領域（J_H）遺伝子のホモ接合性欠失によって内因性抗体産生が完全に阻害されると記載されている。かかる生殖系列変異マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの導入により、抗原誘発の際にヒト抗体が産生される。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovitsら、Nature, 362:255-258(1993); Bruggemannら、Year in Immunol., 7:33(1993); 米国特許第5,545,806号、同第5,5

10

20

30

40

50

69, 825号、同第5, 591, 669号(全てGenPharm); 米国特許第5, 545, 807号; およびWO97/17852号を参照のこと。かかる動物を遺伝子操作して、本発明のポリペプチドを含むヒト抗体を産生する。

【0127】

一定の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトおよび非ヒト供給源の両方に由来する配列を含むキメラ抗体である。特定の実施形態では、これらのキメラ抗体は、ヒト化または霊長類化されている(商標)。実際に、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域の残基およびおそらくいくつかのFR残基がげっ歯類抗体中の類似部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。

【0128】

本発明の文脈では、キメラ抗体には、ヒトの超可変領域または1つまたは複数のCDRが保持されているが、配列の1つまたは複数の他の領域が非ヒト動物由来の対応する配列に置換されている完全なヒト抗体も含まれる。

【0129】

キメラ抗体の作製で使用するべき非ヒト配列(軽鎖および重鎖の両方)の選択は、抗体をヒトでの治療に使用することを意図する場合に、抗原性およびヒト抗非ヒト抗体応答を軽減することが重要である。キメラ抗体が抗原に対する高い結合親和性および他の好ましい生物学的性質を保持することはさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従って、親ヒト配列および非ヒト配列の三次元モデルを使用した親配列および種々の概念的キメラ産物の分析過程によってキメラ抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に利用可能であり、当業者に良く知られている。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座構造を例示および表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の観察により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析(すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析)が可能である。この方法では、所望の抗体の特徴(標的抗原に対する親和性の増加など)が達成されるようにFR残基を選択し、レシピエントと組み合わせ、配列を移入することができる。一般に、超可変領域の残基は、抗原結合への影響に直接且つほとんど実質的に関与する。

【0130】

上記のように、抗体(または免疫グロブリン)を、重鎖の定常領域中のアミノ酸配列の相違に基づいて5つの異なるクラスに分類することができる。所与のクラス内の全ての免疫グロブリンは、非常に類似した重鎖定常領域を有する。これらの相違を、配列研究によるか、より一般的には、血清学的手段(すなわち、これらの相違に指向する抗体の使用)によって検出することができる。本発明の抗体またはそのフラグメントは任意のクラスであり、したがって、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、または ϵ 重鎖を有することができる。 γ 鎖は、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、または $\gamma 4$ であり、 α 鎖は $\alpha 1$ または $\alpha 2$ である。

【0131】

好ましい実施形態では、本発明の抗体またはそのフラグメントはIgGである。IgGは免疫グロブリン分子の全機能を実行することができるので、最も万能な免疫グロブリンと見なされている。IgGは血清中の主なIgであり、胎盤を通過する唯一のIgクラスである。IgGはまた固体を固定するが、IgG4サブクラスは固定しない。マクロファージ、単球、PMN、およびいくつかのリンパ球は、IgGのFc領域のFc受容体を有する。全てのサブクラスが等しく十分に結合するわけではなく、IgG2およびIgG4はFc受容体に結合しない。PMN、単球、およびマクロファージ上のFc受容体への結合の重要性は、今のところ細胞が抗原をより良好に内在化することができるということである。IgGは食作用を増強するオプソニンである。他の細胞型上のFc受容体へのIgGの結合により、他の機能が活性化する。本発明の抗体は、任意のIgGサブクラスの抗体であり得る。

【0132】

別の好ましい実施形態では、本発明の抗体またはそのフラグメントはIgEである。I

10

20

30

40

50

g Eは抗原との相互作用前でさえも好塩基球および肥満細胞上のFc受容体に非常に強固に結合するので、IgEは最少の血清Igである。好塩基球および肥満細胞への結合の結果として、IgEはアレルギー反応に参与する。細胞上のIgEへのアレルゲンの結合により、種々の薬理学的メディエーターが放出されてアレルギー症状を生じる。IgEはまた、寄生性蠕虫疾患で役割を果たす。好酸球は、IgEのFc受容体を有し、IgEコーティングされた蠕虫への好酸球の結合によって寄生虫を死滅させる。IgEは補体を固定しない。

【0133】

種々の実施形態では、本発明の抗体およびそのフラグメントは、 κ および λ のいずれかの可変軽鎖を含む。 λ 鎖は任意のサブタイプ（例えば、 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 、および $\lambda 4$ が含まれる）のいずれかである。

10

【0134】

上記のように、本発明は、さらに、本発明のポリペプチドを含む抗体フラグメントを提供する。一定の環境では、抗体全体よりもむしろ抗体フラグメントを使用の方が有利である。例えば、より小さなサイズのフラグメントは迅速なクリアランスが可能であり、一定の組織（固形腫瘍など）への接近が改善される。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、およびFvフラグメント；二特異性抗体；線状抗体；単鎖抗体；および抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が含まれる。

【0135】

種々の抗体フラグメントの産生技術が開発されている。伝統的に、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解性の消化を介して誘導されていた（例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；およびBrennanら、Science, 229:81 (1985)を参照のこと）。しかし、これらのフラグメントを、現在、組換え宿主細胞によって直接産生することができる。Fab、Fv、およびScFv抗体フラグメントの全てをE. coli中に発現し、これから分泌することができるので、これらのフラグメントを容易に大量に産生することが可能である。Fab'-SHフラグメントを、E. coliから直接回収し、化学的にカップリングさせて $(Fab')_2$ フラグメントを形成することができる（Carterら、Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。別のアプローチに従って、 $(Fab')_2$ フラグメントを、組換え細胞培養物から直接単離することができる。in vivo半減期が増加したFabおよび $(Fab')_2$ フラグメント（サルベージ受容体結合エピトープ残基が含まれる）は、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体フラグメントの他の産生技術は、当業者に明らかであろう。

20

30

【0136】

他の実施形態では、最適な抗体は単鎖Fvフラグメント（scFv）である。WO93/16185号；米国特許第5,571,894号および同第5,587,458号を参照のこと。FvおよびsFvは、定常領域を欠くインタクトな組み合わせ部位を有する唯一の種である。したがって、これらは、in vivoでの使用時の非特異的結合を減少させるのに適切である。sFv融合タンパク質を構築して、sFvのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでのエフェクタータンパク質の融合物を得ることができる。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck、前出を参照のこと。抗体フラグメントはまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載の「線状抗体」である。かかる線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。

40

【0137】

一定の実施形態では、本発明の抗体は二重特異性または多重特異性である。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結合特異性を有する抗体である。例示的二重特異性抗体は、単一抗原の2つの異なるエピトープに結合する。他のかかる抗体は、第1の抗原結合部位が第2の抗原の結合部位と組み合わせられている。あるいは、感染細胞に

50

細胞防御機構を集中および局在化するために、T細胞受容体分子（例えば、CD3）またはIgGのFc受容体（FcγR）（FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、およびFcγRIII（CD16）など）などの白血球上の誘発分子に結合するアームと抗CMVアームを組み合わせる。また、二重特異性抗体を使用して、感染細胞に細胞毒性薬を局在化させる。これらの抗体は、CMV結合アームおよび細胞毒性薬（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、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン）に結合するアームを保有する。二重特異性抗体を、完全長の抗体または抗体フラグメント（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製する。WO96/16673号は二重特異性抗ErBB2/抗FcγRIII抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は二重特異性抗ErBB2/抗FcγRII抗体を開示している。二重特異性抗ErBB2/Fcα抗体はWO98/02463号に示されている。米国特許第5,821,337号は二重特異性抗ErBB2/抗CD3抗体を教示している。

10

【0138】

二重特異性抗体の作製方法は当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な作製は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（この2つの鎖は異なる特異性を有する）の同時発現に基づく（Milsteinら、Nature, 305:537-539（1983））。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の無作為な分類のために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10種の異なる抗体分子（そのうちの1つのみが正確な二重特異性構造を有する）の有望な混合物を産生する。通常はアフィニティクロマトグラフィ工程によって行われる正確な分子の精製はむしろ手間がかかり、生成物の収率は低い。類似の手順は、WO93/08829号およびTraunckerら、EMBO J., 10:3655-3659（1991）に開示されている。

20

【0139】

異なるアプローチに従って、所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合する。好ましくは、Igの重鎖定常ドメイン（ヒンジ領域、C_H2領域、およびC_H3領域の少なくとも一部を含む）に融合する。軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（C_H1）を有し、これが少なくとも1つの融合物中に存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および（必要に応じて）免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを個別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に同時トランスフェクトする。これにより、構築物中で使用した不均等な比の3つのポリペプチド鎖によって最適な収量の所望の二重特異性抗体が得られる実施形態で、3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率がより柔軟に調整される。しかし、等しい比の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現によって高収量が得られるか、比が所望の鎖組み合わせの収量に有意な影響を及ぼさない場合、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を単一の発現ベクターに挿入することが可能である。

30

【0140】

このアプローチの好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームにおける第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）から構成される。たった半分の二重特異性分子中に免疫グロブリン軽鎖が存在することによって容易に分離する方法が得られるので、この非対称構造が望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、WO94/04690号に開示されている。二重特異性抗体生成のさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210（1986）を参照のこと。

40

【0141】

米国特許第5,731,168号に記載の別のアプローチに従って、抗体分子対の間の界面を、組換え細胞培養物からのヘテロ二量体の回収率を最大にするように操作することができる。好ましい界面は、C_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第

50

1の抗体分子の界面由来の1つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換する。巨大側鎖と同一または類似のサイズの代償的な「空洞」を、巨大アミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）に置換することによって第2の抗体分子の界面上に作製する。これにより、他の望ましくない副産物（ホモ二量体など）を超えるヘテロ二量体の収率の増加機構が得られる。

【0142】

二重特異性抗体には、架橋抗体または「ヘテロ抱合体」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ抱合体中の抗体の一方をアビジンとカップリングし、他方をビオチンとカップリングする。かかる抗体は、例えば、望ましくない細胞を免疫系細胞の標的にし（米国特許第4, 676, 980号）、HIV感染治療用の抗体であることが提案されている（WO91/00360号、WO92/200373号、およびEP03089号）。任意の従来の架橋方法を使用して、ヘテロ抱合体抗体を作製する。適切な架橋剤は当該分野で周知であり、多数の架橋技術と共に米国特許第4, 676, 980号に開示されている。

【0143】

抗体フラグメントからの二重特異性抗体の生成技術は文献にも記載されている。例えば、化学的架橋を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら、Science, 229:81 (1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解によって切断してF(ab')₂フラグメントを生成する手順を記載している。これらのフラグメントをジチオール錯化剤（亜硫酸ナトリウム）の存在下で還元して、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止する。次いで、生成したFab'フラグメントをチオニトロベンゾアート（TNB）誘導体に変換する。次いで、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-TNB誘導体の一方をFab'-チオールに変換し、等モル量の他方のFab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体を、酵素の選択的固定化剤として使用することができる。

【0144】

最近の進歩により、E. coliからのFab'-SHフラグメントの直接回収が容易になった。このフラグメントを化学的にカップリングして二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら、J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は、完全にヒト化した二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生を記載している。各Fab'フラグメントをE. coliから個別に分泌させ、このフラグメントをin vitroでの誘導された化学的カップリングに供して二重特異性抗体を形成した。このようにして形成された二重特異性抗体は、Erbb2受容体および通常のヒトT細胞を過剰発現する細胞に結合し、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【0145】

組換え細胞培養物から二重特異性抗体フラグメントを直接作製および単離するための種々の技術も記載されている。例えば、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体が産生されている。Kostelnyら、J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に連結した。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、次いで、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法を、抗体ホモ二量体の産生のために使用することもできる。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に記載の「二重特異性抗体」テクノロジーは、二重特異性抗体フラグメントの別の作製機構を提供している。フラグメントは、短すぎて同一鎖上の2つのドメイン間で対合できないリンカーによってV_Lに連結したV_Hを含む。したがって、一方のフラグメントのV_HドメインおよびV_Lドメインに対して別のフラグメントの相補的なV_LドメインおよびV_Hドメインとの対合を強制し、それにより、抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)二量体の使用による二重特異性抗体フラグメントの別の作製戦略も報告

10

20

30

40

50

されている。Gruberら、J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照のこと。

【0146】

2つを超える結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体を調製する。Tuttlら、J. Immunol. 147:60 (1991)。多価抗体を、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって二価抗体よりも迅速に内在化（および／または異化）することができる。本発明の抗体は3つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体（例えば、三価抗体）であり、これを、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って容易に産生することができる。多価抗体は、二量体化ドメインおよび3つ以上の抗原結合部位を含む。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む。このシナリオでは、抗体は、Fc領域およびFc領域に対してアミノ末端側の3つ以上の抗原結合部位を含む。好ましい多価抗体は、3～約8個であるが、好ましくは4個の抗原結合部位を含む。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）を含み、このポリペプチド鎖は2つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc（式中、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1つのFc領域のポリペプチド鎖であり、X1およびX2はアミノ酸またはポリペプチドを示し、nは0または1である）を含む。例えば、ポリペプチド鎖は以下を含む：VH-CH1-可動性リンカー-VH-CH1-Fc領域鎖またはVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖。多価抗体は、好ましくは、少なくとも2つの（好ましくは4つの）軽鎖可変ドメインのポリペプチドをさらに含む。例えば、多価抗体は、約2個～約8個の軽鎖可変ドメインのポリペプチドを含む。本明細書中で意図する軽鎖可変ドメインのポリペプチドは軽鎖可変ドメインを含み、任意選択的にC_Lドメインをさらに含む。

【0147】

本発明の抗体は単鎖抗体をさらに含む。

【0148】

特定の実施形態では、本発明の抗体は内在化抗体である。

【0149】

本明細書中に記載の抗体のアミノ酸配列の修飾を意図する。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的性質を改良する。抗体またはその鎖をコードするポリヌクレオチドへの適切なヌクレオチドの変化の導入またはペプチド合成によって抗体のアミノ酸配列バリエーションを調製する。例示的な修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失および／または挿入および／または置換が含まれる。最終構築物が所望の特徴を保有する場合、最終抗体に到達するように欠失、挿入、および置換を任意に組み合わせる。アミノ酸の変化により、抗体の翻訳後プロセッシングを変化させることもできる（グリコシル化部位の数または位置の変化など）。本発明のポリペプチドの上記の任意の異形および修飾物は本発明の抗体に含まれる。

【0150】

変異誘発に好ましい位置である抗体の一定の残基または領域の有用な同定方法は、Cunningham and Wells in Science, 244:1081-1085 (1989)に記載のように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。ここでは、標的残基の残基または群（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電残基）を同定し、アミノ酸のPSCA抗原との相互作用に影響を及ぼすように中性または負電荷のアミノ酸（最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）に置換する。次いで、置換に対する機能的感受性が証明されたアミノ酸の位置を、置換部位でのまたは置換部位のためのさらなるまたは他のバリエーションの導入によって精巧にする。したがって、アミノ酸配列異形の導入のための部位を予め決定する一方で、変異自体の性質を予め決定する必要はない。例えば、所与の部位での変異能力を分析するために、標的コンドンまたは標的領域でalaスキャニング変異誘発またはランダム変異誘発を行い、発現した抗抗体バリエーションを所望の活性についてスクリーニングする。

【0151】

アミノ酸配列の挿入には、1残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体または細胞傷害性ポリペプチドと融合した抗体が含まれる。抗体の他の挿入バリエーションには、抗体の血清半減期を増加させる酵素（例えば、ADEPT用）またはポリペプチドへの抗体のN末端またはC末端の融合が含まれる。

【0152】

別のバリエーション型はアミノ酸置換バリエーション型である。これらのバリエーション型は、抗体分子中に異なる残基に置換された少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発のための最も興味深い部位には超可変領域が含まれるが、FRの変化も意図される。保存的置換および非保存的置換が意図される。

10

【0153】

(a) 置換領域中のポリペプチド骨格の構造（例えば、シート立体配座またはヘリックス立体配座として）、(b) 標的部点での分子の電荷または疎水性、または(c) 側鎖の嵩高さの維持に及ぼすその影響が有意に異なる置換の選択によって抗体の生物学的特性における実質的な修飾を行う。

【0154】

抗体の適切な立体配座の維持に関与しない任意のシステイン残基も一般にセリンに置換して、分子の酸化安定性を改良し、異常な架橋を防止する。逆に、システイン結合を抗体に添加して、その安定性を改良する（特に、抗体が抗体フラグメント（Fvフラグメントなど）である場合）。

20

【0155】

1つの置換バリエーション型は、親抗体の1つまたは複数の超可変領域の残基の置換を含む。一般に、さらなる開発のために選択した得られたバリエーション型の生物学的性質を、これらが生成された親抗体と比較して改良した。かかる置換バリエーション型の都合の良い生成方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を含む。簡潔に述べれば、いくつかの超可変領域部位（例えば、6〜7部位）を、各部位に全ての可能なアミノ置換が得られるように変異する。このようにして生成した抗体バリエーション型を、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合物として糸状ファージ粒子から1価の様式でディスプレイする。次いで、本明細書中に開示のように、ファージディスプレイされたバリエーション型を、その生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスクランニング変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域の残基を同定する。あるいはまたはさらに、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原または感染細胞との間の接触点を同定する。これらの接触残基および隣接残基は、本明細書中に詳述した技術に従った置換の候補である。一旦これらのバリエーション型が生成されると、一連のバリエーション型を本明細書中に記載のスクリーニングに供し、1つまたは複数の関連するアッセイで優れた性質を有する抗体をさらなる開発のために選択する。

30

【0156】

抗体の別のアミノ酸バリエーション型は、抗体の元のグリコシル化パターンが変化している。変化は、抗体中に見出される1つまたは複数の炭水化物部分の欠失および／または抗体中に存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

40

【0157】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付着をいう。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される可能性がある。O結合型グリコ

50

シル化は、ヒドロキシアミノ酸（最も一般的にはセリンまたはトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用することができる）への糖であるN-アセチルガラクトサミン（N-acetyl galactosamine）、ガラクトース、またはキシロースの1つの付着をいう。

【0158】

抗体へのグリコシル化部位の付加を、1つまたは複数の上記トリペプチド配列を含むようなアミノ酸配列の変化によって都合よく行う（N結合型グリコシル化部位用）。また、元の抗体配列に対する1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換によって変化させる（O結合型グリコシル化部位用）。

【0159】

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）および／または補体依存性細胞傷害性（CDC）を増強するために、本発明の抗体をエフェクター機能に関して修飾する。これを、抗体のFc領域中の1つまたは複数のアミノ酸置換の導入によってこれを行うことができる。あるいはまたはさらに、システイン残基をFc領域中に導入し、それにより、この領域中に鎖間ジスルフィド結合が形成される。このように生成されたホモ二量体抗体は、内在化能力が改善され、そして／または補体媒介性細胞死滅および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）が増加し得る。Caronら、J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) を参照のこと。抗感染活性が増強されたホモ二量体抗体はまた、Wolffら、Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載のヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製する。あるいは、二重のFc領域を有するように抗体を操作し、それにより、補体溶解およびADCC能力を増強することができる。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) を参照のこと。

【0160】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載のように、サルベージ受容体結合エピトープを抗体（特に、抗体フラグメント）に組み込む。用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のin vivo血清半減期の増加を担うIgG分子（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄）のFc領域のエピトープをいう。

【0161】

また、本発明の抗体を、例えば、生成または診断に適用するためのエピトープタグまたは標識を含むように修飾する。本発明はまた、免疫抱合体（抗癌剤（細胞毒性薬または増殖阻害剤など）に抱合した抗体が含まれる）を使用した療法に関する。かかる免疫抱合体の生成で有用な化学療法薬は上に記載されている。

【0162】

抗体と1つまたは複数の小分子毒素（カリチアマイシン、マイタンシノイド、アウリスチン、トリコテセン（trichothene）、およびCC1065など）および毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体との抱合体も本明細書中で意図される。

【0163】

1つの好ましい実施形態では、本発明の抗体（全長またはフラグメント）を、1つまたは複数のマイタンシノイド分子に抱合する。マイタンシノイドは、チューブリン重合の阻害によって作用する有糸分裂（mitotic）インヒビターである。マイタンシノイドは、東アフリカの低木であるMaytenus serrataから最初に単離された（米国特許第3,896,111号）。その後、一定の微生物もマイタンシノイド（マイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステルなど）を産生することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成マイタンシノールならびにその誘導体およびアナログは、例えば、米国特許第4,137,230号；同第4,248,870号；同第4,256,746号；同第4,260,608号；同第4,265,814号；同第4,294,757号；同第4,307,016号；同第4,308,268号；同第4,

10

20

30

40

50

308, 269号;同第4, 309, 428号;同第4, 313, 946号;同第4, 315, 929号;同第4, 317, 821号;同第4, 322, 348号;同第4, 331, 598号;同第4, 361, 650号;同第4, 364, 866号;同第4, 424, 219号;同第4, 450, 254号;同第4, 362, 663号;および同第4, 371, 533号に開示されている。

【0164】

その治療指数を改善するために、メイタンシンおよびメイタンシノイドを、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体に抱合した。メイタンシノイドを含む免疫抱合体およびその治療用途は、例えば、米国特許第5, 208, 020号、同第5, 416, 064号、および欧州特許第EP0425235B1号に開示されている。Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)は、ヒト結腸直腸癌に指向するモノクローナル抗体C242に連結したDM1と呼ばれるメイタンシノイドを含む免疫抱合体を記載していた。抱合体は、培養結腸癌細胞に対して高い細胞傷害性を示すことが見出され、in vivo腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。

【0165】

抗体-メイタンシノイド抱合体を、抗体またはメイタンシノイド分子の生物学的活性を有意に減少させることなくメイタンシノイド分子に抗体を化学結合することによって調製する。1つの毒素/抗体分子でさえも裸の抗体の使用よりも細胞傷害性が増強されると予想されるにもかかわらず、抗体分子あたり平均して3~4個のメイタンシノイド分子の抱合が抗体の機能または溶解性に負の影響を及ぼすことなく標的細胞の細胞傷害性を増強するのに有効であることが示された。メイタンシノイドは当該分野で周知であり、公知の技術によって合成するか、天然供給源から単離することができる。適切なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第5, 208, 020号ならびに本明細書中の上記で言及した他の特許および非特許刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノールおよびメイタンシノール分子の芳香環内または他の位置で修飾されたメイタンシノールアナログ（種々のメイタンシノールエステルなど）である。

【0166】

抗体抱合体の作製のための当該分野で公知の連結基が多数存在する（例えば、米国特許第5, 208, 020号または欧州特許第0425235B1、およびChariら、Cancer Research 52:127-131 (1992)に開示の連結基が含まれる）。連結基には、上記で確認した特許に開示のジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基、またはエステラーゼ不安定性基が含まれ、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。

【0167】

種々の二官能性タンパク質カップリング剤（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-1-カルボキシラート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（アジピミド酸ジメチル塩酸塩など）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアナート（トルエン2, 6-ジイソシアナートなど）、およびビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど）など）を使用して免疫抱合体を作製する。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合を得るための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）（Carlssonら、Biochem. J. 173:723-737 [1978]）およびN-スクシンイミジル-4-（2-ピリジルジチオ）ペンタノアート（SPP）が含まれる。例えば、リシン免疫毒素を、Vitettaら、Science 238:1098 (1987)に記載のように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四酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性ヌクレオチドの抱合のための

例示的なキレート剤である。WO 94/11026号を参照のこと。リンカーは、細胞中の細胞傷害性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」である。例えば、酸不安定性リンカー (Cancer Research 52:127-131 (1992)) ; 米国特許第5,208,020号)を使用することができる。

【0168】

別の目的の免疫抱合体には、1つまたは複数のカリチアマイシン分子に抱合した抗体が含まれる。抗生物質のカリチアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNA分解物を産生することができる。カリチアマイシンファミリーの抱合体の調製については、米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、同第5,877,296号(全てAmerican Cyanamid Company)を参照のこと。抗体が抱合する別の薬物は抗葉酸剤QFAである。カリチアマイシンおよびQFAは共に細胞内活性部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性内在化を介したこれらの薬剤の細胞取り込みによってその細胞傷害効果が非常に増強される。

【0169】

本発明の抗体に抱合する他の薬剤の例には、BCNU、ストレプトゾシン (streptozocin)、ビンクリスチン、および5-フルオロウラシル(米国特許第5,053,394号、同第5,770,710号に記載の集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー)、およびエスペラミシン(米国特許第5,877,296)が含まれる。

【0170】

使用される酵素活性毒素およびそのフラグメントには、例えば、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖 (Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、 α -サルシン、シナブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシインヒビター、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalisインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセン (tricothecene)が含まれる。例えば、WO 93/21232号を参照のこと。

【0171】

本発明は、さらに、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ(デオキシリボヌクレアーゼ; DNaseなど))との間に形成された免疫抱合体を含む。

【0172】

感染細胞の選択的破壊のために、抗体は高放射性原子を含む。種々の放射性同位体は、放射性抱合した抗PSCA抗体の産生のために利用可能である。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Rc^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が含まれる。抱合体を診断のために使用する場合、抱合体は、シンチグラフィ研究のための放射性原子(例えば、 tc^{99m} または I^{123})または核磁気共鳴(NMR)画像化(磁気共鳴画像法(mri)としても公知)のためのスピン標識(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、または鉄など)を含む。

【0173】

放射性標識または他の標識を、公知の方法で抱合体に組み込む。例えば、ペプチドを生合成するか、例えば、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したアミノ酸化学合成によって合成する。標識(tc^{99m} または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、および In^{111} など)を、ペプチド中のシステイン残基を介して付着させ

10

20

30

40

50

る。イットリウム-90を、リジン残基を介して付着させることができる。IODOGEN法(Fraker ら、(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)を使用して、ヨウ素-123を組み込む。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal, CRC Press 1989)には、他の方法が詳述されている。

【0174】

あるいは、融合タンパク質(抗体および細胞毒性薬が含まれる)を、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製する。DNA長は、相互に隣接するか、抱合体の所望の性質を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離された抱合体の2つの部分をコードする各領域を含む。

【0175】

本発明の抗体はまた、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学療法薬(WO81/01145号を参照のこと))を活性な抗癌薬(例えば、WO88/07378号および米国特許第4,975,278号を参照のこと)に変換するプロドラッグ活性化酵素への抗体の抱合による抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法(ADEPT)で使用される。

【0176】

ADEPTに有用な免疫抱合体の酵素成分には、プロドラッグをそのより活性な細胞傷害性形態に変換するような方法でプロドラッグに作用することができる任意の酵素が含まれる。本発明の方法で有用な酵素には、以下が含まれるが、これらに限定されない:リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ;硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ;非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ;ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なプロテアーゼ(セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(カテプシンBおよびLなど)など);D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ;グリコシル化プロドラッグの遊離薬物への変換に有用な炭水化物切断酵素(β -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなど); β -ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用な β -ラクタマーゼ;およびそのアミン窒素にてフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基で誘導体化された薬物をそれぞれ遊離薬物に変換するのに有用なペニシリンアミダーゼ(ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなど)。あるいは、当該分野で「アブザイム」としても公知の酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離活性薬物に変換することができる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照のこと)。抗体-アブザイム抱合体を、感染細胞集団へのアブザイムの送達について本明細書中に記載のように調製することができる。

【0177】

当該分野で周知の技術(上記で考察したヘテロ二官能性架橋試薬の使用など)によって、本発明の酵素を抗体に共有結合させる。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結した本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を、当該分野で周知の組換えDNA技術を使用して構築する(例えば、Neubergerら、Nature, 312:604-608(1984)を参照のこと)。

【0178】

抗体の他の修飾を本明細書中で意図する。例えば、抗体を、種々の非タンパク質性ポリマー(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、また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とのコポリマー)の1つに連結する。また、抗体を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって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またはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)、またはマクロエマルジョン中に捕捉する。

かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

【0179】

本明細書中に開示の抗体を、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物の送達に有用な種々の型の脂質、リン脂質、および／または界面活性剤から構成される小胞である。リポソーム成分を、一般に、生体膜の脂質配置に類似の二分子膜構成に配置する。抗体を含むリポソームを、当該分野で公知の方法（Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号；および1997年10月23日公開のWO97/38731号に記載の方法など）によって調製する。循環期間が増加したリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

10

【0180】

特に有用なリポソームを、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG由来ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を使用した逆相蒸発法によって生成する。リポソームを、規定の孔サイズのフィルターを介して押し出して所望の直径を有するリポソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントを、ジスルフィド鎖間反応によってMartinら、J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載のリポソームに抱合することができる。化学療法薬を任意選択的にリポソーム内に含める。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989)を参照のこと。

20

【0181】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、任意の種々の生物学的または機能的特徴を有することができる。一定の実施形態では、これらの抗体はCMV特異的抗体であり、これらの抗体が他のウイルスと比較して、CMVまたはHCMVにそれぞれ特異的に結合するか優先的に結合することを示す。

【0182】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、特異的または優先的に結合するポリペプチドまたは細胞の生物学的活性を部分的または完全に遮断または阻害するアンタゴニスト抗体である。他の実施形態では、本発明の抗体は、結合する感染細胞の増殖を部分的または完全に遮断または阻害する増殖阻害抗体である。別の実施形態では、本発明の抗体はアポトーシスを誘導する。さらに別の実施形態では、本発明の抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害または補体依存性細胞傷害性を誘導または促進する。

30

【0183】

ポリヌクレオチド

本発明は、他の態様では、ポリヌクレオチド組成物を提供する。好ましい実施形態では、これらのポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド（例えば、CMVに結合する抗体の可変鎖領域）をコードする。当業者にも認識されるように、本発明のポリヌクレオチドは一本鎖（コード鎖またはアンチセンス鎖）または二本鎖であり、DNA分子（ゲノムDNA、cDNA、または合成DNA）またはRNA分子であり得る。RNA分子には、HnRNA分子（イントロンを含み、1対1様式でDNA分子に対応する）およびmRNA分子（イントロンを含まない）が含まれる。さらなるコード配列または非コード配列は本発明のポリヌクレオチド内に存在することができ（しかし、その必要はない）、ポリヌクレオチドは他の分子および／または支持材料に連結することができる（しかし、その必要はない）。本発明のポリヌクレオチドを、例えば、ハイブリッド形成アッセイで使用して、生物サンプルおよび本発明のポリペプチドの組換え産生物におけるCMV特異的抗体の存在を検出する。

40

【0184】

50

したがって、本発明の別の態様によれば、ポリヌクレオチド組成物（実施例 1 に記載のいくつかまたは全てのポリヌクレオチド配列、実施例 1 に記載のポリヌクレオチド配列の相補物、および実施例 1 に記載のポリヌクレオチド配列の縮重バリエーションが含まれる）を提供する。一定の好ましい実施形態では、本明細書中に記載のポリヌクレオチド配列は、正常なコントロール非感染細胞と比較した場合に C M V 感染細胞に優先的に結合することができるポリペプチド（実施例 1 または図 1 に記載の配列を有するポリペプチドが含まれる）をコードする。さらに、本発明は、任意の本発明のポリペプチドをコードする全てのポリヌクレオチドを意図する。

【0185】

他の関連する実施形態では、本発明は、本明細書中に記載の方法（例えば、標準的なパラメーターを使用した B L A S T 分析）を使用して決定した場合に実施例 1 に記載の配列（または可変ドメインまたは機能的ドメインをコードするその一部）と実質的に同一の配列（例えば、本発明のポリヌクレオチド配列（または本発明のポリペプチドの可変ドメインまたは機能的ドメインをコードするそのフラグメント）と比較して少なくとも 70 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれを超える配列同一性を含む配列）を有するポリヌクレオチドバリエーションを提供する。当業者は、これらの値を適切に調整して、コドン縮重、アミノ酸類似性、および読み取り枠の位置などを考慮することによって 2 つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定できると認識するであろう。

【0186】

典型的には、ポリヌクレオチドバリエーションは、好ましくは、バリエーション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免疫原性結合性が本明細書中に具体的に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと比較して実質的に減少しないような 1 つまたは複数の置換、付加、欠失、および／または挿入を含む。

【0187】

さらなる実施形態では、本発明は、本明細書中に開示の 1 つまたは複数の配列と同一または相補的な種々の長さの連続する配列を含むポリヌクレオチドフラグメントを提供する。例えば、本発明は、本明細書中に開示の 1 つまたは複数の配列の少なくとも約 10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500、1000 個、またはそれを超える連続するヌクレオチドおよびその間の全ての中間の長さを含むポリヌクレオチドを提供する。「中間の長さ」は、この文脈では、引用した値の間の任意の長さ（16、17、18、19 など；21、22、23 など；30、31、32 など；50、51、52、53 など；100、101、102、103 など；および 150、151、152、153 など（200～500；500～1,000 の間の全ての整数が含まれる）など）を意味すると容易に理解されるであろう。

【0188】

本発明の別の実施形態では、中程度から高いストリンジェンシー条件で本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列、そのフラグメント、またはその相補配列とハイブリッド形成することができるポリヌクレオチド組成物を提供する。ハイブリッド形成技術は、分子生物学分野で周知である。例示のために、本発明のポリヌクレオチドの他のポリヌクレオチドとのハイブリッド形成の試験に適切な中程度にストリンジェントな条件には、5 × S S C、0.5 % S D S、1.0 mM E D T A（p H 8.0）を含む溶液での予備洗浄；50 °C～60 °C、5 × S S C で一晩のハイブリッド形成；その後の 0.1 % S D S を含む 2 ×、0.5 ×、および 0.2 × S S C での 65 °C で 20 分間の各 2 回の洗浄が含まれる。当業者は、ハイブリッド形成溶液の塩含有量および／またはハイブリッド形成の実施濃度の変更などによってハイブリッド形成のストリンジェンシーを容易に操作できると理解するであろう。例えば、別の実施形態では、適切な高ストリンジェントハイブリッド形成条件には、例えば、60～65 °C または 65～70 °C にハイブリッド形成温度を上昇させることを除いた上記の条件が含まれる。

【0189】

好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションまたはフラグメントによってコードされるポリペプチドは、未変性のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと同一の結合特異性を有する（すなわち、特異的または優先的にCMVに結合する）。一定の好ましい実施形態では、上記のポリヌクレオチド（例えば、ポリヌクレオチドバリエーション、フラグメント、およびハイブリッド形成配列）は、本明細書中に具体的に記載したポリペプチド配列の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%の結合活性レベルを有するポリペプチドをコードする。

【0190】

本発明のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを、コード配列自体の長さとは無関係に、その長さ全体が非常に変化するように他のDNA配列（プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、多重クローニング部位、および他のコードセグメントなど）と組み合わせる。ほとんどの任意の長さの核酸フラグメントが使用され、好ましくは、意図する組換えDNAプロトコールにおける調製および使用の容易さによって全長が制限される。例えば、全長が約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、および約50塩基対長など（中間の長さが全て含まれる）の例示的ポリヌクレオチドセグメントは、本発明を多数実施する上で有用である。

【0191】

遺伝暗号の縮重の結果として本明細書中に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が多数存在すると当業者に認識されるであろう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意の未変性遺伝子のヌクレオチド配列に対して最少の相同性を有する。それにもかかわらず、本発明のポリペプチドをコードするが、コドン利用頻度の相違のために異なるポリペプチドを本発明で特に意図する。さらに、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの1つまたは複数の変異（欠失、付加、および／または置換など）の結果として変化した内因性遺伝子である。得られたmRNAおよびタンパク質は、構造または機能が変化し得るが、その必要はない。標準的な技術（ハイブリッド形成、増幅、および／またはデータベースでの配列比較など）を使用して対立遺伝子を同定する。

【0192】

本発明の一定の実施形態では、本発明者らは、コードされたポリペプチドの1つまたは複数の性質（その結合特異性または結合強度など）を変化させるための開示のポリヌクレオチド配列の変異誘発を意図する。変異誘発技術は当該分野で周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両バリエーションを作製するために広く使用されている。変異誘発アプローチ（部位特異的変異誘発など）を、本明細書中に記載のポリペプチドのバリエーションおよび／または誘導体を調製するために使用する。このアプローチにより、ポリペプチド配列をコードする基礎をなすポリヌクレオチドの変異誘発によってポリペプチド配列が特異的に修飾される。これらの技術により、ポリヌクレオチドへの1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の導入による配列バリエーションを調製および試験するための簡潔なアプローチ（例えば、1つまたは複数の上記検討材料の組み込み）が得られる。

【0193】

部位特異的変異誘発により、横たわっている欠失連結部（deletion junction）の両側で安定な二重鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列の複雑さのプライマー配列を得るために、特定のオリゴヌクレオチド配列（望ましく変異したヌクレオチド配列が含まれる）および十分な数の隣接ヌクレオチドの使用によって変異体を産生することが可能である。選択されたポリヌクレオチド配列を変異させて、ポリヌクレオチド自体の性質を改良、変更、減少、修飾、または変化させ、そして／またはコードされるポリペプチドの性質、活性、組成、安定性、または一次配列を変化させる。

【0194】

本発明の他の実施形態では、本明細書中に提供されたポリヌクレオチド配列を、核酸ハ

10

20

30

40

50

イブリッド形成のためのプローブまたはプライマーとして（例えば、PCRプライマーとして）使用する。かかる核酸プローブが目的の配列と特異的にハイブリッド形成する能力により、このプローブを所与のサンプル中の相補配列の存在の検出で用いることができるであろう。しかし、他の使用（変異種プライマーまたは他の遺伝子構築物の調製で使用するプライマーの調製のための配列情報の使用など）も想定される。そのようなものとして、本明細書中に開示の15ヌクレオチド長の連続配列と同一の配列を有するか、相補的である少なくとも約15ヌクレオチド長の連続配列の配列領域を含む核酸セグメントが特に有用であることが意図される。より長い連続する同一または相補的な配列（例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000個（全ての中間の長さが含まれる）の配列およびさらに全長までの配列）も一定の実施形態で使用される。

10

【0195】

本明細書中に開示のポリヌクレオチド配列と同一であるか相補的な10～14、15～20、30、50、またはさらに100～200ヌクレオチドほど（その中間の長さも含まれる）の連続するヌクレオチドストレッチを含む配列領域を有するポリヌクレオチド分子を、例えば、サザンブロットティングおよびノーザンブロットティングで用いるハイブリッド形成プローブおよび／または例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で用いるプライマーとして特に意図する。フラグメントの全サイズおよび相補ストレッチのサイズは、最終的に、特定の核酸セグメントの意図する使用または適用に依存するであろう。より小さなフラグメントをハイブリッド形成実施形態で使用し、連続する相補領域の長さを変化させることができるが（約15から約100ヌクレオチドの間など）、検出すべき相補配列の長さに応じてより大きな連続相補ストレッチを使用することができる。

20

【0196】

約15～25ヌクレオチド長のハイブリッド形成プローブの使用により、安定且つ選択的である二重鎖分子が形成される。しかし、ハイブリッドの安定性および選択性を増加させ、それにより、得られた特異的ハイブリッド分子の質および程度を改善するために、12塩基長を超えるストレッチにわたって連続する相補配列を有する分子が一般に好ましい。15～25個またはさらに長い連続ヌクレオチドの遺伝子相補ストレッチを有する核酸分子が好ましい。

【0197】

ハイブリッド形成プローブを、本明細書中に開示の任意の配列の任意の部分から選択する。必要なのは、プローブまたはプライマーとして使用することを望む本明細書中に記載の配列または配列の任意の連続部分（約15～25ヌクレオチド長から全長配列以下）を検討することだけである。プローブおよびプライマー配列の選択は種々の要因に支配され得る。例えば、全配列の末端から末端までのプライマーを使用することが望まれ得る。

30

【0198】

本発明のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントもしくはバリエーションを、自動化オリゴヌクレオチド合成機を使用して一般的に実施される化学的手段によってフラグメントを直接合成することによって容易に調製する。また、フラグメントを、核酸再生テクノロジー（米国特許第4,683,202号のPCR（商標）テクノロジーなど）の適用、組換え産生のための組換えベクターへの選択された配列の導入、および分子生物学分野の当業者

40

【0199】

ベクター、宿主細胞、および組換え法

本発明は、ベクターおよび宿主細胞（本発明の核酸が含まれる）ならびに本発明のポリペプチドの産生のための組換え技術を提供する。本発明のベクターには、任意の細胞型または生物型で複製することができるベクター（例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、およびミニ染色体が含まれる）が含まれる。種々の実施形態では、ベクター（本発明のポリヌクレオチドが含まれる）は、ポリヌクレオチドの増殖または複製に適切なベクターまたは本発明のポリペプチドの発現に適切なベクターである。かかるベクターは当該分野で公知であり、市販されている。

50

【0200】

本発明のポリヌクレオチドを合成し、次いでその全部または一部を組み合わせ、日常的な分子生物学技術および細胞生物学技術（例えば、適切な制限部位および制限酵素を使用した線状化ベクターへのポリヌクレオチドのサブクローニングが含まれる）を使用してベクターに挿入する。本発明のポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの各鎖に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応によって増幅することができる。これらのプライマーはまた、ベクターへのサブクローニングを容易にするための制限酵素切断部位を含むことができる。複製可能なベクター成分には、一般に、1つまたは複数の以下が含まれるが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、および1つまたは複数のマーカー遺伝子または選択遺伝子。

10

【0201】

本発明のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその機能的等価物を、適切な発現ベクター（すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクター）に挿入する。当業者に周知の方法を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写および翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを構築する。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。かかる技術は、例えば、Sambrook, J., ら、(2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., および Ausubel, F. M. ら、(1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y. に記載されている。

20

【0202】

ポリヌクレオチド配列を含めて発現させるために種々の発現ベクター／宿主系を使用する。これらには、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミド DNA 発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリシウイルスモザイクウイルス (CaMV)；タバコモザイクウイルス (TMV)）または細菌発現ベクター（例えば、Ti または pBR322 プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0203】

1つの実施形態内で、目的のモノクローナル抗体を発現する遺伝子の可変領域を、ヌクレオチドプライマーを使用してハイブリドーマ細胞から増幅する。当業者はこれらのプライマーを合成することができるか、販売業者（例えば、マウスおよびヒトの可変領域の増幅用プライマーを販売している Stratagene (La Jolla, California) を参照のこと）から購入することができる。プライマーを使用して重鎖または軽鎖の可変領域を増幅し、次いで、ImmunoZAP (商標) H または ImmunoZAP (商標) L (Stratagene) などのベクターにそれぞれ挿入する。次いで、これらのベクターを *E. coli*、酵母、または哺乳動物ベースの発現系に導入する。V_HドメインおよびV_Lドメインの融合物を含む大量の単鎖タンパク質を、これらの方法を使用して産生することができる (Bird ら、Science 242: 423-426 (1988) を参照のこと)。

40

【0204】

発現ベクター中に存在する「調節エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を行うために宿主細胞タンパク質と相互作用するベクターの非翻訳領域（例えば、エンハンサー、プロモーター、5' および 3' 非翻訳領域）である。これらのエレメントは、その強度および特異性が異なり得る。使用したベクター系および宿主に応じて、多数の適切な転写および翻訳エレメント（構成性プロモーターおよび誘導性プロモーターが含まれる）を使用する。

【0205】

50

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターの例には、p h o aプロモーター、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン (t r p) プロモーター系、およびハイブリッドプロモーター (t a cプロモーターなど) が含まれる。しかし、他の公知の細菌プロモーターが適切である。細菌系で用いるプロモーターはまた、通常、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されたシャイン・ダルカルノ配列を含む。誘導性プロモーター (p B L U E S C R I P Tファージミド (S t r a t a g e n e, L a J o l l a, C a l i f.) またはp S P O R T 1プラスミド (G i b c o B R L, G a i t h e r s b u r g, M D) などのハイブリッドl a c Zプロモーターなど) を使用することができる。

【0206】

真核生物の種々のプロモーター配列は公知であり、本発明に従って、任意のプロモーター配列を使用することができる。実質的に全ての真核生物遺伝子は、転写開始部位から約25~30塩基上流に存在するATリッチな領域を有する。多数の遺伝子の転写開始から70~80塩基上流で見出される別の配列は、C N C A A T領域 (式中、Nは任意のヌクレオチドであり得る) である。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端は、コード配列の3'末端へのポリAテールの付加のためのシグナルであり得るA A T A A A配列である。これらの全配列を、真核生物発現ベクターに適切に挿入する。

【0207】

哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが一般に好ましい。哺乳動物宿主細胞中でのベクター由来のポリペプチド発現を、例えば、ウイルス (ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、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、トリ肉種ウイルス、サイトメガロウイルス (C M V)、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましいサルウイルス40 (S V 40) など) のゲノムから得たプロモーター、異種哺乳動物プロモーター (例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター) および熱ショックプロモーター (但し、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合する場合) によって調節することができる。ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞株を生成することが必要である場合、S V 40またはE B Vベースのベクターを、適切な選択マーカーと共に有利に使用することができる。適切な発現ベクターの一例はC M Vプロモーターを含むp c D N A 3. 1 (I n v i t r o g e n, C a r l s b a d, C A) である。

【0208】

多数のウイルスベースの発現系が、ポリペプチドの哺乳動物発現に利用可能である。例えば、アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、目的のポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターおよび3断片からなるリーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体にライゲーションする。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域中の挿入を使用して、感染宿主細胞中でポリペプチドを発現することができる生存ウイルスを得る (L o g a n, J. a n d S h e n k, T. (1984) P r o c. N a t l . A c a d. S c i. 81:3655-3659)。さらに、転写エンハンサー (ラウス肉腫ウイルス (R S V) エンハンサーなど) を使用して、哺乳動物宿主細胞中での発現を増加させる。

【0209】

細菌系では、ポリペプチド発現を意図した使用に応じて多数の発現ベクターのいずれかを選択する。例えば、大量発現を望む場合、容易に生成される高レベルの融合タンパク質発現を指示するベクターを使用する。かかるベクターには、多機能性E. c o l iクローニングおよび発現ベクター (p E T (S t r a t a g e n e) など) (目的のポリペプチドをコードする配列を、 β -ガラクトシダーゼのアミノ末端M e tおよびそれに続く7残基についての配列) と共にインフレームでベクターにライゲーションし、それにより、ハイブリッドタンパク質が産生される) およびp I Nベクター (V a n H e e k e, G. a n d S. M. S c h u s t e r (1989) J. B i o l. C h e m. 264:5503-5509) などが含まれるが、これらに限定されない。p G E Xベクター (P r o m

10

20

30

40

50

ega, Madison, WI) も使用して、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させる。一般に、かかる融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着およびその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離によって溶解した細胞から容易に精製することができる。目的のクローニングしたポリペプチドを任意に GST 部分から放出することができるように、かかる系で作製されたタンパク質を、ヘパリン、トロンビン、または第 Xa 因子プロテアーゼ切断部位を含むようにデザインする。

【0210】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、構成性または誘導性プロモーター (α 因子、アルコールオキシダーゼ、および PGH) を含む多数のベクターを使用する。酵母宿主と使用するための他の適切なプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素 (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 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、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-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼなど) のプロモーターが含まれる。概説については、Ausubel ら、(前出) および Grant ら、(1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544 を参照のこと。増殖条件によって調節される転写のさら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には、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトロム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、マルトースおよびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域が含まれる。酵母発現での使用に適切なベクターおよびプロモーターは、欧州特許第 73, 657 号にさらに記載されている。酵母エンハンサーを、酵母プロモーターと共に使用することも有利である。

【0211】

植物発現ベクターを使用する場合、ポリペプチドをコードする配列の発現を多数のプロモーターのいずれかによって駆動する。例えば、ウイルスプロモーター (CaMV の 35S および 19S プロモーターなど) を単独で使用するか、TMV 由来の ω リーダー配列と組み合わせて使用する (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311)。あるいは、植物プロモーター (RUBISCO の小サブユニットまたは熱ショックプロモーターなど) を使用することができる (Coruzzi, G. ら、(1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680; Broglie, R. ら、(1984) *Science* 224: 838-843; および Winter, J., ら、(1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105)。これらの構築物を、直接 DNA 形質転換または病原体媒介性トランスフェクションによって植物細胞に導入する。かかる技術は、一般に利用可能な多数の概説に記載されている (例えば、Hobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N. Y.; pp. 191-196 を参照のこと)。

また、昆虫系を使用して目的のポリペプチドを発現する。例えば、1つのかかる系では、*Autographa californica* 核多核体病ウイルス (AcNPV) を、*Spodoptera frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* 幼虫中の外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用する。ポリペプチドをコードする配列を、ウイルスの非必須領域 (ポリヘドリン遺伝子など) にクローン化し、ポリヘドリンプロモーターの調節下におくことができる。ポリペプチドコード配列の首尾の良い挿入によってポリヘドリン遺伝子が不活性にされ、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生される。次いで、組換えウイルスを使用して、例えば、*S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* 幼虫に感染させ、目的のポリペプチドを発現すること

ができる (Engelhard, E. K. ら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3224-3227)。

【0212】

特異的開始シグナルを使用して、目的のポリペプチドをコードする配列をより有効に翻訳することもできる。かかるシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適切な発現ベクターに挿入する場合、さらなる転写および翻訳調節シグナルが必要であり得る。しかし、コード配列またはその一部のみを挿入する場合、ATG開始コドンを含む外因性翻訳調節シグナルを準備する。さらに、開始コドンは、挿入されたポリヌクレオチドの正確な翻訳を確実にするために正確な読み取り枠中に存在する。外因性の翻訳エレメントおよび開始コドンは、種々の起源（天然および合成の両方）であり得る。

10

【0213】

本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写を、しばしば、ベクターへのエンハンサー配列の挿入によって増加させる。多数のエンハンサー配列が公知であり、例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリンをコードする遺伝子中で同定されたエンハンサー配列が含まれる。しかし、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例には、複製起点の後期側 (bp 100~270) のSV40エンハンサー、サイトメガロウイ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ーマエンハンサー、およびアデノウイ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エレメントの増強については、Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) も参照のこと。エンハンサーを、ポリペプチドコード配列の5'側または3'側の位置でベクターにスプライシングすることができるが、好ましくは、プロモーターから5'側の部位に存在する。

20

【0214】

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞）で使用される発現ベクターは、典型的には、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列も含む。かかる配列は、一般に、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'側、時折3側の'非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、抗PSCA抗体をコードするmRNAの非翻訳部分中のポリアデニル化フラグメントとして転写されたヌクレオチドセグメントを含む。1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。WO94/11026号およびこれに開示した発現ベクターを参照のこと。

30

【0215】

本明細書中のベクター中でのDNAのクローニングまたは発現に適切な宿主細胞は、上記の原核生物、酵母、植物、または高等真核生物の細胞である。この目的に適切な原核生物 (prokaryote) の例には、グラム陰性細菌またはグラム陽性細菌などの真正細菌（例えば、Enterobacteriaceae (Escherichia (例えば、E. coli)、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella (例えば、Salmonella typhimurium)、Serratia (例えば、Serratia marcescans)、およびShigellaなど）、ならびにBacilli (B. subtilis およびB. licheniformis (例えば、1989年4月12日公開のDD266, 710号に開示のB. licheniformis 41P) など)、Pseudomonas (P. aeruginosaなど)、およびStreptomyces) が含まれる。1つの好ましいE. coliクローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC 31, 446) であるが、他の株 (E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31, 537)、およびE. coli W3110 (ATCC 27, 325) など) が適切である。これらの例は、本発明を制限するよりもむしろ例示である。

40

【0216】

Saccharomyces cerevisiae (すなわち、一般的なパン酵母)

50

は、下等真核宿主生物の間で最も一般的に使用されている。しかし、多数の他の属、種、および株が本明細書中で一般的に利用可能であり、且つ有用である (*Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* 宿主 (例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC 36, 906)、*K. thermotolerans*、および *K. marxianus* など); *Yarrowia* (EP 402, 226); *Pichia pastoris* (EP 183, 070); *Pichia methanolica*、*Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244, 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* (*Schwanniomyces occidentalis* など); および糸状菌 (例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolypocladium*、および *Aspergillus* 宿主 (*A. nidulans* および *A. niger* など) など) など)。

【0217】

一定の実施形態では、宿主細胞株を、挿入した配列の発現を調整する能力または発現したタンパク質を所望の様式でプロセッシングする能力について選択する。かかるポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングを使用して、正確な挿入、折り畳み、および／または機能を容易にすることもできる。かかる翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的な機構を有する異なる宿主細胞 (*CHO*、*COS*、*HeLa*、*MDCK*、*HEK293*、および *WI38* など) を、外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするために選択することができる。

【0218】

抗体またはそのフラグメントの発現に特異的に適応した方法および試薬も公知であり且つ当該分野で利用可能であり、例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号および同第 6 3 3 1 4 1 5 号に記載のものが含まれる。種々の実施形態では、抗体の重鎖および軽鎖またはそのフラグメントを、同一または異なる発現ベクターから発現させる。1つの実施形態では、両鎖を、同一細胞中に発現させ、それにより、機能的抗体またはそのフラグメントの形成が容易にする。

【0219】

特に、グリコシル化および Fc エフェクター機能が必要ない場合 (治療抗体を細胞毒性薬 (例えば、毒素) に抱合する場合など)、全長抗体、抗体フラグメント、および抗体融合タンパク質を細菌中で産生することができ、免疫複合体自体が感染細胞の破壊で有効性を示す。細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えば、発現および分泌を最適にするための翻訳開始領域 (TIR) およびシグナル配列を記載している米国特許第 5, 6 4 8, 2 3 7 号、同第 5, 7 8 9, 1 9 9 号、および同第 5, 8 4 0, 5 2 3 号を参照のこと。発現後、抗体を可溶性画分中の *E. coli* 細胞ペーストから単離し、例えば、アイソタイプに応じてプロテイン A または G カラムを使用して精製する。例えば、*CHO* 細胞中で発現した抗体の精製のために使用したプロセスに類似のプロセスを使用して最終精製を行う。

【0220】

グリコシル化したポリペプチドおよび抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞 (例えば、アオウキクサなど) および昆虫細胞が含まれる。宿主 (*Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、および *Bombyx mori* など) 由来の多数のパキウウイルス株およびバリエーションならびに対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株は公的

に利用可能であり（例えば、*Autographa californica* NPVのL-1バリエーションおよび*Bombyx mori* NPVのBm-5株）、かかるウイルスを、本発明に従って、特に*Spodoptera frugiperda*細胞のトランスフェクションのためのウイルスとして使用することができる。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養物も宿主として使用する。

【0221】

培養（組織培養）における脊椎動物細胞中での抗体ポリペプチドおよびそのフラグメントの増殖は、日常的手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は以下である：SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7, ATCC CRL 1651）；懸濁培養での増殖についてサブクローン化されたヒト胚腎臓株（293または293細胞（Graham et al, J. Gen Virol. 36:59（1977）））；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－DHFR（CHO, Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216（1980））；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251（1980））；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562, ATCC CCL51）；TR1細胞（Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68（1982））；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞癌株（Hep G2）。

【0222】

宿主細胞を、ポリペプチド産生のための上記発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増殖に適切なように改変した従来の栄養培地中で培養する。

【0223】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生のために、一般に安定な発現が好ましい。例えば、目的のポリヌクレオチドを安定に発現する細胞株を、同一または個別のベクター上にウイルス複製起点および／または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を含むことができる発現ベクターを使用して形質転換することができる。ベクターの導入後、細胞を富化培地中で1～2日間増殖させ、その後を選択培地にスイッチすることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在により、導入された配列が首尾よく発現する細胞を増殖および回収することが可能である。安定に形質転換された細胞の耐性クローンを、細胞型に適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

【0224】

多数の選択系を使用して、形質転換された細胞株を回収することができる。これらには、それぞれtk-細胞またはaprt-細胞で使用される単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（Wigler, M. ら、（1977）Cell 11:223-32）およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy, I. ら、（1990）Cell 22:817-23）遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。また、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤に対する耐性を選択基準として使用する（例えば、dhfr（メトトレキサート耐性を付与する）（Wigler, M. ら、（1980）Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70）；npt（アミノグリコシド、ネオマイシン、およびG-418への耐性を付与する）（Colbere-Garapin, F. ら、（1981）J. Mol. Biol. 150:1-14）；およびalsまたはpat（それぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランス

フェラーゼへの耐性を付与する) (M u r r y, 前出))。さらなる選択遺伝子が記載されている(例えば、t r p B (細胞にトリプトファンの代わりにインドールを利用させる) または h i s D (細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用させる) (H a r t m a n, S. C. a n d R. C. M u l l i g a n (1988) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. 85:8047-51))。視覚可能なマーカーの使用が支持されており、アントシアニン、 β -グルクロニダーゼおよびその基質GUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンなどのマーカーは、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系による一過性または安定なタンパク質発現を定量するためにも広範に使用される(R h o d e s, C. A. ら、(1995) M e t h o d s M o l. B i o l. 55:121-131)。

10

【0225】

マーカー遺伝子発現の有無によって目的の遺伝子も存在することが示唆されるにもかかわらず、その存在および発現を確認する必要がある。例えば、ポリペプチドをコードする配列をマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、配列を含む組換え細胞をマーカー遺伝子機能の非存在によって同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子を、単一のプロモーターの調節下でポリペプチドコード配列と並行して配置することができる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常、縦列遺伝子の発現も示す。

【0226】

あるいは、所望のポリヌクレオチド配列を含み、且つ発現する宿主細胞を、当業者に公知の種々の手順によって同定する。これらの手順には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリッド形成およびタンパク質バイオアッセイまたは免疫アッセイ技術(例えば、核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜、溶液、またはチップベースのテクノロジーが含まれる)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0227】

産物に特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用したポリヌクレオチドにコードされた産物の発現を検出および測定するための種々のプロトコールは当該分野で公知である。例には、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、および蛍光標示細胞分取(FACS)が含まれる。所与のポリペプチド上の2つの非干渉エピトープに反応性を示すモノクローナル抗体を使用した2部位のモノクローナルベースの免疫アッセイはいくつかの適用で好ましいかもしれないが、競合結合アッセイも使用することができる。これらおよび他のアッセイは、他の場所(Hampton, R. ら、(1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.) および Maddox, D. E. ら、(1983; J. Exp. Med. 158:1211-1216))に記載されている。

30

【0228】

種々の標識および抱合技術は当業者に公知であり、種々の核酸およびアミノ酸アッセイで使用することができる。ポリヌクレオチドに関連する配列の検出のための標識したハイブリッド形成プローブまたはPCRプローブの産生手段には、標識したヌクレオチドを使用したオリゴ標識、ニック翻訳、末端標識、またはPCR増幅が含まれる。あるいは、配列またはその任意の一部を、mRNAプローブの産生のためのベクターにクローン化することができる。かかるベクターは当該分野で公知であり、一般に利用可能であり、このベクターを使用して、適切なRNAポリメラーゼ(T7、T3、またはSP6など)および標識したヌクレオチドの付加によって*in vitro*でRNAプローブを合成することができる。これらの手順を、種々の市販のキットを使用して行うことができる。使用される適切なレポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、または発色剤、ならびに基質、補因子、インヒビター、および磁性粒子などが含まれる。

40

【0229】

組換え細胞によって産生されたポリペプチドを、使用される配列および/またはベクターに応じて、分泌させるか、細胞内に含める。当業者に理解されるように、本発明のポリ

50

ヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を介してコードされたポリペプチドの分泌を指示するシグナル配列を含むようにデザインすることができる。

【0230】

一定の実施形態では、本発明のポリペプチドを、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをさらに含む融合ポリペプチドとして産生する。かかる精製を容易にするドメインには、金属キレート化ペプチド（固定化金属上で精製が可能なヒスチジントリプトファンモジュールなど）、固定化した免疫グロブリン上で精製が可能なプロテインAドメイン、およびFLAG伸長／アフィニティ精製システム（Amgen, Seattle, WA）で使用されるドメインが含まれるが、これらに限定されない。切断可能なリンカー配列（精製ドメインとコードされたポリペプチドとの間の第XA因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA）に特異的な配列など）の含有させて精製を容易にすることができる。1つのかかる発現ベクターにより、目的のポリペプチドおよびチオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行する6個以上のヒスチジン残基をコードする核酸を含む融合タンパク質が発現される。Porth, J. ら、(1992, Prot. Exp. Purif. 3:263-281)に記載のように、ヒスチジン残基はIMAC（固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ）での精製を容易にする一方で、エンテロキナーゼ切断部位によって融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製するための手段が得られる。融合タンパク質産生に有用なベクターの考察は、Kroll, D. J. ら、(1993; DNA Cell Biol. 12:441-453)に示されている。

【0231】

一定の実施形態では、本発明のポリペプチドを、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドであり得る異種ポリペプチドに融合する。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識およびプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）配列である。原核生物宿主細胞のために、シグナル配列を、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択することができる。酵母分泌のために、シグナル配列を、例えば、酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー（SaccharomycesおよびKluyveromycesのα因子リーダーが含まれる）、酸性ホスファターゼリーダー、C. albicansグルコアミラーゼリーダー、またはWO90/13646号に記載のシグナルから選択することができる。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー（例えば、単純ヘルペスgDシグナル）を利用可能である。

【0232】

組換え技術を使用する場合、ポリペプチドまたは抗体を、細胞内に産生するか、細胞周辺腔中に産生するか、培地に直接分泌することができる。ポリペプチドまたは抗体を細胞内に産生する場合、最初の工程として、粒子状のデブリ（宿主細胞または溶解したフラグメントのいずれか）を、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去する。Carter ら、Bio/Technology 10:163-167 (1992) は、E. coli の細胞周辺腔に分泌される抗体の単離手順を記載している。簡潔に述べれば、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、およ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分間にわたって解凍する。細胞デブリを遠心分離によって除去することができる。ポリペプチドまたは抗体を培地中に分泌する場合、かかる発現系由来の上清を、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルター（例えば、AmiconまたはMilliporeのPellicon限外濾過ユニット）を使用して最初に濃縮する。プロテアーゼインヒビター（PMSFなど）を、タンパク質分解を阻害するための任意の上記工程に含めることができ、偶発性の夾雑物質の増殖を防止するために抗生物質を含めることができる。

【0233】

細胞から調製したポリペプチドまたは抗体組成物を、例えば、ヒドロキシアパタイトク

ロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティクロマトグラフィを使用して精製することができ、アフィニティクロマトグラフィ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、ポリペプチドまたは抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト γ_1 、 γ_2 、または γ_4 重鎖に基づいて抗体またはそのフラグメントを精製することができる(Lindmarkら、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およびヒト γ_3 に推奨されている(Gussら、EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和性リガンドが付着するマトリックスは、アガロースであることが最も多いが、他のマトリックスが利用可能である。機械的に安定なマトリックス(孔が調節されたガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなど)により、アガロースを使用した場合よりも流速を速め、処理時間を短くすることが可能である。ポリペプチドまたは抗体が C_H3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)は精製に有用である。他のタンパク質精製技術(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、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)でのヘパリンSEPHAROSE(商標)クロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿など)も、回収すべきポリペプチドまたは抗体に応じて利用可能である。

10

【0234】

20

任意の予備精製工程後、目的のポリペプチドまたは抗体および夾雑物を含む混合物を、約pH2.5~4.5の溶離緩衝液を使用し、好ましくは低塩濃度(例えば、塩濃度約0~0.25M)で行う低pH疎水性相互作用クロマトグラフィに供することができる。

【0235】

薬学的組成物

本発明は、所望の純度の本発明のポリペプチド、抗体、またはモジュレーター、および薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤を含む薬学的組成物をさらに含む(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。一定の実施形態では、保存中のポリペプチドまたは抗体の安定性が強化されるように、例えば、凍結乾燥処方物または水溶液の形態で薬学的組成物を調製する。

30

【0236】

許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに無毒であり、例えば、緩衝液(酢酸、Tris、リン酸、クエン酸、および他の有機酸の緩衝液など)；抗酸化剤(アスコルビン酸およびメチオニンが含まれる)；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン(メチルまたはプロピルパラベンなど)；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；およびm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質(血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど)；親水性ポリマー(ポリビニルピロリドンなど)；アミノ酸(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、またはリジンなど)；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物(グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる)；キレート剤(EDTAなど)；等張化剤(トレハロースおよび塩化ナトリウムなど)；糖(スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど)；界面活性剤(ポリソルベートなど)；自己形成対イオン(ナトリウムなど)；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；および/または非イオン性界面活性剤(TWEEN(商標)、PLURONICS(商標)、またはポリエチレングリコール(PEG)など)が含まれる。一定の実施形態では、治療処方物は、好ましくは、5~200mg/ml、好ましくは10~100mg/mlの濃度でポリペプチドまたは抗体を

40

50

含む。

【0237】

本明細書中の処方物はまた、特定の適応症（例えば、治療すべき感染症）の治療または望ましくない副作用の防止に適切な1つまたは複数のさらなる治療薬を含むことができる。好ましくは、さらなる治療薬は、本発明のポリペプチドまたは抗体に相補的な活性を有し、この2つは相互に有害に作用しない。例えば、本発明のポリペプチドまたは抗体に加えて、1つの処方物中に、例えば、さらなる抗体、抗ウイルス剤、抗感染剤、および／または心臓保護薬を含むことが望ましいかもしれない。かかる分子は、薬学的処方物中に意図する目的に有効な量で適切に存在する。

【0238】

有効成分（例えば、本発明のポリペプチドおよび抗体ならびに他の治療薬）を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって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またはゼラチン-マイクロカプセルおよびメチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中に捕捉することもできる。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, O S O L, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0239】

徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の適切な例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは成型品（例えば、フィルム、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）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセタート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフィア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（hydroxybutyric acid）など）が含まれる。

【0240】

i n v i v o 投与のために使用すべき処方物は無菌であることが好ましい。滅菌濾過膜による濾過によってこれを容易に行う。

【0241】

診断での使用

本発明の抗体およびそのフラグメントは、正常なコントロール細胞および組織と比較してCMV感染細胞または組織に特異的に結合するか、優先的に結合する。したがって、本発明の抗体を使用して、種々の診断方法および予後診断法（本明細書中に記載のものが含まれる）のいずれかを使用して、患者、生物サンプル、または細胞集団中の感染細胞または組織を検出することができる。抗CMV抗体が感染細胞を検出する能力は、勿論、その結合特異性に依存するであろう。この結合特異性を、異なる患者および／または異なるCMV株に感染した患者から得た感染細胞または組織に結合する能力を試験することによって容易に決定することができる。

【0242】

診断方法は、一般に、患者から得た生物サンプル（例えば、血液、血清、唾液、尿、痰、細胞スワブサンプル、または組織生検など）をCMV特異的抗体と接触させる工程およびコントロールサンプルまたは所定のカットオフ値と比較して抗体がサンプルに優先的に結合するかどうかを決定し、それにより、感染細胞の存在が示される工程を含む。特定の実施形態では、少なくとも2倍、3倍、または5倍以上のCMV特異的抗体が、適切なコントロール正常細胞または組織サンプルと比較して感染細胞に結合する。所定のカットオフ値を、例えば、試験される生物サンプルの診断アッセイを行うために使用した条件と同

一の条件下でいくつかの異なる適切なコントロールサンプルに結合するCMV特異的抗体量を平均することによって決定することができる。

【0243】

結合した抗体を、本明細書中に記載され、当該分野で公知の手順を使用して検出することができる。一定の実施形態では、本発明の診断方法を、結合した抗体の検出を容易にするための検出可能な標識（例えば、フルオロフォア）に抱合したCMV特異的抗体を使用して実施する。しかし、本発明の診断方法を、CMV特異的抗体の二次検出方法を使用して実施することもできる。これらには、例えば、RIA、ELISA、沈殿、凝集、補体結合、および免疫蛍光が含まれる。

【0244】

一定の手順では、CMV特異的抗体を標識する。標識を、直接検出することができるか（放射性標識および蛍光色素など）、検出されるように反応するか誘導体化されるべき部分（酵素など）であり得る。同位体標識の例は、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、および ^{35}S である。使用することができる蛍光物質には、例えば、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、オーラミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリア、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リゾチーム、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが含まれる。

【0245】

酵素標識を、現在使用されている比色分析技術、分光測定技術、蛍光分光測定技術、またはガス定量技術のいずれかによって検出することができる。これらの手順で使用する事ができる多数の酵素は公知であり、これらを使用することができる。例は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼ、および酸性ホスファターゼである。

【0246】

公知の方法によって抗体をかかると標識でタグ化することができる。例えば、カップリング剤（アルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、イミダート、スクシンイミド、およびbidジアゾ化ベンザジンなど）を使用して、上記蛍光標識、化学発光標識、および酵素標識で抗体をタグ化することができる。酵素を、典型的には、カルボジイミド、過ヨウ素酸塩、ジイソシアナート、およびグルタルアルデヒドなどの架橋分子を使用して抗体と組み合わせる。種々の標識技術は、Morrison, Methods in Enzymology 32b, 103 (1974), Syvanenら、J. Biol. Chem. 284, 3762 (1973) およびBolton and Hunter, Biochem J. 133, 529 (1973)に記載されている。

【0247】

本発明のCMV特異的抗体は、本明細書中に提供した代表的なアッセイを使用して、CMV感染患者と非感染患者とを区別し、患者が感染しているかどうかを決定することができる。1つの方法に従って、CMV感染を有する疑いがあるか、有することが知られている患者から生物サンプルを得る。好ましい実施形態では、生物サンプルには、患者由来の細胞が含まれる。サンプルを、例えば、CMV特異的抗体をサンプル中に存在する感染細胞に結合させるのに十分な時間および条件下でCMV特異的抗体と接触させる。CMV特異的抗体の結合量を決定し、コントロール値と比較する。このコントロール値は、例えば、所定の値または正常な組織サンプルから決定された値であり得る。コントロールサンプルと比較した患者サンプルへの抗体の結合量の増加は、患者サンプル中の感染細胞の存在を示す。

【0248】

関連する方法では、患者から得た生物サンプルを、抗体を感染細胞に結合させるのに十分な時間および条件下でCMV特異的抗体と接触させる。次いで、結合した抗体を検出し、結合抗体の存在は、サンプルが感染細胞を含むことを示す。この実施形態は、CMV特

10

20

30

40

50

異的抗体が検出可能なレベルで正常細胞に結合しない場合に特に有用である。

【0249】

一定の実施形態では、感染細胞に結合する抗体は、好ましくは、少なくとも約20%の感染患者、より好ましくは少なくとも約30%の患者で感染の存在が検出されることを示すシグナルを生成するであろう。あるいはまたはさらに、抗体は、少なくとも約90%の非感染個体で感染の非存在が検出されることを示す負のシグナルを生成するであろう。各抗体は上記基準を満たすべきである。しかし、当業者は、本発明の抗体を組み合わせを使用して感度を改良することができると認識するであろう。

【0250】

本発明はまた、本発明の抗体を使用した診断アッセイおよび予後診断アッセイの実施で有用なキットを含む。これらのキットは、標識形態または非標識形態の1つまたは複数の本発明のCMV特異的抗体を含む適切な容器を含むであろう。さらに、抗体を間接的な結合アッセイに適切な標識形態で供給する場合、キットは、さらに、適切な間接的アッセイの実施に有用な試薬を含むことができる。例えば、キットは、標識の性質に応じて、酵素基質または誘導体化剤を含む1つまたは複数の適切な容器を含むことができる。コントロールサンプルおよび／または説明書も含めることができる。

10

【0251】

治療での使用

本発明のCMV特異的抗体およびそのフラグメントは、正常なコントロール非感染細胞および組織と比較して、感染細胞に特異的に結合するか、優先的に結合する。したがって、これらのCMV特異的抗体を使用して、患者中の感染細胞または組織、生物サンプル、または細胞集団を選択的にターゲティングすることができる。これらの抗体の感染特異的結合性を考慮して、本発明は、感染細胞の増殖を調節（例えば、阻害）する方法、感染細胞を死滅させる方法、および感染細胞のアポトーシスを誘導する方法を提供する。これらの方法は全て、感染細胞を本発明のCMV特異的抗体に接触させる工程を含む。これらの方法を*in vitro*、*ex vivo*、および*in vivo*で実施することができる。

20

【0252】

本発明の薬学的組成物を、標的の患者集団（非常に高齢および若い免疫無防備状態の対象（例えば、HIV/AIDS、別の免疫抑制疾患、または免疫系が不十分になるか、もしくは損なわれる遺伝的障害の対象）、移植レシピエント（全臓器、組織、特に、造血幹細胞集団または骨髄の移植または置換を受けた患者が含まれる）、免疫抑制療法を受けた対象（例えば、関節炎、移植片拒絶、および癌などの容態のために薬物投与された対象）、およびCMVへの曝露またはCMV感染のリスクのあるCMV陰性の妊婦（CMVはこれらの対象を通過して胎児に到達し、全出生児のほぼ1%で聴覚消失および認知障害を引き起こす）が含まれるが、これらに限定されない）に投与する。

30

【0253】

種々の実施形態では、抗体はそれ自体が本質的に治療活性を示し、および／または抗体を、抗体が結合した感染細胞の治療で有用な細胞毒性薬または増殖阻害剤（例えば、放射性同位体または毒素）に抱合する。

40

【0254】

1つの実施形態では、本発明は、CMV感染症と判断された患者、発症リスクのある患者、または有する疑いのある患者に本発明のCMV特異的抗体を投与する工程を含む、患者の感染症を治療または防止する方法を提供する。本発明の方法を、感染の一次治療、その後の治療、または再発性もしくは軟治性の感染の治療で使用するすることができる。本発明の抗体を使用した治療は単独治療であり得るか、患者を治療するために1つまたは複数のさらなる治療薬も使用される併用療法レジメンの1つの構成要素または段階であり得る。

【0255】

ヒトまたは非ヒト患者の*in vivo*治療のために、患者に、通常、本発明のCMV特異的抗体を含む薬学的処方物を投与する。*in vivo*療法のために使用する場合、

50

本発明の抗体を、治療有効量（すなわち、患者のウイルス負荷を消失または減少させる量）で患者に投与する。静脈内投与（例えば、長期間にわたるボラス注入または連続注入として）、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路などの公知の方法に従ってヒト患者に抗体を投与する。抗体を、可能であれば標的細胞部位に非経口投与するか静脈内投与することができる。抗体の静脈内または皮下投与が一定の実施形態で好ましい。

【0256】

非経口投与のために、抗体を、薬学的に許容可能な非経口ビヒクルと組み合わせた単位投薬注射形態（溶液、懸濁液、乳濁液）で処方することができる。かかるビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。非水性ビヒクル（固定油およびオレイン酸エチルなど）も使用することができる。キャリアとしてリポソームを使用することができる。ビヒクルは、等張性および化学的安定性を強化する物質などの少量の添加物（例えば、緩衝液および防腐剤）を含むことができる。抗体を、典型的には、かかるビヒクル中で約1mg/ml～10mg/mlの濃度で処方するであろう。

10

【0257】

用量および投薬レジメンは、医師によって容易に決定される種々の要因（感染性および抗体に抱合した特定の細胞毒性薬または増殖阻害剤（使用する場合）の特性（例えば、その治療指数）、患者、および患者の病歴など）に依存するであろう。一般に、治療有効量の抗体を患者に投与する。特定の実施形態では、抗体の投与量は、典型的には、約0.1～約50mg/kg患者体重の範囲であろう。感染の型および重症度に応じて、約0.1mg/kg～約50mg/kg体重（例えば、約0.1～15mg/kg用量）の抗体は、例えば、1つまたは複数の個別投与または連続注入のいずれかによる患者への投与のための最初の候補投薬量であり得る。この療法の進行を、従来の方法およびアッセイならびに医師または他の当業者に公知の基準に基づいて容易にモニタリングすることができる。

20

【0258】

1つの特定の実施形態では、細胞毒性薬と抱合した抗体を含む免疫抱合体を患者に投与する。好ましくは、免疫抱合体が細胞に内在化され、それにより、免疫抱合体が結合する細胞の死滅における免疫抱合体の治療有効性が増加する。1つの実施形態では、細胞毒性薬は、感染細胞中の核酸をターゲティングするか干渉する。かかる細胞毒性薬の例は、上に記載されており、マイタンシノイド、カリチアマイシン、リボヌクレアーゼ、およびDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

30

【0259】

他の治療レジメンを、本発明のCMV特異的抗体の投与と組み合わせることができる。併用投与には、個別の処方物または単一の薬学的処方物を使用した同時投与およびいずれかの順序の連続投与が含まれ、好ましくは、両方（または全て）の活性薬剤がその生物学的活性を同時に発揮する期間が存在する。好ましくは、かかる併用療法により、相乗的な治療効果が得られる。

【0260】

一定の実施形態では、本発明の抗体の投与を感染因子に関連する別の抗原に指向する別の抗体と組み合わせることが望ましい。

40

【0261】

患者への抗体タンパク質の投与を除いて、本出願は、遺伝子療法による抗体の投与を意図する。抗体をコードする核酸のかかる投与は、表現「治療有効量の抗体の投与」に含まれる。例えば、細胞内抗体を生成するための遺伝子療法の使用に関するPCT特許出願公開WO96/07321号を参照のこと。

【0262】

本明細書中で言及し、そして／または出願データシートに列挙した上記の全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物は

50

、その全体が本明細書中で参考として援用される。

【実施例】

【0263】

(実施例1)

抗CMV抗体の産生

CMVに特異的なヒトモノクローナル抗体を、下記のように組換え的に産生した。

【0264】

89のヒト血漿サンプルを、アミノ酸配列SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK(配列番号31)を有するCMV gp116エピトープAD2部位に対応するポリペプチドを使用し、ELISAによってCMV抗体の存在についてスクリーニングした。試験した2つの血漿サンプルが陽性であり、これは、抗CMV gp116抗体の存在を示す。

10

【0265】

PBMCを、CMV gp116エピトープAD2に対して高IgG力価を有するドナー血液サンプルから得た。CD19+細胞を富化し、ビオチン化形態のCMV gp116AD2ペプチドと混合し、抗原特異的B細胞をstreptavidinコーティングしたマイクロビーズを使用して富化した。これらの抗原選択性B細胞を、1細胞/ウェルを超える密度でマイクロタイター皿にプレートし、B細胞の増殖および活性化を好む条件下(例えば、B細胞分裂促進因子(リポ多糖(LPS)またはCD40リガンドなどの存在下)で培養して、抗体産生B細胞を生成した。次いで、B細胞から得た細胞上清を、CMV gp116エピトープAD2に結合する抗体の存在について試験し、それにより、抗原特異的抗体を産生するB細胞を含む11ウェルを同定した。

20

【0266】

抗原特異的抗体の抗原結合領域を含む組換え抗体を、pcDNA3.1+発現ベクターへの抗体鎖の可変領域をコードするDNAのサブクローニングによって産生した。一過性トランスフェクションを293FT細胞中で行い、これらの抗体を再構成し、組換えによって産生した。次いで、組換え的に産生した抗体を、CMV gp116エピトープAD2に結合する能力について試験し、この抗原に結合した7つの組換えIgGを同定した。その後、2つのさらなる抗CMV抗体をこれらの同一の方法に従って生成した。抗体の結合親和性を、表1に示すように決定した。

30

【0267】

【表 1】

表1. K_D および k_{off} によって分類した抗CMV抗体の結合親和性

K _D による分類			
CMV抗体	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹) × 10 ⁵	k_d (s ⁻¹)	K _D (k_{off}/k_{on}), nM
mAb G—ITC88	7.67(6)	0.00116(3)	1.51 (5)
mAb A—2F10	5.62(7)	0.001112(7)	1.98 (2)
mAb E—5P9	2.45(2)	0.00121(3)	4.9 (1)
mAb F—9C16	5.83(9)	0.00286(8)	4.9 (2)
mAb B—2M16	27(1)	0.023(1)	8.47 (5)
mAb D—4P12	1.75(1)	0.00190(3)	10.9 (2)
mAb C—2N9	26(1)	0.030(2)	11.59 (7)
k _{off} による分類			
CMV抗体	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹) × 10 ⁵	k_d (s ⁻¹)	K _D (k_{off}/k_{on}), nM
mAb A—2F10	5.62(7)	0.001112(7)	1.98(2)
mAb G—ITC88	7.67(6)	0.00116(3)	1.51(5)
mAb E—5P9	2.45(2)	0.00121(3)	4.9(1)
mAb D—4P12	1.75(1)	0.00190(3)	10.9(2)
mAb F—9C16	5.83(9)	0.00286(8)	4.9(2)
mAb B—2M16	27(1)	0.023(1)	8.47(5)
mAb C—2N9	26(1)	0.030(2)	11.59(7)
括弧内の数字は、最後に報告した数字の標準誤差を示す。			

抗体の配列（2 F 1 0、2 M 1 6、2 N 9、3 C 2 1、4 P 1 2、5 P 9、9 C 1 6と指定した抗体のγ重鎖およびκ軽鎖の可変領域の配列が含まれる）を決定した。さらに、抗体配列をコードする各ポリヌクレオチド配列を決定した。可変領域のN末端（または5'末端）に太字で示したシグナルペプチドおよびC末端（または3'末端）に太字で示した定常領域と共にγ重鎖およびκ軽鎖のポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列を以下に示す（プレーンテキストで示す）。

【0 2 6 8】

10

20

30

【化 1】

2F10 γ :

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTAC
ATCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CACTGGATTACATTTAGTAATCACGGCATAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGCTGGCAGTTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGTC
GATT CAGCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCGTGCATCTGCAGATGAATGGCCTGAGACC
TGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGCGAGATGGGAGGTGTGGTGAACCTAAGTGCTACTCA
GGGTTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA

10

【 0 2 6 9 】

【化 2】

CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTG
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号1)

10

2F10 γ 可変領域:

CAGGTACATCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCACTGGATTACATTTAGTAATCACGGCATACATTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGCTGGCAGTTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTG
AAGGGTCGATTACGCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCGTGATCTGCAGATGAATGGCC
TGAGACCTGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGGAGATGGGAGGTGTGGTGAACCTAAGTG
CTACTCAGGGTTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (配列番号34)

20

2F10 γ :

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAATGFTFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWLAVISSDGGDDRYADSVKGRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTAIFYCARDGRCGEPKCYS
GLPDYWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号2)

30

40

【0 2 7 0】

【化 3】

2F10 γ 可変領域: (KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

QVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAAT***GFTFS***SNHGIHWVRQAPGKGLEWLA***VISSDGDDDDRYADSV***
KGRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTAIYFCAR***DGRCGEPKCYSGLPDY***WGRGTLVTVS

(配列番号35)

2F10 γ 重鎖Kabat CDR:

CDR 1: SNHGIH (配列番号36)

CDR 2: VISSDGDDDDRYADSVKG (配列番号37)

CDR 3: DGRCGEPKCYSGLPDY (配列番号38)

10

2F10 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: GFTFSN (配列番号39)

CDR 2: VISSDGDDDR (配列番号40)

CDR 3: DGRCGEPKCYSGLPDY (配列番号38)

20

2F10 κ :

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGCTACCACCGGAGAGA
 TTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCCTG
 CAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGCTCCC
 AGGCTCCTCCTCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTG
 GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACCTTTATTA
 CTGTCTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
 GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
 T (配列番号3)

30

40

2F10 κ 可変領域:

【 0 2 7 1 】

【化 4】

GAGATTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCCTCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACCTT
ATTACTGTCTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTCGGGGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGTACG (配列番号41)

10

2F10 κ :

MEAPAQLLFLLLLLWLPATTGEIVLTQSPATLSLSPGDRATLSCRASQSVGGYLA $WYQKPGQAP$
RLLLYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSELEPEDFALYYCLQRNTWPPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC $LLNNFY$ PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号4)

2F10 κ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EIVLTQSPATLSLSPGDRATLSCRASQSVGGYLA $WYQKPGQAP$ RLLLYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSELEPEDFALYYCLLQRNTWPPLTTFGGGTKVEIKRT (配列番号42)

20

2F10 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: DASNRAT (配列番号44)

CDR 3: LQRNTWPPLT (配列番号45)

30

2F10 κ 軽鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: DASNRAT (配列番号44)

CDR 3: LQRNTWPPLT (配列番号45)

2M16 γ :

ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGCCAGGTGC
AGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGC
CTCTGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC

40

【 0 2 7 2 】

【化 5】

GATTCACTATCTCCAGAGACAATTTCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
TGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGATGGGAGGTGTCCTGATGTTAACTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号5)

10

20

2M16 γ 可変領域:

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTTACGCCTCTGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATTTCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGATGGGAGGTGTCCTGATGTTAACTG
CTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (配列番号46)

30

2M16 γ :

MELGLCWVFLVALLRGVQCQVQLVDSGGGMVQPGRSLRLSCSASGLTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVISSDGSNEHYADSVKGRFTISRDNFNNMLYLQMNSLR AEDTAVYYSARDGRCPDVNCYS

40

【 0 2 7 3 】

【化 6】

GLIDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号6)

10

2M16 γ 可変領域 (KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

QVQLVDSGGGMVQPGRSLRLSCSAS GLTFS**SNYGMHWVRQAPGKLEWVA****VISSDGSNEHYADSV**
KGRFTISRDNFNNMLYLQMNSLRAE~~DTAVYY~~SAR**DGRCPDVNCYSGLIDY**WGQGTLLVTVS
(配列番号47)

2M16 γ 重鎖Kabat CDR:

CDR 1: SNYGMH (配列番号48)

CDR 2: VISSDGSNEHYADSVKG (配列番号49)

CDR 3: DGRCPDVNCYSGLIDY (配列番号50)

20

2M16 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: GLTFSN (配列番号118)

CDR 2: VISSDGSNEH (配列番号51)

CDR 3: DGRCPDVNCYSGLIDY (配列番号50)

30

2M16 κ :

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA
TTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGTCCAAGGTGGAGATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGT
【 0 2 7 4 】

40

【化 7】

GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
 T (配列番号7)

2M16 κ 可変領域:

GAAATTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGC
 TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGC
 AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
 ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGTCCAAGGTGGAGAT
 CAAACGTACG (配列番号94)

10

2M16 κ

MEAPAQLLFLLLLWLPTDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQKGGQAP
 RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIDSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGSKVEIK
 RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号8)

20

2M16 κ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQKGGQAPRLLIY**DASNRAT**GIPARFSG
 SGSGTDFTLTIDSLEPEDFAVYYC**QQRSNWPPLT**TFGGGSKVEIKRT (配列番号52)

30

2M16 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGRYLA (配列番号53)

CDR 2: DASNRAT (配列番号44)

CDR 3: QQRSNWPPLT (配列番号54)

2M16 κ 軽鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGRYLA (配列番号53)

CDR 2: DASNRAT (配列番号44)

CDR 3: QQRSNWPPLT (配列番号54)

40

【0 2 7 5】

【化 8】

2N9 γ :

ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGATTACCTTCAGTAGTAATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GACTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGCAAATGATAACAATACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGT
TGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGATGGGACGTGCAGTGGTGGTAACTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号9)

10

20

30

2N9 γ 可変領域:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTAATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGACTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGCAAATGATAACAATACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGAGAGTTGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGATGGGACGTGCAGTGGTGGTAACTG

40

【 0 2 7 6 】

【化 9】

CTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTCG (配列番号55)

2N9 γ

MELGLRWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL
DWVAVISSDANDKQYADSVKGRFTISRDN SKNMVYLQMNSLRVEDTAVYFCARDGTCSSGNCYS
GLIDYWGRGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号10)

10

2N9 γ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSS**NGIHWVRQAPGKGLDWVA**VISSDANDKQYADSV**
KGRFTISRDN SKNMVYLQMNSLRVEDTAVYFCARDGTCSSGNCYSGLIDYWGRGILVT VS
(配列番号56)

20

2N9 γ 重鎖Kabat CDR:

CDR 1: SSNGIH (配列番号57)

CDR 2: VISSDANDKQYADSVKG (配列番号58)

CDR 3: DGTCSGGNCYSGLIDY (配列番号59)

30

2N9 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: GFTFSS (配列番号60)

CDR 2: VISSDANDKQ (配列番号61)

CDR 3: DGTCSGGNCYSGLIDY (配列番号59)

2N9 κ :

ATGGACATGAGGGTCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCG
GAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAG

40

【 0 2 7 7 】

【化 1 0】

GCTCCCAGGCTCCTCATCTACGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTG
 GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
 TTATTACTGTCACCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAT
 ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 CTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTG
 GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
 TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
 AGAGTGT (配列番号11)

10

2N9 κ 可変領域:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
 TCCCAGGCTCCTCATCTACGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC
 AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
 ATTACTGTCACCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATAT
 CAAACGTACG (配列番号62)

20

2N9 κ :

MRVPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAQYQQKPGQAP
 RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCHQRSNWPPLTFGGGTKVDIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号12)

30

2N9 κ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAQYQQKPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSG
 SGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCHQRSNWPPLTFGGGTKVDIKRT (配列番号63)

2N9 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: ASIRAT (配列番号64)

CDR 3: HQRSNWPPLT (配列番号65)

40

【 0 2 7 8 】

【化 1 1】

2N9 κ 輕鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: ASIRAT (配列番号64)

CDR 3: HQRSNWPPLT (配列番号65)

4P12 γ :

ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTC
CTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTTAGCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACC
TGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAACCTGCTACTCC
GGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号13)

4P12 γ 可変領域:

【 0 2 7 9 】

10

20

30

40

【化 1 2】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGTTGCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTG
AGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCC
TGCGACCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAAC TG
CTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (配列番号66)

10

4P12 γ :

MELGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWVAVISKDGTNAHYADSVRGRFSISRDN SKDTV FLEMRLRPEDTAVYYCAREGR CIEENCY S
GQIDYWGQGS LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号14)

20

4P12 γ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

QVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVAS***KFIFSNHGIHWVRQAPGKGLEWVA***VISKDGTNAHYADSV
RGFRFSISRDN SKDTV FLEMRLRPEDTAVYYCAR***EGRCIEENCYSGQIDYWGQGS***LTVS
(配列番号67)

30

4P12 γ 重鎖Kabat CDR:

CDR 1: SNHGIH (配列番号36)

CDR 2: VISKDGTNAHYADSVRG (配列番号68)

CDR 3: EGRCIEENCYSGQIDY (配列番号69)

4P12 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: KFIFSN (配列番号70)

CDR 2: VISKDGTNAH (配列番号71)

CDR 3: EGRCIEENCYSGQIDY (配列番号69)

40

【 0 2 8 0】

【化 1 3】

4P12 κ :

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA
 TTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
 CAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
 AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTG
 GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTA
 CTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
 GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
 T (配列番号15)

10

4P12 κ 可変領域:

20

GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGC
 TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGC
 AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTT
 ATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT
 CAAACGTACG (配列番号72)

30

4P12 κ :

MEAPAQLLFLLLLWL P DTTGEILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYMAWYQQRPGQAP
 RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号16)

4P12 κ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EILLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVGRY**MAWYQQRPGQAPRLLIY**DASIRAT**GIPARFSG
 SGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYC**QQRSSWPPLT**FGGGTKVEIKRT (配列番号73)

40

【0 2 8 1】

【化 1 4】

4P12 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGRYMA (配列番号74)

CDR 2: DASIRAT (配列番号75)

CDR 3: QQRSSWPPLT (配列番号76)

4P12 κ 軽鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGRYMA (配列番号74)

CDR 2: DASIRAT (配列番号75)

CDR 3: QQRSSWPPLT (配列番号76)

10

5P9 γ :

ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTGAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTGC
CTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACC
TGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAAGTGCTACTCC
GGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC

20

30

40

【 0 2 8 2 】

【化 1 5】

CGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号17)

5P9 γ 可変領域:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGTTGCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTG
AGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCC
TGCGACCTGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAAGTG
CTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (配列番号77)

10

5P9 γ :

MELGLRWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWVAVISKDGTNAHYADSVRGRFSISRDNKDTVFLEMRSLRPEDTAVYYCAREGRCIEEKCY
SQIDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
S
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号18)

20

30

5P9 γ 可変領域 (KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

QVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASK***FIFSNHGIHWVRQAPGKGLEWVA****VISKDGTNAHYADSV*
RGRFSISRDNKDTVFLEMRSLRPEDTAVYYCAR***EGRCIEEKCYSGQIDYWGQGSLVTVS***
(配列番号78)

40

5P9 γ 重鎖Kabat CDR:

【0 2 8 3】

【化 1 6】

CDR 1: SNHGIH (配列番号36)

CDR 2: VISKDGTNAHYADSVRGR (配列番号79)

CDR 3: EGRClEEKCYSGQIDY (配列番号80)

5P9 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: KFIFSN (配列番号70)

CDR 2: VISKDGTNAH (配列番号71)

CDR 3: EGRClEEKCYSGQIDY (配列番号80)

10

5P9 κ :

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAA
TTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGCAATTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (配列番号19)

20

30

5P9 κ 可変領域:

GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGCAATTT
ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT
CAAACGTACG (配列番号81)

40

5P9 κ

【 0 2 8 4】

【化 1 7】

MEAPAQLLFLLLLWLPTTGEILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYMAWYQQRPGQAP
RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQTEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号20)

5P9 κ 可変領域 (KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYMAWYQQRPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLQTEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGKVEIKRT (配列番号82)

10

5P9 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGRYMA (配列番号74)

CDR 2: DASIRAT (配列番号75)

CDR 3: QQRSSWPPLT (配列番号76)

20

5P9 κ 軽鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGRYMA (配列番号74)

CDR 2: DASIRAT (配列番号75)

CDR 3: QQRSSWPPLT (配列番号76)

9C16 γ :

ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGC
AGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCAGTCATCTCAAAGGATGGAACAAACACACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGC
TGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGATGGGAAGTGTCTGATCTTAAGTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC

30

40

【0 2 8 5】

【化 1 8】

CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (配列番号21)

10

9C16 γ 可変領域:

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATCTCAAAGGATGGAACACACACTATGCAGACTCCGTG
AGGGGCCCATTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCC
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGATGGGAAGTGTCTTGATCTTAAGTG
CTACTCAGGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (配列番号83)

20

9C16 γ :

MELGLCWVFLVALLRGVQCQVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAASGLTFSDYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVISKDGTNTHYADSVRGRFTISRDNKNI FYLQMNGLRAEDTAVVYSGRDGKCPDLKCYS
GLIDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号22)

30

40

9C16 γ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

【 0 2 8 6 】

【化 1 9】

QVQLVDSGGGVVQPGRLRLSCAAS GLTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISKDGTNTHYADSV
RGRFTISRDNSKNIFYLQMNGLRAEDTAVYYSGR DGKCPDLKCYSGLIDYWGQGTLVTVS
(配列番号84)

9C16 γ 重鎖Kabat CDR:

CDR 1: SDYGMH (配列番号85)

CDR 2: VISKDGTNTHYADSVRG (配列番号86)

CDR 3: DGKCPDLKCYSGLIDY (配列番号87)

10

9C16 γ 重鎖Chothia CDR:

CDR 1: GLTFSD (配列番号88)

CDR 2: VISKDGTNTH (配列番号89)

CDR 3: DGKCPDLKCYSGLIDY (配列番号87)

20

9C16 κ :

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA
TTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTA
CTGTCAACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (配列番号23)

30

9C16 κ 可変領域:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGC
【 0 2 8 7 】

40

【化 2 0】

AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATTT
ATTACTGTACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATAT
CAAACGTACG (配列番号90)

9C16 κ :

MEAPAQLLFLLLLWL~~PD~~TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLA~~WYQ~~KPGQAP
RLLIYDASKRATGIPARFSGSGSDFTLTISTLEPEDFAIYYCHQRSSWPPLTFGGGTKVDIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC~~LLN~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号24)

10

9C16 κ 可変領域(KabatのCDRは下線、ChothiaのCDRは太字の斜体):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC*RASQSVGGYLA*WYQKPGQAPRLLIY*DASKRAT*GIPARFSG
SGSGTDFTLTISTLEPEDFAIYYC*HQRSSWPPLT*TFGGGTKVDIKRT (配列番号91)

9C16 κ 軽鎖Kabat CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: DASKRAT (配列番号92)

CDR 3: HQRSSWPPLT (配列番号93)

20

9C16 κ 軽鎖Chothia CDR:

CDR 1: RASQSVGGYLA (配列番号43)

CDR 2: DASKRAT (配列番号92)

CDR 3: HQRSSWPPLT (配列番号93)

30

【 0 2 8 8 】

【表 2】

表2: 抗CMV抗体およびコンセンサス配列由来のCDR配列(重鎖について Kabat法およびChothia法を使用して同定し、軽鎖についてはそのCDRが同一である)。

	CDRH1 (Kabat)	配列番号	CDRH2 (Kabat)	配列番号	CDRH3 (Kabat)	配列番号
2F10	SNHGIH	36	VISSDGDGDDRYADSVKG	37	DGRCGEPKCYSGLPDY	38
2M16	SNYGMH	48	VISSDGSNEHYADSVKG	49	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	SSNGIH	57	VISSDANDKQYADSVKG	58	DGTCSSGGNCYSGGLIDY	59
4P12	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYADSVRG	68	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5P9	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYADSVRGR	79	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	SDYGMH	85	VISKDGTNTHYADSVRG	86	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
コンセンサス A	SXXGXH	95	VISXDXXXXXYADSVRG	96	XCXCXXXCYSGXXDY	97
コンセンサス B	SXXGIH	98	VISXDGNXHYADSVXG	99	DGXCSXXXCYSGGLXDY	100
コンセンサス C	SXYGMH	101			EGRCIEECCYSGQIDY	102
コンセンサス D					DGXCPDXCCYSGGLIDY	103
	CDRH1 (Chothia)		CDRH2 (Chothia)		CDRH3 (Chothia)	
2F10	GFTFSN	39	VISSDGDGDDR	40	DGRCGEPKCYSGLPDY	38
2M16	GLTFSN	118	VISSDGSNEH	51	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	GFTFSS	60	VISSDANDKQ	61	DGTCSSGGNCYSGGLIDY	59
4P12	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5P9	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	GLTFSD	88	VISKDGTNTH	89	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
コンセンサス A	XXXFSX	104	VISXDXXXXX	105	XGXCXXXCYSGXXDY	106
コンセンサス B	GXTFSX	107	VISKDGTNXH	108	DGXCSXXXCYSGGLXDY	109
コンセンサス C					EGRCIEECCYSGQIDY	110
	CDRL1		CDRL2		CDRL3	
2F10	RASQSVGGYLA	43	DASNRRAT	44	LQRNTWPPLT	45
2M16	RASQSVGRYLA	53	DASNRRAT	44	QQRSNWPPLT	54
2N9	RASQSVGGYLA	43	ASIRAT	64	HQRSNWPPLT	65
4P12	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
5P9	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
9C16	RASQSVGGYLA	43	DASKRAT	92	HQRSSWPPLT	93
コンセンサス A	RASQSVGYXA	111	XASKRAT	112	XQRXXWPPLT	113
コンセンサス B	RASQSVGYLA	114	DASXRAT	115	HQRSSWPPLT	116
コンセンサス C					QQRSSWPPLT	117

(実施例 2)

保存された抗体可変領域の同定

図 1 A および 1 B に示すように、実施例 1 に記載のように産生した 7 つの抗体の κ 軽鎖および γ 重鎖可変領域のアミノ酸配列をアラインメントし、保存された領域および残基を同定した。

【0289】

生成された抗 CMV 抗体の可変領域は高度に保存されていた。例えば、3 C 2 1 および 4 P 1 2 と指定した抗体は、重鎖可変領域が同一であり、 κ 軽鎖中でたった 1 つのアミノ酸が相違し、4 P 1 2 配列が生殖系列に適合するので、その相違は PCR の アーティファクト と考えられる。5 P 9 γ 鎖は 3 G 7 γ 鎖と同一であり、3 C 2 1 および 4 P 1 2 の γ 鎖由来の C D 3 内に 1 つのアミノ酸相違を有していた。5 P 9 κ 鎖は、5 A 1 1、3 C 2 1、および 4 P 1 2 の κ 鎖と密接に適合した (1 アミノ酸相違) (後者の 2 つの鎖は、D / E スイッチを除いて相互に同一である)。9 C 1 6 γ 鎖は 2 M 1 6 γ 鎖に最も類似し、9 C 1 6 κ 鎖は 2 N 9 κ 鎖に最も類似した (たった 2 つのアミノ酸の相違)。3 G 7 κ 鎖は他 (5 P 9 が含まれる) と非常に異なり、観察された結合が重鎖に起因することが示唆された。

【0290】

これらのデータは、CMV gp116 エピトープ AD2 に特異的に結合する抗体の高度に保存された性質を証明しており、かかる特異性に重要な抗体領域が同定される。

【0291】

(実施例 3)

CMV への組換え抗体の結合

組換え抗体 2 F 1 0、2 M 1 6、2 N 9、3 C 2 1、3 G 7、4 P 1 2、および 5 J 1 2 を、2 9 3 P E A K 細胞における大量一過性トランスフェクションによって m g 単位で産生し、E L I S A によってプレート上にコーティングした U V 不活化 C M V ウイルスに結合する能力について試験した。抗体の結合能力を、競合 C M V g p 1 1 6 エピトープ A D 2 ペプチドの非存在下および存在下で試験し、C M V g p 1 1 6 エピトープ A D 2 にも結合するコントロール抗体 I T C 8 8 の結合とも比較した (O h l i n ら、1 9 9 3, J V i r o l 6 7 : 7 0 3 - 7 1 0)。

【0292】

二次 H R P 抱合抗ヒト抗体を、検出試薬として使用した。

【0293】

図 2 ～ 8 に示すように、2 F 1 0、2 M 1 6、2 N 9、3 C 2 1、および 4 P 1 2 抗体はそれぞれ C M V に結合し、C M V g p 1 1 6 エピトープ A D 2 ペプチドと競合した。これらのデータは、C M V g p 1 1 6 エピトープに対して生成されたヒト組換え抗体が C M V ウイルスにも特異的に結合することができることを証明している。

【0294】

(実施例 4)

組換え抗体による C M V の中和

組換え抗体 2 F 1 0、2 M 1 6、2 N 9、3 C 2 1、3 G 7、4 P 1 2 を、h C M V ウイルスと各抗体との混合およびその後の細胞に感染させるための混合物の使用によって h C M V を阻害する能力について試験した。次いで、総細胞に対する感染細胞の比を、抗体濃度の関数としてプロットした。総細胞核を Y O Y O - 1 での染色によって計数し、細胞の透過および 1 - K - 1 0 (マウス I g G 2 a ; M e r i d i a n L i f e S c i e n c e , C i n c i n n a t i , O H) と指定したモノクローナル抗体 (これは、次いで、a l e x a f l u o r (A F) 6 4 7 抗マウス I g G (H & L) (I n v i t r o g e n ; C a r l s b a d , C A) を使用して検出される) との C M V 最初期抗原の結合の決定によって h C M V 感染核を決定した。コントロール抗体 I T C 8 8 も各実験で使用した。

【0295】

図 9 ～ 1 4 に示すように、2 F 1 0、2 M 1 6、2 N 9、3 C 2 1、および 4 P 1 2 抗体は、それぞれ、コントロール I T C 8 8 抗体と類似のレベルまで h C M V を阻害した。これらのデータは、C M V g p 1 1 6 A D 2 エピトープに対して生成されたヒト組換え抗体が C M V ウイルスを中和することができることを証明している。

【0296】

(実施例 5)

H C M V 抗体の中和能力および範囲：実験デザインおよび一般的方法

C M V は、広範なヒト細胞型に侵入することができる。最近、C M V 糖タンパク質-宿主受容体相互作用は細胞型によって異なることが報告されている。しかし、C M V が全ての細胞型に侵入する能力に関する中心的課題は、糖タンパク質 g B 複合体 (タンパク質 g p 5 8 および g p 1 1 6 から構成される) の宿主細胞受容体との相互作用である。

【0297】

一連の抗 H C M V 抗体を、実施例 1 に記載のように、数人の健康なヒトボランティアからの採血およびその後の B 細胞の回収および刺激を含む手順によって生成した。分泌型 I g G を、g B のアミノ末端内の A D 2 エピトープに対する反応性について試験した。重鎖および軽鎖を、A D 2 結合 I g G を発現する B 細胞からクローン化した。各抗体についての結合親和性を決定した。

【0298】

全ての試験した抗体は、ウイルス株や感染細胞型と無関係に C M V 侵入を強力に中和した。これはモルモット C M V 感染と対照的であり、予想通り、中和抗体では効果がなかった。H C M V g B 対 G P C M V g B の抗 H C M V 抗体の特異性は、抗体結合の有効性に影響を及ぼすこれらのタンパク質内の多様な配列に起因する (表 3)。下記のデータは

10

20

30

40

50

、このCMV中和抗体組のさらなる試験および他のCMV糖タンパク質複合体のターゲティングを支持する。

【0299】

材料と方法

抗体

抗体2N9、5P9、2F10、4P12、2M16、およびITC88を、上記の方法を使用して得た。抗体gH(1)は、基準中和抗糖タンパク質H抗体である。Cytotect(商標)は、Chong Lap(H. K.) CO. LTD製の市販のCMV治療薬である。

【0300】

ウイルス

HCMV VR1814株を、妊婦の頸部分泌物から得た。3つの臨床HCMV分離株8818、8819、および8824を、感染患者の痰、気管支肺泡洗浄物、および肺組織からそれぞれ単離し、内皮細胞株ARPE-19中で増殖させた。モルモットCMV V545/82株を、Mark Schleissから入手し、これはGFPreporter遺伝子を含む(McGregor A. and Schleiss M. R. (2001) Molecular Genetics and Metabolism 72(1): 15-26)。

【0301】

細胞株

これらのアッセイで使用した細胞株は、ヒト由来上皮細胞株ARPE-19(網膜色素上皮細胞、ATCCカタログ番号CRL-2302)、ヒト由来線維芽細胞株NN-NHDF(新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞、Lonzaカタログ番号CC-2509)、ヒト由来内皮細胞株HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞、Lonzaカタログ番号CC-2517)、およびモルモット由来線維芽細胞株JH4(モルモット肺線維芽細胞ATCCカタログ番号CCL-158)である。

【0302】

侵入アッセイ

ARPE-19、NN-NHDF、HUVEC、およびJH4細胞を、 8×10^3 細胞/ウェルの濃度で100 μ lの増殖培地を含む96ウェルプレートに播種した。ARPE-19細胞を完全DMEM/F-12培地で増殖させ、NN-NHDF細胞を完全DMEMで増殖させ、HUVEC細胞をEGM-2培地で増殖させ、JH4細胞をF-12K培地で増殖させた。細胞を、37℃および5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、増殖培地を除去し、ウェルあたり100 μ lの無血清培地で各ウェルを3回洗浄することによって細胞を最初に感染させた。ARPE-19細胞をSF-DMEM/F-12で洗浄し、NN-NHDF細胞をSF-DMEMで洗浄し、HUVEC細胞をEBM-2で洗浄し、JH4細胞をSF-F-12K培地で洗浄した。抗体を、各細胞株(上記を参照のこと)について無血清培地で連続希釈し、96ウェル中で50%の細胞を感染させるのに十分なウイルスと混合し、37℃および5%CO₂で1時間インキュベートした。ウェルを、3連の50 μ l/ウェルの体積のウイルス/抗体混合物の添加によって感染させた。ARPEおよびHUVECのプレートを、37℃および5%CO₂で3時間インキュベートし、NN-NHDFおよびJH4のプレートを37℃および5%CO₂で1時間インキュベートした。ウイルス/抗体含有培地を除去し、ウェルをウェルあたり100 μ lの適切な完全培地(上記を参照のこと)で3回洗浄した。最終洗浄液は除去されなかった。プレートを37℃および5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0303】

VR1814および臨床HCMV分離株のIE染色

培地を除去し、細胞を100 μ l/ウェルの4%パラホルムアルデヒドにて室温(RT)で20分間固定した。次いで、パラホルムアルデヒドを除去し、細胞を100 μ l/ウェルのPBSで3回洗浄した。各ウェルに0.1%Triton X-100を含むPB

10

20

30

40

50

S-GCで2000倍希釈した50 μ lのマウス抗CMV IE抗体を添加し、RTで1時間インキュベートした。

【0304】

IE抗体を除去し、ウェルを100 μ l/ウェルのPBSで3回洗浄した。PBS-GCで2000倍希釈したAlexa Fluor 594ヤギ抗マウス抗体とPBS-GCで5000倍希釈したDAPIとの混合によって同一工程で50 μ lの二次抗体および4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を各ウェルに添加した。プレートを、暗所にてRTで1時間インキュベートした。二次抗体を除去し、ウェルを100 μ l/ウェルのPBSで3回洗浄した。3回目の洗浄液は除去されなかった。Cellomics ArrayScan (登録商標) VTIハイコンテンツ画像化プラットフォームにてプレートを読み取った。

10

【0305】

GPCM Vの染色

培地を除去し、細胞を100 μ l/ウェルの4%パラホルムアルデヒドにてRTで20分間固定した。次いで、パラホルムアルデヒドを除去し、細胞を、100 μ l/ウェルのPBSで3回洗浄した。各ウェルに、PBS-GCで5000倍希釈した50 μ lのDAPIを添加した。プレートを、暗所にてRTで10分間インキュベートした。DAPIを除去し、ウェルを100 μ l/ウェルのPBSで3回洗浄した。3回目の洗浄液は除去されなかった。Cellomics ArrayScan (登録商標) VTIハイコンテンツ画像化プラットフォームにてプレートを読み取った。

20

【0306】

分析

中和アッセイ由来のデータを、Cellomics ArrayScan (登録商標) VTIハイコンテンツ画像化プラットフォームを使用して回収した。プレートを透明な粘着プレートシールでシールし、ロボットアームによってロードした。VR1814およびHCMV臨床分離株を感染させたプレートを、標的活性化プロトコルNB-TA-2CH (ウェルあたり1000個の対象物を計数) を使用して分析した。GPCMVを感染させたプレートを、分子移行プロトコルNB-MT-モルモットCMV (ウェルあたり1000個の対象物を計数) を使用して分析した。ウェルあたりのCMV陽性細胞数 (ウイルスに応じてIEまたはGFPのいずれかによって検出) をウェルあたりの細胞数で割り、100を掛けることによって%感染性を計算した。各希釈物についての相対%感染性を、抗体を含まない (ウイルスのみ) ウェルの%感染性を取り、これを各抗体の各希釈物の%感染性で割り、これに100を掛けることによって計算した。相対%感染性を μ g/ml単位の抗体濃度に対してグラフ化し、最大半量阻害濃度 (IC50)を、ウイルスのみのコントロール中で認められた感染ウイルスの50%が中和される抗体濃度として決定する (50%相対感染性)。

30

【0307】

まとめ

ここに示したデータは、HCMV糖タンパク質B上のDLDのAD-2領域をターゲティングする6つの抗体がヒト由来線維芽細胞株、上皮細胞株、および内皮細胞株へのHCMVの侵入を中和することができることを示す。各抗体のIC50は、VR1814を感染させた3つ全ての細胞株の間で一致し、細胞株と無関係の侵入中和能力を示す。これらの抗体は3つの低継代数のHCMV臨床分離株のNN-NHDFへの侵入を中和することもでき、各抗体間で中和能力の相違はほとんど認められなかった。この効果は、HCMVの8819臨床分離株を感染させたHUV EC細胞およびARPE-19細胞でも認められる。試験した抗体は、モルモット線維芽細胞株JH4へのGPCMV侵入を中和することができなかった。しかし、GPCMV gBとHCMV gBとの間でこのタンパク質のAD-2領域の配列多様性が非常に高いので、これは予想外ではない。全ての抗HCMV gB抗体は、効力が有意に異なることなく3つ全てのヒト由来細胞株に対して試験した全てのHCMVウイルス株を一貫して中和した。

40

50

【0308】

(実施例6)

HCMV抗体はヒト上皮細胞(ARPE-19)、内皮細胞(HUVEC)、および線維芽細胞(NHDF)由来のVR1814感染を強く中和する

抗HCMV抗体を $30 \sim 0.003 \mu\text{g/ml}$ の範囲の希釈度で試験し、この抗体は3つ全ての細胞型のHCMV VR1814感染を中和することができた(図15)。記録されたIC50は $0.35 \sim 1.73 \mu\text{g/ml}$ であり、これはポジティブコントロールgH(1)に匹敵した。各抗体間で中和能力の相違はほとんど認められなかった。6つ全ての抗体は、IC50が有意に変動することなく、全ての細胞株において一貫したVR1814の中和を示した。

10

【0309】

(実施例7)

HCMV抗体はHCMV臨床分離株8818、8819、および8824の線維芽細胞感染を強く中和する

抗HCMV抗体を、 $30 \sim 0.003 \mu\text{g/ml}$ の範囲の希釈度で試験し、この抗体はHCMV臨床分離株8818、8819、および8824の線芽細胞感染を中和することができた(図16)。記録されたIC50は $0.19 \sim 0.83 \mu\text{g/ml}$ であり、これは、gH(1)についてのIC50のシフト(より高い方向)を示した臨床分離株8824を除いてポジティブコントロールgH(1)に匹敵した。各抗体間で相違はほとんど認められなかった。6つ全ての抗体は、IC50が有意に変動することなく、線維芽細胞の3つ全ての臨床分離株感染の一貫した中和を示す。

20

【0310】

(実施例8)

HCMV抗体はHCMV臨床分離株8819の内皮(HUVEC)および上皮(ARPE-19)感染を強く中和する

臨床分離株8818および8824は内皮細胞および上皮細胞の感染に完全に適応しているわけではないので、現在、HUVEC細胞およびARPE-19細胞感染の統計的有意差を測定するには十分に高い力価ではない。したがって、8819のみをこれらの細胞型に対して使用した。抗HCMV抗体を $30 \sim 0.003 \mu\text{g/ml}$ の範囲の希釈度で試験し、この抗体は、HCMV臨床分離株8819の上皮細胞(ARPE-19)および内皮細胞(HUVEC)感染を強く中和することができた(図17)。記録されたIC50は $0.19 \sim 0.83 \mu\text{g/ml}$ であり、これはポジティブコントロールgH(1)に匹敵した。各抗体間で相違はほとんど認められなかった。6つ全ての抗体は、IC50が有意に変動することなく、両細胞株に関して8819臨床分離株を一貫して中和した。HUVEC細胞におけるいくつかのサンプルで認められた高い標準偏差は、少量の感染性ウイルスに原因がある。8819はHUVECに感染することができるにもかかわらず%感染性は低く、このことが相対%感染性をより変動しやすくしている。

30

【0311】

(実施例9)

HCMV抗体はJH4細胞へのGPCMV侵入を中和しない

抗HCMV抗体はJH4細胞においてGPCMVのV545/82株を中和することができなかった(図18)。抗HCMV抗体は、 $300 \mu\text{g/ml}$ (試験した最高濃度であった)までGPCMV侵入に対する効果は認められなかった。ヘパリンは、JH4細胞へのGPCMV侵入を阻害することができる唯一の化合物であった。これらの抗体のGPCMV侵入の遮断の失敗は、GPCMV gBと試験した他のHCMV分離株上のgB配列との間の配列変動性が高いことに原因がある(表3)。

40

【0312】

【表 3】

表3:Ad-2アラインメント

	65	70	80	90	100	110	
VR1814 gB	63	VSHRANETIINTTLEYGDPVVCNTTNYFYVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPNKP					配列番号 25
8818 gB	63	VSHRANETIINTTLEYGDPVVCNTTNYFYVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPNKP					配列番号 26
8819 gB	63	VSHRANETIINTTLEYGDPVVCNTTNYFYVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPNKP					配列番号 27
8824 gB	61	VSHRANETIINTTLEYGDPVVCNTTNYFYVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPNKP					配列番号 28
GPCMV gB	58	S---NNNTVIRNLTASVVFSSQ---RKLTFYFICSHNMGTDLIRFARTIQCVFNNPF					配列番号 29
コンセンサス	65	VSHRANETIINTTLEYGDPVVCNTTNYFYVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPNKP					配列番号 30

AD-2領域を黒で強調する

10

上記から、本発明の特定の実施形態を例示を目的として本明細書中に記載しているが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の修正形態を得ることができると認識されるであろう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲を以外に制限されない。

【図 1 A】

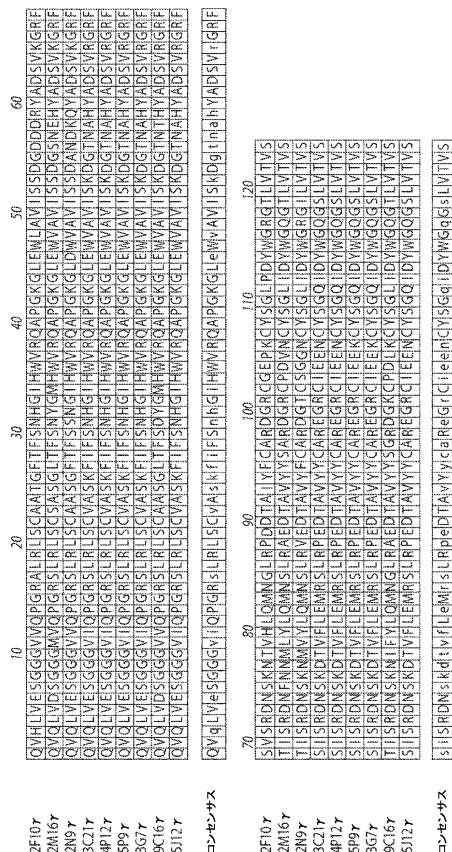


Fig. 1A

【図 1 B】

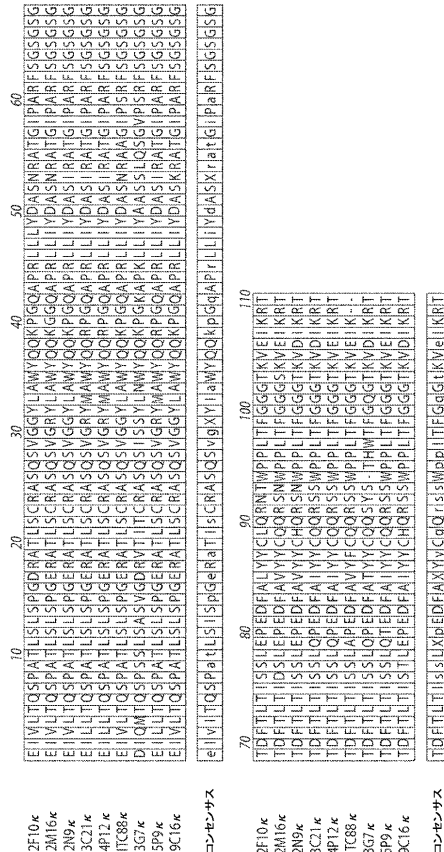


Fig. 1B

【図 2】

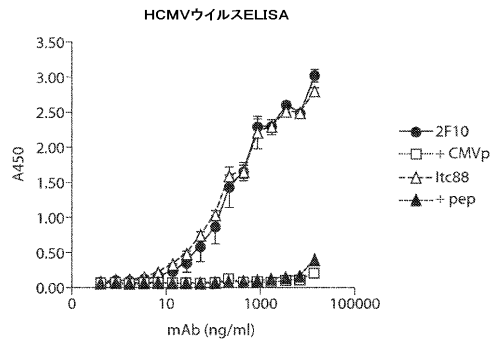


Fig. 2

【図 4】

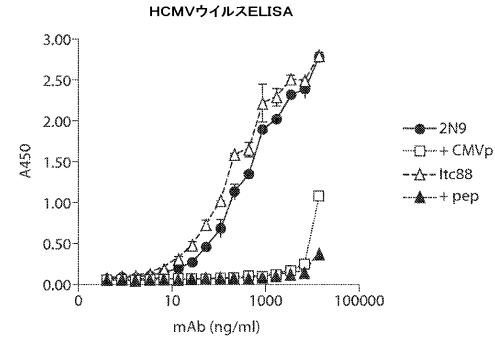


Fig. 4

【図 3】

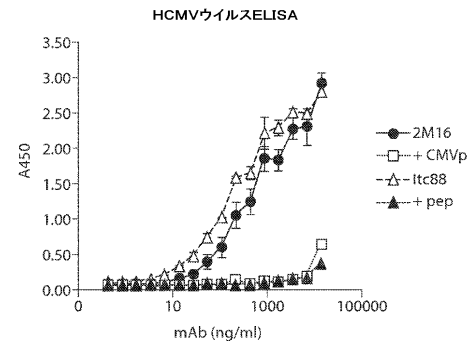


Fig. 3

【図 5】

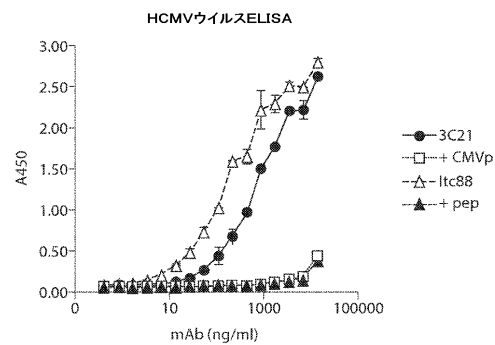


Fig. 5

【図 6】

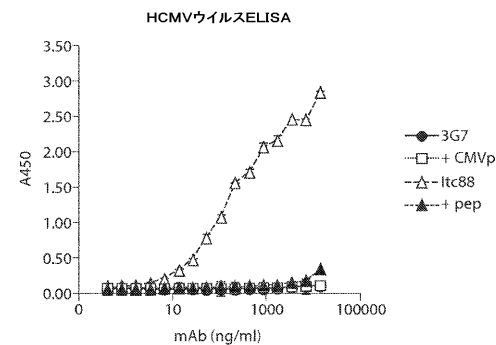


Fig. 6

【図 8】

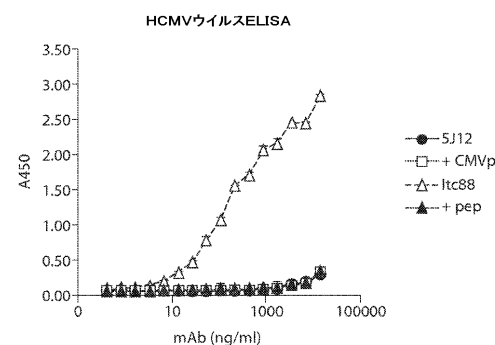


Fig. 8

【図 7】

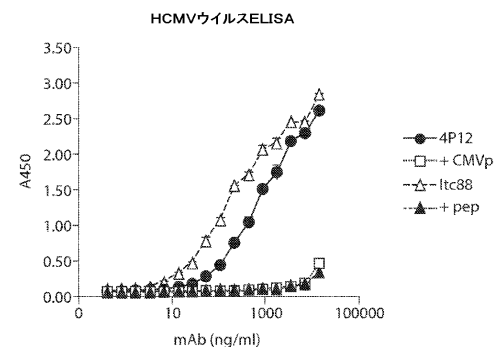


Fig. 7

【図 9】

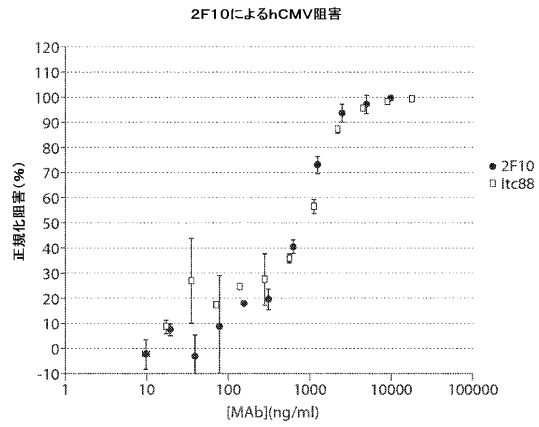


Fig. 9

【図 10】

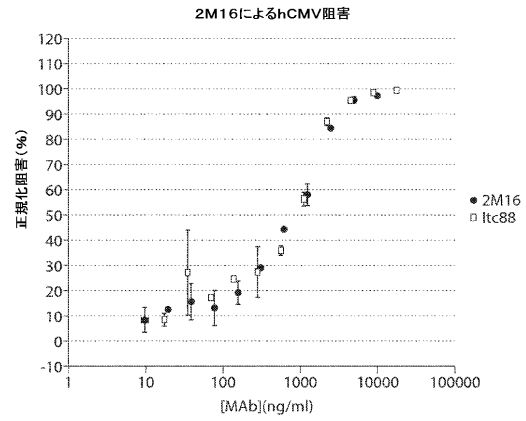


Fig. 10

【図 11】

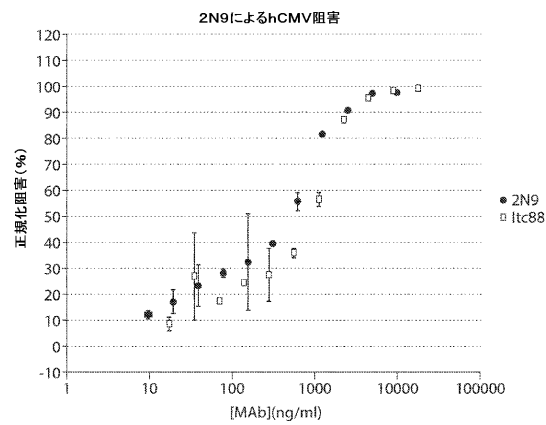


Fig. 11

【図 12】

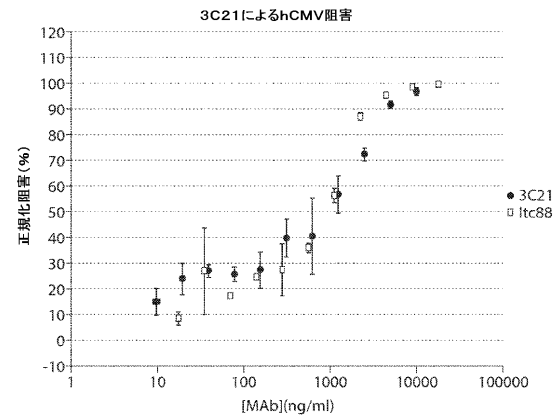


Fig. 12

【図 1 3】

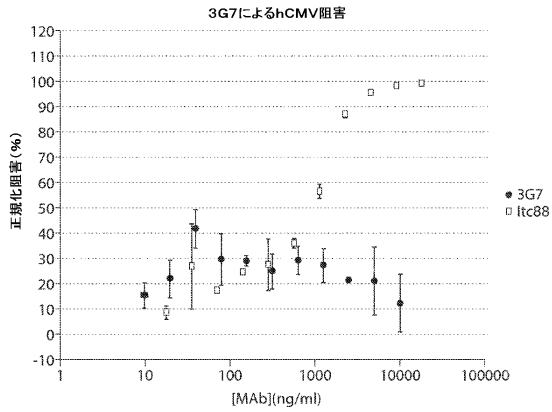


Fig. 13

【図 1 4】

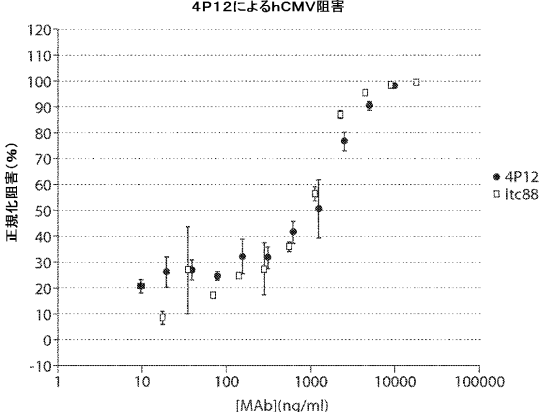


Fig. 14

【図 15】

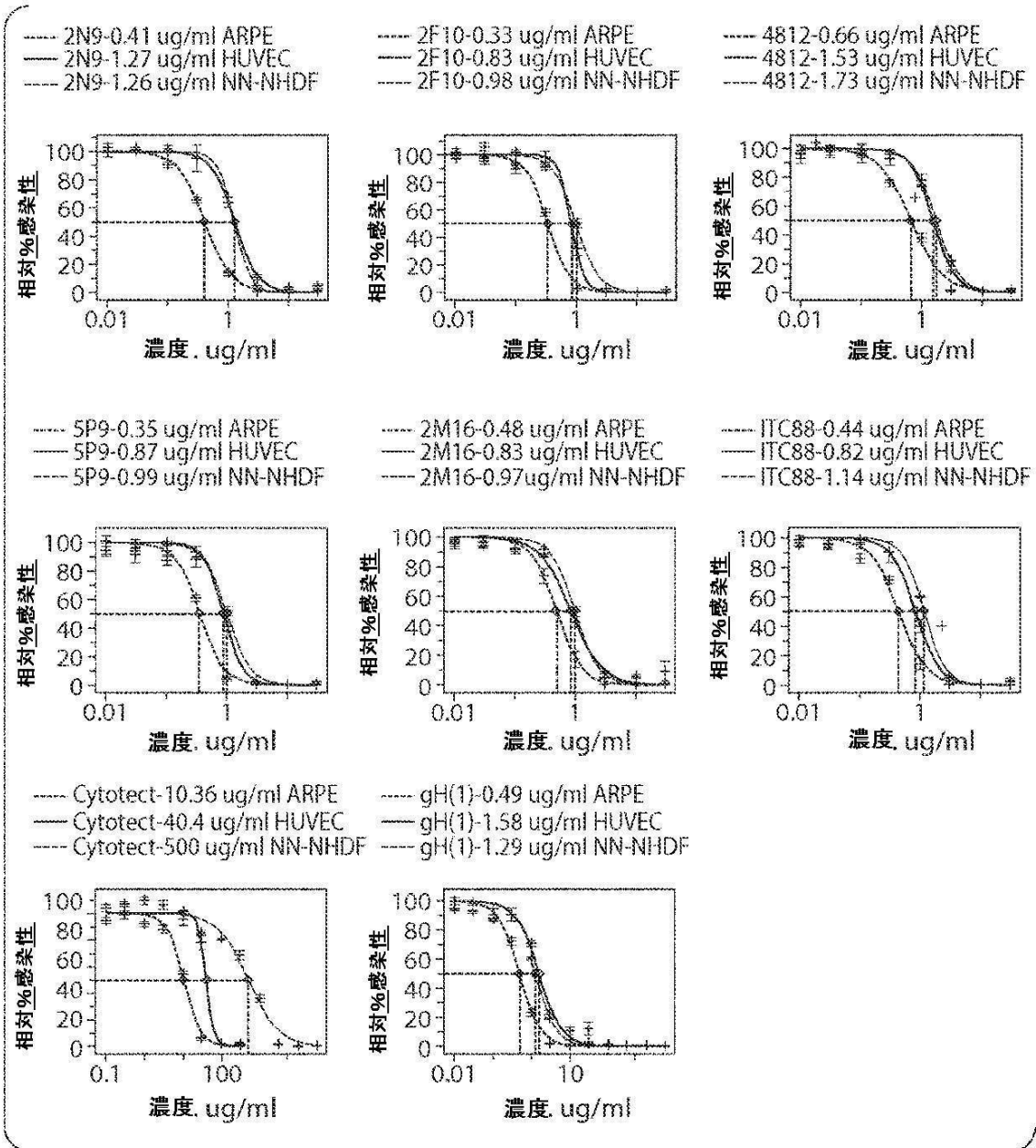


Fig. 15

【図 16】

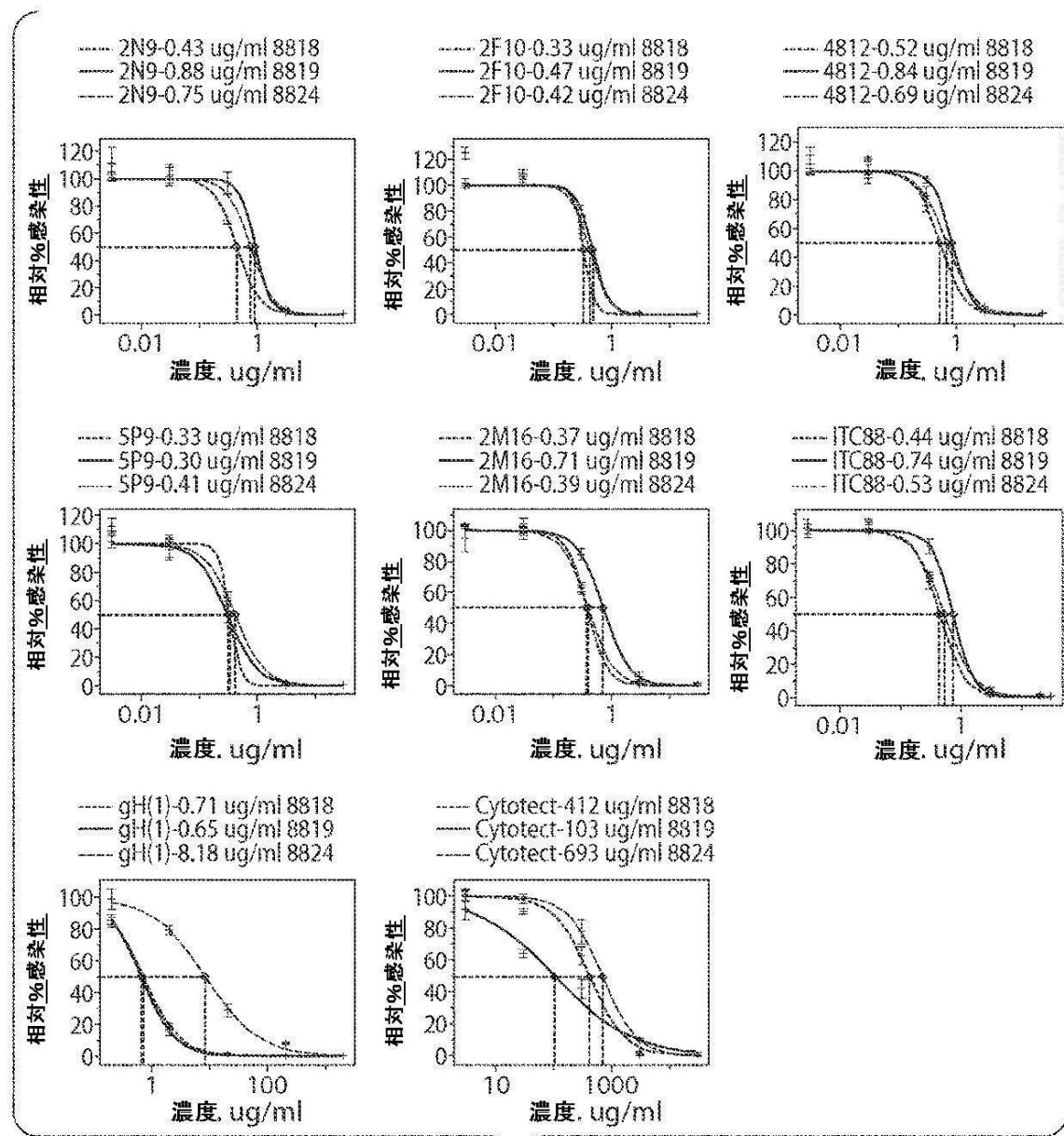


Fig. 16

【図 17】

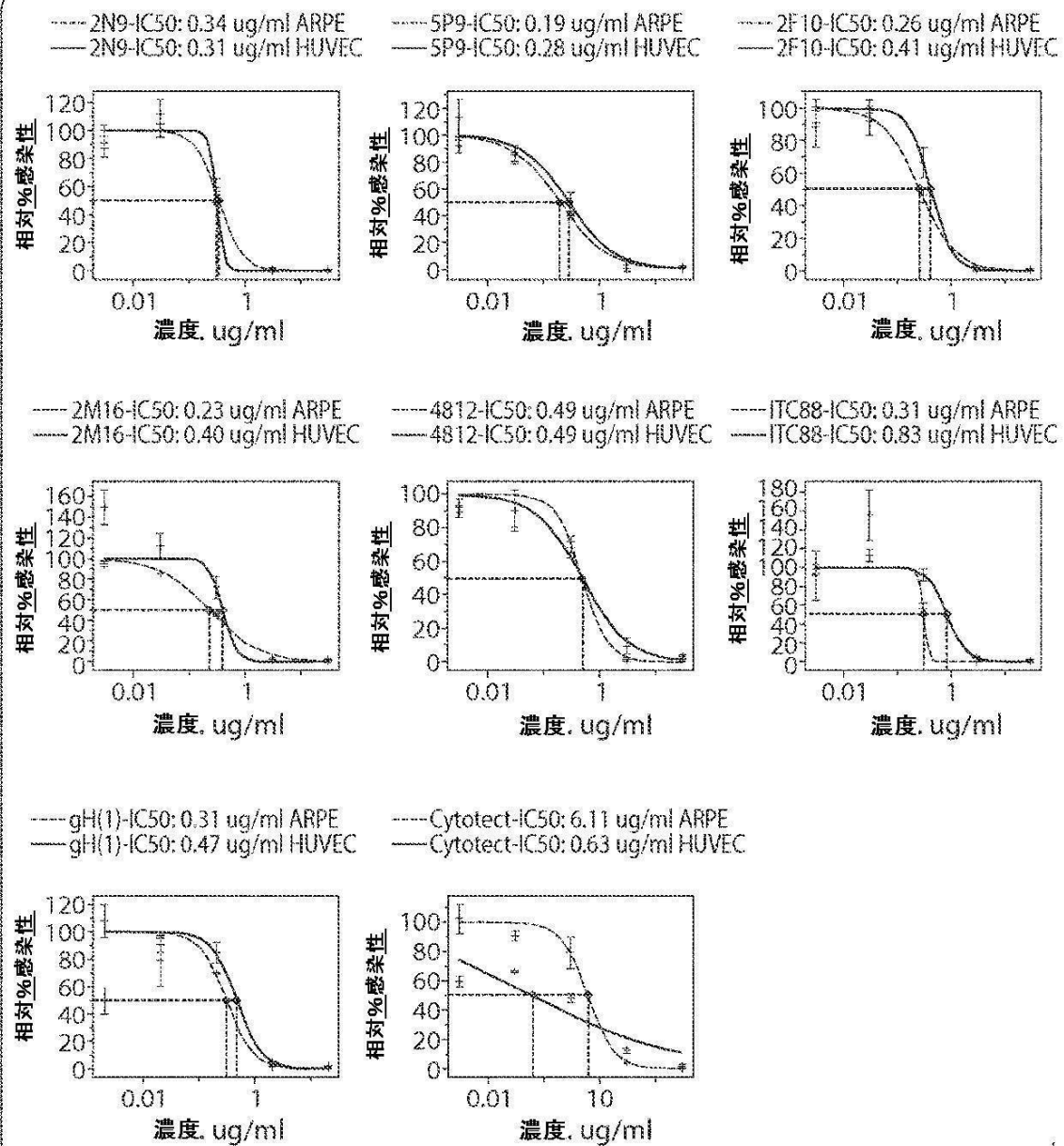


Fig. 17

【図 18】

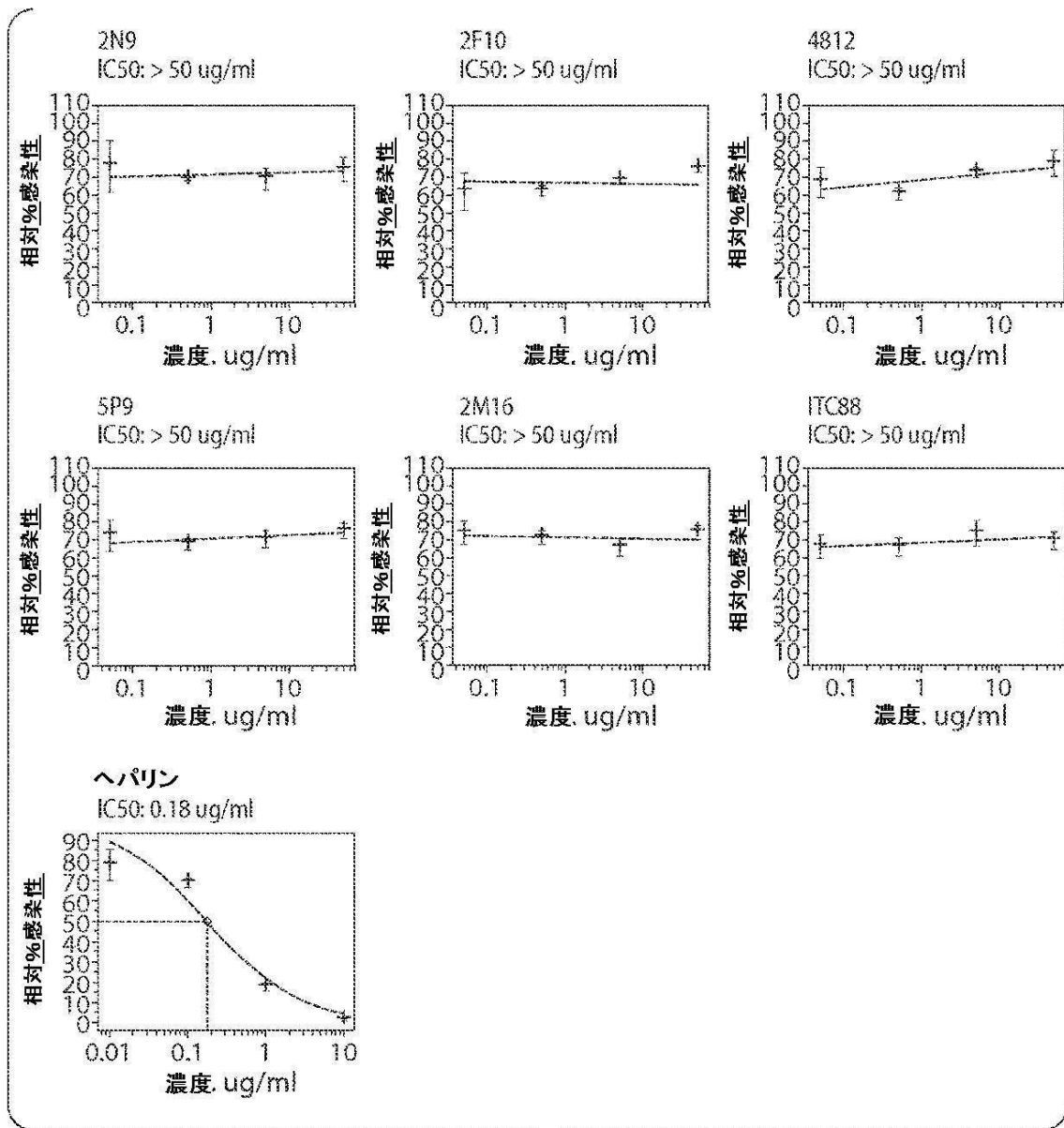


Fig. 18

【配列表】

0005544309000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 オルセン, オール
アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シアトル, 117ティーエイチ ストリート エ
ス. イー. 5309

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第93/021952 (WO, A1)
J. Immunol., 2005, Vol.174, No.8, p.4768-4778
Immunology Lett., 2007, Vol.112, Vol.58-60
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol.93, No.15, p.7843-7848
J. Virol., 1993, Vol.67, No.2, p.703-710

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q
W P I D S / W P I X (S T N)