

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-507257  
(P2008-507257A)

(43) 公表日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 2 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 H O 4 5
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁)

(21) 出願番号 特願2007-504175 (P2007-504175)  
 (86) (22) 出願日 平成17年3月17日 (2005. 3. 17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月13日 (2006. 11. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/009306  
 (87) 国際公開番号 W02005/092926  
 (87) 国際公開日 平成17年10月6日 (2005. 10. 6)  
 (31) 優先権主張番号 60/554, 372  
 (32) 優先日 平成16年3月19日 (2004. 3. 19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/574, 661  
 (32) 優先日 平成16年5月24日 (2004. 5. 24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506313280  
 アムゲン・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・913  
 20-1799・サウザンド・オークス・  
 ワン・アムゲン・センター・ドライブ・(  
 番地なし)  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

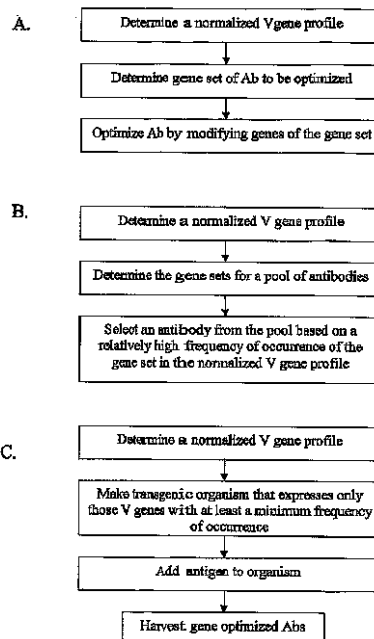
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V遺伝子の操作を介したヒト抗ヒト抗体の危険性の低減

(57) 【要約】

本明細書に示す実施形態は、それらがヒト宿主に投与された際のヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性が低下しているヒト抗体またはヒト化抗体を同定および創出する方法に関する。他の方法は、HAHA応答が起こる確率の予測を対象とする。抗HAHA化合物のためのスクリーニング方法も包含される。

Methods of Making Gene Optimized Abs



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

宿主用の抗体を選択する方法であって、前記抗体は、前記宿主におけるヒト抗ヒト抗体 (HAHA) 応答を誘発する確率が低下しており、以下の工程：

候補抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子を準備する工程、

前記候補抗体を受容することになっている宿主の宿主免疫グロブリン遺伝子を準備する工程、

前記候補抗体をコードする前記免疫グロブリン遺伝子を前記宿主免疫グロブリン遺伝子と比較する工程、および

前記候補抗体をコードする前記免疫グロブリン遺伝子が前記宿主免疫グロブリン遺伝子と同じ場合に前記候補抗体を選択し、それによってHAHA応答を誘発する確率が低下している、前記宿主用の抗体を選択する工程、を含む方法。

10

## 【請求項 2】

前記候補抗体の1種以上の免疫グロブリン遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記候補抗体のあらゆる免疫グロブリンV遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記免疫グロブリン遺伝子がV遺伝子である、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記V遺伝子がV<sub>H</sub>(重鎖)遺伝子である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記V遺伝子がV<sub>L</sub>(軽鎖)遺伝子である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 7】

遺伝子の準備が、前記免疫グロブリン遺伝子の同定物の認識を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 8】

ヒト抗ヒト抗体 (HAHA) 応答を誘導する危険性が低下している、宿主用の抗体を選択する方法であって、

30

抗体V遺伝子セットを宿主V遺伝子セットと比較する工程、および

前記宿主V遺伝子セット内に存在するV遺伝子セットによってコードされている前記抗体を選択する工程、を含む方法。

## 【請求項 9】

前記宿主V遺伝子が、前記宿主で転写される、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記宿主V遺伝子が、前記宿主で翻訳される、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記宿主V遺伝子が、高レベルのタンパク質を産生する、請求項10に記載の方法。

40

## 【請求項 12】

前記V遺伝子がV<sub>H</sub>遺伝子である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記V遺伝子がV<sub>L</sub>遺伝子である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 14】

宿主の治療における使用から抗体を除外する方法であって、

抗体の少なくとも一部をコードする遺伝子を準備する工程、

前記遺伝子が、前記抗体を受容する宿主の遺伝子と同一であるかどうか判定する工程、および

50

前記抗体の少なくとも一部をコードする遺伝子が、さらに前記宿主の遺伝子でない場合に前記抗体を除外する工程、  
を含む方法。

【請求項15】

前記抗体をコードするすべての遺伝子を準備する工程、  
前記遺伝子のそれぞれが、前記宿主の遺伝子のいずれかと同一であるかどうか判定する工程、および

前記遺伝子のいずれかがさらに前記宿主の遺伝子でない場合に、前記抗体を除外する工程、

をさらに含む、請求項14に記載の方法。

10

【請求項16】

抗体の少なくとも一部をコードする前記遺伝子がV<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>3-13、またはV<sub>H</sub>3-64遺伝子である場合に前記抗体が除外される、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

抗体を選択する方法であって、

ある抗体をコードする遺伝子が特定のヒト集団に出現する頻度を測定する工程、および頻度の関数として前記抗体を選択し、それによって前記抗体がヒト宿主内でヒト抗ヒト抗体応答を誘導する危険性を低下させる工程、

を含む方法。

【請求項18】

前記頻度が、前記集団の少なくとも80%である、請求項17に記載の方法。

20

【請求項19】

前記頻度が、前記集団の少なくとも99%である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記頻度が、前記集団の100%である、請求項17に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、免疫原性の予測、操作、および予防と、XenoMouse(登録商標)動物および他の同様な生物、ならびに、患者において抗体がヒト抗ヒト抗体反応を誘導する危険性を、それらを用いて予測および改変する方法とに関する。

30

【背景技術】

【0002】

臨床的に重要な疾患の治療における抗体の有用性は、広く承認されている。これらの抗体が有する主要な危険性の1つが、その抗体を受容する患者による免疫応答の危険性、例えば、治療用抗体に対する抗体を患者が産生する危険性である。

【0003】

全般的に、以前の研究は、ヒトへの、マウスベースの抗体の添加に伴い、その結果ヒト患者がマウスベースの抗体に対する免疫応答を開始することになる危険性に関するものに集中していた。この免疫応答は、HAMA応答とも呼ばれ、これは、「ヒト抗マウス抗体」を表す。

40

【0004】

このHAMA応答を制限する試みの1つが、Gary Studnickaの米国特許出願公開第20040005630号(2004年1月8日公開)に記載されている。この出版物は、改変された抗体を異種生物に投与できるように、その抗体の親和性を低下させない一方で、同時に抗体の免疫原性を低下させるのにどのアミノ酸が改変可能でありうるかを決定するために、どのようにして配列をアミノ酸レベルで比較しうるかに関する可能な方法を開示する。この参考文献は、使用する抗体をコンセンサス配列と残基比較することによって残基を決定することがHAMA応答の問題を克服する方法であると示唆する。その後、溶媒に露出している特定のアミノ酸位置で、その残基が結合に関与していない場合、および、その残基がヒトにおけるコンセ

50

ンサス配列で高度または中程度に保存されている場合に改変を加える。

【0005】

他には、 $V_H$ 遺伝子使用( $V_H$  gene usage)が、自己免疫疾患全般と関連しているかどうかを判定する試みがなされている。これらの試みは、ほとんど成功していない。そのような試みの1つが、Huangらによるものである(Clin. Exp. Immunol. 112、516~527頁(1998))。Huangらは、関節リウマチを患っている患者の $V_H$ 使用の間に何らかの相関関係があったかどうかの判定を試みた。以前の研究は、相反した結果をもたらした。Huangらは、8つの異なった $V_H3$ 遺伝子と、3つの異なった $V_H4$ 遺伝子を調べた。しかし、彼らの結論は、末梢血B細胞では、この疾患によって個々の $V_H$ 遺伝子の使用が影響を受けていないというものであった。Huangらは、リウマチ因子で優先的に使用される $V_H$ 遺伝子がいくつがあるかもしれないが、末梢B細胞における $V_H$ 遺伝子の全体的な表示は変化していないと結論した。さらに、これらの実験は、一般化された自己免疫の問題に限定されたものであった。

10

【0006】

免疫原性を低下させる試みにおける複雑さは数限りない。例えば、考慮されるべきいくつかの因子には、マウス定常領域、V領域配列、ヒト免疫グロブリンAロタイプ、通常と異なるグリコシル化、投与の方法、投与の頻度、抗体の用量、患者の疾患の状態、患者の免疫の状態、患者のMHCハプロタイプ、抗体の特異性、細胞表面抗原であるか可溶性抗原であるか、投与される生物学的存在の凝集の程度、抗原との免疫複合体の形成、抗体による補体活性化、抗体によるFc受容体結合性、炎症、およびサイトカインの放出が含まれる(Mike Clark、Immunology Today、2000年8月)。しかし、Clarkは、V領域配列に関連した免疫原性の問題の一部がヒト化によって改変できることに言及した。

20

【0007】

いくつかの研究は、V遺伝子の多型およびレパートリー発現について、時に民族性、年齢、または性別との関連において取り組んだ。これらの報告は、単一またはごくわずかなドナーに依存するもの(Hufnagleら、Ann N Y Acad Sci.、764、293~295頁(1995); Demaisonら、Immunogenetics、42、342~352頁(1995); Wangら、Clin Immunol.、93、132~142頁(1999); Raoら、Exp Clin Immunogenet.、13、131~138頁(1996); Brezinschekら、J Immunol.、155、190~202頁(1995); および、Rassentiら、Ann N Y Acad Sci.、764、463~473頁(1995))、白血病または自己免疫性患者を分析したもの(Dijk-Hardら、J Autoimmun.、12、57~63頁(1999); Logtenbergら、Int Immunol.、1、362~366頁(1989); Dijk-Hardら、Immunology、107、136~144頁(2002); Johnsonら、J Immunol.、158、235~246頁(1997))、限定された数の遺伝子に注目したもの(Pramanikら、Am J Hum Genet.、71、1342~1352頁(2002); Raoら、Exp Clin Immunogenet.、13、131~138頁(1996); Huangら、Mol Immunol.、33、553~560頁(1996); および、Sassoら、Ann N Y Acad Sci.、764、72~73頁(1995))、あるいは、使用された $V_H$ 遺伝子をファミリーによって分類したもの(Hufnagleら、Ann N Y Acad Sci.、764、293~295頁(1995); Rassentiら、Ann N Y Acad Sci.、764、463~473頁(1995); Logtenbergら、Int Immunol.、1、362~366頁(1989); Ebelingら、Int Immunol.、4、313~320頁(1992))である。

30

【0008】

残念ながら、HAMA応答が除去された場合でさえも、治療用抗体は、なお免疫応答を患者で誘発することがある。換言すれば、治療用抗体は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘発することがある。この反応は、治療用抗体の有効性を制限することがあり、最悪の場合、これらの安全プロフィールに悪い影響を与えることがある。一例として、完全にヒトのファージディスプレイに由来する抗TNF抗体ヒューミラ(登録商標)(Abbott Laboratories社)は、不意に、単独治療を受けている患者の約12%、そして、メトトレキサートとの併用療法では約5%でHAHA反応を誘発する。したがって、HAMA応答に関連した危険性を克服する試みがなされてきているが、HAHA応答の問題への取り組みはほとんどなされていない。

40

【特許文献1】米国特許出願公開第2004/0005630号明細書

【非特許文献1】Huangら、Clin. Exp. Immunol. 112、516~527頁(1998)

【非特許文献2】Mike Clark、Immunology Today、2000年8月

50

- 【非特許文献3】Hufnagleら、Ann N Y Acad Sci.、764、293～295頁(1995)
- 【非特許文献4】Demaisonら、Immunogenetics、42、342～352頁(1995)
- 【非特許文献5】Wangら、Clin Immunol.、93、132～142頁(1999)
- 【非特許文献6】Raoら、Exp Clin Immunogenet.、13、131～138頁(1996)
- 【非特許文献7】Brezinschekら、J Immunol.、155、190～202頁(1995)
- 【非特許文献8】Rassentiら、Ann N Y Acad Sci.、764、463～473頁(1995)
- 【非特許文献9】Dijk-Hardら、J Autoimmun.、12、57～63頁(1999)
- 【非特許文献10】Logtenbergら、Int Immunol.、1、362～366頁(1989)
- 【非特許文献11】Dijk-Hardら、Immunology、107、136～144頁(2002)
- 【非特許文献12】Johnsonら、J Immunol.、158、235～246頁(1997) 10
- 【非特許文献13】Pramanikら、Am J Hum Genet.、71、1342～1352頁(2002)
- 【非特許文献14】Huangら、Mol Immunol.、33、553～560頁(1996)
- 【非特許文献15】Sassoら、Ann N Y Acad Sci.、764、72～73頁(1995)
- 【非特許文献16】Ebelingら、Int Immunol.、4、313～320頁(1992)
- 【非特許文献17】Matsudaら、J Exp Med.、188、2151～2162頁(1998)
- 【非特許文献18】Liら、Blood、103、4602～4609頁(2004)
- 【非特許文献19】Messmerら、Blood、103、3490～3495頁(2004)
- 【非特許文献20】Feuchtenbergerら、J Immunol. Methods、276、121-127頁(2003)
- 【非特許文献21】「Immunology - A Synthesis」、第2版、E.S. GolubおよびD.R. Gren編、Sinauer Associates社、Sunderland, Mass. (1991) 20
- 【非特許文献22】「Fundamental Immunology」、Ch. 7、Paul, W.編、第2版、Raven Press社、N.Y. (1989)
- 【非特許文献23】「Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest」(米国立衛生研究所(National Institutes of Health)、Bethesda, Md. (1987、1991))
- 【非特許文献24】ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol.、196、901～917頁(1987)
- 【非特許文献25】Chothiaら、Nature、342、878～883頁(1989)
- 【非特許文献26】SongsivilaiおよびLachmann、Clin. Exp. Immunol.、79、315～321頁(1990)
- 【非特許文献27】Kostelnyら、J. Immunol.、148、1547～1553頁(1992)
- 【特許文献2】国際公開第03/48731号パンフレット 30
- 【非特許文献28】「The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms」、Parker, S.編、McGraw-Hill社、San Francisco (1985)
- 【非特許文献29】Babcookら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、7843～7848頁(1996)
- 【特許文献3】米国特許第5627052号明細書
- 【特許文献4】米国特許第5958708号明細書
- 【非特許文献30】Brooks, B. R.、Brucoleri, R. E.、Olafson, B. D.、States, D. J.、Swaminathan, S.、およびKarplus, M.、1983、J. Comp. Chem.、4、187頁
- 【非特許文献31】Dayhoff, M.O.、「Atlas of Protein Sequence and Structure」、101～110頁(第5巻、National Biomedical Research Foundation (1972)、およびこの巻への追補1～10頁) 40
- 【非特許文献32】SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math.、2、482頁(1981)
- 【非特許文献33】NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol.、48、443～453頁(1970)
- 【非特許文献34】PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)、85、2444頁(1988)
- 【非特許文献35】Bowieら、Science、253、164頁(1991)
- 【非特許文献36】「Proteins, Structures and Molecular Principles」、Creighton, Ed W. H.、Freeman and Company社、New York (1984)
- 【非特許文献37】「Introduction to Protein Structure」、C.BrandenおよびJ.Tooze編、Garland Publishing社、New York, N.Y. (1991)
- 【非特許文献38】Thorntonら、Nature、354、105頁(1991) 50

- 【非特許文献 3 9】Fauchere、J. Adv. Drug. Res.、15、29頁(1986)
- 【非特許文献 4 0】VeberおよびFreidinger、TINS、392頁(1985)
- 【非特許文献 4 1】Evansら、J. Med. Chem.、30、1229頁(1987)
- 【非特許文献 4 2】RizoおよびGierasch、Ann. Rev. Biochem.、61、387頁(1992)
- 【非特許文献 4 3】Pandey、J.P.、Vaccine 19 (6)、613 ~ 617頁(2000)
- 【非特許文献 4 4】Hougsら、Tissue Antigens 61 (3)、231 ~ 239頁(2003)
- 【非特許文献 4 5】Juulら、Tissue Antigens 49 (6)、595 ~ 604頁(1997)
- 【非特許文献 4 6】Atkinsonら、Immunogenetics 44 (2)、115 ~ 120頁(1996)
- 【特許文献 5】米国特許第6043069号明細書
- 【特許文献 6】米国特許第5683694号明細書 10
- 【特許文献 7】米国特許第5258289号明細書
- 【非特許文献 4 7】Greenら、Nature Genetics 7: 13 ~ 21 頁(1994)
- 【非特許文献 4 8】Mendezら、Nature Genetics 15:146 ~ 156頁(1997)
- 【特許文献 8】米国特許出願公開第08/759620号明細書
- 【非特許文献 4 9】GreenおよびJakobovits、J. Exp. Med. 188: 483 ~ 495頁(1998)
- 【特許文献 9】米国特許出願公開第07/466008号明細書
- 【特許文献 1 0】米国特許出願公開第07/61515号明細書
- 【特許文献 1 1】米国特許出願公開第07/919297号明細書
- 【特許文献 1 2】米国特許出願公開第07/922649号明細書
- 【特許文献 1 3】米国特許出願公開第08/031801号明細書 20
- 【特許文献 1 4】米国特許出願公開第08/112848号明細書
- 【特許文献 1 5】米国特許出願公開第08/234145号明細書
- 【特許文献 1 6】米国特許出願公開第08/376279号明細書
- 【特許文献 1 7】米国特許出願公開第08/43938号明細書
- 【特許文献 1 8】米国特許出願公開第08/464584号明細書
- 【特許文献 1 9】米国特許出願公開第08/464582号明細書
- 【特許文献 2 0】米国特許出願公開第08/463191号明細書
- 【特許文献 2 1】米国特許出願公開第08/462837号明細書
- 【特許文献 2 2】米国特許出願公開第08/486853号明細書
- 【特許文献 2 3】米国特許出願公開第08/486857号明細書 30
- 【特許文献 2 4】米国特許出願公開第08/486859号明細書
- 【特許文献 2 5】米国特許出願公開第08/462513号明細書
- 【特許文献 2 6】米国特許出願公開第08/724752号明細書
- 【特許文献 2 7】米国特許出願公開第08/759620号明細書
- 【特許文献 2 8】米国特許第6162963号明細書
- 【特許文献 2 9】米国特許第6150584号明細書
- 【特許文献 3 0】米国特許第6114598号明細書
- 【特許文献 3 1】米国特許第6075181号明細書
- 【特許文献 3 2】米国特許第5939598号明細書
- 【特許文献 3 3】特許第3068180号公報 40
- 【特許文献 3 4】特許第3068506号公報
- 【特許文献 3 5】特許第3068507号公報
- 【特許文献 3 6】欧州特許第0463151号
- 【特許文献 3 7】国際公開第94/02602号パンフレット
- 【特許文献 3 8】国際公開第96/34096号パンフレット
- 【特許文献 3 9】国際公開第98/24893号パンフレット
- 【特許文献 4 0】国際公開第00/76310号パンフレット
- 【特許文献 4 1】国際公開第03/47336号パンフレット
- 【特許文献 4 2】米国特許第5545807号、Suraniらに交付
- 【特許文献 4 3】米国特許第5545806号明細書 50

【特許文献 4 4】	米国特許第5625825号明細書	
【特許文献 4 5】	米国特許第5625126号明細書	
【特許文献 4 6】	米国特許第5633425号明細書	
【特許文献 4 7】	米国特許第5661016号明細書	
【特許文献 4 8】	米国特許第5770429号明細書	
【特許文献 4 9】	米国特許第5789650号明細書	
【特許文献 5 0】	米国特許第5814318号明細書	
【特許文献 5 1】	米国特許第5877397号明細書	
【特許文献 5 2】	米国特許第5874299号明細書	
【特許文献 5 3】	米国特許第6255458号明細書	10
【特許文献 5 4】	米国特許第5591669号明細書	
【特許文献 5 5】	米国特許第6023.010号明細書	
【特許文献 5 6】	米国特許第5612205号明細書	
【特許文献 5 7】	米国特許第5721367号明細書	
【特許文献 5 8】	米国特許第5789215号明細書	
【特許文献 5 9】	米国特許第5643763号明細書	
【特許文献 6 0】	米国特許出願公開第07/574748号明細書	
【特許文献 6 1】	米国特許出願公開第07/575962号明細書	
【特許文献 6 2】	米国特許出願公開第07/810279号明細書	
【特許文献 6 3】	米国特許出願公開第07/853408号明細書	20
【特許文献 6 4】	米国特許出願公開第07/904068号明細書	
【特許文献 6 5】	米国特許出願公開第07/99860号明細書	
【特許文献 6 6】	米国特許出願公開第08/053131号明細書	
【特許文献 6 7】	米国特許出願公開第08/096762号明細書	
【特許文献 6 8】	米国特許出願公開第08/155301号明細書	
【特許文献 6 9】	米国特許出願公開第08/161739号明細書	
【特許文献 7 0】	米国特許出願公開第08/165699号明細書	
【特許文献 7 1】	米国特許出願公開第08/209741号明細書	
【特許文献 7 2】	欧州特許第0546073号明細書	
【特許文献 7 3】	国際公開第92/03918号パンフレット	30
【特許文献 7 4】	国際公開第92/22645号パンフレット	
【特許文献 7 5】	国際公開第92/22647号パンフレット	
【特許文献 7 6】	国際公開第92/22670号パンフレット	
【特許文献 7 7】	国際公開第93/12227号パンフレット	
【特許文献 7 8】	国際公開第94/00569号パンフレット	
【特許文献 7 9】	国際公開第94/25585号パンフレット	
【特許文献 8 0】	国際公開第96/14436号パンフレット	
【特許文献 8 1】	国際公開第97/13852号パンフレット	
【特許文献 8 2】	国際公開第98/24884号パンフレット	
【特許文献 8 3】	米国特許第5981175号明細書	40
【特許文献 8 4】	欧州特許出願公開第773288号明細書	
【特許文献 8 5】	欧州特許出願公開第843961号明細書	
【特許文献 8 6】	米国特許第5476996号明細書	
【特許文献 8 7】	米国特許第5698767号明細書	
【特許文献 8 8】	米国特許第5958765号明細書	
【特許文献 8 9】	国際公開第98/24893号パンフレット	
【特許文献 9 0】	国際公開第99/53049号パンフレット	
【特許文献 9 1】	米国特許第4399216号明細書	
【特許文献 9 2】	米国特許第4912040号明細書	
【特許文献 9 3】	米国特許第4740461号明細書	50

- 【特許文献 9 4】米国特許第4959455号明細書
- 【特許文献 9 5】米国特許出願公開第60/430729号明細書
- 【非特許文献 5 0】Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. P., およびLanzavecchia, A, Eur. J. Immunol. 19, 2237 ~ 2242頁(1989)
- 【非特許文献 5 1】「Remington's Pharmaceutical Sciences」(第18版、Mack Publishing Company社、Easton, PA、1990)
- 【非特許文献 5 2】Langerら、J. Biomed Mater. Res. (1981)、15:167 ~ 277頁
- 【非特許文献 5 3】Langer、Chem. Tech. (1982)、12:98 ~ 105頁
- 【特許文献 9 6】米国特許第3773919号明細書
- 【特許文献 9 7】欧州特許第58481号明細書 10
- 【非特許文献 5 4】Sidmanら、Biopolymer (1983)、22:547 ~ 556頁
- 【特許文献 9 8】欧州特許第133988号明細書
- 【特許文献 9 9】独国特許第3218121号明細書
- 【非特許文献 5 5】Epsteinら、Proc. Natl. acad. Sci. USA (1985)、82:3688 ~ 3692頁
- 【非特許文献 5 6】Howangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980)、77:4030 ~ 4034頁
- 【特許文献 1 0 0】欧州特許第52322号明細書
- 【特許文献 1 0 1】欧州特許第36676号明細書
- 【特許文献 1 0 2】欧州特許第88046号明細書
- 【特許文献 1 0 3】欧州特許第143949号明細書
- 【特許文献 1 0 4】欧州特許第142641号明細書 20
- 【特許文献 1 0 5】特開83-118008号明細書
- 【特許文献 1 0 6】米国特許第4485045号明細書
- 【特許文献 1 0 7】米国特許第4544545号明細書
- 【特許文献 1 0 8】欧州特許第102324号明細書
- 【非特許文献 5 7】Baldrick P, 「Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.」、Regul.Toxicol. Plzarnaacol 32 (2)
- 【非特許文献 5 8】W. Wang, 「Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals」、Int J. Pharm. 203 (1-2):1 ~ 60 頁(2000)
- 【非特許文献 5 9】Charman WN, 「Lipids, liophilic drugs, and oral drugs delivery -some emerging concepts」、J Pharm Sci 89 (8):967 ~ 78頁(2000) 30
- 【非特許文献 6 0】Powell ら, 「Compendium of excipients for parenteral formulations」、PDA J Pharm Sci Technol. 52:238 ~ 311頁(1998)
- 【特許文献 1 0 9】米国特許第6258562号明細書
- 【発明の開示】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0009】
- 一般集団では過小評価されている遺伝子が、そのような遺伝子によってコードされることのあるタンパク質構造を有する治療用抗体の免疫原性に寄与することがある。これらの遺伝子の同定は、治療用の候補モノクローナル抗体を評価する際の補助となるであろうし、それを、前臨床開発の時点での選択因子として組み込むことができる。これは、多数の  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子個々の存在および使用に関して、そして、これらの個々の遺伝子がHAHA応答の危険性とどのように相関しているかに関して、多数の正常ドナーを研究した最初のものを表す。 40
- 【0010】
- 本発明の一態様は、宿主用の抗体を選択する方法である。宿主におけるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘発する確率が低下している抗体を提供する。この方法は、候補抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子を準備する工程と、候補抗体を受容することになっている宿主の宿主免疫グロブリン遺伝子を準備する工程と、候補抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子を、宿主免疫グロブリン遺伝子と比較する工程と、候補抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子が宿主免疫グロブリン遺伝子と同じ場合に上記候補抗体を選択し、それによ 50

ってHAHA応答を誘発する確率が低下している、宿主用の抗体を選択する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、候補抗体の1種以上の免疫グロブリン遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、候補抗体のあらゆる免疫グロブリンV遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む。一部の実施形態では、上記免疫グロブリン遺伝子がV遺伝子である。一部の実施形態では、上記V遺伝子がV<sub>H</sub>(重鎖)遺伝子である。一部の実施形態では、上記V遺伝子がV<sub>L</sub>(軽鎖)遺伝子である。一部の実施形態では、遺伝子の準備が、免疫グロブリン遺伝子の同定物(identity)の認識を含む。

【0011】

本発明の別の態様は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)反応を誘導する危険性が低下している、宿主用の抗体を選択する方法である。この方法は、抗体V遺伝子セットを宿主V遺伝子セットと比較する工程と、宿主V遺伝子セットに存在するV遺伝子セットによってコードされている抗体を選択する工程とを含む。一部の実施形態では、宿主で宿主V遺伝子が転写される。一部の実施形態では、宿主で宿主V遺伝子が翻訳される。一部の実施形態では、上記V遺伝子がV<sub>H</sub>遺伝子である。一部の実施形態では、上記V遺伝子がV<sub>L</sub>遺伝子である。

10

【0012】

本発明の別の態様は、宿主の治療における使用から抗体を除外する方法である。この方法は、抗体の少なくとも一部をコードする遺伝子を準備する工程と、上記遺伝子が、上記抗体を受容する宿主の遺伝子と同一であるか判定する工程と、上記抗体の少なくとも一部をコードする遺伝子が、さらに宿主の遺伝子でない場合に上記抗体を除外する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、上記抗体をコードするすべての遺伝子を準備する工程と、上記遺伝子のそれぞれが、宿主の遺伝子のいずれかと同一であるかどうか判定する工程と、上記遺伝子のいずれかが、さらに宿主の遺伝子でない場合に、上記抗体を除外する工程とをさらに含む。一部の実施形態では、抗体の少なくとも一部をコードする遺伝子がV<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>3-13、またはV<sub>H</sub>3-64の遺伝子である場合に上記抗体が除外される。

20

【0013】

本発明の別の態様は、集団の一員に投与するための抗体を選択する方法であって、上記抗体は、上記集団におけるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘発する確率が低下しており、この方法は、集団内の個体に投与すべき候補抗体の少なくとも一部をコードするV遺伝子を準備する工程と、上記集団内に上記V遺伝子が出現(存在)する頻度を提供する工程と、上記V遺伝子が、上記集団内に高頻度で出現する場合に上記候補抗体を選択する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、候補抗体の全V遺伝子を準備する工程と、上記集団内に上記全V遺伝子が出現する頻度を提供する工程と、上記V遺伝子のすべてが、上記集団内で所定の出現頻度(存在頻度、frequency of occurrence)より高い出現頻度を有する場合に上記候補抗体を選択する工程とをさらに含む。一部の実施形態では、上記の所定の出現頻度が、上記集団の少なくとも50%である。一部の実施形態では、上記の所定の出現頻度が、上記集団の少なくとも80%である。一部の実施形態では、上記の所定の出現頻度が、上記集団の少なくとも99%である。一部の実施形態では、上記の所定の出現頻度が、上記集団の少なくとも100%である。一部の実施形態では、上記V遺伝子が免疫グロブリンV<sub>H</sub>型遺伝子またはその変種である。一部の実施形態では、上記V遺伝子が免疫グロブリンV<sub>L</sub>型遺伝子またはその変種である。一部の実施形態では、上記抗体がヒト抗体を産生する非ヒト動物から得られたものである。

30

40

【0014】

本発明の別の態様は、宿主におけるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性が高い抗体を同定する方法である。この方法は、上記抗体をコードする遺伝子が、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>3-13、およびV<sub>H</sub>3-64遺伝子のうちの1つであるかどうか判定する工程を含む。

【0015】

本発明の別の態様は、抗体を選択する方法である。この方法は、ある抗体をコードする遺伝子が特定のヒト集団内に出現する頻度を測定する工程と、上記頻度の関数として抗体を選択し、それによって、上記抗体がヒト宿主内でヒト抗ヒト抗体応答を誘導する危険性

50

を低下させる工程とを含む。

【0016】

本発明の別の態様は、抗体がヒト抗ヒト抗体反応を誘導する危険性を低下させるために、患者用の抗体を選択する方法である。この方法は、患者の民族的背景を判定する工程と、上記民族的背景で共通のV遺伝子の出現に合わせて最適化された1セットのV遺伝子を含む抗体を選択し、それによって、上記抗体がヒト抗ヒト抗体応答を誘導する危険性を低下させる工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、上記民族的背景においてどのV遺伝子が共通であるかを最初に判定する工程をさらに含む。一部の実施形態では、上記抗体の実質的にすべてのV遺伝子を、上記民族的背景用に正規化された宿主V遺伝子プロフィールと比較することによって上記抗体を選択する。

10

【0017】

本発明の別の態様は、特定の抗体のために起こるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答の危険性を判定する方法である。この方法は、抗体をコードする遺伝子を同定する工程と、遺伝子の同定物を遺伝子プロフィールと比較する工程と、上記遺伝子プロフィールでの、所定の出現頻度より低い頻度で出現する場合に上記遺伝子に得点をつける工程とを含み、その際、得点が、上記抗体のために起こるHAHA応答の危険性を示す。一部の実施形態では、上記遺伝子プロフィールが個体の遺伝子プロフィールであり、所定の出現頻度が100%である。一部の実施形態では、上記遺伝子プロフィールが、ある集団用に正規化された宿主V遺伝子プロフィールである。一部の実施形態では、上記の正規化された宿主V遺伝子プロフィールが、個体の遺伝子構成に基づいて選択される。一部の実施形態では、上記の正規化された宿主V遺伝子プロフィールが、個体の民族的背景に基づいて選択される。一部の実施形態では、上記の正規化された宿主V遺伝子プロフィールにあるV遺伝子の1つが、所定の出現頻度より低い出現頻度を有し、かつ、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>3-13、およびV<sub>H</sub>3-64からなる群から選択される。一部の実施形態では、上記の所定の出現頻度が、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、および、少なくとも100%からなる群から選択される。

20

【0018】

本発明の別の態様は、特定のヒト集団で免疫応答を誘導する危険性のある抗体を同定するためのトランスジェニック動物である。上記トランスジェニックマウスは、抗原の曝露に応答してヒト抗体を産生する改変されたトランスジェニック動物を含み、その際、上記トランスジェニック動物における1セットのヒト免疫グロブリン遺伝子が、特定のヒト集団の遺伝子セットと同一であり、上記トランスジェニック動物は、上記の特定のヒト集団の遺伝子セット以外のいかなる追加のV遺伝子ももたない。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物が、抗原の曝露に応答して完全ヒト抗体を産生するように改変されている。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物のヒト免疫グロブリン遺伝子セットが、特定のヒト集団の少なくとも50%に存在するものである。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物のヒト遺伝子セットが、特定のヒト集団の少なくとも100%に存在するものである。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物の内在遺伝子座が不活性化されている。一部の実施形態では、上記集団が、1人のヒトからなる。一部の実施形態では、上記集団が、遺伝学的に本質的に近縁な家族からなる。一部の実施形態では、上記集団が、複数の民族にまたがって定義される。一部の実施形態では、上記集団が、1つの民族の中で定義される。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物が、上記トランスジェニック動物を集団と対応付ける識別子をさらに含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニック動物が、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体をさらに含み、上記の完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体が上記トランスジェニック動物にとって外来性のものである。

30

40

【0019】

本発明の別の態様は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性が比較的に高い抗体の検出に使用するためのトランスジェニックマウスである。それは、完全ヒト抗体を発現できるトランスジェニックマウスを含み、上記トランスジェニックマウスは、ヒト免疫グ

50

ロブリン遺伝子セットと、上記トランスジェニックマウス内のヒト抗体とを含み、上記トランスジェニックマウスは、上記トランスジェニックマウスで試験された抗体を受容することになっている患者も欠失している、ヒト免疫グロブリン遺伝子セット内のV遺伝子を欠失しており、上記ヒト抗体は、患者に投与されることになっており、上記ヒト抗体は、上記トランスジェニックマウスにとって外因性の抗体である。

**【0020】**

本発明の別の態様は、特定の患者集団で免疫応答を誘導するであろう抗体を同定する際に使用するためのトランスジェニックマウスである。上記マウスは、抗原の曝露に反応してヒト化抗体を産生するように改変されているトランスジェニックマウスを含み、その際、上記マウスは、ヒト免疫グロブリン遺伝子セットを含み、上記ヒト免疫グロブリン遺伝子セットは、危険性の高いどのような遺伝子も含有しない。一部の実施形態では、上記遺伝子セットがV遺伝子セットである。一部の実施形態では、上記の危険性の高い遺伝子が、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、および $V_H3-64$ である。一部の実施形態では、上記V遺伝子セットが、本質的に、危険性の低い遺伝子からなる。一部の実施形態では、上記の危険性の高い遺伝子が、上記集団の100%に出現する遺伝子以外の任意の遺伝子である。

10

**【0021】**

本発明の別の態様は、患者でヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導しうる抗体を検出するためのキットである。上記キットは、完全ヒト抗体を発現できるトランスジェニックマウスを含み、上記トランスジェニックマウスは、ヒト免疫グロブリン遺伝子と、抗体を上記トランスジェニックマウスに投与する手段とを含み、上記トランスジェニックマウスは、上記トランスジェニックマウスで試験された抗体を受容することになっている患者も欠失しているV遺伝子セットを欠失している。一部の実施形態では、上記キットは、上記トランスジェニックマウスにおけるHAHA応答を検出する手段をさらに含む。一部の実施形態では、上記キットが抗原物質をさらに含み、上記抗原物質は、HAHA応答をそれが誘導するかどうか調べるために試験される抗体に結合するものである。一部の実施形態では、上記抗原物質がT細胞エピトープ(TCE)である。

20

**【0022】**

本発明の別の態様は、ヒトで誘導されるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答の危険性が低下するように抗体を選択する方法である。この方法は、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体をマウスが産生できるようにするヒト遺伝子を含むトランスジェニックマウスに抗体を投与する工程と、上記抗体が上記トランスジェニックマウスにおいてHAHA応答を誘発するかどうかを観測する工程と、上記マウスでHAHA応答を誘発しなかった場合に上記抗体を選択する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、最初に投与した抗体がHAHA応答を誘発した場合に、別の抗体を選択する工程、および、HAHA応答を誘導しない抗体が観測されるまで上記工程を反復することをさらに含む。一部の実施形態では、上記抗体が完全ヒト抗体である。一部の実施形態では、上記抗体がHAHA応答を誘発するかどうかを観測する工程が、上記マウスから得た血液試料に、投与される完全ヒト抗体に結合できる抗体が存在するかどうか試験することを含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスは、上記抗体を受容することになっているヒトと同一のV遺伝子を含む。一部の実施形態では、上記方法は、トランスジェニックマウスが有するヒト免疫グロブリン遺伝子セットと、上記ヒトが有するヒト免疫グロブリン遺伝子セットとの間の類似性に基づいてトランスジェニックマウスを初めに選択する工程とをさらに含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが、上記抗体を受容するヒトと同一の $V_L$ 遺伝子を含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが、上記抗体を受容するヒトと同一の $V_H$ 遺伝子を含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが有するV遺伝子が、上記抗体を受容するヒトと本質的に同一のV遺伝子からなる。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが有する $V_L$ 遺伝子が、上記抗体を受容するヒトと本質的に同一の $V_L$ 遺伝子からなる。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが有する $V_H$ 遺伝子が、上記抗体を受容するヒトと本質的に同一の $V_H$ 遺伝子からなる。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスは、危険性の高い遺伝子を本質的に含まない。一部の実施

30

40

50

形態では、上記トランスジェニックマウスは、本質的に、危険性の低い遺伝子からなる。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスは、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、および $V_H3-64$ 遺伝子からなる群から選択される遺伝子をもたない。

【0023】

本発明の別の態様は、抗体が、患者におけるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性を判定する方法である。この方法は、ヒト抗体またはヒト化抗体を産生できる非ヒト動物に抗体を投与する工程と、HAHA応答が起こるのを可能にするのに十分な時間を置く工程と、上記抗体によってHAHA応答が誘導されたかどうかを観測する工程とを含む。一部の実施形態では、上記非ヒト動物が、トランスジェニックマウスであり、その際、上記マウスの体細胞および生殖細胞のすべてが、Dセグメント遺伝子と、Jセグメント遺伝子と、ヒト免疫グロブリン重鎖のC-デルタ遺伝子座全体を含む定常領域遺伝子とを通して続く、最も近位の5つの $V_H$ 遺伝子セグメントに由来する、ヒト第14染色体のDNA断片を含み、その際、上記断片は、C-ガンマ遺伝子を含み、上記断片は、ヒトC-ガンマ-2領域遺伝子と作用可能に連結している。一部の実施形態では、上記方法は、患者の免疫グロブリン遺伝子セットと、トランスジェニックマウスの免疫グロブリン遺伝子セットとの間の類似性に基づいてトランスジェニックマウスを選択する工程とをさらに含む。一部の実施形態では、上記類似性は、同一の免疫グロブリン遺伝子を上記遺伝子セットが欠失していることである。一部の実施形態では、上記の同一の免疫グロブリン遺伝子が、危険性の高い遺伝子である。

10

【0024】

本発明の別の態様は、抗体によって誘導されるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答の危険性を評価するためのキットである。このキットは、非ヒト動物を含み、上記非ヒト動物は、完全ヒト抗体を産生する手段と、上記非ヒト動物で試験される外因性の抗体と、上記抗体を上記非ヒト動物に投与する手段と、上記非ヒト動物でHAHA応答が起きたかどうか試験する手段とを含む。一部の実施形態では、上記非ヒト動物が、危険性の高い遺伝子をもたない。一部の実施形態では、上記危険性の高い遺伝子が、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、および $V_H3-64$ からなる群から選択される。

20

【0025】

本発明の別の態様は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答の誘導を抑制する薬剤を得るためのスクリーニングに用いるトランスジェニックマウスである。このマウスは、上記トランスジェニックマウスによる、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体の産生が可能となるように設計されたヒト遺伝子と、上記トランスジェニックマウスにおけるHAHA誘導性の抗体とを含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスは、トランスジェニックマウス体内の候補HAHA阻害剤をさらに含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスは、危険性の高いどのような遺伝子をもたない。一部の実施形態では、上記危険性の高い遺伝子が、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、 $V_H3-64$ 、およびこれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、上記HAHA誘導性の抗体が、危険性の高い遺伝子によってコードされている。一部の実施形態では、上記危険性の高い遺伝子が、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、 $V_H3-64$ 、および何らかのこれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0026】

本発明の別の態様は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答の誘導を抑制する薬剤を得るためのスクリーニングの方法である。この方法は、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体の、トランスジェニックマウスによる産生が可能となるように設計されたヒト遺伝子を含むトランスジェニックマウスに、HAHA誘導性の抗体を投与する工程と、上記トランスジェニックマウスに候補HAHA阻害剤を投与する工程と、この結果生じるHAHA応答が抑制されているかどうか、HAHA応答を可能にするのに十分な時間の後に観測する工程とを含む。一部の実施形態では、上記HAHA誘導性の抗体が、危険性の高い遺伝子によってコードされた抗体である。一部の実施形態では、上記HAHA誘導性の抗体が、危険性の高いV遺伝子を有する抗体である。一部の実施形態では、上記HAHA誘導性の抗体が、完全ヒト抗体を産生できるトランスジェニックマウスによって生成される。一部の実施形態では、上記HAHA誘導性の抗体に結

40

50

合する抗体の産生によってHAHA応答をモニターする。一部の実施形態では、HAHA誘導性の抗体をトランスジェニックマウスに投与する前に、候補HAHA阻害剤をトランスジェニックマウスに投与する。一部の実施形態では、複数の候補HAHA阻害剤をトランスジェニックマウスに投与する。

【0027】

本発明の別の態様は、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体と、T細胞エピトープ(TCE)分子とを含む抗体組成物であって、その際、上記TCE分子は上記抗体に連結されている。一部の実施形態では、上記抗体組成物が、上記抗体に結合した複数の抗原物質をさらに含む。一部の実施形態では、上記抗原物質がマレイミド基によって抗体に結合されている。

【0028】

本発明の別の態様は、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答がトランスジェニックマウスで検出される確率を増大させる方法であって、この方法は、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体に抗原物質を結合させる工程と、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体を産生できるトランスジェニックマウスに、結合した抗原物質および抗体を投与して、上記の組合せがHAHA応答を誘導するかどうか判定する工程とを含む。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスがヒト免疫グロブリンV遺伝子を含み、かつ、マウス免疫グロブリンV遺伝子をもたない。一部の実施形態では、上記トランスジェニックマウスが、本質的に、完全ヒト抗体または完全ヒト化抗体を受容することになっている宿主が有するのと同じセットのV遺伝子からなる1セットのV遺伝子を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

一般集団または宿主で過小評価されている抗体遺伝子が、そのような遺伝子によってコードされている治療用抗体の免疫原性に寄与することがある(例えばHAHA応答)のが発見された。これらの遺伝子の同定および特性分析は、治療用の候補モノクローナル抗体を評価する際に補助となであろうし、それを、前臨床開発の時点での危険因子として組み込むことができる。この情報は、HAHA応答が起こる危険性を推算するのに使用できるだけでなく、抗体の生成にも使用することができる。したがって、ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性が低下している抗体を容易に生成および同定することができる。

【0030】

一般的に、抗体がHAHA応答を誘導する危険性を判定することのできる2つのレベルがあり、そのうちの1つが個体であり、もう1つが1つの集団全体にわたるものである(但し、一部の実施形態では、1つの集団が1個体の集団である場合がある)。

【0031】

一態様では、特定の抗体(例えば抗体遺伝子セット)をコードしうる遺伝子を患者または宿主体内の遺伝子(例えば宿主遺伝子セット)と比較することによって、特定の患者または宿主におけるHAHA応答を誘導する危険性が高い抗体を同定することができる。上記抗体をコードする遺伝子と同一の遺伝子を患者または宿主が有する場合、および、宿主で上記遺伝子が発現される場合には、上記抗体が危険性の低い抗体でありうる。上記遺伝子または上記抗体遺伝子によってコードされたタンパク質を宿主がもたない場合には、上記の特定の抗体によって宿主でHAHA応答が起こる危険性がある。したがって、抗体を投与する前に、この薬物の有効性を無効にするか、あるいは重度または生命に関わるアレルギー反応を引き起こすであろうHAHA応答の起こる確率を低下させるために、患者をプレスクリーニングすることが可能であろう。

【0032】

一態様では、集団内の個体で抗体がHAHA応答を誘導する危険性を判定することができる。集団レベルでは、抗体が与えられた場合に、集団内の個体がHAHA応答を経験する危険性を評価するのに、その集団における上記遺伝子の頻度を用いることができる。したがって、上記の方法および組成物は、HAHA応答の危険性を判定するのに、様々なレベルで用いることができる。

【0033】

一部の実施形態は、抗体が個体でヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性を低下させる方法およびシステムに関する。

【0034】

一態様では、患者または患者の集団でHAHA応答を誘導する危険性が低下するように抗体を最適化する方法がその実施形態に含まれる。この方法では、抗体の最適化を、その抗体が免疫グロブリン遺伝子ファミリーに属する1つまたは複数の「危険遺伝子」によってコードされているかどうかを特定することによって行う。これが該当する場合には、患者に投与された際にその抗体がヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する可能性を低下させるために、そのDNAまたはその危険遺伝子によってコードされているタンパク質を改変する。

【0035】

一実施形態では、危険遺伝子が上記抗体の可変ドメインの少なくとも一部をコードする。危険遺伝子は、上記抗体の重鎖または軽鎖のどちらかの免疫グロブリン可変(「V」)領域をコードすることがより好ましい。危険遺伝子は、重鎖V遺伝子( $V_H$ )遺伝子をコードするものでよい。危険遺伝子は、 $V_H3$ 遺伝子をコードすることがさらになお好ましい。別の実施形態では、危険遺伝子が、DまたはJ遺伝子である。別の実施形態では、危険遺伝子が、軽鎖V遺伝子( $V_L$ )またはJ遺伝子である。危険遺伝子は、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、および $V_H3-64$ から選択されることが好ましい。

【0036】

本発明の一部の実施形態は、ある特定のVファミリー遺伝子によってコードされている抗体が、他のV遺伝子によってコードされている抗体よりHAHA応答を誘導する可能性が高いという発見に関する。実施形態はさらに、あるV遺伝子に由来するあるタンパク質断片によってHAHA応答が誘発される可能性が高いかどうか特定することが可能であるという発見に関する。これは、そのV遺伝子によってコードされているタンパク質の一部を含有する抗体を投与することになっている集団内の個体相互で、そのV遺伝子がどの程度一般的であるか検査することによって判定できる。集団全体に出現するV遺伝子およびそれらによってコードされているタンパク質は、HAHA応答を誘発する可能性があまり高くない。反対に、集団内で希少なV遺伝子およびそれらの産物タンパク質は、HAHA応答を誘発する危険性がより高い。

【0037】

各抗体が、V遺伝子ファミリーの特定のメンバーによってコードされている部分を含有しているので、特定のV遺伝子によってコードされている抗体を得るためにスクリーニングすることが可能である。したがって、特定の集団または個体用の抗体が免疫原性(危険性が高い)のV遺伝子によってコードされていることが既知である場合には、潜在的治療用抗体としては、それを除外することができる。同様に、特定の集団用に免疫原性でない(危険性が低い)ことが既知である抗体がV遺伝子によってコードされている場合には、抗体療法に適した候補として、それを選択することができる。これは、各抗体が所望の機能を有し、かつ、各抗体が、HAHA応答を誘導する危険性の低いものである、様々な抗体の大規模なプールの構築を可能に示す。ある集団で、HAHA応答を誘導する危険性が比較的に高いのはどの抗体であるか選択または特定できることによって、そして、抗体のプールからそれらを排除することによって、HAHA応答が起こることに関して多大な懸念をもちずに、多数の様々な抗体を生成および使用することができる。

【0038】

別の態様では、上記方法が、危険性の低い特定の遺伝子(最小出現頻度より高い頻度で出現する遺伝子、またはその個体に存在する遺伝子)の選択に関する。その後、これらの遺伝子に由来する抗体産物は、患者でHAHA応答を誘導する危険性が低いとみなされる。危険性の低い遺伝子の選択、または危険性の高い遺伝子の排除は、DNAに関する実施形態だけではなく、その遺伝子によってコードされたタンパク質に関する実施形態にも適用されることを認識すべきである。したがって、この態様には、危険性の低い遺伝子によってコードされている危険性の低い抗体を選択する方法も含まれる。

【0039】

10

20

30

40

50

別の態様では、上記方法は、特定の患者用の抗体を選択して、その抗体がその患者でHAHA応答を誘導する危険性を最小にすることを対象とする。この態様では、例えば、患者に投与されることになっている抗体をコードする遺伝子セット(抗体遺伝子セット)を、患者における、ゲノムの抗体遺伝子情報、発現された抗体遺伝子情報、または両方を併せた抗体遺伝子情報(宿主遺伝子セット)と比較する。この様にして、患者のゲノムまたは発現抗体レパートリーに存在することが既知である遺伝子によってコードされている投与する抗体を選択することができる。一実施形態では、患者を最初に分析して、その患者の抗体をコードするのに使用されているV遺伝子の存在を判定する。例えば、その患者で、抗体をコードするのにV<sub>H</sub>3-13遺伝子が使用されている場合、そのV<sub>H</sub>遺伝子を用いた抗体は、その患者でHAHA応答を誘発する危険性が低いので、それらを投与することができる。これは、配列または遺伝子の比較によって、あるいは、V遺伝子使用と例えば民族的背景との間の関連データの使用によって実現できる。

10

#### 【0040】

別の態様では、上記方法は、患者の状態のさらなるカスタマイズおよび分析を可能にするために、HAHA応答が起こる可能性を判定することを対象とする。この可能性を知ることによって、患者および医療提供者(care provider)は、その抗体の使用の費用便益分析に関して、より多くの情報に基づいた推測を行うことが可能となる。それは、将来に起こりうる問題に関する追加の情報を提供し、有害な副作用がありそうな場合に、何らかのそのような副作用が現れる前に、患者がHAHA予防処置を開始するのを可能にするであろう。

#### 【0041】

別の態様では、動物システムまたは抗体ディスプレイシステムなどのカスタマイズされたシステムを介して、危険性の低い抗体を生成する方法を提供する。例えば、同定された特定の集団と同じ遺伝子プロフィールまたは遺伝子セットを有するXenoMouse(登録商標)マウスを作製することができる。同様に、HAHAを誘発する可能性が低いと評価されるV遺伝子からのV領域フレームワークのみを使用するために、一定数のV領域フレームワークを用いた抗体ディスプレイライブラリーを事前に選択することもできる。したがって、このカスタマイズされた動物またはディスプレイライブラリーから生成されたいかなる抗体も、その集団にとって危険性の低い遺伝子である遺伝子に由来するものであるであろう。それによって、危険性の高い遺伝子ではない遺伝子によってコードされた、所望の特性を有する抗体が生成される。

20

30

#### 【0042】

別の態様では、抗体がHAHA応答を誘導するかどうか判定するのに、XenoMouse(登録商標)マウスまたはそのカスタマイズバージョンが使用できる。XenoMouse(登録商標)マウスは、潜在的宿主(または宿主集団)と同一の遺伝子セットもつことができるので、候補抗体をXenoMouse(登録商標)マウスに投与して、HAHA応答があるかどうか観察することによって、そのような応答が宿主で起こるかどうか判定することができる。

#### 【0043】

別の態様では、最適化された抗体の様々な遺伝子を決定または選択するのに有用な情報の様々なデータベースを企図する。本明細書で企図されているデータベースには、いくつかの広範なタイプがある。集団内の遺伝子の出現頻度の一般的概念を提供する正規化された宿主V遺伝子プロフィールが存在する。好ましい一実施形態では、上記V遺伝子が、重鎖V遺伝子または軽鎖V遺伝子である。他のデータベースは、D遺伝子およびJ遺伝子を含むか、それらを対象としたものである。好ましい一実施形態では、各遺伝子への危険値の予測および指定に上記出現頻度を用いる。出現頻度が低いほど、集団でのHAHA応答の危険性が高い。

40

#### 【0044】

上記危険性は、様々な様式で集団と関連しうる。一実施形態では、遺伝子の頻度が個体の民族的背景と関連している。別の実施形態では、遺伝子の頻度は、患者の既往歴に基づいて、個体がHAHA応答を有する危険性と関連している。既知のセットの遺伝子を有する抗体を、患者の集団でその抗体がHAHA応答を誘導した発生頻度と比較することによって、そ

50

のようなデータベースを作成することができ、したがって、これらのデータベースを作成する方法も企図されている。さらに、遺伝子クラスター化による相関関係、予測されるタンパク質配列、予測されるタンパク質構造、結合に必要な遺伝子配置、および予測される、遺伝子変更の影響などの追加情報を、これらのデータベースで保存または検査することもできる。これらのデータベースは、高頻度(HAHA応答を誘導する危険性が低い)遺伝子と、低頻度(HAHA応答を誘導する危険性が高い)遺伝子の両方を決定するのに有用でありうる。

#### 【0045】

ヒト抗ヒト抗体応答を誘導する確率の低下を示す様々な最適化された抗体の組成物も存在する。これらの組成物には、アミノ酸および核酸の両方における遺伝子最適化を受けた抗体が含まれ、それらは実質的に純粋なものである場合もある。本明細書に記載の方法によって産生、最適化、または選択された抗体も企図されている。通常の遺伝子または危険性の低い遺伝子のみを含有する遺伝子最適化された抗体も企図されており、選択されたV遺伝子の中に希少な遺伝子を有し、上記希少な遺伝子がタンパク質として機能的に発現されていない遺伝子最適化された抗体も企図されている。これらの遺伝子最適化された抗体の変種も企図されている。

10

#### 【0046】

一実施形態では、「遺伝子最適化された」または「危険性の低い」抗体を、抗体遺伝子セットまたは遺伝子プールから、宿主遺伝子プロフィールまたは正規化された宿主遺伝子プロフィールで一般的な遺伝子を選択することによって産生する。好ましい一実施形態では、上記遺伝子がV遺伝子であり、上記宿主遺伝子プロフィールが宿主V遺伝子プロフィールである。一実施形態では、上記遺伝子最適化された抗体を、XenoMouse(登録商標)マウスまたはそのカスタマイズバージョンから産生する。

20

#### 【0047】

一態様では、本明細書に開示の方法または組成物のいずれも、HAHA応答の危険性を低下させるだけでなく、免疫原性の危険性を全般的に低下させるのにも使用することが企図されている。さらに好ましい実施形態では、本明細書に開示の方法および組成物は、ヒト化抗体、ならびにキメラおよび非ヒト抗体の免疫原性の危険性を低下させるのに企図されている。

#### 【0048】

別の態様では、HAHA応答の危険性を低下させる際に使用することになっている方法および組成物を、HAHA応答の危険性を増大させるのに用いることもできる。

30

#### 【0049】

別の実施形態では、重鎖のD遺伝子およびJ遺伝子、ならびに軽鎖のJ遺伝子およびV遺伝子、さらに、これらの遺伝子の組合せを分析することができ、この開示で使用できるV<sub>H</sub>遺伝子として用いることができる。

#### 【0050】

(定義)

HAHA応答は、抗体のヒト部分に対するヒト宿主、またはその等価物の免疫原性の応答である。上記抗体は、任意の供給源から得られた完全ヒト抗体でよく、例えば、ヒトまたはXenoMouse(登録商標)マウスで産生された抗体でよい。上記抗体は、その抗体の何らかの部分ヒトである限り、ヒト化されたものでもよい。一部の実施形態では、ヒト宿主の等価物がXenoMouse(登録商標)マウスである。したがって、XenoMouse(登録商標)マウスは、例えば、投与されたヒト抗体、ヒト化抗体、ヒトタンパク質配列を含有するか、もしくはヒト核酸配列によってコードされている抗体、またはXenoMouse(登録商標)マウス抗体に対してHAHA応答を有することができる。

40

#### 【0051】

HAHA応答は、危険遺伝子によってコードされているタンパク質によって誘導される可能性が最も高いが、分析およびデータ収集の多くは、遺伝子レベルでの比較を含みうる。この理由から、そして開示を容易にするために、「V遺伝子」、「危険性の高い遺伝子」、

50

および「危険性の低い遺伝子」という用語は、遺伝物質のみを記述するのではなく、その遺伝物質によってコードされているタンパク質を記述するのにも使用することがある。したがって、本明細書の目的では、抗体タンパク質が「危険性の高い遺伝子を有するか、もしくは含む」ことができる。これは、抗体タンパク質がDNAの断片に結合していることを示唆するものではない。むしろ、それは、その抗体が、それらの遺伝子によってコードされるタンパク質断片を含有するという事実を示す。この実施形態の多くの特徴の1つは、遺伝子(またはその遺伝子によってコードされたタンパク質)と、HAHAの危険性との間の相関関係であるので、実際の遺伝子に言及するのか、あるいはそのタンパク質について論じるのかにかかわらず、これらの構造は、一般的に、遺伝子の単位で論じるのが好都合である。したがって、「V<sub>H</sub>3-9遺伝子を有する抗体」は、実際には、その抗体の中にV<sub>H</sub>3-9遺伝子によってコードされたタンパク質断片があることを意味する。しかし、「遺伝子」という用語のこのような使用は、ある種(例えば抗体)のタンパク質について記述する場合にのみ適用される。したがって、別段の指定がない限り、V<sub>H</sub>3-9遺伝子を有するマウス、またはV<sub>H</sub>3-9遺伝子を有するベクターは、実際のDNA物質を指す。さらに、一部の実施形態では、「危険性」という用語を、「可能性」という用語で置換することができる。したがって、例えば、HAHA応答が起こる可能性を決定すること、あるいは、HAHA応答を誘導する確率の高い遺伝子を同定または操作することができる。当業者ならば理解するであろうが、これらの用語は、状況によって、互換性をもって使用されうる。

10

#### 【0052】

「宿主V遺伝子プロフィール」は、潜在的な宿主または患者のV遺伝子セットを指す。上記プロフィールは、宿主の遺伝子型に関する情報を有し、それらの遺伝子が、宿主で、タンパク質形態またはmRNAの形態で出現する頻度に関する情報を有する場合もある。プロフィールは、個体または集団に関して存在しうる。そのようなプロフィール、それを構成する生データ、およびプロフィールの代替的変形形態の例を図1A~Dに示す。抗体内の遺伝子を、宿主V遺伝子プロフィールにある遺伝子と比較することによって、その潜在的な遺伝子が、その宿主で一般的であるかどうか判定でき、それによって、その遺伝子がHAHA応答を誘導する可能性が高いかどうか判定できる。同様に、上記プロフィールにある遺伝子の使用の頻度を抗体内の遺伝子と比較すれば、HAHA応答が起こる確率がより大きなものであるかどうか判定できる。「宿主V遺伝子セット」は、個体に関する「宿主V遺伝子プロフィール」と互換性をもって使用することができ、単に、宿主の関連遺伝子セットを指す。

20

30

#### 【0053】

「正規化された宿主V遺伝子プロフィール」は、何らかの基準によって正規化された宿主V遺伝子プロフィールを指す。正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、多くの様々な方法で正規化されたものでありうる。例えば、単純なレベルでは、それは、ある遺伝子が任意の所与の集団に出現する頻度を示すために何人かにわたって正規化されたものである。「家族」に関して正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、遺伝学的に近縁な家族の構成員にどの遺伝子がどのような頻度で出現するかを決定するために、それら家族構成員の宿主V遺伝子プロフィールを使用するものとなる。民族に関して正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、特定の民族における特定の遺伝子の平均出現頻度を決定するために、上記特定の民族の様々な構成員を比較するものとなる。「ヒト」に関して正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、相対的な出現頻度を評価したものとなり、宿主がヒトでなければならぬという事実を別にして、定義における他のいかなる特徴ももたない。正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、どの遺伝子が危険遺伝子であるか、そして、どの遺伝子が少なくとも通常程度の出現頻度で出現するかの判定を可能にする。正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、様々な人々の遺伝子を含有するであろうから、その結果は、その集団全体における各遺伝子の出現頻度として集計される。非ヒト生物に関しては、他のプロフィールも存在する場合がある。例えば、ネコ、ネズミ、ブタ、イヌ、ウマなどに関して、正規化された宿主V遺伝子プロフィールを作成することができよう。生物種にまたがった宿主V遺伝子プロフィールを作成することもできる。これらのプロフィールは、V遺伝子、またはV遺伝子の機能的な等価システムを含有するいかなる生物にも使用でき

40

50

る。正規化された宿主V遺伝子プロフィールが大きいほど、遺伝子最適化された抗体それぞれのカスタマイズの程度が低くなり、それによって、その遺伝子最適化された抗体がHAHA応答を誘導する可能性が高くなるであろう。これらの比較的大きな正規化されたプロフィールから選択された遺伝子最適化抗体は、「普遍的遺伝子最適化抗体」を産生するのに用いることができる。これらの抗体は、宿主動物でHAHA応答を誘導する危険性の低いものでありうるが、それでもなお、様々な宿主V遺伝子プロフィールを有する多くの様々な生物または患者に使用することができる。これらの普遍的に最適化されたV遺伝子抗体遺伝子は、治療される患者のV遺伝子プロフィールの決定が好都合でない場合に有用であることがある。

#### 【0054】

ある集団において、「危険遺伝子」とは、正規化された宿主V遺伝子プロフィールにおけるその出現頻度が低いため、抗体内でのその存在が、患者でHAHA応答を誘導する顕著な危険性を示す遺伝子である。一実施形態では、危険遺伝子は、遺伝子プロフィールに1%未満のときに出現する。別の実施形態では、ある遺伝子の出現頻度が、正規化された宿主V遺伝子プロフィールの約100%未満、例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、30%、49%、50%、70%、または99%である場合に、その遺伝子が危険遺伝子であるとみなされる。これは、「危険性の高い遺伝子」とも呼ばれる。一実施形態では、危険遺伝子は、所定の出現頻度より少ない出現頻度で出現する任意の遺伝子である。個体では、「危険性の高い遺伝子」は、その個体がもたない遺伝子、またはタンパク質を発現しない遺伝子である。当業者に理解されているように、危険性の高い遺伝子は、それ自体がHAHA応答を誘導する原因でない場合もある。本明細書で使用される場合、「危険性の高い遺伝子」という用語は、その遺伝子によってコードされているタンパク質によって、HAHA応答が誘導される危険性が高いという事実を示す。しかし、この情報を取得し、それを適用できる様々な技法が存在するため、これらの遺伝子を、単に危険性の高い遺伝子と呼ぶ方が、危険性の高い遺伝子によってコードされたタンパク質と呼ぶより、むしろ簡単かつ正確であることが多い。

#### 【0055】

「危険性の低い遺伝子」は、HAHA応答を誘導する顕著な危険性を示さない遺伝子である。別法では、HAHA応答を誘導する危険性を、危険性の低い遺伝子が実際に低下させることもある。集団では、これらの遺伝子を、宿主V遺伝子プロフィールにおける、それらの一般的な出現頻度によって同定することができる。ある遺伝子が少なくとも約1~100%、例えば、1%、5%、10%、15%、20~29%、30~39%、40~49%、50~59%、60~69%、70~79%、80~89%、90~94%、95%、99%、100%の頻度で出現する場合、その遺伝子は危険性の低い遺伝子である。危険性の低い遺伝子は、「通常の遺伝子」と呼ぶこともできる。一実施形態では、危険性の低い遺伝子は、ある集団で、最小または所定の出現頻度より高い頻度で出現する遺伝子である。個体では、危険性の低い遺伝子は、その個体によって発現される遺伝子であって、そのため、HAHA応答の危険性が低い。当業者に理解されているように、危険性の低い遺伝子は、それ自体がHAHA応答を誘導しないことの原因ではないことがある。本明細書で使用される場合、「危険性の低い遺伝子」という用語は、その遺伝子によってコードされているタンパク質によってHAHA応答が誘導される危険性が低いという事実を示す。しかし、この情報を取得し、それを適用できる様々な技法が存在するため、これらの遺伝子を、単に危険性の低い遺伝子と呼ぶ方が、危険性の低い遺伝子によってコードされたタンパク質と呼ぶより、むしろ簡単であることが多い。当業者ならば理解するであろうが、最小の出現頻度は、特定の状況と、患者にとって望ましい治療とに応じて異なる場合がある。当業者ならば、この開示に照らして、望ましい最小の出現頻度(または所定の出現頻度)を容易に決定または設定することができよう。上述の通り、一部の実施形態では、「危険性が低い」または同様の用語は、「可能性が低い」という用語で置換することができる。

#### 【0056】

「抗体遺伝子セット」は、特定の1つまたは複数の抗体をコードする遺伝子セットであ

10

20

30

40

50

る。この遺伝子セット全体を「最適化する」ことができ、これは、この遺伝子セットの遺伝子の組成が、可能性のある宿主遺伝子セット(例えば個体または集団の宿主V遺伝子プロフィール)とある程度の類似性を共有することを意味する。この遺伝子セットは、重鎖のV、D、およびJ遺伝子、ならびに軽鎖のVおよびJ遺伝子からなる。遺伝子セットは、上記遺伝子のすべてを含むこともある。

【0057】

「V遺伝子」は、免疫グロブリン可変領域遺伝子である。

【0058】

ヒト免疫グロブリンV<sub>H</sub>(可変、重鎖)の生殖系列レパートリーには、少なくとも123のエレメントが含まれ(Matsudaら、J Exp Med.、188、2151~2162頁(1998))、これらのうち、41が機能遺伝子を表す。いくつかの研究は、多型およびレパートリー発現について、時に民族性、年齢、または性別との関連において取り組んだ。これらの報告は、単一またはごくわずかなドナーに依存するもの(Hufnagleら、Ann N Y Acad Sci.、764、293~295頁(1995); Demaisonら、Immunogenetics、42、342~352頁(1995); Wangら、Clin Immunol.、93、132~142頁(1999); Raoら、Exp Clin Immunogenet.、13、131~138頁(1996); Brezinschekら、J Immunol.、155、190~202頁(1995); および、Rassentiら、Ann N Y Acad Sci.、764、463~473頁(1995))、白血病または自己免疫性患者を分析したもの(Dijk-Hardら、J Autoimmun.、12、57~63頁(1999); Logtenbergら、Int Immunol.、1、362~366頁(1989); Dijk-Hardら、Immunology、107、136~144頁(2002); Liら、Blood、103、4602~4609頁(2004); Messmerら、Blood、103、3490~3495頁(2004); Johnsonら、J Immunol.、158、235~246頁(1997))、限定された数の遺伝子に注目したもの(Pramanikら、Am J Hum Genet.、71、1342~1352頁(2002); Raoら、Exp Clin Immunogenet.、13、131~138頁(1996); Huangら、Mol Immunol.、33、553~560頁(1996); および、Sassoら、Ann N Y Acad Sci.、764、72~73頁(1995))、あるいは、使用されたV<sub>H</sub>遺伝子をファミリーによって分類したものの(Hufnagleら、Ann N Y Acad Sci.、764、293~295頁(1995); Rassentiら、Ann N Y Acad Sci.、764、463~473頁(1995); Logtenbergら、Int Immunol.、1、362~366頁(1989); Ebelingら、Int Immunol.、4、313~320頁(1992)); および、Feuchtenbergerら、J Immunol Methods、276、121~127頁(2003))であった。V<sub>H</sub>に加えて、様々なV<sub>L</sub>(可変、軽鎖)遺伝子も企図されている。V<sub>L</sub>遺伝子には、V<sub>kappa</sub>遺伝子座によってコードされているものと、V<sub>lambda</sub>遺伝子座によってコードされているものがある。この開示を前提として、当業者ならば、現行の教示を適用して、様々なV<sub>lambda</sub>遺伝子に関する様々なHAHA関連の問題を決着できるであろう。これらのV遺伝子の様々な配列が配列番号15~266に含まれており、V<sub>H</sub>、V<sub>lambda</sub>、およびV<sub>kappa</sub>の様々な遺伝子それ自体の一部が図8ならびに図17A~17I、18A~18P、19A~19G、20A~20L、21A~21F、および22A~22Jに示されている。

【0059】

「最適化された遺伝子」は、抗体内(抗体の一部をコードする点において)、および潜在的宿主の遺伝子の両方に存在する遺伝子である。この遺伝子がV遺伝子である場合、それが、「正規化された宿主V遺伝子プロフィール」にあるなら、あるいは、同様に個体とそのV遺伝子を有するなら、その遺伝子を最適化することができる。そのような遺伝子は、本明細書で論じたいくつかの例外を除いて、通常、「危険性の低い」遺伝子と考えられる。ある遺伝子が宿主にとって危険性の低い遺伝子であると同定された場合、その遺伝子を最適化することができる。別法では、抗体内の遺伝子と宿主遺伝子プロフィールとを比較した後に、その遺伝子が宿主遺伝子プロフィールの遺伝子に、より正確に類似するように、その遺伝子を改変した場合に、その遺伝子を最適化することができる。例えば、ある抗体のある遺伝子が宿主遺伝子プロフィールに存在しないかもしれず、その場合、その遺伝子の欠失によって、それが最適化されることとなる。

【0060】

「遺伝子最適化された抗体」は、少なくとも1つの危険性の低い遺伝子を有する抗体である。遺伝子最適化された抗体は、作製または選択することができる。V遺伝子最適化された抗体が作製された場合、その抗体は、宿主V遺伝子プロフィールにとって危険性の低

い少なくとも1つの遺伝子を含有する。遺伝子最適化された抗体が選択された場合、その抗体では、危険性の低い遺伝子が相対的に増加しているか、あるいは危険性の高い遺伝子が相対的に減少している。一実施形態では、遺伝子最適化された抗体は、その抗体の遺伝子セットおよび潜在的宿主の遺伝子によって定義される類似性に基づいて選択された抗体である。別の実施形態では、遺伝子最適化された抗体は、潜在的宿主のV遺伝子プロフィールと異なる遺伝子をできるだけ少なく含有するように構築または作製された抗体である。別の実施形態では、D遺伝子が宿主D遺伝子プロフィールに出現する場合に、その遺伝子が最適化されていることとなる。別の実施形態では、J遺伝子が宿主J遺伝子プロフィールに出現する場合に、その遺伝子が最適化されていることとなる。

#### 【0061】

本明細書で使用される場合、従来20種のアミノ酸およびそれらの簡略名は、慣例的用法に従ったものである。「Immunology - A Synthesis」(第2版、E.S. GolubおよびD.R. Gren編、Sinauer Associates社、Sunderland, Mass. (1991))を参照のこと。従来20種のアミノ酸の立体異性体(例えばDアミノ酸)、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の通常にはないアミノ酸などの非天然のアミノ酸も、本発明のポリペプチドの適切な構成要素でありうる。通常にはないアミノ酸の例には、4-ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタメート、 $\epsilon$ -N,N,N-トリメチルリシン、 $\epsilon$ -N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、 $\omega$ -N-メチルアルギニン、および他の同様のアミノ酸およびイミノ酸(例えば4-ヒドロキシプロリン)が含まれる。本明細書で使用するポリペプチド表記法では、標準的用法および慣習に従って、左方向がアミノ末端の方向であり、右方向がカルボキシ末端の方向である。

#### 【0062】

同様に、別段の指定がない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端が5'末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左方向を、5'方向と呼ぶ。新生RNA転写産物における5'から3'への付加の方向を転写方向と呼び、RNAと同じ配列を有するDNA鎖上において、RNA転写物の5'末端に対して5'側にある配列領域を「上流配列」と呼び、RNAと同じ配列を有するDNA鎖上において、RNA転写物の3'末端に対して3'側にある配列領域を「下流配列」と呼ぶ。

#### 【0063】

「抗体」または「抗体ペプチド」という用語は、完全な抗体、または特異的な結合に関して完全な抗体と競合する、その結合性断片を指す。結合性断片は、組換えDNA技法、または完全な抗体の酵素的もしくは化学的切断によって産生する。結合性断片には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および一本鎖抗体が含まれる。結合性断片には、単一VHドメインディスプレイライブラリーから産生されるもの、またはラクダ抗体から派生したものなどの「単一ドメイン」抗体も含まれる。「二重特異性」または「二機能性(bifunctional)」の抗体以外の抗体は、それぞれ同一の結合部位を有するものと理解されている。カウンター受容体に結合した受容体の数量を、過剰量の抗体が少なくとも約20%以上、40%以上、60%以上、または80%以上、通常約85%超(in vitro競合結合アッセイによって測定される)減少させた場合に、その抗体は、カウンター受容体への受容体の結合を実質的に阻害する。抗体は、結合を阻止できるだけでなく、結合および様々な酵素過程を補助することもできる。さらに、通常はリガンドが行うように受容体を単独で活性化できる抗体を作製することができる。

#### 【0064】

抗体の基本的構造単位が四量体を含むものであることが知られている。各四量体は、各対が1本の「軽」鎖(約25kDa)および1本の「重」鎖(約50~70kDa)を有する同一な2対のポリペプチド鎖で構成されている。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に参与する約100~110アミノ酸以上の可変領域を含有する。重鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に参与する定常領域を定める。ヒト軽鎖は、 $\kappa$ 軽鎖または $\lambda$ 軽鎖のどちらかに分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、または $\alpha$ に分類され、抗体のアイソタイプ

10

20

30

40

50

をそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEに定める。軽鎖および重鎖の中では、可変領域および定常領域が、約12アミノ酸以上の「J」領域によって連結され、重鎖は、約10アミノ酸以上の「D」領域をさらに含有する。全般的に、「Fundamental Immunology」、Ch. 7 (Paul, W. 編、第2版、Raven Press社、N.Y. (1989))を参照のこと。各軽鎖/重鎖対の可変領域が抗体結合部位を形成する。

#### 【0065】

したがって、完全な抗体は、抗体のアイソタイプに応じて、2~10箇所の結合部位を有する。二機能性または二重特異性の抗体を除けば、それらの結合部位は同一である。

#### 【0066】

軽鎖および重鎖はすべて、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)が、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3本の超可変領域によって連結されている同一の一般構造を示す。各対における2本の鎖のCDRがフレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープへの結合が可能となる。軽鎖および重鎖の両方が、N末端からC末端の方向に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4ドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の帰属は、「Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest」(米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)、Bethesda, Md. (1987、1991))、またはChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol., 196、901~917頁(1987); Chothiaら、Nature、342、878~883頁(1989)の定義に従ったものである。

#### 【0067】

二重特異性または二機能性抗体は、2対の異なった重鎖/軽鎖対と、2箇所の異なった結合部位とを有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab断片の連結を含めた様々な方法で産生できる。例えば、SongsivilaiおよびLachmann、Clin. Exp. Immunol., 79、315~321頁(1990)、ならびに、Kostelnyら、J. Immunol., 148、1547~1553頁(1992)を参照のこと。二重特異性抗体の産生は、従来の抗体産生に比べて、比較的労力のかかる過程となることがあり、また、通常、二重特異性抗体の収率および純度は低い。二重特異性抗体は、単一の結合部位を有する断片(例えばFabおよびFv)の形態では存在しない。

#### 【0068】

重鎖可変領域は、V、D、およびJ遺伝子セグメントからなり、それらが再編成されて、その結果、可変領域の大きい多様性が生じる。哺乳類ゲノムには、V領域、D領域、およびJ領域のそれぞれをコードする多重遺伝子が存在し、それらのいずれもが、組換え過程で連結されて成熟した抗体鎖をコードすることができ、それによって、より大きな多様性が生じる。同様に、軽鎖可変領域は、それぞれ、多数のJ またはJ 遺伝子のうちのいずれかを伴った、哺乳類ゲノムに存在する多数のV およびV 遺伝子から選択されたV (すなわちVkもしくはV<sub>kappa</sub>) 遺伝子またはV (すなわちV<sub>lambda</sub>) 遺伝子の組合せからなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、N配列の導入など、他の改変も行い、それによって、可変領域の可変性および特異性をさらに増強する。したがって、V<sub>H</sub>領域は、いくつかの異なった重鎖V、D、およびJ遺伝子からなるいずれか1つの組合せであり、V<sub>L</sub>領域は、いくつかの異なった軽鎖VおよびJ遺伝子からなるいずれか1つの組合せであり、それらは、いくつかの異なった機構によって生成および改変される。

#### 【0069】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体への特異的な結合、または他の様式での分子との相互作用が可能なタンパク質決定部位のいかなるものも含まれる。エピトープ決定部位は、通常、アミノ酸、炭化水素、または糖側鎖などの、表面の化学的に活性な分子群からなり、通常、特定の三次元の構造特性と、特定の荷電特性とを有する。エピトープは、「線形」または「立体構造依存型」でありうる。線形エピトープでは、タンパク質および相互作用分子(抗体など)が相互作用する点すべてが、そのタンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に現れる。立体構造依存型エピトープでは、相互作用する点が、相互に分離された、そのタンパク質上のアミノ酸残基全体にわたって現れる。解離定数が 1 μM、好ましくは 100nM、そして最も好ましくは 10nMのときに、抗

10

20

30

40

50

体は抗原に特異的に結合するとされる。ひとたび抗原上の望ましいエピトープが決定されたならば、そのエピトープに対する抗体を生成させることが可能である。あるいは、探索過程に、抗体の産生および特性分析によって、望ましいエピトープに関する情報が解明されることがある。この情報から、同一のエピトープに結合するものを得るために抗体を競合的にスクリーニングすることが可能となる。これを実現するための方法は、相互に競合的に結合する抗体を見出すための交差競合試験を実施することであり、例えば、これらの抗体は、抗原への結合に関して競合する。「結合」抗体をそれらの交差競合に基づいて得るための高スループット法が、国際特許出願第03/48731号に記載されている。当業者ならば理解するであろうが、抗体が特異的に結合できる事実上すべてのものがエピトープでありうるであろう。エピトープは、抗体が結合する残基を含むことができる。当業者ならば理解するであろうが、分子の形を形成する残基または側鎖が占有する空間は、何がエピトープであるかを判定するための補助となる。同様に、エピトープに関連したいかなる官能基、ファンデルワールス相互作用、および側鎖の運動性の程度なども、すべてエピトープが実際に何であるかを決定することができる。したがって、エピトープには、エネルギーの相互作用も含まれる場合がある。

10

20

30

40

50

**【0070】**

「パラトープ」という用語は、エピトープへの結合を決定する結合領域の一般構造を記載するものとする。この構造は、結合領域がエピトープに結合するか否か、そして、どのような様式で結合するかに影響を与える。パラトープは、抗体またはその断片が抗原決定基に結合する原因となる、抗体の抗原部位を指す場合がある。パラトープは、抗体のイデオトープ、およびエピトープに結合する相補性決定領域(CDR)も指す。

**【0071】**

「特異的に」または「選択的に (preferentially)」結合するという用語は、または同様の語句は、その抗体が排他的にそのエピトープに結合することを意味するものではない。むしろ、それによって意味されることは、エピトープへの抗体またはその変種の結合が、その抗体が曝露されている他の少なくとも1つの物質への結合よりも高い程度で起こることを意味する。

**【0072】**

「薬剤」という用語は、生体物質から作製された化学化合物、化学化合物の混合物、生体高分子、または抽出物を指示するものとして本明細書で使用されている。

**【0073】**

本明細書で使用される場合、「哺乳動物」は、哺乳動物とみなされているいかなる動物も指す。哺乳動物は、ヒトであることが好ましい。

**【0074】**

抗体を酵素パピインで消化すると、「Fab」断片としても知られている2つの同一な抗原結合性断片と、抗原結合性活性をもたないが、結晶化能を有する「Fc」断片とが生じる。抗体を酵素ペプシンで消化すると、F(ab')<sub>2</sub>断片が生じ、F(ab')<sub>2</sub>断片では、抗体分子の2本の腕が連結された状態で残り、それらは、2箇所の抗原結合部位を含む。F(ab')<sub>2</sub>断片は、抗原を架橋する能力を有する。

**【0075】**

本明細書で使用される場合、「Fv」は、抗原認識部位および抗原結合部位の両方を保持する、抗体の最小断片を指す。これらの断片は、抗体の変種とみなすこともできる。

**【0076】**

本明細書で使用される場合、「Fab」は、軽鎖の定常ドメインと、重鎖のCH1ドメインとを含む抗体の断片を指す。

**【0077】**

「mAb」という用語は、モノクローナル抗体を指す。

**【0078】**

本明細書で使用される場合、「標識」または「標識された」は、ポリペプチドへの検出可能な部分、例えば放射性標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識、またはビオチン基

などの付加を指す。放射性同位元素または放射性核には、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ が含まれることがあり、蛍光標識には、ローダミン、ランタニド発光体、またはFITCが含まれることがあり、そして、酵素標識には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼが含まれることがある。

【0079】

本明細書で使用される場合、「医薬品または薬物」という用語は、患者に適切に投与された際に、望ましい治療効果を誘導できる化学化合物または組成物を指す。本明細書における他の化学用語は、「The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms」(Parker, S. 編、McGraw-Hill社、San Francisco (1985))に例示される、当技術分野における慣例的用法に従って使用されている。

10

【0080】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋である」は、対象の化学種が、存在する中で支配的な種である(すなわち、モルベースで、それが組成物中のいかなる他の個別の化学種よりも豊富である)ことを意味し、好ましくは、実質的に精製された画分は、対象の化学種が、存在するすべての高分子化学種の少なくとも約50パーセント(モルベース)を構成する組成物である。通常、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80パーセント超、より好ましくは約85%、90%、95%、または99%超を構成する。最も好ましくは、対象の化学種が、本質的に均質な状態(従来の検出法によって組成物中に夾雑化学種を検出することができない)にまで精製され、組成物は、本質的に単一の高分子種からなる。

20

【0081】

「患者」という用語には、ヒト対象、および獣医学対象が含まれる。

【0082】

「SLAM(登録商標)技法」という用語は、「選択リンパ球抗体法(Selected Lymphocyte Antibody Method)」を指す(Babcookら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、i93、7843~7848頁(1996)、およびSchrader、米国特許第5627052号)。

【0083】

「XENOMAX(商標)」という用語は、XenoMouse(登録商標)マウスを用いたSLAM技法の使用(以下に記載の通り)を指す。

30

【0084】

(危険性の高い遺伝子を同定する方法)

患者、集団、または集団内の個体でHAHA応答を誘導する危険性の高い遺伝子またはその危険性が低い遺伝子の同定は、その遺伝子が患者または集団でどの程度の頻度で出現するかを決定することによって実現できる。集団および集団内の個体に関しては、集団で比較的一般的な $V_H$ 遺伝子が、集団におけるランダムな構成員でHAHA応答を誘導する危険性が低い。集団で比較的希少な遺伝子は、宿主患者でHAHA応答を誘導する危険性が高い。同様に、個体に存在する $V$ 遺伝子は、その個体にとって危険性の低い遺伝子であり、一方、個体に存在しない $V$ 遺伝子は、その個体にとって危険性の高い遺伝子である。したがって、特定の遺伝子を発現する抗体がHAHA応答をもたらすことになるか否かの判定は、ある集団に特定の遺伝子が見出される頻度に関する情報を含むデータベースによって行うことができる。一実施形態では、ある集団に関して、このデータベースは、正規化された宿主 $V$ 遺伝子プロフィールである。抗体の遺伝子セットを、この正規化された宿主 $V$ 遺伝子プロフィールと比較することによって、危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子の存在を予測することができる。遺伝子構成において、その集団と患者との類似性が高い程、より良い予測となるはずである。

40

【0085】

下記より詳細に論ずるように、危険性の高い遺伝子、危険性の低い遺伝子、およびそれらによってコードされた抗体は、実験的にも、例えば、宿主または宿主集団のもの以外に $V$ 遺伝子をもたないXenoMouse(登録商標)マウスに候補抗体を投与することによっても測定

50

することができる。XenoMouse(登録商標)マウスがHAHA応答を示すなら、その遺伝子、およびその遺伝子によってコードされた抗体は、危険性の高い遺伝子であろう。

【0086】

(正規化された宿主V遺伝子プロフィール)

正規化された宿主V遺伝子プロフィールは、集団における遺伝子の頻度を反映する。この相関を記載することができる代替手段がいくつかある。例えば、図1Aには、5人の異なったヒトの様々なV遺伝子の例が示されている。図1Aは、宿主の遺伝子うちの選択されたものを表し、空間的な順序または他の配置におけるいかなる相関の示唆も意図したものではない。図1Bに示す通り、これから、あるいは、これの代わりに、プロフィールを集録するのに、タンパク質発現またはmRNAを使用することができる。この例では、遺伝子A、C、D、およびEのみがmRNAまたはタンパク質として発現されている。図1Aのデータから、出現頻度を決定することができ、その結果が図1Cに提示されている。別法では、患者における遺伝子頻度の関数として出現頻度を得ることができ、その場合、遺伝子が0コピー、1コピー、または2コピーで出現するという事実が上記の分析にさらに影響を与えるであろう。

10

20

30

40

50

【0087】

さらに、遺伝子の頻度だけではなく、実際に発現されるタンパク質の頻度を考慮することも重要である場合がある。したがって、「正規化された宿主Vタンパク質プロフィール」または「mRNAプロフィール」も、同様に、比較の適切な手段でありうる。好ましい一実施形態では、正規化された宿主V mRNAプロフィールが決定されうる。これら最後の2つのプロフィールは、それらの遺伝子が、一般的ではあるが、単純にタンパク質産物を産生しないことに関する危惧をなくすという追加の利益を有する。これは、抗体の改変がなければ通常は発現されていないかもしれない改変抗体内の遺伝子に特に重要であるかもしれない。したがって、抗体が改変されることになっている状況では、機能的に発現されないいかなる遺伝子も除去することが有利である場合もある。それらの遺伝子の出現頻度は、図1Dに見ることができる。ここでは、図1Bに示されている通り、A、C、D、およびEのみが転写または翻訳されている。

【0088】

好ましい一実施形態では、実際には、各遺伝子から転写されたmRNAが、プロフィール相互で検査および比較される単位である。したがって、正規化された宿主V mRNAプロフィール、およびその使用は、企図されている実施形態である。当業者に理解されているように、mRNAプロフィールは、遺伝子が転写されたかどうかを表すプロフィールが所望のときにいつでも用いることができ、したがって、DNA配列より有用である場合がある。アミノ酸配列もこのタイプの情報を提供するであろう。そして、アミノ酸配列は、保存されている構造的に重要な領域を有する可能性がより大きいであろう。

【0089】

抗体タンパク質の頻度は、少なくとも2つのレベルで検査することができる。正規化されたレベルでは、タンパク質の頻度は、特定の遺伝子のタンパク質産物が所与のヒトで産生されているか否かによって決定される。別のレベルでは、それぞれのヒトの中で、特定の遺伝子のタンパク質産物の使用頻度を検査する。この状況では、そのヒトの抗体の間で一般的なタンパク質産物をその遺伝子が生成するなら、その遺伝子は、非常に高い出現頻度を有し、したがって、危険性の低い遺伝子であろう。

【0090】

図1で生成された様々な頻度は、個体または集団における各遺伝子の出現をどのように数えるかによって、生成される頻度が影響されることがあり、それによって、後の工程で実施される過程も影響されうることを実証するものである。さらに、図1Cと図1Dとの比較は、核酸ベースの遺伝子アプローチと、アミノ酸(またはmRNA)プロフィールアプローチとの間で大きい相違が生じる可能性があることを明らかにする。正規化された宿主V遺伝子プロフィールを対象とするすべての実施形態は、正規化された宿主Vタンパク質プロフィールとしても作製でき、また、そうであることが好ましい。

## 【0091】

これら2つのレベルの分析を併せて、正規化された宿主V遺伝子タンパク質プロフィールを産生することができ、その場合、何が危険性の低い遺伝子または高い遺伝子であるかを決定する際に、両方の因子が考慮される。この併用アプローチは、そうでなければプロフィール内に少数の試料しかない場合に特に有用となりうる。

## 【0092】

下記に論じる通り、構造的に正規化された宿主V遺伝子プロフィール(または正規化された宿主Vタンパク質構造プロフィール)も存在しうる。代替の実施形態には、これらのプロフィールのDおよびJバージョンが含まれるであろう。

## 【0093】

(正規化された宿主V遺伝子プロフィールを用いた比較)

ひとたび宿主V遺伝子プロフィールが得られれば、問題の抗体または作製されるべき未来の抗体の遺伝子セットに対して情報を比較することができる。配列を比較するのに可能な方法は多数あるが、本明細書で記述する比較は、好ましい実施形態の多くで、遺伝子ごとの比較を用いた比較を行うものである。但し、より高いレベルでの比較も、すべての実施形態で企図されている。

## 【0094】

図2は、情報の断片を比較するいくつかの異なった方法を示し、そして、その情報をどのように分析するかに応じて、その情報がどのように異なったものになりうるかを示す。図2Aから始めて、A遺伝子を、遺伝子プロフィールにおけるその遺伝子の頻度と比較すると、遺伝子Aの出現頻度が100%であるので、この遺伝子がこのプロフィールで一般的であることが明らかになる。これは、mRNAレベルの分析である場合もあろう。

## 【0095】

異なったレベルの分析では、図2Bで、遺伝子Aのタンパク質配列をタンパク質またはmRNAプロフィールと比較すると、再度、出現頻度が100%であるという結果が得られる(遺伝子Aは再度、プロフィール中に100%の頻度で出現するので)。

## 【0096】

最後に、別のレベルの分析では、図2Cで、遺伝子Aによってコードされたタンパク質の構造を構造プロフィールと比較すると、そのタンパク質構造の出現頻度が100%であるので、再度、このタンパク質構造が非常に一般的であることが明らかになる。

## 【0097】

次の遺伝子である遺伝子Bも、3つの異なった方法を用いて比較する。第1のレベルでの比較では、図2Aで、プロフィールに見ることができるよう、遺伝子Bは、高い出現頻度、すなわち100%で出現するので、危険性の低い遺伝子として解釈されるであろう。mRNA/アミノ酸配列レベルでの分析では、図2Bに示されているように、B遺伝子タンパク質産物は、この集団に存在していない。したがって、B遺伝子を、危険性の高い遺伝子として分類することができる。最後に、タンパク質構造レベルでは、図2Cで、B遺伝子は、それが生成されているとしても、構造プロフィールに存在しない構造を提示し、したがって、遺伝子Bは、危険性の高い遺伝子であるとみなされるであろう。したがって、遺伝子Bは、危険性の高い遺伝子であるとみなすことができる。

## 【0098】

次の遺伝子である遺伝子Cも、これらの異なった方法を用いて比較する。図2Aでは、遺伝子Cの出現頻度が遺伝子プロフィールの10%にすぎないので、この遺伝子を潜在的に危険性の高い遺伝子と解釈することができよう。図2Bでは、遺伝子Cの出現頻度が、依然として、mRNA/タンパク質プロフィールの10%にすぎないので、再度、この遺伝子を潜在的に危険性の高い遺伝子と解釈することができよう。しかし、図2Cでは、遺伝子Cのタンパク質産物の構造が、構造プロフィールで非常に一般的な(例えば100%)構造であり、したがって、遺伝子Cは危険性の低い遺伝子である。

## 【0099】

上述したすべてのプロフィールおよび比較をmRNAを用いて行うこともできる。

10

20

30

40

50

## 【0100】

比較のすべてが、遺伝子ごとの比較である必要はない。例えば、危険遺伝子である特定の遺伝子が既知である状況では、その特定の遺伝子内で核酸ごとの最適化を試みることによって、その抗体の有用性をさらに改良することができる。したがって、 $V_H3$ 遺伝子の示す、HAHA応答を誘導する危険性がより低くなるように抗体を最適化することに興味がある場合、特定の $V_H3$ 遺伝子の配列が別の遺伝子に類似するように改変しようとすることによって、最適化を始めることができよう。したがって、遺伝子またはタンパク質セグメントの全体ではなく、配列が比較されることになっている正規化された宿主V配列プロフィールが企図されている。

## 【0101】

抗体における、HAHA応答を誘導するかもしれない側面をさらに減少させるために、遺伝子ごとの比較および最適化に続いて、その点で、遺伝子の特定の配列を比較することができる別のレベルでの最適化を行うのが望ましいことがあるかもしれない。配列の比較は、遺伝子セット内の各遺伝子、例えば、V遺伝子、 $V_H$ 遺伝子、 $V_H3$ 遺伝子、または $V_H3-9$ の遺伝子の中で行われることを理解するのが重要である。遺伝子の出現頻度に関連した危険性は、その遺伝子によってコードされた特定の構造と相関している場合がある。

## 【0102】

本明細書に記載の通りに使用する場合、遺伝子は、DNA片のコード態様も、非コード態様も意味することがある。別法では、遺伝子全体を見るのではなく、コード部分のみが潜在的宿主のV遺伝子バックグラウンドと比較されることがある。

## 【0103】

さらに、抗体の構造モチーフまたは構造全体は、タンパク質レベルで比較することができる。これらの遺伝子部分の多くは非常に短いので、これらのアミノ酸配列のモデル化は、*in silico*で簡単かつ正確に行うことができる。

## 【0104】

構造は、相同性モデリングによって、Accelrys社(San Diego, CA)のInsight IIモデリングパッケージなどの市販パッケージの補助を用いて作成することができる。簡潔には、検査する抗体の配列を用いて、プロテインデータバンク(Protein Data Bank)などの、既知構造のタンパク質に関するデータベースに対して検索することができる。既知構造を有する相同タンパク質を同定した後、これらの相同タンパク質をモデリング用の鋳型として用いる。潜在的な鋳型それぞれのアラインメントを行うことができ、それによって、それら鋳型の間で構造ベースの配列アラインメントを作成する。その後、未知構造を有する抗体の配列と、これらの鋳型とのアラインメントを行って、未知構造を有する抗体の分子モデルを生成することができる。当業者ならば理解するであろうが、そのような構造を*in silico*で作成する多数の別法があり、それらのうちのいずれを用いることもできる。例えば、QUANTA (Polygen Corp.社、Waltham, Mass.)およびCHARM (Brooks, B. R., Bruccole ri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., およびKarplus, M., 1983, J. Comp. Chem., 4, 187頁)を利用した、Hardmanら、米国特許第5958708号に記載のものと同様の方法を用いることができる。

## 【0105】

別法では、NMRまたはX線結晶解析などの伝統的な構造検査アプローチを用いることもできる。これらのアプローチは、パラトープ単独の構造も、エピトープに結合している間の構造も検査することができる。別法では、これらのアプローチは、特定のV遺伝子によってそれぞれコードされている個々のタンパク質セグメントを検査するのに用いられることがある。

## 【0106】

これらの構造モチーフは、抗体に組み込まれる際に、他のアミノ酸に連結されるであろうが、実際の遺伝子によって再度分割または規定される。Abタンパク質断片と、プロフィール内のタンパク質断片との整合に用いる比較はタンパク質構造に関するものであるが、検査されるタンパク質断片の重要な要素は、遺伝子およびその出現の相対頻度によって決

10

20

30

40

50

定される、その遺伝子に関連した危険性である。比較は、多くの異なったレベルで行うことができる。例えば、比較的単純なレベルでは、比較の主要な因子が、鎖中の各アミノ酸の側鎖であることがある。すなわち、V遺伝子によってコードされたタンパク質の側鎖の空間充填モデルを、患者のV遺伝子タイプによってコードされたタンパク質の同様の空間充填モデルと比較することができる。より複雑な比較は、例えば、その遺伝子によってコードされたタンパク質の中の各アミノ酸の静電的相互作用を使用するものである。別の比較の方法は、米国特許出願公開第20040005630号(Studnicka、2004年1月8日公開)によって教示される技法を用いたものである。これは、個々のアミノ酸位置を比較して、溶媒中に露出した特定の側鎖を改変する方法を記載する。現行の実施形態は、なお、残基ごとアプローチではなく、遺伝子操作を介した抗体最適化を対象とするが、ひとたび危険性の高い遺伝子が本明細書に記載の方法によって同定されたならば、この方法は、危険性の高い遺伝子の残基を改変するのに依然として有用である場合がある。比較のためのモデリングのレベルは、所望されるだけ増大させることができる。例えば、遺伝子によってコードされたタンパク質は、潜在的抗体と、遺伝子構成または患者のバックグランドとの間で比較すべき部分を同定するために、再度、使用される遺伝子と共に、抗体の三次元タンパク質構造全体としてモデリングすることができよう。潜在的抗体、または潜在的抗体の遺伝子を、患者の遺伝子セットと比較および対照させるために、V遺伝子セグメントによってコードされているタンパク質セグメントのそれぞれと、抗体内の他のタンパク質との間の構造的な相互作用を用いることもできる。この比較を用いることによって、特定の遺伝子構造がHAHA応答を誘導する危険性を判定するのに、タンパク質構造に関するデータベースを使用する。

10

20

**【0107】**

別法では、それらの遺伝子自体の類似性を強調したい場合、核酸レベルで比較を行うことができる。

**【0108】**

一実施形態では、特定の患者における特定の抗体の遺伝子のうち、どの遺伝子が危険性の高い遺伝子であって、どの遺伝子が危険性の低い遺伝子であるか判定するのに、遺伝子セット内の特定の遺伝子のクラスターが重要となる。そのような実施形態では、特定のV遺伝子を、単純な、正規化されたV遺伝子プロフィールと比較した場合に、その遺伝子は危険性の低い遺伝子でありうるが、特定のV遺伝子を、独立に危険性の低い遺伝子でありうる別の遺伝子と対にした場合(例えば、DもしくはJ遺伝子、または特定のV<sub>H</sub>遺伝子の、特定のV<sub>L</sub>遺伝子との対合)、それらの組合せの結果、危険性の高い遺伝子クラスターが生じる。それは、希少な組合せである、2つ以上の一般的な遺伝子の特定の組合せであり、それゆえに、危険性の高い組合せである。したがって、そのようなクラスターを含有する抗体は、単純な非クラスターの分析によって、すべての遺伝子が危険性の低い遺伝子であると示唆されるとしても、患者でHAHA応答を誘導する実質的可能性を有するかもしれない。遺伝子クラスターが、危険性が高いクラスターまたは危険性が低いクラスターであるか否かの判定は、これらの用語が危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子に用いられるのと同様に規定される。クラスターは、抗体を構成する2つ以上の遺伝子からなることがある。

30

40

**【0109】**

ある遺伝子の出現頻度をプロフィール内の遺伝子と比較する際に考慮すべき別の一般的問題は、ある遺伝子の正確な配列を、その遺伝子を描写することのできる唯一の方法としてみなすか否か、あるいは、1つの遺伝子に複数の配列があるかどうか、すなわち、その遺伝子に変種があるかどうかである。変種を含めることが有利となるときもある。それは、それらの変種によって、データの圧縮が可能となるためである。しかし、場合によっては、特に、配列に関しては非常に類似しているが、出現頻度に関してそれらの遺伝子間で相違がある場合には、変種概念を分析に用いることが有害となるであろう。

**【0110】**

本明細書で使用される場合、「変種」という用語は、記載されたポリペプチドまたはポ

50

リヌクレオチドと異なったポリペプチド、ポリヌクレオチド、または分子であるが、指定されない限り、そのタンパク質の活性が有害に改変されていないものである。抗体の変種には、タンパク質レベルのものと、核酸レベルのものとの両方が存在しうる。好ましい一実施形態では、タンパク質変種が機能する能力が、有害に改変されていない。別の実施形態では、タンパク質変種は、野生型mAbの10～500%以上の能力で機能できる。例えば、タンパク質変種は、野生型mAbの能力の10%、50%、110%、500%、または500%超で機能できる。一実施形態では、10～500%の間の範囲の機能的な能力が含まれる。一実施形態では、結合能が機能性であって、それは、限定されるものではないが、エピトープに対する変種の $k_a$ 、 $k_d$ 、または $K_D$ を含めた、様々な様式で反映されることがある。一実施形態では、V遺伝子の変種は、HAHA応答を誘導する、同じ可能性の危険性を有する。そのような変種は、「危険性が一定の変種」と呼ばれる。別の一実施形態では、V遺伝子の変種は、HAHA応答を誘導する、異なった可能性を有する。そのような変種は、「機能が一定の変種」または、より具体的には「危険性が可変的な変種」と分類されることがある。

10

20

30

40

50

#### 【0111】

変種抗体は、5アミノ酸以下の置換、欠失、または付加によって野生型の配列と異なったものでありうる。そのような変種は、通常、開示のポリペプチド配列の1つを改変し、改変されたポリペプチドの結合特性を、例えば本明細書に記載の代表的方法を用いて評価することによって同定できる。ポリペプチド変種は、同定されたポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または99%の同一性を示すことが好ましい。変種は、保存的置換および/または改変でのみ相違していることが好ましい。変種タンパク質には、構造が類似しているもの、および他の抗体タンパク質構造に機能的に同等なものが含まれる。別の実施形態では、変種のパラトープがもう一方の抗体変種のパラトープに類似している限り、抗体タンパク質が別の抗体タンパク質に機能的に同等であるなら、その抗体タンパク質は変種である。

#### 【0112】

一実施形態では、抗体は、その核酸配列が、ストリンジェントな条件下で野生型の配列に選択的にハイブリダイズできる場合に、変種である。適した中程度にストリンジェントな条件は、5xSSC; 0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8:0) 溶液での予洗と、50～65℃、5xSSC、一終夜、または種間相同性の場合には45℃、0.5xSSCでのハイブリダイゼーションと、それに続く、0.1% SDSを含有する2x、0.5x、および0.2xSSCで、それぞれ65℃、20分間、2回の洗浄とを含む。そのようなハイブリダイズするDNA配列も、ハイブリダイズするDNA配列によってコードされた抗体ポリペプチドを、コードの縮重によってコードするヌクレオチド配列であるので、本発明の範囲に包含される。本明細書において、「選択的にハイブリダイズする」という用語は、検出可能かつ特異的に結合することを意味する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびその断片は、非特異的な核酸へのかなりの量の検出可能な結合を最小にするハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で核酸鎖に選択的にハイブリダイズする。選択的なハイブリダイゼーション条件を実現するには、当技術分野で知られており、かつ本明細書に論じられた通りの高ストリンジェンシー条件を用いることができる。通常、本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびそれらの断片と、対象の核酸配列との間の核酸配列相同性は、少なくとも80%、より典型的には、少なくとも85～89%、90～94%、95～98%、99%、および100%になるであろう。2つのアミノ酸配列は、それらの配列の間に部分的または完全な同一性がある場合に相同である。例えば、85%の相同性は、2つの配列が最大の一致を示すようにアラインメントさせた際に、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。一致を最大にする際のギャップ(マッチングが行われている2つの配列のうちのいずれかにおけるもの)は許容され、ギャップ長5以下のものが好ましく、2以下のものがさらに好ましい。別法として、また、好ましくは、2つのタンパク質配列(または、それらに由来する、長さが少なくとも30アミノ酸のポリペプチド配列)が相同であるのは、本明細書でこの用語が使用される場合、それらが、変異データマトリックスおよび6以上のギャップペナルティを用いたALIGNプログラムを使用して5を超えるアラインメントスコア(標準偏差単位で)を有するときである。Dayhoff, M.O., 「At I

as of Protein Sequence and Structure」、101～110頁(第5巻、National Biomedical Research Foundation (1972))、およびこの巻への追補2、1～10頁を参照。より好ましくは、2つの配列またはその部分は、ALIGNプログラムを用いて最適なアラインメントを行った際に、それらのアミノ酸が50%以上同一である場合に相同である。本明細書で使用される場合、「に対応する」という用語は、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは部分に相同であること(すなわち、厳密に進化上の関係があるわけではなく、同一であること)、または、ポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列に同一であることを意味する。対照的に、本明細書で使用される場合、「に相補的な」という用語は、その相補配列が参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは部分に相同であることを意味する。例えば、「TATAC」というヌクレオチド配列は、「TATAC」という参照配列に対応しており、かつ、「GTATA」という参照配列に相補的である。

10

## 【0113】

V遺伝子の多くの間にある高度の類似性のため、複数の特定の遺伝子が実際には異なった遺伝子である場合に、それらの遺伝子が、同じV遺伝子の変種として分類されることがあるのを、当業者ならば理解するであろう。本明細書の方法および組成物の目的では、たとえあるV遺伝子が別のV遺伝子の変種であるとみなされていても、特別に指示(「変種遺伝子」または「変種遺伝子セット」)がない限り、それら2つの遺伝子は、危険度の付加を伴う同一の遺伝子とはみなされないであろう。

## 【0114】

変種遺伝子、変種遺伝子セット、および変種宿主V遺伝子プロフィールは、より高いレベルの潜在的な分析として、現行の実施形態に企図されている。変種遺伝子、変種遺伝子セット、および変種宿主V遺伝子プロフィールは、開示した実施形態のいずれに用いることもできる。そのようなより高いレベルの分析の具体的な利点の1つは、複数の特定の遺伝子をこの様な方法で併用することによって、分析の各レベルに若干の変異性を付加することが可能となることである。これは、選択される遺伝子が、より大きいグループの人々により許容されるものとなるのを可能にする。換言すれば、純粋な遺伝子レベルでの分析を中断して、変種遺伝子レベルでの分析を用いることによって、選択される遺伝子が、より大きなグループの人々にとって危険性の低い遺伝子となる可能性が高くなる。

20

## 【0115】

一実施形態では、これらの密接に関連した変種遺伝子を同じ遺伝子とみなすことができる場合がある。そのような実施形態では、V遺伝子プロフィールを発展させているならば、そのような変種遺伝子を、単一タイプのV遺伝子とみなすことができる。そのような状況では、この結果、各プロフィールに分類される個々の遺伝子の数がより少なくなることになりうる。しかし、それらの存在している遺伝子は、通常、HAHA応答を誘導する見かけの危険性が高いものである。各遺伝子に関連した危険性が同程度増大する限りは、これは、HAHA応答を誘導する原因となるコアタンパク質構造を真に指示するものではない。しかし、複数の遺伝子にわたって変種を併用した際に、変種遺伝子の特定の組合せのみで、それらの遺伝子に関連した危険性が高い場合、これは、HAHA応答の誘導におそらく関連したコア構造を示唆するものである。

30

## 【0116】

この観点では、遺伝子セットを定義するのに変種を使用することは、プロフィールを発展させるのに常に有用ではないかもしれないが、特定の遺伝子がHAHA応答を誘導することとなる危険性を改変するためには、遺伝子における、改変するのに適した関連部分を決定または推測するのに、変種が有用となる場合がある。一例として、3つの異なる遺伝子が対象の遺伝子であり、特定の遺伝子プロフィールにおいて、Aは10%の頻度、Bは100%の頻度、そして、Cは1%の頻度を有し、遺伝子Aの最適化が望まれている。遺伝子BおよびCが遺伝子Aの構造変異体であり、遺伝子BおよびCは、それらに関連した危険性が、遺伝子Aに関連している危険性とは異なるレベルのものである場合、3つの構造を比較して、遺伝子Aのタンパク質構造が、Bに類似し、かつCとは異なるように、遺伝子Aを改変することができる(例えば、図6および図7に関する下記の論述を参照)。理想的には、3つのタンパク

40

50

質すべてが同じ機能を有し、CとBとの相違は、抗体の機能性を改変しないものであるべきであって、その相違は、HAHA応答を誘導する危険性が低下している抗体を与えるものであるべきである。

【0117】

以下の用語、すなわち、「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセント」、および「実質的な同一性」は、2つ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の配列相関について記述するのに使用される。「参照配列」は、配列比較の基礎として使用される特定の配列である。参照配列は、より大きな配列の部分配列、例えば、配列リストに示されている完全長cDNA配列または遺伝子配列のセグメントである場合も、あるいは、完全なcDNA配列または遺伝子配列を含む場合もある。通常、参照配列は、長さが少なくとも18ヌクレオチドまたは6アミノ酸であり、しばしば、長さが少なくとも24ヌクレオチドまたは8アミノ酸であり、多くの場合、長さが少なくとも48ヌクレオチドまたは16アミノ酸である。2つのポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、それぞれ、(1) 2つの分子間で類似した配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の部分)を含み、かつ、(2) 2つのポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間で異なっている配列をさらに含むことがあるので、2つ(またはそれ以上)の分子間の配列比較は、局所領域の配列類似性を同定および比較するために、通常、2つの分子の配列を「比較ウィンドウ」全体にわたって比較することによって行う。本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、連続した少なくとも18のヌクレオチド位置、または6アミノ酸からなる概念的セグメントを指し、その際、ポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を、連続した少なくとも18ヌクレオチドまたは6アミノ酸配列の参照配列と比較することができ、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントを得るために、参照配列(付加または欠失を含まないもの)と比較して20パーセント以下の付加、欠失、置換、および同様のもの(例えば、ギャップ)を含むことができる。比較ウィンドウのアラインメントを行うための最適な配列アラインメントは、SmithおよびWaterman、*Adv. Appl. Math.*、2、482頁(1981)の局所的相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch、*J. Mol. Biol.*、48、443頁(1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman、*Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*、85、244頁(1988)の類似性探索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実施態様(Wisconsin遺伝学ソフトウェアパッケージ [Wisconsin Genetics Software Package] リリース7.0のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA [Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, Wis.]、Geneworks、またはMacVectorソフトウェアパッケージ)によって、あるいは精査によって行うことができ、様々な方法によって作成されたものの中で最良のアラインメント(すなわち、比較ウィンドウ全体にわたって最も高い相同性のパーセントを与えたもの)を選択する。

【0118】

「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウ全体にわたって、2つのポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が同一である(すなわち、ヌクレオチド対ヌクレオチド、または残基対残基のベースで)ことを意味する。「配列同一性のパーセント」という用語は、比較ウィンドウ全体にわたって最適にアラインメントされた2つの配列を比較すること、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、もしくはI)または残基が両方の配列に出現する位置の数を決定して、一致している位置の数を導き出すこと、一致している位置の数を、比較ウィンドウの位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割ること、およびその結果に100を掛けて配列同一性のパーセントを導き出すことによって計算する。本明細書で使用される場合、「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の特性を指し、その際、このポリヌクレオチドまたはアミノ酸は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)位置の比較ウィンドウ全体にわたって、しばしば、少なくとも24~48ヌクレオチド(8~16アミノ酸)位置のウィンドウ全体にわたって参照配列と比較して、少なくとも85パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90~95パーセントの配列同一性、より通常には少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、その際、

配列同一性の割合は、比較ウィンドウ全体にわたって、参照配列の合計20パーセント以下の欠失または付加を含みうる配列と、参照配列とを比較することによって計算する。参照配列は、より大きな配列の部分配列である場合もある。野生型タンパク質または核酸に対して実質的な同一性を有するアミノ酸または核酸は、野生型タンパク質または核酸の変種の例である。

#### 【0119】

ポリペプチドに適用される場合、「実質的な同一性」という用語は、デフォルトギャップウェイトを用いたGAPまたはBESTFITプログラムなどのよって最適にアラインメントさせた際に、2つのペプチド配列が、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一性、そして、最も好ましくは少なくとも99パーセントの配列同一性を共有することを意味する。同一でない残基位置は、保存性アミノ酸置換によって相違していることが好ましい。保存性アミノ酸置換は、類似した側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループは、セリンおよびトレオニンであり、アミドを含有する側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり、塩基性の側鎖を有するアミノ酸のグループは、リシン、アルギニン、およびヒスチジンであり、そして、硫黄を含有する側鎖を有するアミノ酸のグループは、システインおよびメチオニンである。好ましい保存性アミノ酸置換のグループは、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、アスパラギン-グルタミンである。実質的な同一性を有するポリペプチドは、変種であるかもしれない。

#### 【0120】

変種タンパク質には、小さな変異を有するタンパク質も含まれる。本明細書で論じる場合、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列における小さな変異は、アミノ酸配列におけるその変異が、少なくとも75%の同一性、すなわち、75~99%の間の同一性、例えば、80~89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、および99%の同一性を維持するという条件で、本発明によって包含されるものと企図されている。別の実施形態では、変種はすべて、特定の染色体アドレスに位置する遺伝子によってコードされている。詳細には、保存性アミノ酸置換が企図されている。保存性置換は、それらの側鎖が相互に関連しているアミノ酸のファミリー内部で行われるものである。遺伝学的にコードされているアミノ酸は、通常、以下のファミリーに分割される。すなわち、(1) 酸性=アスパルテート、グルタメート、(2) 塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン、(3) 非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、および、(4) 非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。より好ましいファミリーは以下の通りである。すなわち、セリンおよびトレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり、アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリーであり、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり、そして、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの孤立した置換、グルタメートによるアスパルテートの置換、セリンによるトレオニンの置換、または、同様の、構造的に関連したアミノ酸によるアミノ酸の置換は、特にその置換がフレームワーク部位にあるアミノ酸に関与しない場合、その結果得られた分子の結合または特性に大きな影響を与えないであろうと妥当性をもって予測される。アミノ酸変化の結果、機能的ペプチドが得られるかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることによって容易に判定することができる。そのようなアッセイは、本明細書に詳細に記載されている。当業者ならば、抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体を容易に調製することができる。断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能ドメインの境界近傍に出現する。構造ドメインおよび機能ドメイン

10

20

30

40

50

は、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを、公共または私有の配列データベースと比較することによって同定することができる。構造および/または機能が既知の他のタンパク質に出現する、配列モチーフまたは予測上のタンパク質立体配座ドメインを同定するには、コンピューター化された比較手法は用いるのが好ましい。既知の三次元構造に折りたたまれるタンパク質配列を同定する方法が知られている。Bowieら、Science、253、164頁(1991)。したがって、以上の例は、当業者ならば、本明細書に記載の抗体に一致する構造ドメインおよび機能ドメインを定義するのに使用できる配列モチーフおよび構造立体配座を認識できることを実証するものである。

#### 【0121】

好ましいアミノ酸置換は、(1) そのタンパク質に対するHAHA応答を誘導する危険性を低下させるもの、(2) HAHA応答を誘導する危険性がより低いペプチドに対する、HAHA応答を誘導する危険性のあるペプチドの構造類似性を増大させるもの、(3) タンパク質分解に対する感受性を低下させるもの、(4) 酸化に対する感受性を低下させるもの、(5) 形成されるタンパク質複合体への結合親和性を改変するもの、(6) 結合親和性を改変するもの、および、(7) そのような類似体の他の物理化学的または機能的特性を付与または改変するものである。類似体または変種には、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々な変異タンパク質が含まれうる。例えば、単一または多重アミノ酸置換(好ましくは保存性アミノ酸置換)を、天然に存在する配列中に導入することができる(好ましくは、ドメインを形成する分子間接触部位の外にあるポリペプチド部分におけるもの)。保存性アミノ酸置換は、実質的に親配列の構造特性を変えないものであるべきである(例えば、置換アミノ酸は、親配列に出現するヘリックスを壊したり、親配列を特徴付ける他のタイプの2次構造を破壊したりする傾向のないものであるべきである)。当技術分野で承認されている、ポリペプチドの2次構造および3次構造の例は、「Proteins, Structures and Molecular Principles」(Creighton、Ed.、W. H.、Freeman and Company社、New York (1984)); 「Introduction to Protein Structure」(C.BrandenおよびJ.Tooze編、Garland Publishing社、New York, N.Y. (1991)); および、Thorntonら、Nature、354、105頁(1991)に記載されている。

#### 【0122】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド断片」という用語は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は、例えば完全長cDNA配列から推定されている天然の配列における対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。断片は通常、長さが少なくとも5~70アミノ酸であり、これには、長さが少なくとも5、6、8または10アミノ酸、好ましくは長さが少なくとも14アミノ酸、より好ましくは長さが少なくとも20アミノ酸、通常は長さが少なくとも50アミノ酸、そして、より好ましくは長さが少なくとも70アミノ酸である断片が含まれる。本明細書で使用される場合、「類似体」という用語は、推定上のアミノ酸配列の一部に対して実質的な同一性を有する、少なくとも25アミノ酸のセグメントからなるポリペプチドを指す。類似体は通常、長さが少なくとも20アミノ酸であり、好ましくは長さが少なくとも50アミノ酸またはそれより長く、しばしば、完全長の天然ポリペプチドと同じくらい長いこともある。断片および類似体は、両方とも変種の形態である。

#### 【0123】

ペプチド類似体は、通常、鑄型ペプチドの特性に類似した特性を有する非ペプチド性薬物として製薬産業で使用される。これらのタイプの非ペプチド性化合物は、「ペプチド模倣物」または「ペプチドミメティクス」と呼ばれる。Fauchere、J. Adv. Drug Res.、15、29頁(1986); VeberおよびFreidinger、TINS、392頁(1985); および、Evansら、J. Med. Chem.、30、1229頁(1987)。そのような化合物は、しばしば、コンピューター化された分子モデリングの補助を用いて開発される。治療上有用なペプチドに構造的に類似しているペプチドミメティクスを用いて、同等の治療効果または予防効果を産生することができる。通常、ペプチドミメティクスは、パラダイムポリペプチドに構造的に類似したものである。パラダイムポリペプチドは、ヒト抗体など、生化学的性質または薬理活性を有するが

、任意選択で1つまたは複数のペプチド結合が、当技術分野で周知の方法によって、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (シスおよびトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、および $-CH_2SO-$ からなる群から選択された連結で置換されているポリペプチドである。より安定したペプチドを生成させるのに、同一タイプのD-アミノ酸(例えば、L-リシンの代わりにD-リシン)でコンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸を系統的に置換することができる。加えて、当技術分野で知られている方法によって、例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成できる内部システイン残基を付加することによって、コンセンサス配列または実質的に同一なコンセンサス配列変異を含む、拘束ペプチド(constrained peptide)を生成させることができる(RizoおよびGierasch, Ann. Rev. Biochem., 61, 387頁(1992))。ペプチド模倣物およびペプチドミメティクスは、両方とも変種の形態である。

10

## 【0124】

当業者ならば理解するであろうが、上記の論述は、V遺伝子と、正規化されたV遺伝子プロフィールとの比較に焦点を合わせたものであるが、これらの技法は、適切な場合には、候補抗体内のV遺伝子と、個体に存在するV遺伝子とを比較するのもにも使用できる。当然ながら、主要な相違は、この後の状況では、集団内での頻度ではなく、危険性が遺伝子の存在または不在によって定義されることである。

## 【0125】

(遺伝子最適化された抗体を産生するために遺伝子を選択する方法)

一実施形態は、遺伝子最適化された抗体で発現されるべき遺伝子を選択する方法を対象とする。そのような遺伝子最適化された抗体は、HAHA応答を誘導する可能性が低下している機能的抗体である。遺伝子を改変するために選択するなら、どのようにしてその遺伝子を選択するのか、そして、それらにどのようなタイプの改変を施すのかが、潜在的な問題である。これらの問題は、抗体の遺伝子セットと、正規化された宿主V遺伝子プロフィールにおける各遺伝子の出現頻度とを検査することによって、あるいは、その遺伝子が個体のV遺伝子プロフィールに出現するかどうか検査することによって取り組むことができる。この情報を用いて、遺伝子最適化された抗体を作製または取得するために、抗体のV遺伝子(または抗体それ自体)を選択することができる。「抗体遺伝子セット」によって、その抗体の遺伝子構成を意味する。「宿主遺伝子セット」によって、宿主にある一連の関連遺伝子、この場合はV遺伝子を意味する。一実施形態では、これに、V遺伝子、J遺伝子、およびD遺伝子が含まれよう。別の実施形態では、これに、 $V_H$ 遺伝子および $V_L$ 遺伝子が含まれる。別の実施形態では、これに、 $V_H$ 遺伝子が含まれる。当然ながら、このセットは、mRNA、タンパク質配列、またはそれらの遺伝子それぞれの構造的変形形態も指す場合がある。加えて、遺伝子セットは、宿主、集団、またはXenoMouse(登録商標)マウスの遺伝子プロフィールにある遺伝子セットを指す場合もある。例えば、これらを、「抗体V遺伝子セット」または「宿主V遺伝子セット」と呼ぶことができる。宿主V遺伝子プロフィールが1人のヒトのものである場合、それは、宿主V遺伝子セットと同じになるであろう。換言すれば、正規化されたプロフィールは、様々な遺伝子を有する人々の存在について記載することができるが、V遺伝子セットは、単に彼らがどの遺伝子を有するか示すものである。

20

30

## 【0126】

一実施形態では、選抜基準に、危険性の高い遺伝子もしくはその変種の数をも最小にすること、および/または危険性の低い遺伝子もしくはその変種の数をも最大にすることが含まれる。別の実施形態では、図3で示す通り、特定の最小出現頻度よりも低い頻度で出現する遺伝子を除外する。別法では、存在している、危険性の高いいかなる遺伝子または変種も、それらが機能的でない限り許容でき、機能的でないとは、それらがタンパク質を産生しないこと、または、産生されたタンパク質が、通常は危険性の高い遺伝子のタンパク質の危険性の低い変種であることを意味する。

40

## 【0127】

最小の出現頻度は、危険性の高い遺伝子と、危険性の低い遺伝子との間の境界にある出現頻度であって、抗体の機能性への影響に応じて異なる場合がある。一実施形態では、50

50

%超の出現頻度が高頻度とみなされ、一方、50%未満の出現頻度が低頻度とみなされるであろう。別の実施形態では、50～100%の間の出現頻度が高頻度(例えば危険性が低い)とみなされ、一方、50%未満の出現頻度が低頻度とみなされるであろう。別の実施形態では、0～1、1、2、3、4～15、15～30、30～50、50～70、70～90、または90～99パーセントを含めた、0～99パーセントの任意の出現頻度が、それぞれ、低い出現頻度であるとみなされることがある。別の実施形態では、100、100～99、98、97、96～85、85～50、50～30、30～10、または10～最小パーセントを含めた、100パーセント以下の任意の出現頻度が、それぞれ、高い出現頻度であるとみなされることがある。

#### 【0128】

集団における抗体の99パーセントで出現する遺伝子を低頻度とみなすことは直観に反するように見えるかもしれないが、これらは相対的な用語であって、これらの用語の範囲は、検査される集団または部分集団と、意図されている使用とによって異なる。したがって、非常に小さい集団、または選択されたV遺伝子の数が非常に小さい集団では、抗体を産生するのに使用される遺伝子の変異が非常に小さく、それら遺伝子のうちのどれの出現頻度も50%をはるかに超えるということが起こりうる。しかし、これは、そのような遺伝子を除外することによって、その抗原に対する抗体を産生する生物によって、HAHA応答が誘導されうる可能性が低下しないであろうということの意味するわけではない。

#### 【0129】

特定の遺伝子を改変するかどうかを決定する際に考慮すべき別の因子は、その遺伝子がどの程度に希少であるかということである。以下に詳細に記述するように、遺伝子を危険性の高いものとして特徴付けることのできるいくつかの代替的方法がある。さらに、図1で実証した通り、データがどのように分析されたかに応じて、正確な出現頻度が異なる場合がある。例えば、図3に示されているものなど、最小の出現頻度を用いた実施形態では、最小の出現頻度より低頻度であるいかなる遺伝子も、危険性の高い遺伝子とみなされるであろう。遺伝子の頻度を、その遺伝子に関連した危険性を表す値に相関させることによって、より徹底的な分析が提供される。例えば、危険性の高い2つの潜在的遺伝子を仮定し、その一方は、正規化されたV遺伝子プロフィールに1%の頻度で出現し、もう一方は10%の頻度で出現する場合、10%の頻度を有する遺伝子は、その集団内の任意のヒトでHAHA応答が誘発される可能性が10倍低いことになるかもしれない。当業者に理解されているように、危険性に関するこの関係は、線形である必要がなく、これには、特定の最小の出現頻度が含まれることがあり、また、以下に記述する通り、実験的による方法を含めた様々な方法で、これを決定することができる。パーセントで重み付けされたこの危険度は、HAHA応答を誘導する危険遺伝子を回避するに必要でありうる変化の程度を予測することも可能にする。例えば、非常に希少な遺伝子は、ごく若干希少である遺伝子よりも、はるかに大きな改変を必要とする場合がある。これは、遺伝子改変をどのように行うべきかに関する絶対的な指標ではないかもしれないが、危険性の高い遺伝子と危険性の低い遺伝子との配列比較、ならびに類似配列を有するが、危険性の程度が異なる遺伝子相互の配列比較と、これを併用した場合には、どの程度大きな改変が妥当であるか、当業者ならば決定できるであろう。

#### 【0130】

当業者ならば理解するであろうが、「危険性が高い」か、「危険性が低い」かに関する、遺伝子の比較的単純な特性分析は、その遺伝子に関連した危険性のより詳細な記述よりも有利でない場合がある。例えば、一部の実施形態では、遺伝子に関連した危険性を、「中程度の危険性」として特徴付けることができる。

#### 【0131】

別法では、プロフィールにおけるV遺伝子の量によって危険性を記述することもできる。これは、集団全体にわたって行うことも、個体の範囲内で行うこともできる。例えば、集団の全体にわたって行う場合、様々な重み付けの方法で危険性を計算することができ、簡単な方法の1つは、その遺伝子を有する人々のパーセントを介したものである。例えば、第1のV遺伝子は、集団の90%に存在し、第2のV遺伝子は、99%に存在し、そして、第3

10

20

30

40

50

のものは100%に存在している場合がある。したがって、第1のV遺伝子は10%の危険性を有し、第2のものは1%の危険性、そして第3のものは危険性がないと記述することができる。したがって、この危険性は、集団内のランダムなヒトが、その遺伝子をもたず、したがって、その遺伝子を発現する抗体を用いた治療が、有害なものとなる確率を示す。個体の範囲内では、このパーセントは、対象のV遺伝子のタンパク質産物と、宿主のタンパク質との類似性を記述するものでありうる。

【0132】

(遺伝子最適化された抗体を創出する方法)

当業者ならば理解するであろうが、本明細書に記載される抗体の創出には多くの代替法があり、限定することなくそのうちのいくつかを図4に記載する。

10

【0133】

(抗体の改変)

抗体は、図4Aに記載されるように、本明細書に記載されるようにして、危険性の高い遺伝子のタンパク質産物を排除するために改変できる。例えば、ある実施形態において、点突然変異を用いてタンパク質がHAHA応答を誘導する危険性を減少させる。

【0134】

ある実施形態において、危険性の高い遺伝子を、以下に詳述されるようにして、タンパク質構造のような重要な観点においてより危険性が低い遺伝子に似るように変える。タンパク質構造における比較的小さい変化が、HAHA応答が誘導される危険性を容易に大きく減少させることができるので、このことは有利であり得る。タンパク質構造におけるこれらの変化は、危険性の高い遺伝子と危険性の低い遺伝子との比較により達成されかつ導かれる。危険性の高い遺伝子に類似の最も近縁の危険性の低い遺伝子を見出して、危険性の高い遺伝子のタンパク質構造が危険性の低い遺伝子のタンパク質構造に似るように該危険性の高い遺伝子を変えることができる。もちろん、ルーチンの実験および試験を通じて、このプロセスは、V遺伝子の配列を比較し、抗体中の危険性の高い遺伝子の配列を危険性の低い遺伝子により近く似るように変え、そして結合および活性の維持またはHAHA応答を誘導するその危険性あるいはその両方について抗体を試験することの複数回を経て最適化できる。さらに、危険性の高い遺伝子の複数の遺伝子の比較を用いて、危険性の高い遺伝子における傾向を決定できる。次いで、これらの傾向を、最適化された抗体を産生するための変更の選択的な標的とすることができる。

20

30

【0135】

別の実施形態において、危険性の高い遺伝子を危険性の低い遺伝子で置き換えることができる。この置換は、危険性の高い遺伝子に類似であり得る(新しい遺伝子が該遺伝子に關係するより低い危険性を有するべきである事実は別として)。あるいは、置換遺伝子は、タンパク質レベルで、それが置換する遺伝子と構造的に類似な遺伝子であり得る。CDR3または体細胞変異のような機能を与える高い可能性を有する遺伝子のある特徴を、結合特異性および機能的活性を維持するために低い可能性を有する遺伝子のフレームワークに加工することができる。あるいは、置換遺伝子は、他のV遺伝子を置換する特に良好な能力を有する遺伝子であり得る。このような遺伝子は、上記の実験プロセスの経過を通して決定できる。

40

【0136】

ある実施形態において、遺伝子最適化された抗体は、次いで、まだ所望のように機能するかについて試験される。

【0137】

(抗体の選択)

危険性の低い抗体は、図4Bに示すようにして、抗体がHAHA応答を誘導する危険性がより低いことに基づいて、抗体の群から選択できる。単純なレベルにおいて、このことは、正規化された宿主遺伝子プロフィールにおいて危険性の高い遺伝子について最小化された抗体を選択することにより行われる。このことを行い得る別の例は、より詳細に以下に記載されるが、患者の民族学的背景を決定し、次いで、患者の特定の民族学的背景に共通する

50

遺伝子の出現について最適化された遺伝子セットを含む抗体のプールから抗体を選択することである。好ましい実施形態において、遺伝子セットにおいて調べられる遺伝子はV遺伝子であり、プロフィールは正規化された宿主V遺伝子、mRNA、アミノ酸、またはタンパク質構造プロフィールである。

#### 【0138】

患者についての抗体を選択するある方法において、抗体中の遺伝子セットを、患者に存在し得る遺伝子と比較する。遺伝子が類似する場合は、このことは、遺伝子のタイプが患者においてHAHA応答を引き起こしそうではないことを示す。このことを集団に適用する場合、重み付けられた危険度は各遺伝子と関連する。つまり、非常に希少な遺伝子の存在(例えば0.001%)は、希少な遺伝子のみ(例えば0.01%)の存在よりも、より大きい危険度を示すであろう。さらに、特定の宿主V遺伝子プロフィールと関連するいずれの危険性も考慮することができる。例えば、ある特定の遺伝子セットを有する抗体は、正規化された宿主V遺伝子プロフィールに基づいて通常は危険性が低いと考えられるが、正規化された宿主V遺伝子プロフィールをつくる集団のある特定のサブセットについて遺伝子セットが高い危険性を有すると、これを集団内の個体に投与するか否かに疑義をさしはさむことができる。このことは、個体が、正規化された宿主V遺伝子プロフィールの危険性の高いサブセットの部分であるいずれかの指標を示す場合に、特に関連する。

10

#### 【0139】

当業者は、このタイプの比較が塩基配列の比較による単純なベースではないことを認識するであろう。むしろ、遺伝子配列、mRNA、タンパク質配列、またはタンパク質構造は、遺伝子の境界により規定されて比較される。よって、完全配列比較の結果は、遺伝子ごとの比較の結果とは異なり得る。このことのために、特定の抗体がHAHA応答を誘導するか否かの決定は、ほとんどの場合と同じである必要はない。このことは、反復遺伝子に基づくプロフィールに比較して反復配列に基づくプロフィールを作製する場合に特に関係がある。すべてのV遺伝子に共通な配列は、危険性の高いものであっても、危険性の低い要素としてプロフィールに現れるであろう。このことは、危険性の高い遺伝子がこれらの共通の構造を有すると、実際には危険性の高い配列がその危険性評価において間違っ低く評価されることになり得る。これに対して、出現頻度または存在もしくは不在を全体の遺伝子と関連付けることにより、危険性の高い遺伝子のみが高い危険性に分類され、危険性の低い遺伝子のみが低い危険性に分類されるであろう。

20

30

#### 【0140】

特定の患者について危険性の低い遺伝子である遺伝子を単純に選択し、次いでこれらの遺伝子を有する抗体を作製できるが、各患者について抗体を創出する能力は望まれないかまたは実際的でないであろう。さらに、患者の正確なV遺伝子プロフィールはわからないか、または新規な抗体を創出する十分な時間がないであろう。よって、これらの場合においては、患者の仮定されるV遺伝子プロフィールに基づいて患者についての抗体を選択することが有用な代替案である。

#### 【0141】

抗体のプールにある遺伝子を仮定される宿主V遺伝子プロフィールと比較することによるV遺伝子最適化された抗体の選択において、V遺伝子の種々の組合せを含む抗体のより大きい選択が、危険遺伝子が最小限になったV遺伝子の特定の組合せをもつ抗体を得るために有益であり得る。このような場合において、多数の異なるV遺伝子を有することがV遺伝子最適化された抗体を得るために必ずしも必要ではないが、抗体のより大きいプールを有することにより、プール中のある抗体がある患者についてほとんど危険遺伝子を含有しないかまたは多くの危険性の低い遺伝子を含有することになり得る。

40

#### 【0142】

ある実施形態において、患者についての抗体を選択する方法は、「プール」中の遺伝子の種々のタイプを含むすべての入手可能な抗体を集めることを伴う。プールは、非ヒトV遺伝子またはその他の非ヒト遺伝子を有する抗体を含み得る。例えば、げっ歯類、XenoMouse(登録商標)マウス、またはブタからのV遺伝子である。ある実施形態において、これらの

50

プールは、いずれの特定のV遺伝子がいずれの特定の人、人々の群または集団全体においてHAHA応答を誘導する可能性を計算的に比較できる計算的 (computational) データベースであってよい。この可能性は上記のようにして決定され、ここで、共通して出現するV遺伝子はHAHA応答を誘導する可能性が低く、希少なV遺伝子はその可能性が高い。あるいは、プールは、種々の抗体またはその遺伝子の実際のコレクションとして物的に具体化され得る。ある実施形態において、これらのプールは、DおよびJ遺伝子を、組合せまたは別々のプールとして含んでよい。

#### 【0143】

あるいは、コストおよび貯蔵空間の要件を低減するために、プールは「普遍的に遺伝子最適化された抗体 (universally gene-optimized antibodies)」からなることができる。このことは、大きい集団 (例えば1000~10,000、10,000~100万、100万~1億、1億~60億) にわたって投与されたときに抗体がHAHA応答を誘導する危険性を低減するように、抗体が選択されることを意味する。よって、これらの抗体は各個体に完全に最適化されないであろうが、単一の遺伝子最適化された抗体 (または単一のセット) が多くの異なる人々に投与されて、全体としての集団にわたって利益を有することを可能にする。

10

#### 【0144】

当業者に理解されるように、特定の人々の群にカスタマイズされたプールを得ることが可能である。このことは、特定の人々の群が共通のV遺伝子使用を共有する場合に特に有用である。つまり、集団全体の宿主V遺伝子プロフィールに基づいて潜在的抗体を単純に選択するよりも、正確な宿主V遺伝子プロフィールを知らずに、危険性に対してプロフィールをよりよく合わせることもできる。

20

#### 【0145】

ある実施形態において、創出されたV遺伝子プロフィール、および患者についての抗体を創出または選択できる遺伝子のプールは、民族学的背景に基づく。例えば、4つの異なる民族学的な群、北ヨーロッパ人、南ヨーロッパ/アフリカ人、南アジア人、および北東アジア人がある。この特定の区分は特に重要である。なぜなら、民族性についてのデータは、これらの4つの異なる民族起源を用いるヒトIgG1アロタイプの分離について以前に発表された研究により保証されているようだからである (例えばPandey, J. P., Vaccine, 19 (6)、613~617頁(2000); Hougsら、Tissue Antigens、61 (3)、231~239頁(2003); Juulら、Tissue Antigens、49 (6)、595~604頁(1997); Atkinsonら、Immunogenetics、44 (2)、115~120頁(1996)を参照されたい)。同様に、2つのヒトIgG2アロタイプのうち、一方はアフリカ系民族学的背景のヒトにおいて顕著であり、他方は世界の残りの集団において顕著に用いられている。アロタイプは抗体鎖の定常領域の配列における対立遺伝子変異に関連するが、V遺伝子使用も民族性により分けることは道理にかなっている。

30

#### 【0146】

抗体のプールは、いずれのタイプの抗体をも含み得る。ある実施形態において、プールはヒト抗体を含む。別の実施形態において、プールはいずれのヒトIg-トランスジェニック動物からの抗体を含む。別の実施形態において、プールはXenoMouse (登録商標) 動物からの抗体を含む。別の実施形態において、抗体のプールは遺伝子最適化された抗体を含む。遺伝子最適化された抗体は、本明細書に開示されるいずれの遺伝子最適化された抗体でもあり得る。別の実施形態において、プールは普遍的に遺伝子最適化された抗体を含む。別の実施形態において、プールはこれらのすべてのタイプの抗体の混合物を含む。

40

#### 【0147】

さらに、プール自体は、人々の別の特徴に従って最適化できる。例えば、特定の特徴を有する患者、例えば家族の病歴、または患者の特定の遺伝子型について最適化されたプールがあり得る。

#### 【0148】

当業者に理解されるように、抗体または遺伝子最適化された抗体を患者に合わせるための選択プロセスは、場合によって変化し得る。上記のように、付加的な因子、例えばプールのサイズおよびプールの性質などが関与する。

50

## 【0149】

(遺伝子最適化された抗体を産生する生物)

危険性の低い遺伝子のみまたはそれを主に有するか、あるいは危険性の高い遺伝子を少なくとも有さないトランスジェニック動物を、最適化されたタンパク質を産生するために、図4Cに記載するようにして作製できる。各宿主V遺伝子プロフィールについて異なる動物を作製できる。よって、このような動物は、特定のファミリーまたは個体においてさえ、共通のV遺伝子のみを有するであろう。あるいは、動物は、民族学的群において共通のV遺伝子のみを有するであろう。抗体をそのような生物から直接つくり出すことができ、よって遺伝子最適化された抗体をつくり出すときに抗体の機能を失う心配がないことが利点である。もちろん、遺伝子改変マウス、それらの作製方法、および遺伝子最適化された抗体を創出する場合におけるそれらの使用は、現在の実施形態としてすべて含まれる。ある実施形態において、トランスジェニック生物の遺伝子最適化された抗体はV<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-64遺伝子、またはそれらのある組合せを含まない。ある実施形態において、トランスジェニック生物は集団に存在しない遺伝子は含まない。

10

## 【0150】

理論的には、いずれの生物も抗体産生系として用いられ得る。ある実施形態において、低頻度遺伝子およびその変異形はすべて、前記生物から除かれる。つまり、その生物が免疫応答を開始して抗体を発生および選択するとき、高頻度遺伝子を有する抗体のみが用いられる。トランスジェニック生物を用いることができるが、他のアプローチ、例えばアンチセンスRNA、siRNA、または低頻度遺伝子のタンパク質部分に指向された抗体も用いることができ、抗体の選択および作製を低頻度遺伝子を含有しない抗体に偏らせることができる。ある実施形態において、すべての低頻度V遺伝子が除かれたウサギが、関心のある生物である。

20

## 【0151】

ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)マウスは、高頻度(低い危険性)遺伝子のみを有するように遺伝子改変される。つまり、抗原に対する応答においてこのマウスにより産生されるいずれの抗体も、高頻度遺伝子のみを含むだろう。あるいは、このマウスは、低頻度遺伝子のすべてまたはいくらかを除くように改変され得る。つまり、産生されるいずれの抗体も、低頻度遺伝子を有さないかまたはほとんど有さず、従って、患者に投与されたときにHAHA応答を誘導する危険性が低減されているだろう。

30

## 【0152】

当業者ならば理解するであろうが、この特定の配置は、触媒作用的またはアゴニスト的(活性化)のような、一般的ないずれのタイプの抗体も実際に産生することを可能にし、患者に投与されたときにHAHA応答を誘導する可能性が低減された抗体を得るという背景においてそうすることを可能にする。つまり、低頻度遺伝子を除去することにより抗体を最適化しようとするときに、抗体の機能が変化することを心配しなくてもよい。なぜなら、そもそも低頻度遺伝子が存在しないであろうからである。

## 【0153】

ある実施形態において、それぞれ種々の低頻度遺伝子を欠損するかまたは付加的な高頻度遺伝子を含むか、あるいはその両方の、いくつかの異なるタイプの遺伝子改変生物が創出される。異なるタイプの遺伝子改変生物のそれぞれは、特定の出現頻度プロフィールを有するだろう。このことは、集団全体を通じて共通な遺伝子および集団全体を通じて希少な遺伝子が存在しても、集団全体に比べて、特定の遺伝子が共通でありその他の遺伝子が希少である集団のサブセットが存在し得るという事実を認識する。つまり、抗体がHAHA応答を誘導する可能性をさらに低減させるために、これらの亜母集団(subpopulation)のそれぞれについて、それぞれの遺伝子改変生物におけるV遺伝子の選択をカスタマイズすることが望ましくなり得る。つまり、ある実施形態において、亜母集団1において共通なV遺伝子のみを含む遺伝子改変生物が存在できる一方で、亜母集団2において共通なV遺伝子のみを含む第2の遺伝子改変生物が存在するだろう。その結果、抗体創出に用いられる遺伝子がさらにカスタマイズ化され、従って、最終抗体がその特定の亜母集団についてHAHA

40

50

応答を産生する危険性がさらに低減するだろう。このカスタマイズ化は、本明細書に記載する実施形態のいずれの観点についても有用であろう。

【0154】

亜母集団は、後でより詳細に議論する、データベースが組織され得るいずれの様式においても創出されるかまたは区別され得る。簡単に言えば、ある実施形態において、これらの亜母集団は、種々の民族学的なラインの間で分けられるデータベースに基づいて創出される。別の実施形態において、集団は、家族の医療情報により分けられる。さらなる実施形態において、選択された遺伝子は、患者の個別の遺伝子セット、例えば自身の $V_H$ 遺伝子セットに基づく。

【0155】

ある実施形態において、データベースから選択される遺伝子は、 $V$ 遺伝子である。別の実施形態において、遺伝子は $V_H$ 遺伝子である。別の実施形態において、遺伝子は $V_H3$ 遺伝子である。さらに別の実施形態において、 $V_H3-9$ 遺伝子を、生物が抗体の創出および選択において用い得る可能性のある遺伝子の選択から除く。このことにより、いずれの抗体も $V_H3-9$ 遺伝子を有さない抗体を創出する生物が得られ、よってHAHA応答を誘導する危険性が低減された抗体を産生できる生物が得られる。別の実施形態において、除かれる遺伝子は $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、 $V_H3-64$ 、およびこれらのある組合せから選択される。

【0156】

ある実施形態において、生物は、特定の抗体により誘導されているHAHA応答の危険性を決定するためのキットの一部分である。ある実施形態において、キットは、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物、例えばXenoMouse(登録商標)マウスを含み、ここで、該動物は、抗体を受容するヒトまたはヒト集団が欠損するのと同じ $V$ 遺伝子を欠損する。つまり、動物にとっての $V$ 遺伝子セットは、集団にとっての $V$ 遺伝子セットと同じであるか、またはほぼ同じである。言い換えると、動物の $V$ 遺伝子プロフィールは、集団の $V$ 遺伝子プロフィールと同じである。キットは、HAHA応答が得られたかを検出するために、ヒト抗体に結合するであろう抗体をさらに含み得る。さらに、キットは、試験される抗体と結合する抗原物質(例えばTCE)を含み得る。キットは、抗体を動物に投与するためのデバイスを含み得る。ある実施形態において、トランスジェニック動物は危険性の低い遺伝子のみを有する。ある実施形態において、トランスジェニック動物は危険性の高い遺伝子のみを有する。

【0157】

(ヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘導する危険性が低減されるように抗体を最適化するためにいずれの改変を行うかを決定する方法)

抗体の遺伝子は、種々の様式により改変され得る。図5は、改変を起こし得る単純なくつかの例を示す。この図は、例えば欠失により危険遺伝子を除去することにより、可能性のある生物の遺伝子をどのようにして改変するかについての指針、および例えば点突然変異を通してタンパク質レベルでどのようにして変化をつくることのできるのかについての指針の両方を提供する。ある実施形態において、遺伝子はゲノムから単純に除去され、該遺伝子を有する抗体が産生されるであろう可能性はない。つまり、遺伝子の欠失により、所望の効果が達成され得る。あるいは、遺伝物質を除去する必要はなくてよく、むしろ、遺伝物質の発現を、例えばsiRNAまたはアンチセンスRNAを介して抑制できる。より好ましくは、 $V$ 遺伝子の転写を、遺伝子の非コーディング領域を変えることにより、または特異的転写ブロックを加えることにより抑制できる。あるいは、特定の遺伝子を、より共通であるか(つまりより低い危険性)またはHAHA応答をもはや誘導しないような配列に変えることができる。例えば、遺伝子配列の部位特異的突然変異誘発は、危険性の高い遺伝子を低い危険性または中程度の危険性の遺伝子に変えるのに十分であり得る。遺伝子を完全に除去しないことの利点は、このことがより大きな $V$ 遺伝子多様性を可能にすることである。

【0158】

当業者ならば理解するであろうが、遺伝子の改変は、抗体の機能に実質的な影響をもた

10

20

30

40

50

らし得る。つまり、上記のような抗体による機能およびHAHA応答誘導の試験は、各改変の後が望ましい。さらに、これらの試験は、どの改変を行うべきかを選択することを可能にできる。標準的な抗体結合アッセイは、いずれの改変が抗体の機能に悪影響を及ぼすかを決定するのに十分であるだろう。これらのアッセイは、表面プラズモン共鳴タイプの試験、例えばBIAcore親和性測定およびカラム溶出タイプの結合アッセイ、適切な機能アッセイ、ならびに当技術において既知の多くのその他の技術を含む。

【0159】

さらに、同様の機能的試験を、抗体のその他の機能、例えば抗原性抗体について行うことができる。このような場合、抗体の改変が抗体の有用性を破壊していないことを決定する適切な試験を行って、抗体がまだ有用であることを決定できる。さらに、上記の *in silico* 試験を用いて、抗体のパラトープに対するいずれの遺伝子改変の影響を予測することができる。あるいは、*in silico* 試験を行って、特定の遺伝子の除去が、本明細書および米国特許出願公開第20040005630号(2004年1月8日公開、Studnicka)にさらに記載されるタンパク質の機能、例えばタンパク質構造モデリングに対して有害な影響を有すると予想されるかを決定することができる。

10

【0160】

当業者ならば理解するであろうが、これらの機能を、特にパラトープによるエピトープ結合に関して研究できる種々の方法が存在する。ある方法は、おそらく本明細書に記載されるような、作製した構造モデルを用い、次いで、ドッキングモジュールを有する *Insight II* (Accelrys, San Diego, CA) のようなプログラムを用いることである。このプログラムは、特に、パラトープとそのエピトープとの間の立体配座的および配向的な空間についてのモンテカルロサーチを行うことができる。その結果により、エピトープがパラトープとどこでどのようにして相互作用するかを予測することができる。ある実施形態において、エピトープの断片のみまたはその変異形を用いて、適切な相互作用の決定を助ける。ある実施形態において、エピトープ全体を、パラトープとエピトープとの間の相互作用のモデリングに用いる。当業者であれば理解するであろうが、これらの2つの異なるアプローチは、種々の利点および欠点を有する。例えば、エピトープの断片のみを用いることにより、非常に長い時間をかけずに、各側鎖の可能な変動のより詳細な試験が可能になる。一方、エピトープの断片のみまたは単純にエピトープをタンパク質全体の代わりに用いることにより、エピトープ断片の特徴がエピトープ全体の特徴と同じではないことがあり得、計算的モデリングの間にミスリードする危険性が增大する可能性がある。ある実施形態において、結果を照合するために、限定された範囲で両方のアプローチを用いる。好ましい実施形態において、エピトープの変異形を用いる場合には、エピトープの変異形がエピトープの最も重要な残基を含むようにそれを選択するだろう。最も重要な残基の同定は、いずれの多くの方法においても決定できる。

20

30

【0161】

これらの作製した構造を用いて、エピトープとパラトープとの間の相互作用においてどの残基が最も重要であるかを決定することができる。よって、ある実施形態において、抗体の結合特性を変えることを避けるために、どの残基を変更するかを容易に選択できる。例えば、パラトープ内のある残基の側鎖がエピトープの結合を立体的に妨害でき、これらの残基をより小さい側鎖を有する残基に変更することが結合およびHAHA応答の誘導の可能性をより小さくするために有益であることは、ドッキングモデルから明らかになり得る。このことは、多くの方法により決定できる。例えば、2つのモデルを単純に見て、官能基および近接さに基づいて相互作用を予測できる。あるいは、より好ましいエネルギー相互作用を得るために、上記のように、エピトープとパラトープとの組合せを繰り返すことができる。抗体の種々の変異形についてこれらの相互作用を決定し、抗体がエピトープに結合できる代替の方法を決定することもできる。所望の特定の特徴を有する抗体を得るために、種々のモデルを組み合わせて、抗体の構造をどのように変えるべきかを決定することもできる。

40

【0162】

50

例えば、V遺伝子のタンパク質産物についてのコンセンサス配列を創出できる。タンパク質に翻訳されたときの構造的類似性の関数として、またはHAHA応答を誘導する、遺伝子の決定された可能性を通じて、V遺伝子をコンセンサス配列に合わせることができる。後者のオプションにより、遺伝子からの危険性の低いタンパク質産物および危険性の高いタンパク質産物がどのような外見であるかのモデルを開発することが可能になる。つまり、HAHA応答の誘導の原因である、V遺伝子により部分的にコードされるタンパク質の構造を予測することができる。さらに、HAHA応答を発生しないV遺伝子からのタンパク質の構造も予測できる。例えば、図2Cにおいて、遺伝子Aを有する抗体が100%の頻度で出現し、遺伝子Bの構造を有する抗体は出現せず、遺伝子Cの構造を有する抗体も100%の出現頻度で出現するであろうことが、構造から明らかである。さらに、この情報を用いて、図6に示すように、抗体を創出するために利用可能な遺伝子を選択的に変更することができる。図6は、3つの遺伝子、A、BおよびCの出現頻度を示している。遺伝子Cは、遺伝子AまたはBよりもHAHAを(集団内で)誘導する危険性がより大きい、遺伝子Cおよび遺伝子Bにより予測されるタンパク質構造が似ているので、これらのタンパク質を産生するのに用いる動物から遺伝子Cを単純に除去する代わりに、B遺伝子の第2のコピーまたはB遺伝子に類似の構造を有する別の遺伝子を、代わりに置換することができる。類似構造によるこの置換は、人々のある集団で危険性の高いV遺伝子を、構造的には類似するがHAHA誘導には類似しない遺伝子で置換することにおいても有用であると認められる。

10

## 【0163】

構造的情報は、HAHA応答の危険性を低減させるために、変更する特定のアミノ酸を選択するのに用いることもできる。このことの1つの例を図7に示す。遺伝子からのアミノ酸配列は、危険性の高いコンセンサス配列および危険性の低いコンセンサス配列をつくるために、危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子から得る。これらの両方のコンセンサス配列と、抗体またはそのV遺伝子の予測される構造とを用いて、変更される必要がある残基は、危険性の高いコンセンサス配列を個別の予測構造と比較することにより明らかにはずである。例えば、図7において、V遺伝子のタンパク質配列とタンパク質形態での危険性の高い遺伝子のコンセンサス配列との比較は、4番目および最後のアミノ酸の両方が変更のための可能性のある標的であることを示唆する。残基をどのように変更すべきかということは、個別の配列を危険性の低いコンセンサス配列と比較することから明らかになるだろう。例えば、図7において、V遺伝子のタンパク質配列と危険性の低いコンセンサス配列との比較は、4番目の位置を非荷電の側鎖に変更すべきであることを示唆する。さらに、この第2の比較は、A遺伝子における最後の位置は重要でないことを示唆する。遺伝子Aとして規定される部分の外側の単一のアミノ酸は、ここでの分析に関係しないことに注目することも重要である。単一のコンセンサス配列のみを用いることが可能である。しかし、このことにより機能の欠損の危険性が増大し得る。種々の遺伝子の可能性のあるアラインメントの一例を図16Aおよび図16Bに、 $V_H$ 遺伝子について示す。

20

30

## 【0164】

これらのコンセンサス配列およびそこから得られる構造は、本明細書に記載されるいずれの様式によっても重み付けできる。例えば、ある集団について3つの遺伝子、A 1%(高い危険性)、B 50%(低い危険性)およびC 100%(低い危険性から危険性なし)が与えられると、AおよびBは比較してコンセンサス配列を得ることができるが、Aは、危険性の高いV遺伝子の代表であるコンセンサス配列を得ることにおいてより加重を有することができる。

40

## 【0165】

上記で決定されたモデルは、種々の技術を通して試験できる。例えば、どの変異形をさらに調べるかを決定するために、上記のプログラムを用いて相互作用エネルギーを決定できる。さらに、クーロンおよびファンデルワールス相互作用を用いて、エピトープと変異形のパラトープとの相互作用エネルギーを決定する。また、部位特異的突然変異誘発を用いて、抗体構造における予測された変更が、結合特性に所望の変更を実際にもたらすのかを調べることができる。あるいは、エピトープに変更を加えて、モデルが正しいことを証明するか、またはパラトープとエピトープとの間に生じ得る一般的な結合主題を決定でき

50

る。

【0166】

モデル構造の上記の方法は、タンパク質構造のどの変更が抗体の特定の所望される特性をもたらすかを決定するのに用いることができる。これらの方法は、タンパク質構造のどの変更が所望の特性をもたらさないかを決定するのに用いることができる。

【0167】

当業者ならば理解するであろうが、これらのモデルは本実施形態の抗体およびその変異形を作成するのに必要な指針を提供するが、おそらく *in vitro* 研究を介して *in silico* モデルのルーチンの試験を行う必要があるであろう。さらに、当業者ならば理解するであろうが、いずれの改変も、抗体の活性に対して付加的な副次的な影響を及ぼすであろう。例えば、より大きい結合をもたらすと予測される変更はいずれも、より大きい結合を誘導するであろうが、これは、抗体の活性を低減するかまたは変えるであろう他の構造変化をもたらすであろう。このようなことが起こるか否かの決定は、当技術においてルーチンであり、多くの方法により達成できる。

【0168】

抗体の機能の低減は、本実施例の有用性にとって必ずしも有害でないことを認識することが重要である。つまり、抗体の機能を99%低減させるが、HAHA応答の開始の可能性を同程度にまたはそれより多く低減させる改変は、なお有用であり得る。実際に、ある実施形態において、HAHA応答開始の可能性の低減よりも大きい機能の低減は、十分であるかまたは望ましくさえあり得る。ある実施形態において、機能における低減は、次のうちの1つである：0%から1%未満、1%~5%の間、5%~30%の間、30%~60%の間、60%~90%の間、90%~99%の間。あるいは、機能の許容できる減少は、HAHA応答が開始される危険性における効果的な減少の関数として、人々の集団または特定の個体のいずれかについて決定される。あるいは、改変は機能の増大をもたらし得る。ある実施形態において、集団内のいずれの個体に対するHAHA応答の危険性の許容できる減少は、次のうちの1つである：1%未満、1%~5%の間、5%~30%の間、30%~60%の間、60%~90%の間、90%~100%の間、および100%。あるいは、許容できる減少は、機能における変更の関数として決定でき、ここでHAHA応答の危険性におけるより小さい減少は、機能における変更がほとんどないかまたは正である場合に望ましいが、機能におけるより大きい負の変更が発生する場合は、より大きい減少が望ましい。

【0169】

「機能」により、抗体の有用性を意味する。例えば、抗体は、おそらく検出アッセイにおいて有用な、密な結合を要求するが必ずしも迅速な結合を要求しない、単に結合性抗体であってよい。つまり、このような抗体の $K_D$ は、有用であるには改変が抗体に過度に悪影響を及ぼしているかを決定するために検討する因子であるだろう。あるいは、迅速な結合が望ましい場合、 $k_a$ は、改変の後に検討する主な機能であろう。あるいは、抗体のある特定のエピトープに対する特異性(例えば抗体が受容体のブロッカーとして作用することを可能にする)、またはある標的に対する別の標的に関する特異性(例えば交差反応性の可能性を低減させる *in vivo* 状況において)。あるいは、抗体はアゴニストタイプの抗体であってよく、活性化受容体のリガンドとして有用であってよい。あるいは、抗体は、酵素的または触媒的な抗体であり得、2000年3月28日にKoentgenらに対して発行の米国特許第6043069号、1999年9月7日にLandryに対して発行の米国特許第5683694号、および1993年11月2日にDavisらに対して発行の米国特許第5258289号のように、特定の化学反応を促進するという意味で機能的であり得る。当業者ならば理解するであろうが、単一の抗体はこれらおよびその他の多くの機能のいずれの組合せを有してよい。それぞれの相対的重要性は、状況に応じて簡単に決定できる。

【0170】

ある実施形態において、比較される遺伝子は、V、D、またはJ遺伝子である。別の実施形態において、遺伝子はV遺伝子である。別の実施形態において、比較される遺伝子は $V_H$ 遺伝子、 $V_K$ 遺伝子、または $V_{\lambda}$ 遺伝子である。別の実施形態において、遺伝子は $V_H3$ 遺

10

20

30

40

50

伝子である。ある実施形態において、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ および $V_H3-64$ 遺伝子またはその変異形の存在は、特定の抗体がいくつかの集団においてHAHA応答を誘導する危険性が增大する、高い可能性の指標である。別の実施形態において、遺伝子は、Matsudaら(J. Exp. Med. 188: 2151~2162頁(1998))に記載されるいずれの遺伝子でもある。ある実施形態において、それは実際には、試験されるタンパク質セグメントである。つまり、機能的にコードする $V_H$ 遺伝子のみが適切である。別の実施形態において、それは、分析されるかまたは比較される遺伝子からのmRNAのみである。別の実施形態において、セグメントは転写されるのみである。別の実施形態において、セグメントはORFのみである。別の実施形態において、セグメントは点突然変異を有する偽遺伝子のみである。別の実施形態において、セグメントは短縮(truncation)を有する偽遺伝子のみである。ある実施形態において、 $V_H$ 遺伝子は次のうちの1つから選択される：1~2、1~3、1~8、1~18、1~24、1~45、1~46、1~58、1~69、2~5、2~26、2~70、3~7、3~9、3~11、3~13、3~15、3~20、3~21、3~23、3~30、3~33、3~43、3~48、3~49、3~53、3~64、3~66、3~72、3~73、3~74、4~4、4~31、4~34、4~39、4~59、4~61、5~51、6~1。 $V_H$ およびその他の遺伝子のより完全なリストは、図8および図17A~図22Jで見ることができる。

10

## 【0171】

当業者ならば理解するであろうが、危険性の高い遺伝子を最小限にすることにより、HAHA応答を誘導する可能性が低減された抗体がもたらされるであろう。しかし、危険性の低い遺伝子の最適化は、HAHA応答を誘導する危険性がより低い抗体という同じ最終目標を達成する有用な方法でもあり得る。つまり、ある実施形態において、抗体は、危険性の高い遺伝子を危険性の低い遺伝子で置換することにより最適化できる。ある実施形態において、このことは、抗体の危険性の高い $V$ 遺伝子を $V$ 遺伝子の構造的に似た危険性の低い遺伝子で置換することを示す。

20

## 【0172】

(ある抗体について特定の個体に発生するHAHA応答の可能性を決定する方法)

ある状況において、HAHA応答の危険性は、所望の量まで最小限にできないかもしれない。しかし、患者の特定の宿主 $V$ 遺伝子プロフィールについての特定の抗体遺伝子セットと関係する危険性を知ることにより、特定の抗体を特定の患者に投与する際に伴う危険性の程度を人々に認識させることができる。この情報を用いて、HAHA応答に対する予防的対策を行うか、または患者に危険性を十分に気付かせることのいずれかができる。この情報を有することは、将来起こる可能性のある問題が起こった場合に、診断における助けにもなり得る。これらの比較およびデータ分析技術は、危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子のいずれの比較についても一般的に有用である。

30

## 【0173】

これらの計算は、本明細書に開示されるいずれの遺伝子プロフィールを用いても行うことができる。このことは、どの遺伝子がHAHA応答を誘導する低い危険性および高い危険性を有するかを決定することにより行うことができる。患者の正確な宿主 $V$ 遺伝子プロフィールを知ることがある状況において望ましいが、HAHA応答が発生する可能性を、宿主 $V$ 遺伝子プロフィールの種々のタイプを用いて、例えば民族学的背景またはより広いプロフィールに基づいて予測することも可能である。当業者は、このようなHAHA応答を予測するこれらの比較の能力は、あまりカスタマイズされていないプロフィールを用いた場合に減少するであろうことを理解するだろう。

40

## 【0174】

ある実施形態において、危険性の低い遺伝子である特定の抗体遺伝子セットにおける各遺伝子は、負の単一のポイント値を与えられ、危険性の高い遺伝子である各遺伝子は、正の値を与えられる。次いで、各抗体の遺伝子セットにおける遺伝子のそれぞれに対応するそれぞれの値を加えて、HAHA応答出現の危険性を決定できる。数が正であるほど、HAHA応答が出現する機会が大きくなるであろう。つまり、遺伝子セットが $V$ 遺伝子のみを含む場合、危険性の高い $V$ 遺伝子の存在が危険性を表すだろう。この実施形態において、すべての危険性の高い $V$ 遺伝子は、同じ合計危険値、すなわち1を有するだろう。ある実施形態に

50

において、危険性の高い遺伝子のみが採点される。つまり、遺伝子は、最小限または予め決定された出現頻度より小さい頻度で出現する場合にポイント値を与えられ、スコアはHAHA応答の危険性が存在することを示す。より高いスコアはより大きい危険性を表し得る。

【0175】

集団のプロフィールを含む別の実施形態において、各危険遺伝子に単一のポイント値を与える代わりに、プロフィール中の遺伝子の頻度に基づいてポイント値を決定する。例えば、1%の頻度で出現する遺伝子は、10%の頻度で出現する遺伝子よりもより大きいポイント値を与えられる。同様に、99%の頻度で出現する遺伝子は、100%の頻度で出現する遺伝子よりもより大きい数を与えられる。もちろん、すべての4つの遺伝子を比較した場合、ポイント値の相対的加重は1% >10% >99% >100%である。各遺伝子についての各値を加えて、その数が大きいほど、HAHA応答が発生する危険性がより大きくなる。ある実施形態において、与えられるポイント値は、プロフィール中でのそれらの出現頻度に直接関係する。例えば、プロフィール中で10%の出現頻度を有する遺伝子についてのポイント値は、プロフィール中に1%で出現する遺伝子のポイント値に比べて約10倍小さいであろう。結局、数が低いほど、抗体に関連する危険性は低くなる。つまり、遺伝子セットがV遺伝子のみを予期する実施形態において、抗体についての合計危険性スコアまたは値は、そのV遺伝子に与えられる危険値であろう。

10

【0176】

あるいは、抗体が対象に投与されるときにHAHA応答を誘導することにおいて、抗体におけるある遺伝子頻度に関係する危険性を調べることができる。つまり、ある実施形態において、実際の以前の実験データもこれらの計算に含まれる。

20

【0177】

ある実施形態において、データは、抗体の患者への以前の投与、および抗体の使用からいずれのHAHA応答が開始されたか否かの調査から得ることができる。このことをどのようにして行うことができるかの例を図9に示す。このことは、異なる遺伝的背景、例えば上記の異なる民族学的背景における危険性を関係付けることを可能にもする。抗体のHAHA応答への単純な相関関係は、抗体がHAHA応答を誘導する可能性を決定することを可能にする。ある実施形態において、図9の左側に示すように、HAHA応答を引き起こすことが示されている抗体に出現するV遺伝子にポイントを与えることにより、各V遺伝子と関係する危険性の程度を得ることができる。抗体が投与されHAHA応答を誘導するたびに、抗体の遺伝子はポイントを与えられるだろう。最も高いポイント値または「合計危険性スコア」を有する遺伝子は、危険性の高い遺伝子である可能性が最も高い遺伝子である。試験される遺伝子のみがV遺伝子である実施形態において、与えられるポイント値は、V遺伝子に関係する危険性にのみ相関する。

30

【0178】

あるいは、図9の右側に示すように、分析に減法的プロセスを適用することができる。つまり、HAHA応答を誘導する抗体に出現する遺伝子にポイント値が与えられるが、同じ遺伝子が別の抗体に現れて、HAHA応答を誘導しない場合、この遺伝子に与えられたポイントを減じる。再度、最高の合計危険性スコアを有する遺伝子が、HAHA応答を誘導する最も高い危険性を有するだろう。このような減法的アプローチにより、多くの可能性のある危険性の高い遺伝子を除くことができるが、このプロセスにより同定されるこれらの遺伝子は、危険性の高い遺伝子であろう。あるいは、2つの実施形態を組み合わせることでより多くの擬陽性を取り除き、より多くの擬陰性を保つことができる。患者の可能な遺伝的背景における差を修正するように、これを行うことができる。

40

【0179】

別の実施形態において、ヒト化生物を用いて、特定の抗体または遺伝子がHAHA応答を誘導する高い危険性を有するかを調べることができる。以下でより詳細にこれを論じる。

【0180】

もちろん、複数の試験が、それが危険性の高い抗体であるか否かの確実性を増大させるだろう。この実施形態について遺伝子が危険性の高い遺伝子であるかを決定できる、少な

50

くとも2つの方法がある。第1に、ほとんどまたは好ましくはHAHA応答を誘導しない任意の抗体である危険性の低い抗体を決定した後に、次いで、抗体の遺伝子セットの組成を変え、新しいV遺伝子に置換し、改変された抗体を試験する。改変された抗体がHAHA応答を誘発するならば、導入された遺伝子は危険性の高い遺伝子であり得る。

【0181】

別の実施形態において、ヒトまたはXenoMouse(登録商標)マウスを試験対象として用いて、V遺伝子または抗体が危険性の高い化合物であるかを決定する。

【0182】

当業者ならば理解するであろうが、これらの実験結果を用いることは、宿主V遺伝子プロフィールが現在の実施形態において演じるであろう役割を排除するかまたは大きく減じる。しかし、特定の遺伝子とHAHA応答が誘導される特定の可能性との相関関係は、依然として重要である。

【0183】

このような実験データは、危険性の高い遺伝子または危険性の低い遺伝子を定義する上でも同様に有用であり得る。特定の遺伝子、遺伝子セット、または抗体のために発生するHAHA応答の危険性を計算するための上記の方法は、個別の遺伝子を伴う別の方法のためにも用いられ得る。つまり、どの遺伝子がどのようにして改変されるべきかを決定することは、単一遺伝子の分析を伴うことができるが、上記のような各遺伝子に重みをつける種々の方法を、それらの分析に組み込むことができる。

【0184】

ある実施形態において、HAHA応答の危険性は、特定の個体について計算される。ある実施形態において、個体に投与される候補抗体の遺伝子セットは、個体の抗体遺伝子セットと比較されるだろう。危険性の低い遺伝子は、抗体および個体が有しかつ発現するものであり、危険性の高い遺伝子は、抗体が有する(すなわち、抗体のタンパク質構造をコードする)が個体の遺伝子には存在しないものであるだろう。

【0185】

別の実施形態において、HAHA応答の危険性は、より広いベースで計算される。例えば、危険性を、種々の正規化された宿主V遺伝子プロフィールから計算できる。つまり、宿主V遺伝子プロフィールが家族全体のためである場合、比較により作製される危険値は、家族全体のためであるだろう。同様に、民族的宿主V遺伝子プロフィールを用いる場合、得られる危険値はいずれも民族学的群全体のためであるだろう。宿主V遺伝子プロフィールの変動が増大すると危険値の正確さが減少する(例えば一卵性双生児のV遺伝子プロフィールは、民族学的群全体のものよりもずっと正確である)が、抗体に危険性の一般的なレベルを与えることができることに価値があることを当業者は認識するだろう。

【0186】

抗体の投与の後にHAHA応答を発生する患者の危険性を関係付けるために、本明細書においても議論されるいずれの付加的な方法をも、上記のようにして用いることもできる。さらに、投与される抗体が遺伝子最適化された抗体であっても、患者にとってその抗体が関係する危険性を決定することは依然として有用であろう。

【0187】

(危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子を決定するためのデータベースおよび宿主V遺伝子プロフィールデータベースを作成する方法)

単純なレベルにおいて、宿主V遺伝子プロフィールについての集団を規定すること、次いでその集団中のV遺伝子を決定することのみが必要である。次いで、これらのV遺伝子はその集団中に現れる頻度を決定できる。ある実施形態において、mRNAが遺伝子から出現する頻度が決定される。あるいは、遺伝子が集団中のタンパク質において実際に用いられる頻度を決定できる。あるいは、タンパク質の構造または機能のいずれかが実際に決定される。つまり、V遺伝子の単なる存在は、V遺伝子が共通の遺伝子として、計数されるプロフィールに加えられたことを自動的に意味するのではなく、その代わりに、プロフィールに遺伝子が増えらるるために、タンパク質産物が集団内で発現されなければならないことを

10

20

30

40

50

意味する。

【0188】

上記で論じたように、これらのプロフィールは、DNAレベル、mRNAレベル、アミノ酸レベル、またはタンパク質構造レベルに指向され得る。プロフィールは、タンパク質構造の基本的な建築ブロックまたは抗体のより大きな構造に指向され得る。データベースは、特定の $V_H$ および $V_L$ 遺伝子の抗体内での組合せ、または抗体鎖内の特定の $V_H$ 、 $D_H$ 、 $J_H$ 、および $J_L$ 遺伝子の組合せに関する危険性(または可能性)の比較を集める観点において因子であり得る。ある実施形態において、データベースは、各V遺伝子コーディング領域の規定要素が、分析が行われる主要なレベルであるかぎり、遺伝物質を分析するいずれの方法をも含み得る。

10

【0189】

プロフィールは、いずれのサイズの集団に指向することもできる。ある実施形態において、プロフィールを、上記のように、民族学的群に分ける。別の実施形態において、プロフィールは家族の群に分ける。プロフィールは、普遍的なプロフィールでもあり得る。

【0190】

プロフィールには、実験による発見または試験の結果からのさらなる情報を補うことができる。例えば、患者に投与された抗体におけるV遺伝子の頻度の調査およびそのことをHHAHA応答を経験した個体と関係付けることは、非常に希少でプロフィールには含まれない遺伝子を同定するのに非常に有用であり得る。この例を図9に示す。非常に希少な遺伝子はHHAHA応答を誘導する最大の機会を有するだけでなく、プロフィールの中に存在する機会も最も少ないので、このことは問題になりうる。幸運なことに、一旦、サイズが十分なプロフィールが開発されると、プロフィールにV遺伝子が単純に存在しないことがその遺伝子が危険遺伝子であるという指標である。当業者に理解されるように、V遺伝子が危険性の低い遺伝子であっても、その実際の使用によりHHAHA応答が誘導される状況があり得る。そのような状況において、プロフィールがこの事実を反映し、スコアシステムを調節し、危険性を予測するか、または遺伝子最適化された抗体を適宜作製するために遺伝子改変を提案することが可能である。

20

【0191】

当業者に理解されるように、プロフィールになされる多くの調節を、プロフィールの他の遺伝子に対する実際の比較に組み込むこともできる。このような分析は、因子が二重の様式での計算に不注意にも組み込まれない限りは、許容できる。

30

【0192】

ある実施形態において、危険性の高い遺伝子は、ある特定の集団について $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ 、および $V_H3-64$ である。当業者ならば理解するであろうが、遺伝子が危険性の高い遺伝子であるか否かは、遺伝子によりコードされる抗体の宿主となるべき特定の集団または個体によって決まり得る。つまり、関連する危険性を有する特定の集団に注目することがしばしば有益である。当業者ならば理解するであろうが、本発明の開示に従って、種々の遺伝子を高い、中程度、または低い危険性あるいは危険性パーセンテージに分類することは、例えば以下の実施例に従って簡単に達成され得る。

【0193】

(遺伝子最適化された抗体タンパク質、核酸、およびそれらの変異形、V遺伝子プロフィール、カスタマイズされたXenoMouse(登録商標)マウス)

本発明の実施形態には、実際の遺伝子最適化された抗体、遺伝子最適化された抗体をコードする核酸およびそれらの変異形も含まれる。抗体はヒトである必要はないが、ヒトまたはヒト化抗体のいずれかであることが有利である。

40

【0194】

ヒト抗体は、マウスもしくはラットの可変および/または定常領域を有する抗体に関連する問題のいくつかを回避する。このようなマウスまたはラット由来のタンパク質の存在は、抗体の迅速な撤去を導き得るか、または患者による抗体に対する免疫応答の発生を導き得る。マウスまたはラット由来の抗体の使用を避けるために、げっ歯類が完全ヒト抗体

50

を産生するようにヒト抗体の機能をげっ歯類に導入することにより、完全ヒト抗体を作製することができる。

【0195】

YAC(酵母人工染色体)にメガベースサイズのヒト遺伝子座をクローニングして再構築し、それらをマウスの生殖系列に導入する能力は、非常に大きいまたは粗くマッピングされた遺伝子座の機能的要素を明らかにすると共に、ヒト疾患の有用なモデルを作製するための強力なアプローチを提供する。さらに、マウス遺伝子座をそのヒト等価物で置換するためのこのような技術の利用は、発生、他の系とのヒト遺伝子産物の交流、ならびに疾患の誘導および進行におけるヒト遺伝子産物の関与の間のヒト遺伝子産物の発現および調節に対する独特の見識を与え得る。つまり、ある実施形態において、本実施形態の組成物をマウス生殖系列に入れる。このことにより、特定の宿主遺伝子プロフィール、V遺伝子プロフィール、または正規化されたV遺伝子プロフィールを有する生物を創出することが可能になり、次いで最適化された抗体またはV遺伝子最適化された抗体を作製するのにこれを用いることができる。

10

【0196】

このようなストラテジーの重要な実際の適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内因性Ig遺伝子が不活性化されたマウスへのヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座の導入は、抗体のプログラムされた発現および組み立て、ならびにB細胞発達におけるそれらの役割の背後にある機構を研究する機会を提供する。さらに、このようなストラテジーは、ヒト疾患における抗体療法の期待を満足するための重要な段階である完全ヒトモノクローナル抗体(mAb)の産生のための理想的な起源を提供し得る。完全ヒト抗体は、マウスmAbまたはマウス誘導体化mAbの本来の免疫原性およびアレルギー性応答を最小限にし、従って、投与された抗体の効力および安全性を増大させることが予期される。完全ヒト抗体を用いることは、抗体の繰り返し投与を必要とする慢性および再発したヒト疾患、例えば炎症、自己免疫および癌の治療において実質的な利益を提供すると予期できる。

20

【0197】

この目標に対するあるアプローチは、マウス抗体産生が欠損したマウス株をヒトIg遺伝子座の大きい断片で処理することであった。これは、このようなマウスが、マウス抗体なしでヒト抗体の大きいレパートリーを産生するであろうという予想に基づいていた。大きいヒトIg断片は、大きい可変遺伝子多様性、ならびに抗体の産生および発現の適切な調節を保つであろう。抗体の多様化および選択、ならびにヒトタンパク質に対する免疫寛容の欠失のためにマウス装置を利用することにより、これらのマウス株において再現されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗体を含む、いずれの興味対象の抗原に対しても高い親和性を有する抗体を産生するはずである。ハイブリドーマ技術を用いることにより、所望の特異性を有する、抗原特異的ヒトmAbを容易に産生して選択できる。この一般的なストラテジーは、1994年に発表された最初のXenoMouse(登録商標)マウス株の我々による作製に関連して示された。Greenら、Nature Genetics 7: 13~21頁(1994)を参照されたい。XenoMouse(登録商標)株は、コアの可変および定常領域配列を含む、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のそれぞれ245 kbおよび190 kbのサイズの生殖系列構成断片(germline configuration fragments)を含む酵母人工染色体(YAC)を用いて処理された。同上。YACを含むヒトIgは、抗体の再配列および発現の両方についてマウスの系と矛盾しないことが証明され、不活性化されたマウスIg遺伝子を置換できた。このことは、B細胞発達を誘導し、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、かつ抗原特異的ヒトmAbを作製するそれらの能力によって証明された。これらの結果は、V遺伝子のより多数、さらなる調節要素、およびヒトIg定常領域を含むヒトIg遺伝子座のより大きい部分の導入は、感染および免疫化に対するヒト体液性応答の特徴である実質的に完全なレパートリーを反復(recapitulate)することを示唆する。Greenらの研究は、それぞれヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖系列構成YAC断片の導入により約80%を超えるヒト抗体レパートリーを導入することに、最近、拡張された。Mendezら、Nature Genetics 15: 146~156頁(1997)および1996年12月3日に出願された米国特許出願公開第08/759620号を参照

30

40

50

されたい。

【0198】

完全ヒト抗体を作製するためのある方法は、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の245kbおよび190kbのサイズの生殖系列構成断片を含むように処理されたXENOMOUSE(登録商標)マウス株を用いることによる。別のXenoMouseマウス株は、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の980kbおよび800kbのサイズの生殖系列構成断片を含む。さらに別のXenoMouseマウス株は、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の980kbおよび800kbのサイズの生殖系列構成断片に加えて740kbサイズの生殖系列を構成する完全ヒト軽鎖遺伝子座を含む。Mendezら、Nature Genetics 15: 146~156頁(1997)、ならびにGreenおよびJakobovits J. Exp. Med. 188: 483~495頁(1998)を参照されたい。XENOMOUSE(登録商標)株は、Abgenix, Inc. (Fremont, CA)から入手可能である。

10

【0199】

XenoMouse(登録商標)マウスの作製は、1990年1月12日出願の米国特許出願番号第07/466008号、1990年11月8日出願の第07/610515号、1992年7月24日出願の07/919297号、1992年7月30日出願の07/922649号、1993年3月15日出願の第08/031801号、1993年8月27日出願の第08/112848号、1994年4月28日出願の第08/234145号、1995年1月20日出願の第08/376279号、1995年4月27日出願の第08/430938号、1995年6月5日出願の第08/464584号、1995年6月5日出願の第08/464582号、1995年6月5日出願の第08/463191号、1995年6月5日出願の第08/462837号、1995年6月5日出願の第08/486853号、1995年6月5日出願の第08/486857号、1995年6月5日出願の第08/486859号、1995年6月5日出願の第08/462513号、1996年10月2日出願の第08/724752号、および1996年12月3日出願の第08/759620号、ならびに米国特許第6162963号、第6150584号、第6114598号、第6075181号および第5939598号、ならびに特許第3068180号、第3068506号および第3068507号にさらに記載および説明される。また、Mendezら、Nature Genetics 15: 146~156頁(1997)ならびにGreenおよびJakobovits J. Exp. Med. 188: 483~495頁(1998)も参照されたい。1996年6月12日発行の欧州特許第0463151号、1994年2月3日公開の国際特許出願WO 94/02602号、1996年10月31日公開の国際特許出願WO 96/34096号、1998年6月11日公開のWO 98/24893号、2000年12月21日公開のWO 00/76310号、WO 03/47336号も参照されたい。

20

【0200】

別のアプローチにおいて、GenPharm International, Inc.を含むその他のものは、「ミニ遺伝子座(minilocus)」アプローチを用いている。ミニ遺伝子座アプローチにおいて、外因性Ig遺伝子座は、Ig遺伝子座からの要素(個別の遺伝子)を含むことにより模倣される。つまり、1つまたは複数のV<sub>H</sub>遺伝子、1つまたは複数のD<sub>H</sub>遺伝子、1つまたは複数のJ<sub>H</sub>遺伝子、mu定常領域および第2の定常領域(好ましくは定常領域)は、動物に挿入するための構築物へと形成される。このアプローチは、Suraniらの米国特許第5545807号、およびそれぞれLonbergおよびKayの米国特許第5545806号、第5625825号、第5625126号、第5633425号、第5661016号、第5770429号、第5789650号、第5814318号、第5877397号、第5874299号および第6255458号、KrimpenfortおよびBernsの米国特許第5591669号および第6023010号、Bernsらの米国特許第5612205号、第5721367号および第5789215号、ならびにChoiおよびDunnの米国特許第5643763号、ならびにGenPharm Internationalの1990年8月29日出願の米国特許出願第07/574748号、1990年8月31日出願の第07/575962号、1991年12月17日出願の第07/810279号、1992年3月18日出願の第07/853408号、1992年6月23日出願の第07/904068号、1992年12月16日出願の第07/990860号、1993年4月26日出願の第08/053131号、1993年7月22日出願の第08/096762号、1993年11月18日出願の第08/155301号、1993年12月3日出願の第08/161739号、1993年12月10日出願の第08/165699号、1994年3月9日出願の第08/209741号に記載される。欧州特許第0546073号、国際特許出願WO 92/03918号、WO92/22645号、WO 92/22647号、WO 92/22670号、WO 93/12227号、WO 94/00569号、WO 94/25585号、WO 96/14436号、WO 97/13852号およびWO 98/24884号、ならびに米国特許第5981175号も参照されたい。さらに、Taylorら、1992、Chenら、1993、Tuailonら、1993、Choiら、1993、Lonbergら、(1994)、Taylorら、(1994)およびTuailonら、(1995)、Fishwildら、(1996)も参

30

40

50

照されたい。

【0201】

Kirinは、マイクロセル融合により染色体の大きい要素または染色体全体が導入されたマウスからのヒト抗体の作製を示している。欧州特許出願第773288号および843961号を参照されたい。

【0202】

Xenerex Biosciencesは、ヒト抗体の作製の可能性のある技術を開発している。この技術において、SCIDマウスは、ヒトリンパ細胞、例えばBおよび/またはT細胞を用いて再構成される。次いで、マウスは抗原により免疫され、抗原に対する免疫応答を生じることができる。米国特許第5476996号、第5698767号および第5958765号を参照されたい。

10

【0203】

ヒト抗体は、in vitro法によりもたらすこともできる。適切な例は、限定されないが、ファージディスプレイ(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(以前のProliferon)、Affimed)、リボソームディスプレイ(CAT)、酵母ディスプレイなどを含む。

【0204】

(抗体)

上記のように、可能性のあるV遺伝子のサブセットのみ、特にV<sub>H</sub>またはV<sub>kappa</sub>またはV<sub>lambda</sub>遺伝子のサブセットのみを含有するトランスジェニックをつくる実質的な利点がある。つまり、ある危険性の高い遺伝子を欠損するトランスジェニックXenoMouse(登録商標)動物は、抗体を産生するために特に望ましい。しかし、当業者に理解されるように、トランスジェニックがマウスまたはXenoMouse(登録商標)マウスである必要はない。

20

【0205】

本明細書に記載されるように、抗体は、以下に記載するXenoMouse(登録商標)技術を用いることにより作製できる。このようなマウスは、次いで、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生することができ、マウス免疫グロブリン分子および抗体の産生を欠損する。このことを達成するために用いられる技術は、本明細書に引用する特許、出願および参考文献に開示される。しかし、マウスのトランスジェニック作製およびそこから抗体の好ましい実施形態は、特に、1996年12月3日出願の米国特許出願第08/759620号、ならびに1998年6月11日公開の国際特許出願WO 98/24893号、および2000年12月21日公開のWO 00/76310号に開示される。また、Mendezら、Nature Genetics 15: 146~156頁(1997)も参照されたい。

30

【0206】

このような技術を用いることにより、種々の抗原に対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製できる。本質的には、XenoMouse(登録商標)マウスシステムを興味対象の抗原で免疫し、抗体を発現したマウスからリンパ細胞(例えばB細胞)を回収し、そのような細胞を骨髄系細胞系統と融合させて不死のハイブリドーマ細胞系統を作製し、このようなハイブリドーマ細胞系統をスクリーニングして選択して、興味対象の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞系統を同定する。このような細胞系統により産生される抗体は、このような抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を含めて、さらに特性決定される。

40

【0207】

あるいは、ミエローマ細胞に融合させてハイブリドーマを作製する代わりに、回収細胞(免疫されたXenoMouse(登録商標)マウスシステムから単離したもの)により産生された抗体を、最初の抗原に対する反応性についてさらにスクリーニングする。このようなスクリーニングは、抗原を安定に発現する細胞へのin vitro結合であるELISAを含む。抗体は、HAHA応答を誘導する危険性を有するか決定するためにスクリーニングすることもできる。次いで、興味対象の抗体を分泌する単独B細胞を、抗原特異的溶血ブランクアッセイを用いて単離する(Babcookら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843~7848頁(1996))。溶解の標的とする細胞は、好ましくは、抗原で被覆されたヒツジ赤血球(SRBC)である。興味対

50

象の免疫グロブリンおよび補体を分泌するB細胞培養の存在下で、ブランクの形成は、標的細胞の特異的抗原が媒介する溶解を示唆する。ブランクの中央の単一抗原特異的形質細胞は単離でき、抗体の特異性をコードする遺伝情報は、単一形質細胞から単離される。逆転写酵素PCRを用いて、分泌された抗体の可変領域をコードするDNAをクローニングできる。このようなクローニングされたDNAは、次いで、適切な発現ベクター、好ましくはベクターカセット、例えばpcDNA、より好ましくは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常ドメインを含むpcDNAベクターへさらに挿入することができる。作製されたベクターは、次いで、宿主細胞、好ましくはCHO細胞にトランスフェクションでき、プロモータを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修飾された一般的な栄養培地で培養できる。

10

## 【0208】

XenoMouse(登録商標)マウスからのB細胞は、抗体ディスプレイライブラリーを作製できる遺伝物質の起源として用いることもできる。このようなライブラリーは、当該技術において一般的な技術を用いて、バクテリオファージ、酵母、またはリボソームディスプレイを介してin vitroでつくることができる。過免疫されたXenoMouse(登録商標)は、そこから高親和性の抗原反応性抗体が単離できるであろう豊富な起源であり得る。よって、抗原に対して過免疫されたXenoMouse(登録商標)マウスは、そこから抗原に対する高親和性抗体を単離できる抗体ディスプレイライブラリーを作製するのに用いることができる。このようなライブラリーは、適切な標的、例えばオリゴペプチドまたはタンパク質に対してスクリーニングでき、それにより得られる抗体を、抗原を発現する細胞に対してスクリーニングして、天然にディスプレイされる抗原についての特異性を確かめる。完全IgG抗体は、次いで、組換えDNA技術を用いて発現される。例えば、WO 99/53049号を参照されたい。

20

## 【0209】

一般に、上記の細胞系統により産生された抗体は、ヒト軽鎖と共に完全ヒトIgG重鎖を有する。抗体は高い親和性を有し、固相および液相のいずれかにより測定したときに、典型的に、約 $10^{-9}$  ~ 約 $10^{-13}$ Mの $K_d$ を有する。

## 【0210】

理解されるように、本明細書に記載される抗体は、ハイブリドーマ細胞系統以外の細胞系統においても発現できる。特定の抗体をコードする配列は、適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換に用いることができる。形質転換は、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス内(またはウイルスベクター内)にパッケージングすること、および宿主細胞をウイルス(またはベクター)で形質導入することを含む、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する任意の公知の方法、または当該技術において知られたトランスフェクション方法(米国特許第4399216号、第4912040号、第4740461号、および第4959455号に例示されている)により行うことができる。用いる形質転換方法は、形質転換される宿主によって決まる。哺乳動物細胞に異種ポリヌクレオチドを導入する方法は、当該技術において公知であり、デキストラ媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリプレックス媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソームへのポリヌクレオチドの被包、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションを含む。

30

## 【0211】

発現のための宿主として入手可能な哺乳動物細胞系統は、当該技術において公知であり、American Type Culture Collection (ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞系統を含み、限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝癌細胞(例えばHep G2)、およびその他の多くの細胞系統を含む。

40

## 【0212】

(HAHA応答誘導の危険性を決定するためのアッセイ系としてのXenoMouse(登録商標)動物)

(XenoMouse(登録商標)動物のタイプ)

ある実施形態において、ヒト化生物を用いて、特定の抗体または抗体の部分をコードす

50

る遺伝子がHAHA応答を誘導する危険性を有するかを調べる。ある実施形態において、生物はXenoMouse(登録商標)動物である。つまり、XenoMouse(登録商標)動物に投与された抗体が動物においてHAHA応答をもたらす場合、この抗体は、XenoMouse(登録商標)動物の免疫原性遺伝子セットに類似の免疫原性遺伝子セットを有するいずれの患者にとっても危険性の高い抗体であるだろう。特に、患者とXenoMouse(登録商標)動物との間で危険性の高い遺伝子の不在が似ていることにより、XenoMouse(登録商標)動物がその患者にとって適切なモデルであるかが決定されるだろう。

【0213】

ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、個体または個体の群、例えば上記のような民族学的な群についてカスタマイズされる。例えば、カスタマイズされたXeno Mouse(登録商標)動物は、その患者のためにXenoMouse(登録商標)動物がカスタマイズされている場合、患者が欠損するのと同じ危険性の高い遺伝子を欠損するだろう。つまり、特定の民族学的背景の患者は、試験対象としての患者および民族学的な群が欠損するのと同じ危険性の高い遺伝子を欠損するカスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物を用いて、特定の抗体が患者においてHAHA応答をもたらすかを決定できる。つまり、その患者がHAHA応答を経験する危険性は、より正確に評価される。このことは、また、抗体の患者への投与をよりカスタマイズすることも可能にする。

10

【0214】

ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、抗体を受容する患者または集団が有するのと同じ危険性の低い遺伝子のみを有する。任意の人々の群について、危険性の高い遺伝子または危険性の低い遺伝子の傾向が一旦同定されると、その他のカスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物試験対象を創出することもできる。危険性プロフィールを、Abが投与された場合にHAHA応答が発生するであろう危険性の指標であるXenoMouse(登録商標)動物に移すことができる。ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、それが代表する集団についての危険性の高い遺伝子の少数を有する。別の実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、治療される集団についての危険性の高い遺伝子の約50%またはそれ未満、例えば50~20、20~10、10~5、5~1または1~0%を有する。別の実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、抗体を用いて治療する集団についての危険性の高い遺伝子を有さない。別の実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、人々の集団のコンセンサスからの危険性の低い遺伝子のみを有する。ある実施形態において、コンセンサスは民族学的な群を超える。ある実施形態において、コンセンサスは民族学的な群の中にある。

20

30

【0215】

ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、すべての危険性の高い遺伝子および危険性が中程度の遺伝子を欠損する。ある実施形態において、危険性の高い遺伝子は、 $V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ および $V_H3-64$ を含む。ある実施形態において、危険性の低い遺伝子は、危険性の高い遺伝子でないものである。ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、危険性の低い遺伝子のみを含む。

【0216】

ある実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、Homo sapiensからのすべてのまたは実質的にすべてのV、D、および/またはJ遺伝子を含む。このようなXenoMouse(登録商標)動物は、ヒト抗体に対してHAHA応答を示さないはずであり、HAHA応答の不在を証明するネガティブコントロールとして有用であり得る。

40

【0217】

(HAHA応答を誘導する危険性の検出または決定のための、XenoMouse(登録商標)動物の使用方法)

ある実施形態において、抗体がヒトにおいてHAHA応答を誘導するかどうかを決定するためのXenoMouse(登録商標)動物の使用方法が提供される。該方法は、候補抗体をXenoMouse(登録商標)動物に投与し、十分な時間を経過させてHAHA応答が発生することを可能にし、XenoMouse(登録商標)動物からサンプルを回収し、該サンプルを試験抗体に指向された抗

50

体の存在について試験し、該サンプルを試験抗体に結合する物質(例えば抗体)の存在または不在について調べることを伴う。このような使用の例を、以下の実施例7に示す。

【0218】

ある実施形態において、2つの抗体を2つの類似のXenoMouse(登録商標)動物に与える。1つの抗体は、そのHAHA誘導性活性が不明である候補抗体であり、もう1つの抗体は、その誘導されたHAHA応答が試験抗体のHAHA応答に対する参照点として用いられるコントロール抗体である。HAHA応答を誘導する危険性が既知または予測されるいずれの抗体もコントロールとして用いることができる。

【0219】

例えば、ある可能性のあるコントロール抗体は、ヒトにおいてHAHA応答を誘導することが知られているHUMIRA(登録商標)、抗体D2E7である(配列番号1~4、それぞれLCVR、HCVR、LC CDR3、HC CDR3、図23A)。そのような抗体のXenoMouse(登録商標)動物への投与から得られるHAHA応答は、図12A~図12Cで見ることができる。D2E7のXenoMouse(登録商標)動物への投与が、免疫原性の著しい量をもたらしたことは明らかである。一方、候補のヒトIgG1、抗体Aは著しいHAHA応答を誘導しなかった(図11A~Cを参照)。候補抗体である抗体Aは、2002年12月2日出願の同時係属の米国特許出願第60/430729号に記載される抗体であり、該出願の配列番号71~74および本明細書の配列番号5~8(図23A)に同定される配列を有する。

【0220】

ヒトまたはヒト化抗体を作製する能力を有するいずれのXenoMouse(登録商標)動物あるいはその他のトランスジェニック生物も用いることができる。ある実施形態において、ヒトの危険性の高い遺伝子を有さないXenoMouse(登録商標)動物を用いることができる。このような「普遍的」生物は、HAHA応答を誘導する危険性があるかを検出する最大の能力を有するので、有用である。このようなXenoMouse(登録商標)動物は、特定の抗体が特定の患者においてHAHA応答を誘導するかを予測することにおいて、種々の遺伝子セットを有する別のXenoMouse(登録商標)動物ほど有用ではないだろう。なぜなら、そのようなXenoMouse(登録商標)動物は、集団の個別のメンバーに関して多くの擬陽性をもたらし得るからである。しかし、ある実施形態において、普遍的マウスは、人々の集団を越えてHAHA応答を誘導しない普遍的抗体を同定するのに有用である。例えば、すべての危険性の高い遺伝子を欠損したトランスジェニック生物は集団内の誰についても危険性の高い遺伝子を有する任意の抗体に対してHAHA応答を示すが、HAHA応答を誘導しなかった任意の抗体は、集団内の誰においてもHAHA応答を誘導する可能性が低いだろう。よって、このような生物は、普遍的HAHA抗体のスクリーニングに有用である。

【0221】

ある実施形態において、患者の遺伝子セットにない危険性の高い遺伝子は、試験抗体が投与されるであろうカスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物に存在しない。これらのカスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物を用いることにより、発生し得る擬陽性の数を減少することができる。ある実施形態において、カスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物および患者は、同一の危険性の高い遺伝子の全てを欠損する。別の実施形態において、カスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物および患者または患者が属する集団は、同一の危険性の高い遺伝子の100%またはそれ未満、例えば同一の危険性の高い遺伝子の100~99、99~98、98~95、95~90、90~80、80~70、70~50、50~30、30~1、1~0パーセントを欠損する。別の実施形態において、カスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物は、患者または患者が属する集団と同じV、D、およびJ遺伝子についての遺伝子セットを有する。ある実施形態において、カスタマイズされたXenoMouse(登録商標)動物および患者または集団は、少なくとも1つの遺伝子を共通して有する。例えば、これらは同じV、D、またはJ遺伝子の100、100~90、90~70、70~50、50~30、30~10、10~1、または1~0パーセントを、共通して有してよい。

【0222】

別の実施形態において、XenoMouse(登録商標)動物は、抗体を受容することになってい

10

20

30

40

50

る患者に対して厳密にカスタマイズされる必要はない。つまり、XenoMouse(登録商標)動物は、患者が欠損する危険性の高い遺伝子を有することができ、つまり、抗体をXenoMouse(登録商標)動物に投与することが擬陰性をもたらす可能性を上昇させる。しかし、抗体のXenoMouse(登録商標)動物への投与は、これを考慮に入れることができる。その特定の危険性の高い遺伝子を有する抗体は、XenoMouse(登録商標)動物によりHAHA応答が創出されなくても、患者に対する可能性のある抗体として含まれない。

#### 【0223】

HAHA応答が発生するかまたはモニタリングされることを可能にするいずれの投与方法も、これらの実施形態の目的に適している。ある実施形態において、試験または候補抗体は、患者に用いられるのと類似のアプローチを用いてマウスに投与される。別の実施形態において、HAHA応答を誘導する可能性を最適化する方法が有用であり得る。例えば、図12A~Cに示すように、静脈内投与は、HAHA応答を誘導できる抗体のマウスにおけるHAHA応答の検出を導くが、抗体を皮下投与またはアジュバントと共に投与すると、より高い応答が得られる。ある実施形態において、抗体は、タンパク質または核酸として投与される。

#### 【0224】

さらに、HAHA応答は、抗体の複数回投与の後により発生しやすいので、HAHA応答が誘導されるかを調べるために、試験抗体をXenoMouse(登録商標)動物に繰り返し投与することが有利であり得る。

#### 【0225】

免疫原性応答は、本来の試験抗体に指向された抗体の存在を明らかにするものであれば、いずれの方法によっても測定できる。例えば、実施例7で論じるように、ブリッジング(bridging) ELISAアッセイを用いることができる。あるいは、本来の試験抗体は、通常、わかっているので、BIAcoreアッセイ系のように試験抗体をビーズまたはチップに適用して、試験対象の血清サンプル中に候補または試験抗体に結合するタンパク質が存在するかを検出することは容易である。基質が試験抗体に結合することは、免疫原性応答が存在する可能性があることを示唆する。ある実施形態において、調べられる特定の応答は、HAHA応答である。これは、ヒト抗体またはヒト化抗体をXenoMouse(登録商標)動物に投与することにより行うことができる。

#### 【0226】

一般的に、抗体により発生する免疫原性応答のレベルは、ポジティブまたはネガティブコントロール抗体のいずれかと比較できる。ある実施形態において、免疫原性またはHAHA応答が発生するか否かは、HAHA応答が発生したことを示すネガティブコントロールまたは基準設定からずれた、バイナリアンサー(binary answer)である。別の実施形態において、HAHA応答の存在または不在は、投与された抗体の時間または濃度に関係する。応答の存在または不在は、投与方法を考慮に入れることもできる。ある実施形態において、正のHAHA応答は、ネガティブコントロールまたは負の応答の基準設定での量よりも大きな量で、ネガティブコントロールの少なくとも100パーセントを超えて、例えばネガティブコントロールの101、101~200、200~300、300~500、500~800、800~1500、1500パーセントまたはそれより多い量で抗体に結合する物質の量を表す応答である。ある実施形態において、投与した抗体に結合する物質は、宿主抗体として規定される。つまり、投与された抗体または試験抗体に結合する宿主抗体における増加のみが、「投与された抗体に結合する物質」という用語により包含される。別の実施形態において、投与された抗体に結合する物質における増加は必要でない。例えば、宿主は投与された抗体に対する確立された免疫原性応答を既に有してよい。つまり、投与された抗体に結合する実質的な量はいずれも、投与された抗体に結合する物質の増加を後でもたらさなくても、抗体がHAHA応答を誘導することを示し得る。データのこのような比較は、予測されるかまたは標準の応答を通して、通常行われる。

#### 【0227】

応答の重要性は、多くの因子、例えば応答が発生するのにどれぐらいの長さが必要かに加えて、HAHA応答が発生する危険性に比した抗体の必要性および利益、ならびに抗体と共

10

20

30

40

50

に投与される可能性のある薬物などの因子によって決まるだろう。

【0228】

HAHA応答が誘導される危険性を知ることの利点は、HAHA応答の発生の危険性を低減するために抗体と共に他の剤を加えるべきか否かということである。

【0229】

これらのXenoMouse(登録商標)動物および開示される方法のさらなる使用の1つは、Xeno Mouse(登録商標)動物およびHAHA誘導性の抗体を組み合わせ、HAHA応答の発生の危険性を減少させ得る薬物または物質(抗HAHA応答またはHAHA阻害化合物)をスクリーニングできることである。例えば、HAHA応答をXenoMouse(登録商標)動物において誘導する抗体を得て、抗HAHA応答化合物の候補がHAHA応答の発生の危険性を低減させるのに適切であるかを決定するために、抗HAHA応答化合物の候補をHAHA誘導性の抗体と共にXenoMouse(登録商標)動物に加えることができる。同様に、HAHA応答を誘導する抗体と共にXenoMouse(登録商標)動物を用いて、HAHA応答をブロックする物質(HAHA誘導性の抗体)をスクリーニングできる。同様に、マウスおよび抗体を用いて、化合物の有効用量を決定することを助けることができる。

10

【0230】

当業者に理解されるように、上記の議論は、XenoMouse(登録商標)動物およびその使用の方法を、危険性の高いIV遺伝子に関して時折詳細にする。しかし、遺伝子はDまたはJ遺伝子でもあってよい。さらに、軽鎖および重鎖の遺伝子の両方が考えられる。

【0231】

(上記の方法におけるさらなる変動の排除または最小化)

当業者に理解されるように、HAHA誘導の危険性の検出器としての任意のトランスジェニック生物の適用を複雑にし得る、マウスとヒトとの機構のさらなる違いが存在し得る。以下で論じるこのような因子の1つは、T細胞エピトープのレパートリーにおける役割および存在し得る違いである。この因子およびその背後にある理論は、説明のためだけの手段であり、本発明を限定する意図はない。

20

【0232】

タンパク質抗原に対するB細胞媒介抗体応答は、同種の相互作用の形態でのT細胞のヘルプおよび活性化されたT細胞により放出される可溶性因子に主に依存する。一旦、抗原が取り込まれ抗原提示細胞(APC)によりタンパク質溶解処理されると、抗原認識によるT-ヘルパー(Th)細胞の活性化により、このヘルプが引き起こされる。このような認識は、Th細胞上のT細胞受容体(TCR)が、APCの表面上の主要組織適合複合体(MHC)クラスIIヘテロダイマー分子の溝に提示された抗原由来ペプチドの組合せに特異的に結合するときに発生する。Th細胞によるペプチド認識は、クラスIIのMHCがペプチドに結合する能力(これは、クラスIIのMHC分子のハプロタイプに依存するので、遺伝的に抑制される)、およびクラスIIのMHCとの関連で、TCRがペプチド配列を認識する能力(「T細胞エピトープ」またはTCE)の両方に依存する。

30

【0233】

タンパク質抗原を用いる免疫化がB細胞応答を誘導できないときは(このようなB細胞により産生され、血清中に存在する抗体として観察される)、いくつかの原因が存在し得る。例えば、このことは、あるレベルでの免疫応答の活性化を不能にすることを導く、生物において作用する寛容機構、T細胞またはB細胞寛容を反映するだろう。あるいは、タンパク質溶解性の抗原プロセッシングおよびクラスIIのMHC提示抑制により、Th細胞に提示されている抗原由来ペプチドの限定されたレパートリーがもたらされることが認識される。つまり、生物の発現されるハプロタイプのクラスIIのMHC分子により提示されないか、またはTh細胞上のTCRにより認識され得るT細胞エピトープを示さないかのいずれかであるペプチドを、特定の抗原が産生する可能性がある。集合的に、このようなペプチドレパートリーは、Th細胞活性化の誘導に失敗し、結局、B細胞活性化および抗体産生を導く事象は発生しない。非ヒト生物を用いてヒトにおける免疫原性を予測するときに、このような生物におけるT細胞エピトープのレパートリーは、それらが提示できるクラスIIのMHCおよびペ

40

50

プチドの違いのために、ヒトにおいて存在するものとは異なるであろうという警告が存在する。このことは、抗原上のB細胞エピトープの存在(すなわち、B細胞により産生される抗体により認識されるエピトープ)が正確に報告されない「擬陰性」の結果をもたらし得る。

#### 【0234】

この可能性に取り組むいくつかの方法がある。1つの方法は、以下の実施例8でさらに論じる。広く特徴付けると、抗原物質を試験すべき抗体と結合させることができる。この議論の目的のために、抗原物質は、抗原性応答を誘導できるものである。例えば、これは抗体の産生を刺激することができる。ある実施形態において、該物質は通常、マウス、ヒト、または一般的な哺乳動物において抗原性である。別の実施形態において、該物質は、それが投与される生物において抗原性である。

10

#### 【0235】

例えば、ヒト化IgG1、を、抗原性タンパク質配列、例えば配列CQYIKANSKFIGITELKK(配列番号9)を有する合成ペプチド(以下、「T細胞エピトープ」または「TCE」という。この配列は、普遍的に抗原性であると記載されている [Panina-Bordignon, P., Tan, A., Ter mijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. P. および Lanzavecchia, A., Eur. J. Immunol. 19, 2237~2242頁(1989)] )と結合させることができる。組み合わせた抗体と抗原物質とを免疫原性応答を誘導する生物に投与する場合、抗原物質がT細胞受容体および/または主要組織適合複合体の互換性の問題の可能性を回避するので、抗原物質の存在は、上記の擬陰性の危険性を低減するだろう。内因性T細胞エピトープが存在しなくても、試験抗体は、内因性B細胞エピトープ(抗体結合部位)を有していれば、抗体応答を誘導する。ある実施形態において、「TCE」は試験物質と結合する任意の外因性ペプチドである。

20

#### 【0236】

抗原性セグメントは、抗原性セグメントが適切に機能でき、かつ試験抗体のプロセッシングおよび認識を過度に妨げない限りは、あらゆる方法により抗体に付着できる。ある実施形態において、マレイミド化学反応(maleimide chemistry)を用いて、抗原性セグメントを試験抗体に連結することができる。例えば、スルホ-SMCCを用いることができる。これは、抗体上のアミンと反応するNHSエステルと、TCEペプチドのN末端システイン上のスルフヒドリル基と反応してTCE-装飾抗体(「Ab-TCE」)を作製するマレイミド基とを含有する。コントロールとして、さらなる抗体を同様にして処理できるが、TCEをこの反応に加えない(「Ab-偽」)。次いで、未処理の抗体およびTCE単独と共に、これらを、XenoMouse(登録商標)動物に投与できる。このような実験の結果を、実施例9に関連して、以下に詳細に記載する。以下に詳細に説明するように、投与した抗体に対して指向された抗体の著しい誘導をもたらしたサンプルは、TCEと結合した抗体、およびアジュバントの存在下で尾の付け根、それに続いて腹腔内で投与した抗体だけであった。つまり、TCEの使用は、抗体がHAHA応答をXenoMouse(登録商標)動物において誘導できる可能性を効率的に増大できるようである。

30

#### 【0237】

(HAHA応答阻害剤を試験するためのトランスジェニックXenoMouse(登録商標)動物)

ある実施形態において、抗体に対してHAHA応答を示すXenoMouse(登録商標)動物は、可能性のある抗HAHA化合物(AHAHA化合物またはHAHA阻害剤化合物)をスクリーニングするために用いられる。例えば、XenoMouse(登録商標)動物がHAHA誘導性の抗体を投与されたときにHAHA応答を示すならば、XenoMouse(登録商標)動物に投与され、かつHAHA誘導性の抗体がXenoMouse(登録商標)動物に投与されたときに、予測されるHAHA応答の誘導を阻害する任意の物質が、ヒト系においてもHAHA応答の誘導を妨げるのに有用であるだろう。つまり、ある実施形態において、特定の抗体に対してHAHA応答を示すXenoMouse(登録商標)動物が、種々の化合物を、HAHA応答を抑制する化合物の能力について試験するための手段として企図される。得られる化合物は、一般的にHAHA応答の誘導を妨げるか、またはHAHA応答を誘導する原因である特定の抗体についてのHAHA応答の誘導を妨げるために効果的であり得る。

40

50

## 【0238】

別の実施形態において、HAHA応答を抑制するために試験される化合物、候補HAHA阻害剤は、HAHA誘導性の抗体をXenoMouse(登録商標)動物に投与する前、その最中または後にXenoMouse(登録商標)動物に投与される。XenoMouse(登録商標)動物は、内部でもHAHA誘導性の抗体を産生してよい。例えば、XenoMouse(登録商標)動物は、問題のHAHA誘導性の抗体タンパク質についてのトランスジェニックマウスであってよい。あるいは、XenoMouse(登録商標)動物は、タンパク質を産生している、限定された数の細胞を有することができる。あるいは、XenoMouse(登録商標)動物は、XenoMouse(登録商標)動物の細胞に感染するウイルスまたはウイルス構築物の使用を通じて抗体を産生することができる。特に必要でない限り、HAHA誘導性の抗体を、HAHA応答を可能にする任意の様式で、XenoMouse(登録商標)動物試験対象に投与できる。

10

## 【0239】

ある実施形態において、HAHA阻害剤を試験する方法は、1) 1種または複数種の候補HAHA阻害剤と、2) HAHA誘導性の抗体との両方をXenoMouse(登録商標)動物に投与することを伴う。必要であれば、候補HAHA阻害剤およびHAHA誘導性の抗体のいずれかまたは両方の連続的な供給を、そのHAHA阻害剤がない場合にHAHA応答の発生に必要とされるであろう期間、XenoMouse(登録商標)動物に投与する。次いで、サンプルをXenoMouse(登録商標)動物から採取して、HAHA応答が発生したかを決定する。もしなければ、またはHAHA応答の発生が少ない量であれば、候補HAHA阻害剤はHAHA阻害剤と考えられるだろう。HAHA阻害剤は、HAHA応答を100%阻害する必要はない。例えば、HAHA阻害剤は、少なくともいくつかのHAHA応答、例えばHAHA応答の1、2、3~5、5~7、7~10、15~20、20~30、30~50、50~70、70~80、90~95、95~97、98、99、または100パーセントを阻害するだろう。この応答は、種々の方法により、例えばXenoMouse(登録商標)動物の血清においてHAHA誘導性の抗体に結合する物質を探すことにより測定できる。機能的なHAHA阻害剤は、ある一連の条件下、HAHA誘導性の抗体に指向された抗体の存在を低減させるかまたは排除するだろう。ある実施形態において、HAHA阻害剤はHAHA応答の発生を遅延させるだろう。つまり、HAHA応答およびHAHA応答のサイズは依然として発生するが、応答が発生するためにより長くかかるだけである。HAHA阻害剤は、その応答を少なくとも1パーセント、例えば1~5、5~10、10~20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、150~200、200~300パーセントまたはそれより多く遅延させるだろう。

20

30

## 【0240】

任意に、さらなるスクリーニング工程を行って、HAHA誘導性AbがHAHA阻害剤の存在下でまだその結合能力に対して機能的であるかを確かめることができる。もちろん、HAHA阻害剤はXenoMouse(登録商標)動物に投与されてもいるので、阻害剤に対する免疫原性応答も調べることができる。

## 【0241】

HAHA誘導性の抗体は、患者に投与されたときにHAHA応答を誘導する抗体である。このことは、図11A~Dおよび12A~Dに示すように、実験的に決定できる。このことは、その遺伝子頻度、ならびにどの遺伝子が危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子であるかを調べることによっても決定できる。低頻度遺伝子を含む抗体は、その遺伝子が低頻度遺伝子である(例えば個体に存在しない)人々にとって、HAHA誘導性の抗体であるだろう。

40

## 【0242】

XenoMouse(登録商標)動物を例として用いているが、類似のヒトベースの免疫系を有するその他の生物も、記載された組成物および方法に対して機能するだろう。

## 【0243】

(治療のための投与および製剤)

作用の持続時間が延長されることにより、静脈内、皮下または筋肉内注射などの代替非経口経路による、より頻度が低くかつより簡便な投与計画が可能になるだろう。

## 【0244】

in vivo投与に用いられる場合、本明細書に記載される抗体製剤は滅菌されるべきであ

50

る。このことは、例えば、凍結乾燥および水などを加えて戻す前または後に、滅菌ろ過膜を通してろ過することにより容易に達成される。通常、抗体は凍結乾燥形態または溶液で貯蔵されるだろう。治療用抗体組成物は、一般的に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば静脈注射用の溶液バッグ、または製剤の回収を可能にするアダプタを有するバイアル、例えば皮下注射針により刺すことができる栓を有するバイアルなどに入れられる。

#### 【0245】

抗体の投与経路は既知の方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、くも膜下腔内、吸入もしくは病巣内経路による注射または注入、あるいは以下に記載する徐放系に従う。抗体は、注入またはポラス注入により連続的に投与されることが好ましい。

10

#### 【0246】

治療に用いられる抗体の有効量は、例えば、治療対象、投与経路、および患者の状態などによって決まる。よって、治療専門家が、最適な治療効果を得るために必要とされるように用量滴定し、投与経路を変更することが好ましい。典型的には、臨床医が所望の効果を達成する投与量まで抗体を投与するだろう。この治療の経過は、従来のアッセイまたは本明細書に記載のアッセイにより、容易にモニタリングされる。

#### 【0247】

本明細書に記載の抗体は、薬学的に許容可能なキャリアとの混合物として調製できる。治療用組成物を、静脈内または鼻もしくは肺を通して、好ましくは液体または粉末エアロゾル(凍結乾燥)として投与することができる。所望により、非経口または皮下でも組成物を投与できる。全身投与する場合には、治療用組成物は、滅菌かつパイロジェンフリーであって、pH、等張性および安定性に当然払うべき注意を払った非経口的に許容される溶液であるべきである。これらの条件は、当業者に知られている。簡単に述べると、本発明の化合物の用量製剤(dosage formulation)は、所望の純度を有する化合物と生理的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤とを混合することにより、貯蔵または投与用に調製される。このような物質は、用いられる投与量および濃度で受容者に非毒性であり、TRIS HCl、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩およびその他の有機酸塩などのバッファー;アスコルビン酸などの抗酸化剤;ポリアルギニンなどの低分子量(約10残基未満)ペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質;ポリビニルピロリジノンなどの親水性ポリマー;グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニンなどのアミノ酸;セルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、およびその他の炭水化物;EDTAなどのキレート剤;マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール;TWEEN、PLURONICS、もしくはポリエチレングリコールなどの、ナトリウムおよび/またはノニオン性界面活性剤などの対イオンを含む。

20

30

#### 【0248】

注射用の滅菌組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1990)に記載されるような従来の薬学のプラクティスに従って製剤化され得る。例えば、活性化合物をビヒクル、例えば水またはゴマ油、ピーナツ油、もしくは綿実油などの天然植物油、あるいはオレイン酸エチルなどの合成脂肪酸ビヒクルに溶解または懸濁することが所望されるだろう。バッファー、保存料、抗酸化剤などを、許容される薬学プラクティスに従って組み込むことができる。

40

#### 【0249】

徐放性調製物の適した例には、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、該マトリックスは成型物、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、Langerら、J. Biomed Mater. Res.、(1981) 15: 167~277頁およびLanger、Chem. Tech.(1982) 12: 98~105頁に記載される、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3773919号、欧州特許第58481号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー(Sidmanら、Biopolymers、(1983) 22:5

50

47～556頁)、非分解性エチレン - ビニルアセテート(Langerら、上記参照)、分解性乳酸 - グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON Depot(商標)(乳酸 - グリコール酸コポリマーとロイプロリドアセテートとで構成される注射可能なミクロスフェア)、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133988号)が含まれる。

【0250】

エチレン - ビニルアセテートおよび乳酸 - グリコール酸などのポリマーは100日以上にわたって分子を放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短い期間でタンパク質を放出する。被包されたタンパク質が体内で長期間存続する場合、37℃で湿気に曝露された結果として、それらは変性または凝集することがあり、生物学的活性の損失および免疫原性の潜在的变化をもたらされ得る。用いる機構に応じてタンパク質安定化を工夫することが合理的なストラテジーであり得る。例えば、凝集機構がジスルフィド交換を介しての分子間S-S結合形成であると見出された場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の制御、適切な添加物の使用、および特定のポリマーマトリックス組成物の開発により達成されるだろう。

【0251】

徐放性組成物には、結晶を懸濁物に保持できる適切な製剤に懸濁された、抗体の結晶の調製物も含まれる。皮下または腹腔内で投与されたときにこれらの調製物は、徐放性効果を発揮できる。その他の組成物には、リポソームに封入された本発明の抗体も含まれる。このような抗体を含むリポソームは、それ自体知られた方法により作製される：米国特許第DE 3218121号; Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1985) 82:3688～3692頁; Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1980) 77: 4030～4034頁; 欧州特許第52322号; 欧州特許第36676号; 欧州特許第88046号; 欧州特許第143949号; 欧州特許第142641号; 日本国特許出願第83-118008号; 米国特許第4485045号および第4544545号; ならびに欧州特許第102324号。

【0252】

ある患者についての抗体製剤の投与量は、疾患の重篤度およびタイプ、体重、性別、食餌、投与期間および経路、その他の治療ならびにその他の関連する臨床上的因子を含む、薬物の作用を変更することが知られる種々の因子を考慮に入れて、主治医により決定されるだろう。治療上有効な投与量を、*in vitro*または*in vivo*方法のいずれかにより決定してよい。

【0253】

治療に用いられる抗体の有効量は、例えば、治療対象、投与経路、および患者の状態によって決まる。よって、治療専門家が、最適な治療効果を得るために必要とされるように用量滴定し、投与経路を変更することが好ましい。典型的な一日投与量は、上記の因子に応じて、約0.001 mg/kgから100 mg/kgまで、またはそれより多くであるだろう。典型的には、臨床医が所望の効果を達成する投与量まで治療用抗体を投与するだろう。この治療の経過は、従来のアッセイにより、または本明細書に記載されるとおりに、容易にモニタリングされる。

【0254】

当然のことながら、本明細書に記載の組成物および方法に従う治療用物質の投与は、適切なキャリア、賦形剤、および製剤に組み込まれて移動、送達、耐性などを改善するその他の剤と共に投与されるだろう。多くの適切な製剤を、すべての薬剤師に知られた処方書で見出すことができる：Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版、Mack Publishing Company, Easton, PA (1990))、特にその中のBlock、Lawrenceによる第87章。これらの製剤は、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、オイル、脂質、脂質(カチオン性またはアニオン性)含有小胞(例えばLipofectin(商標))、DNAコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油滴型および油中水滴型エマルション、エマルションカーボワックス(carbowax)(種々の分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、ならびにカーボワックス含有半固体混合物を含む。上記のいずれの混合物も、製剤中の活性成分が製剤により不活性化されず、かつ製剤が投与経路に生理的に適合し耐性であるならば、本発明に従う

10

20

30

40

50

治療および療法に適切であり得る。Baldrick P.、「Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.」、Regul. Toxicol. Pharmacol. 32 (2): 210~8頁(2000)、Wang. W.、「Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals」、Int. J. Pharm. 203(1-2): 1~60頁(2000)、Charman WN、「Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts」、J Pharm Sci. 89(8): 967~78頁(2000)、Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulations」、PDA J Pharm Sci Technol. 52:238~311頁(1998)、ならびに薬剤師に公知の製剤、賦形剤およびキャリアに関するさらなる情報について、その中に引用された文献も参照されたい。

**【0255】**

(実施例)

(実施例1)

本実施例は、正規化宿主 $V_H$ 遺伝子プロフィールをどのようにして作製できるかを示す。まず、プロフィールのメンバーのすべてにおいてどの $V_H$ 遺伝子が存在しているかを決定する。すべての $V$ 遺伝子の配列、およびその同定方法が現在ではわかっているので、このことは当業者にとってはルーチンである。次に、各遺伝子についての出現頻度を、遺伝子が出現する人の数を決定し、その数をプロフィール内の人の数で割ることにより決定する。図1Aに示すように、5つの宿主の遺伝子を決定し、次いで、図1Cに示すような様々な方法で正規化する。これを、各遺伝子について繰り返し、ある集団についての $V$ 遺伝子の完全プロフィールを得る。

**【0256】**

(実施例2)

本実施例は、正規化宿主 $V$ タンパク質プロフィールをどのようにして作製できるかを示す。実施例1の正規化宿主 $V$ 遺伝子プロフィールを、実際に発現される遺伝子について種々のアミノ酸配列に変換する。図1Aの $V$ 遺伝子から発現されるタンパク質の例を図1Bに示し、得られる頻度を図1Dに示す。

**【0257】**

図1Cと図1Dとの比較から分かるように、頻度、延いては遺伝子に関する危険性は、分析がDNAレベルで行われるかまたはタンパク質レベルで行われるかにより変動し得る。

**【0258】**

(実施例3)

本実施例は、遺伝子の選択に関する危険性を低減させるために行うことができる変更を示す。図3に示すように、遺伝子の選択において危険性の高い遺伝子が一旦同定されると、それを最適化できる。HAHA応答を低減させる可能性を増大させ、かつ機能性の損失の危険性を減少させるために、正規化宿主 $V$ タンパク質プロフィールにおける情報により改変を支配できる。この例を図6に示す。図6では、最適化される遺伝子は、出現頻度が最も低い(20%)ので遺伝子Cである。本実施例において、遺伝子Cは除去されるだろう。置換遺伝子が必要な場合は、遺伝子Cの置換は、類似のタンパク質構造を有する他の遺伝子を決定するためにプロフィールを調べることにより決定される。つまり、これは遺伝子B、または遺伝子Cよりも遺伝子Bにより似ている別の遺伝子であり得る。

**【0259】**

(実施例4)

本実施例は、 $V$ 遺伝子を抗体の形で患者に与えたときに、特定の $V$ 遺伝子に関する危険性をどのようにして決定できるかを示す。まず、正規化宿主 $V$ 遺伝子プロフィールを、患者が属する集団について選択する。このことは、患者がどの $V$ 遺伝子を有するかまたは有する可能性があるかを決定することにより行うことができる。次いで、患者に投与される抗体の $V$ 遺伝子を決定する。次いで、抗体の $V$ 遺伝子を、プロフィール内の $V$ 遺伝子と比較する。

**【0260】**

例えば、集団のプロフィール内にA、B、C、D、およびEの5つの遺伝子があり、頻度は遺

10

20

30

40

50

伝子Aが30%、遺伝子Bが2%、遺伝子Cが5%、遺伝子Dが100%、および遺伝子Eが99%であり得る。抗体の一部分がA遺伝子によりコードされる場合、抗体は70%危険遺伝子であると考えられる。抗体の一部分がB遺伝子によりコードされる場合、これは98%危険遺伝子であると考えられる。抗体の一部分がC遺伝子によりコードされる場合、これは95%危険遺伝子であると考えられることができる。抗体の一部分がDまたはE遺伝子によりコードされる場合、これは0または1%危険遺伝子であると考えられることができる。

#### 【0261】

##### (実施例5)

本実施例は、 $V_H$ 遺伝子の出現頻度と、遺伝子が患者においてHAHA応答を誘導する危険性との関係をどのようにして確かめることができるかを記載する。

10

#### 【0262】

まず、既知の遺伝子セットを有する抗体を患者に投与する。次いで、患者をHAHA応答について試験する。HAHA応答を誘導する抗体は、それらの遺伝子セットにポイント値を与えられる。投与された抗体すべての遺伝子すべては、それぞれのポイント値が合計される。次いで、これらの値を、遺伝子がどのような頻度で出現するか、正規化する。つまり、10個の抗体に存在するがそのうちの1つのみがHAHA応答の原因である遺伝子は0.1ポイント値を与えられ、1つの抗体に存在するが、あるプロフィールのすべての個体においてHAHA応答の原因となる遺伝子は1.0ポイント値を与えられる。最高のポイント値を有する遺伝子は、HAHA応答の誘導と最大の関係をもつ遺伝子となるだろう。次いで、これらのポイント値を、正規化宿主 $V$ 遺伝子プロフィールの遺伝子の出現頻度と比較して、その関係がどれぐらい近いかを決定する。このことは、共通の遺伝子はHAHA応答と関係する頻度がより低く、集団において希少な遺伝子は、HAHA応答と関係する頻度がより高いことを証明する。

20

#### 【0263】

##### (実施例6)

$V_H3-9$ 遺伝子の存在を、多くのサンプルにおいて調べた。標準的なPCR-ELISA法を用いて、ヒトドナーおよび4つのヒト細胞系統、A375、A549、MCF7およびHEK-293細胞のゲノムDNAにおける $V_H3-9$ の出現を調べた。PCR-ELISAで用いたビオチン標識プローブは、(5' 3')[BioTEG] CCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGC (配列番号14、図23B)の配列を有していた。図10に示す結果は、 $V_H3-9$ および $V_H3-9$ の存在における多様性は、このプローブを用いるPCR-ELISAにより検出できることを証明する。

30

#### 【0264】

##### (実施例7)

本実施例は、XenoMouse(登録商標)動物が、抗体がHAHA応答を誘導するかを決定するのに有用であることを証明する。完全ヒト抗体を産生できるXenoMouse(登録商標)マウスの群を、選択された完全ヒト抗体で免疫した。各マウスは、2つの異なる抗体(AまたはB)の1つを、2週間の間隔で、投与あたり10 $\mu$ gの抗体で3回投与された。さらに、いくつかのマウスには、ポジティブコントロール免疫原としてキーホールリンペットヘモシアニン(KLH; Pierce, Rockford IL) 10 $\mu$ gを投与し、その他にはネガティブコントロールとしてキャリアのみを注射した。抗体Aは、XenoMouse(登録商標)マウスから創出され、TNF $\alpha$  に対して指向された抗体であった。抗体Aは、米国特許出願第60/430729号で以前に開示され(配列番号71~74; 本明細書の配列番号5~8、および配列番号12および13、これらはそれぞれ軽鎖および重鎖のコンセンサス配列を示す、図23B)、299v2として同定された。抗体Bも、TNF $\alpha$  に対して指向された抗体であった。抗体BはHUMIRA (D2E7、アダリムマブ)としても知られ、この抗体は、2001年7月10にSalfeldらに発行された米国特許第6258562号の主題であった。前記の特許第6258562号では、この抗体を、ヒトTNF $\alpha$  に結合するヒト抗体として特徴付けている(一般的には前記特許第6258562号を参照されたい)。しかし、以前の研究は、抗体Bが、ヒトに投与されたときにHAHA応答を誘導できることを証明していた(情報は、FDAウェブサイトpdf adalabb123102r1p2.pdfから入手可能である)。

40

#### 【0265】

抗体、KLH、またはキャリアを、静脈内(「I. V.」)若しくは皮下(「S. C.」)投与する

50

か、またはフロイント完全アジュバント(Sigma, St. Louis, MO)で乳化して尾の付け根(第1投与)に投与し、それに続いてフロイント不完全アジュバント(Sigma)で乳化して腹腔内(第2および第3投与)(「BIP/ADJ」)に投与した。マウスから後眼窩採血により図11A~Cおよび図12A~Cに示す時間で血清を得て、次の段落に記載するようにしてすべてのサンプルが試験できるまで-80℃で保存した。

#### 【0266】

ブリッジングELISAを用いて、注射した抗体に反応性のある成分の存在について、血清サンプルをアッセイした。このELISAアッセイにおいて、Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc, Rochester, NY)を試験抗体またはKLHで適切にコートし、次いで、プレートを洗浄して、ウシアルブミンでブロッキングした。次いで、XenoMouse(登録商標)動物の血清サンプルを1:10希釈で二重(in duplicate)に加えた。ネガティブおよびポジティブコントロールとして、10%正常マウス血清(Equitech-Bio, Kerrville, TX)、およびそれぞれ10%マウス血清中で希釈したウサギ抗ヒトIgG(Southern Biotechnology, Birmingham, AL)またはXenoMouse(登録商標)動物由来抗KLH(Abgenix)を用いた。インキュベートした後、血清を洗い流し、ビオチン化形態の試験抗体またはKLH(EZ-Link(商標) Sulfo-NHS-LC-Biotinylationキットおよび付属のプロトコル、Pierceを用いて調製した)をウェルに加え、続いてさらに洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンでインキュベートした。視覚化はEnhanced K-blue TMB基質(Neogen, Lexington, KY)を用い、2Mの硫酸を用いて反応を停止させた。プレートを450nmの波長のプレートリーダーで読んだ。データをO.D. マルチプル(O.D. Multiple)として表し、下記式：

サンプル平均OD(二重のウェル)/ネガティブコントロール平均OD(プレートあたり6~8ウェル)

を用いて算出した。

#### 【0267】

O.D. マルチプル>2は、試験抗体に対する血清抗体について陽性であると考えた。2つの完全ヒトIgG1試験抗体からのデータを図11A~11Cおよび図12A~12Cに示す。BIP/ADJの結果を図11Aおよび12Aに示し、S.C.の結果を図11Bおよび12Bに示し、そしてI.V.の結果を図11Cおよび12Cに示す。

#### 【0268】

図11A~Cのデータから分かるように、抗体Aでは、抗体の投与方法にかかわらず、XenoMouse(登録商標)動物での免疫原性が検出されなかった。一方、図12A~Cから分かるように、抗体Bは、高いレベルの免疫原性を誘導した。10%正常マウス血清からのネガティブコントロールの結果およびウサギ抗ヒトIgGからのポジティブコントロールの結果は、次の通りであった。抗体Aについて、ネガティブコントロールは0.05の平均OD、0.01の標準偏差および1.00のODマルチプルであり、ポジティブコントロールは0.19の平均OD、0.02の標準偏差および3.81のODマルチプルであった。抗体Bについて、ネガティブコントロールは0.07の平均OD、0.00の標準偏差および1.00のODマルチプルであり、ポジティブコントロールは0.11の平均OD、0.02の標準偏差および1.55のODマルチプルであった。図12Dは、ポジティブコントロール免疫原であるKLHの実験の結果を示す。

#### 【0269】

これらから分かるように、抗体BのI.V.投与は、7匹のマウスのうち3匹で免疫原性応答を誘導し、抗体Bに対して免疫原性を示すマウスの数は、抗体をS.C.投与されたXenoMouse(登録商標)動物において7匹のうち5匹に増え、最終的には、図12Aに示すように、アジュバントと共に投与した抗体について7匹のうち7匹になった。つまり、本実施例は、XenoMouse(登録商標)動物を用いて、同じタンパク質に指向された2つのヒトまたはヒト化抗体の免疫原性の程度を区別することができることを証明する。

#### 【0270】

これは、XenoMouse(登録商標)マウスから産生された抗体が、同じ遺伝子プロフィールを有する宿主においてHAHA応答を誘導しないことも証明する。

#### 【0271】

10

20

30

40

50

当業者に理解されるように、記載した一般的な概念を変更せずに、上記の変数の多くを調節してよい。例えば、O.D.マルチプル $>2$ は、厳密なカットオフである必要はない。例えば、カットオフは3に、標準偏差をバックグラウンドより高く設定することができ、またはより複雑な統計法を用いることができる。

【0272】

(実施例8)

本実施例は、本明細書に記載されるXenoMouse(登録商標)マウスの使用における擬陰性の可能性を避けるための、ある方法を示す。ヒト化IgG1、抗体、Xolair (E25、オマリズマブ)(重鎖V領域、配列番号10および軽鎖領域、配列番号11)を、配列CQYIKANSKFIGITELKK(配列番号9)を有する合成ペプチド(以下、「TCE」という)と結合させた。マレイミド化学反応をスルホ-SMCCを用いて行い、TCE-装飾抗体(「Ab-TCE」)を作製した。さらなる抗体を同様に処理したが、この反応にTCEは加えなかった(「Ab-偽(sham)」)。

10

【0273】

完全ヒト抗体を産生可能なXenoMouse(登録商標)マウスの群を、非修飾で未処理の試験抗体(「Ab」)、Ab-TCE、またはAb-偽のいずれか10 $\mu$ gを用いて免疫した。マウスのさらなる群は、コントロールとしての10 $\mu$ gのTCEペプチドのみを投与された。各マウスは、静脈内(「I.V.」)または皮下(「S.C.」)のいずれかで、2週間の間隔で、3回の投与量を投与された。さらに、非修飾のAbを、フロイント完全アジュバント(Sigma, St. Louis, MO)で乳化して、マウスの1つの群に尾の付け根(第1投与)に投与し、それに続いてフロイント不完全アジュバント(Sigma)で乳化したAbを腹腔内(第2および第3投与)(「BIP/ADJ」)に投与した。マウスから後眼窩採血により以下の図に示す時間で血清を得て、すべてのサンプルを試験できるまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

20

【0274】

ブリッジングELISAを用いて、抗体を含む、注射した抗体に反応性のある成分の存在について、血清サンプルをアッセイした。このELISAアッセイにおいて、Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc, Rochester, NY)を非修飾の試験抗体でコートし、プレートを洗浄して、ウシアルブミンでブロッキングした。次いで、XenoMouse(登録商標)動物の血清サンプルを1:10希釈で二重に加えた。ネガティブおよびポジティブコントロールとして、10%正常マウス血清(Equitech-Bio, Kerrville, TX)、および10%マウス血清中で希釈したウサギ抗ヒトIgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL)を用いた。インキュベートした後、血清を洗い流し、ビオチン化形態の試験抗体(EZ-Link(商標) Sulfo-NHS-LC-Biotinylationキットおよび付属のプロトコル、Pierceを用いて調製した)をウェルに加え、続いてさらに洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンでインキュベートした。視覚化はEnhanced K-blue TMB基質(Neogen, Lexington, KY)を用い、2Mの硫酸を用いて反応を停止させた。プレートを450nmの波長のプレートリーダーで読んだ。データをO.D.マルチプルとして表し、下記式：

30

サンプル平均OD(二重のウェル)/ネガティブコントロール平均OD(プレートあたり6~8ウェル)

を用いて算出した。

【0275】

O.D.マルチプル $>2$ は、試験抗体に対する血清抗体について陽性であると考えた。

40

【0276】

図13A~D、図14A~Dおよび図15は、本実験の結果を示す。結果は、抗体にTCEを加えることにより7匹のマウスのうち2匹で免疫原性が得られたが、非修飾および偽-結合抗体は、試験した14匹のマウスで免疫原性ではなかったことを示す。つまり、タンパク質にTCEが結合することは、B細胞媒介免疫原性の報告を可能にする。XenoMouse(登録商標)マウスは、未修飾の抗体に応答して、それがアジュバントと共に投与されると抗体を産生し、このことは、試験抗体が内因性T細胞エピトープを含有することを示唆する。

【0277】

(実施例9)

50

本実施例は、正規化宿主 $V_H$ 遺伝子プロフィール、または遺伝子特異的プローブを用いて、96人のドナーの末梢血液細胞からのゲノムDNAおよびRNAのレベルの両方についての集団を超えた $V_H$ 遺伝子レパトリーの分析を示す。PBMCにおける転写産物およびゲノム配列の存在は、 $V_H$ 遺伝子セグメントを決定した。

【0278】

$V_H$ 遺伝子のプローブを設計し、標的遺伝子および関係するファミリーメンバーを発現するハイブリドーマからのプラスミドおよび/またはcDNAについて確かめた。

【0279】

[ドナー、PBMC単離および核酸調製]

末梢血を66人のドナーおよび市販の起源(Bioreclamation, Inc.)を通して32人の個体から得た。すべてのドナーの年齢、性別および民族のデータを集めた。45 mlの血液から、末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。細胞を計数し、ゲノムDNAを $5 \times 10^6$ 細胞から、QiagenのDNeasy 96 Tissue Kitを用いて、製造業者の使用説明に従って単離した。定量は、Pico Green (Molecular Probes社)を用いて行い、50ngのgDNAをリアルタイムPCR反応に用いた。RNAを、RNeasyミニカラムを用いて、製造業者の使用説明に従って単離した。残存DNAを、Ambion社のTURBO DNA-フリーを用いて除去した。RiboGreen (Molecular Probes)を、RNAサンプルの定量に用い、80ngのトータルRNAを用いて、InvitrogenのSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCRを用いてcDNAを作製した。最終反応混合物の1/12を用いてリアルタイムPCR分析を行った。

【0280】

[プライマーおよびプローブの設計]

プライマーおよびプローブは、Vbaseで入手可能な配列情報(および図17A~図22Jに示す)に基づいて、Primer Expressソフトウェアバージョン2.0 (Applied Biosystems)を用いて設計した。マイナーグループ結合(Minor Groove Binding) (MGB) プローブは、65~67の $T_m$ を有していた。可能であれば、プローブをFR1で設計し、そうでなければFR2、FR3、またはリーダー領域で設計した。CDR領域および報告された多型は避けた。このことは、種々の方法により、例えば図16Aおよび図16Bに示すような種々の $V_H$ 遺伝子間の配列比較により行うことができる。当業者ならば理解するであろうが、図16Aおよび16Bにおける覆われた部分(wrap around)(例えば遺伝子2-05、2-26、3-43および7.41)はいずれも、空間的束縛の結果であり、アラインメントの特性を示すものではない。PCR単位複製配列は、できる限り短く、200bpを超えないようにした。プローブならびに20塩基上流および下流の配列は、Altschul、Stephen F.、Thomas L. Madden、Alejandro A.Schaffer、Jinghui Zhang、Zheng Zhang、Webb MillerおよびDavid J. Lipman (1997)、「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」、Nucleic Acids Res. 25:3389~3402頁を参照した方法に従ってヒトゲノムデータベースを検索して、偽遺伝子との交差反応性を最小限にした。

【0281】

[リアルタイムPCR]

リアルタイムPCRを、ABI Prism 7700アナライザーで行った。各プライマー/プローブ対についてのアニーリング/伸長温度(60~68 )を、興味対象の配列および近縁関係のファミリーメンバーの配列を含むプラスミドまたはハイブリドーマcDNAサンプルを用いて最適化した。cDNAをまず分析し、すべてのドナーがその遺伝子を発現していなければ、gDNAを分析した。

【0282】

$V_H3-9$ 、 $V_H3-13$ および $V_H3-64$ 遺伝子の結果を表1にまとめる。危険性の高い遺伝子は、不在であり対象の亜母集団で発現されていないもの(例えば100%未満)であるか、または検出可能なレベルよりも低いmRNAのレベルを有するものであった。

【0283】

10

20

30

40

【表1】

V遺伝子	cDNA	gDNA
3-9	90%	91%
3-13	99%	100%
3-64	97%	100%

表1

## 【0284】

10

このデータに基づいて、この集団について、 $V_H3-9$ は他の2つの遺伝子に比べて出現する頻度がより低いことがわかる。さらに、3-13および3-64は、ゲノムレベルでは集団全体に出現しているのに、mRNAレベルでは集団全体に出現しなかった。

## 【0285】

開発の早期段階での危険性評価は、可能性のある治療用抗体の評価において有益な手段であり得る。ここで示した結果は、(前)臨床開発のための主要な候補分子の選択の付加的基準として用いることができる。

## 【0286】

もちろん、当業者ならば理解するであろうが、上記で詳細に論じたように、種々のV遺伝子の分類されるグループ分けは、集団内の危険性の高い遺伝子および危険性の低い遺伝子についての選択されるカットオフラインに応じて変動できる。例えば、単純な分析を用いて、V遺伝子が100%未満でgDNAとして存在する場合はいつでも、それは危険性の高い遺伝子であり得る。より好ましくは、V遺伝子が100%未満でmRNAとして存在する場合はいつでも、それは危険性の高い遺伝子であり得る。しかし、例えば、より定量的な分析において、遺伝子がcDNAとして集団の80%未満で存在する場合はいつでも、それは危険性の高い遺伝子である。あるいは、その頻度に基づいてそれを表すことができる；つまり、高い、中程度、または低いと表す代わりに、集団の80%で出現する遺伝子は、集団内のある人が同じ遺伝子を有さない確率が20%であるので、20%危険遺伝子であり得る(または集団内のいずれの個体においてもHAHA応答を誘導する可能性が20%である)。ある実施形態において、集団についての高いおよび低い危険性の値は、抗体の特定の使用に基づいて変動し得る。しかし、当業者は、特定の状況および本明細書の教示に基づいて、その所望の値を容易に決定できるだろう。

20

30

## 【0287】

(実施例10)

生殖細胞系列 $V_k$ 遺伝子座は、132の遺伝子を含み、これらの45がオープンリーディングフレームを有し、これらの25がXenoMouse(登録商標)動物に存在する。これは同一配列を有する7の重複遺伝子対を含み、これらは単一遺伝子として扱うことができる。よって、全体で18の異なる機能的 $V_k$ 遺伝子配列がXenoMouse(登録商標)動物に存在する。実施例9に示したのと同じ方法および分析を $V_{kappa}$ または $V_{lambda}$ 遺伝子に行うことができる。手順は同じであり、遺伝子およびプライマーなどのみを変更すべきである。試験できる種々のV遺伝子のいくつかを図8に示し、 $V_{lambda}$ および $V_{kappa}$ についての特定のV遺伝子の配列を図19A~19G、20A~20L、21A~21Fおよび22A~22Jに示す。方法は、上記の実施例10に示したのと同じである。結果は、どの遺伝子が集団内または個体で共通であり、どの遺伝子がそうでないかを明らかにする。

40

## 【0288】

上記のデータから分かるように、この特定の集団において危険性の高い遺伝子として記載できるいくつかの遺伝子がある。このことは、このアプローチが免疫グロブリン遺伝子の種々のタイプ、例えば $V_{lambda}$ 遺伝子、ならびにDおよびJ遺伝子について用いることができることを示唆する。

## 【0289】

50

(等価物)

上記の記載および実施例は、本発明のある好ましい実施形態を詳細に説明し、本発明者らにより想定される最良の形態を記載する。しかし、当然のことながら、上記の記載がいかに詳細であっても、本発明は様々な方法で行うことができ、本発明は添付の請求の範囲およびその等価物によって解釈されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0290】

【図1】図1Aは、正規化された宿主V遺伝子プロフィールの生データの一例を表す図である。宿主1は、遺伝子a~dのV遺伝子を有する。図1Bは、ポリペプチドまたはmRNA発現フォーマットにおける、正規化された宿主V遺伝子プロフィールの生データの一例を表す図である。宿主1は、遺伝子A、C、およびDのみを転写または翻訳する。図1Cは、遺伝子の出現頻度の関数として、宿主1~5の集団における、様々な遺伝子の出現頻度を表す表である。図1Dは、タンパク質またはmRNAの出現頻度の関数として、宿主1~5の同じ集団における、様々な遺伝子の出現頻度を表す表である。

10

【図2】図2Aは、プロフィールと比較された、一連の抗体V遺伝子を表す図である。図2Bは、プロフィールと比較された、一連の抗体Vアミノ酸配列を表す図である。図2Cは、プロフィールと比較された、抗体V領域ポリペプチド構造を表す図である。

【図3】図3は、ある遺伝子が、HAHA応答を誘導する危険性の高い遺伝子であるかどうか判定し、その後、遺伝子を改変して危険性を低下させる方法のフローチャートを示す図である。

20

【図4】図4Aは、抗体を最適化するある方法のフローチャートを示す図である。図4Bは、抗体を最適化する別の方法のフローチャートを示す図である。図4Cは、抗体を最適化する別の方法のフローチャートを示す図である。

【図5】図5は、抗体における、HAHA応答を誘導する危険性を低下させるために、遺伝子を選択および改変する様々な方法のフローチャートを示す図である。これらの方法は、例えば $V_H$ 遺伝子または $V_L$ 遺伝子を除去することによって、個々の抗体を改変するために、あるいは、例えばゲノムから危険性の高い遺伝子を除去することによって、HAHAに合わせてカスタマイズされたXenoMouse(登録商標)または他のトランスジェニックマウスのゲノムを改変するために使用できる。同様に、HAHAを誘発する可能性が低いと評価されるV遺伝子に由来するV領域フレームワークのみを使用するために、一定数のV領域フレームワークを用いた抗体ディスプレイライブラリーを予め選択することができる。

30

【図6】図6は、機能性の減失を回避しながら、HAHA応答の危険性を低下させるために、どの遺伝子をどのように改変することができるかを決定する方法を表す図である。

【図7】図7は、機能性の減失を回避しながら、HAHA応答の危険性を低下させるために、どのアミノ酸をどのように改変することができるかを決定する方法を表す図である。

【図8A】図8は、本発明の実施形態に関連した遺伝子の一部を列挙した表である。この表は、比較的希少な遺伝子、または潜在的に危険性の高い遺伝子も特定する。

【図8B】図8は、本発明の実施形態に関連した遺伝子の一部を列挙した表である。この表は、比較的希少な遺伝子、または潜在的に危険性の高い遺伝子も特定する。

【図9】図9は、遺伝子の危険性に関する値を決定するのに、それによって実験データを使用できる、ある方法のフローチャートを示す図である。

40

【図10】図10は、様々な細胞における $V_H3-9$ の存在を示す棒グラフである。

【図11】図11Aは、アジュバントの存在下、尾の付け根を介してXenoMouse(登録商標)動物に投与し、それに続いて腹腔内経路によって投与した(「BIP/ADP」)際に、抗体Aによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図11Bは、XenoMouse(登録商標)動物に投与した際に、抗体Aによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図11Cは、XenoMouse(登録商標)動物に静脈内投与した際に、抗体Aによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。

【図12】図12Aは、XenoMouse(登録商標)動物にBIP/ADJ経路を介して投与した際に、抗体Bによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図12Bは、XenoMouse

50

(登録商標)動物に皮下投与した際に、抗体Bによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図12Cは、XenoMouse(登録商標)動物に静脈内投与した際に、抗体Bによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図12Dは、BIP経路(左パネル)または皮下経路(右パネル)を介して、ポジティブコントロールであるKLHによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。

【図13】図13Aは、皮下投与された抗体(「Ab」)によって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図13Bは、皮下投与された偽(sham)-結合Ab(「Ab-sham」)によって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図13Cは、皮下投与されたTCEペプチド結合Ab(「Ab-TCE」)によって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図13Dは、皮下投与されたTCEペプチドによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。

10

【図14】図14Aは、静脈内投与されたAbによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図14Bは、静脈内投与された偽-結合Ab(「Ab-sham」)によって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図14Cは、静脈内投与されたTCEペプチド結合Ab(「Ab-TCE」)によって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。図14Dは、静脈内投与されたTCEペプチドによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。

【図15】図15は、BIP経路を介して投与されたAbおよびアジュバントによって誘導された免疫原性のレベルを示すグラフである。

【図16】図16は、様々な $V_H$ 遺伝子のアラインメントを示す図である。

【図17】図17は、様々な $V_H$ 遺伝子のアミノ酸配列のリストである。

20

【図18】図18は、様々な $V_H$ 遺伝子の核酸配列のリストである。

【図19】図19は、様々な $V_{\kappa}$ 遺伝子のアミノ酸配列のリストである。

【図20】図20は、様々な $V_{\kappa}$ 遺伝子の核酸配列のリストである。

【図21】図21は、様々な $V_{\lambda}$ 遺伝子のアミノ酸配列のリストである。

【図22】図22は、様々な $V_{\lambda}$ 遺伝子の核酸配列のリストである。

【図23】図23は、本明細書に使用されたその他の配列のリストである。

【 図 1 】

A. 宿主		B. タンパク質又は mRNA (ACDE のみ)	
1	$V_a, V_b, V_c, V_d$	1	A, C, D
2	$V_b, V_c, V_d, V_e$	2	C, E
3	$V_a, V_d, V_e, V_a$	3	A, C, D, E
4	$V_a, V_d, V_e, V_c$	4	A, C, D, E
5	$V_c, V_b, V_c, V_a$	5	A, C, E

C. DNA としての頻度		D. タンパク質又は mRNA としての頻度	
$V_a$	= 80%	$V_a$	= 80%
$V_b$	= 60%	$V_b$	= 0
$V_c$	= 100%	$V_c$	= 100%
$V_d$	= 80%	$V_d$	= 60%
$V_e$	= 80%	$V_e$	= 80%

図1

【 図 2 】

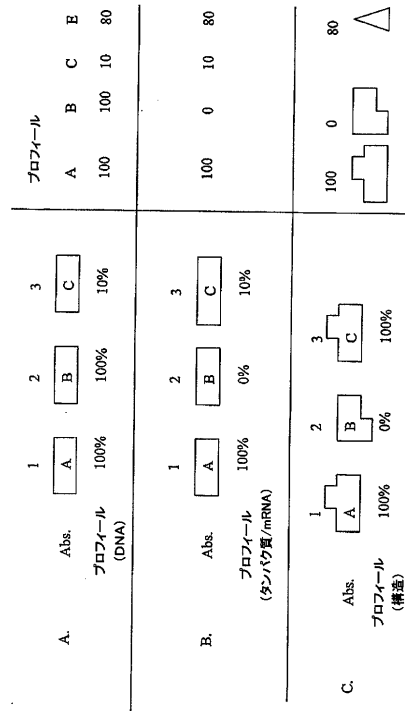


図2

【 図 3 】

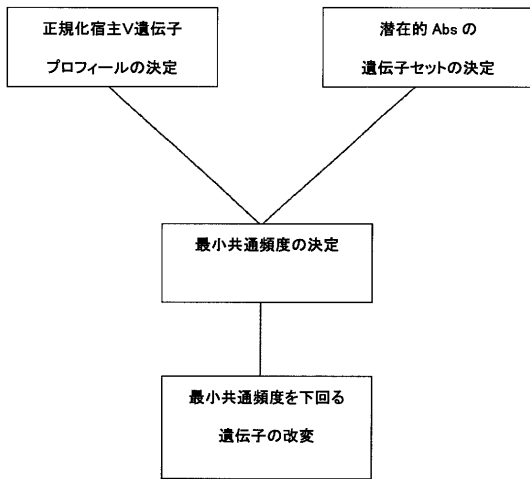


図3

【 図 4 】

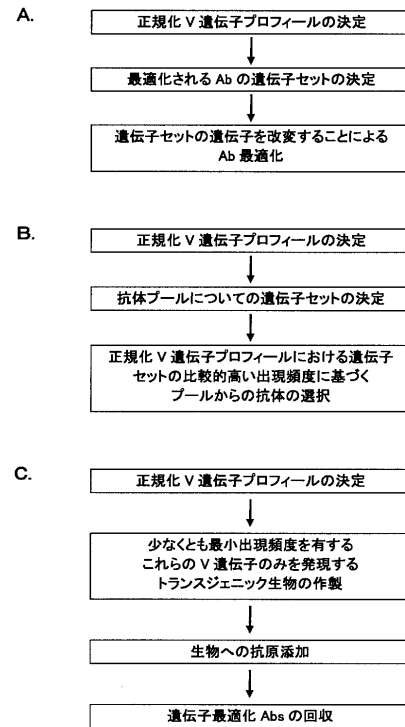


図4 遺伝子最適化 Abs の作製方法

【 図 5 】

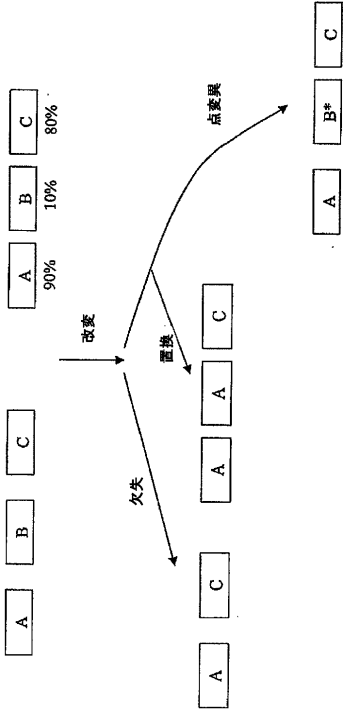


図5 遺伝子および Ab 最適化

【 図 6 】

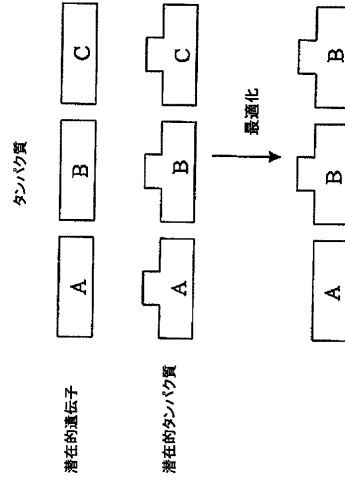


図6 遺伝子レベルでの標的的改变

【 図 7 】

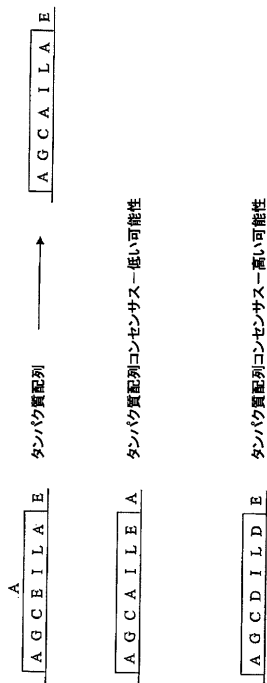


図7 アミノ酸レベルでの標的的改变

【 図 8 A 】

機能的 VH	ヒトでの報告	機能的 Vkappa	ヒトでの報告	機能的 Vlambda	ヒトでの報告
3-74		VK3-L25		4b	V5-6
3-73	Disruption	VK1-L24		8a	V3-4
3-72		VK1-L23		4a	V5-4
2-70		VK3-L20		6a	V1-22
1-69		VK1-L19		10a	V1-20
1-f	Insertion	VK1-L18		1b	V1-19
1-e	Insertion	VK3-L16		6b	V4-4
3-65		VK1-L15		9a	V5-2
3-64	young	VK1-L14		1g	V1-17
4-61	confined deletion	VK8-A14		7b	V3-3
4-69		VK3-A11		6c	V4-2
1-58		VK8-A10		1c	V1-16
3-53		VK2-A3		7a	V3-2
5-51	young	VK2-A2		1e	V1-13
3-49	elderly	VK2-A1		5e	V4-1
3-48		VK1-O8		1a	V1-11
1-46		VK1-O2		2-19	
1-45		VK2-O1		3m	V2-17
3-d	27% Insertion	VK2-O11		2b2	V1-7
3-43	insertion, ?%	VK1-O12		3e	V2-15
4-b	?	VK1-O18		3h	V2-14
4-39	young	VK2-A17		3l	V2-13
4-34	young	VK2-A18		2d	V1-5
3-33	young	VK2-A19		3a	V2-11
4-31		VK1-A20	rare: defects in 7-R8S	2a2	V1-4

【 図 8 B 】

3-30.5		VK2-A23		2e	V1-3	
4-30.4		VK6-A26		3p	V2-7	
3-30.3	Insertion allele 73%	VK3-A27		3j	V2-6	
4-30.2		VK1-A30		2c	V1-2	
4-30.1		VK1-L1		4c	V5-1	
3-30		VK3-L2		3r	V2-1	
4-28		VK1-L4				
2-26		VK1-L5				
1-24		VK3-L6				
3-23		VK1-L8				
3-21		VK1-L9				
3-20		VK1-L11				
1-18		VK1-L12				
3-15		VK6-B2				
5-a	75%	VK4-B3				
3-13		VK1-La				
3-11						
3-9						
1-8						
3-7						
2-5						
7-4.1	Insertion 91%					
4-4						
1-3						
1-2						
6-1						

- A. 一部の人々では再構成されない(Huangら, 1996)、または希少(Galloら, 2000)
- B. 種々人における、低頻度の再構成された配列(Coxら, 1994)
- C. ストップコドンを含む、潜在的対立遺伝子(Tomlinsonら, 1995)
- D. プールされたcDNAの転写物において、低いか検出不能(Ignatovitchら, 1997)
- E. 5/5高齢者のライブラリー又は4/4若年者のライブラリーで不在(WangおよびStollar, 1999)
- F. FrippiatおよびLefranc, 1994によって記載された、非機能的な対立遺伝子(挿入または欠失)
- G. WilliamsおよびWinter, 1993によって記載された、非機能的な対立遺伝子(挿入または欠失)
- H. 57人の白色人種のうちの21%に存在(Juul, 1998)

図8

【 図 9 】

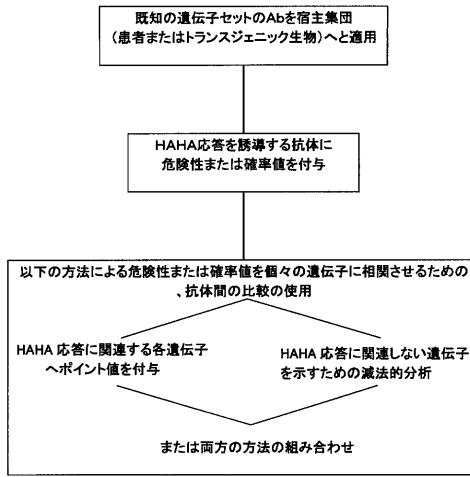


図9

【 図 1 0 】

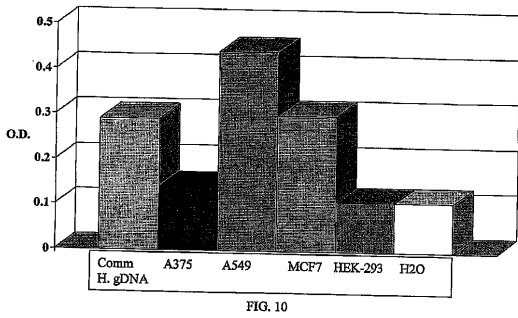


FIG. 10

【 図 1 1 】

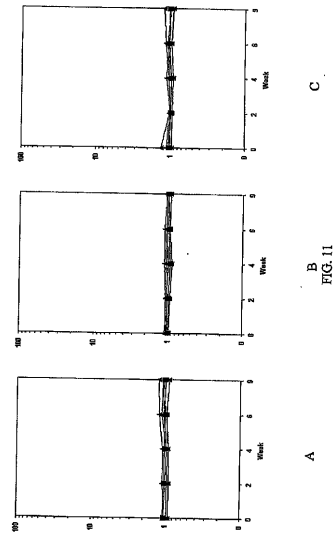


FIG. 11

【 1 2 】

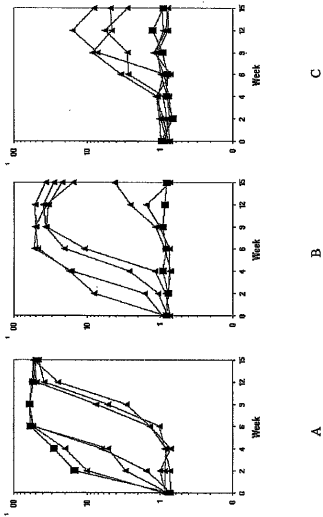


FIG. 12

【 1 2 D 】

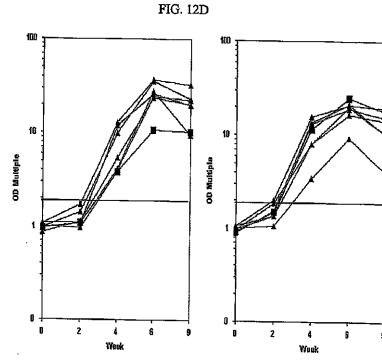


FIG. 12D

【 1 3 】

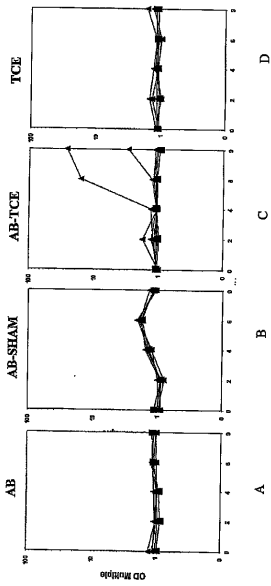


FIG. 13

【 1 4 】

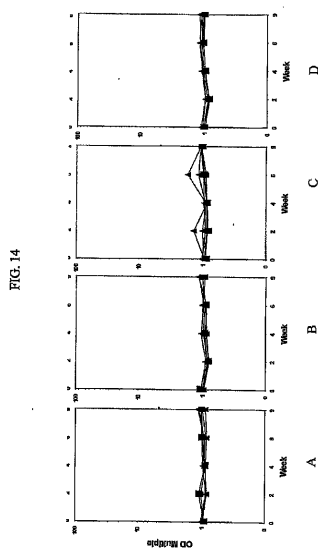


FIG. 14

【 1 5 】

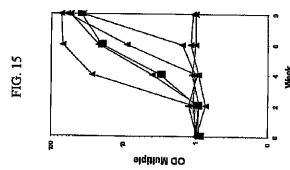


FIG. 15

【 16 A 】

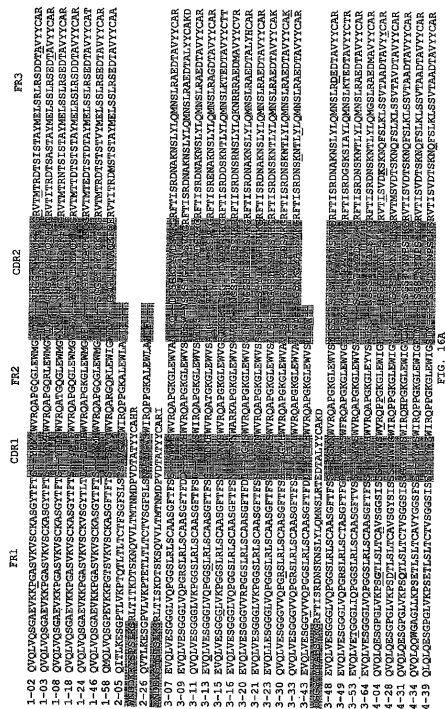


FIG. 16A

【 16 B 】



FIG. 16B

【 17 A 】

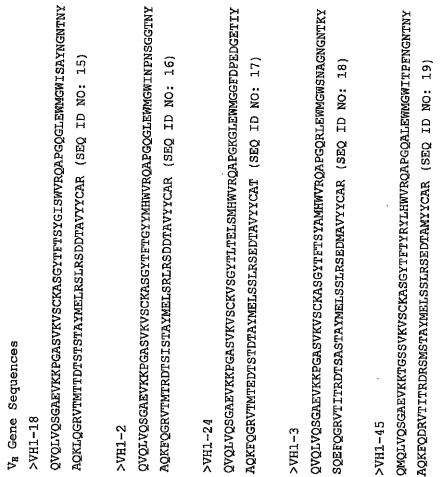


FIG. 17A

【 17 B 】

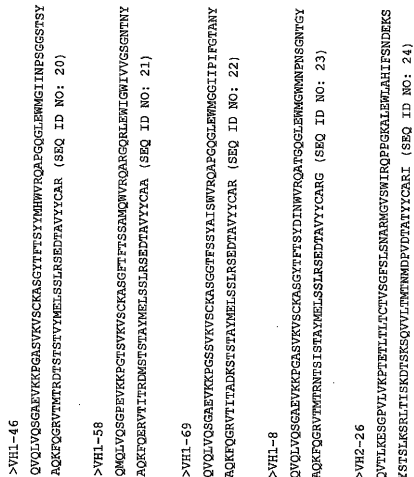


FIG. 17B

17C

>VH2-5  
 QVLLKESGFTVRFVQQLALACTFSEGSISFSGVGMIRQPPGKALEWLIYVNDKRR  
 YSFLSKRULITIKDTSRQVWVLMNNDVDTAVYCAHR (SEQ ID NO: 25)

>VH2-70  
 QVTLREGPALVRFVQQLALACTFSEGSISFSGVGMIRQPPGKALEWLIYVNDKRR  
 YSFLSKRULITIKDTSRQVWVLMNNDVDTAVYCAHR (SEQ ID NO: 26)

>VH3-11  
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 27)

>VH3-13  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 28)

>VH3-15  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 DYAAVAGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICTT (SEQ ID NO: 29)

FIG. 17C

17D

>VH3-16  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 VDSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 30)

>VH3-20  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 31)

>VH3-21  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 32)

>VH3-23  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 33)

>VH3-30  
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 34)

FIG. 17D

17E

>VH3-33  
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 35)

>VH3-35  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 36)

>VH3-38  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 SRKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 37)

>VH3-43  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 38)

>VH3-48  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 39)

FIG. 17E

17F

>VH3-49  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 EYPAVAGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICTR (SEQ ID NO: 40)

>VH3-53  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 DSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 41)

>VH3-64  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 42)

>VH3-66  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 DSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 43)

>VH3-7  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFDYIMSWIRQAPGKLEWVSISSSSSTIY  
 ADSVKGRFTISRDNKNSIYLQMSLRADDTAVYICAR (SEQ ID NO: 44)

FIG. 17F









【  1 8 N 】

>VH4-34  
 CAGGTCCAGCTACAGCAGTGGGGCCAGGACTGTTGAGCCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGGCGTCTATGAGTGGGCTCTCAGCAACAGTGTCTCTGAGACTGGATCAGG  
 CAGTCCGACGAGAGGCTTGAAGTGGGAAATCAATCAATGATGGAGACCAACACTACAC  
 CGGTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 AAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 95)

>VH4-39  
 CAGCTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGCAGTCTCTGAGTGGGCTCAATCAATGATTAATCTACTGAGCTGGATCCGGAGCC  
 GCCGGGAGGGACTGGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 CCTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 AAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 96)

>VH4-4  
 CAGGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGCAGTCTCTGAGTGGGCTCAATCAATGATTAATCTACTGAGCTGGATCCGGAGCC  
 GCCGGGAGGGACTGGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 CCTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 AAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 97)

FIG. 18N

【  1 8 O 】

>VH4-59  
 CAGGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGCAGTCTCTGAGTGGGCTCAATCAATGATTAATCTACTGAGCTGGATCCGGAGCC  
 GCCGGGAGGGACTGGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 CCTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 AAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 98)

>VH4-61  
 CAGGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGCAGTCTCTGAGTGGGCTCAATCAATGATTAATCTACTGAGCTGGATCCGGAGCC  
 GCCGGGAGGGACTGGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 CCTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 AAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 99)

>VH5-51  
 GAGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 TCTGTGAGGCTTCTGATCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACT  
 CCGGAGAGGCTTCGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 AGCCCTCCCTCAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 CAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 100)

FIG. 18O

【  1 8 P 】

>VH6-1  
 CAGGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ACCTGCAGTCTCTGAGTGGGCTCAATCAATGATTAATCTACTGAGCTGGATCCGGAGCC  
 GCCGGGAGGGACTGGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 CAGTCCGACGAGAGGCTTGAAGTGGGAAATCAATCAATGATGGAGACCAACACTACAC  
 AMGATTAAGAGTCCAGTCAACCAATATCAGTACACACTCCAGAACCAAGTTCCTG  
 CAGTCCGACGAGAGGCTTGAAGTGGGAAATCAATCAATGATGGAGACCAACACTACAC  
 AGAGA (SEQ ID NO: 101)

>VH7-61  
 CAGGTGCAGCTGCAGAGTGGGCGCCAGGACTGTGAGCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 TCTGTGAGGCTTCTGATCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACT  
 CCTGGAGAGGCTTCGAGTGGGATTTGGGATTAATCAACAGTGGAGACCAACACTACAC  
 GCCCAGGCTTCAGAGGAGGCTTGAAGTGGGAAATCAATCAATGATGGAGACCAACACTACAC  
 CAGCTGAGCTCTGTGAGCCGCGGGGACAGGCTGTGTATTAATCTGTGCGAGAG  
 (SEQ ID NO: 102)

FIG. 18P

【  1 9 A 】

Vazppa Gene Sequences

>A1  
 DVMWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 SGVDFRFGSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 103)

>A10  
 EIVLWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 RFSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 104)

>A11  
 EIVLWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 DRFSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 105)

>A14  
 DVMWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 RFSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 106)

>A17  
 DVMWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 SGVDFRFGSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 107)

>A18  
 DVMWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 SGVDFRFGSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 108)

>A19  
 DVMWQSLFLVTPGKPVASISCHSOSLHSDKTYLWYVLOKPGQSPQLLYEVSFR  
 SGVDFRFGSGSDFTLLKISRVEADVGVYCMQGHHP (SEQ ID NO: 109)

FIG. 19A

【 19B 】

>A2  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 110)

>A20  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 111)

>A23  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 112)

>A26  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 113)

>A27  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 114)

>A3  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 115)

>A30  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 116)

FIG. 199

【 19C 】

>A5  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 117)

>A7  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 118)

>B2  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 119)

>B3  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 120)

>I1  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 121)

>I10  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 122)

>I11  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 123)

FIG. 19C

【 19D 】

>L12  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 124)

>L14  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 125)

>L15  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 126)

>L16  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 127)

>L18  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 128)

>L19  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 129)

>L2  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 130)

FIG. 199

【 19E 】

>L20  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 131)

>L22  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 132)

>L23  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 133)

>L24  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 134)

>L25  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 135)

>L4/18a  
EIVMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 136)

>L5  
DIWMTQSPFSLASVGDVRRVITTCRASGIGSISLWYQKQKPKLLIYDASISLQSGVPS  
RFSGSGGTDFTLTISLQPEDFAVYCCQYNSP (SEQ ID NO: 137)

FIG. 19E

【  19F】

>I6  
 TQRPATLSISDRBATLGRASQSVSLAWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 136)

>I8  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 139)

>I9  
 AIRMQPFSLSASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 140)

>O1  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 141)

>O11  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 142)

>O12  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 143)

>O14  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 144)

FIG. 19F

【  19G】

>O18  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 145)

>O2  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 146)

>O4  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 147)

>O8  
 DIQIQSPFSLASVGRVVTTCRASQDLSNINWYQKPKKLLIYDASNRATGTPA  
 RFSGSGDFTFTLSSLPEDVAVYVYQVNSMF (SEQ ID NO: 148)

FIG. 19G

【  20A】

V<sub>hsp90</sub> Gene Sequences

>A1  
 GATGTGTGATGACTCAGTCTCCACCTCCCTCCGCGCTGACCTTGGACAGCGCCCTCC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 TTTCAGCAGCGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 149)

>A10  
 GAAATTTGCTGATGCTCAGCTTCCAGCTTCCAGTCTGCTGACCTCCAGAGGAAATGTCAC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 GATCACTCCAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 150)

>A11  
 GAAATTTGCTGATGCTCAGCTTCCAGCTTCCAGTCTGCTGACCTCCAGAGGAAATGTCAC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 CTTGCGCGGCGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 GACAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 151)

>A14  
 GAAATTTGCTGATGCTCAGCTTCCAGCTTCCAGTCTGCTGACCTCCAGAGGAAATGTCAC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 ATCAAGCCAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 152)

FIG. 20A

【  20B】

>A17  
 GATGTGTGATGACTCAGTCTCCACCTCCCTCCGCGCTGACCTTGGACAGCGCCCTCC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 ATCAAGCCAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 153)

>A18  
 GATGTGTGATGACTCAGTCTCCACCTCCCTCCGCGCTGACCTTGGACAGCGCCCTCC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 TACTCTGAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 154)

>A19  
 GATGTGTGATGACTCAGTCTCCACCTCCCTCCGCGCTGACCTTGGACAGCGCCCTCC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 TACTCTGAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 155)

>A2  
 GATGTGTGATGACTCAGTCTCCACCTCCCTCCGCGCTGACCTTGGACAGCGCCCTCC  
 ATCTCTGAGGCTAGTCAAGAGCTGTAACAGTGAATGAAACACACTTCAATGATG  
 TACTCTGAGAGCCAGCCCAATCTCAGAGCCCTTAAATTAATAGTCTTAACTGGGAC  
 TCTGGGCTCCACAGCAATCCAGCGGAGTGGTCAAGCCTGATTTCACTCACTCAAAATC  
 AGCAGGCTGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTAACTACTGATCAGCAAGGATCACTGCTCC  
 CC (SEQ ID NO: 156)

FIG. 20B







【 2 1 C 】

>Y2-1  
 SYELTQPPSVSVSGTASITCGSGDLKGLKVCYVQCKRFGQFVLVYQDSKRSFGIPER  
 FSGNSGNTATLITISGTQAMDEADYCCWMDSSSTA (SEQ ID NO: 209)

>Y2-11  
 SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGALPKKYVWYQCKRFGQFVLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGSSSGTIVLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGTFP (SEQ ID NO: 210)

>Y2-13  
 SELITQDANVYALGVYVFCGGSLSASVSKVQKFGQAPFLITGKNNRFSFGIPDR  
 FSGSSGNTSHLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 211)

>Y2-14  
 SYLVLPQPSVSVVAPQGTARITCGGNNISKSVHWYQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 FSGNSGNTATLITISKVEAGDEADYCCWMDSSSDHPE (SEQ ID NO: 212)

>Y2-15  
 SYELTQPPSVSVFQGTARITCSGDLGKLVWYQCKRFGQAPFLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGSSGNTATLITISRVLTQDEADYCYCLSDGDENP (SEQ ID NO: 213)

>Y2-17  
 SYELTQPPSVSVFQGTARITCSGDLGKLVWYQCKRFGQAPFLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGSSGNTATLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGTFP (SEQ ID NO: 214)

>Y2-19  
 SYELTQPPSVSVFQGTARITCSGDLGKLVWYQCKRFGQAPFLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGSSGNTATLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 215)

FIG. 21C

【 2 1 D 】

>Y2-6  
 SYELTQPPSVSVLGGTARITCGGNNISKSVHWYQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 FSGNSGNTATLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGTFP (SEQ ID NO: 216)

>Y2-7  
 SYELTQPPSVSVFQGTARITCSGDLGKLVWYQCKRFGQAPFLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGSSGNTATLITISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 217)

>Y2-8  
 SYELTQPPSVSVVAPQGTARITCGGNNISKSVHWYQKFGQAPFLVYKDSRFSFGIPER  
 FSGNSGNTATLITISRIEAGDEADYCCWMDSSSDHP (SEQ ID NO: 218)

>Y3-2  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 PAREFSSLLGGKALITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 219)

>Y3-3  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 PAREFSSLLGGKALITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 220)

>Y3-4  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 PAREFSSLLGGKALITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 221)

>Y4-1  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GSGVPSRFSGSSKASANTGILLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 222)

FIG. 21D

【 2 1 E 】

>Y4-2  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GSGVPSRFSGSSKASANTGILLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 223)

>Y4-3  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GSGVPSRFSGSSKASANTGILLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 224)

>Y4-4  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GSGVPSRFSGSSKASANTGILLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 225)

>Y4-6  
 RQVLTQPPSVSVVAPQGTARITCSGDLGKLVWYQCKRFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 FSGNSGNTATLITISKVEAGDEADYCCWMDSSSDHPE (SEQ ID NO: 226)

>Y5-1  
 LPVLTQPPSVSALLGASIKITLITLSSGHSYVYVYQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GIPDRFNGSSGADRVLITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 227)

>Y5-2  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 DGIPIRFSVLSGELMAYLITLITRTOEDEDSDHCGADHSGSNFV (SEQ ID NO: 228)

>Y5-4  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GIPDRFNGSSGADRVLITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 229)

FIG. 21E

【 2 1 F 】

>Y5-6  
 QVVTQPELTVSFGGVTITLTCSSFGVAVSGYVFMFQKFGQAPFLVYVVDSDRFSFGIPER  
 GIPDRFNGSSGADRVLITLISGQVQDEADYCYCLSDSSGNTLH (SEQ ID NO: 230)

FIG. 21F







## 【配列表】

2008507257000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成18年11月29日(2006.11.29)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

宿主用の抗体を選択する方法であって、前記抗体は、前記宿主におけるヒト抗ヒト抗体(HAHA)応答を誘発する確率が低下しており、以下の工程：

候補抗体の可変ドメインの一部をコードする候補免疫グロブリン遺伝子の同定物を準備する工程、

前記候補抗体を受容することになっている宿主の宿主免疫グロブリン遺伝子の同定物を準備する工程、

前記候補免疫グロブリン遺伝子の同定物を前記宿主免疫グロブリン遺伝子の同定物と比較する工程、および

前記候補免疫グロブリン遺伝子の同定物が前記宿主免疫グロブリン遺伝子の同定物と同じ場合に前記候補抗体を選択し、それによってHAHA応答を誘発する確率が低下している、前記宿主用の抗体を選択する工程、

を含む方法。

【請求項2】

前記候補抗体の1種以上の免疫グロブリン遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記候補抗体のあらゆる免疫グロブリンV遺伝子を準備、比較、および選択する工程の反復をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記候補免疫グロブリン遺伝子および前記宿主免疫グロブリン遺伝子がV遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記V遺伝子が $V_H$ (重鎖)遺伝子である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記V遺伝子が $V_L$ (軽鎖)遺伝子である、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記候補免疫グロブリン遺伝子および前記宿主免疫グロブリン遺伝子がD遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記候補免疫グロブリン遺伝子および前記宿主免疫グロブリン遺伝子がJ遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記宿主V遺伝子が、前記宿主で転写される宿主免疫グロブリン遺伝子から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項10】

前記宿主V遺伝子が、前記宿主で翻訳される宿主免疫グロブリン遺伝子から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項11】

前記V遺伝子が $V_H$ 遺伝子である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項12】

前記V遺伝子がV<sub>L</sub>遺伝子である、請求項4に記載の方法。

## 【請求項13】

前記候補免疫グロブリン遺伝子がすべての宿主免疫グロブリン遺伝子と異なる場合に、前記候補抗体を、前記宿主においてHAHA応答を誘発する可能性が高いと判定する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項14】

前記候補免疫グロブリン遺伝子がV<sub>H</sub>3 - 9、V<sub>H</sub>3 - 13、またはV<sub>H</sub>3 - 64遺伝子である場合に、前記候補抗体を、前記宿主においてHAHA応答を誘発する可能性が高いと判定する、請求項13に記載の方法。

## 【請求項15】

抗体を選択する方法であって、

ある抗体の可変ドメインの一部をコードする遺伝子が特定のヒト集団に出現する頻度を測定する工程、および

頻度の関数として前記抗体を選択し、それによって前記抗体がヒト宿主内でヒト抗ヒト抗体応答を誘導する危険性を低下させる工程、を含む方法。

## 【請求項16】

前記頻度が、前記集団の少なくとも80%である、請求項15に記載の方法。

## 【請求項17】

前記頻度が、前記集団の少なくとも99%である、請求項15に記載の方法。

## 【請求項18】

前記頻度が、前記集団の100%である、請求項15に記載の方法。

## 【請求項19】

抗体に対するヒト抗ヒト抗体（HAHA）応答の存在または不在を判定する方法であって、

抗体を第一のトランスジェニックマウスへ投与する工程（ここで、前記第一のトランスジェニックマウスには、前記第一のトランスジェニックマウスが複数のヒト抗体を産生できるように、ヒト抗体の可変ドメインの一部をコードするヒト遺伝子が含まれている）、および

前記抗体が、前記第一のトランスジェニックマウスにおいてHAHA応答を誘発するかどうかを観測し、それによってHAHA応答の存在または不在を判定する工程、を含む方法。

## 【請求項20】

前記複数のヒト抗体が、完全ヒト抗体である、請求項19に記載の方法。

## 【請求項21】

前記抗体がHAHA応答を誘発するかどうかを観測する工程が、前記第一のトランスジェニックマウスから得た血液試料に、前記投与抗体に結合できる抗体が存在するかどうか試験することを含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項22】

前記第一のトランスジェニックマウスが、ヒト抗体の可変ドメインの一部をコードする危険性の高い遺伝子を本質的に含まない、請求項19に記載の方法。

## 【請求項23】

前記第一のトランスジェニックマウスが、本質的に、ヒト抗体の可変ドメインの一部をコードする危険性の低い遺伝子からなる、請求項19に記載の方法。

## 【請求項24】

前記第一のトランスジェニックマウスに投与する工程が、第一の投与計画で行われ、かつ以下の工程：

第二の投与計画を用いて第二のトランスジェニックマウスに前記投与抗体を投与する工程（ここで、前記第二のトランスジェニックマウスには、前記第二のトランスジェニックマウスが複数のヒト抗体を産生するように、ヒト抗体の可変領域の一部をコードするヒト

遺伝子が含まれている)、および

前記第二のトランスジェニックマウスにおいてHAHA応答の存在または不在を判定する工程、

をさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項25】

前記第一のトランスジェニックマウスに投与する工程が、アジュバントを用いて行われる、請求項19に記載の方法。

【請求項26】

前記第一のトランスジェニックマウスに投与する工程が、静脈内で行われ、かつ以下の工程：

第二のトランスジェニックマウスに前記投与抗体を皮下投与する工程（ここで、前記第二のトランスジェニックマウスには、前記第二のトランスジェニックマウスが複数のヒト抗体を産生するように、ヒト抗体の可変ドメインの一部をコードするヒト遺伝子が含まれている）、および

前記第二のトランスジェニックマウスにおいてHAHA応答の存在または不在を判定する工程、

をさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項27】

前記トランスジェニックマウスの体細胞および生殖細胞のすべてに、D遺伝子と、J遺伝子と、前記ヒト免疫グロブリン重鎖のC-デルタ遺伝子座全体を含む定常領域遺伝子とを通して続く、最も近位の5つのV<sub>H</sub>遺伝子に由来する、ヒト第14染色体のDNA断片（ここで、前記断片は、C-ガンマ遺伝子を含有せず、ヒトC-ガンマ-2領域遺伝子と作用可能に連結している）が含まれている、請求項19に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US2005/009306		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395 A61P37/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 90/07861 A (PROTEIN DESIGN LABS, INC) 26 July 1990 (1990-07-26) page 5, line 8	1-13		
X	WO 01/31065 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE; BARBAS, CARLOS, F., III; RADER, CHRIST) 3 May 2001 (2001-05-03) page 26, line 27 - page 27, line 5	14-20		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            *E* earlier document but published on or after the international filing date            *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.            *Z* document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 19 January 2006		Date of mailing of the international search report 09/02/2006		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot, P		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2005/009306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9007861	A	26-07-1990	AT 133452 T 15-02-1996
			AT 183753 T 15-09-1999
			AU 647383 B2 24-03-1994
			AU 5153290 A 13-08-1990
			BG 61095 B2 31-10-1996
			CA 2006865 A1 28-06-1990
			CN 1043875 A 18-07-1990
			CZ 9104186 A3 13-10-1993
			DE 68925536 D1 07-03-1996
			DE 68925536 T2 20-06-1996
			DE 68929061 D1 30-09-1999
			DE 68929061 T2 27-04-2000
			DE 122005000007 I1 30-06-2005
			DK 119191 A 19-06-1991
			EP 0451216 A1 16-10-1991
			ES 2081974 T3 16-03-1996
			ES 2136760 T3 01-12-1999
			FI 108797 B1 28-03-2002
			HK 1014718 A1 14-07-2000
			HU 9500236 A3 28-09-1995
			IE 20000331 A1 21-02-2001
			JP 3604058 B2 22-12-2004
			JP 11004694 A 12-01-1999
			JP 2828340 B2 25-11-1998
			JP 4502408 T 07-05-1992
			JP 2003245090 A 02-09-2003
			JP 2003245091 A 02-09-2003
			KR 178385 B1 01-04-1999
			LU 90411 A9 02-09-1999
			LU 90528 A9 11-04-2000
			LU 90676 A9 05-02-2001
			LU 91139 A9 04-04-2005
			MC 2146 A 18-02-1992
			NL 300005 I1 03-04-2000
			NL 300023 I1 02-01-2001
			NL 300173 I1 01-04-2005
			NL 990020 I1 01-09-1999
			NO 912385 A 19-06-1991
			NZ 231984 A 24-06-1997
			PT 92758 A 29-06-1990
			YU 248989 A1 31-10-1991
WO 0131065	A	03-05-2001	NONE

## フロントページの続き

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

(72)発明者 シリド - アイミー・ケラーマン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94025・メンロ・パーク・アルマーノ・アヴェニュー・1000

(72)発明者 ラリー・エル・グリーン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94114・サン・フランシスコ・ヒル・ストリート・464

(72)発明者 ワウター・コーヴァー

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94025・メンロ・パーク・オークランド・アヴェニュー・1052

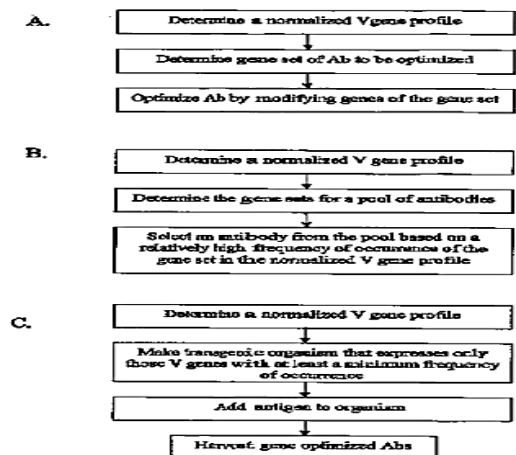
Fターム(参考) 2G045 AA40

4B024 AA11 BA44 CA04 DA02 GA11

4H045 AA11 DA75 EA22 FA74

专利名称(译)	通过操纵V基因降低人抗人抗体的风险		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008507257A</a>	公开(公告)日	2008-03-13
申请号	JP2007504175	申请日	2005-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	Amugen公司		
[标]发明人	シリドアイミーケラーマン ラリーエルグリーン ワウターコーヴァー		
发明人	シリド・アイミー・ケラーマン ラリー・エル・グリーン ワウター・コーヴァー		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/50 G01N33/15 C07K16/00 C07K16/46 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/464 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07K16/00		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	60/554372 2004-03-19 US 60/574661 2004-05-24 US		
其他公开文献	JP2008507257A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

*Methods of Making Gene Optimized Abs*



摘要(译)

本文提供的实施方案涉及鉴定和产生人或人源化抗体的方法，所述抗体在将其施用于人宿主时诱导人抗人抗体（HAHA）应答的风险降低。另一种方法包括预测HAHA反应发生的概率。还包括抗HAHA化合物的筛选方法。