

(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2004-506603
(P2004-506603A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/28	CO7K 16/28 ZNA	4B024
C12N 5/10	C12P 21/08	4B064
C12P 21/08	GO1N 33/53 D	4B065
GO1N 33/53	GO1N 33/577 B	4H045
GO1N 33/577	C12N 5/00 B	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-567800 (P2001-567800)	(71) 出願人	595158407
(86) (22) 出願日	平成13年3月8日 (2001.3.8)		アプライド・リサーチ・システムズ・エイ
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		アールエス・ホールディング・ナムローゼ
(86) 国際出願番号	PCT/IL2001/000216		・フェンノートシャップ
(87) 国際公開番号	W02001/068710		Applied Research Sy
(87) 国際公開日	平成13年9月20日 (2001.9.20)		stems ARS Holding N
(31) 優先権主張番号	135025		. V.
(32) 優先日	平成12年3月13日 (2000.3.13)		オランダ領アンチル, キュラソー, ピーテ
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		ルマーイ 15
(31) 優先権主張番号	139217	(74) 代理人	100065226
(32) 優先日	平成12年10月23日 (2000.10.23)		弁理士 朝日奈 宗太
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)	(74) 代理人	100098257
			弁理士 佐木 啓二
		(74) 代理人	100117112
			弁理士 秋山 文男
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトLDL受容体に対するモノクローナル抗体、その産生および用途

(57) 【要約】

LDLの同定および精製、および、たとえばC型肝炎感染の治療において有用なヒトLDL受容体に対するモノクローナル抗体を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体 C 7 を除く、ヒト LDL 受容体およびその断片を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体、キメラ抗体、完全なヒト化抗体、抗 - 抗 I D 抗体またはそれらの断片。

【請求項 2】

ヒト可溶性 LDL 受容体を特異的に認識して結合する請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

番号 I - 2 3 9 0 によって CNC M に寄託されるハイブリドーマクローン 1 2 . 6 により発現される M a b である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 4】

番号 I - 1 2 9 1 によって CNC M に寄託されるハイブリドーマクローン 2 8 により発現される M a b である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

番号 I - 2 3 9 2 によって CNC M に寄託されるハイブリドーマクローン 2 9 . 8 により発現される M a b である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

番号 I - 2 3 9 3 によって CNC M に寄託されるハイブリドーマクローン 3 0 により発現される M a b である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。 20

【請求項 7】

番号 I - 2 3 9 3 によって CNC M に寄託されるハイブリドーマクローン 5 0 . 3 0 により発現される M a b である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

免疫グロブリンアイソタイプ I g G₁ または I g M に属する請求項 3、4、5、6 または 7 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載のモノクローナル抗体の使用を含むヒト LDL R の検出および / または定量方法。

【請求項 10】

E L I S A における対に使用され得る請求項 1 記載のモノクローナル抗体。 30

【請求項 11】

ハイブリドーマクローン 2 8 または 2 9 . 8 により生成されるモノクローナル抗体である請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

ウェスタンブロット解析において LDL R を同定することができる請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

ハイブリドーマクローン 1 2 . 6、クローン 2 8、クローン 2 9 . 8 またはクローン 3 0 により生成されるモノクローナル抗体である請求項 12 記載のモノクローナル抗体。 40

【請求項 14】

r - h s LDL R の抗ウイルス生物活性を中和することができる請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

ハイブリドーマ細胞クローン 1 2 . 6 またはクローン 5 0 . 3 0 により生成されるモノクローナル抗体である請求項 14 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 16】

C 型肝炎ウイルスの複製を阻害することができる請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 17】

ハイブリドーマクローン 1 2 . 6、クローン 2 8 またはクローン 2 9 . 8 により生成され 50

るモノクローナル抗体である請求項 16 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 18】

番号 I - 2390 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 12.6。

【請求項 19】

番号 I - 2391 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 28。

【請求項 20】

番号 I - 2392 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 29.8。

【請求項 21】

番号 I - 2393 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 30。

【請求項 22】

番号 I - 2393 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 50.30。

【請求項 23】

hsLDL で免疫化した哺乳動物由来の脾臓細胞と均質または不均質のリンパ細胞とからなるクローン化ハイブリドーマを液体培地または哺乳動物の腹腔において増殖させ、ハイブリドーマにモノクローナル抗体を産生させることを含む、請求項 1 記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 24】

前記 LDLR 免疫原が高度に精製されたヒト LDLR である請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 記載のモノクローナル抗体とヒト LDLR 含有材料とを接触させることからなる、ヒト LDLR の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[本発明の分野]

本発明は、低密度リポタンパク質に対するヒト受容体 (LDLR) を特異的に認識するモノクローナル抗体に関する。それらの抗体は、たとえば、生産工程におけるヒト可溶性 LDLR (hsLDLR) の同定および精製、ならびに C 型肝炎感染 (HCV) などの疾患の同定および治療において有用である。

【0002】

[本発明の背景]

すべての真核生物の形質膜の成分であるコレステロールは、高等生物における細胞の増殖および生存に必須である。しかしながら、コレステロールの高い血清レベルは、全身の動脈におけるアテローム硬化性のプラーク形成の一因となることにより、疾患および死を引き起こす。哺乳動物におけるコレステロール合成の主な部位は肝臓である。コレステロールのかなりの量が腸によっても形成されている。それらの臓器によるコレステロール形成の速度は、食事供給源 (dietary sources) から吸収されるコレステロールの量に対して非常に反応しやすい。肝臓および腸以外の細胞は、新たなコレステロールの合成によってではなく、血漿からコレステロールを得る。コレステロールおよびほかの脂質は、増加する密度にしたがって分類されるリポタンパク質により、体液に輸送される。リポタンパク質は、極性脂質とアポタンパク質とからなる外皮に囲まれた疎水性脂質のコアからなる粒子である。そのようなリポタンパク質は、高い疎水性の脂質を可溶化し、特異的な標的細胞や組織の中および外への特定の脂質の移動を制御するシグナルを収容するという、2つの役割を担う。コレステロールは、非肝細胞の形質膜上にある特異的受容体に結合する低密度リポタンパク質 (LDL) により、体液に輸送される。ついで、受容体-LDL 複合体は、受容体媒介エンドサイトーシスとして知られる輸送機構により、細胞の中へと内在化される (Goldstein et al. 1979)。低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体は、哺乳動物細胞において多数のリガンドのエンドサイトーシスを媒介する、構造的に関連付けられた細胞表面受容体のファミリーのプロトタイプである。

【0003】

10

20

30

40

50

LDL受容体は822アミノ酸残基からなり、164000の分子量を示す。LDL受容体はいくつかのドメインからなり、そのドメイン中には他のタンパク質に配列相同性を有するものがある。そのNH₂末端のリガンド結合ドメインは、7つのシステインリッチの不完全な繰り返しを配された292残基からなる。各繰り返しは、1つから3つのパターンでジスルフィド結合された6つのシステイン残基を含有する(Bieri et al. 1995)。このドメインに、4つのさらなるドメインが続く。第1番目は400アミノ酸残基からなりかつEGF受容体に相同性を有しており、第2番目はO-結合糖に富む58アミノ酸残基からなるものであり、第3番目は22アミノ酸残基からなる1つの膜貫通ドメインであり、および第4番目は50アミノ酸残基からなる細胞質ドメインである(Sudhof et al. 1985)、(Brown et al. 1986)。

10

【0004】

LDL受容体の生理学的な重要性は、家族性高コレステロール血症(FH)に関するBrownおよびGoldsteinの研究により明らかにされた。当該疾患は、LDLに対する機能的な受容体の欠如または欠失を生じる分子遺伝学的障害が原因で発見された(Brown et al. 1976)。FH突然変異の種類の一つは特徴づけられた(Goldstein et al. 1975)。

【0005】

抗ウイルス活性を示す可溶性のsLDLRは、インターフェロンに誘導された細胞の培養上清から(Fischer et al. 1993)および体液において(Fischer et al. 1994)同定され単離された。インターフェロンに誘導されるタンパク質の一つは、IFNによる抗ウイルス状態の誘導に役立つものとして同定されている。抗ウイルス活性を示すそのようなタンパク質の一つが、ヒト羊膜WISH細胞の培養上清に産生され蓄積された。このタンパク質が均質に精製され、そしてsLDLRとして同定された(EP0553667およびFischer et al. 1993を参照)。sLDLRは、インターフェロンに応答して抗ウイルス状態にはいる哺乳動物細胞により、培地中に分泌されることが見出された。インターフェロンと異なり、sLDLRは細胞において抗ウイルス状態を誘導しないが、それ自体で抗ウイルス性である。sLDLRは、ウイルスの複製、成熟および出芽(budding)の過程で存在していなければならないようであることが分かり、sLDLRは、ウイルスの集合または出芽の阻害を導く複雑な過程に関連しているかもしれないことが示唆された(未公開データ)。C型肝炎ウイルスのエンドサイトーシスは、培養細胞上のLDL受容体により媒介されていることが最近示された(Agnello et al. 1999)。それらおよびほかの発見は、LDL受容体のファミリーがウイルス受容体として働き得ることを示唆する。したがって、sLDLR受容体に対する抗体は、細胞のLDL受容体に結合することによるウイルス粒子の侵入および出芽を妨害するかもしれない。

20

30

【0006】

これまでに知られているLDLRの唯一入手可能なモノクローナル抗体は、ウシLDLRの抗体であるC7であり(Beisiegel et al. 1981, アマシャム社、UKより商業的に入手可能)、均質に精製されたウシ副腎皮質LDLRによるマウスの免疫化により製造された。ウシ副腎皮質由来の膜が可溶化され、受容体はDEAEセルロースカラムからの溶出により部分的に精製された(Beisiegel et al. 1981)。ウシLDLRの抗体は、ヒトLDLRと弱い交差反応を示すのみである。

40

【0007】

実際、ウシLDLRに対するC7Mabは、組換えヒトLDLRの検出および定量に使用される際に著しい不利益を有することが分かった：

- a) C7Mabは、ヒトLDLRに対して非常に低い親和性を有する。
- b) C7Mabは、細胞培養物由来の不純物と顕著に交差反応する。

【0008】

ヒトLDLRの特異的な抗体は、以前は入手可能ではなかった。精製、同定のために、または検定開発目的のために新規タンパク質に対する抗体をおこすことは非常に一般的であ

50

るため、これは驚くべきことである。モノクローナル抗体を生成するための条件は、効果的なマウスの免疫化を可能とする、利用可能な十分に量の多い高度に精製された抗原であるため、そのような抗体はこれまでつくられていないということが考えられる。高度に精製された抗原は、R P - H P L Cにおいて単一の大きなピークとしてあらわれるものである。さらには、精製過程で抗原の同定および定量的方法を確認することは容易ではなかった。本発明により、本願明細書において説明される抗ウイルス活性検定は、精製過程でL D L Rの同定に使用された。

【0009】

効果的な免疫検定 (E L I S A) を開発するための方法、およびウェスタンブロットにおいてタンパク質を同定するための方法を提供するために、ヒト可溶性L D L Rに対する特異的M a bを生成する必要がある。それらの抗体は、組換えヒト可溶性L D L Rの産生および精製過程の進行中における組換えタンパク質の記録および定量的ために、および天然タンパク質の検出のために必要とされる。

10

【0010】

[本発明の要旨]

本発明は、ヒトL D L受容体およびその断片を特異的に認識して結合することができるモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞株の生成を可能とする。

【0011】

さらに詳細には、本発明は、ヒト可溶性L D L受容体を特異的に認識して結合することができるモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞株の生成を可能とする。

20

【0012】

したがって、本発明は、モノクローナル抗体C 7を除く、ヒトL D L受容体およびその断片を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体 (h u m a n i z e d a n t i b o d y)、抗 - 抗 I d抗体またはそれらの断片に関する。

【0013】

本発明は、ヒト可溶性L D L Rを認識して結合し、下記の要求を満たすモノクローナル抗体を提供する。

- 1 . ヒト可溶性L D L Rの検出のためのE L I S A、たとえばサンドイッチE L I S A (E n z y m e L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y)、における対として使用され得るM a b
- 2 . ウェスタンブロット分析におけるL D L Rの同定のために使用され得るM a b
- 3 . ヒト可溶性L D L Rの抗ウイルス性生物学的活性を中和するために使用され得るM a b
- 4 . H C Vなどのウイルス感染を阻害するために使用され得るM a b。

30

【0014】

本発明はさらに、ヒトL D L Rの検出および/または定量的目的で、既知の方法での本発明の特異的モノクローナル抗体の使用を含む、ヒトL D L Rの検出および/または定量的方法を提供する。

【0015】

本発明はまた、組換えヒトL D L Rで免疫化した哺乳動物由来の脾臓細胞および均質もしくは不均質のリンパ系細胞からなるクローン化されたハイブリドーマを提供する。

40

【0016】

本発明のモノクローナル抗体は、従来の方法で、たとえばh s L D Lで免疫化した哺乳動物由来の脾臓細胞および均質もしくは不均質のリンパ系細胞からなるクローン化されたハイブリドーマを液体培地または哺乳動物の腹腔において増殖させ、ハイブリドーマがモノクローナル抗体を産出および蓄積することを可能にすることにより、製造される。

【0017】

さらにもうひとつの態様において、本発明は、粗L D L R含有する材料を本発明のモノクローナル抗体に接触させることを含むヒトL D L Rの精製方法を提供する。吸着させたL D L R特異的なモノクローナル抗体を含むカラムは、組換えタンパク質の精製方法におけ

50

るアフィニティー精製工程として使用し得る。

【0018】

組換え体ヒトLDLRの検出および測定方法は、実施例5に記載されているようなELISA検定において、本発明のモノクローナル抗体を抗体として使用することを含む。

【0019】

動物用を免疫化するためのLDLRまたはLDLRの断片としては、温血哺乳動物のLDLRであるかぎり、いかなるLDLRも使用し得る。LDLRのムテインもまた使用し得る。そのような哺乳動物のヒト可溶性LDLRの代表例は、ヒトLDLRの配列の位置+4のアミノ酸Aspで始まり位置+291のアミノ酸Gluで終わるアミノ酸配列を含む可溶性LDLR+291型であり、+292型などのほかの型も同様に使用し得る。

10

【0020】

[本発明の詳細な説明]

ヒト可溶性LDLR(hsLDLR)に対するモノクローナル抗体を生成する。それらのモノクローナル抗体を使用することにより、hsLDLRの同定のためのELISAおよびウェスタンブロットニングならびにhsLDLRの抗ウイルス活性に対する中和検定を開発した。

【0021】

Mabは、ヒト可溶性LDLRのAsp+4からGlu+291までのN末端リガンド結合ドメインからなるhsLDLRの組換え体+291型で免疫化したマウスにおいて、生成された。hsLDLRの組換え体+291型はCHO細胞で産生され、均質に精製された。

20

【0022】

免疫化したマウスは、著しい力価の特異的抗体を産生した。ハイブリドーマのスクリーニングののち、5つのクローン(番号12、28、29、30および50)が、高抗体プロデューサーとして同定された。サブクローニングのために、それらのクローンはさらに選択された。サブクローニングののち、高抗体産生能を有する29のサブクローンを単離し、親クローン由来のアンブルおよびサブクローン由来のアンブルを凍結した。

【0023】

一組のモノクローナル抗体を、r-hsLDLRに対するELISA用に選択した。Mab28をコーティング抗体として選択し、そしてビオチンで標識化したMab29.8を第2抗体として選択した。Mab12.6および29.8は、ウェスタンブロット解析における天然および組換え体hsLDLRの同定に適していることが見出され、そしてMab28および30はウェスタンブロット解析における組換え体hsLDLRの同定に適していることが見出された。Mab12.6および50.30は、hsLDLRの抗ウイルス活性を阻害するために適していることが見出された。

30

【0024】

本発明により、Mab12.6、28および29.8は、ヒト肝細胞の初代培養におけるC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルスゲノム複製を阻害することも見出された。このように、それらの抗体は、C型肝炎感染の治療に使用され得る(図3)。

【0025】

それらのクローンにより産生されるMabのサブクラスアイソタイプが決定された。クローン12.6、28、29.8および30はIgG₁として同定され、一方、クローン50.30はIgMであることが見出された。

40

【0026】

hsLDLRの+291型に対して開発されたMabは、hsLDLRのほかの型、すなわち組換え体CHO細胞において産生されるr-hsLDLRの+292型および+331型をも、ELISAおよびウェスタンブロット解析において認識した。+292型はアミノ酸残基Asp+4からCys+292までの受容体のN末端部を含み、そして+331型はアミノ酸残基Asp+4からCys+331までの受容体のN末端部を含む。

【0027】

50

モノクローナル抗体を生成するためのマウスの免疫化に使用される抗原は、CHO細胞において産生されるr-hsLDLR+291型であった。そのr-hsLDLRの産生は、固定相フィブラセルマトリクスシステム(Fibracel matrix system)を用いるバイオリクターにおいて実施された。r-hsLDLRは均質に精製され、そしてマウスを免疫化するために使用された。

【0028】

最も優れたマウス免疫応答動物由来の免疫脾臓細胞は、ハイブリドーマの融合および生成のために使用された。

【0029】

本明細書において記載される抗体に関し、用語「モノクローナル抗体」は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、完全にヒト化した抗体、可溶型または結合型で標識化され得る抗イデオタイプ抗体に対する抗体(抗-抗Id抗体)、ならびに、酵素的切断、ペプチド合成または組換え技術などの、しかしながらそれらに限定されないあらゆる既知の技術により提供されるそれらの断片を含むことを意味する。

10

【0030】

モノクローナル抗体は、抗原に特異的な抗体の実質的に均質な集団を含み、該集団は実質的に同種のエピトープ結合部位を含有する。Mabは当業者に知られる方法により得ることができる。たとえば、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975); U. S. Patent No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); and Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N. Y., (1992-1996)を参照のこと。これらの参考文献の内容は、出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、GILDおよびそれらのサブクラスを含むあらゆる免疫グロブリンのクラスであってよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロ、インサイチュまたはインビボで培養してもよい。インビボまたはインサイチュでの高力価のMabの産生は、現在の好ましい産生方法である。

20

30

【0031】

キメラ抗体は、マウスMab由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどの、異なる部位が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体は、主として、投与の際に免疫原性を低下させるため、および産生の際に収率をあげるために使用されている。たとえば、マウスのMabはハイブリドーマからの高い収率であるが、ヒトにおいて高い免疫原性を有しているため、ヒト/マウスキメラMabsが使用される。キメラ抗体およびそれらの産生方法は当業者に知られている(Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., European Patent Application 125023 (published November 14, 1984); Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496 (published February 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494 (published March 5, 1986); Neuberger et al., PCT Application WO 8601533, (published March 13, 1986); Kudo et al., European Patent Appli

40

50

cation 184187 (published June 11, 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., International Patent Application No. W08702671 (published May 7, 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 214-218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988); Riechmann et al., Nature 332: 323-327; Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra.). これらの参考文献は、出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。 10

【0032】

「完全なヒト化抗体」は、ヒト免疫グロブリンの可変領域および定常領域を共に含有する分子である。完全にヒト化した抗体は、治療の用途に潜在的に使用され得る。自己免疫疾患などの慢性および再発性の疾患に対しては繰り返し治療することが要求される。完全なヒト抗体の製造方法は、内因性のIg遺伝子を不活性にしたマウスにヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座を導入することによるマウス体液性免疫系の「ヒト化」、すなわちヒトIgを産生することができるマウス系統(ゼノマウス)の産生からなる。一般的な免疫応答を最終的に引き起こすために要求されるIg遺伝子座の物質的な構造ならびに遺伝子転位および発現過程に関して、Ig遺伝子座は非常に複雑である。抗体多様性は、Ig遺伝子座に存在する様々なV、DおよびJ遺伝子間のコンビナトリアル転位によって主に生成される。それらの遺伝子座はまた、抗体発現、対立遺伝子排除、クラススイッチおよび親和性成熟を制御する散在性制御因子を含有する。転位していないヒトIg導入遺伝子のマウスへの導入は、マウスの組換え機構がヒト遺伝子に適合することを証明した。さらに、様々なアイソタイプの抗原特異的hu-mAbを分泌するハイブリドーマは、抗原によるゼノマウス免疫化によって得ることができる。 20

【0033】

完全なヒト化抗体およびそれらの産生方法は、当業者に知られている(Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997); Buggemann et al., Eur J. Immunol. 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727 (2000); Patent WO 98/24893)。 30

【0034】

抗イデオタイプ(抗Id)抗体は、独特の決定基を認識し、一般に抗体の抗原結合部位に結合される抗体である。Id抗体は、Mabの供給源として同種かつ同遺伝子型の動物(たとえばマウス系統)を免疫化し、そのMabに対して抗Idが製造されることによって製造され得る。免疫化された動物は、イデオタイプ決定基に対する抗体(抗Id抗体)を産生することにより、免疫性を与える抗体のイデオタイプ決定基を認識し応答する。たとえば、U. S. Patent No. 4,699,880を参照のこと。それは出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。 40

【0035】

抗Id抗体はまた、いわゆる抗-抗Id抗体を産生するさらに他の動物において、免疫応答を誘導するための「免疫源」として使用され得る。抗-抗Idは、抗Idを誘導した本来のMabと、エピトープが同一であってもよい。すなわち、Mabのイデオタイプ決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性を有する抗体を発現するほかのクローンを同定することが可能である。

【0036】

したがって、本発明のLDLRに対して生成されたMab、そのアイソフォーム、アナロ 50

グ、断片または誘導体は、BALB/cマウスなどの適当な動物において抗Id抗体を誘導するために使用され得る。そのような免疫化されたマウス由来の脾臓細胞は、抗Id Mabを分泌する抗Idハイブリドーマを産生するために使用される。さらには、抗Id Mabを、カサガイ(keyhole limpet)ヘモシアニン(KLH)などの担体に結合し、さらなるBALB/cマウスを免疫化するために使用し得る。それらのマウスからの血清は、前記LDLRタンパク質またはそのアナログ、断片および誘導体のエピトープに特異的な本来のMabの結合特性を有する抗-抗Id抗体を含有するであろう。

【0037】

したがって、抗Id Mabは、それら独自のイデオタイプエピトープ、または評価されたそのエピトープに構造的に類似する「イデオトープ」を有する。用語「モノクローナル抗体」はまた、完全な分子および、たとえば抗原に結合することができるそのFabおよびF(ab)₂などの断片の双方を含むことを意図されている。FabおよびF(ab)₂断片は、完全な抗体のFc断片を欠き、血液循環からより早急に排除され、そして完全な抗体よりも非特異的組織結合が少ない(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983))。

10

【0038】

本発明において有用な抗体のFabおよびF(ab)₂ならびにほかの断片は、本明細書において開示される完全な抗体分子用の方法にしたがい、LDLRタンパク質の検出および定量のために使用し得ることは評価されるであろう。そのような断片は、パプシン(Fab断片を産生)またはペプシン(F(ab)₂断片を産生)などの酵素を用いるタンパク質分解的切断によって、一般に産生される。

20

【0039】

モノクローナル抗体が分子に特異的に反応することができ、それにより分子が抗体に結合する場合は、モノクローナル抗体は分子に「結合することができる」といわれる。用語「エピトープ」は、抗体により結合され得るあらゆる分子の一部であって、またその抗体によっても認識される一部を指すことを意図されている。エピトープまたは「抗原決定基」は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面配置から構成され、特異的な3次元構造の特徴および固有の電荷特性を有する。

【0040】

「抗原」は、抗体により結合され得る分子または分子の一部であり、抗原はさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を動物に産生させることができる。抗原は1つ以上のエピトープを有し得る。前記で言及した特異的反応は、抗原は、高い選択的様式で、他の抗原によってつくられ得るほかの多数の抗体ではなく、その対応する抗体上のエピトープに反応することを示すものとして意図されている。

30

【0041】

本発明に有用な、抗体の断片を含む抗体は、試料中のLDLRタンパク質を量的または質的に検出するために、または本発明のLDLRタンパク質を発現する細胞の存在を検出するために使用され得る。これは、蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー検出法または蛍光測定検出法と組み合わせる、蛍光標識化抗体(下記を参照のこと)を用いる免疫蛍光技術により達成することができる。

40

【0042】

本発明において有用な抗体(またはその断片)は、本発明のLDLRタンパク質のインサイチュ検出法のための免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡法などにおいて、組織学的に使用され得る。インサイチュ検出法は、患者から組織学的標本を取りだし、そして本発明の標識化抗体をその標本に供給することにより達成され得る。抗体(または断片)は、標識化抗体(または断片)を生物学的試料に適用することにより、または標識化抗体(または断片)を生物学的試料で覆うことにより提供されることが好ましい。そのような手法を使用することによって、LDLRタンパク質の存在だけでなくその検査される組織上の配置もまた、決定することができる。本発明を用いれば、当業者は、そのようなインサイチュ検

50

定法を達成するために、広く様々な組織学的方法（染色手法など）を改変し得ることを、容易に理解するであろう。

【0043】

本発明のLDLRタンパク質用のそのような検定は、通常は、LDLRタンパク質を同定することができる標識化抗体の存在下において、生物学的流体、組織抽出物、リンパ球もしくは白血球などの採取したばかりの細胞、または組織培養においてインキュベーションされている細胞などの生物学的試料をインキュベーションし、ついで本分野において既知のあらゆる技術により該抗体を検出することを含む。

【0044】

生物学的試料は、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体、または細胞、細胞片もしくは可溶性タンパク質を固定することができるほかの支持体または担体に結合してもよい。ついで、支持体または担体を適当な緩衝液で洗い、前記のように本発明したがつて標識化抗体で処理する。固相支持体または担体はついで、結合していない抗体を除去するために緩衝液で2回洗う。ついで、前記固定支持体または担体上の結合した標識の量は、従来の方法により検出される。

【0045】

「固相支持体」、「固相担体」、「固定支持体」、「固定担体」、「支持体」または「担体」は、抗原または抗体を結合することができるあらゆる支持体または担体を意図されている。公知の支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロンアミラーゼ類、天然および修飾セルロース類、ポリアクリルアミド類、ガブロス (g a b b r o s) ならびに磁鉄鉱を含む。担体の性質は、本発明の目的のために、ある程度可溶性あるいは不溶性のどちらかであり得る。支持体材料は、結合される分子が抗原または抗体に結合することができる限り、事実上あらゆる構造構成を有していてもよい。したがって、支持体または担体の構成は、ビーズのような球状、試験管の内面または棒の外表面のようなシリンダー状であってもよい。あるいは、その表面は、シート、検定細片 (t e s t s t r i p) などの平面であってもよい。好ましい支持体または担体はポリスチレンビーズを含む。当業者は、抗体を結合するほかの適当な担体を理解するであろうし、または日常の試験の用途により同様のことを確認することができるであろう。

【0046】

前記のように、本発明の得られた多くの抗体の結合活性は、既知の方法にしたがつて測定され得る。当業者は、日常の試験を使用することによって、各測定法における作用のおよび最善の検定条件を決定することができるであろう。

【0047】

洗い、攪拌、振とう、濾過などのほかの工程は通常のもの、あるいは特定の状況に必要なものである場合、前記検定に追加してもよい。

【0048】

本発明の抗体が標識化され得る方法の1つは、酵素に抗体を結合し、酵素免疫検定 (E I A) において使用するものである。その結果、のちに酵素が適当な基質にさらされると、たとえば分光光度計法、蛍光測定法または可視的方法によって検出され得る化学的部分を産生するための方法において、酵素は基質と反応する。抗体を検出できるように標識化するために使用される酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ-グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない。検出は、酵素に対する色素原基質を使用する比色分析法により達成され得る。検出はまた、同様に調整された標準物に対する基質の酵素的反応の程度を可視的に比較することにより、達成され得る。

10

20

30

40

50

【0049】

検出は、様々なほかの免疫検定を用いることにより達成してもよい。たとえば、抗体または抗体断片を放射活性標識することにより、放射性免疫検定法(RIA)を用いてR-PTPaseを検出することが可能である。RIAの適当な説明は、本明細書に出典を指示することにより取りこまれるChard, T.による“An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques”と題された章にとくに関連する、Work, T. S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978)によるLaboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biologyにみられる。放射活性アイソトープは、gカウンターまたはシンチレーションカウンターを使用した方法などにより、またはオートラジオグラフィにより検出され得る。

10

【0050】

蛍光化合物により本発明の抗体を標識することも可能である。蛍光標識化抗体が適当な波長の光にさらされると、蛍光によりその存在が検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、ピコシアニン、アロフィコシアニン、O-フタルデヒド(o-phthaldehyde)およびフルオレサミンである。

【0051】

抗体はまた、 ^{152}E またはほかのランタニド類などの蛍光放射金属を用いて検出可能に標識化することができる。それらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(ETPA)などの金属キレート群を用いることにより、抗体に結合することができる。

20

【0052】

抗体はまた、化学発光化合物に結合することにより検出可能に標識化することができる。ついで、化学発光を付加した抗体の存在は、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することにより測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマチックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0053】

さらに、本発明の抗体を標識するために、生物発光化合物を使用してもよい。生物発光は、触媒タンパク質により化学発光反応の効率が增大される生物系において見出された、化学発光の1つの型である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより測定することができる。標識の目的で重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

30

【0054】

本発明の抗体分子は、同様に「両側」または「サンドイッチ」検定として知られる免疫測定検定法における使用に適応されてもよい。典型的な免疫測定検定法において、定量の非標識化抗体(または抗体の断片)が固定支持体または担体に結合され、そして定量の検出可能に標識化された可溶性抗体を添加することにより、固相抗体、抗原および標識化抗体のあいだで形成される3元の複合体の検出および/または定量を行う。

40

【0055】

典型的で好ましい免疫測定検定は、まず、試験される試料と固相に結合する抗体を接触させ、二元の固相抗体-抗原複合体の形成によって試料から抗原を抽出する「フォワード」検定を含む。適当なインキュベーション後、固相支持体または担体を、液体試料の残渣(もしあるとすれば、未反応の抗原を含む)を除去するために洗い、ついで未知量の標識化抗体(「リポーター分子」として機能する)を含有する溶液と接触させる。非標識化抗体の中で、固定支持体または担体に結合した抗原と標識化抗体とを複合体にするための第2のインキュベーションののち、未反応の標識化抗体を除去するために固定支持体または担体を2回洗う。

50

【0056】

本発明の抗原を用いることによってもまた有用であり得るもう1つの型の「サンドイッチ」検定において、いわゆる「同時」および「逆」検定が用いられる。同時検定は、固定支持体または担体に結合した抗体、および標識化抗体をとともに同時に試験される試料に添加するために、1つのインキュベーション工程を含む。インキュベーションを完了したのち、液体試料の残渣および非複合体の標識化抗体を除去するために固定支持体または担体を洗った。固定支持体または担体に結合した標識化抗体の存在は、ついで、従来の「フォワード」サンドイッチ検定と同様に測定される。

【0057】

「逆」検定において、まず、標識化抗体の溶液を液体試料に徐々に添加し、ついで適当なインキュベーション期間が設けられたのちに、固定支持体または担体に結合した非標識化抗体を添加する。2回目のインキュベーションののち、試験試料の残渣および未反応の標識化抗体の溶液を除くために、固定相を従来の様式で洗う。ついで、固定支持体または担体に結合した標識化抗体の測定は、「同時」および「フォワード」検定と同様に測定される。

10

【0058】

ここで、以下の非限定的な実施例を用いて本発明を説明する。

【0059】

[実施例]

実施例1 CHO r-hsLDLRの調製

20

2つの発現ベクター（アミノ酸残基 Asp (+4) から始まり Glu 291 (+291) までの LDLR の N 末端リガンド結合ドメインを含有する psLDLR01、および DHFR に対するマウス遺伝子を含有する pDHF R。双方とも SV40 初期領域のプロモーターおよび転写終結エレメントにより調節される）を用いる、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を欠く CHO-DUKX 細胞 (Urlaub, G. et al., 1980) への共トランスフェクションにより、ヒト可溶性 LDLR を発現する安定な組換え体 CHO 細胞を生成した。トランスフェクションは、リポフェクトアミン (Lipofectamine) (ギブコ BRL 社 (Gibco BRL) 製) を用いる陽イオンリポソームにより、製造業者により記載されたプロトコルにしたがって実施した。トランスフェクションの 72 時間後、デオキシヌクレオシドおよびリボヌクレオシドを欠き、かつ 10% の透析 FCS を補充した選択培地に細胞を移した。DHFR 活性を発現する細胞はコロニーを形成することができ、トリプシンを含ませたペーパーディスクで細胞をつりあげることによって単離した。細胞を増殖させ、ついで r-hsLDLR 活性に対するスクリーニングを行った。ついで、トランスフェクションされた細胞を用いて MTX による遺伝子増幅を行い、続いて安定なプロデューサークローンのサブクローニングおよび選択を行った。

30

【0060】

5 リットルの Celligen バイオリアクターにおける無血清培地 (ギブコ CHO-A-SFM、カタログ番号 95-0091DJ) 中で、#33-10-29-21 と命名した安定な CHO プロデューサークロン細胞を用いて、r-hsLDLR (+291 型) を産出した。粗製の収集物は、0.8-0.2 μ カートリッジフィルター (ゲルマン (Gelman) カタログ番号 CSS92DSCCK) による濾過によって清澄化し、そして 5-kDa 膜で覆って 100 倍に濃縮した。最初の免疫化に用いられた r-hsLDLR の +291 型は、スモールスケール精製方法を用いて精製された。その方法において、DEAE セファロース陽イオン交換カラムが用いられ、ついで プチル-TSK カラムにおける疎水的相互作用工程、続いて HTP カラムおよびセファクリル 100 カラムにおけるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行った。SEC の分画 #27 は、下記の実施例 9 記載の抗ウイルス検定において検出された 780 ユニット / μg の特異的抗ウイルス活性を有していたので、SEC の分画 #27 を選択した。その分画におけるタンパク質を、N 末端分析により、r-hsLDLR として同定した。

40

50

【0061】

CHO + 291 r - h s L D L R の第 2 の群を精製し、マウスの促進注射用に用いた。以下の工程、a) 清澄化および粗製収集物の 100 倍濃縮、b) H Q P O R O S 陰イオン交換カラム、および c) 2 つの疎水的相互作用 (H I C) 工程 (プチル - T S K カラムでの捕捉およびフェニル 5 P W カラムによる流下) を含む、収率が改良された精密な工程を用いて精製した。最終の H I C 工程由来の非結合分画を透析し、そして H S - P O R O S 陽イオン交換カラムにより精製した。その最終工程はヒドロキシアパタイト (H T P) カラムであった。そして、r - h s L D L R は約 90 % まで精製され、R P - H P L C における単一の主要ピークとして溶出された。

【0062】

実施例 2 マウスの免疫化

前記実施例 1 の S E C カラムの分画 # 27 の精製 r - h s L D L R 10 μ g を、100 μ g / m l の濃度で、完全フロイントアジュバンド (C F A 、 50 % v / v) で均質化し、5 匹の 7 週齢の B a l b / C 雌マウスの肢に注射にした。

【0063】

第 1 回の免疫化から 4 週間後、マウスは、C F A の 50 % (v / v) 溶液における同分画の精製 r - h s L D L R 10 μ g により筋肉内注射で促進された。

【0064】

第 2 回の注射から 2 週間後、以下の実施例 3 記載の直接的 E L I S A を用いて、r - h s L D L R の抗体に対するマウス血清の試験を行なった。

【0065】

第 2 回の注射の 10 週間後、r - h s L D L R に最も顕著に特異的な免疫活性を有する 2 匹のマウス M - 1 および M - 2 を、前記実施例 1 記載の精密な精製方法で得られた精製 r - h s L D L R 10 μ g により、さらに促進させた。

【0066】

14 週間後にマウスは採血され、r - h s L D L R の抗体に対する試験を行った。ついで、マウスに P B S 中 r - h s L D L R 50 μ g の 2 回のさらなる促進薬を、1 回目は腹腔内に、そして 2 回目は 2 日後、腹腔内および静脈内の双方に与えた。

【0067】

2 回目の注射から 2 週間後にマウスは採血され、その抗血清は、下記実施例 3 の直接的 E L I S A により、抗 r - h s L D L R 活性に対して試験された。各抗血清は 1 : 100 ~ 1 : 32000 に順次に希釈され、そして、前記実施例 1 記載の精密な精製方法により精製された r - h s L D L R を 10 U / 穴でコートした 96 穴プレート 2 組に用いた。検定用緩衝液および D M E M + P B S 含有 10 % H S + 1 % B S A またはゼラチン + 0.05 % ツイーン 20 + 0.05 % チメローサルを、ブランクとして各列の第 1 番目の穴に使用した。正常なマウス血清 (N M S) を、陰性コントロールとして、最後の 2 列に同じ希釈割合で用いた。酵素反応の吸光度を、492 および 405 n m において E L S A リーダーで測定した。

【0068】

この試験結果は、マウス M - 1 の血清が r - h s L D L R に対し、より高い特異的な免疫活性を有していることを示したので、犠牲死させ、ミエローマ細胞を用いて融合するために脾臓細胞を採取した (E s h h a r Z , 1985) 。

【0069】

実施例 3 抗血清試験の直接 E L I S A およびハイブリドーマクローンスクリーニング陽性抗血清のスクリーニングのための直接 E L I S A を、以下のように実施した。P B S + 1 % ゼラチン (シグマ社 (S i g m a) 製、カタログ番号 G - 7765) + 0.9 m M $C a^{+2}$ および 0.5 m M $M g^{+2}$ 、p H 5.6 中 r - h s L D L R (実施例 1 の精密な精製方法により精製) 100 ユニット / m l の 100 μ l (以下、検定用緩衝液と呼ぶ) を用い、振とうしながら 90 分間 37 で 96 穴プレートをコートした。そのプレートを、P B S + 0.05 % ツイーン 20 (ポリオキシエチレン - モノラウリン酸ソルビタ

10

20

30

40

50

ン - シグマ P - 1379) (以下、洗浄溶液と呼ぶ) で6回洗った。

【0070】

免疫化マウス由来の1:100~1:32000に順次希釈された抗血清試料、またはハイブリドーマ細胞培養物由来の上清を穴に添加し、90分間37℃で振とうしながらインキュベーションし、ついで洗浄溶液で6回洗った。

【0071】

1:1200に希釈されたマウスFab (シグマ社製、カタログ番号4601-1) の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) - APA複合ヤギ抗体100µlを穴に添加し、90分間37℃で振とうしながらインキュベーションし、ついで洗浄溶液で6回洗った。

【0072】

基質溶液100µl (OPD1錠およびH₂O₂1錠を20mlの水に溶解することにより調製) を穴に添加し、そしてRTで30分間インキュベーションした。酵素反応は、100µl/穴の4N HClの添加により停止させた。

【0073】

96穴プレートにおける吸光度を492および405nmにおけるELISAリーダーを用いて読みとり、得られた結果を、ELISAリーダーに連結したPCコンピュータのMultiCalcソフトウェアによって、4つのパラメトリックロジスティックアルゴリズムを用いて計算した。

【0074】

実施例4 融合、ハイブリドーマ製造、クローンの選択および腹水液からの抗体の精製
融合方法およびハイブリドーマ細胞選択は、Eshhar Z, 1985記載のプロトコルにしたがって実施した。つまり、融合する2~4日前に促進されたマウスM-1由来の脾臓細胞を、PEGを用いる短時間のインキュベーションによってミエローマ細胞と融合した。はじめに、PEGをDMEMでゆっくり希釈し、ついで遠心により完全に除去した。細胞をDMEM-HAT培地に再懸濁し、約3.4×10⁴細胞/穴の濃度で96穴プレートに配置させ、8%CO₂インキュベータにおいて37℃で10~14日間インキュベーションした。10日以内にすべてのハイブリドーマの穴の培地を、10%ウマ血清(HS)で補充したDMEMに交換した。前記実施例3記載の直接ELISAにより、r-hsLDLRのMabの存在に対するハイブリドーマ培養上清試料のスクリーニングを行った。検定用緩衝液およびDMEM+10%HSをブランクとして使用した。Mab C7 (アマシャム社 (Amersham) より商業的に入手可能) およびM-1マウス抗血清を陽性コントロールとして使用し、可溶性p55TNF受容体に対するモノクローナル抗体を陰性コントロールとして使用した。培養上清において抗体の存在が検出された穴由来の細胞を24穴プレートに移し、ついで25cm²T-フラスコに移した。展開された培養は、r-hsLDLRに対するMabの分泌についてモニターされた。陽性培養物由来の細胞のアンブルを液体窒素において凍結し保存した。

【0075】

r-hsLDLRの抗体を検出するために、合計約1000培養物をスクリーニングした。最も高い免疫活性を有する54の培養物を数回、再試験した。最も高い活性を有する5つの培養物(12、28、29、30および50)を、96穴プレートにおける限界希釈によりクローン化した。直接ELISAにより、増殖するクローン由来の上清を数回、r-hsLDLRの抗体に対して試験した。

【0076】

陽性ハイブリドーマクローンの細胞を組織培養フラスコにおいて15%ウマ血清を含有するDMEMで増殖させ、培養物の一部から得たアンブルを凍結した。並行して、異なるハイブリドーマクローンの細胞を2~4匹の各マウスに注射し、腹水液を得た。硫酸アンモニウム沈殿法により、またはタンパク質Gカラムのどちらかにおいて、抗体を腹水液から精製した。つまり、7.5mlの腹水液を20mMリン酸緩衝液pH7において1:3に希釈し、5mlタンパク質Gカラム(C10/10)に添加した。20mMリン酸緩衝液pH7を用いてカラムを洗い、100mMグリシン緩衝液pH2.7を用いてMabを溶

10

20

30

40

50

出した。1 M トリス緩衝液 pH 9.3 を用いて、溶出分画の pH を 7 ~ 7.5 に調整した。

【0077】

実施例 5 ELISA に使用するための Mab の対のスクリーニングおよび ELISA パラメータの最適化

下記実施例 6 記載の r - h s L D L R 用 サンドイッチ ELISA における第 1 および第 2 抗体として使用される最適な Mab の対を選択するために、前記実施例 4 記載のように腹水液から精製された Mab は、マトリックス形式での一連の実験を実施するために使用された。つまり、硫酸アンモニウム沈殿法によりまたはタンパク質 G カラムのどちらからにおいて精製された 5 つのハイブリドーマ (# 12、28.28、29.08、30 および 50.05) 由来の腹水液で、96 穴プレートをコートした。CHO 細胞において産生された r - h s L D L R の + 291 型ならびに + 292 型 (アミノ酸残基 Asp + 4 から Cys + 292 まで) および + 331 (アミノ酸残基 Asp + 4 から Cys + 331 まで) 型を抗原として用い、抗体をスクリーニングした。サンドイッチ ELISA における第 2 抗体としての適合性の短時間スクリーニングのために、前述の部分的に精製された各 Mab の 1 ml をビオチンにより標識した。つまり、硫酸アンモニウム沈殿法で精製された Mab の 1.5 mg を、0.5 M NaHCO₃ 30 μl により、pH 8.5 に調整した。0.75 mg のビオチン - OSu N - ヒドロキシスクシニミド (Hydroxysuccinimido) - ビオチン (ビオチン - OSu、シグマ社製、カタログ番号 H1759、200 μl DMSO における 5 mg の溶液) を抗体溶液に添加し、そして緩やかに振とうしながら室温で 2 時間インキュベーションし、ついで 2 ~ 8 において一晩インキュベーションした。ビオチン化 Mab と過剰な未反応ビオチン - OSu とを分けるために、反応溶液をセファデックス G - 25 M (ファルマシア社 (Pharmacia) カタログ番号 17 - 0851 - 01) PD10 カラムに適用した。

【0078】

最初の予備実験は、Mab 29.08 および 30 が ELISA における第 2 抗体として使用された場合、バックグラウンドを超えて最も高いシグナルを産生することを示した。

【0079】

それら 2 つのクローンの反応は、プレートのコーティングに使用される抗体 12、28、29.08 および 50 とともに、第 2 抗体として再度試験された。この実験結果は明らかに、Mab 28 はコーティングに最適な抗体であることを示した。

【0080】

シグナル強度および特異性に関し、最もよい結果は、マイクロタイタープレートのコーティングに使用された Mab 28 および第 2 抗体としてビオチンで標識化した Mab 29.08 により得られた。それらの Mab を使用することにより、r - h s L D L R の 3 つの型すべて (+ 291、+ 292 および + 331) でよい結果が得られた。すべての型について、492 / 405 nm における吸光度は約 1.3 OD であった。

【0081】

r - h s L D L R 抗原の 3 つの型は、0.9 ~ 1000 ng / ml の濃度範囲の一連の希釈で分析された。コーティングに使用された Mab 28 および第 2 抗体としてビオチン化された Mab 29.08 により、用量反応曲線を得た。その組み合わせは、r - h s L D L R の 1 ~ 10 ng / ml の濃度範囲において、直線反応を示した。

【0082】

以下の条件を試験することによって、試薬濃度、インキュベーション時間、緩衝液およびプレートの選択など、ELISA 試験に影響し得る様々な条件を最適化した。

・PBS 中 5 ~ 10 μg / ml の Mab 28 によるマイクロタイターウェルのコーティング

・緩衝液組成：

a) PBS + ツイーン 20

b) トリス + Ca²⁺ + NaCl + ツイーン 20

・ブロッキング溶液

- a) P B S 中 1 % ゼラチン、0 . 0 5 % ツイーン、0 . 0 0 5 % チメローサル
- b) P B S 中 1 % B S A、0 . 0 5 % ツイーン、0 . 0 0 5 % チメローサル
- c) P B S 中 1 % F B S、0 . 0 5 % ツイーン、0 . 0 0 5 % チメローサル
- d) P B S 中 1 % ミルク、0 . 0 5 % ツイーン、0 . 0 0 5 % チメローサル
- e) I ブロック (I B l o c k)、ハイペップ (H y P e p) およびハイイースト (H y Y e a s t)

・10 . 7 4 ~ 0 . 5 3 7 μ g / ml の濃度範囲に相当する 1 : 5 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 2 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 8 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0 の濃度におけるビオチンで標識された第 2 M a b 2 9 . 0 8

10

・エクストルアビジン (E x t r a v i d i n) 濃度 : 4 ~ 0 . 2 μ g / ml の濃度範囲に相当する 1 : 5 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 2 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 8 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0。

【0083】

それらの実験に基づき、下記実施例 6 記載のサンドイッチ E L I S A 試験のための最終手順を確立した。

【0084】

実施例 6 r - h s L D L R に対するサンドイッチ E L I S A の確立

M a b 2 8 および 2 9 . 0 8 を用いて、r - h s L D L R に対するサンドイッチ E L I S A を確立した。つまり、100 μ l のタンパク質 G 精製 M a b 2 8 (5 μ g / ml) を用い、2 ~ 8 で一晩または 3 7 で 3 時間、9 6 穴プレートにコートした。ついで、P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 を用い、プレートを 5 回洗った。プレートを 2 0 0 μ l のブロッキング溶液 (P B S + 1 % B S A またはゼラチン + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 + チメローサル 0 . 0 5 %) とともに 3 7 で 1 時間または 4 で一晩インキュベーションし、P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 で 5 回洗った。100 μ l の検量曲線抗原 (ブロッキング溶液で希釈された 0 . 5 ~ 3 2 n g / ml の C H O + 2 9 1 r - h s L D L R) または試料を穴に添加し、ついで振とうしながら 3 7 で 9 0 分間インキュベーションした。ついで、P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 を用いてプレートを 5 回洗った。

20

【0085】

ブロッキング溶液に溶解したビオチン化 M a b 2 9 . 0 8 (0 . 6 7 μ g / ml) 1 0 0 μ l / 穴を添加し、そして 3 7 で 1 時間、振とうしながらインキュベーションした。P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 を用いてプレートを 5 回洗った。市販のエクストルアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (エクストルアビジン T M - ペルオキシダーゼ バイオメーカー (B i o M a k o r)、カタログ番号 0 6 4 5 - 1) を 1 : 1 0 0 0 0 に希釈した 1 0 0 μ l を穴に添加し、1 時間 3 7 で振とうしながらインキュベーションした。ついで、P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 を用いてプレートを 5 回洗った。1 2 5 μ l の前記基質溶液を各穴に添加し、その色が所望の強度に達するまで約 1 0 分間インキュベーションした。反応は、1 2 5 μ l の 4 N H C l を添加することにより停止した。9 6 穴プレートにおける吸光度を 4 9 2 および 4 0 5 n m 波長において E L I S A リーダーを用いることにより読みとり、その結果を E L I S A リーダーに連結した P C コンピュータの M u l t i C a l c ソフトウェアにより計算した。

30

40

【0086】

実施例 7 モノクローナル抗体アイソタイプ

モノクローナル抗体 I g アイソタイプは、市販のアイソタイプングキット (ファルミンゲン インターナショナル社製 (P h a r M i n g e n I n t e r n a t i o n a l)) を用い、製造会社の検定手順にしたがって測定された。クローン 1 2 . 6、2 8、2 9 . 8 および 3 0 を I g G₁ として同定し、一方、クローン 5 0 . 3 0 は I g M クラスであることが分かった。

【0087】

実施例 8 S D S - P A G E ウェスタンブロット解析

50

精製した r - h s L D L R の + 2 9 1 型およびヒトの尿から精製された天然 L D L R を、 r - h s L D L R に対して開発されたモノクローナル抗体を用いるウェスタンブロット解析により解析した。つまり、12% SDS ポリアクリルアミドゲルを、100 ng / レーンの r - h s L D L R の C H O + 2 9 1 型または天然の尿 h s L D L R もしくは T B P - 1 粗製採取物 (陰性コントロールとして) とともに還元条件下 (4 0 m M D T T) において添加した。1つのレーンには低分子量マーカー (L M W) を添加した。このサンプルの組み合わせを5回実施した。ゲル上で分離されたタンパク質を、電気溶出によりニトロセルロース膜に移した。10% 低脂肪ミルク、0.1% ツイーン20を含有する P B S において、膜を16時間インキュベーションした。膜を細片に切断し、選択した5つの M a b (1 2 . 6 、 3 0 、 5 0 . 3 0 、 2 8 または 2 9 . 0 8 (1 : 4 0 0 0 希釈の腹水液)) のうち1つとともに、各細片を室温で2時間インキュベーションした。

【 0 0 8 8 】

膜の細片は、0.1% ツイーン20含有 P B S で洗い (3 × 1 5 分間) 、第2抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼ - アルカリホスファターゼ) (1 : 1 0 0 0 0 希釈、バイオメーカー社製) とのヤギ抗マウス複合体で2時間インキュベーションした。

【 0 0 8 9 】

細片を、0.1% ツイーン20含有 P B S で洗った (3 × 1 5 分間) 。陽性のバンドを、増強された化学発光 (E C L 、アマシャム社製) により検出した。

【 0 0 9 0 】

モノクローナル抗体 # 1 2 . 6 および # 2 9 . 8 は、ウェスタンブロット解析において、尿の精製 r - h s L D L R ならびに + 2 9 1 型の精製 r - h s L D L R の双方を認識した (図 2) 。 M a b 2 8 および 3 0 は、 + 2 9 1 型の精製 r - h s L D L R を認識した。

【 0 0 9 1 】

実施例 9 モノクローナル抗体による r - h s L D L R 抗ウイルス活性の阻害

V S V / W I S H 系における細胞変性効果 (C P E) 阻害検定を用いることにより、 r - h s L D L R に特異的に反応した M a b を、インビトロにおける r - h s L D L R (+ 2 9 1 型) の抗ウイルス活性を阻害する能力に対して試験した。

【 0 0 9 2 】

W I S H 細胞 (ヒト羊膜が起源) を、37、5% C O ₂ インキュベータにおいて、10% F B S および 4 m M グルタミンで補充した M E M で培養した。検定開始 2 4 時間前に、指数関数的に増殖する細胞を 9 6 穴組織培養プレートに 4 0 0 0 0 細胞 / 穴の密度で播種した。試験すべき試料および標準を希釈し、細胞を有する穴に分配した。即時に、0.5 p f u / 細胞の感染多重度 (M O I) で V S V を穴に添加した。プレートを 1 6 ~ 1 8 時間 3 7 でインキュベーションし、ついでエタノールで洗った。グラムクリスタルバイオレット染色により、生存細胞の単層を観察した。標準に対する細胞変性効果の定量は、標準濃度に対する色密度 (c o l o u r d e n s i t y) をプロットすることにより、実施した。

【 0 0 9 3 】

抗体の中和効果を解析するために、試験される M a b の腹水液の濃度を上げながら、 r - h s L D L R を 3 7 で 3 0 分間プレインキュベーションした。ついで、それらの溶液を 9 6 マイクロタイタープレートにおける W I S H 細胞の培養物に添加し、水疱性口内炎ウイルス (V S V) を添加した。18時間のインキュベーションののち、クリスタルバイオレットで残った細胞を染色することにより、V S V 媒介細胞溶解を測定した。標準濃度に対する色強度 (E L I S A リーダーにより測定) をプロットすることにより、標準に対する細胞変性効果の半定量を実施した。

【 0 0 9 4 】

r - h s L D L R の濃度をあげながら、M a b の効果を試験した。表 1 に示すように、2つの M a b (1 2 . 6 および 5 0 . 3 0) は中和活性を示すことが分かった。

【 0 0 9 5 】

表 1 に示す実験において、2つの M a b の阻害効果は、腹水液の 1 : 4 0 希釈で試験され

た。この希釈で、M a b 1 2 . 6 は、M a b 5 0 . 3 0 よりもいくらか高い活性を示した。これは、M a b の特性ならびに腹水液におけるそれらの濃度の違いに由来する結果かもしれない。

【 0 0 9 6 】

M a b の阻害効果は、M a b 濃度に対して r - h s L D L R 濃度を上げることにより解消されることができた。実際に 6 2 . 5 U / m l の r - h s L D L R 濃度では、どちらの M a b も、解析された抗体濃度において、r - h s L D L R 活性に対する効果を有していなかった。

【 0 0 9 7 】

【表 1】

表1:クローン12.6および50.30によるr-hsLDLR抗ウイルス活性の阻害①

VSV/Mab	LDLR 濃度 (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
- VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV +クローン50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+VSV +クローン12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67

① VSVに対するr-hsLDLR抗ウイルス活性の阻害はWISH細胞の細胞溶解を媒介した。Mabの阻害効果は、腹水液の1:40希釈で測定した。生存細胞の数をOD値で表に示す。括弧内の番号は、0および12.5U/mlのLDLR濃度で実施した反復を示す。

【 0 0 9 8 】

r - h s L D L R の抗ウイルス活性阻害は、M a b 1 2 . 6 および 5 0 . 3 0 の濃度を上げながら使用することによって測定された。M a b 1 2 . 6 は、1 : 4 0 希釈 (腹水液) においては ~ 6 0 % で、および 1 : 2 0 5 0 0 希釈においては ~ 3 5 % で、r - h s L D L R の抗ウイルス活性を阻害した。クローン 5 0 . 3 0 は、1 : 4 0 希釈においては ~ 4 5 % で、および 1 : 2 0 5 0 0 希釈においては ~ 1 5 % で、r - h s L D L R 活性を阻害した。

【 0 0 9 9 】

両 M a b を用いて得られた用量反応曲線、および、阻害効果が過剰の r - h s L D L R によって減じられるという見解により、M a b は r - h s L D L R への結合によってその効果を発揮することが示唆された。

【 0 1 0 0 】

実施例 1 0 モノクローナル抗体による H C V 複製の阻害

r - h s L D L R 特異的な M a b は、初代培養のヒト肝細胞における H C V 複製阻害能力に関して試験された。F T 1 6 7 細胞培養物は、医療目的で葉切除を要する 5 7 歳の男性患者 (結腸腫瘍の転移、右葉) 由来であった。

【 0 1 0 1 】

ヒト肝細胞の初代培養を、2工程コラゲナーゼ灌流法 (the two steps collagenase perfusion method) (Maurel P. Adv.

10

20

30

40

50

Drug Del. Rev. 22: 105-132 (1996), Pichard L. et al. Mol. Pharmacol. 41: 1047-1055 (1992), Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107: 31-45 (1997)) によって調製した。平板培養前の細胞の生存能力は、トリパンブルー排除試験 (trypan blue exclusion test) を用いて測定された。3 ml 培地中 4 百万個の細胞を、コラーゲンでプレコートした 60 mm プラスチック皿において平板培養した。長期無血清培養培地は、公表されたように補充したウィリアムズ E (Williams' E) からなる (Lanford R. et al. In Vitro Cell Dev. Biol. 25: 174-182 (1989))。つづいで、その培地を 48 時間ごとに取り替えた。培養物は、空気および 5% 二酸化炭素からなる湿潤雰囲気下において 37 °C で維持した。それらの培養条件において、ヒト肝細胞は、少なくとも 35 日間、その分化した表現型を保ち (Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107: 31-45 (1997))、HCV 感染に感受性であり、ウイルスゲノム複製に対して許容的である (Fournier C. et al. J. Gen Virol. 79: 2367-2374 (1998))。

10

20

30

40

50

【0102】

HCV 陽性血清試料: EIA HCV 3.0 およびケイロン (Chiron) RIBA HCV 3.0 SIA により抗 HCV 抗体陽性を検査された患者由来のヒト血清バンクが設立された。それらの患者の誰もが、HBV または HIV に共感染していなかった。各血清試料において、HCV RNA は、ロッシュ モニター (the Roche monitor) により定量され、ラインプローブ検定 (line probe assay) により遺伝子型を決定された (イノ-リパ HCV II (Inno-Lipa HCV II)、イノジェネティクス社 (Innogenetics) 製)。凍結-解凍サイクルを避けるために、少量のアリコートで血清試料を -80 °C で保存した。それらの実験において、試料 S42 (遺伝子型 Ib; ウイルス負荷: 410000 コピー/ml) を使用した。

【0103】

感染およびつぎの処理のために、肝細胞培養物は、滅菌条件で P3 研究室 (ヒト感染性微生物に対する高度な締め出し) に移された。平板培養の 3 日後、単離の傷害から細胞が回復したとき、3 ml 培地中に存在する HCV 陽性血清試料 (S42) の 25 µl とともに一晩インキュベーションすることにより、肝細胞のインビトロ感染を実施した。感染後、3 ml の新鮮な培地で細胞を 3 回洗い、そして長期培養培地における正常な条件下で培養を続けた。

【0104】

細胞を、r-hsLDLR に対する 3 つの異なる Mab (Mab 12.6、Mab 28、Mab 29.8) で処理した。感染の 30 分前に、細胞を 2 または 8 µg/ml の異なる Mab に曝した。ついで、細胞を前記のように感染させた。

【0105】

コントロール培養物は、同様の条件下であるが抗ウイルス処理をせずに、感染させた。並行実験において、比較のために同じ条件下で、同じ培養物を 5000 U/ml IFN で処理した (IFN は細胞における HCV 複製を強く阻害する)。すべての処理は 2 組で実施した。

【0106】

感染後 5 日で、培地を除去し、そして冷たいリン酸緩衝化食塩水を用いて培養物を 3 回洗った。グアニジニウムイソチオシアネート-酸性フェノール抽出手順を用い、 4×10^6 肝細胞から RNA を精製した (Chomczynski PN. And Sacchi N. Analyt. Biochem. 162: 156-159 (1987))。沈殿した RNA をジエチルピロカルボネート (DEPC) 処理された水 50 µl に溶かし、定量した。1 µg の細胞 RNA を、鎖特異的 rTth RT-PCR 検定において解析した。

【0107】

感染の可能性を避けるために、鎖特異的RT-PCR検定は、つづいて3つの異なる部屋（前PCR室、PCR室および後PCR室）を用いて実施した。10 μ lのDEPC処理された水に溶かしたRNAをミネラルオイルで覆い、95 $^{\circ}$ Cで1分間加熱した。温度を70 $^{\circ}$ Cに下げ、予め加熱されたcDNA反応混合液10 μ lを添加した。ついでアニーリングのために温度を2分間60 $^{\circ}$ Cに下げ、そしてrTth DNAポリメラーゼ（パーキン-エルマー社（Perkin-Elmer）製）を用い、cDNA反応を20分間70 $^{\circ}$ Cで実施した。温度を70 $^{\circ}$ Cに維持し、同時に、rTth RT活性を抑制するために、Mn²⁺のキレート剤としてEGTAを含有する予め温められた緩衝液40 μ lを添加した。反応チューブを70 $^{\circ}$ Cに維持し、同時に、予め温められたPCR混合液40 μ lを添加した。Gene Amp（登録商標）PCRシステム9600（パーキン-エルマー社製）において実施されたPCR条件は、94 $^{\circ}$ C 1分間の開始サイクル、94 $^{\circ}$ C 15秒間、58 $^{\circ}$ C 30秒間および72 $^{\circ}$ C 30秒間からなる50サイクル、および72 $^{\circ}$ C 7分間の最終伸長工程からなる。プラス鎖HCV RNA検定のために、リバースプライマーP3のヌクレオチド配列は、5'-TGG/ATGCACGGTCTACGAGACCTC-3'（nt342~320）であり、そしてフォワードプライマーP4のヌクレオチド配列は、5'-CACTCCCCTGTGAGGAACT-3'（nt:38~56）である（Laskus T. et al. J. Gen. Virol. 78: 2747-2750（1997））。マイナス鎖を検出するために、同じプライマーを逆の順序で使用した。アガロース（2%）上でのゲル電気泳動法によって増幅産物の10分の1を解析し、ついでBETで着色し、UV光のもとで写真撮影を行った。すべての一連の実験において、合成HCV RNA（+）および（-）鎖の希釈を行い、培養された肝細胞の解析のための条件に似せるために、1 μ gの全肝臓RNAを添加した。それらの混合液は、RT-PCR検定および解析のための陽性コントロールとして使用した。

【0108】

図3は、LDLRに対するMabの存在下では、HCVマイナス鎖の産生が培養FT167において完全に阻害されることを示す。したがって、ウイルスゲノムの複製は強く阻害された。その結果は、LDLRがHCVに対する受容体であり得るという見解に一致した。

【0109】

実施例11 LDLRに対するキメラ抗体の産生
mRNAは、LDLR特異的mAbを産生するハイブリドーマ株から精製した。

【0110】

重鎖可変ドメイン由来のエクソンCH1の5'末端に対する相補オリゴヌクレオチド（oligo 1）および軽鎖可変ドメインのC_Hエクソンの5'に対する相補オリゴヌクレオチド（oligo 2）を用い、精製したmRNAを鋳型として用いて、特異的なcDNAを合成した。

【0111】

2つのcDNAが得られ、そのうちの1つは重鎖の可変領域（LDLR特異的）をコードし、他方は軽鎖の可変領域（LDLR特異的）をコードする。cDNAをクローン化して配列決定する。

【0112】

キメラ重鎖の構築のために、クローン化したヒトIg重鎖遺伝子の可変領域を、マウスの重鎖可変ドメイン（LDLR特異的）をコードするクローン化DNAに交換する（遺伝子操作を用いる）。遺伝子操作は、特異的な制限酵素を用いるヒトIgからの可変領域の除去、およびマウス可変領域のライゲーションを含む。キメラ軽鎖を得るために、同じ手順を実施した。

【0113】

2つの哺乳動物発現プラスミドを構築する。1つはキメラ重鎖遺伝子を含み、他方はキメラ軽鎖遺伝子を含む。両ベクターは、ハイブリドーマ細胞株（SP6）を共トランスフェ

クシオンするために使用した。

【0114】

L D L R 特異的 I g の産生は、トランスフェクションした細胞の培養上清を第 2 抗体として用いる E L I S A またはウェスタンブロットにより試験される。リガンドに対するキメラ抗体の親和性は、ピアコア (B i a c o r e) によって記録された。

【0115】

実施例 1 2 ヒト免疫グロブリン遺伝子座 (ゼノマウス) を有するように処理されたトランスジェニックマウスの作製および h L D L R に対するヒト m A b の製造

ゼノマウス作製は、W O 9 8 / 2 4 8 9 3 および M e n d e z M , J . e t a l N a t u r e g e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 5 6 (1 9 9 7) に記載されている。

10

【0116】

ヒト重鎖可変領域 (約 1 0 0 0 k b) を含有する Y A C について、ヒト - 酵母人工染色体 (Y A C) ライブラリーをスクリーニングする (Y A C クローニング方法は、1 0 0 k b より大きい挿入サイズが必要とされる場合の選択方法である)。

【0117】

それらの Y A C は、サザンブロット解析およびパルスフィールド電気泳動法 (P F G E) により特徴づけられる。Y A C は生殖系列立体配置 (g e r m l i n e c o n f i g u r a t i o n) において C μ 、C、D h および V h 領域を含むべきである。

【0118】

Y A C に含有されるオーバーラップ配列を利用し、段階的な組換え計画によって、酵母で Y A C の組換えを行った。組換えを行う前に、Y A C (V 領域を有する) の 3 末端を H P R T 選択マーカに結合した。組換えられた Y A C の構造は、P F G E およびサザンブロット解析により確認した (生殖系列立体配置における C 領域から V h 領域までのヒト重鎖遺伝子座の存在)。

20

【0119】

完全な 2 定常領域、マウスのエンハンサー、ネオマイシン耐性遺伝子を有するベクターを用いることにより Y A C 無動原体アームをターゲティングし、完全な可変領域を含有する最終的な重鎖 (すなわち、8 2 の V h 遺伝子、6 の J h 遺伝子および 3 つの異なる定常領域 C μ 、C、C ならびにそれらに対応する調節配列) をもたらした。この Y A C を y H 2 と命名した。この構築をゼノマウスの産出用に使用した。

30

【0120】

全カップ遺伝子座を含有する再構築 Y A C にネオマイシン選択マーカを結合したことを除き、前記で使用したものと同様の計画をカップ遺伝子座の再構築に利用した。この Y A C を y K 2 と命名した。

【0121】

Y A C 含有酵母スフェロプラストと H P R T 欠損 E 1 4 . T G 3 B マウス E S 細胞との融合により、y H 2 を含有する Y A C を E S 細胞に導入する。H P R T 陽性細胞を選択する。陽性クローンを増殖させ、そしてサザンブロットおよび C H E F ブロット解析によって解析する。完全な y H 2 Y A C を含有するクローンを選択する。

【0122】

E S 細胞における y K 2 Y A C の導入および選択は、y H 2 Y A C についての記載と同様に実施した。

40

【0123】

Y H 2 含有 E S 細胞をマウス C 5 7 B L / 6 J プラストサイトに微量注入する。作製されたキメラの雄は、子孫への生殖系遺伝に対して評価される。

【0124】

y H 2 およびまたは y K 2 トランスジェニックマウスは D I マウスと交配される (遺伝子ターゲティングされ不活性化されたマウスの重鎖遺伝子座およびカップ鎖遺伝子座に対してホモ接合型)。y H 2 ; D I トランスジェニック株を y K 2 ; D I トランスジェニック株と交配させ、ゼノマウス株を作製した。

50

【0125】

ゼノマウスにおけるB細胞発生の再構成および抗体産生は、フローサイトメトリーおよびELISAによって評価される。

【0126】

ゼノマウスの免疫化は実施例2記載のように実施される。

【0127】

ハイブリドーマ調製および陽性クローンのスクリーニング方法は、実施例3および4記載の方法と同様である。

【0128】

ハイブリドーマクローン12.6、28、29.8、30および50.30は、ブダペスト条約にしたがって、ザコレクションナショナルデカルチャーデマイクロオーガニズムズ(the Collection Nationale de Culture de Microorganismes)(CNCM)、パスツール研究所、パリ、に寄託し、それぞれ寄託番号I-2390、I-2391、I-2392、I-2393およびI-2394を与えられた。

【0129】

[参考文献]

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In Process Citation]." Proc Natl Acad Sci U S A, 96(22), 12766-71.

Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). "Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia." J Biol Chem, 256(22), 11923-31.

Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly, N. L., Smith, R., and Kroon, P. A. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain." Biochemistry, 34(40), 13059-65.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1976). "Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor." N Engl J Med, 294(25), 1386-90.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." Science, 232(4746), 34-47.

Chomczynski, P. N., and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Analyt. Biochem. 162:156-9.

Eshhar Z, 1985 "Monoclonal Antibody Strategy and Techniques" in "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", Edited by

- Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985; Chapter 1)
- Fischer. D. G., Tal. N., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (1993). "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon". *Science*, 262(5131), 250-3.
- Fischer. D. G., Novick, D., Cohen, B, Rubinstein, M. (1994). "Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein" 10
. *Proc Soc Exp Biol Med* 206(3), 228-32.
- Ferrini. J.B., Pichard, L., Domergue, J., and Maurel, P. (1997). "Long-term primary cultures of adult human hepatocytes". *Chem-Biol Interactions* 107:31-45.
- Fournier. C., Sureau. C., Coste. J., Ducos, J., Pageaux G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998). "In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus" 20
. *J. Gen Virol* 79:2367-74.
- Goldstein, J. L., Anderson. R. G., and Brown, M. S. (1979). "Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis." *Nature*, 279(5715), 679-85.
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). "Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor." 30
Proc Natl Acad Sci U S A, 72(3), 1092-6.
- Lanford R. E., Carey, K. D., Estlack, L.E., Smith, G. C., and Hay, R. V. (1989) "Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of baboon hepatocytes maintained in serum-free medium" *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:174-82.
- Laskus T., Radkowski, M., Wang, L. F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997) 40
) . "Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication". *J. Gen. Virol.* 78 : 2747-50.
- Maurel P. (1996) "The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man". *Adv. Drug Del. Rev.* 22 : 105-132 50

- Mendez, M. M., Green, L. L., Corvalan, J. R. F., Jia X-C., Maynard-Currie, E. E., Yang, X-D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. M., Fukushima, A., Hales, J. F., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M. and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 15, 146-56. 10
- Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes". *Mol. Pharmacol.* 41:1047-55.
- Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature*, 332, 323-27. 20
- Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985). "The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins." *Science*, 228(4701), 815-22.
- Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220. 30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、r-hsLDLR に対するモノクローナル抗体の開発を表すフローチャートを示す図である。

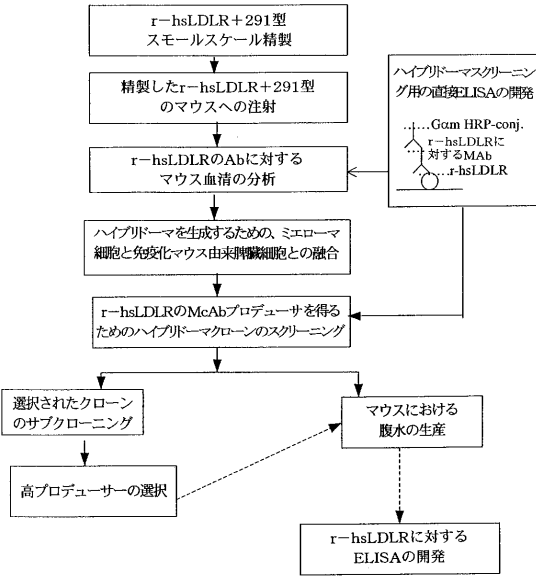
【図 2】

図 2 は、レーン 1 に r-hsLDLR の +291 型、レーン 2 に尿 hsLDLR および陰性コントロールとしてのレーン 3 に組換え体ヒト p55TNF 受容体 (r-hTBP-1) の、各細片の下方に示すモノクローナル抗体を用いるウェスタンブロット解析を示す図である。図面左の矢印は分子量マーカーの位置を示し、図面右の矢印は、各矢印の上に表示される hsLDLR 型の位置を示す。 40

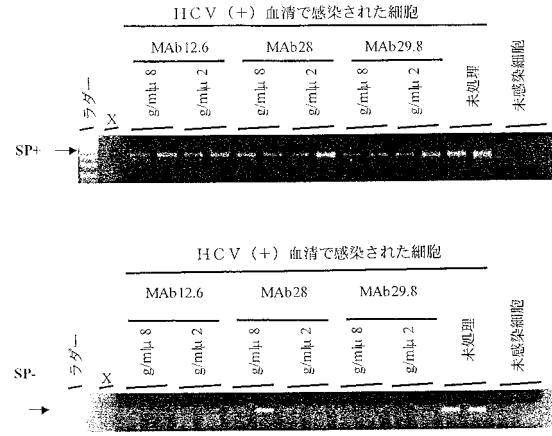
【図 3】

図 3 は、培養 FT167 における HCV (+) 鎖および (-) 鎖の産生に対する Mab 12.6、28 および 29.8 の効果を示す図である。細胞は、感染 30 分前に Mab 抗 LDLR (8 または 2 μg/ml) により処理された。ついで、細胞は 25 μl の HCV (+) 血清 (N°42; 1b) で一晚感染させた。感染の翌日、3 回の洗いを実施し、そして 48 時間ごとに新しい培地を添加して交換した。感染 5 日後に肝細胞を採取し、RNA を精製し、そして 1 μg の細胞の RNA を rTth RT-PCR (パーキン エルマー社製) により解析した。検定は 2 回実施した。+SP: プラス鎖 RNA 検定; -SP: マイナス鎖 RNA 検定; X: ブランク

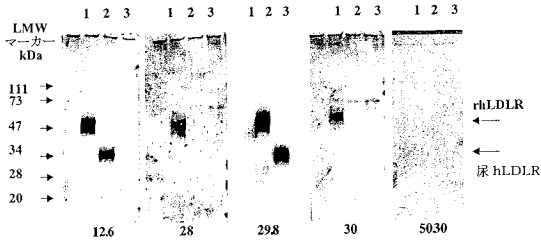
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/68710 A1

- (51) International Patent Classification: **C07K 16/28**, G01N 33/577, 33/68, C12N 5/20
- (52) International Application Number: PCT/IL01/00216
- (22) International Filing Date: 8 March 2001 (08.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
135925 13 March 2000 (13.03.2000) IL
139217 23 October 2000 (23.10.2000) IL
- (71) Applicant (for all designated States except US): **APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.** [NL/NL]; Pietermaai 1 S, Curacao (AN).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **YONAH, Nachum** [IL/IL]; Remez Street 6, 70700 Gedera (IL). **SUISSA, Dany** [IL/IL]; Moskowitz Street 28, 76468 Rehovot (IL). **BELZER, Itana** [IL/IL]; Harashba Street 10, 75483 Risbon Le-Zion (IL).
- (74) Agent: **EJNAV, Henry**; Inter-Lab Ltd., Science-based Industrial Park, Kiryat Weizmann, 76110 Ness-Ziona (IL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 01/68710 A1

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE HUMAN LDL RECEPTOR, THEIR PRODUCTION AND USE

(57) Abstract: There are provided monoclonal antibodies to the human LDL receptor which are useful for the identification and purification of LDL and in treatment of e.g. hepatitis C infection.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

1

MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE HUMAN LDL RECEPTOR, THEIR PRODUCTION AND USE

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to monoclonal antibodies which specifically recognise the human receptor for low-density lipoproteins (LDLR). These antibodies are useful e.g. for the identification and purification of human soluble LDLR (hsLDLR) in production processes as well as in the identification and treatment of diseases such as, hepatitis C infection (HCV).

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Cholesterol, a component of all eukaryotic plasma membranes, is essential for the growth and viability of cells in higher organisms. However, high serum levels of cholesterol cause disease and death by contributing to the formation of atherosclerotic plaques in arteries throughout the body. The major site of cholesterol synthesis in mammals is the liver. Appreciable amounts of
15 cholesterol are also formed by the intestine. The rate of cholesterol formation by these organs is highly responsive to the amount of cholesterol absorbed from dietary sources. Cells outside of the liver and intestine acquire cholesterol from the plasma rather than by synthesising it *de novo*. Cholesterol and other lipids are transported in body fluids by lipoproteins, which are classified according to
20 increasing density. A lipoprotein is a particle consisting of a core of hydrophobic lipids surrounded by a shell of polar lipids and apoproteins. These lipoproteins have two roles: they solubilize highly hydrophobic lipids and they contain signals that regulate the movement of particular lipids in and out of specific target cells and tissues. Cholesterol is transported in body fluids by low-density lipoproteins
25 (LDL) which binds to a specific receptor on the plasma membrane of non hepatic cells. The receptor-LDL complex is then internalised into the cells by a transport mechanism known as receptor mediated endocytosis (Goldstein et al. 1979). The low density lipoprotein (LDL) receptor is the prototype of a family of structurally

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

2

related cell surface receptors that mediate endocytosis of multiple ligands in mammalian cells.

The LDL receptor consists of 822 amino acid residues and exhibits a molecular weight of 164000. It is composed of several domains some of which share sequence homology with other proteins. Its NH₂-terminal ligand-binding domain consists of 292 residues, arranged in 7 cysteine-rich imperfect repeats. Each repeat contains six cysteine residues which are disulphide bonded in the pattern one to three, two to five, and four to six. (Bieri et al. 1995). This domain is followed by four additional domains: the first consists of 400 amino acid residues and is homologous to the EGF receptor, the second consists of 58 amino acid residues rich in O-linked sugars, the third is a single trans-membrane domain of 22 amino acid residues and the fourth is a cytoplasmic domain of 50 amino acid residues (Sudhof et al. 1985), (Brown et al. 1986).

The physiologic importance of the LDL receptor was revealed by Brown and Goldstein's studies on familial hypercholesterolemia (FH). The disease was found to be due to a molecular genetic defect resulting in the absence or deficiency of functional receptors for LDL (Brown et al. 1976). Several classes of FH mutations have been characterised. (Goldstein et al. 1975).

A soluble form of the sLDLR exhibiting antiviral activity was identified and isolated from the culture supernatant of interferon-induced cells (Fischer et al. 1993) and in body fluids (Fischer et al. 1994). Several interferon-induced proteins have been identified that are instrumental in the induction of the antiviral state by IFNs. One such protein exhibiting antiviral activity was produced and accumulated in the culture supernatant of human amnion WISH cells. This protein was purified to homogeneity and identified as the sLDLR (see EP 0 553 667 and Fischer et al. 1993). The sLDLR was found to be secreted into the medium by mammalian cells that enter an antiviral state in response to interferon. In contrast to interferon, sLDLR does not induce an antiviral state in the cells but is antiviral by itself. It was found that sLDLR apparently has to be present throughout the process of viral replication maturation and budding suggesting it might be involved in a complex process that leads to the inhibition of virus assembly or budding (unpublished data). Endocytosis of the hepatitis C virus has been

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

3

recently shown to be mediated by LDL receptors on cultured cells (Agnello et al. 1999). These and other findings suggest that the family of LDL receptors may serve as viral receptors. Therefore, antibodies raised against the sLDLR receptor may block the entry and budding of viral particles by binding to the cellular LDL receptor.

The only available monoclonal antibody to LDLR known so far is C7, an antibody to bovine LDLR (Beisiegel et al. 1981, commercially available from Amersham, UK) which was prepared by immunization of mice with the bovine adrenal cortex LDLR purified to homogeneity. Membranes from the bovine adrenal cortex were solubilized and the receptor was partially purified by elution from a DEAE-cellulose column (Beisiegel et al. 1981). The antibody to the bovine LDLR only weakly cross-reacts with human LDLR.

In fact, the C7 Mab to bovine LDLR was found to have significant disadvantages when used for detection and quantitation of recombinant human LDLR:

- a) It has very low affinity to the human LDLR
- b) It significantly cross reacts with cell culture derived impurities

Specific antibodies to human LDLR were not previously available. This appears surprising since it is very common to raise antibodies against novel proteins, be it for purification, identification or for assay development purposes. It is possible that such antibodies have not been generated so far, since a condition for generating monoclonal antibodies is the availability of sufficiently large amounts of highly purified antigen which allow efficient immunization of mice. A highly purified antigen is one which appears as a single major peak in RP-HPLC. Furthermore methods for identification and quantitation of the antigen during purification processes were not easy to establish. In accordance with the invention, the antiviral activity assay described herein was employed for the identification of LDLR during purification processes.

There exists a need to generate specific Mabs to human soluble LDLR to provide the means for developing an efficient immunoassay (ELISA) and for the identification of the protein in Western blot. These antibodies are required for the

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

4

monitoring and quantitation of the recombinant human soluble LDLR during development of the production and purification processes of the recombinant protein and for detection of the natural protein.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention allows the generation of hybridoma cells lines producing monoclonal antibodies capable of specifically recognising and binding the human LDL receptor and fragments thereof.

10 More specifically the present invention allows the generation of hybridoma cells lines producing monoclonal antibodies capable of specifically recognising and binding the human soluble LDL receptor.

15 Thus the present invention relates to a monoclonal antibody, chimeric antibody, humanized antibody, anti-anti-Id antibody or fragment thereof which specifically recognises and binds the human LDL receptor and fragments thereof, except monoclonal antibody C7.

The present invention provides such monoclonal antibodies that recognise and bind the human soluble LDLR and meet the following needs:

1. Mabs that can be used as a pair in an ELISA, e.g. a sandwich ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) for detection of human soluble LDLR.
- 20 2. Mabs that can be used for identification of the LDLR in Western Blot analysis.
3. Mabs that can be used to neutralise the antiviral biological activity of the human soluble LDLR.
- 25 4. Mabs that can be used to inhibit virus infection, such as HCV.

The present invention further provides a method for the detection and/or the quantitation of human LDLR which comprises the use of the specific

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

5

monoclonal antibodies according to the invention in a known manner for that purpose.

The present invention also provides cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with recombinant human LDLR and a homogenic
5 or heterogenic lymphoid cell.

A monoclonal antibody according to the invention is prepared in a conventional manner, e.g. by growing a cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with hsLDL and a homogenic or heterogenic lymphoid cell in liquid medium or mammalian abdomen to allow the hybridoma
10 to produce and accumulate the monoclonal antibody.

The invention, in yet another aspect, provides a method for purifying the human LDLR which comprises contacting a material containing crude LDLR with a monoclonal antibody according to the invention. A column with adsorbed LDLR specific monoclonal antibody may be used as an affinity purification step,
15 in the purification process of the recombinant protein.

A method for detecting and measuring recombinant human LDLR which comprises using as antibody the monoclonal antibodies of the present invention in an ELISA assay as described in example 5.

As the LDLR or fragment of a LDLR for immunizing animals any LDLR
20 can be used as long as it is the LDLR of a warm-blooded mammal. A mutein of LDLR can be also used. A representative example of such a mammalian human soluble LDLR is the soluble LDLR +291 form which includes the amino acid sequence beginning at amino acid Asp at position +4 and ending with amino acid Glu at position +291 of the sequence of the human LDLR, any other form may be
25 used as well, such as the +292 form etc.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure I shows a flow chart depicting the development of monoclonal antibodies to r-hsLDLR.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

6

Figure 2 shows a Western blot analysis of the +291 form of r-hsLDLR in lane 1, the urinary hsLDLR in lane 2 and recombinant human p55 TNF receptor as a negative control (r-hTBP-1) in lane 3, with the monoclonal antibodies indicated beneath each strip. The arrows to the left of the figure indicate the position of the molecular weight markers and the arrows to the right of the figure point to the position of the hsLDLR form indicated above each arrow.

Figure 3 shows the effects of Mabs 12.6, 28 and 29.8 on the production of HCV(+) and (-) strands in culture FT167. Cells were treated 30 minutes before infection with MAb anti-LDLR (8 or 2 µg/ml). Then, cells were infected overnight with 25 µl of HCV(+) serum (N° 42;1b). The day after infection, three washes were performed and new medium was added and changed every 48 hours. Five days after infection, the hepatocytes were harvested, RNA was purified and 1 µg cellular RNA was analyzed by rTth RT-PCR (Perkin Elmer). Assays were performed in duplicate.

+ SP : positive-strand RNA assay; - SP : negative-strand RNA assay; X : blank.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Monoclonal antibodies (Mabs) to human soluble LDLR (hsLDLR) were generated. Using these monoclonal antibodies, an ELISA and a Western blotting procedure for the identification of hsLDLR and a neutralising assay to the antiviral activity of hsLDLR were developed.

The Mabs were generated in mice, immunized with the recombinant +291 form of hsLDLR, which consists of the N-terminal ligand binding domain of the human soluble LDLR, from Asp +4 to Glu +291. The recombinant +291 form of hsLDLR, was produced in CHO cells and purified to homogeneity.

The immunized mice produced significant titres of specific antibodies. After screening of hybridomas, five clones (numbers 12, 28, 29, 30 and 50) were identified as the highest antibody producers. These clones were selected for further subcloning. After subcloning, 29 subclones which had high antibody

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

7

productivity were isolated and ampoules from the parent clones and from the subclones were frozen.

A pair of monoclonal antibodies was chosen for the ELISA to the r-hsLDLR. Mab 28 was selected as the coating antibody, and Mab 29.8, labelled
5 with biotin, was chosen as the second antibody. Mabs 12.6 and 29.8 were found to be suitable for the identification of the native and recombinant hsLDLR in Western blot analysis and Mabs 28 and 30 were found to be suitable for the identification of the recombinant hsLDLR in Western blot analysis. Mabs 12.6 and 50.30 were found to be suitable for inhibiting the antiviral activity of
10 hsLDLR.

It was also found in accordance with the invention that Mabs 12.6, 28 and 29.8 inhibit replication of the viral genome of hepatitis C virus (HCV) in human hepatocytes primary cultures. Thus, these antibodies may be used for the treatment of hepatitis C infection (Figure 3).

15 The subclass isotype of the Mab produced by the clones was determined. Clones 12.6, 28, 29.8 and 30 were identified as IgG₁ whereas clone 50.30 was found to be IgM.

The Mabs, developed against the +291 form of the hsLDLR recognised also other forms of the hsLDLR, i.e. the +292 form and the +331 form of the r-hsLDLR produced in recombinant CHO cells, in ELISA and in Western blot
20 analysis. The +292 form comprises the N-terminus part of the receptor from amino acid residue Asp +4 to Cys +292 and the +331 form comprises the N-terminus part of the receptor from amino acid residue Asp +4 to Cys +331.

The antigen used to immunize mice for
25 generating monoclonal antibodies was the r-hsLDLR +291 form, which was produced in CHO cells. Production of the r-hsLDLR was performed in bioreactors, using the stationary phase Fibracel matrix system. The r-hsLDLR was purified to homogeneity and used for immunizing mice.

30 Immune spleen cells from the best mouse responder were used for fusion and generation of hybridomas.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

8

As regards the antibodies mentioned herein throughout, the term "monoclonal antibody" is meant to include monoclonal antibodies, chimeric antibodies, fully humanized antibodies, antibodies to anti-idiotypic antibodies (anti-anti-Id antibody) that can be labeled in soluble or bound form, as well as fragments thereof provided by any known technique, such as, but not limited to enzymatic cleavage, peptide synthesis or recombinant techniques.

A monoclonal antibody contains a substantially homogeneous population of antibodies specific to antigens, which population contains substantially similar epitope binding sites. Mabs may be obtained by methods known to those skilled in the art. See, for example Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane *ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); and Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., (1992-1996), the contents of which references are incorporated entirely herein by reference. Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, GILD and any subclass thereof. A hybridoma producing a mAb of the present invention may be cultivated *in vitro*, *in situ* or *in vivo*. Production of high titers of Mabs *in vivo* or *in situ* makes this the presently preferred method of production.

Chimeric antibodies are molecules of which different portions are derived from different animal species, such as those having the variable region derived from a murine Mab and a human immunoglobulin constant region. Chimeric antibodies are primarily used to reduce immunogenicity in application and to increase yields in production, for example, where murine Mabs have higher yields from hybridomas but higher immunogenicity in humans, such that human/murine chimeric Mabs are used. Chimeric antibodies and methods for their production are known in the art (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly et al., European Patent Application 125023 (published November 14, 1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496 (published February 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494 (published March 5, 1986); Neuberger et al., PCT

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

9

Application WO 8601533, (published March 13, 1986); Kudo et al., European Patent Application 184187 (published June 11, 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., International Patent Application No. WO8702671 (published May 7, 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:214-218 (1987); Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327. and Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra. These references are entirely incorporated herein by reference.

“Fully humanized antibodies” are molecules containing both the variable and constant region of the human immunoglobulin. Fully humanized antibodies can be potentially used for therapeutic use, where repeated treatments are required for chronic and relapsing diseases such as autoimmune diseases. One method for the preparation of fully human antibodies consist of “humanization” of the mouse humoral immune system, i.e. production of mouse strains able to produce human Ig (Xenomice), by the introduction of human immunoglobulin (Ig) loci into mice in which the endogenous Ig genes have been inactivated. The Ig loci are exceedingly complex in terms of both their physical structure and the gene rearrangement and expression processes required to ultimately produce a broad immune response. Antibody diversity is primarily generated by combinatorial rearrangement between different V, D, and J genes present in the Ig loci. These loci also contain the interspersed regulatory elements, which control antibody expression, allelic exclusion, class switching and affinity maturation. Introduction of unrearranged human Ig transgenes into mice has demonstrated that the mouse recombination machinery is compatible with human genes. Furthermore, hybridomas secreting antigen specific hu-mAbs of various isotypes can be obtained by Xenomice immunisation with antigen.

Fully humanized antibodies and methods for their production are known in the art (Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997); Buggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326 (1991); Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000) Patent WO 98/24893.

An anti-idiotypic (anti-Id) antibody is an antibody which recognizes unique determinants generally associated with the antigen-binding site of an antibody. An Id antibody can be prepared by immunizing an animal of the same

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

10

species and genetic type (e.g. mouse strain) as the source of the Mab to which an anti-Id is being prepared. The immunized animal will recognize and respond to the idiotypic determinants of the immunizing antibody by producing an antibody to these idiotypic determinants (the anti-Id antibody). See, for example, U.S. Patent No. 4,699,880, which is herein entirely incorporated by reference.

5 The anti-Id antibody may also be used as an "immunogen" to induce an immune response in yet another animal, producing a so-called anti-anti-Id antibody. The anti-anti-Id may be epitopically identical to the original Mab, which induced the anti-Id. Thus, by using antibodies to the idiotypic determinants of a Mab, it is possible to identify other clones expressing antibodies of identical specificity.

10 Accordingly, Mabs generated against LDLR, its isoforms, analogs, fragments or derivatives of the present invention may be used to induce anti-Id antibodies in suitable animals, such as BALB/c mice. Spleen cells from such immunized mice are used to produce anti-Id hybridomas secreting anti-Id Mabs. Further, the anti-Id Mabs can be coupled to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize additional BALB/c mice. Sera from these mice will contain anti-anti-Id antibodies that have the binding properties of the original Mab specific for an epitope of the above LDLR protein, or analogs,

20 fragments and derivatives thereof.

The anti-Id Mabs thus have their own idiotypic epitopes, or "idiotopes" structurally similar to the epitope being evaluated. The term "monoclonal antibody" is also meant to include both intact molecules as well as fragments thereof, such as, for example, Fab and F(ab')₂, which are capable of binding antigen. Fab and F(ab')₂ fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)).

25 It will be appreciated that Fab and F(ab')₂ and other fragments of the antibodies useful in the present invention may be used for the detection and quantitation of the LDLR protein according to the methods disclosed herein for intact antibody molecules. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments).

30

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

11

A monoclonal antibody is said to be "capable of binding" a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody. The term "epitope" is meant to refer to that portion of any molecule capable of being bound by an antibody, which can also be recognized
5 by that antibody. Epitopes or "antigenic determinants" usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and have specific three dimensional structural characteristics as well as specific charge characteristics.

An "antigen" is a molecule or a portion of a molecule capable of being
10 bound by an antibody, which antigen is additionally capable of inducing an animal to produce antibody capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more than one epitope. The specific reaction referred to above is meant to indicate that the antigen will react, in a highly selective manner, with an epitope on its corresponding antibody and not with the multitude
15 of other antibodies which may be evoked by other antigens.

The antibodies, including fragments of antibodies, useful in the present invention may be used to quantitatively or qualitatively detect the LDLR proteins in a sample or to detect presence of cells that express the LDLR proteins of the present invention. This can be accomplished by immunofluorescence techniques
20 employing a fluorescently labeled antibody (see below) coupled with fluorescence microscopy, flow cytometric, or fluorometric detection.

The antibodies (or fragments thereof) useful in the present invention may be employed histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for *in situ* detection of the LDLR proteins of the present invention.
25 *In situ* detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and providing the labeled antibody of the present invention to such a specimen. The antibody (or fragment) is preferably provided by applying or by overlaying the labeled antibody (or fragment) to a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of
30 the LDLR proteins but also its distribution on the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve such *in situ* detection.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

12

Such assays for the LDLR proteins of the present invention typically comprises incubating a biological sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells such as lymphocytes or leukocytes, or cells which have been incubated in tissue culture, in the presence of a labeled antibody capable of identifying the LDLR proteins, and detecting the antibody by any of a number of techniques well known in the art.

The biological sample may be coupled to a solid phase support or carrier such as nitrocellulose, or other solid support or carrier which is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support or carrier may then be washed with suitable buffers followed by treatment with a labeled antibody in accordance with the present invention, as noted above. The solid phase support or carrier may then be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody. The amount of bound label on said solid support or carrier may then be detected by conventional means.

By "solid phase support", "solid phase carrier", "solid support", "solid carrier", "support" or "carrier" is intended any support or carrier capable of binding antigen or antibodies. Well-known supports or carriers, include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon amyloses, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support or carrier configuration may be spherical, as in a bead, cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports or carriers include polystyrene beads. Those skilled in the art will know may other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of antibody, of the invention as noted above, may be determined according to well-known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

13

Other such steps as washing, stirring, shaking, filtering and the like may be added to the assays as is customary or necessary for the particular situation.

One of the ways in which an antibody in accordance with the present invention can be labeled is by linking the same to an enzyme and used in an enzyme immunoassay (EIA). This enzyme, in turn, when later exposed to an appropriate substrate, will react with the substrate in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or by visual means. Enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomeras, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholin-esterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactive labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to detect R-PTPase through the use of a radioimmunoassay (RIA). A good description of RIA may be found in Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) with particular reference to the chapter entitled "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" by Chard, T., incorporated by reference herein. The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a g counter or a scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label an antibody in accordance with the present invention with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wavelength, its presence can be then detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

14

compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, pycocyanin, allophycocyanin, o-phthalaldehyde and fluorescamine.

5 The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as ^{152}E , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriamine pentaacetic acid (ETPA).

10 The antibody can also be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, thionin, acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

15 Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

20 An antibody molecule of the present invention may be adapted for utilization in an immunometric assay, also known as a "two-site" or "sandwich" assay. In a typical immunometric assay, a quantity of unlabeled antibody (or fragment of antibody) is bound to a solid support or carrier and a quantity of detectably labeled soluble antibody is added to permit detection and/or quantitation of the ternary complex formed between solid-phase antibody, 25 antigen, and labeled antibody.

Typical, and preferred, immunometric assays include "forward" assays in which the antibody bound to the solid phase is first contacted with the sample being tested to extract the antigen from the sample by formation of a binary solid phase antibody-antigen complex. After a suitable incubation period, the solid 30 support or carrier is washed to remove the residue of the fluid sample, including unreacted antigen, if any, and then contacted with the solution containing an unknown quantity of labeled antibody (which functions as a "reporter molecule"). After a second incubation period to permit the labeled antibody to complex with

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

15

the antigen bound to the solid support or carrier through the unlabeled antibody, the solid support or carrier is washed a second time to remove the unreacted labeled antibody.

In another type of "sandwich" assay, which may also be useful with the antigens of the present invention, the so-called "simultaneous" and "reverse" assays are used. A simultaneous assay involves a single incubation step as the antibody bound to the solid support or carrier and labeled antibody are both added to the sample being tested at the same time. After the incubation is completed, the solid support or carrier is washed to remove the residue of fluid sample and uncomplexed labeled antibody. The presence of labeled antibody associated with the solid support or carrier is then determined, as it would be in a conventional "forward" sandwich assay.

In the "reverse" assay, stepwise addition first of a solution of labeled antibody to the fluid sample followed by the addition of unlabeled antibody bound to a solid support or carrier after a suitable incubation period is utilized. After a second incubation, the solid phase is washed in conventional fashion to free it of the residue of the sample being tested and the solution of unreacted labeled antibody. The determination of labeled antibody associated with a solid support or carrier is then determined as in the "simultaneous" and "forward" assays.

The invention will be now illustrated by the following non-limiting examples.

25 EXAMPLES

Example 1 Preparation of CHO r-hsLDLR

Stable recombinant CHO cells expressing human soluble LDLR were generated by co-transfection of CHO-DUKX cells lacking the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (Urlaub, G. et al., 1980) with two expression vectors: psLDLR01 containing the N-terminal ligand-binding domain of the LDLR,

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

16

beginning at amino acid residue Asp (+ 4) up to Glu 291 (+291), and pDHFR, containing the murine gene for DHFR, both controlled by the promoter and transcription termination elements of the SV40 early region. Transfection was performed by cationic liposomes using LipofectAmine (Gibco BRL), according
5 to the protocol described by the manufacturer. Seventy-two hours after transfection cells were transferred to a selective medium lacking deoxy and ribonucleosides and supplemented with 10% dialysed FCS. Cells expressing DHFR activity were able to form colonies, which were isolated by lifting the cells with trypsin-soaked paper discs. The cells were grown and screened for r-hsLDLR
10 activity. The transfected cells were then subjected to gene amplification by MTX, followed by subcloning and selection of the stable producer clones.

r-hsLDLR (+291 form) was produced with cells of a stable CHO producer clone designated #33-10-29-21, in a 5 liter CeliGen bioreactor in serum free medium (Gibco CHO-A-SFM Cat. no. 95-0091DJ). The crude harvest was
15 clarified by filtration through a 0.8-02 μ cartridge filter (Gelman Cat. No. CSS92DSCCK) and concentrated 100 fold over a 5-kDa membrane. The +291 form of the r-hsLDLR used for the first immunizations, was purified using a small scale purification process. In this process a DEAE-Sepharose cation exchange column was used, followed by a hydrophobic interaction step on a
20 Butyl-TSK column followed by an HTP column and a size exclusion chromatography (SEC) step on a Sephacryl 100 column. Fraction #27 of the SEC, was chosen, as it contained a specific antiviral activity of 780 units/ μ g detected in the antiviral assay described in Example 9 below. The protein in this fraction was identified as r-hsLDLR by N-terminal analysis.

25 A second batch, of CHO +291 r-hsLDLR was purified and used for boost injections of the mice. It was purified using a refined process having an improved yield which included the following steps: a) clarification and concentration x100 of the crude harvest; b) a HQ POROS anion exchange column, and c) two hydrophobic interaction (HIC) steps: capture on a Butyl-TSK
30 column and flow through a Phenyl 5PW column. The unbound fraction from the last HIC step was dialysed and purified over an HS-POROS cation exchange column. The last step was a Hydroxyapatite (HTP) column. The r-hsLDLR

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

17

hence obtained was purified to about 90%, eluting as a single major peak in RP-HPLC.

Example 2 Immunization of mice

10 μg of the purified r-hsLDLR of fraction #27 of the SEC column of Example 1 above, at a concentration of 100 μg /ml, were homogenised with Complete Freund's Adjuvant (CFA, 50 % v/v) and injected into the footpad of each of five 7 week old Balb/C female mice.

Four weeks after the first immunization, the mice were boosted, intramuscular with 10 μg of the same fraction of purified r-hsLDLR, in a 50 % (v/v) solution of CFA.

Two weeks after the second injection the mice sera was tested for antibodies to r-hsLDLR, using the direct ELISA described in Example 3 below.

The two mice M-1 and M-2, with the most significant specific immunoreactivity with r-hsLDLR were further boosted, 10 weeks after the second injection, with 10 μg of the purified r-hsLDLR obtained in the refined purification process described in Example 1 above.

The mice were bled 14 weeks later and tested for antibodies to r-hsLDLR. They were then given two additional boosts of 50 μg r-hsLDLR in PBS: the first intraperitoneal and the second, two days later, both intraperitoneal and intravenous.

The mice were bled two weeks after the second injection and the antiserum was tested for anti-r-hsLDLR activity by the direct ELISA of Example 3 below. Each antiserum was serially diluted 1:100-1:32,000 and applied in duplicates to a 96 well plate coated with 10U/well of r-hsLDLR purified using the refined purification process described in above Example 1. Assay buffer and DMEM +10% HS containing PBS +1% BSA or Gelatin + 0.05% Tween 20 + 0.05% Thimerosal were used as blanks in the first well of each row. Normal Mouse Serum (NMS) was applied in the same dilution range in the last two rows

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

18

as negative controls. The absorbency of the enzymatic reaction was measured with an ELISA reader at 492 and 405 nm.

The results of this test indicated that sera from mouse M-1 had a higher specific immunoreactivity with r-hsLDLR and was therefore sacrificed and spleen cells were collected for fusion with myeloma cells (Eshhar Z, 1985).

Example 3 Direct ELISA for antisera testing and hybridoma clones screening

The direct ELISA for screening for positive antisera was performed as following: 96 wells plates were coated with 100 μ l of r-hsLDLR (purified by the refined purification process of example 1) 100 units/ml (10U/well) in PBS + 1% Gelatine (Sigma, Cat. No. G-7765) +0.9mM Ca^{+2} and 0.5mM Mg^{+2} , pH 5.6, hereinafter referred to as assay buffer, for 90 min. at 37°C with shaking. The plates were washed six times in PBS + 0.05% Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate- Sigma P-1379), hereinafter referred to as wash solution .

Anti serum samples from the immunized mice serially diluted 1:100-1:32,000, or supernatant from hybridoma cell cultures were added to the wells and incubated for 90 min. at 37°C, while shaking, followed by six washes in wash solution.

100 μ l of Horse Radish Peroxidase (HRP)-APA conjugated goat antibody to mouse Fab (Sigma- Cat. NO. 4601-1) diluted 1:1,200 were added to the wells and incubated for 90 min at 37°C, while shaking, and then washed six times with wash solution.

100 μ l of substrate solution (prepared by dissolving one tablet of OPD and one tablet of H_2O_2 in 20 ml water) were added to the wells and incubated at RT for 30 min. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 μ l /well of 4N HCl.

The absorbency in the 96 wells plates was read using an ELISA reader at 492 and 405 nm and the results were calculated using the four parametric logistic algorithm, by the MultiCalc software of the PC computer linked to the ELISA reader.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

19

**Example 4 Fusion, hybridoma preparation, selection of clones
and purification of antibodies from ascitis fluids**

The fusion process and hybridoma cell selection were performed according to the protocols in Eshhar Z, 1985. Briefly, spleen cells from mouse
5 M-1, boosted 2-4 days before fusion, were fused with myeloma cells by a short incubation with PEG. The PEG was first slowly diluted with DMEM and then completely removed by centrifugation. The cells were re-suspended in DMEM-HAT medium, distributed in 96 wells plates at a concentration of about 3.4×10^4
10 cells/well and incubated for 10-14 days in an 8% CO₂ incubator at 37 °C. The medium in all the hybridoma wells was changed to DMEM supplemented with 10% Horse Serum (HS) within 10 days. Hybridoma culture supernatant samples were screened for the presence of Mabs to r-hsLDLR by the direct ELISA described in Example 3 above. Assay buffer and DMEM+10% HS were used as blanks. Mab C7 (commercially available from Amersham) and M-1 mouse
15 antiserum were used as positive controls, while a monoclonal antibody to the soluble p55 TNF receptor was used as a negative control. Cells from wells, in which the presence of antibodies was detected in the culture supernatant, were transferred to 24 well plates and then to 25 cm² T-flasks. The expanded cultures were monitored for secretion of Mabs to r-hsLDLR. Ampoules of cells from
20 positive cultures were frozen and stored in liquid nitrogen.

A total of approximately 1000 cultures were screened for detecting antibodies to r-hsLDLR. 54 cultures with the highest immuno-activity were re-tested several times. Five cultures (12, 28, 29, 30 and 50) with the highest activity were cloned by limiting dilution in 96 well plates. Supernatants from the
25 growing clones were tested several times for antibodies to r-hsLDLR, by the direct ELISA.

Cells of positive hybridoma clones were grown in tissue culture flasks in DMEM containing 15% horse serum and ampoules were frozen from part of the cultures. In parallel, cells of different hybridoma clones were injected, to 2-4
30 mice each, to obtain ascitis fluids. Antibodies were purified from ascitis fluid either by ammonium sulphate precipitation or on a protein G column. Briefly 7.5 ml of ascitis fluid were diluted 1:3 in 20 mM Phosphate buffer pH 7 and loaded

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

20

onto a 5 ml Protein G column (C10/10). The column was washed with 20 mM Phosphate buffer pH 7 and the Mabs were eluted with 100 mM Glycine buffer pH 2.7. The pH of the elution fraction was adjusted to 7-7.5 with 1M Tris buffer pH 9.3.

5 **Example 5: Screening for pairs of Mabs to be used in ELISA and optimisation of the ELISA parameters**

The Mabs purified from the ascitis fluids as in example 4 above were used to perform a set of experiments in a matrix format to select the best suitable pair of Mabs to be used as first and second antibodies in the sandwich ELISA for r-hsLDLR described in Example 6 below. Briefly, 96 well plates were coated with ascitis fluids derived from five hybridomas (# 12, 28,28, 29,08, 30 and 50,05) purified either by ammonium sulphate precipitation or on a protein G column. The antibodies were screened using the +291 form as well as the +292 (from amino acid residue Asp + 4 to Cys + 292) and +331 (from amino acid residue
15 Asp + 4 to Cys + 331) forms of r-hsLDLR produced in CHO cells, as antigens. One ml of each of the above partially purified Mabs was labelled with biotin for a fast screening of their suitability as second antibodies in a sandwich ELISA. Briefly 1.5 mg of ammonium sulphate precipitation-purified Mabs were adjusted to pH 8.5 with 30 µl of 0.5 M NaHCO₃. 0.75 mg of Biotin-OSu N-Hydroxysuccinimido-Biotin (Biotin-OSu, Sigma, Cat. # H1759, from a solution
20 of 5 mg in 200 µl DMSO) were added to the antibody solution and incubated for two hours at room temperature with gentle shaking, followed by an overnight incubation at 2-8°C. The reaction solution was loaded onto a Sephadex G-25M (Pharmacia Cat. #17-0851-01) PD10 column to separate between the biotinylated
25 Mabs and the excess of non-reacted biotin-OSu.

The first preliminary experiments indicated that Mabs 29,08 and 30 produced the highest signal above background, when used as second antibodies in the ELISA.

The reaction of these two clones was tested again as second antibodies
30 with antibodies 12, 28, 29,08 and 50 used for coating of plates. The results of

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

21

this experiment clearly showed that Mab 28 was the antibody most suitable for coating.

The best results, in terms of signal intensity and specificity, were obtained with Mab 28 used for coating of the microtiter plate, and Mab 29.08, labelled with biotin, as a second antibody. Using these Mabs good results were obtained with all the three forms (+291, +292 and +331) of the r-hsLDLR. With all forms, the absorbency at 492/405nm was about 1.3 OD.

The three forms of the r-hsLDLR antigen were analysed in serial dilutions in a concentration range of 0.9-1000 ng/ml. A dose response curve was obtained with Mab 28 used for coating and biotinylated Mab 29.08 as a second antibody. This combination gave a linear response at a concentration range of 1-10ng/ml of r-hsLDLR.

The various parameters that may affect the ELISA test such as concentration of reagents, incubation periods, selection of buffers and plates were optimised by testing the following parameters:

- Coating of microtiter plate wells with 5-10 µg/ml of Mab28 in PBS.
- Buffer composition:
 - a) PBS+ Tween 20
 - b) Tris+Ca⁺² + NaCl + Tween 20
- Blocking solutions:
 - a) 1% Gelatine in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - b) 1% BSA in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - c) 1% FBS in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - d) 1% Milk in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - e) 1 Block, Hy Pep and Hy Yeast
- Second Mab 29.08, labelled with biotin, at concentrations of 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10,000 equivalent to a concentration range of 10.74-0.537 µg/ml.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

22

Extravidin concentrations: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000,
1:10,000 equivalent to a concentration range of 4-0.2µg/ml.

On the basis of these experiments the final procedure for the sandwich ELISA
test described in Example 6 below was established.

5 Example 6 Establishment of a Sandwich ELISA for r-hsLDLR

A sandwich ELISA to the r-hsLDLR was established using Mabs 28 and
29.08. Briefly 96 wells plate were coated with 100 µl of a Protein G purified Mab
28 (5 µg/ml) overnight at 2-8°C or 3 hrs. at 37°C. The plates were then washed
five times with PBS+0.05% Tween 20. The plates were incubated with 200 µl of
10 blocking solution (PBS+1%BSA or Gelatin + 0.05% Tween 20 + Thimerosal
0.05% for one hr at 37°C or over night at 4°C and washed five times with
PBS+0.05% Tween 20. 100 µl of samples or of calibration curve antigen (CHO
+291 r-hsLDLR, 0.5-32 ng/ml diluted in blocking solution), were added to the
wells and incubated for 90 min at 37°C, with shaking. The plates were then
15 washed five times with PBS+0.05% Tween 20.

100 µl/well biotinylated Mab 29.08 (0.67 µg/ml) in blocking solution
were added, and incubated with shaking for one hour at 37°C. The plates were
washed five times with PBS+0.05% Tween 20. 100 µl of a commercial extravidin
- peroxidase conjugate, (ExtrAvidin TM-Peroxidase BioMakor, Cat.# 0645-1)
20 diluted 1:10,000 were added to the wells and incubated with shaking for one hour
at 37°C. The plates were then washed five times with PBS+0.05% Tween 20. 125
µl of the abovementioned substrate solution were added to each well and
incubated for about 10 minutes until the colour developed to the desired intensity.
The reaction was stopped by adding 125 µl of 4N HCL. The absorbency in the 96
25 wells plates was read using an ELISA reader at 492 and 405 nm wavelengths and
the results were calculated by the MultiCalc software of the PC computer linked
to the ELISA reader.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

23

Example 7 Monoclonal antibodies isotype

The monoclonal antibodies Ig isotype was determined using a commercial isotyping kit (PharMingen International) according to the manufacturer's assay procedure. Clones 12.6, 28, 29.8 and 30 were identified as IgG₁, whereas clone 5 50.30 was found to be of the IgM class.

Example 8 SDS-PAGE Western blot analysis

The +291 form of purified r-hsLDLR and the native LDLR purified from human urine were analysed by western blot analysis with the monoclonal antibodies developed to the r-hsLDLR. Briefly a 12% SDS Poly Acrylamide gel 10 was loaded with 100ng/lane of the CHO +291 form of r-hsLDLR, or native urinary hsLDLR or TBP-1 crude harvest (as negative control) under reducing conditions (40mM DTT). One lane was loaded with Low Molecular Weight Markers (LMW). This set of samples was run five times. The proteins separated on the gels were transferred by electroelution to nitrocellulose membranes. The 15 membranes were incubated in PBS containing 10% low-fat milk, 0.1% Tween 20, for 16 hr. The membranes were cut into strips and each strip was incubated for 2 hours at room temperature with one of the five selected Mabs : 12.6, 30, 50.30, 28 or 29.08 (ascitis fluid diluted 1:4000) .

Membrane strips were washed with PBS containing 0.1% Tween 20 20 (3x15 min) and incubated for one hour with the second antibody - goat anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase-alkaline phosphatase (diluted 1:10.000, BioMakor) for 2 hours at room temperature.

The strips were washed with PBS containing 0.1% Tween 20 (3x15 min). The positive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL, 25 Amersham).

Monoclonal antibodies #12.6 and #29.8 recognised both the urinary as well as the +291 form of the purified r-hsLDLR in western blot analysis (Figure 2). Mabs 28 and 30 recognised the +291 form of the purified r-hsLDLR.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

24

Example 9 Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity by monoclonal antibodies

Mabs which specifically reacted with r-hsLDLR were tested for their ability to block the antiviral activity of r-hsLDLR (+291 form) *in-vitro*, using a cytopathic effect (CPE) inhibition assay in a VSV/WISH system.

WISH cells (of human amnion origin) were cultured in MEM supplemented with 10% FBS and 4 mM glutamine in a 37°C, 5% CO₂ incubator. Exponentially growing cells were seeded in 96-well tissue culture plates, at a density of 40,000 cells/well twenty-four hours before initiation of the assay. Samples to be tested and the standard were diluted and dispensed into the cells' containing wells. VSV was immediately added to the wells, at a multiplicity of Infection (MOI) of 0.5 pfu/cell. The plates were incubated 16-18 hours at 37°C and were then washed with ethanol. The monolayer of surviving cells was viewed by Gram Crystal Violet stain. Quantitation of the cytopathic effect relative to the standard was performed by plotting the colour density versus standard concentration.

For analysing the neutralising effect of the antibodies, r-hsLDLR was pre-incubated for 30 min. at 37°C, with increasing concentrations of ascitis fluid of the Mab tested. These solutions were then added to cultures of WISH cells in 96 microtiter plates, followed by the addition of vesicular stomatitis virus (VSV). After 18 hours incubation, the VSV mediated cell lysis was determined by staining of the remaining cells with crystal violet. Semi-quantitation of the cytopathic effect relative to the standard was performed by plotting the colour intensity (determined by an ELISA reader) versus standard concentration.

The effect of the Mabs was tested with increasing concentrations of r-hsLDLR. As shown in Table 1 two Mabs (12.6 and 50.30) were found to display neutralising activity.

In the experiment shown in Table 1, the inhibitory effect of the two Mabs was tested at a 1:40 dilution of the ascitis fluids. At this dilution, Mab 12.6 displayed somewhat higher activity than to Mab 50.30. This may result from the

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

25

properties of the Mabs, as well as from differences in their concentration in the ascitis fluid.

The inhibitory effect of the Mabs could be overcome by increasing r-hsLDLR relative to Mabs concentration. In fact at r-hsLDLR concentrations of 62.5 U/ml, neither Mab had any effect on r-hsLDLR activity at the antibody concentration analysed.

Table 1: Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity by clones 12.6 and 50.30[Ⓞ].

VSV/Mab	LDLR Concentration (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
- VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV +Clone 50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+ VSV +Clone 12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67

10 [Ⓞ] Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity against VSV mediated cell lysis of WISH cells. The inhibitory effect of the Mabs was determined at a 1:40 dilution of the ascitis fluid. The number of viable cells is represented in the table in OD values. Numbers in brackets represent a repetition performed at the 0 and 12.5 U/ml LDLR concentrations.

15

Inhibition of the antiviral activity of r-hsLDLR was determined using increasing concentrations of Mabs 12.6 and 50.30. Mab 12.6, inhibited the antiviral activity of r-hsLDLR, by ~60% at a 1:40 dilution (of the ascitis fluid) and by ~35% at a 1:20,500 dilution. Clone 50.30 inhibited r-hsLDLR activity by ~45% at the 1:40 dilution and by ~15% at 1:20,500 dilution.

20 The dose response curve, obtained with both Mabs, and the observation that their inhibitory effect was impaired by excess r-hsLDLR, suggest that the Mabs exert their effect by binding to r-hsLDLR.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

26

Example 10 Inhibition of HCV replication by monoclonal antibodies

5 Mabs specific for r-hsLDLR were tested for their ability to inhibit HCV replication in human hepatocytes in primary culture. FT167 cell culture was derived from a 57 year old male patient requiring lobectomy resection for medical purposes (metastasis of a colon tumor, right lobe).

10 Primary cultures of human hepatocytes were prepared by the two steps collagenase perfusion method (Maurel P. Adv. Drug Del. Rev. 22:105-132 (1996), Pichard L. et al. Mol. Pharmacol. 41:1047-1055(1992), Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107:31-45 (1997)). The viability of the cells before plating was determined using trypan blue exclusion test. Four million cells in 3ml of culture medium were placed into 60-mm plastic dishes precoated with collagen. The long-term serum-free culture medium consisted of Williams' E, supplemented as published (Lanford R. et al. In Vitro Cell Dev. Biol. 25:174-182 (1989)). This medium was subsequently renewed every 48 hours. Cultures were maintained at 15 37°C in a humid atmosphere of air and 5% carbon dioxide. Under these culture conditions, human hepatocytes retain their differentiated phenotype for at least 35 days (Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107:31-45 (1997)) and are sensitive to HCV infection and permissive to the viral genome replication 20 (Fournier C. et al. J. Gen. Virol. 79:2367-2374 (1998)).

HCV-positive serum sample: A bank of human sera from patients tested anti-HCV antibody-positive by the EIA HCV 3.0 and Chiron RIBA HCV 3.0 SIA has been established. None of these patients was co-infected with HBV or HIV. In each serum sample HCV RNA was quantitated by the Roche monitor and 25 genotyped by a line probe assay (Inno-Lipa HCV II, Innogenetics). Serum samples were stored at -80°C, in small aliquots in order to avoid freezing-thawing cycles. In these experiments the sample S42 (genotype 1b; viral load: 410 000 copies/ml) was used.

30 For infection and subsequent treatments, hepatocyte cultures were transferred under sterile conditions to a P3-laboratory (high confinement for human-infectious micro-organisms). Three days after plating, when the cells had recovered from the traumatism of isolation, in vitro infection of hepatocytes was performed by an overnight incubation with 25µL of HCV-positive serum sample

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

27

(S42) in 3mL of medium. After infection, cells were washed three times with 3mL of fresh medium and the culture was continued under normal conditions in the long-term culture medium.

5 Cells were treated with 3 different Mabs against r-hsLDLR, Mab12.6, Mab28 and Mab29.8. Thirty minutes before infection, cells were exposed to 2 or 8µg/ml of the different Mabs. Then cells were infected as described above.

10 Control cultures were infected under similar conditions but in the absence of antiviral treatment. In parallel experiments, the same cultures were treated with 5000 U/mL IFN α , under similar conditions for comparison (IFN α strongly inhibits HCV replication in the cells ref). All treatments were carried out in duplicate.

15 At day 5 post-infection, the medium was removed and the cultures washed 3 times with cold phosphate-buffered saline. RNA was purified from 4 x 10⁶ hepatocytes using a guanidinium isothiocyanate-acid phenol extraction procedure (Chomczynski PN. And Sacchi N. *Analyt. Biochem.* 162:156-159 (1987)). The precipitated RNA was dissolved in 50 µL of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and quantified. One µg of cellular RNA was analyzed in the strand-specific rTth RT-PCR assay.

20 To avoid possible contamination, the strand-specific RT-PCR assay was carried out sequentially using three different rooms: a pre-PCR room, a PCR room and a post-PCR room. RNA dissolved in 10 µl of DEPC-treated water was covered with mineral oil and heated at 95°C for 1 min. The temperature was lowered to 70°C and 10 µl of preheated cDNA reaction mixture was added. The temperature was then dropped to 60°C for 2 min for annealing and the cDNA reaction was performed for 20 min at 70°C using the rTth DNA polymerase (Perkin-Elmer). The temperature was maintained at 70°C while 40 µl of prewarmed buffer containing EGTA as chelator of Mn²⁺ was added to suppress the rTth RT activity. Reaction tubes were held at 70°C while 40 µl of prewarmed PCR mixture was added. The PCR conditions, performed on Gene Amp ® PCR-System 9600 (Perkin-Elmer), consisted of an initial cycle at 94°C for 1 min, 50 cycles at 94°C for 15 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and a final extension step at 72 °C for 7 min. For positive strand HCV RNA assay, the nucleotide

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

28

sequence of the reverse primer P3 is: 5'-TGG/ATGCACGGTCTACGAGACCTC-3', (nt 342-320) and that of the forward primer P4 is: 5'-CACTCCCCTGTGAGGAACT-3', (nt: 38-56), (Laskus T. et al. J. Gen. Virol. 78:2747-2750 (1997)). The same primers were used in reverse order to detect the negative strand. One-tenth of the amplified product was analyzed by gel electrophoresis on agarose (2%), followed by coloration with BET and photography under UV light. In all series of experiments, dilutions of synthetic HCV RNA (+) and (-) strands were made and 1 µg of total liver RNA was added to mimic the conditions for analysis of cultured hepatocytes. These mixtures were used as positive controls for RT-PCR assay and analysis.

Figure 3 shows that the production of the HCV negative strand, in the presence of the Mabs against LDLr, was fully inhibited in culture FT167. Therefore the replication of the viral genome was strongly inhibited. The results were consistent with the view that the LDLR might be a receptor for HCV.

15

Example 11 Production of chimeric antibodies to LDLR

mRNA is purified from a hybridoma line producing mAb specific for LDLR.

Specific cDNA is synthesized with oligonucleotides complementary to the 5' end of the exon CH1 from the heavy chain variable domain (oligo 1) and from the 5' of the C_κhexon of the light chain variable domain (oligo 2) using the purified mRNA as the template.

Two cDNAs are obtained one of which encode the variable region (specific for LDLR) of the heavy chain, and the other the variable region (specific for the LDLR) of the light chain. The cDNAs are cloned and sequenced.

For the construction of the chimeric heavy chain, the variable region of a cloned human Ig heavy chain gene is exchanged (using genetic manipulations) for the cloned DNA encoding the mouse variable domain (specific for LDLR) of the heavy chain. The genetic manipulations include excision of the variable region from the human Ig, using specific restriction enzymes and ligation of the mouse variable region. The same procedure is performed to obtain the chimeric light chain.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

29

Two mammalian expression plasmids are constructed, one including the chimeric heavy chain gene and the other including the chimeric light chain gene. Both vectors are used to cotransfect the hybridoma cell line (SP6).

5 The production of LDLR specific Ig is tested by ELISA or western blots using culture soup of transfectant cells as secondary antibody. The affinity of the chimeric antibody to its ligand is monitored by Biacore.

10 **Example 12 Preparation of transgenic mice that are engineered to contain human immunoglobulin gene loci (xenomic) and preparation of human mAb against hLDLR.**

Xenomic preparation is described in WO 98/24893 and Mendez M.J. et al Nature genetics 15:146-56(1997).

Human-yeast artificial chromosome (YAC) libraries are screened for YACs containing the human heavy chain variable region (about 1000 kb) (YAC 15 cloning method is the method of choice when inserts sizes bigger of 100 kb are required).

The YACs are characterized by Southern blot analysis and by Pulse Field Electrophoresis (PFGE). The YACs should include the C μ C δ , Dh and Vh regions in germ line configuration.

20 Through utilization of the overlapping sequences contained in the YACs, the YACs are recombined in yeast by stepwise recombination strategy. Prior to recombination the 3' end YAC (with the V region) is ligated to HPRT selectable marker. The structure of recombined YAC is confirmed by PFGE and Southern blot analysis (presence of the human heavy chain locus from C region to Vh 25 region in germline configuration).

The YAC acentric arm is targeted with a vector bearing the complete γ 2 constant region, mouse enhancer, neomycin resistance gene, to yield the final heavy chain containing the whole variable region i.e. 82 Vh genes, 6 Jh genes and 30 3 different constant regions C μ C δ C γ with their corresponding regulatory sequences. This YAC is designated yH2. This construct is used for the production of the Xenomouse.

A similar strategy to the one used above is utilized for the reconstruction of the kappa loci. only that: neomycin selection marker is ligated to the

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

30

reconstructed YAC containing the whole kappa loci. This YAC is designated yK2.

YACs containing the yH2 are introduced into ES cell via fusion of YAC containing yeast spheroplast with HPRT deficient E14.TG3B mouse ES cells.

- 5 HPRT positive cells are selected. Positive clones are propagated and analyzed by Southern blots and by CHEF blot analysis. Clones containing the intact yH2 YAC are selected.

Introduction and selection of yK2 YAC in ES cells is performed similarly as described for yH2 YAC.

- 10 yH2 containing ES cells are microinjected into mouse C57BL/6J blastocytes. The chimeric males produced are evaluated for germ line transmission to offspring.

- yH2 and or yK2-transgenic mice are bred with DI mice (homozygous for gene targeted-inactivated mouse heavy and kappa chain loci). Each of the yH2;DI transgenic strains are bred with yK2;DI transgenic strain to generate Xenomouse strains.
- 15

Reconstitution of B-cell development and antibody production in Xenomouse is evaluated by flow cytometry and ELISA.

The immunization of xenomouse is performed as described in example 2.

- 20 The methods for the hybridoma preparation and screening of positive clones are similar to those described in examples 3 and 4.

Hybridoma clones 12.6, 28, 29.8, 30 and 50.30 were deposited at the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, under the Budapest Treaty and were accorded deposit Nos. I-2390, I-2391,

- 25 I-2392, I-2393 and I-2394, respectively.

REFERENCES

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In Process Citation]." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12766-71.
- Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). "Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia." *J Biol Chem*, 256(22), 11923-31.
- Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly, N. L., Smith, R., and Kroon, P. A. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain." *Biochemistry*, 34(40), 13059-65.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1976). "Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor." *N Engl J Med*, 294(25), 1386-90.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science*, 232(4746), 34-47.
- Chomczynski, P.N., And Sacchi, N. (1987). "Single -step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analyt. Biochem.* 162:156-9.
- Eshhar Z, 1985 "Monoclonal Antibody Strategy and Techniques" in "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", Edited by Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985; Chapter 1)
- Fischer, D. G., Tal, N., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (1993). "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon". *Science*, 262(5131), 250-3.
- Fischer, D.G., Novick, D., Cohen, B, Rubinstein, M. (1994). "Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein". *Proc Soc Exp Biol Med* 206(3),228-32.
- Ferrini, J.B., Pichard.L.,Domergue, J., and Maurel, P. (1997). "Long-term primary cultures of adult human hepatocytes". *Chem-Biol Interactions* 107:31-45.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998). " In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus". *J. Gen Virol.* 79:2367-74.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1979). "Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis." *Nature*, 279(5715), 679-85.
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). "Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

32

- different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72(3), 1092-6.
- Lanford R.E., Carey, K.D., Estlack, L.E., Smith, G.C., and Hay, R.V. (1989) "Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of baboon hepatocytes maintained in serum-free medium" *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:174-82.
- 5 Laskus T., Radkowski, M., Wang, L.F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997). "Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication". *J. Gen. Virol.* 78:2747-50.
- 10 Maurel P. (1996) "The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man". *Adv. Drug Del. Rev.* 22:105-132
- Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Currie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 15, 146-56.
- 20 Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes". *Mol. Pharmacol.* 41:1047-55.
- 25 Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature*, 332, 323-27.
- Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985). "The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins." *Science*, 228(4701), 815-22.
- 30 Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

33

CLAIMS

- 5 1. A monoclonal antibody, chimeric antibody, fully humanized antibody, anti-anti-ID antibody or fragment thereof which specifically recognizes and binds human LDL receptor and fragments thereof, except monoclonal antibody C7.
2. A monoclonal antibody according to claim 1 which specifically recognizes and binds the human soluble LDL receptor.
- 10 3. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by hybridoma clone 12.6 deposited at the CNCM under No. I-2390.
4. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by hybridoma clone 28 deposited at the CNCM under No. I-1291.
- 15 5. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by hybridoma clone 29.8 deposited at the CNCM under No. I-2392.
6. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by hybridoma clone 30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
7. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by hybridoma clone 50.30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
- 20 8. Monoclonal antibodies according to any one of claim 3-7 the belong to the immunoglobulin isotype IgG₁ or IgM.
9. A method for the detection and/or the quantitation of human LDLR which comprises the use of a monoclonal antibody according to any one of the preceding claims.
- 25 10. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of being used as a pair in an ELISA.
11. Monoclonal antibodies according to claim 10 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 28 or clone 29.8.
- 30 12. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of identifying LDLR in Western Blot analysis.

WO 01/68710

PCT/L01/00216

34

13. Monoclonal antibodies according to claim 12 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 12.6, clone 28, clone 29.8, or clone 30.
14. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of neutralizing the antiviral biological activity of r-hsLDLR.
- 5 15. Monoclonal antibodies according to claim 14 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 12.6 or clone 50.30.
16. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of inhibiting the replication of hepatitis c virus.
17. Monoclonal antibodies according to claim 16 being monoclonal antibodies
10 generated by hybridoma clone 12.6, clone 28 or clone 29.8.
18. The hybridoma clone 12.6 deposited at the CNCM under No. I-2390.
19. The hybridoma clone 28 deposited at the CNCM under No. I-2391.
20. The hybridoma clone 29.8 deposited at the CNCM under No. I-2392.
21. The hybridoma clone 30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
- 15 22. The hybridoma clone 50.30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
23. A method for preparing a monoclonal antibody according to claim 1, comprising growing a cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with hsLDL and a homogenic or heterogenic lymphoid cell in liquid medium or mammalian abdomen to allow the
20 hybridoma to produce and accumulate the monoclonal antibody.
24. A method according to claim 21 wherein the LDLR immunogen is highly purified human LDLR.
25. A method for purifying human LDLR which comprises contacting a material containing human LDLR with a monoclonal antibody according to
25 any one of claims 1-8.

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

1/3

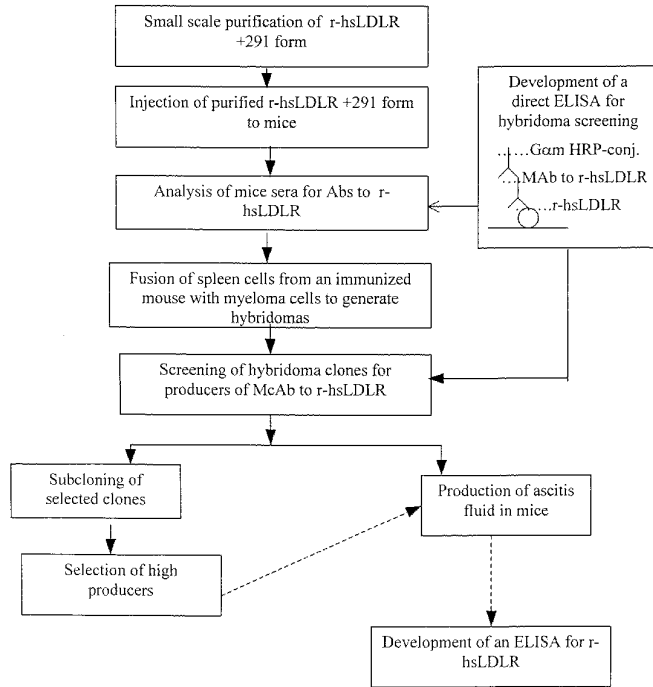


Figure 1

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

2/3

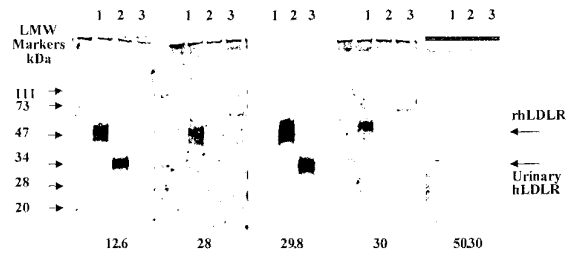


Figure 2

WO 01/68710

PCT/IL01/00216

3/3

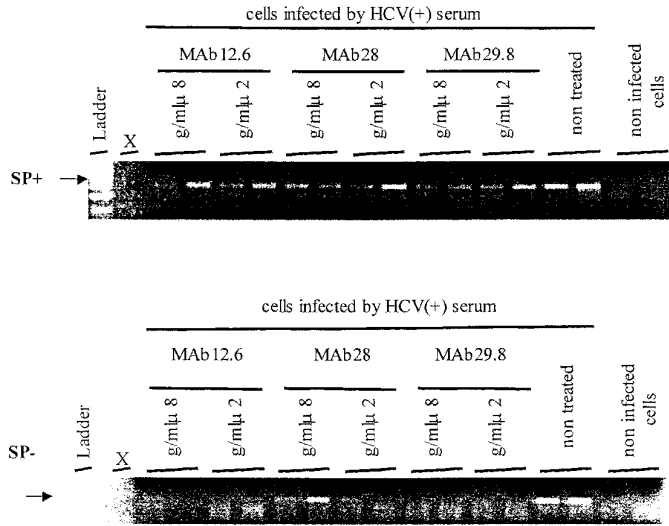


Figure 3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IL 01/00216
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/68 C12N5/20		
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) IPC 7 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) BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. XIE ET AL.: "Preparation and properties of monoclonal antibodies against low density lipoprotein (LDL) receptors." ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA, vol. 23, no. 3, 1991, pages 189-195, XP001015474 Shanghai, Peoples Republic of China English abstract --- -/--	1,2,9, 10,12,23
<input checked="" 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:		
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 9 August 2001	Date of mailing of the international search report 22/08/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nooij, F	

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/IL 01/00216

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I. VAN DRIEL ET AL.: "Stoichiometric binding of low density lipoprotein (LDL) and monoclonal antibodies to LDL receptors in a solid phase assay." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 16, 5 June 1989 (1989-06-05), pages 9533-9538, XP002174321 Baltimore, MD, USA the whole document	1,2,9, 10,12, 23-25
X	M. CARUSO ET AL.: "Demonstration of low density lipoprotein receptor in human colonic carcinoma and surrounding mucosa by immunoenzymatic assay." ITALIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 25, no. 7, August 1993 (1993-08), pages 361-367, XP001015472 Padova, Italy page 362, right-hand column, line 10 - line 22	1,2, 8-10,12
X	T. NISHIKAWA ET AL.: "Beta-migrating very low density lipoproteins induce foam cell formation in mouse mesangial cells." ATHEROSCLEROSIS, vol. 114, no. 1, 7 April 1995 (1995-04-07), pages 123-132, XP001015467 Amsterdam, The Netherlands page 125, left-hand column, line 47 -right-hand column, line 4 figures 3,5	1,2,9,12
A	V. AGNELLO ET AL.: "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002174322 Washington, DC, USA cited in the application abstract page 12766, right-hand column, line 1 - line 3	1-25
A	US 5 945 308 A (TANG ET AL.) 31 August 1999 (1999-08-31) column 20, line 40 -column 21, line 23 column 36, line 33 -column 37, line 8 -/--	1-25

2

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IL 01/00216

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE WPI Week 0102 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2001-011101 XP002174323 & JP 2000 279174 A (BML KK), 10 October 2000 (2000-10-10) abstract -----	1, 2, 9, 10, 12, 23-25

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/IL 01/00216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5945308 A	31-08-1999	AU 3453499 A EP 1068236 A WO 9951640 A	25-10-1999 17-01-2001 14-10-1999
JP 2000279174 A	10-10-2000	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100117123

弁理士 田中 弘

(72) 発明者 ヨナフ、ナクム

イスラエル国、7 0 7 0 0 ゲデラ、レメズ ストリート 6

(72) 発明者 スイッサ、ダニー

イスラエル国、7 6 4 6 8 レホボト、モスコビッツ ストリート 2 8

(72) 発明者 ベルザー、イラナ

イスラエル国、7 5 4 8 3 リション レ - ジオン、ハラシュバ ストリート 1 0

(72) 発明者 アントネッティ、フランチェスコ

イタリア共和国、イ - 0 0 1 7 9 ローマ、ピア アマデオ チルベルッチ、3 5

(72) 発明者 スモラルスキー、モーシェ

イスラエル国、7 6 2 7 3 レホボト、グルスキン ストリート 9

(72) 発明者 ドレアノ、ミシェル

フランス共和国、エフ - 7 4 1 6 0 コロンジェ - ス - サレブ、シュメン デ ボットクルウ、1 6 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA07 EA04 GA03 GA11 HA15

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE04 CE10 DA15

4B065 AA91X AA93Y AA94X AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4H045 AA11 CA40 DA76 DA86 EA29 EA52 FA72 FA74 GA05 GA26

专利名称(译)	抗人LDL受体的单克隆抗体，其制备和用途		
公开(公告)号	JP2004506603A	公开(公告)日	2004-03-04
申请号	JP2001567800	申请日	2001-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
申请(专利权)人(译)	应用研究系统Eiaruesu控股Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	ヨナフナクム スイッサダニー ベルザーイラナ アントネッティフランチェスコ スモラルスキーモーシェ ドレアノミシエル		
发明人	ヨナフ、ナクム スイッサ、ダニー ベルザー、イラナ アントネッティ、フランチェスコ スモラルスキー、モーシェ ドレアノ、ミシエル		
IPC分类号	G01N33/53 C07K C07K16/28 C12N C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/28 Y10S436/82		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE10 4B064/DA15 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA05 4H045/GA26		
代理人(译)	秋山文雄 田中 弘		
优先权	135025 2000-03-13 IL 139217 2000-10-23 IL		
其他公开文献	JP4768193B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

例如，抗人LDL受体的单克隆抗体，其可用于LDL的鉴定和纯化以及用于治疗丙型肝炎感染。

(5) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)
C07K 16/28	C07K 16/28 ZNA	4B024
C12N 5/10	C12P 21/08	4B064
C12P 21/08	GO1N 33/53 D	4B065
GO1N 33/53	GO1N 33/577 B	4H045
GO1N 33/577	C12N 5/00 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁

(21) 出願番号	特願2001-567800 (P2001-567800)	(71) 出願人	595158407 アプライド・リサーチ・システムズ・ アールエス・ホールディング・ナムエ ・フエンノートシャップ Applied Research systems ARS Holding 、V.
(86) (22) 出願日	平成13年3月8日 (2001.3.8)		オランダ領アンテル、キエラソー、 ルマーイ 15
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		
(86) 国際出願番号	PCT/IL2001/000216		
(87) 国際公開番号	W02001/068710		
(87) 国際公開日	平成13年9月20日 (2001.9.20)		
(31) 優先権主張番号	135025		
(32) 優先日	平成12年3月13日 (2000.3.13)		
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		
(31) 優先権主張番号	139217	(74) 代理人	100065226 弁理士 朝日奈 宗太
(32) 優先日	平成12年10月23日 (2000.10.23)		
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)	(74) 代理人	100098257 弁理士 佐木 啓二
		(74) 代理人	100117112 弁理士 秋山 文男