(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-141231
(P2017-141231A)
(43)公開日　平成29年8月17日(2017.8.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/10	***(2006.01)***	C07K	16/10	ZNA	4H045
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

審査請求 有　請求項の数 10　ＯＬ　外国語出願　（全 67 頁）

(21)出願番号　特願2017-34589(P2017-34589)
(22)出願日　平成29年2月27日(2017.2.27)
(62)分割の表示　特願2015-37426(P2015-37426)の分割
原出願日　平成22年5月12日(2010.5.12)
(31)優先権主張番号　61/177,987
(32)優先日　平成21年5月13日(2009.5.13)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/228,114
(32)優先日　平成21年7月23日(2009.7.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508339161
シー　レーン　バイオテクノロジーズ，エルエルシー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２７，　アサートン，　セルビー　レーン　３５６
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ホロヴィッツ，　ローレンス
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２７，　アザートン，　セルビー　レーン　３６２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インフルエンザウイルスに対する中和分子

(57)【要約】　（修正有）
【課題】インフルエンザＡ型ウイルスに対する中和抗体を同定、産生、及び操作するための方法及び、手段、並びに産生された中和抗体と前記中和抗体の作製方法の提供。
【解決手段】特定の配列より選択される前記配列を持つ重鎖からの１つ、２つ、若しくは３つの超可変領域配列を含む、結合分子、又はその機能的に活性なフラグメントを、含む前記中和抗体。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７、配列番号８、および配列番号９からなる群より選択される重鎖からの１つ、２つ、もしくは３つの超可変領域配列を含む、結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２】
配列番号１０、配列番号１１、および配列番号１２からなる群より選択される重鎖からの１つ、２つ、もしくは３つの超可変領域配列を含む、結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３】
配列番号７、配列番号８、もしくは配列番号９からのすべての超可変領域配列を含む、請求項１に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４】
配列番号１０、配列番号１１、もしくは配列番号１２からのすべての超可変領域配列を含む、請求項２に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項５】
軽鎖と会合するときに、標的に結合することが可能である、請求項１に記載の結合分子。
【請求項６】
軽鎖と会合するときに、標的に結合することが可能である、請求項２に記載の結合分子。
【請求項７】
前記軽鎖は、配列番号１３、配列番号１４、もしくは配列番号１５の前記ポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む、請求項５に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項８】
前記軽鎖は、配列番号１６、配列番号１７、もしくは配列番号１８の前記ポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む、請求項５に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項９】
前記軽鎖は、配列番号１９、配列番号２０、もしくは配列番号２１の前記ポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む、請求項５に記載の結合分子。
【請求項１０】
前記軽鎖は、配列番号２２、配列番号２３、もしくは配列番号２４の前記ポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む、請求項６に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１１】
配列番号１３、配列番号１４、もしくは配列番号１５のすべての超可変領域配列を含む、請求項７に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１２】
配列番号１６、配列番号１７、もしくは配列番号１８のすべての超可変領域配列を含む、請求項７に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１３】
配列番号１９、配列番号２０、もしくは配列番号２１のすべての超可変領域配列を含む、請求項７に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１４】
配列番号２２、配列番号２３、もしくは配列番号２４のすべての超可変領域配列を含む、請求項８に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１５】

ＶｐｒｅＢ配列および／またはλ５配列を含むポリペプチドをさらに含む、請求項１もしくは２に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１６】
λ５配列に融合されたＶｐｒｅＢ配列を含むポリペプチドをさらに含む、請求項１もしくは２に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１７】
Ｖｉｃ様配列および／またはＪＣκ配列を含むκ様代替軽鎖（ＳＬＣ）構築物をさらに含む、請求項１もしくは２に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項１８】
抗体、またはその機能的に活性なフラグメントである、請求項１もしくは２に記載の結合分子。
【請求項１９】
重鎖を含む、結合分子であって、前記重鎖は、配列番号１として示した前記アミノ酸配列を含む、結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２０】
重鎖を含む、結合分子であって、前記重鎖は、配列番号２として示した前記アミノ酸配列を含む、結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２１】
配列番号３、配列番号４、および配列番号５からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖をさらに含む、請求項１９に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２２】
配列番号６として示した前記アミノ酸配列を含む軽鎖をさらに含む、請求項２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２３】
（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）前記ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する、請求項１９に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２４】
（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの亜型および／または少なくとも１つの分離株を中和し、（ｉｉ）前記ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する、請求項２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２５】
前記ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープに結合する、請求項１９または２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２６】
前記ＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合する、請求項１９もしくは２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２７】
前記ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープに、および前記ＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合する、請求項１９もしくは２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２８】
前記ＨＡ抗原のＨ９亜型のエピトープに結合する、請求項１９もしくは２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項２９】
前記ＨＡ抗原のＨ５亜型のエピトープに結合する、請求項２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３０】

前記エピトープは、インフルエンザＡ型ウイルス上に提示される、請求項２５から２９のいずれか１項に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３１】
Ｈ１ＨＡ抗原およびＨ３抗原と交差反応性である、請求項１９もしくは２０に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３２】
前記Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型の少なくとも１つを中和する、請求項１９に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３３】
前記Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型を中和する、請求項１９に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３４】
前記Ｈ１ＨＡ抗原を中和する、請求項２０に記載の結合分子、または機能的に活性なフラグメント。
【請求項３５】
前記Ｈ５ＨＡ抗原を中和する、請求項２０に記載の結合分子、または機能的に活性なフラグメント。
【請求項３６】
前記Ｈ１およびＨ５ＨＡインフルエンザＡ型ウイルス亜型を中和する、請求項２０に記載の結合分子、または機能的に活性なフラグメント。
【請求項３７】
前記Ｈ１亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ１ウイルスのニューカレドニア／２０／９９分離株に由来する、請求項２５に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３８】
前記Ｈ１亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ１ウイルスのソロモン諸島／３／０６分離株に由来する、請求項２５に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項３９】
前記Ｈ３亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ３ウイルスのウィスコンシン／６７／０５分離株に由来する、請求項２６に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４０】
前記Ｈ３亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ３ウイルスの香港／６８分離株に由来する、請求項２６に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４１】
前記Ｈ９亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ９ウイルスの香港／１０７３／９９分離株に由来する、請求項２８に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４２】
前記Ｈ５亜型、または前記ＨＡは、前記Ｈ５ウイルスのベトナム／１２０３／０４分離株に由来する、請求項２９に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４３】
前記インフルエンザＡ型ウイルスの球状頭部が細胞表面に結合するのを阻止する、請求項２３に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４４】
前記インフルエンザＡ型ウイルスが感染される細胞に付着するのを阻止する、請求項２３に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４５】
前記ウイルスの少なくとも１つがヒトに感染する能力を有する、請求項２３もしくは２４に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４６】

前記分離株の少なくとも１つがヒト被験体から得たものである、請求項２３もしくは２４に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４７】
前記分離株の少なくとも１つが非ヒト動物から得たものである、請求項２３もしくは２４に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４８】
前記非ヒト動物がトリである、請求項４７に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項４９】
前記トリが野鳥またはニワトリである、請求項４８に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項５０】
前記非ヒト動物は、ブタである、請求項４７に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項５１】
Ｈ１ＨＡ抗原に結合する、請求項１９に記載の結合分子、または機能的に活性なフラグメント。
【請求項５２】
少なくとも１つのさらなるＨＡ抗原に結合する、請求項５１に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項５３】
前記さらなるＨＡ抗原は、Ｈ３である、請求項５２に記載の結合分子、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項５４】
配列番号１として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体。
【請求項５５】
配列番号３、配列番号４、および配列番号５からなる群より選択されるアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、請求項５４に記載の抗体。
【請求項５６】
配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体。
【請求項５７】
配列番号６として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、請求項５６に記載の抗体。
【請求項５８】
（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）前記ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する、請求項５４もしくは５５に記載の抗体。
【請求項５９】
（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）前記ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する、請求項５６もしくは５７に記載の抗体。
【請求項６０】
請求項１から５９のいずれか１項に記載の結合分子または抗体を含む、組成物。

【請求項６１】
被験体におけるインフルエンザＡ型ウイルス感染の防止および／または治療のための方法であって、請求項６０に記載の有効量の組成物を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項６２】
被験体におけるインフルエンザＡ型ウイルス感染を治療するための方法であって、請求項１から５９のうちのいずれか１つの中和抗体または結合分子の有効量を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項６３】
前記被験体は、ヒト患者である、請求項６１もしくは６２に記載の方法。
【請求項６４】
請求項１から５９のいずれか１項に記載の抗体または結合分子によって結合された中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含む、インフルエンザＡ型ウイルスに有効なワクチン。
【請求項６５】
合成ワクチンである、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項６６】
弱毒化インフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部を含む、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項６７】
死滅させたインフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部を含む、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項６８】
前記抗体または結合分子は、
（ａ）配列番号１として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体または結合分子、
（ｂ）配列番号１として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む重鎖ポリペプチドを含む、抗体、
（ｃ）配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体または結合分子、またそのフラグメント、および
（ｄ）配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む、抗体、またはそのフラグメント、からなる群より選択される、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項６９】
前記抗体または結合分子は、ＨＡ抗原に結合する、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項７０】
前記ＨＡ抗原は、Ｈ３亜型である、請求項６９に記載のワクチン。
【請求項７１】
前記ＨＡ抗原は、Ｈ１亜型である、請求項６９に記載のワクチン。
【請求項７２】
前記ＨＡ抗原は、Ｈ１亜型およびＨ３亜型である、請求項６９に記載のワクチン。
【請求項７３】
前記ＨＡ抗原は、Ｈ５亜型である、請求項６９に記載のワクチン。
【請求項７４】
前記ＨＡ抗原は、Ｈ９亜型である、請求項６９に記載のワクチン。
【請求項７５】
前記抗原は、インフルエンザＡ型ウイルスの表面上に提示される、請求項６９に記載の

ワクチン。
【請求項７６】
前記ペプチドまたはポリペプチドは、中和抗体を惹起する抗原決定基を含む、請求項６４から７５のいずれか１項に記載のワクチン。
【請求項７７】
経口投与に好適な、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項７８】
経粘膜送達に好適な、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項７９】
前記経粘膜送達は、鼻腔内投与である、請求項７８に記載のワクチン。
【請求項８０】
非経口投与に好適な、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項８１】
経皮投与に好適な、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項８２】
前記ワクチンは、小児期免疫化用である、請求項６４に記載のワクチン。
【請求項８３】
長さが修正された重鎖ループを含むインフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの分離株を中和する、ヒトに感染する能力を有するインフルエンザＡ型ウイルスの血球凝集素へ結合する、中和抗体または結合分子。
【請求項８４】
前記延長重鎖ループは、ＣＤＲ３ループである、請求項８３に記載の抗体または結合分子。
【請求項８５】
前記ＣＤＲ３ループは、配列番号９のアミノ酸配列を含む、請求項８４に記載の抗体または結合分子。
【請求項８６】
前記延長重鎖ループは、ＣＤＲ１ループである、請求項８５に記載の抗体または結合分子。
【請求項８７】
前記ＣＤＲ１ループは、配列番号７のアミノ酸配列を含む、請求項８６に記載の抗体または結合分子。
【請求項８８】
前記長さの修正は、延長重鎖ループを含む、請求項８３に記載の抗体または結合分子。
【請求項８９】
前記長さの修正は、前記重鎖ループにおける欠失を含む、請求項８３に記載の抗体または結合分子。
【請求項９０】
重鎖可変ドメイン中の１つまたは複数のメチオニン置換を含むインフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの分離株を中和する、ヒトに感染する能力を有するインフルエンザＡ型ウイルスの血球凝集素に結合する、低下した酸化能を有する、設計抗体または結合分子。
【請求項９１】
前記重鎖可変ドメインは、ＣＤＲ３領域である、請求項９０に記載の設計抗体または結合分子。
【請求項９２】
前記メチオニン置換は、カバットナンバリングシステムによる９６位においてである、請求項９０に記載の設計抗体または結合分子。
【請求項９３】
前記メチオニン置換は、カバットナンバリングシステムによる９８位である、請求項９

０に記載の設計抗体または結合分子。
【請求項９４】
前記メチオニン置換は、カバットナンバリングシステムによる９６位および９８位である、請求項９０に記載の設計抗体または結合分子。
【請求項９５】
前記メチオニンは、ロイシンで置換される、請求項９０から９４のいずれか１項に記載の設計抗体または結合分子。
【請求項９６】
前記重鎖可変ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む、請求項９０に記載の設計抗体または結合分子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、インフルエンザＡ型ウイルスに対する中和分子を同定、産生、および設計するための方法および手段、ならびに産生された中和分子に関する。本発明は、さらに、標的インフルエンザＡ型ウイルス上の本発明の中和分子の結合部位を使用したワクチンの設計および産生を含む、産生された分子の種々の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
流感は、インフルエンザウイルスにより引き起こされる感染性呼吸器疾患である。インフルエンザは軽度から重度の疾患を引き起こし、時には死に至り得る。米国では年間、人口の５～２０％がインフルエンザに罹患し、約２００，０００人が入院し、約３６，０００の死者をもたらす。
【０００３】
インフルエンザウイルスは咳およびくしゃみによって生じた呼吸器飛沫で広がり、それが通常人から人へ伝播する。インフルエンザ表面抗原、特に、血球凝集素に対する免疫は、感染の可能性、および感染した場合の疾患の重症度を軽減する。インフルエンザワクチンを利用可能ではあるが、１つのインフルエンザウイルスの型または亜型に対するワクチンは別のインフルエンザの型または亜型に対する限定的な防御を付与するか、または全く防御しないため、毎年インフルエンザワクチンの中に１つまたは複数の新しい株を組みこむ必要がある。
【０００４】
インフルエンザウイルスは分節負鎖ＲＮＡウイルスであり、オルトミクスウイルス科に属する。インフルエンザＡ型ウイルスは、９種類の構造タンパク質からなり、調節機能を有する１つの非構造ＮＳ１タンパク質をさらにコードする。非構造ＮＳ１タンパク質は、再生サイクル中に大量に合成され、感染細胞のサイトゾルおよび細胞核内に局在する。ウイルスゲノムの分節性により、異なるウイルス株との細胞の混合感染中に遺伝子再集合（ゲノムセグメントの交換）機能が生じる。インフルエンザＡ型ウイルスは、その表面上に提示される異なる血球凝集素（ＨＡ）およびノイラミニダーゼ（ＮＡ）ウイルスタンパク質に応じて種々の亜型にさらに分類することができる。インフルエンザＡ型ウイルス亜型は、２つのウイルス表面糖タンパク質である、血球凝集素（ＨＡまたはＨ）およびノイラミニダーゼ（ＮＡまたはＮ）によって同定される。各インフルエンザウイルス亜型は、ＨおよびＮタンパク質のその組み合わせによって同定される。１６種のＨＡ亜型および９種のＮＡ亜型が公知である。インフルエンザＡ型ウイルスは、ヒト、トリ、ブタ、ウマ、および他の動物に感染し得るが、野鳥がこれらのウイルスの天然の宿主である。いくつかのインフルエンザＡ型亜型（すなわち、Ｈ１Ｎ１、Ｈ１Ｎ２、およびＨ３Ｎ２）のみが、現在ヒト間で流布しているが、１６種のＨ亜型と９種のＮＡ亜型とのすべての組み合わせが鳥類、特に、野生の水鳥および浜に生息する鳥で同定されている。さらに、Ｈ５およびＨ７インフルエンザウイルスもヒト疾病を引き起こし得るという証拠が増えつつある。
【０００５】

インフルエンザＡ型ウイルスのＨＡは、２つの構造的に異なる領域、すなわち、球状頭部領域（ｇｌｏｂｕｌａｒ ｈｅａｄ ｒｅｇｉｏｎ）およびステム領域（ｓｔｅｍ ｒｅｇｉｏｎ）を含む。球状頭部領域は、標的細胞へのウイルス付着を担い、かつＨＡの血球凝集活性に関与する受容体結合部位を含む。ステム領域は、ウイルスエンベロープと細胞のエンドソーム膜との間の細胞融合に必要であり、したがって融合活性に関連する融合ペプチドを含む（Ｗｉｌｅｙ ｅｔ ａｌ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，５６：３６５－３９４（１９８７））。

【０００６】

パンデミック（世界的流行病）は、世界的な疾患の発生である。インフルエンザパンデミックは、新規のインフルエンザＡ型ウイルスが、（１）ヒト集団においてほとんどまたは全く免疫が存在しないものとして出現した場合、（２）重篤な疾病を引き起こし始め、次いで、（３）世界規模で人から人へ容易に伝播する場合に起こる。２０世紀には、かかるインフルエンザパンデミックが３回起こっている。第１に、１９１８年に、「スペイン風邪」インフルエンザパンデミックにより、米国で少なくとも５００，０００人が死亡し、世界で４０００万人までが死亡した。このパンデミックは、インフルエンザＡ型Ｈ１Ｎ１亜型に起因していた。第２に、１９５７年に、インフルエンザＡ型Ｈ２Ｎ２亜型に起因する「アジア風邪」インフルエンザパンデミックにより、米国で少なくとも７０，０００人が死亡し、世界で１００～２００万人が死亡する結果となった。最も最近では、１９６８年に、インフルエンザＡ型Ｈ３Ｎ２亜型に起因する「香港風邪」インフルエンザパンデミックにより、米国で約３４，０００人が死亡し、世界で７００，０００人が死亡する結果となった。

【０００７】

１９９７年に、最初のインフルエンザＡ型Ｈ５Ｎ１の症例が香港で報告された。これは、このトリウイルス型のヒトへの最初の直接感染であったが、ヒトからヒトへの感染が認められなかったので、パンデミックという結果にならなかった。

【０００８】

Ｌｕ ｅｔ ａｌ，Ｒｅｓｐ．Ｒｅｓ．７：４３（２００６）（ｄｏｉ：１０．１１８６／１４６５－９９２－７－４３）は、不活化Ｈ５Ｎ１ウイルスを接種したウマ由来の抗Ｈ５Ｎ１ ＩｇＧ、およびＨ５Ｎ１特異的Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントの調製を報告しており、これらは、Ｈ５Ｎ１ウイルスを感染させたＢＡＬＢ／ｃマウスを防御すると説明されていた。

【０００９】

Ｈａｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓｐ．Ｒｅｓ．７：１２６（ｄｏｉ：１０．１１８６／１４６５－９９２１－７－１２６）は、マウスの受動免疫化のためのインフルエンザＡ型ウイルスＨ５血球凝集素に特異的なキメラモノクローナル抗体の使用を記載している。

【００１０】

インフルエンザウイルスに対する中和抗体は、２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号に開示されている。

【００１１】

あるインフルエンザＡ型ウイルスに起因する呼吸器疾患の重症度および潜在的パンデミックの脅威を考慮して、有効な防止方法および治療方法が非常に必要とされている。本発明は、インフルエンザＡ型ウイルスのＨ１亜型、Ｈ３亜型、およびＨ５亜型が含まれるが、これらに限定されない、ウイルスの種々のＨ亜型に対するインフルエンザＡ型中和分子を提供することによって、この必要性に取り組んでいる。本発明は、さらに、種々のヒトおよび非ヒト種から得た分離株ならびに種々のインフルエンザのエピデミックおよび／またはパンデミックの犠牲者および／または生存者由来の分離株が含まれるが、これらに限定されない、インフルエンザＡ型ウイルスの所与の亜型の１つを超える分離株（株）、好ましくはすべての分離株（株）を中和することができる分子を提供する。

【００１２】

かかる交差反応性中和分子は、感染集団またはエピデミックもしくはパンデミックの場合のリスク集団の受動免疫化を含む、インフルエンザウイルス感染の防止および／または治療のために使用することができる。さらに、交差反応性抗体は、将来のワクチン発見のための設計ガイド、および現在のワクチン臨床開発のための評価ツールとして使用することができる。

【発明の概要】

【００１３】

１つの態様では、本発明は、重鎖および軽鎖ポリペプチド由来の超可変領域を含む結合分子を提供する。１つの実施形態では、結合分子は、配列番号７、配列番号８、および配列番号９からなる群より選択される重鎖からの１つ、２つ、もしくは３つの超可変領域配列、またはその機能的に活性なフラグメントを含む。別の実施形態では、結合分子は、配列番号７、配列番号８、および配列番号９のすべての超可変領域配列を含む。１つの他の実施形態では、結合分子は、軽鎖と会合したときに、標的に結合することが可能である、結合分子である。１つの実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５のポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む。別の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１６、配列番号１７、および配列番号１８のポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む。１つの他の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１９、配列番号２０、および配列番号２１のポリペプチド配列のうちの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む。別の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５のすべての超可変配列を含む。別の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１６、配列番号１７、および配列番号１８のすべての超可変配列を含む。１つの他の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号１９、配列番号２０、および配列番号２１のすべての超可変配列を含む。

【００１４】

別の実施形態では、結合分子は、配列番号１０、配列番号１１、および配列番号１２からなる群より選択される重鎖からの１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列、またはその機能的に活性なフラグメントを含む。１つの他の実施形態では、結合分子は、配列番号１０、配列番号１１、および配列番号１２のすべての超可変領域配列を含む。１つの他の実施形態では、結合分子は、軽鎖と会合したときに、標的に結合することが可能である結合分子である。１つの他の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号２２、配列番号２３、および配列番号２４のポリペプチド配列の１つ、２つ、もしくは３つの超可変配列を含む。１つの他の実施形態では、軽鎖または結合分子は、配列番号２２、配列番号２３、および配列番号２４のすべての超可変領域配列を含む。

【００１５】

１つの実施形態では、結合分子は抗体である。別の実施形態では、結合分子はサロボディである。

【００１６】

別の態様では、本発明は、ＶｐｒｅＢ配列および／またはλ５配列を含む結合分子を提供する。１つの実施形態では、結合分子は、ＶｐｒｅＢ配列および／またはλ５配列を含むポリペプチドを含む。別の実施形態では、結合分子は、λ５配列に融合したＶｐｒｅＢ配列を含むポリペプチドをさらに含む。１つの他の実施形態では、結合分子は、Ｖκ様配列および／またはＪＣκ配列を含むκ様代替軽鎖（ＳＬＣ）構築物をさらに含む。

【００１７】

すべての実施形態では、結合分子は、（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する。別の実施形態では、結合分子は、Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型の少なくとも１つを中和する。１つの実施形態では、結合分子は、Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型を中和する。別の実施形態では、結合分子は、インフルエンザＡ型ウイルスの球状頭部が細胞表面に

結合するのを阻止する。１つの他の実施形態では、結合分子は、インフルエンザＡ型ウイルスが感染される細胞に付着するのを阻止する。別の実施形態では、結合分子は、Ｈ１ＨＡ抗原に結合する。１つの実施形態では、結合分子はまた、少なくとも１つのさらなるＨＡ抗原に結合する。別の実施形態では、さらなるＨＡ抗原は、Ｈ３である。別の実施形態では、結合分子は、Ｈ２ＨＡ抗原に結合する。

【００１８】

１つの実施形態では、本発明は、重鎖を含む抗体を提供し、重鎖は、配列番号１として示したアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号３、配列番号４、および配列番号５からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖をさらに含む。１つの他の実施形態では、抗体は、（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する、抗体である。別の実施形態では、抗体は、Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型の少なくとも１つを中和する抗体である。１つの実施形態では、抗体は、Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡ型ウイルス亜型を中和する抗体である。別の実施形態では、抗体は、インフルエンザＡ型ウイルスの球状頭部が細胞表面に結合するのを阻止する抗体である。１つの他の実施形態では、抗体は、インフルエンザＡ型ウイルスが感染される細胞に付着するのを阻止する抗体である。別の実施形態では、抗体は、Ｈ１ＨＡ抗原に結合する抗体である。１つの実施形態では、抗体は、少なくとも１つのさらなるＨＡ抗原に結合する抗体である。別の実施形態では、さらなるＨＡ抗原は、Ｈ３である。

【００１９】

別の実施形態では、抗体は、重鎖を含み、重鎖は、配列番号２として示したアミノ酸配列を含む。１つの他の実施形態では、抗体は、配列番号６として示したアミノ酸配列を含む軽鎖をさらに含む。１つの他の実施形態では、抗体は、（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの亜型および／または少なくとも１つの分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する、抗体である。１つの実施形態では、抗体は、ＨＡ抗原のＨ５亜型のエピトープに結合する抗体である。別の実施形態では、抗体は、Ｈ１ＨＡ抗原を中和する、Ｈ５ＨＡ抗原を中和する、またはＨ１およびＨ５インフルエンザＡ型ウイルス亜型を中和する、抗体である。

【００２０】

別の実施形態では、抗体または結合分子は、インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株に結合する、および／またはそれに対して反応性である、および／またはそれを中和する。１つの実施形態では、ウイルスは、ヒトに感染する能力を有するウイルスである。別の実施形態では、分離株は、ヒト被験体から得られた分離株である。１つの他の実施形態では、分離株は、非ヒト動物から得られた分離株である。別の実施形態では、非ヒト動物は、トリである。１つの実施形態では、前記トリは、野鳥またはニワトリである。１つの他の実施形態では、非ヒト動物は、ブタである。

【００２１】

別の実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。１つの他の実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。別の実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープ、およびＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。１つの実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ９亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。別の実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ５亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。別の実施形態では、抗体または結合分子は、ＨＡ抗原のＨ２亜型のエピトープに結合する、抗体または結合分子である。

【００２２】

すべての実施形態では、抗体または結合分子は、インフルエンザＡ型ウイルスの表面上に提示されるエピトープに結合する。

【００２３】
すべての実施形態では、Ｈ１亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ１ウイルスのニューカレドニア／２０／９９分離株に由来するか、Ｈ１亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ１ウイルスのソロモン諸島／３／０６分離株、またはＨ１ウイルスのメンフィス／３／２００８分離株に由来する。
【００２４】
すべての実施形態では、Ｈ３亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ３ウイルスのウィスコンシン／６７／０５分離株に由来するか、またはＨ３亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ３ウイルスの香港／６８分離株に由来する。
【００２５】
すべての実施形態では、Ｈ９亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ９ウイルスの香港／１０７３／９９分離株に由来する。
【００２６】
すべての実施形態では、Ｈ５亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ５ウイルスのベトナム／１２０３／０４分離株に由来する。
【００２７】
すべての実施形態では、Ｈ２亜型、もしくは前記ＨＡは、Ｈ２ウイルスのアダチ／１／１９５７分離株に由来する。
【００２８】
すべての実施形態では、抗体または結合分子は、Ｈ１ＨＡ抗原およびＨ３抗原と交差反応性である、抗体または結合分子である。
【００２９】
１つの他の実施形態では、本発明は、配列番号１として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する抗体または結合分子を提供する。別の実施形態では、抗体または結合分子は、配列番号３、配列番号４、および配列番号５からなる群より選択されるアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する。１つの他の実施形態では、抗体または結合分子は、（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する、抗体または結合分子である。
【００３０】
１つの実施形態では、本発明は、配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体または結合分子を提供する。別の実施形態では、抗体または結合分子は、配列番号６として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する。１つの他の実施形態では、抗体または結合分子は、（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）に結合する、抗体または結合分子である。
【００３１】
別の実施形態では、本発明は、本明細書中に記載の結合分子または抗体を含む組成物を提供する。
【００３２】
別の態様では、本発明は、インフルエンザＡ型ウイルス感染の治療および／または防止を必要とする被験体における、インフルエンザＡ型ウイルス感染の治療および／または防止のための方法を提供する。１つの実施形態では、前記方法は、有効量の本明細書中に記載の組成物を前記被験体に投与することを含む。別の実施形態では、前記方法は、有効量

の本明細書中に記載の中和抗体または結合分子を前記被験体に投与することを含む。１つの他の実施形態では、前記被験体はヒト患者である。

【００３３】

別の態様では、本発明は、インフルエンザＡ型ウイルス感染に有効なワクチンを提供する。１つの実施形態では、ワクチンは、本明細書中に記載の抗体または結合分子に結合した中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含む。別の実施形態では、ワクチンは合成ワクチンである。１つの他の実施形態では、ワクチンは弱毒化インフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部を含む。別の実施形態では、ワクチンは死滅させたインフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部を含む。１つの他の実施形態では、抗体または結合分子は、（ａ）配列番号１として示したアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体または結合分子、（ｂ）配列番号１として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む重鎖ポリペプチドを含む抗体、（ｃ）配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体のエピトープと本質的に同一のエピトープに結合する、抗体または結合分子、および（ｄ）配列番号２として示したアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列もしくは変異体配列を含む重鎖ポリペプチドを含む抗体、からなる群より選択される。

【００３４】

すべての実施形態では、抗体はＨＡ抗原に結合する。ＨＡ抗原は、Ｈ３亜型、Ｈ１亜型、Ｈ２亜型、Ｈ１亜型およびＨ３亜型、Ｈ５亜型、Ｈ９亜型、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択され得る。１つの実施形態では、抗原は、インフルエンザＡ型ウイルスの表面上に提示される。別の実施形態では、本明細書中に記載の抗体または結合分子に結合した中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドは、中和抗体を惹起する抗原決定基を含む。別の実施形態では、ワクチンは、経口投与、経皮投与、または非経口投与に適切である。別の実施形態では、ワクチンは、経粘膜送達に好適である。１つの他の実施形態では、経粘膜送達は、鼻腔内投与である。別の実施形態では、ワクチンは、小児期免疫化用ワクチンである。

【００３５】

１つの態様では、本発明は、長さが修正された重鎖ループを有するインフルエンザ中和抗体または結合分子を提供する。長さが修正された鎖は、延長重鎖ループまたは短縮重鎖ループであり得る。１つの実施形態では、抗体または結合分子は、延長重鎖ループを有するインフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの分離株を中和する、ヒトに感染する能力を有するインフルエンザＡ型ウイルスの血球凝集素へ結合する、中和抗体または結合分子である。１つの他の実施形態では、長さが修正された重鎖ループは、ＣＤＲ３ループまたはＣＤＲ１ループである。別の実施形態では、ＣＤＲ３ループは、配列番号９のアミノ酸配列を含む。さらに別の抗体では、ＣＤＲ１ループは、配列番号７のアミノ酸配列を含む。

【００３６】

別の態様では、本発明は、低下した酸化能を有する設計抗体または結合分子を提供する。１つの実施形態では、低下した酸化能を有する設計抗体または結合分子は、重鎖可変ドメイン中の１つまたは複数のメチオニン置換を有するインフルエンザＡ型ウイルスの少なくとも１つの分離株を中和する、ヒトに感染する能力を有するインフルエンザＡ型ウイルスの血球凝集素へ結合する抗体である。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、ＣＤＲ３領域である。１つの他の実施形態では、メチオニン置換は、カバットナンバリングシステムによる９６位および／または９８位である。さらに別の実施形態では、メチオニンは、ロイシンで置換される。１つの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【００３７】
【図１】交差反応性を生じる／増加させるための並行した発見プールの組換えによる、２つの異なる標的（標的ＡおよびＢ）に対する反応強度を増加させるための戦略を示す。組換え抗体ライブラリーの各選択ラウンドにより、両標的に対する得られたプールの反応強度を増加させる。
【図２】標的Ｂに対する交差反応性を増加させる一方で、標的Ａに対する反応性を維持する戦略を示す。第１に、標的Ａに反応性を示すクローンを選択し、次いで、標的Ａに反応性を示すクローンの変異誘発ライブラリーを調製し、示すように選択が行われ、標的Ａおよび標的Ｂの両方との強い反応性を示す１つまたは複数の抗体を得る。
【図３】「目的変異誘発」法によって多様な多機能抗体集団を生成するための代表的な変異誘発法を示す。
【図４】Ｈ１、Ｈ３、およびＨ９から血球凝集素抗原への１２８６－Ｃ５抗体の結合能力を示す。
【図５】Ｈ１、Ｈ３、Ｈ５、およびＨ９から血球凝集素抗原への１２８６－Ａ１１抗体の結合能力を示す。
【図６】合体された抗体ライブラリーを生成するための代表的な方法を示す。
【図７Ａ】インフルエンザ中和抗体の治療効果および保護効果を示す。図７Ａは、高力価の致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体による予防効果を示す。
【図７Ｂ】インフルエンザ中和抗体の治療効果および保護効果を示す。図７Ｂは、高力価の致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体による予防効果を示す。
【図７Ｃ】インフルエンザ中和抗体の治療効果および保護効果を示す。図７Ｃは、致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体による治療効果を示す。
【図７Ｄ】インフルエンザ中和抗体の治療効果および保護効果を示す。図７Ｄは、致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体による治療効果を示す。
【図７Ｅ】インフルエンザ中和抗体の治療効果および保護効果を示す。図７Ｅは、高力価の季節性Ｈ１Ｎ１ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体による予防効果を示す。
【図８】Ｃ０５変異体がＨ１およびＨ３ＨＡタンパク質の認識を維持することを示す。
【図９】Ｃ０５変異体がＨ１およびＨ３ＨＡタンパク質の認識を維持することを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３８】
Ａ．定義
他で定義されない限り、本明細書中で使用される技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同様の意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ １９９４）は、本出願で使用した多数の用語に対する一般的な指針を当業者に提供している。
【００３９】
当業者は、本発明の実施の際に使用することができる本明細書中に記載のものと類似または等価の多数の方法および材料を認識するであろう。実際、本発明は、記載の方法および材料に決して制限されない。本発明の目的のために、以下の用語を下記のように定義する。
【００４０】
「インフルエンザＡ型亜型」または「インフルエンザＡ型ウイルス亜型」という用語は、交換可能に使用され、これらは、血球凝集素（Ｈ）ウイルス表面タンパク質によって特徴づけられ、それにより、Ｈ番号、例えば、Ｈ１、Ｈ３、Ｈ５、およびＨ９等によって分類されるインフルエンザＡ型ウイルス変異体を表す。加えて、亜型を、Ｎ番号、例えば、Ｎ１およびＮ２等によって示したノイラミニダーゼ（Ｎ）ウイルス表面タンパク質によってさらに特徴づけることができる。したがって、亜型を、Ｈ番号およびＮ番号の両方、例えば、Ｈ１Ｎ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ３Ｎ２、Ｈ５Ｎ１、Ｈ５Ｎ２、およびＨ９Ｎ２等によって

表すことができる。本用語には、具体的には、通常は変異に起因し、異なる病理学的プロファイルを示す各亜型内のすべての株（絶滅した株が含まれる）が含まれる。かかる株はまた、過去、現在、および未来の分離株のすべてを含む、ウイルス亜型の種々の「分離株」と表されるであろう。したがって、本文脈中で、「株」および「分離株」という用語は、交換可能に使用される。亜型は、インフルエンザＡ型ウイルスに基づいた抗原を含む。抗原は、血球凝集素ウイルス表面タンパク質に基づくことができ、この抗原を「ＨＡ抗原」と指定することができる。いくつかの例では、かかる抗原は、特定の亜型、例えば、Ｈ１亜型およびＨ３亜型等のタンパク質に基づき、それぞれ、Ｈ１抗原およびＨ３抗原と指定することができる。

【００４１】

「インフルエンザ」という用語は、インフルエンザウイルスに起因する接触伝染病を表すために使用される。

【００４２】

本発明の文脈において、「結合分子」という用語は、最も広い意味で使用され、標的に特異的に結合するポリペプチド配列を含む任意の分子を含む。定義には、ホモ二量体またはヘテロ二量体形態等の単量体または多量体であれ、抗体および抗体フラグメント、抗体様分子およびそのフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。多量体結合分子は、共有結合性および／または非共有結合性相互作用を介してそれらの配座を保持することができ、かつそれらが標的（例えば、抗体の場合では、抗原）に結合する必要特性を保持する限り、互いに、および／または分子もしくは部分に抱合し得る。

特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープ「に特異的に結合する」、または「それに特異的」である結合分子は、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、その特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合するものである。

【００４３】

「抱合体」、「抱合した」、および「抱合」という用語は、任意のおよびすべての共有結合または非共有結合の形態を表し、直接的な遺伝子融合または化学的融合、リンカーまたは架橋剤によるカップリング、および、例えば、ファンデルワールス力またはロイシンジッパーの使用による非共有結合が含まれるが、これらに限定されない。

【００４４】

「抗体」（Ａｂ）という用語は、最も広い意味で使用され、特定の抗原、ならびに免疫グロブリンおよび抗原特異性が欠乏する他の抗体様分子に対して結合特異性を示すポリペプチドが含まれる。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで、かつ骨髄腫により増大したレベルで産生される。本用途では、「抗体」という用語は、単クローン抗体、多クローン抗体、および抗体フラグメントを具体的に含むが、これらに限定されない。

【００４５】

「低下した酸化能」または「減少した不均質性酸化能」という用語は、酸化的アミノ酸から非酸化的アミノ酸への少なくとも１つのアミノ酸置換を有するポリペプチドを含有する抗体を表す。アミノ酸配列は、メチオニン置換であり得る。抗体ポリペプチドは、メチオニンアミノ酸残基を非酸化的アミノ酸残基で置換するために、選択的に操作され得、それによって、低下した酸化能を有する抗体を提供する。例えば、メチオニンは、ロイシン、セリン、またはアラニンで置換され得る。

【００４６】

「未変性の抗体」は、通常、２つの同一の軽（Ｌ）鎖および２つの同一の重（Ｈ）鎖から構成される約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、共有結合性のジスルフィド結合によって重鎖に連結されている一方で、ジスルフィド結合数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた、規則的間隔の鎖間ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_H）を有し、その後に多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン

（V_L）を有し、その他方の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８６：６５１（１９８５）、Ｎｏｖｏｔｎｙ ａｎｄ Ｈａｂｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８２：４５９２（１９８５））。

【００４７】

抗体鎖に関する「可変」という用語は、抗体間の配列が非常に異なり、かつ特定の各抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性が関連する抗体鎖部分を表すために使用される。かかる可変性は、軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方において、超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。未変性の重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、４つのＦＲ（それぞれ、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）を含み、ＦＲはそのほとんどが３つの超可変領域と連結したβシート配置の形態をとり、それにより、超可変領域はβシート構造に連結してループを形成し、βシート構造の一部を形成することもある。各鎖の超可変領域は、ＦＲによって他の鎖由来の超可変領域とともに極近傍に保持され、これが抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１），ｐａｇｅｓ６４７－６６９を参照）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接は関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与等の種々のエフェクター機能を示す。

【００４８】

「超可変領域」という用語は、本明細書中で抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を表す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」由来のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基３０～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、および８６～９６（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の３０～３５（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３））を含む（ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１９９６）。「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、本明細書中に定義の超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【００４９】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体を異なるクラスに割り当てることができる。５つの主な抗体クラスのＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭがあり、これらのうちのいくつかは、さらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、およびＩｇＡ２に分けられ得る。

【００５０】

異なる免疫グロブリンクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。

【００５１】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」を、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる２つの明確に異なる型の１つに割り当てることができる。

【００５２】

「抗体フラグメント」という用語は、全長抗体の一部、一般に、その抗原結合ドメインまたは可変ドメインである。抗体フラグメントの例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント、線状抗体、一本鎖抗体分子、ディアボディ、ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。抗体フラグメントのさらなる例には、ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、ｄＡｂ（単一ドメイン抗体）、および相補性決定領域（ＣＤＲ）フラグメント、ならびにその２つのループが組み

合わせ変異誘発の影響を受けやすい最小化可変ドメインであるミニボディが含まれるが、これらに限定されない。

【００５３】

「モノクローナル抗体」という用語は、Ｂ細胞の単一クローンによって合成される抗体分子を表すために使用される。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体の特徴を示し、任意の特定の方法によって抗体産生が必要であると解釈されるべきではない。したがって、モノクローナル抗体を、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５（１９７５）、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１（１９７６）に最初に記載されたハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ技術によって作製することができるか、あるいはファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【００５４】

「ポリクローナル抗体」という用語は、Ｂ細胞集団によって合成された抗体分子集団を表すために使用される。

【００５５】

「単鎖Ｆｖ」または「ｓＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Ｆｖポリペプチドは、さらに、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーを含み、それにより、ｓＦｖが抗原結合に所望の構造を形成することができる。ｓＦｖの概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ ｅｄｓ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照。単鎖抗体は、例えば、ＷＯ８８／０６６３０号およびＷＯ９２／０１０４７号に開示されている。

【００５６】

「ディアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを表し、このフラグメントは、同一ポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む（V_H－V_L）。短すぎて同一鎖上の２ドメイン間で対合が不可能なリンカーの使用により、ドメインは別の鎖の相補ドメインと強制的に対合して２つの抗原結合部位が作製される。ディアボディは、例えば、欧州特許第４０４，０９７号、ＷＯ９３／１１１６１号、およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３）において、より完全に記載されている。

【００５７】

「ミニボディ」という用語は、自己アセンブリして８０ｋＤａの２価の二量体$(scFv-CH3)_2$を形成するｓｃＦｖ－ＣＨ３融合タンパク質を表すために使用される。

【００５８】

「アプタマー」という用語は、高い特異性および親和性を有するタンパク質標的に結合する合成核酸リガンドを表すために本明細書中で使用される。アプタマーは、タンパク質機能の有力な阻害剤として公知である。

【００５９】

ｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４ ５４６（１９８９））は、V_HドメインまたはＶＬドメインからなる。

【００６０】

本明細書中で使用する場合、「抗体結合領域」という用語は、抗原に結合することが可能な免疫グロブリンまたは抗体可変領域の１つまたは複数の部分を表す。典型的には、抗体結合領域は、例えば、抗体軽鎖（ＶＬ）（またはその可変領域）、抗体重鎖（ＶＨ）（またはその可変領域）、重鎖Ｆｄ領域、Ｆａｂ、$F(ab')_2$等の抗体軽鎖と重鎖（またはその可変領域）との組み合わせ、単一ドメイン、または一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、または全長抗体、例えば、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ

４亜型）、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ抗体等である。

【００６１】

「二重特異性抗体」という用語は、２つの異なる抗原型に特異性を示す抗体を表す。この用語には、本明細書中で具体的に使用する場合、標的抗原、および特定の組織への送達を容易にする別の標的に対して結合特異性を示す抗体が含まれるが、これらに限定されない。同様に、多重特異性抗体は、２つ以上の結合特異性を有する。

【００６２】

「線状抗体」という表現は、抗原結合領域対を形成するタンデムＦｄセグメント対（$V_H-C_H1-V_H-C_H1$）を含むことを表すために使用される。線状抗体は、二重特異性または単一特性であり得、例えば、Ｚａｐａｔａ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２（１９９５）に記載されている。

【００６３】

本発明の目的のために、「抗体様分子」という用語には、ウイルス抗原に結合してそれを中和することができる上記定義の抗体フラグメント以外の任意の分子が含まれる。本用語には、具体的には、例えば、２００８年１０月２日に公開されたＰＣＴ公開第ＷＯ２００８／１１８９７０号、およびＸｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０５（３１）：１０７５６－６１（２００８）に記載されるような、代替軽鎖（ＳＬＣ）エレメントを含む「サロボディ」と呼ばれるプレＢ細胞受容体（ｐｒｅ－ＢＣＲ）様構造が含まれるが、これらに限定されない。ＳＬＣは、非共有結合したＶｐｒｅ－Ｂおよびλ５タンパク質から構成される非分散型のヘテロ二量体である。それぞれ、ＶｐｒｅＢ鎖はＶλＩｇドメインに相同であり、λ５鎖は基準抗体のＣλドメインに相同である。ヘテロ二量体ＳＬＣは、ｐｒｅ－ＢＣＲ ＨＣのＣλドメインと第１の定常ドメインとの間のジスルフィド結合によってｐｒｅ－ＢＣＲ複合体中の重鎖と共有結合している。ＳＬＣの固有の特徴は、ＶｐｒｅＢ１およびλ５ドメインの非基準ペプチドがそれぞれ伸長していることである。ＶｐｒｅＢ１はそのＣ末端にさらなる２１残基を有し、λ５はそのＮ末端上に５０アミノ酸長のテールを有する（例えば、Ｖｅｔｔｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８：４４－５５（２００６）を参照）。サロボディ構造には、具体的には、ｐｒｅ－ＢＣＲの未変性三量体ｐｒｅ－ＢＣＲ様機能単位、ＶｐｒｅＢ１とλ５との融合物、およびλ５のＮ末端５０アミノ酸、ＶｐｒｅＢ１のＣ末端２１アミノ酸、または両方のペプチド伸長物のいずれかが排除された三量体が含まれるが、これらに限定されない。加えて、古典的抗体軽鎖の定常成分を使用したキメラ構築物は、サロボディの定義内に明確に含まれる。

【００６４】

他の代表的な「抗体様分子」は、本明細書中に定義されるように、抗体代替κ軽鎖配列を含む類似の構造であり、このκ軽鎖配列は、任意に、別のポリペプチド、例えば、抗体重鎖および／または軽鎖ドメイン配列等とパートナーを組む。κ様Ｂ細胞受容体（κ様ＢＣＲ）は、κ様代替軽鎖（κ様ＳＬＣ）を使用して同定されている（Ｆｒａｎｃｅｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ １３：５９３７－４３（１９９４）、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ４８：３０５－１１（１９９８）、Ｒａｎｇｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８０：１７８０７－１４（２００５））。Ｒａｎｇｅｌら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８０（１８）：１７８０７－１７８１４（２００５）は、非再配列Ｖκ遺伝子の産物であるＶκ様タンパク質の同定および分子の特徴づけを報告しており、これは、Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ４８：３０５－３１１（１９９８）によって以前に報告されたｃＤＮＡ配列と同一であることが判明した。それに対して、Ｆｒａｎｃｅｓら、ＥＭＢＯ Ｊ １３：５９３７－４３（１９９４）は、Ｂ細胞前駆体表面でμ重鎖と会合する能力を有し、それにより、Ｂ細胞成長のためのλ５経路の代替物が得られる再配列生殖系列ＪＣｋの同定および特徴づけを報告した。κ様およびλ様ｐｒｅ－ＢＣＲが協力して軽鎖の再配列を促進するように作用し、Ｂ細胞前駆体の成熟を確実にすることが示唆されている。概説については、ＭｃＫｅｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｖａｌｄｅｚ Ｓｅｍｉｎａｒｓ ｉｎ

Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１８：４０４３（２００６）を参照。

【００６５】

「λ５」という用語は、本明細書中で最も広い意味で使用され、任意の未変性配列または変異体λ５ポリペプチドを表し、具体的には、未変性配列のヒトおよび他の哺乳動物のλ５ポリペプチド、翻訳後修飾によって形成された変異体、ならびにかかる未変性配列のポリペプチドの変異体が含まれるが、これらに限定されない。

【００６６】

「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」および「ＶｐｒｅＢポリペプチドの変異体」という用語は、交換可能に使用され、アミノ酸修飾の結果として、１つまたは複数のアミノ酸位置における未変性配列のＶｐｒｅＢポリペプチドと異なるポリペプチドであると本明細書中で定義する。「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、本明細書中に定義されるように、未変性の抗体λまたはＫ軽鎖配列またはそのフラグメントと異なるであろう。「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、好ましくは、未変性配列のＶｐｒｅＢポリペプチドと少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％の配列同一性を保持するであろう。別の好ましい実施形態では、「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、未変性抗体のλまたはＫ軽鎖配列とそのアミノ酸配列が９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、または６０％未満同一であろう。変異体ＶｐｒｅＢポリペプチドには、具体的には、ＶｐｒｅＢ配列のＣ末端の非Ｉｇ様の固有のテールが部分的または完全に除去されたＶｐｒｅＢポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。「変異体λ５ポリペプチド」および「λ５ポリペプチドの変異体」という用語は、交換可能に使用され、アミノ酸修飾の結果として、１つまたは複数のアミノ酸位置における未変性配列のλ５ポリペプチドと異なるポリペプチドであると本明細書中で定義する。「変異体λ５ポリペプチド」は、本明細書中に定義されるように、未変性抗体のλもしくはκ軽鎖配列、またはそのフラグメントと異なるであろう。「変異体λ５ポリペプチド」は、好ましくは、未変性配列のλ５ポリペプチドと少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％の配列同一性を保持するであろう。別の好ましい実施形態では、「変異体λ５ポリペプチド」は、未変性の抗体のλまたはκ軽鎖配列とそのアミノ酸配列が９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、または６０％未満同一であろう。変異体λ５ポリペプチドは、具体的には、λ５配列のＮ末端の固有のテールが部分的または完全に除去されたλ５ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【００６７】

「ＶｐｒｅＢ配列」という用語は、上記定義の「ＶｐｒｅＢ」の配列またはそのフラグメントを表すために本明細書中で使用される。

【００６８】

「λ５配列」という用語は、上記定義の「λ５」の配列またはそのフラグメントを表すために本明細書中で使用される。

【００６９】

「代替軽鎖配列」という用語は、本明細書中に定義されるように、上記定義の「ＶｐｒｅＢ配列」および／または「λ５配列」を含む任意のポリペプチド配列を意味する。

【００７０】

「κ様代替軽鎖可変ドメイン」、「Ｖκ様ＳＬＣ」、および「Ｖκ様」という用語は、交換可能に使用され、これらは、非再配列Ｖκ遺伝子およびその変異体の産物である任意の未変性配列のポリペプチドを表す。１つの実施形態では、未変性配列のＶκ様ポリペプチドの変異体は、抗体κ軽鎖配列に関連するＣ末端伸長（テール）を含む。特定の実施形態では、未変性配列のＶκ様ポリペプチドの変異体は、Ｖκ様ポリペプチドと対応する抗体κ軽鎖とを区別する固有のＣ末端伸長（テール）の少なくとも一部、好ましくはすべて

を保持する。別の実施形態では、変異体Ｖκ様ポリペプチドのＣ末端テールは、残りの配列と天然には関連しない配列である。後者の実施形態では、未変性Ｖκ様配列中に天然に存在するＣ末端テールと変異体配列との相違は、１つまたは複数のアミノ酸の改変（置換、挿入、欠失、および／または付加）に起因し得るか、またはＣ末端テールが異なるＶκ様タンパク質中に天然に存在するテールと同一であり得る。Ｖκ様ポリペプチドは、１つまたは複数の抗体κ軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列に対応する領域中にアミノ酸の改変を含み得る。すべての例では、変異体は、未変性の抗体のκ軽鎖可変領域配列と比較して少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、または少なくとも１０個のアミノ酸、好ましくは４～１００個、４～９０個、４～８０個、４～７０個、４～６０個、４～５０個、４～４５個、４～４０個、４～３５個、４～３０個、４～２５個、４～２０個、４～１５、または４～１０個のアミノ酸残基のＣ末端伸長を含むことができるか、好ましくは含む。本明細書中に定義されるように、Ｖκ様ポリペプチド変異体は、未変性の抗体のκもしくはλ軽鎖配列またはそのフラグメントと異なり、好ましくは、未変性配列のＶκポリペプチドと少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％の配列同一性を保持するであろう。別の好ましい実施形態では、Ｖκ様ポリペプチド変異体は、未変性の抗体のλまたはκ軽鎖配列とそのアミノ酸配列が９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、５０％未満、４５％未満、または４０％未満同一であろう。他の実施形態では、配列同一性は、約４０％と約９５％との間、約４５％と約９０％との間、約５０％と約８５％との間、約５５％と約８０％との間、約６０％と約７５％との間、約６０％と約８０％との間、約６５％と約８５％との間、約６５％と約９０％との間、または約６５％と約９５％との間である。すべての実施形態では、好ましくは、Ｖκ様ポリペプチドは標的に結合することができる。

【００７１】

「ＪＣκ」および「ＪＣκ様」という用語は、交換可能に使用され、これらは、未変性配列のκＪ定常（Ｃ）領域セグメントおよび固有のＮ末端伸長（テール）、ならびにその変異体と同一の部分を含む未変性配列のポリペプチドを表す。１つの実施形態では、未変性配列のＪＣκ様ポリペプチドの変異体は、抗体ＪＣセグメントと区別されるＮ末端伸長（テール）を含む。特定の実施形態では、未変性配列のＪＣκ様ポリペプチドの変異体は、ＪＣκ様ポリペプチドを対応する抗体κ軽鎖ＪＣセグメントと区別する固有のＮ末端伸長（テール）の少なくとも一部、好ましくはすべてを保持する。別の実施形態では、変異体ＪＣκ様ポリペプチドのＮ末端テールは、残りの配列と天然には関連しない配列である。後者の実施形態では、未変性ＪＣκ様配列中に天然に存在するＮ末端テールと変異体配列との相違は、１つまたは複数のアミノ酸の改変（置換、挿入、欠失、および／または付加）に起因し得るか、またはＮ末端テールは異なるＪＣκ様タンパク質中に天然に存在するテールと同一であり得る。未変性配列のＪＣκ様ポリペプチドの変異体は、未変性の抗体のκ可変ドメインＪＣ配列と同一の配列の一部に１つまたは複数のアミノ酸の改変を含み得る。すべての場合、変異体は、未変性の抗体のκ軽鎖ＪＣ配列と比較して少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、または少なくとも１０個のアミノ酸、好ましくは４～１００個、または４～９０個、または４～８０個、または４～７０個、または４～６０個、または４～５０個、または４～４５個、または４～４０個、または４～３５個、または４～３０個、または４～２５個、または４～２０個、または４～１５個、または４～１０個のアミノ酸残基のＮ末端伸長（固有のＮ末端）を含むことができるか、好ましくは含む。ＪＣκ様ポリペプチド変異体は、本明細書中に定義されるように、未変性の抗体のλもしくはκ軽鎖ＪＣ配列またはそのフラグメントと異なり、好ましくは、未変性配列のＪＣポリペプチドと少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％の配列同

一性を保持するであろう。別の好ましい実施形態では、ＪＣκ様ポリペプチド変異体は、未変性の抗体のλもしくはκ軽鎖ＪＣ配列とそのアミノ酸配列が９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、または６０％未満同一であろう。他の実施形態では、配列同一性は、約４０％と約９５％との間、約４５％と約９０％との間、約５０％と約８５％との間、約５５％と約８０％との間、約６０％と約７５％との間、約６０％と約８０％との間、約６５％と約８５％との間、約６５％と約９０％との間、または約６５％と～約９５％との間である。

【００７２】

アミノ酸配列同一率を、配列比較プログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２を用いて決定することができる（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７））。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムを、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖからダウンロードすることができるか、またはそうでなければ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤから入手することができる。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２は、いくつかの検索パラメーターを使用し、これらの検索パラメーターのすべてを、例えば、アンマスク＝イエス、鎖＝すべて、予想される発生数＝１０、最小低複雑性長＝１５／５、マルチパスｅ値＝０．０１、マルチパス定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、およびスコアリング行列＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む、デフォルト値に設定する。

【００７３】

「融合」という用語は、そのヌクレオチドコード配列のインフレームでの組み合わせによる１つのポリペプチド鎖中の異なる起源のアミノ酸の組み合わせを表すために本明細書中で使用される。「融合」という用語は、その末端の１つへの融合に加えて、内部融合、すなわち、ポリペプチド鎖内の異なる起源の配列の挿入を明確に含む。

【００７４】

本明細書中で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、すべて、共有結合性の「ペプチド結合」によって連結されたアミノ酸の一次配列を表す。一般に、ペプチドは、少数のアミノ酸、典型的には、約２～約５０個のアミノ酸からなり、タンパク質より短い。「ポリペプチド」という用語は、本明細書中に定義されるように、ペプチドおよびタンパク質を含む。

【００７５】

「アミノ酸」または「アミノ酸残基」という用語は、典型的に、その当該分野で認識された定義を有するアミノ酸、例えば、アラニン（Ａｌａ）、アルギニン（Ａｒｇ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）、システイン（Ｃｙｓ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、グリシン（Ｇｌｙ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、リシン（Ｌｙｓ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、プロリン（Ｐｒｏ）、セリン（Ｓｅｒ）、トレオニン（Ｔｈｒ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、チロシン（Ｔｙｒ）、およびバリン（Ｖａｌ）からなる群より選択されるアミノ酸等を表すが、必要に応じて、修飾アミノ酸、合成アミノ酸、または希アミノ酸を使用することができる。したがって、連邦規則集第３７巻１．８２２（ｂ）（４）に列挙した修飾アミノ酸および通常でないアミノ酸は、本定義内に具体的に含まれ、参照により本明細書に明確に組み込まれる。アミノ酸を、種々の亜群に分類することができる。したがって、アミノ酸を、非極性側鎖（例えば、Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｖａｌ）、負電荷の側鎖（例えば、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、正電荷の側鎖（例えば、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ）、または無電荷極性側鎖（例えば、Ａｓｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒ）を有するアミノ酸に分類することができる。アミノ酸を、小アミノ酸（Ｇｌｙ、Ａｌａ）、求核性アミノ酸（Ｓｅｒ、Ｈｉｓ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ）、疎水性アミノ酸（Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｐｒｏ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、アミド（Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、および塩基性アミノ酸（Ｌｙｓ

、Ａｒｇ）に分類することもできる。
【００７６】
「ポリヌクレオチド」という用語は、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子等の核酸、ならびにその類似体（例えば、ヌクレオチド類似体または核酸化学を用いて生成したＤＮＡまたはＲＮＡ）を表す。必要に応じて、ポリヌクレオチドを、例えば、当該分野で認識された核酸化学を用いて合成的に作製するか、または例えば、ポリメラーゼを用いて酵素的に作製するか、必要に応じて、修飾することができる。典型的な修飾には、メチル化、ビオチン化、および他の当該分野で公知の修飾が含まれる。加えて、核酸分子は、必要に応じて、検出可能な部分に連結した一本鎖または二本鎖であり得る。
【００７７】
基準ポリペプチドに関する「変異体」という用語は、未変性ポリペプチドと比較して、少なくとも１つのアミノ酸の変異または修飾（すなわち、改変）を保有するポリペプチドを表す。「アミノ酸修飾」によって生成された変異体を、例えば、未変性アミノ酸配列中の少なくとも１つのアミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または化学修飾によって産生することができる。
【００７８】
「アミノ酸修飾」は、所定のアミノ酸配列のアミノ酸配列の変化を表す。例示的な修飾には、アミノ酸の置換、挿入、および／または欠失が含まれる。
【００７９】
「特定の位置でのアミノ酸修飾」は、特定の残基の置換もしくは欠失、または特定の残基に隣接する少なくとも１つのアミノ酸残基の挿入を表す。「隣接する」特定の残基の挿入は、その１～２個の残基内の挿入を意味する。挿入は、特定の残基のＮ末端またはＣ末端であり得る。
【００８０】
「アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸配列中の少なくとも１つの既存のアミノ酸残基の別の異なる「置換」アミノ酸残基との置換を表す。置換残基または残基は、「天然に存在するアミノ酸残基」（すなわち、遺伝子コードによってコードされる）であり得、アラニン（Ａｌａ）、アルギニン（Ａｒｇ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）、システイン（Ｃｙｓ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、グリシン（Ｇｌｙ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、リシン（Ｌｙｓ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、プロリン（Ｐｒｏ）、セリン（Ｓｅｒ）、トレオニン（Ｔｈｒ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、チロシン（Ｔｙｒ）、およびバリン（Ｖａｌ）からなる群より選択され得る。１つまたは複数の天然に存在しないアミノ酸残基との置換はまた、本明細書中のアミノ酸置換の定義に含まれる。
【００８１】
「天然に存在しないアミノ酸残基」は、ポリペプチド鎖中の隣接アミノ酸残基に共有結合することができる上記列挙の天然に存在するアミノ酸残基以外の残基を表す。天然に存在しないアミノ酸残基の例には、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、およびＥｌｌｍａｎらのＭｅｔｈ．Ｅｎｚｖｍ．２０２：３０１　３３６（１９９１）に記載されるもの等の他のアミノ酸残基類似体が含まれる。かかる天然に存在しないアミノ酸残基を生成するために、Ｎｏｒｅｎら　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：１８２（１９８９）およびＥｌｌｍａｎら（前出）の手順を使用することができる。簡潔に述べれば、これらの手順は、天然に存在しないアミノ酸残基での抑制性ｔＲＮＡの化学的活性化およびその後のＲＮＡのインビトロ転写および翻訳を含む。
【００８２】
「アミノ酸挿入」は、所定のアミノ酸配列への少なくとも１つのアミノ酸の組み込みを表す。挿入は、通常、１つまたは２つのアミノ酸残基の挿入からなる一方で、本出願は、より巨大な「ペプチド挿入」、例えば、約３～約５個、またはさらに約１０個までのアミノ酸残基の挿入を企図する。挿入される残基は、上記開示の天然に存在する残基または天

然に存在しない残基であり得る。

【００８３】

「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも１つのアミノ酸残基の除去を表す。

【００８４】

「変異誘発」という用語は、他で特定しない限り、任意の当該分野で認識されたポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を改変させる技術を表す。好ましい変異誘発型には、エラー多発性ＰＣＲ変異誘発、飽和変異誘発、または他の部位特異的変異誘発が含まれる。

【００８５】

「部位特異的変異誘発」は、当該分野で標準的な技術であり、少数のミスマッチを除いて所望の変異を示す変異誘発すべき一本鎖ファージＤＮＡに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行う。簡潔に述べれば、合成オリゴヌクレオチドを、一本鎖ファージＤＮＡに相補的な鎖の合成を指示するためのプライマーとして使用し、得られた二本鎖ＤＮＡを、ファージ支持宿主細菌に形質転換する。形質転換された細菌の培養物を上層寒天にプレートし、ファージを保有する単一の細胞からプラークを形成させる。理論的には、新規のプラークの５０％が一本鎖として変異形態を有するファージを含み、５０％が元の配列を有するであろう。目的のプラークを、正確に適合するハイブリッド形成が可能であるが、元の鎖とのミスマッチがハイブリッド形成を阻止するのに十分である温度でのキナーゼ化合成プライマーとのハイブリッド形成によって選択する。次いで、プローブとハイブリッド形成するプラークを選択し、配列決定し、培養し、ＤＮＡを回収する。

【００８６】

「中和分子」という用語は、本明細書中でその最も広い意味で使用され、これは、中和を達成する機構と無関係にウイルスが標的細胞に複製的に感染するのを阻害する任意の分子を表す。中和分子は、好ましくは、上記定義の抗体または抗体様分子もしくは結合分子である。中和は、例えば、細胞表面へのウイルスの付着または接着を阻害することによって、例えば、ウイルスの付着または接着を担う部位に直接結合するか、またはその近傍で結合する抗体または抗体様分子もしくは結合分子等の分子を操作することによって、達成することができる。中和はまた、ビリオン表面に指向してビリオンの凝縮をもたらす抗体または抗体様分子等の分子によって達成することができる。中和は、標的細胞へのウイルスの付着後のウイルス膜と細胞膜との融合の阻害、エンドサイトーシスの阻害、および感染細胞由来の子孫ウイルスの阻害等によってさらに生じ得る。本発明の、抗体または抗体様分子もしくは結合分子等の中和分子は、中和を達成する機構によって制限されない。

【００８７】

「抗体レパートリー」という用語は、本明細書中で最も広い意味で使用され、これは、結合能力、結合特異性、胃腸管輸送能力、安定性、および親和性等の特定の性質をスクリーニングするために使用することができる抗体または抗体フラグメントの集団を表す。本用語には、具体的には、例えば、抗体ファージ提示ライブラリー等の組み合わせライブラリーのすべての型を含む、抗体ライブラリーが含まれ、これには、ナイーブライブラリー、合成ライブラリー、および半合成ライブラリーを含む、任意の供給源由来の単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）およびＦａｂ抗体ファージ提示ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。

【００８８】

同様に、（上記定義のように）「抗体様分子のレパートリー」は、結合能力、結合特異性、胃腸管輸送能力、安定性、および親和性等の特定の性質をスクリーニングするために使用することができる、かかる分子の集団を表す。本用語には、具体的には、サロボディライブラリーおよびκ様軽鎖構築物のライブラリー（上記定義）が含まれ、これらには、例えば、抗体ファージ提示ライブラリー等の組み合わせライブラリーのすべての型が含まれる。組み合わせサロボディライブラリーは、例えば、Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，（２００８）、（前出）に開示されている。

【００８９】
「抗体レパートリー」という用語は、本明細書中で最も広い意味で使用され、これは、結合能力、結合特異性、胃腸管輸送能力、安定性、および親和性等の特定の性質をスクリーニングするために使用することができる抗体または抗体フラグメントの集団を表す。本用語には、具体的には、例えば、抗体ファージ提示ライブラリー等の組み合わせライブラリーのすべての型を含む、抗体ライブラリーが含まれ、これには、ナイーブライブラリー、合成ライブラリー、および半合成ライブラリーを含む、任意の供給源由来の単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）およびＦａｂ抗体ファージ提示ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。
【００９０】
「ファージ提示ライブラリー」は、ファージコートタンパク質との融合物としてのクローン化タンパク質配列集団を発現するタンパク質発現ライブラリーである。したがって、「ファージ提示ライブラリー」という語句は、本明細書中で、ファージ（例えば、繊維状ファージ）の集団を表し、このファージは外部（典型的には、異種）タンパク質を発現する。外部タンパク質は、ファージが接触する他の部分と自由に相互作用する（または結合する）。外部タンパク質を提示する各ファージは、ファージ提示ライブラリーの「メンバー」である。
【００９１】
「抗体ファージ提示ライブラリー」は、抗体または抗体フラグメントを提示するファージ提示ライブラリーを表す。抗体ライブラリーには、ファージ集団、かかるファージ集団をコードするベクター集団、またはかかるファージ集団もしくはベクター集団を保有する細胞が含まれる。ライブラリーは、ファージ粒子あたり平均して１つの一本鎖抗体または抗体フラグメントを提示する１価であり得るか、ウイルス粒子あたり平均して２つ以上の抗体または抗体フラグメントを提示する２価であり得る。「抗体フラグメント」という用語には、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）フラグメントおよびＦａｂフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。好ましい抗体ライブラリーは、平均して10^6個超、10^7個超、10^8個超、または10^9個超の異なるメンバーを含む。
【００９２】
「繊維状ファージ」という用語は、その表面上に異種ポリペプチドを提示することができるウイルス粒子を表し、繊維状ファージには、ｆ１、ｆｄ、Ｐｆ１、およびＭ１３が含まれるが、これらに限定されない。繊維状ファージは、テトラサイクリン（例えば、「ｆｄ－ｔｅｔ」）等の選択マーカーを含むことができる。種々の繊維状ファージ提示系が当業者に周知である（例えば、Ｚａｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｇｅｎｅ ９：１２７－１４０（１９８０）、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１３１５－１３１７（１９８５）、およびＰａｒｍｌｅｙ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｇｅｎｅ ７３：３０５－３１８（１９８８）を参照）。
【００９３】
「パニング」という用語は、標的に対して高い親和性および特異性を有する抗体等の化合物を保有するファージの同定および単離における複数ラウンドのスクリーニング過程を表すために使用される。
【００９４】
本明細書中で使用する、「非ヒト動物」という用語は、哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）、および例えば、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、ウマ、およびロバ等の非げっ歯類動物を含むが、これらに限定されない。鳥類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、およびガチョウ等）も含まれる。本明細書中で使用する、「非霊長類動物」という用語は、特に上記列挙の哺乳動物を含むが、これらに限定されず、霊長類以外の哺乳動物を表す。
【００９５】
「機能的に異なる抗体」という語句、およびその文法上の変異体は、結合特異性、結合親和性、および例えば、標的を中和する能力、もしくは生物学的活性の範囲または質等の

任意の免疫学的機能または生物学的機能を含むが、これらに限定されず、少なくとも１つの性質が互い異なる抗体を表すために使用される。

【００９６】

「保存アミノ酸残基」という語句は、互いに整列している２つ以上のアミノ酸配列間で同一のアミノ酸残基を表すために使用される。

【００９７】

本明細書中で使用する場合、「エピトープ」という用語は、少なくとも約３～５個、好ましくは少なくとも約５～１０個、または少なくとも約５～１５個のアミノ酸、典型的には、せいぜい５００個または約１，０００個のアミノ酸の配列を表し、それ自体またはより大きな配列の一部として、かかる配列に応答して生成される抗体に結合する配列を定義する。エピトープは、それが由来する親タンパク質の一部と同一の配列を有するポリペプチドに制限されない。実際、ウイルスゲノムは、その状態が絶えず変化し、分離株間で比較的高い変異性を示す。したがって、「エピトープ」という用語は、未変性配列と同一の配列、および未変性配列の欠失、置換および／または挿入等の修飾物を含む。一般に、かかる修飾物は事実上保存されるが、非保存的修飾も企図される。この用語には、具体的には、「ミモトープ」、すなわち、連続的な線状の未変性配列を同定しないか、あるいは必ずしも未変性タンパク質中に生じないが、未変性タンパク質上のエピトープを機能的に模倣する配列が含まれる。「エピトープ」という用語には、具体的には、線状および立体構造エピトープが含まれる。

【００９８】

Ｂ．一般的技術

本発明の方法を実施するための技術当該分野で周知であり、標準的な実験テキスト（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｄ．Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌ ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｐ．Ｍ．Ｏ‘Ｂｒｉａｎ ａｎｄ Ｒ．Ａｉｔｋｅｎ ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１７８、Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃ．Ｆ．Ｂａｒｂａｓ ＩＩＩ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１、およびＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｇ．Ｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ，ｅｄ．，Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ，２００４に記載されている。変異誘発を、例えば、部位特異的変異誘発（Ｋｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８２：４８８－４９２（１９８５））を用いて行うことができる。

【００９９】

１つの態様では、本発明のウイルス抗原中和分子は、典型的には、抗体または多様なポリペプチドライブラリーを用いて選択される抗体である。以下の記載では、本発明は、ある抗体ライブラリー型を参照して例示しているが、本発明は、任意の特定の抗体または多様なポリペプチドライブラリー型の使用に制限されない。組換えモノクローナル抗体ライブラリーは、免疫フラグメントまたはナイーブフラグメントに基づき得る。免疫抗体ライブラリー由来の抗体は、典型的には、無作為な組み合わせライブラリーを産生するために、元のＢ細胞から発現に適切なベクターにクローン化されるV_HおよびV_L遺伝子プールを使用して構築し、その後に抗体を選択および／またはスクリーニングすることができる。他のライブラリー型は、抗原に結合するクローンに明確に偏っていない遺伝子供給源由来の抗体フラグメントから構成され得る。したがって、ナイーブ抗体ライブラリーは、天

然で免疫化されていない再配列Ｖ遺伝子に由来する。合成抗体ライブラリーを、１つまたは複数のＶ遺伝子のＣＤＲへの完全または適合した縮重領域の導入するインビトロ法によって完全に構築する。半合成ライブラリーは、天然の多様性と合成の多様性が組み合わされており、しばしば、天然の多様性が増加する一方で、所望のレベルの機能的多様性が保持されるように作製される。したがって、かかるライブラリーは、例えば、天然ＣＤＲ領域のシャフリング（Ｓｏｄｅｒｌｉｎｄ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：８５２－８５６（２０００））またはヒトＢ細胞由来の天然に再配列されたＣＤＲ配列と合成ＣＤＲ１およびＣＤＲ２多様性との組み合わせ（Ｈｏｅｔ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：４５５－３８（２００５））によって作製することができる。本発明は、ナイーブ抗体ライブラリー、合成抗体ライブラリー、および半合成抗体ライブラリー、またはその任意の組み合わせの使用を含む。

【０１００】

同様に、本発明の方法は、抗体の提示のために使用されるいかなる特定の技術にも制限されない。本発明はファージ提示を参照して例示されているが、本発明の抗体を、他の提示および富化技術によって同定することもできる。抗体フラグメントは、抗体遺伝子をコードする繊維状ファージの表面上に提示されている（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，２２２：３８１ ３８８（１９９２）、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ３４８（６３０１）：５５２ ５５４（１９９０）、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ ＥＭＢＯ Ｊ．，１３（１４）：３２４５－３２６０（１９９４））。抗体ライブラリーの選択およびスクリーニング技術の概説については、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（９）：１１０５－１１１６（２００５）を参照。加えて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（Ａｇｔｅｒｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ，Ｇｅｎｅ ８８：３７－４５（１９９０）、Ｃｈａｒｂｉｔ ｅｔ ａｌ，Ｇｅｎｅ ７０：１８１－１８９（１９８８）、Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：２７１３－２７１７（１９９２））およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ等の酵母（Ｂｏｄｅｒ ａｎｄ Ｗｉｔｔｒｕｐ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３－５５７（１９９７）、Ｋｉｅｋｅ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１０：１３０３－１３１０（１９９７））の表面上の異種タンパク質およびそのフラグメントの提示について当該分野で公知の系が存在する。他の公知の提示技術には、リボゾームまたはｍＲＮＡ提示（Ｍａｔｔｈｅａｋｉｓ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ，ＵＳＡ ９１：９０２２－９０２６（１９９４）、Ｈａｎｅｓ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ，ＵＳＡ ９４：４９３７－４９４２（１９９７））、ＤＮＡ提示（Ｙｏｎｅｚａｗａ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．３１（１９）：ｅ１１８（２００３））、細菌提示等の微生物細胞提示（Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１５：２９－３４（１９９７））、哺乳動物細胞上の提示、胞子提示（Ｉｓｔｉｃａｔｏ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８３：６２９４－６３０１（２００１）、Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ７１：３３３７－３３４１（２００５）、および２００６年１１月１３日に出願された同時係属の米国仮出願第６０／８６５，５７４号））、レトロウイルス提示等のウイルス提示（Ｕｒｂａｎ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３３：ｅ３５（２００５）、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づいた提示（Ｏｄｅｇｒｉｐ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ａｃａｄ．Ｎａｔｌ、Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０１：２８０６－２８１０（２００４）、Ｒｅｉｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３３：ｅ１０（２００５）、ならびにマイクロビーズ提示（Ｓｅｐｐ ｅｔ ａｌ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５３２：４５５－４５８（２００２））が含まれる。

【０１０１】

Ｃ．好ましい実施形態の詳細な説明

１つの態様では、本発明は、インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／

または１つを超える分離株を中和し、ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合するが、血球凝集を阻害しないモノクローナル抗体および抗体様分子の選択、産生、および使用に関する。

【０１０２】

インフルエンザＡ型ウイルスのビリオンは、８セグメントの線状の負のセンス一本鎖ＲＮＡを含む。総ゲノム長は１３６００ヌクレオチドであり、この８セグメントは、２３５０ヌクレオチド長、２３５０ヌクレオチド長、２２５０ヌクレオチド長、１７８０ヌクレオチド長、１５７５ヌクレオチド長、１４２０ヌクレオチド長、１０５０ヌクレオチド長、および９００ヌクレオチド長である。インフルエンザＡ型ウイルスの宿主特異性および弱毒化は、ウイルス血球凝集素（Ｈ、ＨＡ）、核タンパク質（ＮＰ）、マトリックス（Ｍ）、および非構造（ＮＳ）遺伝子にそれぞれまたはウイルス遺伝子の組み合わせで寄与している（例えば、Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １２７：３６１－３７３（１９８３）、Ｓｃｈｏｌｔｉｓｓｅｋ ｅｔ ａｌ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １４７：２８７－２９４（１９８５）、Ｓｎｙｄｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２４：４６７－４６９（１９８６）、Ｔｉａｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５３：７７１－７７５（１９８５）、Ｔｒｅａｎｏｒ ｅｔ ａｌ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７１：１－９（１９８９）を参照）。

【０１０３】

血球凝集素およびノイラミニダーゼタンパク質を含む、インフルエンザＡ型ウイルスおよびその表面タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、例えば、Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ Ｇｒｏｕｐ ｏｆ Ｌｏｓ Ａｌａｍｏｓ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙが保持しているインフルエンザ配列データベース等のＧｅｎＢａｎｋおよび他の配列データベースから利用可能である。インフルエンザＡ型ウイルス血球凝集素の１５種の公知のＨ亜型（Ｈ１～Ｈ１５）のアミノ酸配列は、２００８年1月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に示されている。さらなるインフルエンザＡ型ウイルス血球凝集素亜型（Ｈ１６）が、最近スウェーデンにてユリカモメから単離され、Ｆｏｕｃｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７９（５）：２８１４－２２（２００５）によって報告された。各Ｈ亜型の非常に多様な株も公知である。例えば、Ｈ５ Ａ／香港／１５６／９７と指定されたＨＡタンパク質配列は、１９９７年５月に香港でヒトから単離されたインフルエンザＡ型Ｈ５Ｎ１ウイルスから決定され、Ｓｕａｒｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：６６７８－６６８８（１９９８）に他の関連Ｈ５Ｎ１分離株から得たいくつかのさらなる株の配列と比較して示されている。

【０１０４】

インフルエンザウイルスノイラミニダーゼの触媒部位および抗原部位の構造はＣｏｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３０３：４１－４（１９８３）によって公開されており、ノイラミニダーゼ配列はＧｅｎＢａｎｋおよび他の配列データベースから利用可能である。

【０１０５】

感染個体の免疫応答に起因するウイルス特異的抗体が、典型的にはウイルス血球凝集素との相互作用を介してウイルスを中和することが公知である（Ａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２８：１－５４（１９８６）、Ｃｏｕｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｏｂｉｏｌ．３７：５２９－５４９（１９８３））。インフルエンザウイルス血球凝集素の三次元構造およびインフルエンザウイルス血球凝集素と中和抗体との複合体の結晶構造も決定され、公開されている（例えば、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２８９：３６６－７３（１９８１）、Ｒｕｉｇｒｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６９（Ｐｔ １１）：２７８５－９５（１９８８）、Ｗｒｉｇｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １３１（２）：３０８－１４（１９８３）、Ｄａｎｉｅｌｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．６

：１４５９－１４６５（１９８７）、およびＢｉｚｅｂａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７６：９２－９４（２００２）を参照）。

【０１０６】

本発明によれば、所望の性質を有する抗体を１つまたは複数の抗体ライブラリーから特定し、この抗体は、種々の供給源に由来し、異なる型であり得る。

【０１０７】

包括的ヒトインフルエンザ抗体ライブラリー

包括的ヒトインフルエンザ抗体ライブラリーは、種々の以前のインフルエンザ、季節性の大流行、エピデミック、ならびに１９６８年の香港風邪（Ｈ３Ｎ２）、１９５７年のアジア風邪（Ｈ２Ｎ２）、１９１８年のスペイン風邪（Ｈ１Ｎ１）、および２００４／２００５年のトリインフルエンザ（Ｈ５Ｎ１）を含む、パンデミックの回復期患者から得た抗体から作製することができる。例えば、２００８年1月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照。かかるライブラリーを調製するために、血液または骨髄のサンプルを、インフルエンザウイルスに感染していることが知られているか疑いのある個体から採取する。特に地理的に離れた供給源由来の末梢血サンプルを、輸送および使用前に安定化することが必要であり得る。この目的のためのキットは、周知かつ市販されており、例えば、ＢＤ Ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ（登録商標）ＣＰＴ（商標）細胞調製管等をリンパ球の遠心精製のために使用することができ、グアニジウム、トリゾール、またはＲＮＡｌａｔｅｒをサンプル安定化のために使用した。安定化リンパ球または全骨髄の受け取りの際、当該分野で公知の免疫グロブリンオリゴプライマーを使用してＲＴ－ＲＣＰを行い、重鎖および軽鎖レパートリーをレスキューする。当該分野で公知の手順に従って、ＰＣＲレパートリー産物をリンカーオリゴと組み合わせてｓｃＦｖライブラリーを生成し、ｍ１３ｐＩＩＩタンパク質を使用してインフレームで直接クローン化する。

【０１０８】

典型的なプロトコルでは、ヒト血清中の抗体を、例えば、周知の血球凝集素阻害（ＨＡＩ）アッセイ（Ｋｅｎｄａｌ，Ａ．Ｐ．、Ｍ．Ｓ．Ｐｅｒｅｉｒａ ａｎｄ Ｊ．Ｊ．Ｓｋｅｈｅｌ．１９８２．Ｃｏｎｃｅｐｔｓ ａｎｄ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｆｏｒ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ－ｂａｓｅｄ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ ｓｕｒｖｅｉｌｌａｎｃｅ．Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ，Ａｔｌａｎｔａ，Ｇｅｏｒｇｉａ）またはマイクロ中和アッセイ（Ｈａｒｍｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２６：３３３－３３７（１９８８））を含む、周知の血清学的アッセイによって検出することができる。血清サンプルがインフルエンザ中和抗体を含むと既に確認されている場合、この検出工程は必要ないかもしれない。全血由来のリンパ球または骨髄中に存在するリンパ球を、次に、当該分野で公知の方法によって処理する。新鮮な組織またはＲＮＡｌａｔｅｒで安定化した組織由来の全ＲＮＡを、ＴｒｉＢＤ試薬（Ｓｉｇｍａ）によって抽出する。その後、単離したドナー総ＲＮＡを、Ｏｌｉｇｏｔｅｘ精製（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、ｍＲＮＡにさらに精製する。次に、ＡｃｃｕＳｃｒｉｐｔ逆転写酵素（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のプロトコルに従ったランダム九量体オリゴヌクレオチドおよびまたはオリゴ（ｄＴ）$_{18}$プライマーの使用によって第１のｃＤＮＡ鎖を合成する。簡潔に述べれば、１００ｎｇのｍＲＮＡ、０．５ｍＭのｄＮＴＰ、および３００ｎｇのランダム九量体およびまたは５００ｎｇのオリゴ（ｄＴ）$_{18}$プライマーを含むＡｃｃｕｓｃｒｉｐｔＲＴ緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を６５℃で５分間インキュベートし、その後に４℃に急冷する。次いで、１００ｍＭのＤＴＴ、Ａｃｃｕｓｃｒｉｐｔ ＲＴ、およびＲＮＡｓｅ Ｂｌｏｃｋを各反応物に添加し、４２℃で１時間インキュベートし、逆転写酵素を７０℃で１５分間の加熱によって不活性化する。得られたｃＤＮＡを抗体重鎖および軽鎖Ｖ遺伝子のＲＴ－ＰＣＲ増幅のテンプレートとして使用することができ、次いで、ベクターにクローン化することができるか、またはファージ提示ライブラリーを意図する場合、ファージベクター

にクローン化することができる。この手順により、抗体重鎖および軽鎖可変領域クローンのレパートリー（V_HおよびV_Lライブラリー）が得られ、これを分離したままにするか、スクリーニングのために組み合わせることができる。

【０１０９】

１９１８年のスペイン風邪等の先のエピデミックおよびパンデミックの生存者の末梢リンパ球由来の免疫グロブリンレパートリーを、上記に類似の様式で回収し、安定化し、レスキューすることができる。さらなるＨ１およびＨ３ライブラリーレパートリーを、適切にタイミングを合わせてワクチン接種を行った局所起源のドナーから回収することができる。さらなる選択肢として、市販の骨髄総ＲＮＡまたはｍＲＮＡを商業的供給源から購入し、Ｈ２抗体スクリーニングにも適切なドナーの背景に応じてＨ１およびＨ３に適切なライブラリーを産生することができる。

【０１１０】

合成ヒト様レパートリー

本発明の方法では、合成ヒト抗体レパートリーを、合成抗体ライブラリーによって示すことができ、このレパートリーを、当該分野で公知の方法によって作製することができるか、または商業的供給源から入手することができる。したがって、例えば、完全に合成のヒトレパートリーは、２００９年3月２６日に出願されたＨｏｒｏｗｉｔｚらの米国特許出願公開第２００９００８２２１３号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。簡潔に述べれば、この特許出願は、所定のアミノ酸が、目的の免疫グロブリンの１つまたは複数の相補性決定領域に組み合わせて導入された免疫グロブリンのライブラリーを記載している。さらに、例えば、かかるライブラリーのサブセットを含むユニバーサル免疫グロブリンライブラリーは、２００３年１２月１１日に公開された米国特許出願公開第２００３０２２８３０２号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１１１】

種々の変異を有する抗体重鎖および軽鎖の特定のサブライブラリーを組み合わせて、本発明の抗体のフレームワーク構築物を得て、その後に重鎖および軽鎖の両方のＣＤＲに多様性を導入することができる。この多様性を、例えば、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発等の当該分野で公知の方法によって達成することができ、これを数回繰り返して多様性をさらに増大させることができる。したがって、例えば、複数のＫｕｎｋｅｌ変異誘発ラウンドによって重鎖および軽鎖ＣＤＲ１およびＣＤ２領域に多様性を個別または同時に導入することができる。必要に応じて、種々のＫｕｎｋｅｌクローンを、ＣＤＲの長さによって分離することができ、そして／またはターゲティングしたＣＤＲ（例えば、ＣＤＲ１またはＣＤＲ３）中に多様性を欠くクローンを、例えば、テンプレート特異的制限酵素での消化によって除去することができる。これらの工程の完了の際、ライブラリーのサイズは、約10^9メンバーを超えるべきであるが、より少数のメンバーを有するライブラリーも有用である。

【０１１２】

特定の実施形態では、免疫化抗体ライブラリーおよび合成抗体ライブラリーの両方を、本発明の中和抗体の同定のために使用する。２つのライブラリー型は基本的に異なる。合成抗体ライブラリーは、抗原に結合する能力が予想されるヒト抗体集団を合成する一方で、免疫化レパートリーはトリＨ５血球凝集素、および／またはＨ１、Ｈ２、またはＨ３血球凝集素（場合による）を特異的に認識するための配列を含むであろう。したがって、免疫化レパートリーは、理論的には、ターゲティングしたインフルエンザ亜型の重要成分を認識するように最適化される。これらの相違の結果として、２つの方法によって異なる抗体組が産生され、したがって、所望の中和抗体を同定するためのより有効なアプローチが得られる。

【０１１３】

高免疫化非ヒト霊長類抗体ライブラリー

本方法では、抗体ライブラリーを、例えば、マカクまたはヒヒ等の高免疫化非ヒト霊長

類から救済する。具体的には、非ヒト霊長類を、インフルエンザＡ型ウイルスの種々の亜型または種々の血球凝集素（Ｈ）タンパク質で免疫化する。動物が免疫化されるインフルエンザＡ型ウイルス亜型または血球凝集素を認識する抗体の力価を生じる動物を屠殺し、その脾臓を採取する。上の包括的インフルエンザ抗体ライブラリーについて記載されるように、免疫化した動物の血液または骨髄を採取し、産生された抗体を回収し、増幅する。

【０１１４】

本発明の中和抗体の単離のための戦略

使用した抗体ライブラリーの型と無関係に、例えば、２つの異なるインフルエンザＡ型亜型および／または同一亜型の２つの株（分離株）、ならびに／またはヒトおよび非ヒト分離株との反応を示す等の二重特異性を有する抗体を、調節された交差反応選択および／または定方向組み合わせおよび／または変異誘発操作によって発見および最適化することができる。

【０１１５】

図１に例示する典型的な富化スキームでは、標的ＡおよびＢと指定した２つの標的に交差反応性を示す抗体を含むライブラリーを、複数の富化ラウンドに供する（２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）。富化が標的Ａとの反応性に基づく場合、各富化ラウンドにより、標的Ａに対してプールの反応強度が増加するであろう。同様に、富化が標的Ｂとの反応性に基づく場合、各富化ラウンドにより、標的Ｂに対してプールの反応強度が増加するであろう。このアプローチが、ファージ提示ライブラリーをスクリーニングする場合に使用される選択方法であるパニング（以下を参照）を表すにもかかわらず、アプローチは、上記で考察した任意のライブラリー型、当該分野で公知の他の型、および任意の提示技術型に等しく適用可能である。標的ＡおよびＢには、インフルエンザウイルスの種々の分離株、型、および亜型が含まれるが、これらに限定されない、抗体が結合する任意の標的が含まれる。

【０１１６】

本発明の目的が複数の特異性を有する中和抗体を同定することであるので、交差反応発見選択スキームが開発された。簡潔にするために、このスキームを、二重特異性を有する抗体の選択を示す図２に例示する。この場合、２つの標的である標的ＡおよびＢとの反応性を示す抗体を含む抗体ライブラリーを、一方の標的（例えば、標的Ａ）との反応性について最初に選択し、その後に他方の標的（例えば、標的Ｂ）との反応性について選択する。それぞれの連続的な選択ラウンドにより、両標的に対する得られたプールの反応強度を増加させる（２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）も参照されたい）。したがって、本方法は、二重特異性を有する抗体の同定に特に有用である。もちろん、本方法を、さらなる標的に対するさらなる富化ラウンドを含めることによって、さらなる標的に対する反応性を示す抗体の同定に拡大することができる。また、スクリーニングされるライブラリーがファージ提示ライブラリーである場合、交差反応パニングによって選択を行うが、他のライブラリーおよび他の選択方法を使用することもできる。

【０１１７】

上記で考察した２つの方法の組み合わせは、上記のように、それぞれ標的Ａおよび標的Ｂに対する反応性についての２つの個別の富化ラウンド、得られた２つのプールの組換え、およびその後の交差反応選択ラウンドを含む（２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）。このアプローチを、図１に例示する。純粋な交差反応と同様に、組換えられたライブラリーの各選択ラウンドにより、両標的に対する得られたプールの反応強度が増加する。

【０１１８】

図２に例示するさらなる実施形態では、第１に、標的Ａと強い反応性を示し、かつ標的Ｂと検出可能な交差反応性を有するクローンを同定する。このクローンに基づいて、変異

誘発ライブラリーを調製し、次いで、交互のラウンドにおいてそれぞれ標的Ｂおよび標的Ａとの反応性について選択する。このスキームにより、標的Ａとの強い反応性を保持し、かつ標的Ｂとの反応性が増加した抗体が得られる（２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）。これまでと同様に、スクリーニングされるライブラリーがファージ提示ライブラリーである場合、パニングによって選択を行うが、同一の戦略に従って、他のライブラリー、他の提示技術、および他の選択方法を使用することもできる。

【０１１９】

上記で考察するように、標的ＡおよびＢは、例えば、インフルエンザＡ型ウイルスの２つの異なる亜型、同一のインフルエンザＡ型ウイルスの２つの異なる株（分離株）、２つの異なる種（一方の種は好ましくはヒトである）由来の亜型または分離株であり得る。したがって、例えば、標的Ａは、Ｈ１Ｎ１ウイルスのニューカレドニア分離株の分離株であり得、標的Ｂは、Ｈ３Ｎ２ウイルスのウィスコンシン分離株であり得る。これらの例は例示のみを目的とし、任意の２つまたは複数の標的に対する二重および複数の特異性を有する抗体を類似の様式で同定、選択、および最適化することができることを強調しておく。

【０１２０】

代替として、個別のフレームワークおよびＣＤＲの長さを分離することが可能なＵＡＬ等の抗体ライブラリーを使用して、標的Ａに対する抗体を見出す場合、抗原Ｂをスクリーニングし、ライブラリーを類似のパラメーターの多様な集団に制限することができる。一旦抗原Ｂに対する抗体が見出された場合、各Ａ抗体およびＢ抗体に基づいたキメラ抗体または変異誘発抗体を使用して二重特異性集団を操作することができる。

【０１２１】

ファージ提示

特定の実施形態では、本発明は、複数の（二重を含む）特異性を有するモノクローナル中和抗体を機能的に発見するためにファージ提示抗体ライブラリーを使用する。かかる抗体は、例えば、Ｈ１、Ｈ３、および／またはＨ９亜型、Ｈ１およびＨ３、Ｈ５およびＨ１等のＨ５、Ｈ７、および／またはＨ９亜型；Ｈ５およびＨ２；Ｈ５およびＨ３；Ｈ５、Ｈ１、およびＨ２；Ｈ５、Ｈ１、およびＨ３；Ｈ５、Ｈ２、およびＨ３；Ｈ１、Ｈ２およびＨ３等の亜型を含む、１つを超えるインフルエンザＡ型ウイルス亜型、ならびに／または同一亜型の１つを超える株（分離株）を中和することができるモノクローナル抗体であり得る。

【０１２２】

ファージ抗体ライブラリーを生成するために、上記考察のライブラリーを含む、任意の供給源から得たｃＤＮＡライブラリーをファージベクターにクローン化する。

【０１２３】

したがって、例えば、上記のようにＲＴ－ＰＣＲによってリンパ球または骨髄からレスキューした抗体重鎖および軽鎖レパートリー集団を、ｍ１３　ｐＩＩＩタンパク質に融合したｓｃＦｖライブラリーとして再アセンブリする。組み合わせライブラリーは、約10^6超、10^7超、10^8超、または10^9超の異なるメンバーを含み、10^7超もしくはそれ以上の異なるメンバーが好ましい。品質管理のために、ランダムクローンを配列決定して、全体的なレパートリーの複雑さを評価する。

【０１２４】

同様に、ナイーブ、免疫化ヒト、または高免疫化非ヒト霊長類の抗体ライブラリー由来の重鎖および軽鎖可変領域の最初のＰＣＲ救済後、ＰＣＲ産物をリンカーオリゴと組み合わせて、Ｍ１３　ｐＩＩＩコートタンパク質を使用してインフレームで直接クローン化するためのｓｃＦｖライブラリーを生成する。このライブラリーは、約10^6超、10^7超、10^8超、または10^9超の異なるメンバーを含み、10^7超もしくはそれ以上の異なるメンバーが好ましい。品質管理のために、ランダムクローンを配列決定して、全体的なレパートリーのサイズおよび複雑さを評価する。

【０１２５】

抗体ファージ提示ライブラリーは、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）形式またはＦａｂ形式等の種々の形式の抗体を含むことができる。概説については、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７８：１－３７（２００２）を参照。

【０１２６】

スクリーニング

所望の中和特性を有する抗体を同定するためのスクリーニング方法を、上記している。所望の血球凝集素タンパク質への直接結合に基づいて反応性を評価することができる。

【０１２７】

血球凝集素（ＨＡ）タンパク質の産生

血球凝集素（ＨＡ）タンパク質を、組換えＤＮＡテクノロジーによって産生することができる。この方法では、ＨＡ遺伝子を、適切なベクター、好ましくは、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ９）細胞等のバキュロウイルス感染昆虫細胞における発現のためのバキュロウイルス発現ベクターにクローン化する。

【０１２８】

ＨＡタンパク質をコードする核酸を、ポリ－ｈｉｓ（ヘキサヒスチジンタグ）等のＣ末端エピトープタグを使用するか使用しないで、Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）等のバキュロウイルス発現ベクターに挿入する。ポリ－ｈｉｓタグは、ニッケルキレートクロマトグラフィーによる容易な精製を提供する。

【０１２９】

一般に、クローニングは、アセンブリＰＣＲによって個別に合成されたオリゴから基準ｃＤＮＡを作製する工程を含む。対応する分離株の変異体ＨＡタンパク質を、さらなるアセンブリＰＣＲへの適切な変異オリゴの置換、あるいはＫｕｎｋｅｌ変異誘発等の変異誘発技術のいずれかによって作製する。

【０１３０】

組換えバキュロウイルスを、リポフェクチン（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬから市販されている）を使用した上記バクミドのＳｆ９細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１７１１）へのトランスフェクションによって生成する。２８℃での４～５日間のインキュベーション後、放出されたウイルスを採取し、さらなる増幅のために使用する。ウイルス感染およびタンパク質発現を、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｏｘｆｏｒｄ：Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，１９９４）に記載のように行う。

【０１３１】

次いで、発現したポリ－Ｈｉｓタグ化ＨＡポリペプチドを、例えば、以下のように、Ni^{2+}－キレートアフィニティクロマトグラフィーによって精製することができる。Ｒｕｐｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３６２：１７５－１７９（１９９３）に記載のように、組換えウイルス感染Ｓｆ９細胞から上清を回収する。総容積５ｍＬを用いて、Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販されている）を調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出物を、０．５ｍＬ／分でカラムに充填する。カラムをローディング緩衝液でベースラインA_{280}まで洗浄し、その時点で画分回収を開始する。次に、カラムを二次洗浄緩衝液（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロール（ｐＨ６．０））で洗浄し、非特異的結合タンパク質を溶離する。A_{280}ベースラインに再度到達した後、カラムを、二次洗浄緩衝液を含む０～５００ｍＭイミダゾール勾配を使用して展開する。１ｍＬの画分を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色またはアルカリホスファターゼ抱合Ni^{2+}－ＮＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用したウェスタンブロットによって分析する。溶離したHis_{10}タグ化ＨＡポリペプチドを含む画分をプールし、ローディング緩衝液に対して透析する。

【０１３２】

代替として、ＩｇＧタグ化（またはＦｃタグ化）ＨＡポリペプチドの精製を、例えば、プロテインＡまたはプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフ

ィー技術を用いて行うことができる。

【０１３３】

Ｓｆ９細胞の代替物として、ＨＡタンパク質を、他の組換え宿主細胞、原核生物、酵母、または高等真核細胞中で産生することもできる。適切な原核生物には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物等の真正細菌、例えば、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ（例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ）、およびＳｈｉｇｅｌｌａ等）、ならびにＢａｃｉｌｌｉ（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（例えば、１９８９年４月１２日に公開された第ＤＤ２６６，７１０号に開示のＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ ４１Ｐ）等）、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ等のＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、ならびにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓが含まれるが、これらに限定されない。Ｅ．ｃｏｌｉ Ｋ１２ ＭＭ２９４株（ＡＴＣＣ ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０株（ＡＴＣＣ ２７，３２５）、およびＫ５ ７７２（ＡＴＣＣ ５３，６３５）等の種々のＥ．ｃｏｌｉ株は、公的に利用可能である。

【０１３４】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、ＨＡポリペプチドをコードする核酸を含むベクターの適切なクローニング宿主または発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、一般的に使用されている下等真核宿主微生物である。しかし、多数の他の属、種、および株、例えば、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ（Ｂｅａｃｈ ａｎｄ Ｎｕｒｓｅ，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：１４０（１９８１）、１９８５年５月２日に公開された欧州特許第１３９，３８３号）；Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ宿主（米国特許第４，９４３，５２９号；Ｆｌｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：９６８－９７５（１９９１））、例えば、Ｋ．Ｌａｃｔｉｓ（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４、Ｌｏｕｖｅｎｃｏｕｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ ７３７（１９８３））、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ １２，４２４）、Ｋ．Ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ １６，０４５）、Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ（ＡＴＣＣ ２４，１７８）、Ｋ．ｗａｌｔｉｉ（ＡＴＣＣ ５６，５００）、Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ（ＡＴＣＣ ３６，９０６）、Ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：１３５（１９９０））、Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ、およびＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ等；ｙａｒｒｏｗｉａ（欧州特許第４０２，２２６号）；Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ（欧州特許第１８３，０７０号、Ｓｃｒｅｅｋｒｉｓｈｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｓｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２８：２６５－２７８（１９８８））；Ｃａｎｄｉｄａ；Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ（欧州特許第２４４，２３４号）；Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ（Ｃａｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７６：５２５９－５２６３（１９７９））；Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ（１９９０年１０月３１日に公開された欧州特許第３９４，５３８号）等のＳｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ；ならびに例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ（１９９１年１月１０日に公開されたＷＯ９１／００３５７号等の糸状菌、およびＡ．ｎｉｄｕｌａｎｓ（Ｂａｌｌａｎｃｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１１２：２８４－２８９（１９８３）、Ｔｉｌｂｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ２６：２０５－２２１（１９８３）、Ｙｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：１４７０－１４７４（１９８４）等のＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ宿主、およびＡ．ｎｉｇｅｒ（ＫｅｌｌｙおよびＨｙｎｅｓ、ＥＭＢＯ Ｊ．４：４７５－４７９（１９８５）等）を、本明細書中で一般的に利用可能であり、かつ有用である。メチロトロープ酵母が本明細書中で適切であり、ＨＡｎｓｅｎｕｌａ、Ｃａｎｄｉｄａ、

Ｋｌｏｅｃｋｅｒａ、Ｐｉｃｈｉａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ、およびＲｈｏｄｏｔｏｒｕｌａからなる属から選択される、メタノール中で成長することができる酵母が含まれるが、これらに限定されない。この酵母クラスの例である特定の種のリストを、Ｃ．Ａｎｔｈｏｎｙ、Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｓ ２６９（１９８２）中に見出すことができる。

【０１３５】

ＨＡタンパク質発現に適切な宿主細胞には、多細胞生物細胞が含まれる。無脊椎動物細胞の例には、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９等の上記昆虫細胞、ならびに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞およびＣＯＳ細胞が含まれる。より具体的な例には、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）、ヒト胚腎臓株（ＨＥＫ２９３細胞または懸濁培養での成長についてサブクローン化されたＨＥＫ２９３細胞（Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））、チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６（１９８０））、マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））、ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ ８０６５）、およびマウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２、ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）が含まれる。適切な宿主細胞の選択は、当業者の技術範囲内と見なされる。

【０１３６】

血球凝集素（ＨＡ）タンパク質パニング

ＨＡタンパク質を、マイクロタイターウェルまたは磁性ビーズの表面上に固定して、上記ライブラリーをパニングする。特定の実施形態では、各ライブラリーを、１つまたは複数のＨタンパク質に４℃で２時間結合させ、次いで、冷ＰＢＳで広範囲に洗浄し、その後に０．２Ｍグリシン－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ２．５）を使用してＨＡ特異的結合クローンを溶離する。回収したファージを中性ｐＨにし、感受性宿主Ｅ．ｃｏｌｉの感染によって増幅させる。その後、陽性クローン富化を繰り返すためにファージミド産生を誘導し、その後に選別のためにクローンを単離することができる。十分な富化の際に、全プールを、感染によって、ＨＢ２１５１等の非アンバー抑制性Ｅ．ｃｏｌｉ株に導入して可溶性ｓｃＦｖタンパク質を発現させる。代替として、下記のように、プールを、ｐＢＡＤ等の単量体ｓｃＦｖ発現ベクターにサブクローン化することができ、組換え可溶性ｓｃＦｖタンパク質をインビトロでの分析および特徴づけのために発現させる。

【０１３７】

特徴づけ

クローンを、上記にように、１つまたは複数のＨタンパク質への結合親和性について試験する。例えば、Ｈ１タンパク質（Ｒｅｆｓｅｑ ＡＢＱ１０１３７、分離株ニューカレドニア／２０／９９（Ｈ１Ｎ１）、および／またはＲｅｆｓｅｑ ＡＢＵ９９０６９、分離株ソロモン諸島／３／０６（Ｈ１Ｎ１））への結合を試験し、かつＨ３タンパク質（Ｒｅｆｓｅｑ ＡＣＣ６７０３２、分離株ウィスコンシン／６７／０５（Ｈ３Ｎ２）、および／またはＲｅｆｓｅｑ ＣＡＡ２４２６９、香港／６８（Ｈ３Ｎ２））への結合を平行して試験するが、他の分離株も単独または任意の組み合わせで使用することができる。証明された結合に基づき得た陽性クローンは、中和能力について試験することができる。中和についての典型的な機能試験は、赤血球への全ウイルス結合を使用した血球凝集阻害アッセイを含む。代替として、組替え血球凝集素タンパク質および赤血球を使用した血球凝集アッセイが可能である。全血の必要性を排除するために、気道上皮細胞に対して血球凝集素結合阻害アッセイを行うことができる。結合アッセイは、任意のフローサイトメトリーまたは細胞ＥＬＩＳＡ（ｃＥＬＩＳＡ）ベースのアッセイが含まれるが、これらに限定されない、任意の形態で行うことができる。高価なフローサイトメトリー装置を使用する必要がなく、クローン評価がより自動化され、より多数のデータを収集することができる

という点で、ｃＥＬＩＳＡの使用は有利である。他方では、フローサイトメトリーは、より優れた感度、一貫性、および速度が可能である。

【０１３８】

１つの態様では、本発明の抗体は、インフルエンザウイルスを含有するＨ１ＨＡ、および／またはインフルエンザウイルスを含有するＨ３ＨＡに対する結合親和性を有する。本発明の抗体の結合親和性を、例えば、Ｍｕｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のスキャッチャード分析等の当業者に公知の方法によって決定することができる。１つの実施形態では、結合親和性は、＜１００ｐＭである。１つの実施形態では、抗体の結合親和性は、約1×10^{-7}～約1×10^{-13}Ｍ、約1×10^{-8}～約1×10^{-12}Ｍ、または約1×10^{-9}～約1×10^{-11}Ｍである。他の実施形態では、抗体の結合親和性は、約1×10^{-7}Ｍ、約1×10^{-8}Ｍ、約1×10^{-9}Ｍ、約$1\times10^{-1\times10}$Ｍ、約1×10^{-11}Ｍ、約1×10^{-12}Ｍ、または約1×10^{-13}Ｍである。

【０１３９】

最適化：変異誘発ライブラリー

インフルエンザエピデミックおよび非ヒト動物ウイルスに起因するヒト感染に関連する潜在的パンデミックを含むパンデミックの有効な管理のために、Ｈタンパク質の現在の分離株および未来の変異体を有効に中和する抗体が必要である。この目的を達成するために、ターゲティングした血球凝集素亜型のすべての公知の分離株に結合する多様なＨ（例えば、Ｈ１、Ｈ３、Ｈ５等）中和クローンを単離する必要がある。

【０１４０】

いくつかの例では、交差反応性抗体は、単一の抗原に対して対象としたスクリーニングを介して出現する。分離交差反応性クローンの可能性を増大するために、複数の抗原に対して前進的にスクリーニングすることによって複数の選択的圧力を印加するであろう。いずれかの事象では、交差反応性は、当該分野において公知の抗体最適化法によってさらに改良することができる。例えば、本明細書中に記載する免疫グロブリン鎖の可変領域のある領域は、選択したＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域の軽鎖シャッフリング、目的変異誘発、ＣＤＲ合体、および直接変異誘発を含む、１つまたは複数の最適化戦略を対象とし得る。

【０１４１】

１つを超えるインフルエンザＡ型亜型および／または同一亜型の１つを超える分離株との本明細書中の抗体の交差反応性を意図的に導入するために設計された１つの変異誘発法を、本明細書中で「目的」変異誘発と表す。目的変異誘発を使用して、好ましくは反応性の異なる１つまたは複数の抗体クローンに基づいて抗体の集団を合理的に操作することができる。本発明の文脈では、目的変異誘発を使用して、抗体の個別のＣＤＲ中の配列等の類似の配列上の類似の位置によって特定された単一または複数の残基をコードする。この場合、これらの集団を、類似の位置に見出される残基の範囲を捕捉するためのオリゴ縮重を使用して生成する。この集団内で、親クローンの特異性の間またはそれを超えて一連の特異性が存在すると予想される。目的変異誘発の目的は、２つ以上の個別の物質または集団の間に多様な多機能抗体集団またはライブラリーを生成することである。インフルエンザの場合、本方法を、２つの異なるエピトープ、分離株、または亜型を認識する２つの抗体を使用し、両機能的質を単一の抗体に変えるために利用することができる。例として、第１のインフルエンザＡ型抗体は、Ｈ１亜型の分離株に特異性を示し得、第２の抗体は、インフルエンザＡ型ウイルスのＨ３亜型の分離株に特異性を示す。目的変異誘発ライブラリーを作製するために、両抗体についてのＣＤＲ配列を最初に獲得し、アラインメントする。次に、同一性が保存されたすべての位置を、適合した残基に単一コドンを使用して固定する。非保存位置で、両残基をコードするために縮重コドンを組み込む。いくつかの例では、縮重コドンは、この位置で２つの親残基のみをコードするであろう。しかし、いくつかの例では、さらなる副産物が産生される。副産物の産生レベルを、副産物産生を強制するように調節するか、サイズの限度または目的に応じてこの産生を排除することができ

る。

【０１４２】

したがって、例えば、２つの抗体の第１の位置がそれぞれ、トレオニンおよびアラニンである場合、第１の２つの位置中にＡ／Ｇ－Ｃ－を有する縮重コドンは、第３の位置中の塩基と無関係にトレオニンまたはアラニンのみをコードするであろう。例えば、次の位置の残基がリジンおよびアルギニンである場合、縮重コドンＡ－Ａ／Ｇ－Ａ／Ｇは、リジンまたはアルギニンのみをコードするであろう。しかし、縮重コドンＡ／Ｃ－Ａ／Ｇ－Ａ／Ｇ／Ｃ／Ｔを使用した場合、アスパラギン、ヒスチジン、グルタミン、およびセリン副産物も生成されるであろう。

【０１４３】

便宜上、適合したＣＤＲ長を有する抗体のみを使用することがより簡潔である。これを強制するための１つの方法は、最初に発見された抗体によって与えられたＣＥＲの長さおよび潜在的なさらなるフレームワーク制限に基づいて、第２の抗原についてサイズが制限されたライブラリーをスクリーングすることである。しかし、同じ長さのＣＤＲの使用は単に便利であるが、必要条件ではないことを付け加えておく。この方法がインフルエンザＡ型ウイルスの中和抗体の機能的に多様な巨大ライブラリーを作製するのに有用である一方で、その適用性は遥かにより広いことが明白である。この変異誘発技術を使用して、任意の抗体の機能的に多様なライブラリーまたは集団を産生することができる（２００８年１月１７日に公開された米国特許出願公開第２００８００１４２０５号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）。したがって、図３は、変異誘発された親配列としてＴＮＦ－α抗体およびＣＤ１１ａ抗体のＣＤＲを使用した目的変異誘発法の使用を例示するために本明細書中に含まれる。

【０１４４】

交差反応性が自然に一般に選択されないため、典型的な変異戦略を実行することは、強力な交差反応性を可能にし得ない可能性が高い。目的変異は、交差反応性タンパク質を有する抗体の範囲を生成するための対象方法として考案された。代替として、ＣＤＲ合体は、交差反応性抗体の生成および／または最適化のための別の迅速かつ強力な戦略を提供し得る。抗原結合および特異性が、いずれかまたは両方の鎖から選択されたＣＤＲの組み合わせが異なることによって大きく影響されることが確立されている。既存の抗体に含有されるＣＤＲが、既に、標的に対して最適化され得るため、図６に示されるように、不均質性標的に対する有効性を証明し得る、単一の抗体または複数の抗体に由来するＣＤＲ合体の集団を作製することができる。

【０１４５】

図６では、ＣＤＲが合体された抗体は、単一のフレームワーク時にＣＥＲの組み合わせ重ね合わせとして示すが、それらは、複数の関連フレームワーク、および非関連フレームワークの際に、またはそのキメラフレームワークの際でさえ、ＣＤＲが重ね合わされない可能性があり、得られる合体された抗体または複数の抗体の全体の多様性および生産性を増大する。合体ライブラリーは、既存の抗体に見られる生産の多様性、および合体集合体あたりの多くの新規抗体を同定する能力を活用する利点を有する。付加的な重鎖フレームワークのこのより広域の使用は、ＣＤＲの文脈における結合のサンプリング、およびより高い交差反応性および潜在性が誘導体化される、従来のＢ細胞成熟において達成可能ではない組み合わせを可能にするフレームワーク変異体を可能にする。ＣＤＲが標的に係合するための相互作用ループとして機能するため、それぞれの本来の配置に関し、かつそれに関わらず、両方の重鎖と軽鎖との間でＣＤＲを混合することによって、遥かに広範囲の組み合わせを作成することができる。

【０１４６】

より従来の最適化が活性の効力または範囲を増加させるのに十分である場合、次いで、標的としたランダム変異誘発、飽和変異誘発、またはさらには、エラー多発性ＰＣＲを利用することができる。

【０１４７】

曖昧に合成されたオリゴヌクレオチドを使用した標的化ランダム変異誘発（Ｍａｔｔｅｕｃｈｉ ａｎｄ Ｈｅｙｎｅｋｅｒ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １１：３１１３－３１２１（１９８３））は、意図するコドンおよびすべての可能なコドンを、特定の比で、互いに、指定の位置に生成する技術である。曖昧に合成されたオリゴヌクレオチドにより、指定の場所への非「野生型」塩基、または、コドンの特異的付加によるヌクレオチド付加の正確さが低下する。これを、典型的には、オリゴヌクレオチド合成機における野生型塩基と非野生型塩基との比の固定および合成時の２つの試薬の混合物の指定によって行う。

【０１４８】

飽和変異誘発（Ｈａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １７：３１０－３１５（１９９４））は、タンパク質中の特定の位置の２０種すべてのアミノ酸を置換し、各変異体に対応するクローンを特定の表現型についてアッセイする技術である（米国特許第６，１７１，８２０号、同第６，３５８，７０９号、および同第６，３６１，９７４号も参照されたい）。

【０１４９】

エラー多発性ＰＣＲ（Ｌｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ １：１１－１５（１９８９）、Ｃａｄｗｅｌｌ ａｎｄ Ｊｏｙｃｅ，ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄ Ａｐｐｌｉｃ．２：２８－３３（１９９２））は、クローン化した遺伝子にランダム点変異を導入する修正ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術である。得られたＰＣＲ産物をクローン化してランダム変異ライブラリーを産生することができるか、またはＴ７プロモーターが適切なＰＣＲプライマー内に組み込まれる場合に直接転写することができる。

【０１５０】

他の変異誘発技術も当該分野で周知であり、例えば、Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｊ．Ｂｒａｍａｎ，Ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００１に記載されている。

【０１５１】

最適化：変異誘発ライブラリースクリーニングのための選択的考察

この場合、主な目的の１つは、現在のＨ１および／もしくはＨ３（またはＨ５もしくはＨ９）分離株ならびに将来の変異体を有効に処置するために、集団からの１つの抗体（または複数の抗体）を操作し、単離することである。新規の分離株Ｈ１／Ｈ３中の変異を認識することができる耐性を有する抗体を操作するために、種々のＨ１／Ｈ３分離株に結合する中和クローンを同定すべきである。第１のＨ１／Ｈ３分離株に対してクローンを選択する場合、より低いレベルで、第２のＨ１／Ｈ３分離株に結合／中和すると予想される。この場合、目的は、第１のＨ１／Ｈ３分離株結合の改善（または少なくとも維持）という状況において、第２のＨ１／Ｈ３分離株の認識を劇的に改善することである。したがって、第２のＨ１／Ｈ３分離株の改善のために最初に選択を行い、その後に第１のＨ１／Ｈ３タンパク質を選択する。それにより、新規の株に対してより高い選択圧が得られる一方で、第２のパラメーターに対する選択圧が維持される。

【０１５２】

他のＨ中和抗体を類似の様式で最適化することができる。この場合、出発点または目的のいずれかとして他の単離株（例えば、Ｈ５、Ｈ９等）由来の任意の基準タンパク質配列を用いて、選択および最適化することができる。

【０１５３】

加えて、中和抗体クローンを使用して、型間認識を試験する。型間認識の例は、非Ｈ１起源のクローンまたは最適化クローン由来の同時または操作されたＨ１結合である。

【０１５４】

概して、複数の変異誘発集合およびスクリーンは、Ｃ５およびＡ１１抗体、Ｃ５様およびＡ１１様抗体、Ｃ５およびＡ１１抗体様分子、Ｃ５およびＣ５様サロボディ、ならびにＡ１１およびＡ１１様サロボディに基づくことができる。それによって、先述の分子のそれぞれは、広い範囲の反応性および高い効力を有する適切な反応性分子を単離するために

、上記に記載した任意の、かつすべての選択を対象とすることができる。

【０１５５】

中和抗体のエピトープマッピング

一旦所望の性質を有する中和抗体が同定されると、かかる抗体の大部分によって認識される優性のエピトープを同定することが望ましいかもしれない。エピトープマッピング法は、当該分野で周知であり、例えば、Ｍｏｒｒｉｓ，Ｇｌｅｎｎ Ｅ．，Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎ．Ｊ．ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，１９９６、およびＥｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｗｅｓｔｗｏｏｄ ａｎｄ Ｈａｙ，ｅｄｓ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１に開示されている。

【０１５６】

エピトープマッピングは、抗体が結合するエピトープの同定に関する。抗体－抗原複合体の結晶学的分析、競合アッセイ、遺伝子フラグメント発現アッセイ、および合成ペプチドベースのアッセイを含む、タンパク質上のエピトープの位置を決定するための当業者に公知の方法が多数存在する（例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅの１１章中の、Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９９９、米国特許第７，３３２，５７９号（それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）。２つの抗体が同一のエピトープまたは立体的に重複するエピトープを認識する場合に、抗体は基準抗体と「本質的に同一のエピトープ」に結合する。同一または立体的に重複するエピトープに２つの抗体が結合するかどうかを決定するための一般的に使用されている方法は、競合アッセイであり、このアッセイを、標識した抗原あるいは標識した抗体のいずれかを用いて、すべての異なる形式で形成することができる。通常、抗原を９６ウェルプレート上に固定し、非標識抗体が標識抗体の結合を遮断する能力を、放射性標識または酵素標識を使用して測定する。

【０１５７】

中和抗体の産生

一旦所望の中和特性を有する抗体が同定されると、抗体フラグメントを含むかかる抗体を、例えば、ハイブリドーマ技術または組換えＤＮＡ技術を含む当該分野で周知の方法によって産生することができる。

【０１５８】

ハイブリドーマ法では、マウスまたはハムスター等の他の適切な宿主動物を免疫化して、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか産生することができるリンパ球を惹起する。代替として、リンパ球をインビトロで免疫化することができる。次いで、ポリエチレングリコール等の適切な融合剤を使用してリンパ球を骨髄腫細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１５９】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、適切な培養培地中に播種し、成長させ、これには、非融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する１つまたは複数の物質を含むことが好ましい。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（ＨＡＴ培地）を含み、これらの物質はＨＧＰＲＴ欠損細胞の成長を阻害する。

【０１６０】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、ＨＡＴ培地等の培地に感受性を示す骨髄腫細胞である。これらの細胞株のうち、好ましい骨髄腫細胞株は、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ Ｕ

ＳＡから利用可能なＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍由来の細胞株、およびＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ ＵＳＡから利用可能なＳＰ－２細胞またはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞等のマウス骨髄腫株である。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１（１９．８４）、およびＢｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１６１】

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について評価分析する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）等の免疫沈降またはインビトロ結合アッセイによって決定する。

【０１６２】

組換えモノクローナル抗体を、例えば、必要な抗体鎖をコードするＤＮＡの単離、周知の組換え発現ベクターを用いた組換え宿主細胞と同時発現用のコード配列との共トランスフェクションによって産生することができる。組換え宿主細胞は、上記の細胞等の原核細胞および真核細胞であり得る。

【０１６３】

ヒト化抗体の作製で使用すべきヒト可変ドメイン（軽鎖および重鎖の両方）の選択は、抗原性の減少に非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメイン配列を、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（ＦＲ）として許容する（Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６（１９９３）、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１（１９８７））。抗体を抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および種々の概念ヒト化産物の分析過程によって調製する。

【０１６４】

加えて、当該分野で公知の方法に従って、ヒト抗体を生成することができる。例えば、免疫化の際に内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することができる。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：２５５１（１９９３）、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６２：２５５－２５８（１９９３）、Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏ．７：３３（１９９３）、および米国特許第５，５９１，６６９号、同第５，５８９，３６９号、および同第５，５４５，８０７号を参照。

【０１６５】

中和抗体

以下の実施例に記載されるものを含む、本明細書中に記載の技術の使用によって多数の中和抗体が同定されている。１つの態様では、本発明は、血球凝集素タンパク質エピトープに結合する中和抗体を提供する。１つの実施形態では、中和抗体は、血球凝集素タンパク質のＨＡ１サブユニット上の少なくとも１つのエピトープに結合する。別の実施形態では、中和抗体は、血球凝集素タンパク質のＨＡ１サブユニット上の少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも６つのエピトープに結合する。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、Ｈ３および／またはＨ１を含むウイルスを

中和する。他の実施形態では、抗体は、Ｈ３およびＨ１の両方を中和する。１つの実施形態では、本発明の抗体は、血球凝集を阻止する。他の実施形態では、抗体は、感染すべき標的細胞へのインフルエンザＡ型ウイルスの結合を阻止する。別の実施形態では、抗血球凝集素抗体は、インフルエンザＡ型ウイルスのＨＡの球状頭部上の受容体結合部位が標的細胞に付着してＨＡの血球凝集素活性が生じるのを阻害する。

【０１６７】

以下の実施例に記載される実験に基づいて、多数の抗血球凝集素抗体の重鎖／軽鎖対合を同定した。別の実施形態では、本発明の抗体は、２つまたは複数のインフルエンザＡ型ウイルス亜型に対して交差反応性である。１つの実施形態では、抗体は、配列番号１もしくは配列番号２として示したアミノ酸配列を含有する重鎖ポリペプチド、および配列番号３、配列番号４、配列番号５、もしくは配列番号６として示したアミノ酸配列を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する。好ましい実施形態では、本発明の中和抗体は、（ｉ）配列番号２として示した重鎖アミノ酸配列、および配列番号６として示した軽鎖アミノ酸配列を含む抗体（下記の実施例において、および表１に示すとおり、クローン１２８６－Ａ１１）、（ｉｉ）配列番号１として示した重鎖アミノ酸配列、および配列番号３として示した軽鎖アミノ酸配列を含む抗体（下記の実施例において、および表１に示すとおり、クローン１２８６－Ｃ５）、（ｉｉｉ）配列番号１として示した重鎖アミノ酸配列、および配列番号４として示した軽鎖アミノ酸配列を含む抗体（下記の実施例において、および表１に示すとおり、クローン１２８６－Ｃ５）、または（ｉｖ）配列番号１として示した重鎖アミノ酸配列、および配列番号５として示した軽鎖アミノ酸配列を含む抗体（下記の実施例において、かつ表１に示すとおり、クローン１２８６－Ｃ５）のエピトープと実質的に同一であるエピトープに結合する。

【表１】

重鎖配列	配列番号	軽鎖配列	配列番号
QVQLQESGGGLVQPGESL RLSCVGSGSSFGESTLSYY AVSWVRQAPGKGLEWLSI INAGGGDIDYADSVEGRF TISRDNSKETLYLQMTNL RVEDTGVYYCAKHMSMQ QVVSAGWERADLVGDAF DVWGQGTMVTVSS	1	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC TGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNNRPSGVPDR FSGSKSGASASLAITGLQAEDE AHYYCQSYDNSLSGSVFGGGT QLTVLS	3
		DIQLTQSPSSLSASVGDRVTLT CQASQDIRKFLNWYQQKPGK GPKLLIYDASNLQRGVPSRFSG GGSGTDFTLIISSLQPEDVGTY YCQQYDGLPFTFGGGTKLEIK	4
		DIQLTQSPSSLSASIGDRVTITC QASQDIRNSLNWYEHKPGKAP KLLIHDASNLETGVPSRFSGGG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANSFPLTFGGGTKVEIK	5
QVQLQQSGPRLVKPSQTL SLTCAISGDSVSGDSGTW NWIRQSPSRGLEWLGRTY YRSKWYNDYAESVKSRIV IKADTSKNEFSLQLNSVTP EDTAIYYCARAGVKIFGLI VGALDNWGRGTLVTVSS	2	EIVMTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGVPDRF HGGGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYDTSSGLTFGGGTK VEIK	6

【０１６８】

典型的な重鎖ループよりも長い重鎖ループを有する抗体は、ある特性を示すとして報告されている。例えば、典型的な重鎖ＣＤＲ３ループよりも長いループは、多反応性（Ｓｃｈｅｔｔｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９７；１５８；２４７７－２４８９）に関係付けられており、ごく近年では、それらは、多くの抗Ｈ１Ｖ抗体（Ｓａｐｈｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００１；２９３；１１５１－１１５９、Ｋｕｎｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ；１９９８；１４（１３）；１１１５－１１２８、Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９９３；２３０（３）：８１２－８２３）、および抗肺炎球菌抗体（Ｂａｘｅｎｄａｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐｅｒ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００７；１５１；５１－６０）と関連している。延長ループは、より深いプロービング、および病原性抗原との相互作用を促進し得る。１９アミノ酸長の重鎖ＣＤＲ３を含有するＨ１Ｖ抗体の場合では、標的は、ｇｐ１２０上の感受性凹型領域と接触する、指状突起物の形成を介して非常に特異的に係合する。実施例７に記載されるように、Ｃ０５抗体重鎖配列は、１１アミノ酸の極めて非定型の長さの重鎖ＣＤＲ１ループ、および２５アミノ酸のＣＤＲ３ループを有する。

【０１６９】

１つの態様では、本発明は、長さが修正された重鎖ＣＤＲループを有する、インフルエンザ中和抗体または結合分子に関する。通常、抗原に接触するヒト重鎖ＣＤＲ１ループの長さは、典型的には、約６または８アミノ酸のいずれかであり、抗原に接触するヒト重鎖ＣＤＲ３ループの典型的な長さは、約１３アミノ酸である（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，

Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，ｅｄ．５，（１９９１））、ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２，７３２－７４５）。１つの実施形態では、長さが修正された重鎖は、抗体の典型的な重鎖ＣＤＲループよりも長いＣＤＲループを指す、「延長」重鎖ＣＤＲループである。

【０１７０】

１つの実施形態では、抗体または結合分子は、延長重鎖ＣＤＲ３ループ、および／または延長重鎖ＣＤＲ１ループを有する。１つの実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、典型的な重鎖ＣＤＲ３ループよりも長い、約１アミノ酸、約２アミノ酸、約３アミノ酸、約４アミノ酸、約５アミノ酸、約６アミノ酸、約７アミノ酸、約８アミノ酸、約９アミノ酸、約１０アミノ酸、約１１アミノ酸、約１２アミノ酸、約１３アミノ酸、約１４アミノ酸、約１５アミノ酸、約１６アミノ酸、約１７アミノ酸、約１８アミノ酸、約１９アミノ酸、または約２０アミノ酸である。別の実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、典型的な重鎖ＣＤＲ３ループよりも長い、約１～約２０アミノ酸、約１～約１９アミノ酸、約１～約１８アミノ酸、約１～約１７アミノ酸、約１～約１６アミノ酸、約１～約１５アミノ酸、約１～約１４アミノ酸、約１～約１３アミノ酸、約１～約１２アミノ酸、約１～約１１アミノ酸、約１～約１０アミノ酸、約１～約９アミノ酸、約１～約８アミノ酸、約１～約７アミノ酸ｖ１～約６アミノ酸、約１～約５アミノ酸、約１～約４アミノ酸、約１～約３アミノ酸、または約１～約２アミノ酸である。さらに別の実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、または約３５アミノ酸の長さである。

【０１７１】

好ましい実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、約２５アミノ酸の長さである。別の好ましい実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、アミノ酸配列ＡＫＨＭＳＭＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号９）を含む。記載される抗体が血球凝集を阻害することが可能であるため、この長さの重鎖ＣＤＲ３ループもまた、球状頭部内の深部にプローブする突出物を形成することが可能である。球状頭部のかかる深部プローブは、血球凝集素の球状頭部ドメインの凹部内でシアル酸に介入する新規手段を提供し得る。これは、本明細書中に記載の延長ＣＤＲ３ループを有する抗体に認められた活性の顕著な全幅に寄与し得る。

【０１７２】

１つの実施形態では、抗体または結合分子は、延長重鎖ＣＤＲ１ループを有する。１つの実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ１ループは、典型的な重鎖ＣＤＲ１ループよりも長い、約１アミノ酸、約２アミノ酸、約３アミノ酸、約４アミノ酸、約５アミノ酸、約６アミノ酸、約７アミノ酸、約８アミノ酸、約９アミノ酸、約１０アミノ酸、約１１アミノ酸、約１２アミノ酸、約１３アミノ酸、約１４アミノ酸、または約１５アミノ酸である。別の実施形態では、延長　重鎖ＣＤＲ１ループは、典型的な重鎖ＣＤＲ１ループよりも長い、約１～約１５アミノ酸、約１～約１４アミノ酸、約１～約１３アミノ酸、約１～約１２アミノ酸、約１～約１１アミノ酸、約１～約１０アミノ酸、約１～約９アミノ酸、約１～約８アミノ酸、約１～約７アミノ酸、約１～約６アミノ酸、約１～約５アミノ酸、約１～約４アミノ酸、約１～約３アミノ酸、または約１～約２アミノ酸である。さらに別の実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ３ループは、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、または約１５アミノ酸の長さである。

【０１７３】

好ましい実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ１ループは、約１１アミノ酸の長さである。別の好ましい実施形態では、延長重鎖ＣＤＲ１ループは、アミノ酸配列ＧＥＳＴＬＳＹＹＡＶＳ（配列番号７）を含む。重鎖ＣＤＲ１領域の配置が、典型的に、ＣＤＲ３の近位であり、結合表面の縁に向かうため、付加的な長さ（例えば、３～５アミノ酸）は、赤血球凝

集素への抗体のより優れた安定性を作成する、付加的な物理的ドッキング表面積を与え得ることが可能である。興味深いことに、ＶＨ遺伝子の分析は、かかる延長された長さのＣＤＲ１の使用を明らかにしない。同様に、ＢＬＡＳＴ検索は、任意の以前に報告されたかかるＣＤＲ１の長さを有する抗体の同定において失敗に終わった。ポジティブ選択が、かかる新規ＣＤＲ１長および組成物を強化する役割を担ったという考察を生じる。

【０１７４】

１つの他の態様では、長さが修正された重鎖ループは、短縮された重鎖ループである。短縮重鎖ループは、欠失を含み得る。１つの実施形態では、ＣＤＲ１ループおよび／またはＣＤＲ３ループは、欠失を含む。別の実施形態では、配列番号７および／または配列番号９は、欠失を含む。１つの実施形態では、重鎖ＣＤＲ１またはＣＤＲ３ループ内の欠失は、約１アミノ酸、約２アミノ酸、約３アミノ酸、約４アミノ酸、約５アミノ酸、約６アミノ酸、約７アミノ酸、約８アミノ酸、約９アミノ酸、約１０アミノ酸、約１１アミノ酸、約１２アミノ酸、約１３アミノ酸、約１４アミノ酸、または約１５アミノ酸、または約１６アミノ酸、または約１６アミノ酸、または約１７アミノ酸、または約１８アミノ酸、または約１９アミノ酸、または約２０アミノ酸、または約２１アミノ酸、または約２２アミノ酸、または約２３アミノ酸、または約２４アミノ酸である。

【０１７５】

１つの態様では、本発明は、低下した酸化能または減少した不均質性酸化能を有するインフルエンザ中和抗体または結合分子に関する。ポリペプチドの水性製剤中の過酸化物によるメチオニンの酸化は、タンパク質ベースの治療薬の開発に有害であると見なされる。この懸念は、少なくとも２倍である。第１に、メチオニンが必須である場合、次いで、酸化は、抗体が活性を維持することができるように制御されなければならない。しかし、それらが活性に必須ではない場合、次いで、非酸化的置換は、減少した不均質性を有する抗体または結合分子を産生するために好ましい。１つの実施形態では、低下した酸化能を有する抗体または結合分子は、変異体重鎖アミノ酸配列を有する。別の実施形態では、変異体アミノ酸配列は、ＣＤＲ３ループ内である。１つの実施形態では、変異体アミノ酸配列は、カバットナンバリング変換による９６位および／または９８位におけるアミノ酸に対応する、少なくとも１つの置換を含む。好ましい実施形態では、９６位および／または９８位におけるメチオニンは、置換アミノ酸である。さらに別の実施形態では、変異体重鎖アミノ酸配列は、メチオニン残基の少なくとも１つの置換を含有する。１つの実施形態では、変異体重鎖アミノ酸配列は、メチオニン残基の少なくとも２つの置換を含有する。好ましい実施形態では、変異体配列は、ロイシン置換に対して少なくとも１つのメチオニン、より好ましくは、ロイシン置換に対して少なくとも２つのメチオニンを含有する。別の実施形態では、変異体配列は、以下のうちの１つを含む：
ＡＫＨＭＳＬＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号２５）、
ＡＫＨＬＳＭＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号２６）、
ＡＫＨＡＳＬＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号２７）、および
ＡＫＨＳＳＬＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号２８）、好ましくは
ＡＫＨＬＳＬＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号２９）。

【０１７６】

１つの実施形態では、減少した不均質性酸化能を有する抗体または結合分子は、以下の特性（（ｉ）インフルエンザＡ型ウイルスの１つを超える亜型および／または１つを超える分離株を中和する、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する、（ｉｉｉ）血球凝集を阻害する、またはそれらの任意の組み合わせ）のうちの１つまたは複数を保持する。

【０１７７】

１つの態様では、本発明は、配列番号１～２９として示した１つまたは複数のアミノ酸配列を含むか、本質的にこれからなるか、またはこれからなる、ポリペプチドを有する中和抗体または結合分子に関する。

【０１７８】

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載の重鎖または軽鎖アミノ酸配列の組み合わせを有する中和抗体または結合分子に関する。例えば、１２８６－Ｃ０５および１２８６－Ａ１１抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列が特徴づけられており（実施例２）、本発明は、それらの種々の重鎖および軽鎖、それらのＣＤＲ領域、および／またはそれらの機能的に活性なフラグメントの間の組み合わせを検討する。本明細書中に記載の抗体または結合分子は、任意の組み合わせにおいて、重鎖および軽鎖、および／または重鎖および軽鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１～２９）からなり得る。１つの実施形態では、抗体または結合分子は、重鎖（配列番号１もしくは２）、および軽鎖（配列番号６）、または重鎖（配列番号１もしくは２）、および１つまたは複数の軽鎖（配列番号３、４、もしくは５）を含む。別の実施形態では、抗体または結合分子は、（ｉ）重鎖（配列番号１）、および１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１０～１２）、（ｉｉ）重鎖（配列番号２）、および１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号７～９）、（ｉｉｉ）軽鎖（配列番号１３～２１）のうちの１つ、および１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１０～１２）、および（ｉｖ）軽鎖（配列番号２２～２４）のうちの１つ、および１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号７～９）を含む。他の実施形態では、抗体または結合分子は、（ｉ）１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号７、８、もしくは９）、および１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１０、１１、または１２）、（ｉｉ）１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号７、８、もしくは９）、および１つまたは複数の軽鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号２２、２３、もしくは２４）、および（ｉｉｉ）１つまたは複数の重鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１０、１１、もしくは１２）、および１つまたは複数の軽鎖超可変ＣＤＲ領域（配列番号１３～２１）を含む。当該分野の当業者は、配列番号１～２９、またはそれらの機能的に活性なフラグメントの他の組み合わせも理解するであろう。

【０１７９】

中和抗体の使用

本発明のインフルエンザ中和抗体を、インフルエンザＡ型感染の防止および／または治療のために、ならびに適切な交差中和エピトープを提示するワクチンの開発のために使用することができる。治療への応用ために、抗体または抗体ベースの輸送配列を使用することによってその送達が容易になった抗体または他の分子を、通常、薬学的組成物の形態で使用する。技術および製剤を、一般に、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ＿ＰＨＡｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．１９９０）に見出すことができる。Ｗａｎｇ ａｎｄ Ｈａｎｓｏｎ “Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｒｓ，” Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｒｅｐｏｒｔ Ｎｏ．１０，Ｓｕｐｐ．４２－２Ｓ（１９８８）も参照。

【０１８０】

１つの態様では、本発明は、治療または防止を必要とする被験者におけるインフルエンザの治療または防止する方法に関する。１つの実施形態では、方法は、本明細書に記載のインフルエンザ中和抗体を必要とする被験者にインフルエンザ中和抗体を投与するステップを含む。抗体は、Ｃ０５抗体であり得る。実施例６に記載するように、Ｃ０５抗体は、インフルエンザ感染、例えば、Ｈ３Ｎ２感染に対する治療的または予防的効果を提供し得る。

【０１８１】

抗体は、典型的には、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で製剤化される。許容可能な担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度で受容者に無毒であり、これらには、リン酸、クエン酸、および他の有機酸の緩衝液等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル

アルコールまたはベンジルアルコール、メチルパラベンまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノール、およびｍ－クレゾール等の防腐剤；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン等のアミノ酸；モノサッカリド、ジサッカリド、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；および／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤が含まれる。

【０１８２】

抗体を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ－（メチルメタクリラート）マイクロカプセル）、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に捕捉することもできる。かかる技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（前出）に開示されている。

【０１８３】

本明細書中に開示の中和抗体を、免疫リポソームとして製剤化することもできる。抗体を含むリポソームを、当該分野で公知の方法（Ｅｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３６８８（１９８５）、Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４０３０（１９８０）、米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号、および１９９７年１０月２３日に公開されたＷＯ９７／３８７３１号に記載の方法等）によって調製する。循環期間が増加したリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０１８４】

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

【０１８５】

疾患の防止または治療のために、抗体の適切な投薬量は、治療すべき感染の型、疾患の重症度および経過、ならびに抗体投与が防止または治療のいずれを目的とするかに依存するであろう。抗体を、１回または一連の治療にわたって患者に適切に投与する。疾患の型および重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇ～約１５ｍｇ／ｋｇの抗体は、例えば、１回または複数回の個別の投与または連続注入のいずれかでの抗体への投与のための典型的な最初の候補投薬量である。

【０１８６】

本発明の中和抗体を、インフルエンザＡ型ウイルスの抗原決定基のエピトープマッピングのためのツールとしてさらに使用することができ、これはワクチン開発に有用である。実際、以下の実施例に示すように、本明細書の発明者らは、ワクチン設計のガイドとして使用することができるいくつかの広範に反応性を示す中和抗体を同定した。

【０１８７】

したがって、本発明の中和抗体を使用して、抗体が結合する中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを選択することができ、それにより、インフルエンザＡ型ウイルス感染のワクチンを開発することができる。１つの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載の抗体に結合した中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含む、インフルエンザＡ型ウイルスに有効なワクチンを提供する。１つの実施形態では、ワクチンは、血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する抗体に結合した中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含む。別の実施形態では、ワクチンは合成ワクチンであり得る。他の実施形態では、ワクチンは、（ｉ）弱毒化インフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部、または（ｉｉ）死滅させたインフルエンザＡ型ウイルスまたはその一部を含むことができる。１つの他の実施形態では、ワクチンは、血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合する抗体に結合した中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含む。ＨＡ抗原は、Ｈ３亜型またはＨ１亜型であり得る。別の実施形態では、ＨＡ抗原は、インフルエンザＡ型ウイルスの表面上に提示される。

【０１８８】

別の実施形態では、ワクチンのペプチドまたはポリペプチドは、インフルエンザＡ型ウイルス中和抗体を惹起する抗原決定基を含む。

【０１８９】

１つの態様では、本発明は、疾患の防止または治療を必要とする被験者の疾患の防止または治療に有用な、またはそのための薬剤または薬学的組成物の調製のための本明細書に記載する抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、疾患の防止または治療を必要とする被験者の疾患を治療または防止するための薬学的組成物を提供し、前記組成物は、本明細書に記載のインフルエンザ中和抗体を含む。

【０１９０】

中和特性を有する非抗体分子

前述で本発明は抗体ライブラリーを参照して例示されているが、サロボディ等の他の非抗体分子のライブラリーを、類似の様式で調製し、使用し、最適化することができる。したがって、プレＢ細胞受容体（ｐｒｅ－ＢＣＲ）に基づいた固有の組み合わせタンパク質ライブラリー（「サロボディライブラリー」）の構築は、Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００８（前出）に記載されている。前に考察のように、ｐｒｅ－ＢＣＲは、抗体レパートリーの通常の作製中に産生されるタンパク質である。基準抗体と異なり、ｐｒｅ－ＢＣＲサブユニットは、２つの代替軽鎖（ＳＬＣ）成分と対合した抗体重鎖から構成される三量体である。多様な重鎖が固定ＳＬＣと対合するこれらのｐｒｅ－ＢＣＲタンパク質に基づいた組み合わせライブラリーを、哺乳動物系、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ系、およびファージミド系で発現させた。これらのライブラリーは、標的抗原に対してナノモルの親和性を有するメンバーを含む。ライブラリーの構築、選択的富化、およびライブラリーメンバーの生物物理学的特徴づけの説明は、Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，（２００８）（前出）の材料と方法の項に詳述されている。本明細書に記載の抗体配列のいずれかを使用して、かかる結合、または非抗体分子（例えば、サロボディ等）を構築し得る。

【０１９１】

本発明のさらなる詳細を、以下の非限定的な実施例によって例示する。

【実施例】

【０１９２】

実施例１－インフルエンザドナー由来の抗体ライブラリー

包括的インフルエンザライブラリーに含有するために選択されたドナーは、以前にインフルエンザ感染しており、１９５７年のＨ２Ｎ２、または１９６８年のＨ３Ｎ２インフルエンザパンデミックの時点で約５歳であり、現在、健康状態が良好であることが確認された。Ｈ１Ｎ１　Ａ／ニューカレドニア／２０／９９、Ｈ３Ｎ２　Ａ／パナマ／２００７／９９、およびＨ５Ｎ１　Ａ／ベトナム／１２０３／２００４ウイルスのパネルまたは血球凝集素タンパク質上で血清学を実施して、血球凝集素タンパク質に対する抗体の存在を確認した。

【０１９３】
第１に、５～２０ｍＬの骨髄を、選択条件を満たしている各ドナーから採取し、製造者の指示毎のＲＮＡｌａｔｅｒ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で混合して、細胞ＲＮＡの完全性を保持した。ＲＮＡを、ＴＲＩ－ＢＤ試薬プロトコール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して単離した。
【０１９４】
重鎖および軽鎖レパートリーを、重鎖のためのランダム感作されたｃＤＮＡテンプレート、軽鎖のためのオリゴｄＴ感作されたｃＤＮＡテンプレート、および遺伝子特異的可変ドメインプライマーを使用するＲＴ－ＰＣＲによって、各ドナー由来のＲＮＡから回収させた。
【０１９５】
次に、ドナーあたり１μｇの各プールされたκ軽鎖、およびプールされたλ軽鎖をＮｏｔｌおよびＢａｍＨ１、ならびにＱｉａｇｅｎゲル抽出キットを使用して精製されたゲルで消化した。κおよびλ軽鎖クローニングでは、５μｇの各ベクターを、ＮｏｔｌおよびＢａｍＨ１で消化し、Ｑｉａｇｅｎゲル抽出キットを使用してゲル精製した。２００ｎｇのゲル精製κまたはλインサートおよび１μｇのゲル精製ベクターを使用して、軽鎖ライブラリーライゲーションを行う。インキュベーションは、１４℃で一晩である。クローニング効果を決定するために、対照連結反応を、軽鎖インサートの追加なく、１つのエレクトロポレーションの量（２００～３００ｎｇのベクターＤＮＡ）と同等に設定する。転換前に、Ｅｄｇｅ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ Ｐｅｒｆｒｏｍａスピンカラムを使用して、ライゲーション物を脱塩する。それぞれのライブラリーを、８０μＬのＤｈ５αエレクトロコンピテント細胞アリコートを使用して、３～５回のエレクトロポレーションで変換し、それぞれ１ｍＬのＳＯＣ中に回収し、プールし、３７℃で１時間増殖させた。各ライブラリーのサンプルを、選択的媒体上でプレーティングし、クローニングの効果および形質転換体の総数を決定するために使用した。残部を２００ｍＬの２ＹＴ＋１００μｇ／ｍＬアンピシリン＋２％グルコースに移し、３７℃で一晩成長させた。良好なライブラリーは、１０％未満のバックグラウンド、および1×10^{6}メンバーを超える総数の形質転換体を有する。翌日、Ｑｉａｇｅｎ Ｈｉｇｈ Ｓｐｅｅｄ Ｍａｘｉｐｒｅｐキットを使用して軽鎖ライブラリープラスミドを単離した。
【０１９６】
重鎖集合をクローニングするために、１．５～２μｇの各５ドナー特異的重鎖可変遺伝子（ＶＨ１／７、ＶＨ２、５、６、ＶＨ３、およびＶＨ４）を、ＳｆｉＩおよびＸｈｏＩを４０単位／μｇのＤＮＡで消化し、Ｑｉａｇｅｎゲル抽出キットを使用してゲル精製する。受容プラスミドを調製するために、１５μｇの各軽鎖ライブラリーベクターを、ＳｆｉＩおよびＸｈｏＩを４０単位余剰／μｇのＤＮＡで消化し、Ｑｉａｇｅｎゲル抽出キットを使用してゲル精製する。ライブラリーライゲーション物を、消化した１．２μｇのＳｆｉＩ／ＸｈｏＩを組み合わせることによって達成し、ドナーあたりのゲル精製された重鎖ＤＮＡを、５ｎｇの各軽鎖ライブラリー、κ、およびλをそれぞれ有する、３００ｎｇの各５重鎖改変遺伝子ファミリーを含有するようにプールした。対照ライゲーション反応は、重鎖インサートの添加なく、１つのエレクトロポレーションの量（３００～６００ｎｇのベクターＤＮＡ）と同等に設定する。ライゲーション物を、１４℃で一晩インキュベートし、次いで、Ｅｄｇｅ Ｂｉｏ Ｓｙｓｔｅｍ Ｐｅｆｒｏｍａスピンカラムで脱塩した。ライゲーション物を、８０μＬのＴＧ－１細胞を使用して行う、ライブラリーあたり８～１２回のエレクトロポレーションに移し、それぞれ１ｍＬのＳＯＣ中に回収し、プールし、３７℃で１時間増殖させた。それぞれのサンプルを使用して、クローニングの有効性および形質転換体の総数を決定した。形質転換体の標的数／ライブラリーは、１０％未満のバックグラウンドを有する、少なくとも1×10^{7}でなければならない。残部を、３００ｍＬの２ＹＴ＋１００μｇ／ｍＬアンピシリン＋２％グルコースに移し、ＯＤ６００が約０．３になるまで成長させた。次に、ｍ１３Ｋ０７ヘルパーファージを、５：１の感染（ＭＯＩ）の多重度で添加し、振動せずに、３７℃で１時間インキュベートした。へ

ルパー感染後、遠心分離によって細胞を採取し、３００ｍＬの２ＹＴ＋１００μｇ／ｍＬのアンピリシン＋２％のグルコース＋７０μｇ／ｍＬのカナマイシン中で再懸濁し、ストックファージ産生用に振動して一晩３７℃で増殖を続けた。

【０１９７】

培養上清を含有する得られたファージを、４℃で１０分間の間、６０００ＲＰＭでの遠心分離によって採取する。次に、ファージを、各上清への０．２容量の２０％のＰＥＧ／２．５ＭのＮａＣｌ溶液の添加、および１時間の間、氷上でのインキュベーションによって沈殿させる。次いで、ファージを、４℃で１５分間の間、７９００ＲＰＭでの遠心分離によって採取する。上清を除去し、ファージペレットを、３０ｍＬの無菌１ＸＰＢＳ中で再懸濁する。長期の－２０℃の保管では、ＰＢＳを、５０％のグリセロールで補充する。

【０１９８】

実施例２－中和抗体の調製

前述のように、ヒト骨髄ファージ提示抗体ライブラリー由来の抗体（実施例１を参照）を、変換し、哺乳動物発現免疫グロブリンとして試験した（Ｋａｓｈｙａｐ ＡＫ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００８ Ａｐｒ ２２；１０５（１６）：５９８６－９１を参照）。重鎖を２つの配列クラスに分類した：

ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＥＳＲＬＳＣＶＧＳＧＳＳＦＧＥＳＴＬＳＹＹＡＶＳＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＬＳＩＩＮＡＧＧＧＤＩＤＹＡＤＳＶＥＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＥＴＬＹＬＱＭＴＮＬＲＶＥＤＴＧＶＹＹＣＡＫＨＭＳＭＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤＶＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（配列番号１）

ＱＶＯＬＱＱＳＧＰＲＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＧＤＳＧＴＷＮＷＲＯＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＤＹＡＥＳＶＫＳＲＩＶＩＫＡＤＴＳＫＮＥＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＩＹＹＣＡＲＡＧＶＫＩＦＧＬＩＶＧＡＬＤＮＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２）。

下線の超可変ＣＤＲ領域を、以下の重鎖に示す。

ＧＥＳＴＬＳＹＹＡＶＳ（配列番号７）

ＷＬＳＩＩＮＡＧＧＧＤＩＤ（配列番号８）

ＡＫＨＭＳＭＱＱＶＶＳＡＧＷＥＲＡＤＬＶＧＤＡＦＤ（配列番号９）

ＳＧＤＳＧＴＷＮ（配列番号１０）

ＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＤ（配列番号１１）

ＡＲＡＧＶＫＩＦＧＬＩＶＧＡＬＤ（配列番号１２）

【０１９９】

配列番号１によって記載される重鎖は、１つのλ軽鎖（配列番号３）、およびクローン１２８６－Ｃ５によって例示される２つのκ軽鎖（配列番号４～５）と対を成すことが見出された。

ＱＳＶＬＴＱＰＰＳＶＳＧＡＰＧＱＲＶＴＩＳＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡＧＹＤＶＨＷＹＱＱＬＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＤＮＮＮＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳＧＡＳＡＳＬＡＩＴＧＬＱＡＥＤＥＡＨＹＹＣＱＳＹＤＮＳＬＳＧＳＶＦＧＧＧＴＱＴＬＴＶＬＳ（配列番号３）

ＤＩＱＬＴＯＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＬＴＣＱＡＳＯＤＩＲＫＦＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＧＰＫＬＬＩＹＤＡＳＮＬＱＲＧＶＰＳＲＦＳＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＩＩＳＳＬＱＰＥＤＶＧＴＹＹＣＱＱＹＤＧＬＰＦＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号４）

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＩＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＲＮＳＬＮＷＹＥＨＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＨＤＡＳＮＬＥＴＧＶＰＳＲＦＳＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ

ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＡＮＳＦＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５）

下線の超可変ＣＤＲ領域を、以下の軽鎖に示す。
ＩＧＡＧＹＤＶＨＷＹ（配列番号１３）
ＬＬＩＹＤＮＮＮＲＰ（配列番号１４）
ＱＳＹＤＮＳＬＳＧＳ（配列番号１５）
ＩＲＫＦＬＮＷＹ（配列番号１６）
ＬＬＩＹＤＡＳＮＬＱ（配列番号１７）
ＱＱＹＤＧＬＰＦ（配列番号１８）
ＩＲＮＳＬＮＷＹ（配列番号１９）
ＬＬＩＨＤＡＳＮＬＥ（配列番号２０）
ＱＱＡＮＳＦＰＬ（配列番号２１）

【０２００】

配列番号２によって記載され、単一のκ軽鎖（配列番号６）とのクローン１２８６－Ａ１１対によって例示される重鎖。

ＥＩＶＭＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＴＲＡＴＧＶＰＤＲＦＨＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＹＤＴＳＳＧＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号６）

下線の超可変ＣＤＲ領域を、以下の軽鎖に示す。
ＳＳＹＬＡＷＹ（配列番号２２）
ＬＬＩＹＧＡＳＴＲＡ（配列番号２３）
ＱＱＹＤＴＳＳＧＬ（配列番号２４）

【０２０１】

図４～５は、クローン１２８６－Ｃ５抗体およびクローン１２８６－Ａ１１の結合能力を示す。先述のように、これらの抗体の機能を特徴づけるために、対応するＩｇＧｓを、異なる抗原のパネル上で結合する能力に対して試験した（図４および５）（Ｋａｓｈｙａｐ　ＡＫ　ｅｔ　ａｌ．，２００８（前出）も参照されたい）。クローン１２８６－Ａ１１および１２８６－Ｃ５抗体の結合能力。両１２８６－Ａ１１および１２８６－Ｃ５は、Ｈ１Ｎ１、Ｈ３Ｎ２、およびＨ９Ｎ２血球凝集素に結合することができた。加えて、１２８６－Ａ１１は、Ｈ５Ｎ１血球凝集素に結合することが可能であった。種々のインフルエンザ亜型ウイルスのマイクロ中和もまた、先述のように実施した（同文献も参照されたい）。

【０２０２】

下記の表２に示すように、各抗体は、ＭＤＣＫ細胞中でインビトロＨ１ウイルス複製を中和することが可能であった。

【表２】

1286-C5	亜型	株	結合	中和 MIC(ug/mL)
トリインフルエンザ	H5N1	ベトナム/１２０３/０４	なし	333 において活性なし
	H9N2	香港 1073/99	あり	100
季節性インフルエンザ	H１N１	ニューカレドニア/20/99	あり	0.5
		ソロモン諸島/3/06	あり	0.65
	H3N2	ウィスコンシン/67/05	あり	0.13
		香港/68	あり	0.13
「アジア型インフルエンザ」	H2N2	アダチ/1/1957	あり	21
1286－すべて	亜型	株	結合	中和 MIC (ug/mL)
トリインフルエンザ	H5N1	ベトナム/1203/04	あり	333 において部分的活性
季節性インフルエンザ	H1N1	ニューカレドニア/20/99	あり	83
		ソロモン諸島/3/06	あり	試験なし
	H3N2	ウィスコンシン/67/05	あり	333 において活性なし
		香港/68	あり	

【０２０３】

１２８６－Ｃ５もまた、Ｈ３ウイルス複製を中和する顕著な能力を示した。１２８６－Ａ１１は、Ｈ３亜型ウイルスを測定可能に中和しなかったが、Ｈ５亜型中和を提示した。１２８６－Ｃ５抗体の作用の機構は、血球凝集阻害を介するものであるが、１２８６－Ａ１１の作用の機構は、決定されなかった。

これらの抗体のそれぞれは、飽和変異誘発および誤りがちのＰＣＲ等の標準的指向およびランダム化抗体最適化技術のそれぞれを介して、増加した活性の効力および範囲に最適化されるであろう。おそらく、これらの抗体は、種々のフラグメント、ならびに単一特異性および多特異性サロボディに変換された場合に有用であろう。

【０２０４】

実施例３－ユニバーサルインフルエンザワクチンの生成

異種病原体のワクチン設計の目的は、有効かつ広範な防御抗原を同定および設計することである。インフルエンザの場合、相当な歴史的努力によって保存された線状配列および領域の経験的試験が行われてきたが、ほとんど成功していない。これらの失敗についてのもっともらしい理由は、抗原性被験物質に対する注目される応答が実際の感染条件での病原体上の抗原の中和のための実際の真の産生部位であるという知識不足である。インフルエンザのために、インフルエンザ感染の生存者のレパートリー内にこれらの真の解決策が見出されると期待されるであろう。本発明者らの場合、多数の抗体の集団の中の一定の抗体は、インフルエンザの複数の亜型を中和することができることが証明された。これらの抗体のうちのいくつかは、血球凝集の古典的阻害を介して、インフルエンザを中和する。

まとめると、真の生存者由来のかかる交差中和抗体を使用したワクチンの設計および評価が交差反応性または「ユニバーサル」インフルエンザワクチンの設計および妥当性に役に立つと期待される。

【０２０５】

具体的には、交差中和モノクローナル抗体を、現在および将来的に製造されるワクチン中の交差中和エピトープの質および抗原性を維持または増強するワクチン産生過程の設計および確証で使用することができる。ワクチンへの抗体結合が構造的完全性および抗原潜在性を反映すると仮定すると、かかるワクチン過程の誘導体への交差中和抗体の結合を評価して、その交差中和潜在性を定量的に評価するであろう。

【０２０６】

これらのユニバーサルエピトープに対する応答を最大にするために、胞子殻または胞子外膜等の抗原性補強剤を通してこれらのユニバーサルエピトープに対する免疫原性を増加させるための誘導体を作製するであろう。代替として、予測モデルおよび支持試験を介して、それらの免疫原性を増大するために、これらの交差中和エピトープを操作および最適化することが出来る。どんな場合でも、得られた抗原を再度試験して、標的への結合有効性を維持するだけでなく、定方向の免疫原性も達成されることを保証するであろう。これは、おそらく競合ＥＬＩＳＡによって免疫化した個体または試験動物由来の血清中に含まれる特異的なユニバーサル中和力価の決定を含むであろう。インビトロ代替物として、免疫原性のために抗原－抗体結合データをインビトロまたはコンピュータを用いて予測モデルの抗体結合データと組み合わせるであろう。ユニバーサルエピトープに対する応答をさらに指示するために、公知の非中和および非交差反応性血球凝集素エピトープを脱免疫化し得る。

血球凝集素のキメラ、フラグメント、および立体構造模倣物の設計および確証のために本抗体を拡大することが妥当である。例えば、インフルエンザが非中和応答を生じる多数の免疫原性エピトープを含むことが十分に確立されている。交差防御抗体を使用して、これらの免疫優性非中和エピトープが部分的または完全に脱免疫化されたワクチンの抗原変異体が維持されるか、ユニバーサル保護エピトープの認識が強化されるのかどうかを評価することが可能である。

【０２０７】

また、これらのワクチン設計の結果として、抗原エピトープを最小にし、さらに、血球凝集素の構成から除去して、立体構造交差特異性抗原を作製することができる。

【０２０８】

この戦略は、中和エピトープまたはエレメントを最小にするために応答を案内するために上に詳細の方法を概説した。立体構造的に依存している可能性が高く、不連続な配列空間内に存在するかかる最小化したエレメントの知識から、前に記載のように（Ｈｏｒｏｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ ｏｆ Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌｌｙ Ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ、ＰＣＴ公開第ＷＯ／２００８／０８９０７３号を参照）、より小さなポリペプチド内に組み合わせ様式で立体構造中和エピトープを作製する可能性があり、不連続なエピトープのみの近位の配置、または設計した構造支持体の文脈では、立体構造エピトープの必須の性質を再生することができる。

【０２０９】

かかる設計では、立体構造エピトープの形態をとり、これらを血球凝集素関連および非関連構造足場上で発現させるか、立体構造依存性抗体によって選択することができるライブラリー内の立体構造エピトープ集団としての形態もとるであろう。

【０２１０】

不連続エピトープの立体構造エピトープへの減少により、従来のタンパク質操作を使用して可能なペプチド免疫原よりもさらにより小さなサイズのペプチド免疫原が得られるであろう。さらに、これらの構造エピトープを、非ペプチド模倣物の使用によって、さらに増強、サイズの減少、または置換することができる。いずれにしても、任意のこれらの立

体構造誘導体または模倣物を、配列番号１～６のうちの１つまたは複数、配列番号１～６のうちの少なくとも１つを含む関連抗体、または選択するインフルエンザウイルスに対応する抗体によって確証するであろう。

【０２１１】

方法と材料。インフルエンザ融合エピトープ胞子ワクチン標的。

１．分泌タンパク質または哺乳動物細胞としての標的の哺乳動物発現

ａ．単一分離株由来の球状ＨＡ１変異体

ｂ．関連分離株由来の球状ＨＡ１キメラ

ｃ．非関連分離株由来の球状ＨＡ１キメラ

ｄ．関連分離株および非関連分離株由来の球状ＨＡ１キメラ

２．分泌タンパク質または哺乳動物細胞の配列番号１～６の抗体または関連抗体での立体構造エピトープの検出。

３．首尾の良い立体構造抗原の胞子発現への導入。

４．配列番号１～６の抗体または関連抗体での胞子結合の試験。

５．インビボ交差反応性免疫原性の評価。

【０２１２】

実施例４－交差亜型中和抗体の効力および範囲の増加

実施例１に記載される抗体の重鎖および軽鎖の配列情報に基づき、変異誘発方法を使用して、個別またはライブラリー中の集団の中で試験するための改良された変異体を作製する。有益な変異を導入するために一般に使用される方法は、結合を担うことが公知の領域にわたって結合またはエラー多発性ＰＣＲ変異誘発を担う部位での飽和変異誘発であり得る。

【０２１３】

従来の抗体最適化戦略の固有の限界のため、交差反応性および効力が不十分である場合、目的変異誘発、合体抗体ライブラリー、または互いに、もしくは以前に記載した従来の最適化戦略を用いるこれらの方法のうちのいずれかもしくは両方の組み合わせを考慮するであろう。

【０２１４】

実施例５－防御の効力および範囲を増加させるためのワクチンおよび抗体の同時投与

抗体と抗原との複合体は、動物における多数の微生物タンパク質および他のタンパク質に対する応答を潜在的に誘導することが公知である。１つの可能な説明は、ワクチン抗体複合体の強制的な取り込みは抗原提示細胞上のＦｃ受容体によって生じるということである。交差反応性抗体と季節性ワクチンとの複合体により、効力を年々増大させることが可能であり、新規のウイルス分離株を各季節のインフルエンザワクチンのために選択する場合、交差反応性抗体が多数の血球凝集素抗原を認識するため、新規の抗体を再度作製する必要がなくなるからである。さらに、これらの抗体が保存された中和領域に指向するので、抗原と複合体を形成した場合、抗体はこれらの非常に保存された感受性領域へのより有効な防御応答を実際に指示することができる。前述のように、ワクチンは、従来の生ウイルスまたは死滅ウイルス、組換えタンパク質またはタンパク質フラグメント、またはさらに最小化されたペプチド、または抗体、抗体フラグメント、または誘導体と複合体化した非ペプチドの立体構造エピトープ、またはサロボディであり得る。

【０２１５】

実施例６－インフルエンザ攻撃に対する保護効果

メスの生後６～８週のＤＢＡ／２（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）マウスをＡＢＳＬ３＋コンテインメント内にケージあたり５～６匹で収容した。餌および水を不断で提供した。マウス（グループあたり５～６匹）は、腹腔内（ＩＰ）注射によって、約２００～３００μＬの無菌リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中の体重ｋｇあたり１、２．５、１０、または２５ｍｇの抗体Ｃ０５（Ｃ０５－１２８６）を受容した。対照グループは、ＩＰ注射によって、２００～３００μＬのＰＢＳ中のＰＢＳ２５ｍｇの非免疫性ヒトＩｇＧまたはＰＢＳのみのいずれかが注入された。抗体および対照は、ウイルス攻撃の２４時間前にＸ－３

１（Ｈ３Ｎ２）またはＡ／メンフィス／３／２００８（Ｈ１Ｎ１）ウイルスが投与された。致死的ウイルス攻撃では、マウスは、３０～５０μＬのＰＢＳ中の３３ＭＬＤ$_{50}$（５０％のマウス致死量）インフルエンザウイルスでの鼻腔内投与によって接種された。Ｈ３Ｎ２およびＨ１Ｎ１ウイルスの両方は、ＤＢＡ／２マウスにおいて高病原性である。死亡前に起こる症状は、３０％超の体重減少および一般的な不活発である。体重、罹患率、および死亡率を、１４日間の間毎日監視した。

【０２１６】

図７Ａ～Ｂは、高力価の致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体の予防効果を例証する。高力価攻撃（３３ＭＬＤ$_{50}$）では、以下の結果が得られた。ＰＢＳでの処置：０％の生存率。２．５ｍｇ／ｋｇでの処置：８０％の生存率。１０ｍｇ／ｋｇでの処置：１００％の生存率。２５ｍｇ／ｋｇでの処置：１００％の生存率。２５ｍｇ／ｋｇのＩｇＧアイソタイプでの処置：０％の生存率。図７Ｅは、Ｈ１Ｎ１メンフィス／３／２００８ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体の予防効果を例証する。

【０２１７】

図７Ｃ～Ｄは、致死的Ｈ３Ｎ２ウイルス攻撃に対するＣ０５抗体の処置効果を示す。ＤＢＡ／２マウスは、まず、３０～５０μＬのＰＢＳ中の３３ＭＬＤ$_{50}$（５０％のマウス致死量）のＸ－３１（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルスでの鼻腔内投与によって接種された。マウス（グループあたり５～６匹）は、腹腔内（ＩＰ）注射によって、約２００～３００μＬの無菌リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中の体重ｋｇあたり１５ｍｇの抗体Ｃ０５（Ｃ０５－１２８６）を受容した。対照グループは、ＩＰ注射によって、２００～３００μＬのＰＢＳ中のＰＢＳ２５ｍｇの非免疫性ヒトＩｇＧまたはＰＢＳのみのいずれかが注入された。Ｃ０５抗体は、感染後、２４時間、４８時間、７２時間、または９６時間で投与された。対照物の投与は、感染後２４時間で生じた。体重、罹患率、死亡率を、１４日間毎日監視した。

【０２１８】

実施例７－異なる長さの重鎖ループを有する変異体の生成

下記に示すように、Ｃ０５抗体重鎖配列（配列番号１）は、アミノ酸の非常に非定型の長さのＣＤＲ１（配列番号７）ループを有する。Ｃ０５は、ＶＨ３－２３生殖系列と比較して、ＣＤＲ１においてさらに５個のアミノ酸を有する。

CDR1 CDR2

VH3 3-23 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF----SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

C05 QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCVGSGSSFGESTTLSYYAVSWVRQAPGKGLEWLSIINAGGDIDYADSVEGRFTISRDNSKETLYLQMTNLRVEDTGVYYCAK

CDR1 欠失

進行性

----SSYAMS3~23 生殖系列

GESTLSYYAVS C05

-ESTLSYYAVS

--STLSYYAVS

---TLSYYAVS

----LSYYAVS

-----SYYAVS

CDR1 挿入

CDR 隣接

C05 ベース

C05-based

GESTLSYYAVS

$(X)_m$GESTLSYYAVS

GESTLSYYAVS$(Y)_n$

$(X)_m$GESTLSYYAVS$(Y)_n$

生殖系列ベース

SSYAMS

$(X)_m$SSYAMS

SSYAMS$(Y)_n$

$(X)_m$SSYAMS$(Y)_n$

【０２１９】

重鎖ＣＤＲ１領域の配置が、典型的には、ＣＤＲ３に近位であり、結合表面の縁に向かうため、付加的な長さの３～５アミノ酸が、血球凝集素に抗体に対してより高い安定性を作製する付加的な物理的ドッキング表面積を与え得ることが可能である。ＶＨ遺伝レパートリーの分析は、かかる延長した長さのＣＤＲ１の使用を明らかにしない。さらに、ＢＬＡＳＴ検索は、かかるＣＤＲ１の長さを有する任意の抗体を同定しない。したがって、ポジティブ選択が、かかる新規のＣＤＲ１の長さおよびその組成物の存在および強化において役割を担い得るという考察を生じる。重鎖は、ＣＤＲ１およびＣＤＲ３の両方において、かかる独自のループの長さを特長とするため、これらのループの組成物を変化させるだけでなく、これらのループの長さを変化させることによって、効力および全幅の増加を考慮するであろう。改良を行うことに関して、まず、上述（パネルの左下）のように、親ＣＤＲ１ループ中のアミノ酸延長の欠失、および対応するより短い生殖系列ＣＤＲ１ペプチド配列での置換によって、および／または生成中間の長さのループ、またはその多種多様な集団を介して開始することができるであろう。依然として延長ループが有益であるが、完全に最適ではない場合、段階的または組み合わせ手段で、ＣＤＲ１内、ＦＲ１接合、および／またはＣＤＲ１のＦＲ２接合における（１～２０）ランダムまたは選択したアミノ酸の挿入によるループの延長を考慮するであろう。延長ループを有する、かかる抗体の組み合わせライブラリーを作製することによって、両感受性および非感受性インフルエンザ分離株、株、および型へのより優れた、かつ広域なバインダーに対して区別的にスクリーニングすることができる。

【０２２０】

加えて、Ｃ０５抗体は、２５アミノ酸の典型的な重鎖ＣＤＲ３（配列番号９）ループよりも長いループを特徴とする。上述のＣＤＲ１挿入および欠失の例と同様に、ＣＤＲ３領域は、同様に修正することができる。下記（右下のパネル）に示すように、ＣＤＲ３配列は、段階的組み合わせ手段（Ｃ０５のゲノム配列が示される）で、ループ内またはＣＤＲ３のＦＲ３およびＦＲ４接合における１～２０アミノ酸によって、同様に、縮小または拡張することができるであろう。

CDR2 CDR3

VH3 3-23 EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFDVWGQGTMVTVSS

C05 EWLSIINAGGDIDYADSVEGRFTISRDNSKETLYLQMTNLRVEDTGVYYCAK----------AFDIWGQGTMVTVSS JH3

CDR3挿入

C05ベース

AKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFD

$(X)_n$AKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFD

AKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFD $(Y)_n$

$(X)_n$AKHMSMQQVVSAGWERADLVGDAFD $(Y)_n$

【０２２１】

他の相互利益の変異誘発への類似により、異なるループの長さのＣＤＲ１およびＣＤＲ

３ライブラリーを組み合わせて、現在の感受性および非感受性インフルエンザ分離株、株、および型に対する、新規、かつより広域な効力の抗インフルエンザ抗体をインテロゲートすることができるであろう。重要なことには、これらの戦略もまた、親Ｃ０５ＣＤＲだけでなく、対象の抗体に交差されたＶｈ３－２３生殖系列または他のＶｈ生殖系列のＣＤＲ１ループに適用することができるであろう。

【０２２２】

実施例８－減少した不均質性酸化能を有する変異体

抗体１２８６－Ｃ０５は、カバット残基９６および９８において、重鎖ＣＤＲ３ループ内に２つのメチオニンを含有する。定義により、このループは、表面曝露され、したがって、酸化を受けやすい。カバット残基９６において、アラニン、ロイシン、またはセリンをメチオニンに、カバット残基９８において、ロイシンをメチオニンに置換する二重点突然変異を生成することによって、メチオニンのいずれかまたは両方が必須であったかどうかを試験した。対応するタンパク質を、一過性哺乳動物系を産生し、先述のように精製した（Ｋａｓｈｙａｐ　ＡＫ　ｅｔ　ａｌ．（前出）２００８）。得られたタンパク質を、Ｈ１（ニューカレドニア／２０／９９）血球凝集素への結合に対して試験し、親タンパク質のフォールド内で結合することを見出した。次に、これらのタンパク質を、それらのＨ３（ウィスコンシン／６７／２００５）血球凝集素へ結合する能力に対して試験し、それは、ロイシン９６／ロイシン９８変異体が、実質的に、アラニン９６／ロイシン９８およびセリン９６／ロイシン９８変異体よりもよく結合したことを示した。図８は、Ｃ０５非酸化的「ＸＬ」変異体が、Ｈ１およびＨ３ＨＡタンパク質の認識を維持することを例証する。

【０２２３】

図９は、Ｈ１およびＨ３への非変異体Ｃ０５の結合と比較して、Ｈ１（ニューカレドニア／２０／９９）およびＨ３（ウィスコンシン／６７／２００５）血球凝集素へのロイシン９６／ロイシン９８Ｃ０５変異体の結合を示す。Ｃ０５非酸化的「ＬＬ」は、Ｈ１およびＨ３ＨＡタンパク質の認識を維持する。

【０２２４】

表３は、血球凝集阻害（ＨＡＩ）アッセイによって試験されたように、Ｃ０５－ＬＬ変異体が活性の同様の効力および全幅を提示したことを例証し、そこでは、血球凝集アッセイおよび血球凝集阻害アッセイは、本質的に、ＥｄｗａｒｄｓおよびＤｉｍｍｏｃｋ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，ｖ７５ｐｐ、１０２０８－１８、２００１）に説明するとおりであり、そこでは、組換えウイルスは、Ｋａｓｈｙａｐら（２００８）（前出）によって説明するとおりに生成された。値は、０．５％のｃＲＢＣの血球凝集を阻害する抗体の最小濃度を表す。

【表３】

亜型	株	1286C05 での活性	1286C5LL 変異体での活性
パンデミック H1N1	(SOIV) A/Cal/04/09(6:2)	活性なし(>100ug/ml)	活性なし(>100 ug/ml)
季節性 H1N1	A/ニューカレドニア/99	<0.1 ug/ml	0.39 ug/ml
	A/テキサス/91	活性なし(>100 ug/ml)	活性なし(>100 ug/ml)
	A/Bris/59/07	1.56 ug/ml	3.12 ug/ml
	A/ソロモン諸島/06	1.56 ug/ml	3.12 ug/ml
	A/バージニア/87	活性なし(>100 ug/ml)	活性なし(>100 ug/ml)
季節性 H3N2	A/ウィスコンシン/05	<0.1 ug/ml	<0.1 ug/ml
	AJHK/68	<0.1 ug/ml	0.39 ug/ml
	A/Bris/10/07	1.25 ug/ml	12.5 ug/ml
	A/パナマ/99	0.39 ug/ml	0.19 ug/ml

【０２２５】

実施例８－活性の増大した親和性および全幅を有する変異体の作製

変異誘発の種々の方法を使用して、個別またはライブラリー中の集団を試験するための改良された変異体を作製する。直接的構造分析を介して特異的に発見されたＣＤＲまたはこれらの接触残基等の結合を担う部位において有益な変異を導入するために使用される方法は、飽和変異誘発、ルックスルー変異誘発、または倹約変異誘発があるが、これらに限定されない。

【０２２６】

対象ステップとして、上述の方法によって、ＣＤＲ３の変異誘発に基づき変異体の集団を作製するであろう。他のヒト抗体を使用する先行研究は、軽鎖、他の重鎖ＣＤＲ、または同時に一度にこれらの領域のうちのいくつかまたはすべてへの点変異体を調査し、かつ生成して、合成改良を産生することによって、多大な利益を証明した。通常、ＣＤＲの組成物のみを変化させながら、ＣＤＲの親フレームワークおよび長さを維持することによって、これを達成することができる。従来の誤りがちなＰＣＲ変異誘発および他の確率プロセスを、同様の領域にわたって、かつ重鎖可変ドメインの他の領域においても使用して、変異体の集団を生成することができるであろう。任意の事象では、得られる集団またはクローンは、活性の増大した親和性、中和、および／または全幅に対して選択することができるであろう。

【０２２７】

上述のように、かかる最適化集団を生成するが、重鎖が、ＣＤＲ１およびＣＤＲ３の両方において、かかる独自のループの長さを特徴とするため、これらのループの組成物を変化させるだけでなく、これらのループの長さも変化させることによって、活性の効力および全幅を試験することがさらに重要であることができるであろう。例えば、対応するより短い生殖系列ＣＤＲ１ペプチド配列、および／または変異集団での置換によって、延長ＣＤＲ１ループの効果を試験するであろう。加えて、ループが適合し、さらには既存の延長ループの長さを超えるまで、段階的ライブラリーの方法で、ＣＤＲ１内、またはＣＤＲ１のＦＲ１およびＦＲ接合におけるランダムアミノ酸の挿入を行い、より優れたさらに広域のバインダーに対して区別的にスクリーニングすることができるであろう。同様に、ＣＤＲ３配列は、段階的ライブラリーの方法で、ループ内またはＣＤＲ３のＦＲ３およびＦＲ

４接合において、収縮または拡張することができるであろう。他の相互に有益な変異誘発への類似により、異なったループの長さのＣＤＲ１およびＣＦＲ３ライブラリーを組み合わせて、新規かつより広域な効力の抗インフルエンザ抗体を調べることができるであろう。

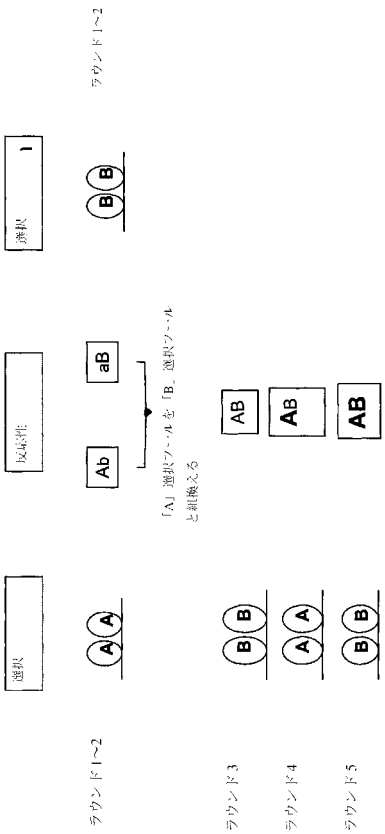
【０２２８】

上記の説明中で本発明は、ある実施形態を参照して例示しているが、本発明はこれらに限定されない。実際に、本明細書中に示し、かつ記載した実施形態に加えて、本発明の種々の変更が上記の説明から当業者に明らかとなり、これらの変更は添付の特許請求の範囲の権利範囲内である。

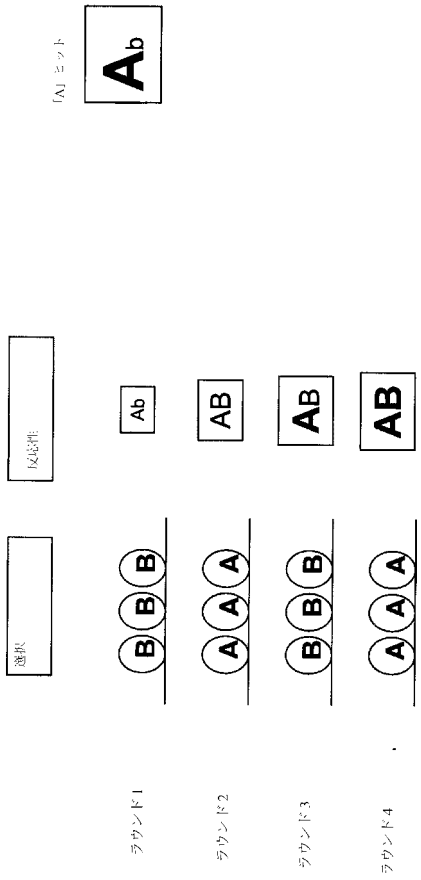
【０２２９】

本明細書を通して引用されたすべての参照は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

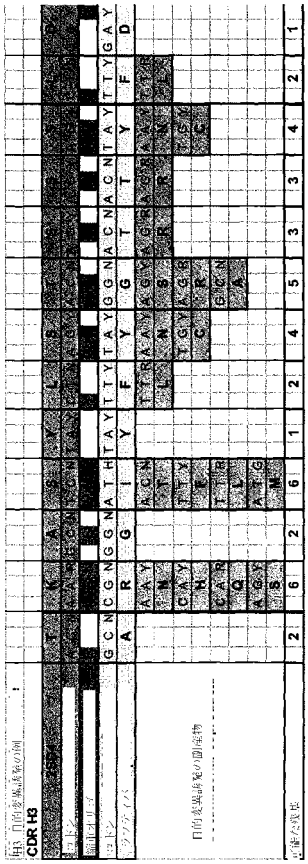
【図１】



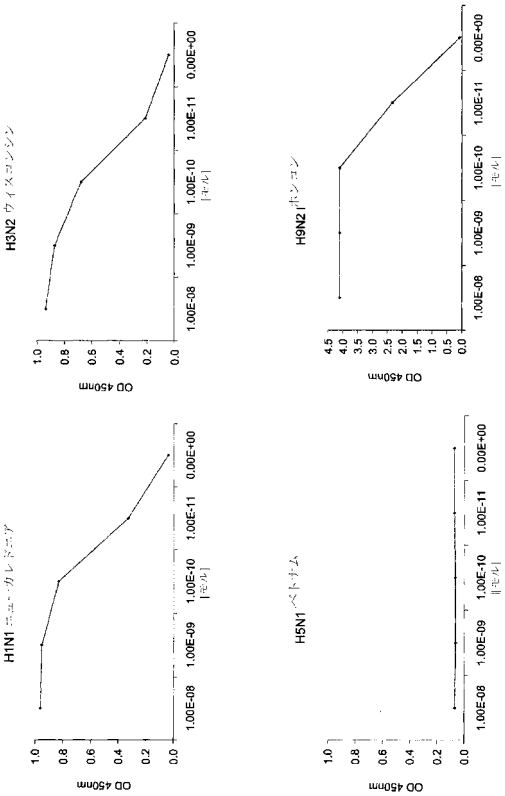
【図２】



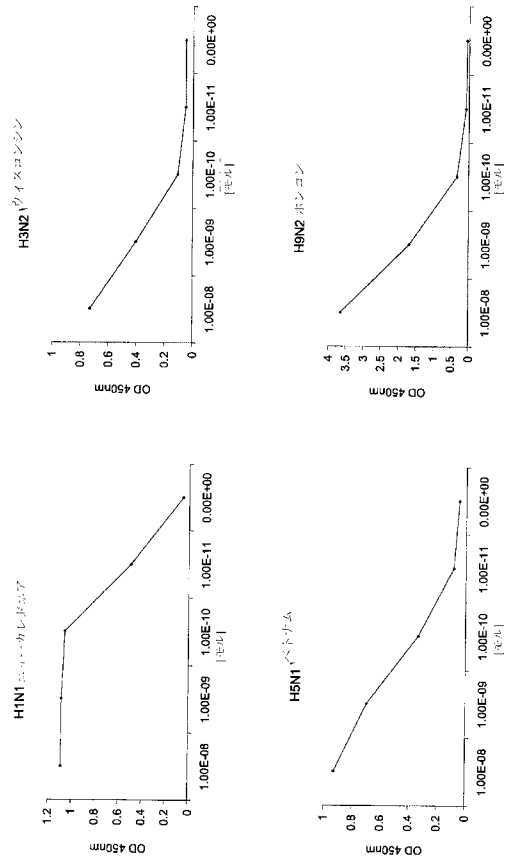
【図３】



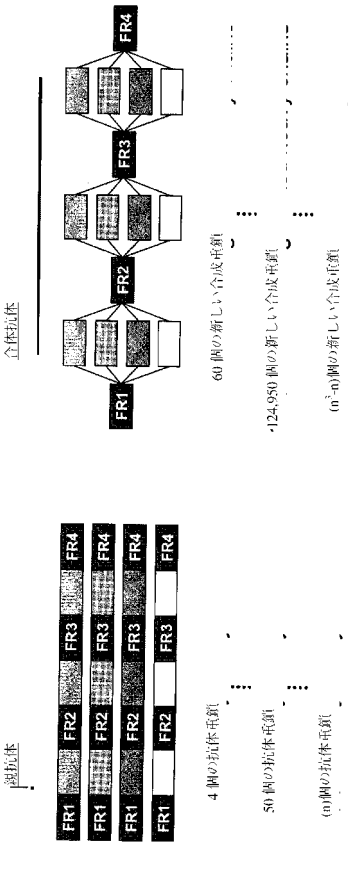
【図４】


H3N2 ウイルスコンジン
H9N2 ポンコン
H1N1
H5N1 ベトナム
OD 450nm
1.00E-08
1.00E-09
1.00E-10
1.00E-11
0.00E+00

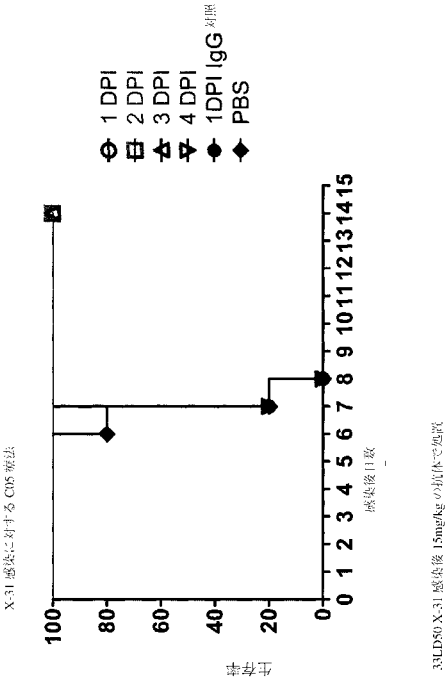
【図５】


H3N2 ウイルスコンジン
H9N2 ポンコン
H1N1
H5N1 ベトナム
OD 450nm
1.00E-08
1.00E-09
1.00E-10
1.00E-11
0.00E+00

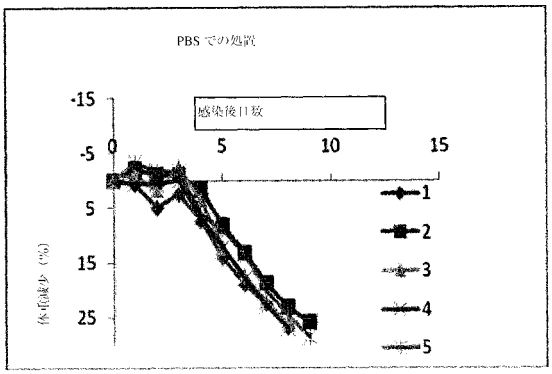
【図６】

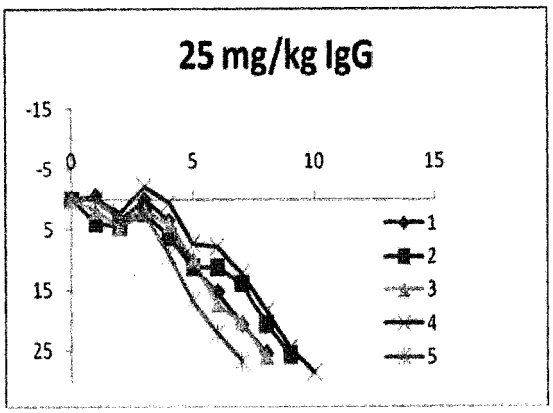

FR1
FR2
FR3
FR4
4 個の抗体配列
50 個の抗体配列
(n)個の抗体配列
60 個の新しい合成配列
124,950 個の新しい合成配列
(n^3-n)個の新しい合成配列

【図７Ａ】

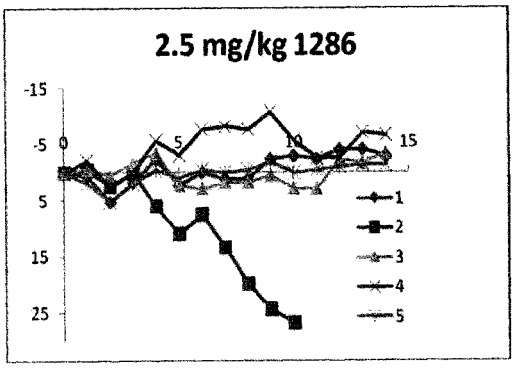


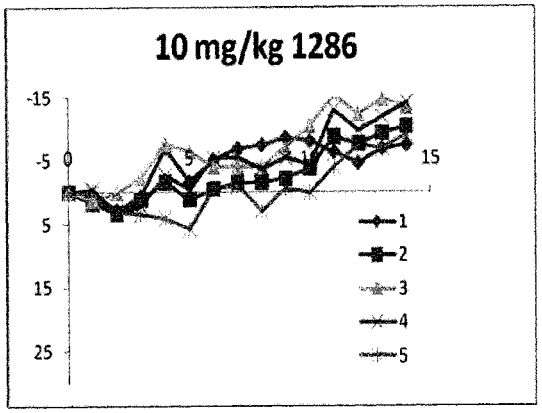
【図７Ｂ－１】



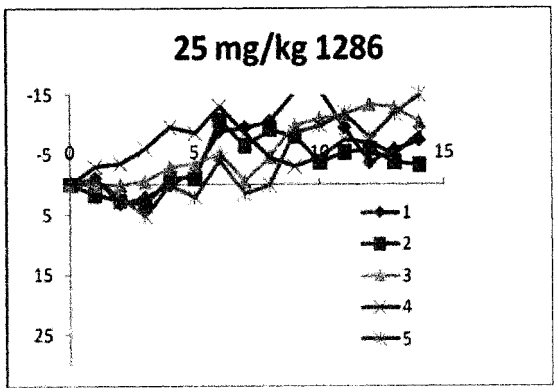


【図７Ｂ－２】

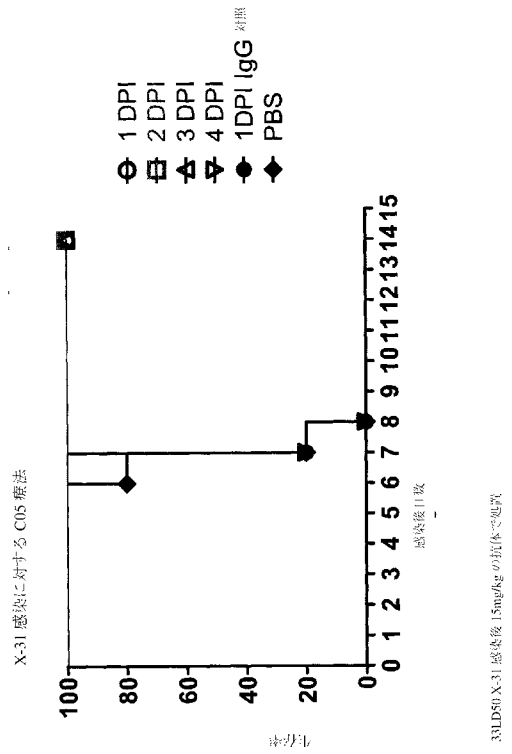




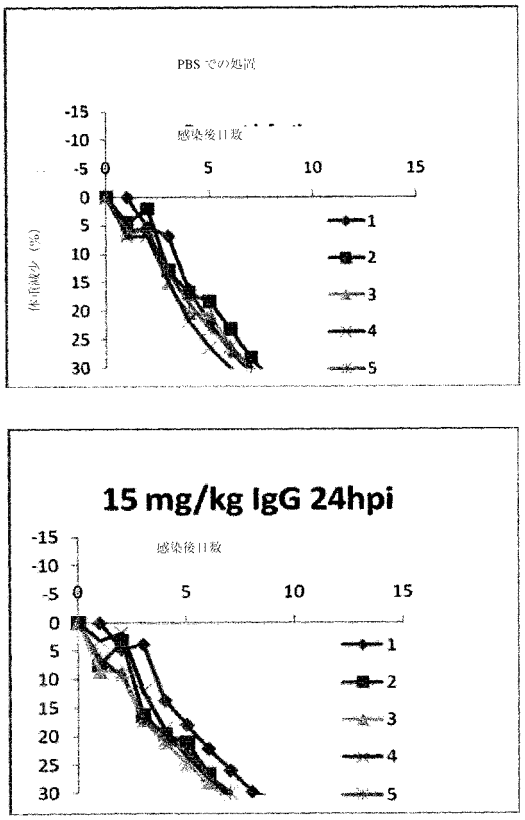
【図７Ｂ－３】



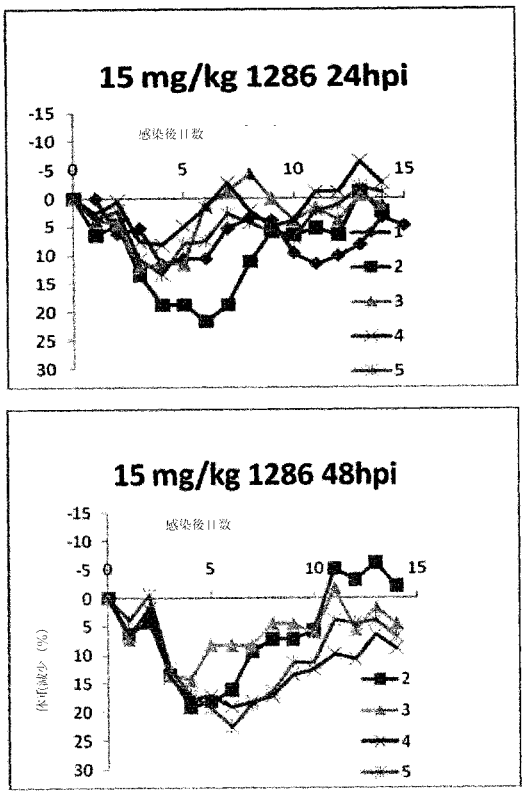
【図７Ｃ】



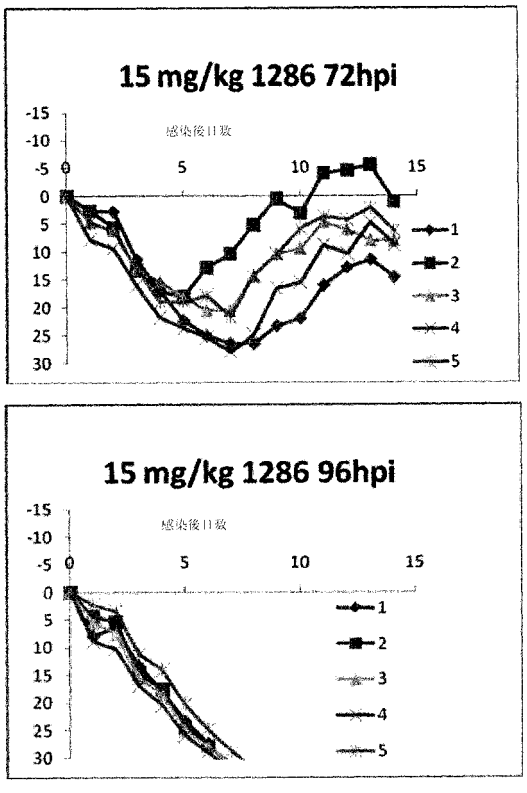
【図７Ｄ－１】



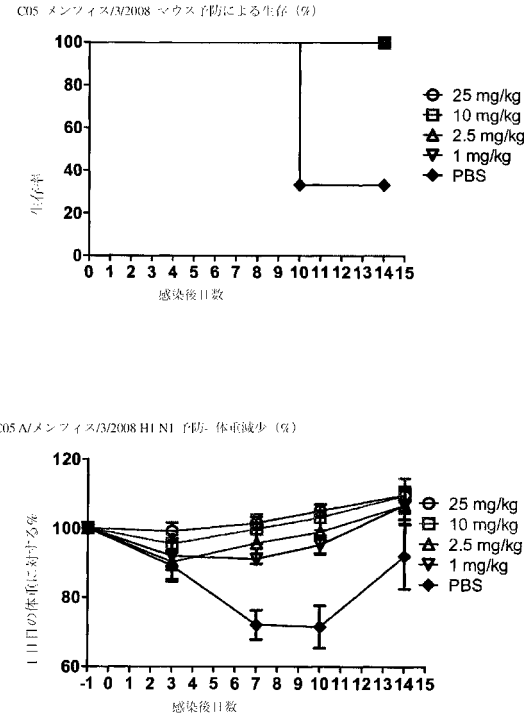
【図７Ｄ－２】



【図７Ｄ－３】



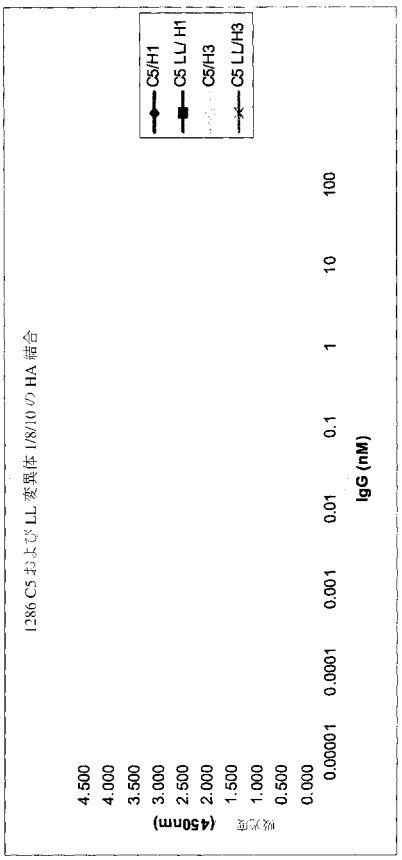
【図７Ｅ】


C05 メンフィス/3/2008 マウス予防による生存（%）
生存率
感染後日数
25 mg/kg
10 mg/kg
2.5 mg/kg
1 mg/kg
PBS
C05 A/メンフィス/3/2008 H1 N1 予防- 体重減少（%）
1 日目の体重に対する%
感染後日数
25 mg/kg
10 mg/kg
2.5 mg/kg
1 mg/kg
PBS

【図８】


H3 における C5 修飾されていない AL LL SL
nM IgG
H1 および H3 における C5 修飾されていない AL LL SL
nM IgG

【図９】


1286 C5 および LL 変異体 1/8/10 の HA 結合
C5/H1
C5 LL/ H1
C5/H3
C5 LL/H3
吸光度 (450nm)
IgG (nM)

【配列表】
2017141231000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年3月28日(2017.3.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載の発明。
【手続補正書】
【提出日】平成29年6月30日(2017.6.30)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７、配列番号８、および配列番号９の超可変領域配列、またはその機能的に活性なフラグメントを含む重鎖；および（ｂ）軽鎖を含む、インフルエンザウイルスに対する抗体であって、
抗体またはその機能的に活性なフラグメントは、（ｉ）インフルエンザＡウイルスの１を超える亜型および／または１を超える分離株を中和し、（ｉｉ）ウイルスの血球凝集素（ＨＡ）抗原に結合し、かつ（ｉｉｉ）血球凝集素を阻害する、抗体。
【請求項２】
軽鎖が、
ａ）配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５の軽鎖超可変配列、またはその機能的に活性なフラグメント；
ｂ）配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８の軽鎖超可変配列、またはその機能的に活性なフラグメント；または
ｃ）配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１の軽鎖超可変配列、またはその機能的に活性なフラグメント、
を含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
重鎖が、配列番号１に示されるアミノ酸配列、またはその機能的に活性なフラグメントを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
ａ）軽鎖が、配列番号３、配列番号４、および配列番号５から選択される、もしくはその機能的に活性なフラグメントである；または
ｂ）Ｈ１ＨＡ抗原、もしくはその機能的に活性なフラグメントに結合し、かつ任意選択的に、少なくとも１のさらなるＨＡ抗原、もしくはその機能的に活性なフラグメントに結合し、さらなるＨＡ抗原が、任意選択的にＨ３、もしくはその機能的に活性なフラグメントである、
請求項３に記載の抗体。
【請求項５】
ａ）ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープに結合し；または
ｂ）ＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合し；または

ｃ）ＨＡ抗原のＨ１亜型のエピトープ、およびＨＡ抗原のＨ３亜型のエピトープに結合する；または
ｄ）ＨＡ抗原のＨ９亜型のエピトープに結合し；または
ｅ）Ｈ１ＨＡ抗原およびＨ３抗原と交差反応し；または
ｆ）Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡウイルス亜型の少なくとも１を中和し；または
ｇ）Ｈ１およびＨ３インフルエンザＡウイルス亜型を中和し；または
ｈ）Ｈ１ＨＡ抗原、もしくはその機能的に活性なフラグメントを中和し、
ａ）からｄ）の場合、エピトープが任意選択的にインフルエンザＡウイルスの表面上に提示される、
請求項４に記載の抗体、またはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項６】
ａ）前記Ｈ１亜型がＨ１ウイルスのニューカレドニア／２０／９９分離株であるか、もしくはＨＡがＨ１ウイルスのニューカレドニア／２０／９９分離株に由来する；
ｂ）前記Ｈ１亜型がＨ１ウイルスのソロモン諸島／３／０６分離株であるか、もしくはＨＡがＨ１ウイルスのソロモン諸島／３／０６分離株に由来する；
ｃ）前記Ｈ３亜型がＨ３ウイルスのウィスコンシン／６７／０５分離株であるか、もしくはＨＡがＨ３ウイルスのウィスコンシン／６７／０５分離株に由来する；
ｄ）前記Ｈ３亜型がＨ３ウイルスの香港／６８分離株であるか、もしくはＨＡがＨ３ウイルスの香港／６８分離株に由来する；または
ｅ）前記Ｈ９亜型がＨ９ウイルスの香港／１０７３／９９分離株であるか、もしくはＨＡがＨ９ウイルスの香港／１０７３／９９分離株に由来する、
請求項５に記載の抗体、もしくはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項７】
ａ）インフルエンザＡウイルスの球状頭部領域が細胞表面に結合するのを阻止する；または
ｂ）インフルエンザＡウイルスが、感染される細胞に付着するのを阻止する；または
ｃ）少なくとも１の前記ウイルスがヒトに感染する能力を有する；または
ｄ）少なくとも１の前記分離株がヒト被験体から得られた、
請求項３に記載の抗体、もしくはその機能的に活性なフラグメントであって、
少なくとも１の前記分離株が非ヒト動物から得られた、請求項３に記載の抗体、もしくはその機能的に活性なフラグメント。
【請求項８】
請求項１に記載の抗体を含む組成物。
【請求項９】
請求項１に記載の抗体の有効量を被験体に投与することを含む、被験体におけるインフルエンザＡウイルス感染の阻止および／または治療のための方法。
【請求項１０】
請求項１に記載の抗体により結合される中和エピトープを機能的に模倣するペプチドまたはポリペプチドを含むインフルエンザウイルスＡに対する有効なワクチン。

フロントページの続き

(72)発明者　バット，　ラメシュ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４００２，ベルモント，　ウォーザム　クロス　２７２９
(72)発明者　カシャップ，　アルーン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５６０，ニューアーク，　セヴァーン　ドライヴ　３５２８８

Ｆターム(参考) 4H045 AA10　AA11　AA30　BA10　CA40　EA20　EA29　FA74

【外国語明細書】
2017141231000001.pdf