

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-510802

(P2012-510802A)

(43) 公表日 平成24年5月17日(2012.5.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 31/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/16	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 S	4 C 0 8 5
<b>C 0 7 K 16/10 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/10 Z N A	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-538980 (P2011-538980)	(71) 出願人	505141657
(86) (22) 出願日	平成21年11月30日 (2009.11.30)		インターセル アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月15日 (2011.7.15)		オーストリア国 ウイーン キャンパス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/066052		ウィーン バイオセンター 3
(87) 国際公開番号	W02010/063675	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成22年6月10日 (2010.6.10)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	08170749.9	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成20年12月4日 (2008.12.4)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	09173548.0		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成21年10月20日 (2009.10.20)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 完全ヒトインフルエンザM2 特異的抗体

## (57) 【要約】

本発明は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合するヒト抗体、好ましくは完全ヒト抗体に関する。本発明は、さらに、そのような抗体の個々の軽鎖および／または重鎖、該抗体またはそれらの軽鎖および／もしくは重鎖をコードする核酸、ならびに該抗体の発現のための発現ベクターに関する。さらに、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および／または防止における該抗体の使用に関する。

	CDR1	CDR2	CDR3
1005	YQSFSLAVLGERATINCKSG	GVLTYSINQV	GHVQKPGQPPNLLIY
1013			
1019			
1033			
1037			
1005	S..S..A..E..		
1006	S..S..A..E..		
1007			
1011	H..		
1012			
1013			
1023	S..S..A..E..		
1028			
1029			
1030	S..S..A..E..		
1031			
1033			
1034			
1035			
1036			
1040	S..S..A..E..		
1043	S..S..A..E..		
1044			
1048	S..S..A..E..		
1049			
1051			
1003	V..		

	CDR1	CDR2	CDR3
1005	YQSFSLAVLGERATINCKSG	GVLTYSINQV	GHVQKPGQPPNLLIY
1013			
1019			
1033			
1037			
1005	S..S..A..E..		
1006	S..S..A..E..		
1007			
1011	H..		
1012			
1013			
1023	S..S..A..E..		
1028			
1029			
1030	S..S..A..E..		
1031			
1033			
1034			
1035			
1036			
1040	S..S..A..E..		
1043	S..S..A..E..		
1044			
1048	S..S..A..E..		
1049			
1051			
1003	V..		

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体である、単離されたモノクローナル抗体であって、  
該抗体が少なくとも1つの抗原結合部位を含み、

該抗原結合部位が以下のものを含む、モノクローナル抗体：

(a) (i) SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；  
ならびに

(b) (i) SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVR。

**【請求項 2】**

少なくとも1つの抗原結合部位が、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されたエピトープを認識する、請求項1記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 3】**

LC CDR1がSEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つのペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1または2のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 4】**

LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1～3のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 5】**

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなる、請求項1～4のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 6】**

HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、請求項1～5のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 7】**

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれかのペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなる、請求項1～6のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20のペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、請求項1～7のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

IgG、好ましくは、IgG1である、請求項1～8のいずれか一項記載のモノクローナル抗体

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 10】

SEQ ID NO:26、27、および28のいずれか1つのアミノ酸配列、好ましくはSEQ ID NO:26を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの軽鎖を含み、かつSEQ ID NO:29のアミノ酸を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの重鎖をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 11】

インフルエンザM2e抗原がA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインであり、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48～83および90～92のいずれかのペプチドであり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48のペプチドである、請求項1～10のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

10

## 【請求項 12】

モノクローナル抗体とインフルエンザM2e抗原との解離定数(Kd)が、高々100nM、好ましくは高々10nM、より好ましくは高々6nM、最も好ましくは高々5nMであり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48である、請求項1～11のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 13】

請求項1～12のいずれか一項記載のモノクローナル抗体を含み、好ましくは、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤をさらに含む、薬学的組成物。

## 【請求項 14】

好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防の方法において使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または請求項13記載の薬学的組成物。

20

## 【請求項 15】

好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防のための医薬の製造における、請求項1～12のいずれか一項記載のモノクローナル抗体の使用。

## 【請求項 16】

有効量の請求項1～12のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または有効量の請求項13記載の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または防止の方法であって、好ましくは、該対象がヒトであり、さらに好ましくは、該モノクローナル抗体がIgG1である、方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の領域

本発明は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合するヒト抗体、好ましくは完全ヒト抗体に関する。本発明は、さらに、そのような抗体の個々の軽鎖および/または重鎖、該抗体またはそれらの軽鎖および/もしくは重鎖をコードする核酸、ならびに該抗体の発現のための発現ベクターに関する。さらに、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または防止における、該抗体の使用に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

関連分野

A型インフルエンザウイルスは、未だ、毎年、300万～500万の重症例および250,000～500,000人の死亡の原因となっている、ヒトにおける主要な病因である。赤血球凝集素(HA)に対する中和抗体を誘導することにより作用する、効率的なA型インフルエンザワクチンが入手可能である。HAは、変異(抗原連続変異)により絶えず変化しているため、A型インフルエンザの新たな抗原性バリエーションが毎年発生し、従って、常にワクチンの更新が必要となっている。HAまたはノイラミニダーゼ(NA)の亜型間の交換をもたらす、セグメ

50

ント化されたウイルスゲノムの時々の再集合（抗原不連続変異と呼ばれる過程）のため、効率的な予防接種は、さらに複雑になっている。HAを標的とするモノクローナル抗体（mAb）による受動免疫は、極めて効率的であるが、抗原不連続変異および抗原連続変異のため、現在のワクチンと同一の短所を呈する。

#### 【 0 0 0 3 】

従って、能動免疫戦略および受動免疫戦略のための理想的な標的は、保存されたウイルスタンパク質であろう。マトリックスタンパク質2（M2）は、この条件を満たしており、過去数十年間にわたってインフルエンザ感染に対する可能性のある標的として相当の注目を浴びてきた（Zebedee SL, Lamb RA: Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol 1988, 62:2762-2772（非特許文献1））。M2は、エンドソームにおけるウイルスのアンコーティング、およびトランスゴルジネットワークにおけるウイルス成熟に関与している四量体イオンチャネルである。23アミノ酸の細胞外ドメインは、過去100年以上にわたりヒトA型インフルエンザウイルス単離物において著しく保存され続けている。それは、少なくとも一部分は、M2タンパク質がマトリックスタンパク質1（M1）と同時転写されるという事実による。M2は、感染細胞上に豊富に発現されるが、A型インフルエンザウイルス膜にはほとんどM2分子が存在しない。これらの観察に従って、M2特異的抗体は、ウイルスの中和を通して感染を防止するのではなく、ADCCによる感染細胞の排除により防御することが示された（Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF: Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. J. Immunol. 2004, 172:5598-5605（非特許文献2））。

#### 【 0 0 0 4 】

モノクローナル抗体による受動免疫は、予防接種と比べていくつかの利点を有する。特に、それは、高齢者、幼児、または免疫不全個体のような、ワクチンに対して不十分に応答する人々の処置を可能にする。さらに、受動免疫は、曝露後の処置または急性曝露のための予防のような、迅速な防御が重大である状況において、選択される処置オプションである。多数のM2外部ドメイン（M2e）特異的mAbが、予防的環境で、致死チャレンジからマウスを防御することが報告されている。これらのmAbは、染色体導入（transchromosomal）マウスに由来する完全ヒト抗体を含み（Wang R et al, Antiviral Res. 2008, 80:168-177（非特許文献3）；WO2006/061723A2（特許文献1）；およびWO03/078600A2（特許文献2））、天然のヒトM2e特異的抗体は現在のところ報告されていない。しかしながら、ヒト対象における適用のためには、天然ヒト抗体が好ましい選択である。ファージディスプレイまたは染色体導入マウスに由来するヒト化抗体および完全ヒト抗体とは対照的に、天然ヒト抗体は、最小限の免疫原性の利点を、非選択的な反応性および毒性の最も小さな可能性と組み合わせる。さらに、ヒト由来抗体は、高親和性抗体をもたらす親和性成熟過程を経ているという利点を有する。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 WO2006/061723A2

【 特許文献 2 】 WO03/078600A2

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Zebedee SL, Lamb RA: Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol 1988, 62:2762-2772

【 非特許文献 2 】 Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF: Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. J. Immunol. 2004, 172:5598-5605

【 非特許文献 3 】 Wang R et al, Antiviral Res. 2008, 80:168-177

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【0007】

ライブラリーに基づくスクリーニングは、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインに対して高い親和性を示す、53のヒトscFvの同定、単離、およびクローニングをもたらした。完全ヒトモノクローナルIgG1抗体が、代表的なscFvクローンから生成された。ヒト抗体、特に、完全ヒト抗体は、ヒト対象へ投与された場合に、より軽度の副作用を示すため、有利である。理論に拘束はされないが、これは、ヒト抗体、特に、完全ヒト抗体が、典型的には、好ましくは、ヒト免疫系により認識されないためである。驚くべきことに、選択された抗体クローンは、軽鎖可変領域（LCVR）および重鎖可変領域（HCVR）に、同一のかつ／または高度に類似しているCDR配列の異なる組み合わせを示すことが見出された。CDRの特定の組み合わせに基づき、異なる型のLCVRおよびHCVRが区別され得る（表1および2を参照のこと）。しかしながら、表1および2に提供される配列情報から推定され得るように、全てのクローンのLCVRおよびHCVRが、高度に類似している。従って、本発明の抗体は、クローン関連性を有するとの結論が下された。表3は、選択されたクローンに見出されたCDRにより定義されるような、LCVRおよびHCVRの型の異なる組み合わせの概要を提供する。表は、53のクローンにおけるこれらの組み合わせの各々の存在量も示す。さらに驚くべきことに、本発明の抗体は、インフルエンザM2e抗原、特に、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインに対して、極めて高い親和性を示すことが見出された。抗体とRNase-A型インフルエンザM2e抗原コンジュゲートとの間の解離定数（Kd）は、低ピコモル範囲にあることが見出された。エピトープマッピングは、抗体クローンD005により認識される最小エピトープがアミノ酸配列LLTEVETP（SEQ ID NO:93）に含まれることを明らかにした。このエピトープは、大部分の公知のA型インフルエンザ株のM2タンパク質に含まれている。従って、本発明の抗体は、A型インフルエンザウイルスの異なる株に由来するA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインの異なるバリエーションに対して同様に高い親和性を示すことが見出された。本発明の抗体は、表面上に組換えA型インフルエンザM2タンパク質を発現している細胞に特異的に結合することも証明された。さらに、本発明の抗体は、細胞会合型のA型インフルエンザM2タンパク質に対して優先的な結合を示すことが見出された。さらに、本発明の抗体は、A型インフルエンザウイルス粒子に関連したA型インフルエンザM2タンパク質に特異的に結合し得ることが見出された。最も重要なことに、本発明の抗体は、A型インフルエンザウイルス感染の処置および／または防止において高度に効率的であることが、A型インフルエンザウイルス感染のマウスモデルにおいて証明された。当技術分野において公知の他のA型インフルエンザM2特異的ヒト抗体とは異なり、本発明の抗体は、感染後1日目または2日目に単回投与された場合に治療活性を有する。従って、本明細書に開示された抗体は、治療的環境においても予防的環境においても、A型インフルエンザウイルス感染に対する医薬として有用である。

## 【0008】

（表1）完全ヒトM2特異的モノクローナル抗体のLCVRのCDR。LCVRの9つの型（1A～3B）が、CDR配列の組み合わせに基づき区別され得る。LC CDRの配列類似性に基づき、LCVRの3つの群が区別され得る：1A～1E、2A～2B、および3A～3B。

型	クローン	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR 3
1A	D005および 他31クローン	qsvlytsnnkny (SEQ ID NO:1)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
1B	F048, F084	qsvlntsnnkny (SEQ ID NO:2)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
1C	E011	qsvlhtsnnkny (SEQ ID NO:3)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
1D	E036	qsvlytsnnkny (SEQ ID NO:1)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmapit (SEQ ID NO:9)
1E	F076	qsvlytsnnkny (SEQ ID NO:1)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfvtpit (SEQ ID NO:10)
2A	E040および 他10クローン	qsvlyssnneny (SEQ ID NO:4)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
2B	E043	qsvlyssnnedy (SEQ ID NO:5)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
3A	F052, F015, F077	qsllyssnnkny (SEQ ID NO:6)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpit (SEQ ID NO:8)
3B	F027	qsllyssnnkny (SEQ ID NO:1)	was (SEQ ID NO:7)	qqyfmltpia (SEQ ID NO:11)

10

## 【 0 0 0 9 】

(表2) 完全ヒトM2特異的モノクローナル抗体のHCVRのCDR。HCVRの6つの型が、CDR配列の組み合わせに基づき区別され得る。

20

型	クローン	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR 3
1A	D005および 他45クローン	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	iksksygvtt (SEQ ID NO:13)	tsssgflyyfdy (SEQ ID NO:15)
1B	E031, F023, F057	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	iksksygvtt (SEQ ID NO:13)	tsssgflyyfdh (SEQ ID NO:16)
1C	E005	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	iksksygvtt (SEQ ID NO:13)	tsssflyyfdy (SEQ ID NO:17)
1D	E034	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	iksksygvtt (SEQ ID NO:13)	tsnsgflyyfdy (SEQ ID NO:18)
1E	E044	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	ikskpygvtt (SEQ ID NO:14)	tsssgflyyfdy (SEQ ID NO:15)
1F	F071	glnfgdyp (SEQ ID NO:12)	iksksygvtt (SEQ ID NO:13)	tsssgfsyyfdy (SEQ ID NO:19)

30

## 【 0 0 1 0 】

(表3) 完全ヒトM2特異的モノクローナル抗体の53の独立したクローンに存在するようなLCVRとHCVRとの組み合わせ。(太字で強調されている)クローンD005、E040、およびF052は、LCVRとHCVRとの最も豊富な組み合わせのうちの3つを表し、従って、さらなる分析のために代表的なクローンとして選ばれた。

CDR型の 組み合わせ (LC VR-HC VR)	クローン	クローンの数
1A-1A	D005, D013, D019, D033, D037, E007, E012, E021, E028, E029, E033, E035, E049, E051, F004, F005, F025, F037, F039, F040, F045, F046, F054, F065, F075, F087	26
1A-1B	E031, F023, F057	3
1A-1D	E034	1
1A-1E	E044	1
1A-1F	F071	1
1B-1A	F048, F084	2
1C-1A	E011	1
1D-1A	E036	1
1E-1A	F076	1
2A-1A	E006, E023, E030, E040, E048, F003, F020, F044, F062, F066	10
2A-1C	E005	1
2B-1A	E043	1
3A-1A	F015, F052, F077	3
3B-1A	F027	1

10

## 【 0 0 1 1 】

一つの局面において、本発明は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、かつヒトモノクローナル抗体、好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体に関する。好ましくは、該モノクローナル抗体とインフルエンザM2e抗原とのEC50値および/または解離定数(Kd)は、高々1000nM、好ましくは高々100nM、より好ましくは高々10nM、さらに好ましくは高々1nM、さらに好ましくは高々100pM、さらに好ましくは高々10pM、最も好ましくは高々1pMである。

20

## 【 0 0 1 2 】

好ましい態様において、(i)モノクローナル抗体は、(a)SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c)SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む少なくとも1つのLCVRを含み；かつ/または(ii)モノクローナル抗体は、(a)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む少なくとも1つのHCVRを含む。

30

## 【 0 0 1 3 】

さらなる局面において、本発明は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくはヒトモノクローナル抗体、最も好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体であって、かつ少なくとも1つの抗原結合部位を含む、単離されたモノクローナル抗体に関する。該抗原結合部位は、(a)(i)SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii)SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；ならびに(b)(i)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVRを含む。

40

## 【 0 0 1 4 】

本発明のさらなる局面は、ヒトモノクローナル抗体、最も好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体であって、かつインフルエンザM2e抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の、(a)SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c)SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含むLCVRである。

## 【 0 0 1 5 】

50

本発明のさらなる局面は、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体であって、かつインフルエンザM2e抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の、SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b) SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c) SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含むHCVRである。

【0016】

さらなる局面において、本発明は、本発明のHCVRもしくはLCVR、本発明のモノクローナル抗体、またはそれらの個々の鎖をコードする核酸分子に関する。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、本発明の抗体の組換え発現のための発現ベクターに関する。

10

【0018】

さらなる局面において、本発明は、少なくとも一つの本発明の核酸分子または少なくとも一つの本発明の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0019】

さらなる局面において、本発明は、少なくとも一つの本発明のモノクローナル抗体を含む薬学的組成物に関する。

【0020】

さらなる局面において、本発明は、有効量の本発明のモノクローナル抗体または有効量の本発明の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、受動免疫、好ましくはA型インフルエンザウイルスに対する受動免疫の方法に関する。好ましくは、該モノクローナル抗体はIgG1である。

20

【0021】

さらなる局面において、本発明は、有効量の本発明のモノクローナル抗体または有効量の本発明の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または防止の方法に関する。好ましくは、該対象はヒトであり、さらに好ましくは、該モノクローナル抗体はIgG1である。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、受動免疫、好ましくはA型インフルエンザウイルスに対する受動免疫において使用するための、本発明のモノクローナル抗体または本発明の薬学的組成物に関する。さらに好ましくは、該モノクローナル抗体はIgG1である。

30

【0023】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防のための医薬の製造における、本発明のモノクローナル抗体の使用に関する。さらに好ましくは、該モノクローナル抗体はIgG1である。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1-1】M2特異的ヒト抗体のLCVR配列(アミノ酸5~113)のアラインメント。同一のアミノ酸は、ドットとして示されている。LC CDR1~3が四角で囲まれている。

40

【図1-2】M2特異的ヒト抗体のLCVR配列(アミノ酸5~113)のアラインメント。同一のアミノ酸は、ドットとして示されている。LC CDR1~3が四角で囲まれている。

【図2-1】M2特異的ヒト抗体(図1と同一の抗体)のHCVR配列(アミノ酸7~121)のアラインメント。同一のアミノ酸は、ドットとして示されている。HC CDR1~3が四角で囲まれている。

【図2-2】M2特異的ヒト抗体(図1と同一の抗体)のHCVR配列(アミノ酸7~121)のアラインメント。同一のアミノ酸は、ドットとして示されている。HC CDR1~3が四角で囲まれている。

【図3】インフルエンザにより誘導される罹患率および死亡率に対するM2特異的抗体の効果。-2日目に、示されたscFv-msFc 2c抗体500 μgによりマウスを処理し、0日目に、A型

50



インフルエンザウイルスPR8を感染させ、示された日に、体重（A）、体温（B）、および生存率（C）をモニタリングした。

【図4】インフルエンザ感染マウスの生存率に対するscFv-D005-msFc 2cの効果。（A）用量滴定。-2日目に、示された量の抗体によりマウスを処理し、0日目に、A型インフルエンザウイルスPR8を感染させ、21日間、生存率をモニタリングした。（B）抗体の治療的適用。0日目に、マウスにA型インフルエンザウイルスPR8を感染させ、示された日に、抗体200 μgにより処理し、21日間、生存率をモニタリングした。対照は、-2日目にマウスIgGにより処理された。

【図5】インフルエンザにより誘導される罹患率および死亡率に対するM2特異的抗体の効果。-2日目に、示されたフォーマットの抗体D005によりマウスを処理し、0日目に、A型インフルエンザウイルスPR8を感染させ、示された日に、体重（A）、体温（B）、および生存率（C）をモニタリングした。

【図6】可溶性M2eペプチドの存在下での細胞表面M2への結合。L929/M2#E9細胞を、可溶性M2eペプチドの存在下（実線）または非存在下（太線）で、抗体14C2（A）またはD005（B）により染色し、FACSにより分析した。点線は、蛍光標識された二次抗体のみによる染色。

【図7】抗体D005のA型インフルエンザPR8ウイルス粒子への直接結合。抗HA抗体により予めコーティングされたELISAプレートのウェル上に、示された量のウイルスを捕捉した。hIgG1k-D005または無関係のアイソタイプ対照により、ウイルスを検出した。

【図8】抗体D005の結合特異性の特徴決定。（A）A型インフルエンザの異なる株からのM2e由来ペプチドとのIgG1k-D005の反応性。（B）エピトープマッピング。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

「抗体」：本明細書において使用されるように、「抗体」という用語は、典型的には、好ましくは、抗原のエピトープもしくは抗原決定基、またはハプテンに結合することにより、抗原に特異的に結合することができる分子、好ましくはタンパク質をさす。好ましくは、抗体という用語は、少なくとも1つの可変領域を含む、抗原またはハプテンと結合する分子をさし、好ましくは、該分子は、少なくとも1つのHCVRおよび/または少なくとも1つのLCVRを含む。さらに好ましくは、抗体という用語は、各々、1つのHCVRおよび1つのLCVRにより形成される抗原結合部位を、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む、抗原またはハプテンと結合する分子をさす。さらに、抗体という用語は、完全抗体、好ましくは、IgG、IgA、IgE、IgM、またはIgDクラス、より好ましくは、IgGクラス、最も好ましくは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4の完全抗体、ならびにそれらの抗原結合断片をさす。好ましい態様において、完全抗体は、軽鎖または軽鎖のいずれかを含む。「抗体」という用語は、抗原またはハプテンと結合する抗体断片、好ましくは、タンパク質分解断片およびそれらの組換えアナログ、最も好ましくは、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvもさす。抗体という用語は、少なくとも1つ、好ましくは2つの可変領域を含み、さらに好ましくは、正確に1つのHCVRおよび正確に1つのLCVRを含むタンパク質をさらに包含する。好ましい態様において、抗体という用語は、単鎖抗体、好ましくはscFvをさす。従って、好ましい抗体は、単鎖抗体、好ましくはscFv、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、および軽鎖可変領域（LCVR）または重鎖可変領域（HCVR）のいずれかを含む断片である。本発明に関して、「抗体」という用語は、好ましくは、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つの可変領域を含む単一のポリペプチドからなる組換えタンパク質を含む、組換え抗体をさす。本発明に関して、組換え抗体は、例えば、リンカー領域、シグナルペプチドもしくは疎水性リーダー配列、検出タグ、および/または精製タグ（例えば、Fc）のような機能要素をさらに含んでいてもよい。

【0026】

「認識」：抗体が、抗体との相互作用のために利用可能な位置にエピトープを含む抗原に特異的に結合し、かつエピトープを含まないか、またはエピトープが抗体との相互作用

10

20

30

40

50

のために利用可能でない位置に位置している以外は同一である抗原に特異的に結合しない場合、その抗体は、そのエピトープを「認識」と言われる。同様に、抗原結合部位を含む抗体がエピトープを認識する場合、その抗原結合部位は、そのエピトープを認識すると言われる。典型的には、好ましくは、該抗体は、異なる構造を有する第2の抗原結合部位を含まない。

【0027】

「Fv」：Fvという用語は、抗原またはハプテンに結合することができる、抗体の最小タンパク質分解断片、および該断片の組換えアナログをさす。

【0028】

「単鎖抗体」：単鎖抗体は、単一のポリペプチドからなる抗体である。好ましい単鎖抗体は、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのVRを含むポリペプチドからなる。好ましくは、該VRはHCVRである。より好ましい単鎖抗体は、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのHCVRと、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのLCVRとを含むポリペプチドからなる。さらに好ましい単鎖抗体は、正確に1つのHCVRと正確に1つのLCVRとを含む。典型的には、好ましくは、該HCVRおよび該LCVRは、抗原結合部位を形成している。最も好ましい単鎖抗体は、リンカー領域により相互に連結されている正確に1つのHCVRと正確に1つのLCVRとを含む単一のポリペプチドからなるscFvである。好ましくは、該リンカー領域は、少なくとも15アミノ酸、好ましくは15～20アミノ酸からなる (Bird et al. (1988) Science, 242(4877):423-426)。さらに好ましい単鎖抗体は、5' 3'方向に、以下の順序で、(1) 軽鎖または 軽鎖からの軽鎖フレームワーク (LC FR) 1と相補性決定領域 (LC CDR) 1とLC FR2とLC CDR2とLC FR3とLC CDR3とLC FR4とからなる軽鎖可変領域 (LCVR) ; (2) 可動性リンカー (L)、および (3) フレームワーク (HC FR) 1と相補性決定領域 (HC CDR) 1とHC FR2とHC CDR2とHC FR3とHC CDR3とHC FR4とからなる重鎖可変領域 (HCVR) : を含むコーディング領域によりコードされるscFvである。あるいは、単鎖抗体は、5' 3'方向に、以下の順序で、(1) フレームワーク (HC FR) 1と相補性決定領域 (HC CDR) 1とHC FR2とHC CDR2とHC FR3とHC CDR3とHC FR4とからなる重鎖可変領域 (HCVR) ; (2) 可動性リンカー (L)、および (3) 軽鎖または 軽鎖からの軽鎖フレームワーク (LC FR) 1と相補性決定領域 (LC CDR) 1とLC FR2とLC CDR2とLC FR3とLC DR3とLC FR4とからなる軽鎖可変領域 (LCVR) : を含むコーディング領域によりコードされるscFvである。

【0029】

「ダイアボディ」：「ダイアボディ」という用語は、リンカー領域により相互に連結されているHCVRおよびLCVRを各々含む、2本のポリペプチド鎖、好ましくは、2本の同一のポリペプチド鎖を含む抗体をさす。好ましくは、該リンカー領域は、高々10アミノ酸を含む (Huston et al. (1988), PNAS 85(16):587958-83 ; Holliger et al. (1993), PNAS 90(14):6444-6448, Hollinger & Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136 ; Arndt et al. (2004) FEBS Letters 578(3):257-261)。ダイアボディの好ましいリンカー領域は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸を含む。

【0030】

「ヒト抗体」：本明細書において使用されるように、「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を基本的に有する抗体、好ましくは、組換え抗体、またはその断片をさし、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体を含む。本発明に関して、「ヒト抗体」は、ネイティブヒト抗体の配列と比較して、限られた数のアミノ酸交換を含んでもよい。そのようなアミノ酸交換は、例えば、クローニング法により引き起こされる場合がある。しかしながら、本発明のヒト抗体におけるそのようなアミノ酸交換の数は、好ましくは、最小化される。好ましくは、ヒト抗体のアミノ酸配列は、ネイティブヒト抗体のものと少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。より好ましくは、ヒト抗体のアミノ酸配列は、関心対象の抗原またはハプテンに特異的に結合するネイティブヒト抗体のものと少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%

、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。最も好ましくは、ヒト抗体のアミノ酸配列は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合するネイティブヒト抗体のものと少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。好ましくは、該インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48~52のいずれか1つより選択され、最も好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48である。

【0031】

好ましい組換えヒト抗体は、高々20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸、ネイティブヒト抗体と異なる。極めて好ましくは、組換えヒト抗体とネイティブヒト抗体とのアミノ酸配列の差は、分子クローニングによって排除され、従って、最も好ましくは、組換えヒト抗体およびネイティブヒト抗体のアミノ酸配列は同一である。そのような抗体は「完全ヒト抗体」とも呼ばれる。ヒト抗体ライブラリーより選択されたヒト抗体から完全ヒト抗体を入手する方法の例示的な例が、実施例8に提供される。典型的には、好ましくは、完全ヒト抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない。

【0032】

好ましいヒト抗体は、(a)少なくとも1つ、好ましくは1つのHCVR、(b)少なくとも1つ、好ましくは1つのHCCR、(c)少なくとも1つ、好ましくは1つのLCVR、および(d)少なくとも1つ、好ましくは1つのLCCRを含む。該少なくとも1つのHCVRおよび/または該少なくとも1つのHCCRおよび/または該少なくとも1つのLCVRおよび/または該少なくとも1つのLCCRは、それぞれのネイティブヒト領域と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。

【0033】

ヒト免疫グロブリンを含む免疫グロブリンの定常領域が、様々なアロタイプで存在すること、即ち、定常領域のアミノ酸配列が、集団の個体間で、ある程度異なる場合があることは、よく確立されている。ヒト免疫グロブリンの定常領域のアロタイプは、極めてよく研究されており、配列情報は、Immuno Genetics Information System (<http://imgt.cines.fr/>)を含む、様々な供給元から当業者に容易に入手可能である。ある免疫グロブリンの定常領域の異なるアロタイプが、本発明の目的のため、交換可能であることが理解されるべきである。例えば、本発明のモノクローナル抗体のヒト1重鎖は、ヒト1HCCRの任意の既存のアロタイプを含み得る。

【0034】

「モノクローナル抗体」：本明細書において使用されるように、「モノクローナル抗体」という用語は、ただ一つの単一抗体種、即ち、同一のアミノ酸配列を有する抗体を含む抗体集団をさす。

【0035】

「定常領域(CR)」：「定常領域」という用語は、抗体の軽鎖定常領域(LCCR)または重鎖定常領域(HCCR)をさす。典型的には、好ましくは、CRは、ジスルフィドにより安定化されたループ構造を特徴とする1~4つの免疫グロブリンドメインを含む。好ましいCRは、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンのCRであり、さらに好ましくは、該免疫グロブリン、好ましくは、該ヒト免疫グロブリンは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、およびIgDからなる群より選択される。極めて好ましいCRは、例えば、Immunogenetic Information System (<http://imgt.cines.fr/>)を含む、公的なデータベースより入手可能なアミノ酸配列を含むかまたはからなるヒトCRである。

【0036】

軽鎖定常領域(LCCR)：LCCR、より具体的には、LCCRまたはLCCRは、典型的には、ネイティブ抗体のネイティブ軽鎖または軽鎖のC末端側の半分を表す。LCCRは、典型的には、1つの免疫グロブリンドメインを表す約110アミノ酸を含む。

【0037】

重鎖定常領域（HCCR）：重鎖の定常領域は、抗体の重鎖の約4分の3以上を含み、C末端に位置している。典型的には、HCCRは、3つまたは4つのいずれかの免疫グロブリンドメインを含む。好ましいHCCRは、HCCR、HCCR、HCCR、 $\mu$  HCCR、およびHCCRより選択される。極めて好ましいのは、HCCRであり、好ましくは、該HCCRは、1 HCCR、2 HCCR、3 HCCR、および4 HCCRより選択され、最も好ましくは、該HCCRは1 HCCRである。

#### 【0038】

「可変領域（VR）」：とは、抗体の可変領域または可変ドメイン、より具体的には、重鎖可変領域（HCVR）または軽鎖可変領域（LCVR）をさす。典型的には、好ましくは、VRは、単一の免疫グロブリンドメインを含む。好ましいVRは、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンのVRであり、さらに好ましくは、該免疫グロブリン、好ましくは該ヒト免疫グロブリンは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、およびIgDからなる群より選択される。様々な種のVRが、当技術分野において公知である。好ましいVRは、フレームワークが、公知のヒトVR配列のフレームワークとの少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示すヒトVRである。好ましいVRは、フレームワークが、公的なデータベースより入手可能なヒトVR配列のフレームワーク、最も好ましくは、Immuno genetics Information System (<http://imgt.cines.fr/>) より入手可能なヒトVR配列との少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を示すヒトVRである。

10

20

#### 【0039】

各VRは、いわゆるフレームワークに埋め込まれた、抗体の結合特徴を決定する、いわゆる相補性決定領域（CDR）を含む。典型的には、好ましくは、VRは、フレームワーク（FR1～4）に埋め込まれた3つのCDR、好ましくは、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。従って、好ましい態様において、VRは、N末端からC末端へ、以下の順序で、FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4の要素を含む。

#### 【0040】

一般に、VRは、例えば、D遺伝子セグメントおよびJ遺伝子セグメント（HCVR）またはJ遺伝子セグメント（LCDR）のようなさらなる遺伝子セグメントと組み合わせられた、V遺伝子セグメントのファミリーのメンバーの産物であるポリペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。

30

#### 【0041】

「軽鎖可変領域（LCVR）」：軽鎖可変領域は、再構成された核酸分子によりコードされ、LCVRまたはLCVRのいずれかである。ヒトLCVRは、ヒトV遺伝子セグメントのファミリー1～7のメンバーの産物であるポリペプチドを含む。本発明に関して、好ましいLCVRは、ヒトLCVRであり、好ましくは、WO2008/055795A1のSEQ ID NO:49～52として開示されたオリゴヌクレオチドのいずれか1つと、WO2008/055795A1のSEQ ID NO:53～56として開示されたオリゴヌクレオチドのいずれか1つとのプライマーの組み合わせを使用して、さらに好ましくは、WO2008/055795A1の実施例3に記載されたPCR条件を使用して、ヒトB細胞から増幅され得るDNAによりコードされるヒトLCVRである。

40

#### 【0042】

ヒトLCVRは、ヒトV遺伝子セグメントのファミリー1～11のメンバーの産物であるポリペプチドを含む。本発明に関して、好ましいLCVRは、ヒトLCVRであり、好ましくは、WO2008/055795A1のSEQ ID NO:57～65のいずれか1つと、WO2008/055795A1のSEQ ID NO:66～68のいずれか1つとのプライマーの組み合わせを使用して、さらに好ましくは、WO2008/055795A1の実施例3に記載されたPCR条件を使用して、ヒトB細胞から増幅され得るDNAによりコードされるヒトLCVRである。

#### 【0043】

典型的には、好ましくは、LCVRは、軽鎖フレームワーク（LC FR1～4）に埋め込まれた3つのLC CDR、好ましくは、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3を含む。従って、好ましい

50

態様において、LCVRは、N末端からC末端へ、以下の順序で、LC FR1 - LC CDR1 - LC FR2 - LC CDR2 - LC FR3 - LC CDR3 - LC FR4の要素を含む。

【 0 0 4 4 】

「重鎖可変領域（HCVR）」：重鎖可変領域は、再構成された核酸分子によりコードされる。ヒトHCVRは、ヒト V遺伝子セグメントのファミリー1～7のメンバーの産物であるポリペプチドを含む。本発明に関して、好ましいHCVRは、ヒトHCVRであり、好ましくは、WO 2008/055795A1のSEQ ID NO:42～47のいずれか1つと、WO2008/055795A1のSEQ ID NO:48とのプライマーの組み合わせを使用して、さらに好ましくは、WO2008/055795A1の実施例3に記載されたPCR条件を使用して、ヒトB細胞より増幅され得るDNAによりコードされるヒトHCVRである。

10

【 0 0 4 5 】

典型的には、好ましくは、HCVRは、重鎖フレームワーク（HC FR1～4）に埋め込まれた3つのHC CDR、好ましくは、HC CDR1、HC CDR2、およびHC CDR3を含む。従って、好ましい態様において、HCVRは、N末端からC末端へ、以下の順序で、HC FR1 - HC CDR1 - HC FR2 - HC CDR2 - HC FR3 - HC CDR3 - HC FR4の要素を含む。

【 0 0 4 6 】

「CDR」：抗体のHCVRおよびLCVRそれぞれの相補性決定領域（CDR）1、2、および3は、当技術分野において一般に公知の方法により同定され得る。本願の目的のため、CDRおよびFRの境界は、Scavengerら（1999）（Exp Clin Immunogenet., Vol. 16 pp. 234-240）またはLefrancら（2003）（Developmental and Comparative Immunology Vol. 27 pp. 55

20

-77）により示されたようにして定義される。

【 0 0 4 7 】

「抗原」：本明細書において使用されるように、「抗原」という用語は、抗体が結合する分子をさす。抗原は、免疫系および/または体液性免疫応答により認識され、1つまたは複数のエピトープ、好ましくはB細胞エピトープ、または抗原決定基を有することができる。

【 0 0 4 8 】

「A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメイン」：本明細書において使用されるように、「A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメイン」という用語は、A型インフルエンザウイルスのM2タンパク質のN末端細胞外ドメイン、またはその少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、もしくは23アミノ酸の連続ストレッチをさす。好ましくは、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインとは、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質のアミノ酸残基2～24、またはその少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22アミノ酸の連続ストレッチをさす。より好ましい態様において、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインは、SEQ ID NO:48～83および90～92のいずれか1つ、またはその少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22アミノ酸の連続ストレッチより選択されるペプチドを含むかまたはからなる。極めて好ましい態様において、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインは、SEQ ID NO:48～50のいずれか1つより選択されるペプチドを含むかまたはからなる。最も好ましくは、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインは、M2eコンセンサス配列（SEQ ID NO:48）である。

30

40

【 0 0 4 9 】

（表4）A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインのバリエーション。配列はN末端メチオニンなしに示される。

A型インフルエンザM2eバリエーション	aa配列	SEQ ID NO
SEQ ID NO:84のaa2~24 (PR8)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	51
M2-T:	SLLTEVETPT <b>R</b> NEWGCRCNDSSD	52
M2eコンセンサス	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	48
M2eショート	SLLTEVETPIRNEWGC	49
M2-KE:	SLLTEVETPT <b>K</b> NEW <b>E</b> CRCNDSSD	53
M2-K:A/ウィスコンシン/3523/88(H1N1)	SLLTEVETPIRNEWGC <b>K</b> CNDSSD	54
M2-E:	SLLTEVETPIRNEW <b>E</b> CRCNDSSD	55
M2-GE:	SLLTEVETPIRNG <b>E</b> CRCNDSSD	56
M2-S:	SLLTEVETPIR <b>S</b> EWGCRCNDSSD	57
M2-FP:	<b>S</b> FLPEVETPIRNEWGCRCNDSSD	58
M2-DSSN:	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSS <b>N</b>	59
M2-K:	SLLTEVETPIR <b>K</b> EWGCRCNDSSD	61
M2-F:	<b>F</b> LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	62
M2-EG:A/ニューヨーク/687/1995/(H3N2)	SLLTEVETPIRNEW <b>E</b> CRCNGSSD	63
M2-PS:	SL <b>P</b> TEVETPIR <b>S</b> EWGCRCNDSSD	64
M2-P:	SL <b>L</b> PEVETPIRNEWGCRCNDSSD	65
M2-PG:	SL <b>L</b> PEVETPIRNGWGCRCNDSSD	66
M2-TGE: A/DK/ST/5048/2001 (H3N8)	SLLTEVETPT <b>R</b> NG <b>E</b> CRCNDSSD	67
M2-FG: A/X-31 (H3N2)	<b>S</b> FLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	68
M2-EYS:	SLLTEVETPIRNEW <b>E</b> YRCSDSSD	69
M2-LTGS: A/HK/156/97 (H9N2)	SLLTEVET <b>L</b> TRNGWGCRCSDSSD	70
M2-LTKGS: A/HK/542/97 (H5N1)	SLLTEVET <b>L</b> TKNGWGCRCSDSSD	71
M2-HTES:	SLLTEVET <b>H</b> TRNEW <b>E</b> CRCNDSSD	72
M2-TES: A/VN/1203/2004 (H5N1) M2e-VN	SLLTEVETPT <b>R</b> NEW <b>E</b> CRCSDSSD	50
M2-TGEK:A/オランダ/33/03 (H7N1)	SLLTEVETPT <b>R</b> NGW <b>E</b> CKCNDSSD	73
M2-FLTGEKS:	<b>S</b> FLTEVET <b>L</b> TRNGW <b>E</b> CRCSDSSD	74
M2-LTGEKS: A/HK/1074/99 (H9N2)	SLLTEVET <b>L</b> TRNGW <b>E</b> CKCSDSSD	75
M2-DLTGS: A/HK/485/97/ (H5N1)	SLLTEV <b>D</b> TLTRNGWGCRCSDSSD	76
M2-TGS:A/ニワトリ/SH/F/98/(H9N2)	SLLTEVETPT <b>R</b> NGWGCRCSDSSD	77
M2-KTGEKS:A/ウズラ/AR/16309-7/94 (H7N3NSA)	SLLTEV <b>K</b> TP <b>R</b> NGW <b>E</b> CKCSDSSD	78
M2-TDGEKS:A/ニワトリ/Pen/13552-1/98 (H7N2NSB)	SLLTEVETPT <b>R</b> DGW <b>E</b> CKCSDSSD	79
M2-HTGEKS:A/ニワトリ/CA/1002a/00 (H6N2)	SLLTEVET <b>H</b> TRNGW <b>E</b> CKCSDSSD	80
M2-P:A/ブタ/ケベック/192/81/(H1N1)	SL <b>P</b> TEVETPIRNEWGCRCNDSSD	81
M2-SG:A/ブタ/テネシー/25/77/(H1N1)	SLLTEVETPIR <b>S</b> EWGCRCND <b>S</b> GD	82
M2-KGENS:A/シチメンチョウ/VA/158512/02 (H7N2)	SLLTEVETPIR <b>K</b> GW <b>E</b> CNCSDSSD	83
M2TGEKS:A/カナダ/rv504/2004 (H7N3)	SLLTEVETPT <b>R</b> NGW <b>E</b> CKCSDSSD	90
M2GHTGKS:A/ニワトリ/香港/SF1/03 (H9N2)	SLLT <b>G</b> VET <b>H</b> TRNGWG <b>C</b> KCSDSSD	91
M2PHTGS:A/ニワトリ/香港/YU427/03 (H9N2)	SL <b>L</b> PEVET <b>H</b> TRNGWGCRCS <b>D</b> SSD	92

10

20

30

40

## 【 0 0 5 0 】

「インフルエンザM2e抗原」：本明細書において使用されるように、「インフルエンザM2e抗原」という表現は、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープを含む抗原をさす。好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原という用語は、SEQ ID NO:48~83および90~92のペプチドのいずれか1つの少なくとも1つのエピトープを含む抗原をさす。より好ましくは、インフルエンザM2e抗原という用語は、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインを含むかまたはからなる抗原をさす。さらに好ましくは、インフルエンザM2e抗原という用語は、SEQ ID NO:48~83および90~92のいずれか1つのペプチド、またはその少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22アミノ酸の連続ストレッチを

50

含むかまたはからなる抗原をさす。極めて好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48~50のいずれか1つのペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。最も好ましくは、インフルエンザM2e抗原は、M2eコンセンサス配列 (SEQ ID NO:48) を含むかまたは好ましくはからなる。

【0051】

「インフルエンザM2e抗原」という用語には、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープを含む、コンジュゲート、融合物、またはカップリング生成物も含まれる。これには、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインと、担体、好ましくはRNAse Aとのコンジュゲートが含まれる。特に、  
「インフルエンザM2e抗原」という用語には、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインがカップリングしているウイルス様粒子、好ましくは、RNAバクテリオファージQ またはAP205のウイルス様粒子であり、最も好ましくは、RNAバクテリオファージQ のウイルス様粒子である。極めて好ましいインフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48のペプチドがカップリングしており、好ましくは、共有結合性の非ペプチド結合によってカップリングしている、RNAバクテリオファージQ のウイルス様粒子である。インフルエンザM2e抗原という用語には、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはその少なくとも1つのエピトープを含む融合タンパク質も含まれる。特に、インフルエンザM2e抗原という用語には、SEQ ID NO:48~83および90~92のいずれか1つのペプチドを含む融合タンパク質が含まれる。好ましい融合タンパク質は、第1のA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインと、第2のA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞間ドメインとを含むキメラタンパク質である。極めて好ましいキメラタンパク質は、SEQ ID NO:85のタンパク質である。

10

20

【0052】

さらに、インフルエンザM2e抗原という用語には、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはその少なくとも1つのエピトープを含むウイルス粒子またはウイルス様粒子が含まれる。従って、インフルエンザM2e抗原とは、インフルエンザウイルス粒子またはインフルエンザウイルス様粒子、好ましくは、A型インフルエンザウイルス粒子またはA型インフルエンザウイルス様粒子もさす。

【0053】

好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原という用語は、細胞表面上にA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインを含む細胞、好ましくは真核細胞をさす。これには、インフルエンザウイルス、好ましくはA型インフルエンザウイルスが感染した細胞が含まれる。これには、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはその少なくとも1つのエピトープを含み、好ましくは、細胞膜への組換えタンパク質の組み込みを可能にするドメインを含む組換えタンパク質を発現している、安定的に形質転換またはトランスフェクトされた細胞も含まれる。これに関して好ましい組換えタンパク質は、A型インフルエンザM2タンパク質、または第1のA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインと、第2のA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞間ドメインとを含むキメラタンパク質である。好ましい態様において、組換えタンパク質は、SEQ ID NO:84または85のいずれか1つ、好ましくは、SEQ ID NO:84のタンパク質であり、さらに好ましくは、組換えタンパク質のN末端メチオニン残基は切断除去されている。

30

40

【0054】

さらなる好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原とは、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはその少なくとも1つのエピトープを含み、好ましくは、細胞膜への組換えタンパク質の組み込みを可能にするドメインを含む組換えタンパク質を発現している真核細胞、好ましくは、L929細胞または293T細胞をさす。これに関して好ましい組換えタンパク質は、A型インフルエンザM2タンパク質、または第1のA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインと、第2のA型インフルエンザウイル

50

スM2タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞間ドメインとを含むキメラタンパク質である。好ましい態様において、組換えタンパク質は、SEQ ID NO:84または85のいずれか1つのタンパク質であり、さらに好ましくは、組換えタンパク質のN末端メチオニン残基は切断除去されている。

#### 【0055】

「特異的結合」：抗体の特異性は、抗体の抗原に特異的に結合する能力に関する。抗体と抗原との間のこの相互作用の特異性（親和性）は、結合定数、または逆に解離定数（ $K_d$ ）により特徴決定される。抗体の抗原に対する見かけの親和性は、抗体および抗原の構造、ならびに実際のアッセイ条件に依ることが理解されるべきである。多価の相互作用における抗体の抗原に対する見かけの親和性は、アビディティにより、一価の相互作用よりも有意に高くなり得る。従って、親和性は、好ましくは、一価の相互作用にとって都合のよい条件の下で決定される。 $K_d$ は、当技術分野において公知の方法により決定され得る。好ましくは、抗体と抗原との所定の組み合わせの $K_d$ は、一定量の精製された抗体、例えば、scFvまたはFab断片を、既知濃度の抗原の段階希釈物と接触させる、基本的には記載されるようなFriguet ELISA（Friguet B. et al, 1985, J. Immunol. Meth. 77, 305-319）により決定される。

#### 【0056】

極めて好ましくは、溶液中の抗体と抗原との $K_d$ が、Friguet ELISAにより決定される。好ましくは、該抗体は、scFv抗体、最も好ましくは、scFv-msFc<sub>2c</sub>融合物であり、さらに好ましくは、該抗原はインフルエンザM2e抗原であり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48～83および90～92のいずれか1つのペプチド、最も好ましくはSEQ ID NO:48のペプチドを含むかまたはからなる。一つの態様において、インフルエンザM2e抗原は、RNase-AとSEQ ID NO:48のペプチドとのコンジュゲートである。好ましい態様において、Friguet-ELISAは、基本的には本明細書中の実施例11に記載されるような条件の下で実施される。極めて好ましい態様において、該Friguet-ELISAは、基本的には実施例11に記載されるような条件の下で実施され、該インフルエンザM2e抗原は溶液中にあり、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48である。抗体と抗原との所定の組み合わせの親和性は、一定量の固定化された抗原を、既知濃度の精製された抗体、好ましくは、scFvまたはFab断片の段階希釈物と接触させるELISAによっても決定され得る。次いで、最大の半分の結合が観察される抗体の濃度（ $EC_{50}$ ）として、親和性が決定される。極めて好ましくは、抗体と固定化された抗原との $EC_{50}$ は、ELISAにより決定され、好ましくは、該抗体はscFv抗体であり、最も好ましくはscFv-msFc<sub>2c</sub>融合物であり、さらに好ましくは、該抗原は、インフルエンザM2e抗原であり、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48～83のいずれか1つ、最も好ましくはSEQ ID NO:48のペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。最も好ましくは、インフルエンザM2e抗原は、RNase-AとSEQ ID NO:48のペプチドとのコンジュゲートである。極めて好ましい態様において、ELISAは本明細書中の実施例4の第一段落に記載されるようにして実施される。あるいは、抗体と抗原との相互作用の $K_d$ は、会合速度（ $k_{on}$ ）と解離速度（ $k_{off}$ ）との比としてBiacore分析により決定される。 $K_d$ は平衡透析によっても決定され得る。

#### 【0057】

$K_d$ の比較的低い値は、比較的高い値より特異的な抗体の抗原との結合を示す。本願に関して、上記のようなFriguet ELISAにより決定されるような解離定数（ $K_d$ ）が、高々10nM（ $10^{-8}M$ ）、好ましくは高々1nM（ $10^{-9}M$ ）、より好ましくは高々100pM（ $10^{-10}M$ ）、さらに好ましくは高々10pM（ $10^{-11}M$ ）、最も好ましくは高々1pM（ $10^{-12}M$ ）である場合、その抗体は「抗原に特異的に結合する」と見なされる。極めて好ましいのは、20pM未満の $K_d$ で抗原に結合することができる抗体であり、さらに好ましくは、 $K_d$ は溶液中で決定される。本願に関して、好ましくは上記のように決定される $EC_{50}$ が、高々1000nM（ $10^{-6}M$ ）、好ましくは高々100nM（ $10^{-7}M$ ）、より好ましくは高々10nM（ $10^{-8}M$ ）、さらに好ましくは高々1nM（ $10^{-9}M$ ）、さらに好ましくは高々100pM（ $10^{-10}M$ ）、さらに好ましくは高々10pM（ $10^{-11}M$ ）、最も好ましくは高々1pM（ $10^{-12}M$ ）である場合、その抗体



は、「抗原に特異的に結合する」とさらに見なされる。極めて好ましいのは、100pM未満のEC50で抗原に結合することができる抗体であり、さらに好ましくは、該EC50は固定化された抗原を用いて決定される。これに関して、Kdおよび/またはEC50の値は、これらの値が100pM未満である場合に、「低ピコモル範囲」とあると呼ばれる。

【0058】

抗体のインフルエンザM2e抗原に対する親和性は、インフルエンザM2e抗原が、細胞表面上にA型インフルエンザウイルスM2タンパク質の細胞外ドメインまたはそのエピトープを含む細胞、典型的には、好ましくは、生細胞である、実験設定においても決定され得る。抗体の細胞に対する親和性は、好ましくは、基本的には本明細書中の実施例5および9に開示されるような実験設定において、好ましくは、FACS技術により決定される。抗体と細胞との特定の組み合わせのEC50値は、同一の実験設定においてのみ対照抗体に対して比較可能であることが理解されるべきである。対照抗体とインフルエンザM2e抗原との間の相互作用のEC50値が、抗体とインフルエンザM2e抗原との間の相互作用のEC50値より少なくとも $10^3$ 倍、好ましくは少なくとも $10^4$ 倍、より好ましくは少なくとも $10^5$ 倍、最も好ましくは少なくとも $10^6$ 倍高い場合、その抗体は、細胞であるインフルエンザM2e抗原に特異的に結合すると見なされる。

10

【0059】

「有効量」：本発明のモノクローナル抗体または本発明の薬学的組成物の治療的に有効な量とは、一般に、必要な投薬量および期間で、所望の治療結果を達成するのに必要な量をさし、好ましくは、該結果とは、インフルエンザウイルス、好ましくはA型インフルエンザウイルスによる感染の防止、低下、または改善である。ヒトの治療的処置に関して、「有効量」とは、典型的には、1mg~1000mg、好ましくは10mg~500mg、より好ましくは10mg~300mg、さらに好ましくは50mg~200mg、最も好ましくは約100mgのモノクローナル抗体の量をさす。

20

【0060】

「タグ」：タグ、好ましくは、精製タグまたは検出タグという用語は、第2のポリペプチドの精製もしくは検出を提供するため、または第2のポリペプチドの基質への接着のための部位を提供するため、第2のポリペプチドに付着させられ得るポリペプチドセグメントをさす。原理的には、抗体またはその他の特異的結合剤が利用可能である任意のペプチドまたはタンパク質が、アフィニティタグとして使用され得る。タグには、赤血球凝集素タグ、mycタグ、ポリヒスチジンタグ、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Gluアフィニティタグ、サブスタンスP、FLAGペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、またはその他の抗原性エピトープもしくは結合ドメインが含まれる（主として、US06686168より引用）。

30

【0061】

関心対象の抗原に特異的に結合するscFvの同定、単離、およびクローニングのためのライブラリーに基づくスクリーニング法が、WO2008/055795A1に開示されている。特に、該方法は、ヒトscFvの同定、単離、およびクローニング、ならびにFab断片および完全IgGを含む完全ヒト抗体のその後の生成を可能にする。該技術を適用して、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体が同定されクローニングされた。

40

【0062】

一つの局面において、本発明は、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは、完全ヒトモノクローナル抗体である、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体を提供する。好ましい態様において、該モノクローナル抗体は組換えモノクローナル抗体である。

【0063】

好ましい態様において、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは、完全ヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫系により認識されない。

【0064】

抗体の特異性は、抗体の重鎖可変領域（HCVR）内の相補性決定領域（CDR）のアミノ酸

50

配列および／または抗体の軽鎖可変領域（LCVR）内のCDRにより主として決定される。本発明は、A型インフルエンザM2に特異的に結合することができるモノクローナル抗体のHCVRのCDR（HC CDR）およびLCVRのCDR（LC CDR）を開示する。典型的には、好ましくは、該HCVRおよび該LCVRは抗原結合部位を形成している。

【0065】

驚くべきことに、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合することができる本発明のモノクローナル抗体は、同一のまたは密接に関連したHC CDRおよび／またはLC CDRを異なる組み合わせで共有しており、密接に関連したHC CDRおよび／またはLC CDRは、高々数アミノ酸残基、異なっていることが見出された（表1～3を参照のこと）。従って、表1～3の全ての抗体がクローン関連性を有すると結論付けられる。

10

【0066】

従って、一つの態様において、モノクローナル抗体は、（i）（a）好ましくは、LCVRのフレームワーク内のCDR1位置に位置する、SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；（b）好ましくは、LCVRのフレームワーク内のCDR2位置に位置する、SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；（c）好ましくは、LCVRのフレームワーク内のCDR3位置に位置する、SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのLCVRを含み；かつ／または、モノクローナル抗体は、（ii）（a）好ましくは、HCVRのフレームワーク内のCDR1位置に位置する、SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；（b）好ましくは、HCVRのフレームワーク内のCDR2位置に位置する、SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；（c）好ましくは、HCVRのフレームワーク内のCDR3位置に位置する、SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのHCVRを含む。

20

【0067】

さらなる態様において、モノクローナル抗体は、（i）（a）SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；（b）SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；（c）SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのLCVRを含み；かつ、モノクローナル抗体は、（ii）（a）SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；（b）SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；（c）SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのHCVRを含む。

30

【0068】

典型的には、好ましくは、モノクローナル抗体は、好ましくは、抗原結合部位を形成している、正確に1つのLCVRおよび正確に1つのHCVRを含む。IgGフォーマットの抗体の場合、モノクローナル抗体は、正確に2つのLCVRおよび正確に2つのHCVRを含む。しかしながら、本発明の抗体は、ただ1つのLCVRまたはただ1つのHCVRを含むかあるいはからなっているもよい。従って、さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、（a）SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；（b）SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；（c）SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのLCVRを含むかあるいはからなる。

40

【0069】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、（a）SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；（b）SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；（c）SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つのHCVRを含むかあるいはからなる。

【0070】

50

典型的には、好ましくは、本発明の抗体は、A型インフルエンザM2e抗原のエピトープを認識する、1つのLCVRと1つのHCVRとを含む、少なくとも1つの抗原結合部位を含む。従って、本発明の一つの局面は、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくはヒトモノクローナル抗体、より好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体であり、かつ少なくとも1つの抗原結合部位を含む、単離されたモノクローナル抗体である。該抗原結合部位は、(a)(i)SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii)SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；ならびに(b)(i)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVRを含む。

10

#### 【0071】

LC CDR1のアミノ酸配列とLC CDR3のアミノ酸配列との間の配列類似性に基づき、3つの密接に関連した抗体の群が区別され得る(表1を参照のこと)。従って、一つの態様において、LCVRは、(a)SEQ ID NO:1、2、および3のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c)SEQ ID NO:8、9、および10のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含み；好ましくは、HCVRは、(a)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む。

20

#### 【0072】

さらなる態様において、LCVRは、(a)SEQ ID NO:4および5のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c)SEQ ID NO:8のペプチドからなる1つのLC CDR3とを含み；好ましくは、HCVRは、(a)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む。

#### 【0073】

さらなる態様において、LCVRは、(a)SEQ ID NO:1および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b)SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c)SEQ ID NO:8および11のペプチドからなる1つのLC CDR3を含み；好ましくは、HCVRは、(a)SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b)SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c)SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む。

30

#### 【0074】

本発明の抗体の中で、LC CDR配列の異なる組み合わせを含む、9つの異なる型のLCVRが同定された(表1を参照のこと)。従って、好ましい態様において、LCVRは以下のものより選択される：(a)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(b)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:2のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(c)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:3のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(d)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:9のペプチドからなるLCVR；(e)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:10のペプチドからなるLCVR；(f)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:4のペプチドからなり、(ii)LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii)LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(g)(i)LC CDR1がSEQ ID NO:5のペ

40

50

プチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(h) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:6のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；および(i) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:11のペプチドからなるLCVR。

【0075】

本発明の抗体の中で、LC CDRの最も豊富な組み合わせは、1A型、1A型、および3A型である(表1を参照のこと)。従って、好ましい態様において、LCVRは以下のものより選択される：(a) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(b) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:4のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；および(c) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:6のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR。極めて好ましい態様において、LCVRは、(a) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVRより選択される。

【0076】

ライブラリースクリーニングから入手された抗体は、クローニングアーティファクトのため、VRのある種のアミノ酸位置において、完全ヒト抗体と異なっている場合があり、典型的には、これらの位置は、可変領域のN末端および/またはC末端の近くに位置している。好ましくは、これらのアーティファクトは、完全ヒト抗体を入手するために抗体から除去される。例えば、完全ヒトLCVRを入手するために、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24に交換される。従って、好ましい態様において、LCVRの1～4位はSEQ ID NO:24からなる。

【0077】

好ましい態様において、LCVRは、図1に示されたアミノ酸配列のいずれか1つを含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、LCVRの5～113位は、SEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位はSEQ ID NO:24のペプチドからなる。

【0078】

さらなる好ましい態様において、LCVRの5～113位は、SEQ ID NO:86、87、および88のいずれか1つの核酸配列によりコードされるペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位はSEQ ID NO:24のペプチドからなる。

【0079】

さらに、本発明の抗体の中で、HC CDR配列の異なる組み合わせを含む、6つの異なる型のHCVRが同定された(表2を参照のこと)。従って、好ましい態様において、HCVRは以下のものより選択される：(a) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなるHCVR；(b) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:16のペプチドからなるHCVR；(c) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:17のペプチドからなるHCVR；(d) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:18のペプチドからなるHCVR；(e) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:14のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなるHCVR；および(f) (i) HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、(ii) HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ(iii) HC CDR3がSEQ ID NO:19のペプチドからなるHCVR。

【0080】

本発明の抗体の中で、HC CDRの最も豊富な組み合わせは1A型である（表2を参照のこと）。従って、好ましい態様において、HCVRは、（a）（i）HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、（ii）HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ（iii）HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなるHCVRより選択される。

【0081】

クローニングアーティファクトを除去し、完全ヒトHCVRを入手するため、典型的には、好ましくは、HCVRの1～6位はSEQ ID NO:25に交換される。従って、好ましい態様において、HCVRの1～6位はSEQ ID NO:25からなる。

【0082】

好ましい態様において、HCVRは、図2に示されたアミノ酸配列のいずれか1つを含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、HCVRの7～121位は、SEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、HCVRの1～6位はSEQ ID NO:25のペプチドからなる。さらなる好ましい態様において、HCVRの7～121位は、SEQ ID NO:89の核酸配列によりコードされるペプチドからなり、好ましくは、HCVRの1～6位はSEQ ID NO:25のペプチドからなる。

10

【0083】

本発明の抗体の中で、LC CDRおよびHC CDRの14の異なる組み合わせが同定された（表2を参照のこと）。従って、一つの態様において、モノクローナル抗体は、LC CDRおよびHC CDRの組み合わせが表3の組み合わせのいずれか1つより選択される、少なくとも1つ、好ましくは正確に1つの抗原結合部位を含む。好ましくは、該組み合わせは、最も豊富な組み合わせ1A-1A、1A-1B、2A-1A、および3A-1Aのうちの一つから選ばれる。

20

【0084】

極めて好ましい態様において、LC CDR1はSEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つのペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15および16のいずれか1つのペプチドからなる。

【0085】

極めて好ましい態様において、LC CDR1はSEQ ID NO:1のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

30

【0086】

極めて好ましい態様において、LC CDR1はSEQ ID NO:1のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:16のペプチドからなる。

【0087】

極めて好ましい態様において、LC CDR1はSEQ ID NO:4のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

40

【0088】

極めて好ましい態様において、LC CDR1はSEQ ID NO:6のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

【0089】

好ましい態様において、LCVRは図1に示されたアミノ酸配列のいずれか1つからなるペプチドを含み；かつHCVRは図2に示されたアミノ酸配列のいずれか1つからなるペプチド

50

を含む。

【0090】

極めて好ましい態様において、LCVRは図1に示されたアミノ酸配列のいずれか1つからなるペプチドを含み；かつHCVRは図2に示されたアミノ酸配列からなるペプチドを含む。図2に示されたアミノ酸配列は、図1に示されたアミノ酸配列と同一の表記を有する。表記は、1つの文字の後に3つの数字が続いたものである（例えば、D005）。

【0091】

好ましい態様において、抗原結合部位は、(a) LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、かつ(b) HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、かつ/または、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、1つのLCVRおよび1つのHCVRを含む。

10

【0092】

好ましい態様において、抗原結合部位は、(a) LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20のペプチドからなり、かつ(b) HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、かつ/または、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、1つのLCVRおよび1つのHCVRを含む。

【0093】

好ましい態様において、抗原結合部位は、(a) LCVRの5～113位がSEQ ID NO:21のペプチドからなり、かつ(b) HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、かつ/または、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、1つのLCVRおよび1つのHCVRを含む。

20

【0094】

好ましい態様において、抗原結合部位は、(a) LCVRの5～113位がSEQ ID NO:22のペプチドからなり、かつ(b) HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、かつ/または、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、1つのLCVRおよび1つのHCVRを含む。

【0095】

好ましい態様において、抗原結合部位は、(a) LCVRの5～113位がSEQ ID NO:86、87、および88のいずれか1つの核酸配列によりコードされるペプチドからなり、かつ(b) HCVRの7～121位がSEQ ID NO:89の核酸配列によりコードされるペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、かつ/または、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、1つのLCVRおよび1つのHCVRを含む。

30

【0096】

さらなる好ましい態様において、LCVRの5～113位は、SEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチド、好ましくは、SEQ ID NO:24のペプチドと少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一であり；かつ、HCVRの7～121位は、SEQ ID NO:23のペプチドと少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。

40

【0097】

さらなる好ましい態様において、LCVRは、図1に示されたアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一であり；かつ、HCVRは、図2に示されたアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。

50

## 【 0 0 9 8 】

さらなる好ましい態様において、LCVRは、図1に示されたアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一であり；かつ、HCVRは、図2に示されたアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一である。

## 【 0 0 9 9 】

さらなる好ましい態様において、前述のアミノ酸配列の差違は、LCVRおよび/またはHCVRのCDR位置の外部に位置している。ペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列が、別のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一のアミノ酸配列を有するか否かは、Bestfitプログラムのような公知のコンピュータプログラムを使用して慣習的に決定され得る。

## 【 0 1 0 0 】

本発明のモノクローナル抗体は、天然に存在するフォーマットまたは合成フォーマットで、組換えにより作製され得る。従って、以下の態様は、本発明の全ての局面および態様を明示的にさす。一つの態様において、モノクローナル抗体は組換え抗体である。好ましい態様において、本発明のモノクローナル抗体は、(a) 単鎖抗体、好ましくは、scFv；(b) Fab断片；(c) F(ab')<sub>2</sub>断片；(d) scFv-Fc融合物；(e) IgG1；(f) IgG2；(g) IgG3；(h) IgG4；(i) IgA；(j) IgE；(k) IgM；(l) IgD；および(m) ダイアボディ；からなる群より選択される抗体である。好ましい態様において、モノクローナル抗体は、正確に1つのLCVRおよび/または正確に1つのHCVRを含むかまたは好ましくはからなる。

## 【 0 1 0 1 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は単鎖抗体であり、好ましくは、該単鎖抗体はscFvである。さらなる好ましい態様において、単鎖抗体は、SEQ ID NO:38~40のいずれか1つの核酸配列によりコードされるペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、単鎖抗体はFc融合物、好ましくは、Fc<sub>2</sub>c融合物であり、さらに好ましくは、Fc<sub>2</sub>c融合物は、SEQ ID NO:42、44、および46のいずれか1つによりコードされるペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、単鎖抗体は、SEQ ID NO:43、45、および47のいずれか1つのペプチドを含む。

## 【 0 1 0 2 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、IgG、好ましくはヒトIgGである。さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、IgG1、好ましくはヒトIgG1である。さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つのLCを含み、好ましくは、該LCは、SEQ ID NO:26~28のいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一のペプチドを含むかまたはより好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:26~28のいずれか1つのペプチドを含むかまたは好ましくはからなるLCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む、ヒトIgG1である。

## 【 0 1 0 3 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つのHCを含み、好ましくは、該HCは、SEQ ID NO:29と少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは97%、さらに好ましくは98%、さらに好ましくは99%、最も好ましくは100%同一のペプチドを含むかまたはより好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、HCは、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたは好ましくはからなる。

10

20

30

40

50

## 【0104】

極めて好ましい態様において、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:26~28のいずれか1つのペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含むヒトIgG1であり、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

## 【0105】

極めて好ましい態様において、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:26のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含むヒトIgG1であり、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

10

## 【0106】

極めて好ましい態様において、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:27のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含むヒトIgG1であり、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

## 【0107】

極めて好ましい態様において、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:28のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含むヒトIgG1であり、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははかなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

20

## 【0108】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、IgG1、好ましくはヒトIgG1であり、最も好ましくは完全ヒトIgG1である。従って、好ましい態様において、モノクローナル抗体は、2つ、好ましくは正確に2つの 1 HCを含み、さらに好ましくは、2つ、好ましくは正確に2つの 1 HCは同一である。

## 【0109】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、2つ、好ましくは正確に2つのLCを含み、好ましくは、該LCは、(a) LC; および (b) LCより選択され、最も好ましくは LCであり; さらに好ましくは、2つ、好ましくは正確に2つのLCは同一である。

30

## 【0110】

好ましい態様において、モノクローナル抗体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体は、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープを含むかまたははかなるインフルエンザM2e抗原に特異的に結合する。さらなる好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原は、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメイン、好ましくは、A型インフルエンザM2タンパク質のアミノ酸2~24を含むかまたははかなる。さらなる好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48~83および90~92のいずれか1つのペプチドを含むかまたはは好ましくははかなる、好ましくは、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48~50のいずれか1つのペプチドを含むかまたはは好ましくははかなる、最も好ましくは、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48のペプチドを含むかまたはは好ましくははかなる。

40

## 【0111】

さらなる好ましい態様において、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48の少なくとも1つのエピトープを含むかまたははかなる、好ましくは、インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:93のアミノ酸配列により構成されたエピトープを含むかまたははかなる。

## 【0112】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、高々1000nM ( $10^{-6}$ M)、好ましくは高々100nM ( $10^{-7}$ M)、より好ましくは高々10nM ( $10^{-8}$ M)、さらに好ましくは高々1nM ( $10^{-9}$ M)、さらに好ましくは高々100pM ( $10^{-10}$ M)、さらに好ましくは高々10pM ( $10^{-11}$ M)、最も好ましくは高々1pM ( $10^{-12}$ M)のEC50値および/または解離

50



定数 (Kd) で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はA型インフルエンザM2eタンパク質の細胞外ドメインであり、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48~83のいずれか1つ、より好ましくはSEQ ID NO:48~50のいずれか1つ、最も好ましくはSEQ ID NO:48のペプチドであり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、かつ/または、該EC50値は、好ましくは、基本的には本明細書中の実施例4の第一段落に記載されたような条件の下で、ELISAにより決定される。

【0113】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、高々100nM、好ましくは高々10nM、より好ましくは高々6nM、最も好ましくは高々5nMの解離定数 (Kd) で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定される。

10

【0114】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10M、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数 (Kd) で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定される。

20

【0115】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、0.01pM~1000nM、好ましくは0.1pM~100nM、より好ましくは0.1pM~10nM、さらに好ましくは0.1pM~1nM、さらに好ましくは0.1pM~100pM、さらに好ましくは0.1pM~50pM、さらに好ましくは0.1pM~20pM、さらに好ましくは0.1pM~15pM、さらに好ましくは1pM~15pM、最も好ましくは1pM~10pMの解離定数 (Kd) で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原は、A型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインのRNaseコンジュゲートであり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原は、SEQ ID NO:48~83および90~92のいずれか1つ、より好ましくはSEQ ID NO:48~50のいずれか1つ、最も好ましくはSEQ ID NO:48のペプチドを含み、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定される。

30

【0116】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、細胞表面上にA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープを含む細胞であるインフルエンザM2e抗原に特異的に結合する。

【0117】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、細胞表面上にA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインを含む細胞であるインフルエンザM2e抗原に特異的に結合する。

40

【0118】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10M、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数 (Kd) で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、さらに好ましくは、LC CDR1はSEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つのペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

50

## 【 0 1 1 9 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10M、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、さらに好ましくは、LC CDR1はSEQ ID NO:1のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

10

## 【 0 1 2 0 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10M、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、LCVRの5~113位はSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなる。

## 【 0 1 2 1 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10nM、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、HCVRの7~121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

20

## 【 0 1 2 2 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10nM、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、LCVRの5~113位はSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、かつHCVRの7~121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

30

## 【 0 1 2 3 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10nM、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、LCVRの5~113位はSEQ ID NO:20のペプチドからなり、かつHCVRの7~121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

40

## 【 0 1 2 4 】

さらなる好ましい態様において、モノクローナル抗体は、1~100nM、好ましくは1~10nM、より好ましくは1~6nM、さらに好ましくは3~6nM、最も好ましくは4~5nMの解離定数（Kd）で、インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原はSEQ ID NO:48であり、最も好ましくは溶液中にあり、さらに好ましくは、該Kdは、最も好ましくは、基本的には実施例11に記載されたような条件の下で、Friguet-ELISAにより決定され、該モノクローナル抗体は、ヒトIgG、好ましくはヒトIgG1であり、好ましくは、該ヒトIgG1は、SEQ ID NO:26~28のいずれか1つ、好ましくはSEQ ID NO:20のペプチドを含むかまたはより好ましくはからなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2

50

つ含み、かつ、該モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははからなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

【0125】

エピトープマッピングは、本発明の抗体により認識される最小エピトープが、M2eコンセンサス配列 (SEQ ID NO:48) のアミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) に含まれることを明らかにした。本発明の抗体は、他のA型インフルエンザ遺伝子型M2eに存在するこのエピトープのバリエーションを認識し得ることが示された (図8Aを参照のこと)。

【0126】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、さらに好ましくは、LC CDR1はSEQ ID NO:1のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。 10

【0127】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、LCVRの5~113位はSEQ ID NO:20のペプチドからなり、かつHCVRの7~121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

【0128】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、モノクローナル抗体は、ヒトIgG、好ましくはヒトIgG1であり、好ましくは、該ヒトIgG1は、SEQ ID NO:26のペプチドを含むかまたはより好ましくははからなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含み、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははからなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。 20

【0129】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、さらに好ましくは、LC CDR1はSEQ ID NO:4のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。 30

【0130】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、LCVRの5~113位はSEQ ID NO:21のペプチドからなり、かつHCVRの7~121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

【0131】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、モノクローナル抗体は、ヒトIgG、好ましくはヒトIgG1であり、好ましくは、該ヒトIgG1は、SEQ ID NO:27のペプチドを含むかまたはより好ましくははからなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含み、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくははからなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。 40

【0132】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、さらに好ましくは、LC CDR1はSEQ ID NO:6のペプチドからなり、LC CDR2はSEQ ID NO:7のペプチドからなり、LC CDR3はSEQ ID NO:8のペプチドからなり、HC CDR1はSEQ ID NO:12のペプチドからなり、HC CDR2はSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつHC CDR3はSEQ ID NO:15のペプチドからなる。

【0133】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、LCVRの5~113位はSEQ ID NO 50

:22のペプチドからなり、かつHCVRの7～121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなる。

【0134】

さらなる好ましい態様において、少なくとも1つの抗原結合部位は、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されるエピトープを認識し、モノクローナル抗体は、ヒトIgG、好ましくはヒトIgG1であり、好ましくは、該ヒトIgG1は、SEQ ID NO:28のペプチドを含むかまたはより好ましくはからなる LCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含み、かつ、モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたはより好ましくはからなる 1 HCを、少なくとも1つ、好ましくは正確に2つ含む。

【0135】

インフルエンザM2e抗原に特異的に結合する第1の抗体のHCVRを使用し、適当な起源から対応するLCVRを選択し、第1の抗体のHCVRと選択されたLCVRとを含み、かつ第1の抗体とほぼ同一の特異性でA型インフルエンザM2e抗原に結合し得る第2の抗体を作出することは、十分に当業者の技術の範囲内にあることが理解されるべきである(「チェーンシャフリング」)。さらに、同様にして、第1の抗体のLCVRを、適当な起源から対応するHCVRを選択するために使用してもよいことが、当業者には明白である。LCVRおよび/またはHCVRの増幅のための適当な起源は、例えば、未感作ヒトB細胞からのcDNA、インフルエンザM2e抗原により免疫されたヒト対象のB細胞からのcDNA、およびMorphosys' HuCALライブラリーのような完全合成ライブラリーである。これらの方法は、Kang ASら (Proc Natl Acad Sci USA 88, 11120-11123, 1991)、Marks JDら (Biotechnology (N Y) 10, 779-783, 1992)、およびJespersenら (Biotechnology (N Y) 12, 899-903, 1994) に詳細に記載されている。

10

20

【0136】

従って、本発明のさらなる局面は、ヒトモノクローナル抗体、最も好ましくは、完全ヒトモノクローナル抗体であり、かつインフルエンザM2e抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の、(a) SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(b) SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(c) SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3と：を含むLCVRである。

【0137】

好ましい態様において、LCVRは、(a) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(b) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:2のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(c) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:3のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(d) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:9のペプチドからなるLCVR；(e) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:10のペプチドからなるLCVR；(f) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:4のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(g) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:5のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；(h) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:6のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなるLCVR；および(i) (i) LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、(ii) LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、かつ(iii) LC CDR3がSEQ ID NO:11のペプチドからなるLCVR：より選択される。

30

40

【0138】

極めて好ましい態様において、LCVRの5～113位はSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つ、最も好ましくはSEQ ID NO:20のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位は

50

SEQ ID NO:24のペプチドからなる。

【0139】

本発明のさらなる局面は、SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b) SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c) SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3と；を含む、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体であり、かつインフルエンザM2e抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体のHCVRである。

【0140】

さらなる好ましい態様において、HCVRは、SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(b) SEQ ID NO:13のペプチドからなる1つのHC CDR2と；(c) SEQ ID NO:15のペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む。好ましい態様において、HCVRの7～121位はSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、HCVRの1～6位はSEQ ID NO:25のペプチドからなる。

10

【0141】

本発明の全ての局面、特に、以下に開示される薬学的組成物、方法、および使用は、本明細書に開示されたモノクローナル抗体のいずれかに関する。しかしながら、抗体クローンD005、E040、およびF052、特に、クローンD005に関する態様が、好ましい。従って、特に好ましいのは、モノクローナル抗体が、(a) (i) SEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つ、好ましくは、SEQ ID NO:1のペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:8のペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；ならびに(b) (i) SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:13のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:15のペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVR；を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む態様である。さらに好ましいのは、LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つ、好ましくはSEQ ID NO:20のペプチドからなり、かつHCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなる態様である。さらに好ましいのは、モノクローナル抗体が、IgG1であり、かつSEQ ID NO:26、27、および28のいずれか1つ、好ましくはSEQ ID NO:26のアミノ酸配列を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの軽鎖を含み、かつSEQ ID NO:29のアミノ酸を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの重鎖をさらに含む態様である。

20

30

【0142】

さらなる局面において、本発明は、本発明のHCVRもしくはLCVR、本発明のモノクローナル抗体、またはその個々の鎖をコードする核酸分子に関する。好ましい態様において、核酸分子は、(a) 好ましくは、図1に示されたペプチドのいずれか1つを含むかまたは好ましくはからなる、本発明のLCVR；(b) SEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドを含むかまたは好ましくはからなるLCVR；(c) 好ましくは、図2に示されたペプチドのいずれか1つを含むかまたは好ましくはからなる、本発明のHCVR；(d) SEQ ID NO:23のペプチドを含むかまたは好ましくはからなるHCVR；(e) 好ましくは、SEQ ID NO:43、45、および47のいずれか1つのペプチドを含むかまたは好ましくはからなる、本発明の単鎖抗体；(f) 好ましくは、SEQ ID NO:26、27、および28のいずれか1つのペプチドを含むかまたは好ましくはからなる、本発明のLC；(g) 好ましくは、SEQ ID NO:29のペプチドを含むかまたは好ましくはからなる、本発明の1HC；ならびに(h) 本発明のモノクローナル抗体より選択されるペプチドをコードする。

40

【0143】

さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:86～89のいずれか1つのヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:86～88のいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、かつSEQ ID NO:89のヌクレオチド配列をさらに含む。

【0144】

さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:30、32、34、および36のい

50

れか1つのヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:32、34、および36のいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、かつSEQ ID NO:30のヌクレオチド配列をさらに含む。

【0145】

さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:38、39、および40のいずれか1つのヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。

【0146】

さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:41のヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。

【0147】

さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:42、44、および46のいずれか1つのヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。さらなる好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:42、44、および46のいずれか1つのヌクレオチド配列を含むかまたは好ましくはからなる。

【0148】

さらなる局面において、本発明は、本発明の抗体の組換え発現のための発現ベクターに関する。好ましい態様において、発現ベクターは、少なくとも一つの本発明の核酸分子を含む。本発明のモノクローナル抗体の発現のための適当な発現ベクターは、例えば、W02008/055795A1に開示されている。好ましい態様において、発現ベクターは、SEQ ID NO:86~89のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。さらなる好ましい態様において、発現ベクターは、SEQ ID NO:86~88のいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、好ましくは、SEQ ID NO:89のヌクレオチド配列をさらに含む。さらなる好ましい態様において、発現ベクターは、SEQ ID NO:41のヌクレオチド配列を含む。

【0149】

さらなる局面において、本発明は、少なくとも一つの本発明の核酸分子または少なくとも一つの本発明の発現ベクターを含む宿主細胞、好ましくは、細菌細胞または真核細胞に関する。好ましい態様において、宿主細胞は、(a) 酵母細胞、(b) 昆虫細胞；および(c) 哺乳動物細胞より選択される真核細胞であり、好ましくは、該哺乳動物細胞は、HEK-293T細胞、CHO細胞、およびCOS細胞より選択される。極めて好ましくは、哺乳動物細胞はHEK-293T細胞である。

【0150】

さらなる局面において、本発明は、医薬として使用するための本発明のモノクローナル抗体に関する。

【0151】

本発明のモノクローナル抗体は、対象への投与のために適している組成物へ組み込まれてもよい。従って、さらなる局面において、本発明は、少なくとも一つの本発明のモノクローナル抗体を含み、好ましくは、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤をさらに含む薬学的組成物に関する。薬学的に許容される担体、希釈剤、および賦形剤は、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, Gennaro (ed.), Mack publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されている。本発明の薬学的組成物は、単回投与されるかまたは複数回投与される。

【0152】

好ましい態様において、薬学的組成物は、少なくとも一つの前記抗体をさらに含み、好ましくは、該少なくとも一つの前記抗体は、インフルエンザ抗原、好ましくはインフルエンザM2e抗原に特異的に結合する。

【0153】

さらなる好ましい態様において、薬学的組成物は、少なくとも一つの前記抗体をさらに含み、好ましくは、該少なくとも一つの前記抗体は、A型インフルエンザウイルスHAタンパク質の抗原またはA型インフルエンザウイルスNAタンパク質の抗原であるインフルエンザ抗原に特異的に結合する。

## 【 0 1 5 4 】

本発明のモノクローナル抗体は、好ましくはヒトの受動免疫、さらに好ましくは、A型インフルエンザウイルスに対する受動免疫において使用され得る。従って、本発明のモノクローナル抗体は、A型インフルエンザ感染の処置および／または予防において有用である。さらなる局面において、本発明は、有効量の本発明のモノクローナル抗体または有効量の本発明の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、受動免疫、好ましくはA型インフルエンザウイルスに対する受動免疫の方法に関する。

## 【 0 1 5 5 】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体および／または薬学的組成物は、好ましくは、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋内内投与、鼻腔内投与、頬投与、舌下投与、および坐剤投与より選択される、標準的な投与技術を使用して、対象、好ましくはヒトへ投与される。

10

## 【 0 1 5 6 】

さらなる局面において、本発明は、有効量の本発明のモノクローナル抗体または有効量の本発明の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、A型インフルエンザウイルス感染を処置する方法に関する。好ましくは、該対象はヒトであり、さらに好ましくは、該対象は、A型インフルエンザウイルス感染に罹患している。

## 【 0 1 5 7 】

さらなる局面において、本発明は、有効量の本発明のモノクローナル抗体または有効量の本発明の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、A型インフルエンザウイルス感染を防止する方法に関する。好ましくは、該対象はヒトであり、さらに好ましくは、該対象は、A型インフルエンザウイルス感染に罹患していない。

20

## 【 0 1 5 8 】

さらなる局面において、本発明は、受動免疫、好ましくは、ヒトにおける、好ましくは、A型インフルエンザウイルスに対する受動免疫において使用するための、本発明のモノクローナル抗体または本発明の薬学的組成物に関する。さらに好ましくは、該モノクローナル抗体はヒトへ投与される。

## 【 0 1 5 9 】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および／または予防の方法において使用するための、本発明のモノクローナル抗体または本発明の薬学的組成物に関する。

30

## 【 0 1 6 0 】

さらなる局面において、本発明は、受動免疫、好ましくは、A型インフルエンザウイルスに対する受動免疫のための医薬の製造における、本発明のモノクローナル抗体の使用に関する。

## 【 0 1 6 1 】

さらなる局面において、本発明は、受動免疫、好ましくは、A型インフルエンザウイルスに対する受動免疫において使用するための、本発明のモノクローナル抗体に関する。

## 【 0 1 6 2 】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および／または予防のための医薬の製造における、本発明のモノクローナル抗体の使用に関する。

40

## 【 0 1 6 3 】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置または防止の方法において使用するための、本発明のモノクローナル抗体に関する。

## 【 0 1 6 4 】

本発明のさらなる局面は、好ましくは血液試料における、最も好ましくはELISAによる、A型インフルエンザウイルスM2タンパク質の定量的かつ／または定性的な検出の方法における、本発明の抗体の使用である。

50

## 【 0 1 6 5 】

本発明の全ての局面は、本明細書に開示される任意のモノクローナル抗体に関することが理解されるべきである。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 6 6 】

## 実施例1

哺乳動物細胞ディスプレイによるM2特異的単鎖抗体の同定

BD Vacutainer (商標) CPT (商標) Tube法 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を使用して、高いM2力価を有する個体のヘパリン処理された血液10mlから末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。PBMCを、Alexa 647nm標識Q (5.5 µg/ml) およびヒト グロブリン (11 µg/ml; Jackson Immuno Research) と共にブレインキュベートし、次いで、以下のものにより染色した: (1) Alexa 488nm標識Q 特異的マウスmAb (2 µg/ml) と組み合わせた、Q にカップリングしたM2細胞外ドメインコンセンサスペプチド (M2e; SEQ ID NO: 48、表7を参照のこと) (2.4 µg/ml)、およびFITC標識ロバ抗マウスIgG抗体 (1 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) と組み合わせた、M2特異的マウスmAb (0.5 µg/ml); (2) PE標識マウス抗ヒトIgM抗体 (50倍希釈; BD Biosciences/Pharmlingen)、マウス抗ヒトIgD抗体 (100倍希釈; BD Biosciences/Pharmlingen)、マウス抗ヒトCD14抗体 (50倍希釈; BD Biosciences/Pharmlingen)、およびマウス抗ヒトCD3抗体 (50倍希釈; BD Biosciences/Pharmlingen); ならびに (3) PE-TexasRed標識マウス抗ヒトCD19抗体 (50倍希釈; Caltag Laboratories)。染色後、細胞を洗浄し、濾過し、334個のM2e特異的B細胞 (FL1陽性、FL2陰性、FL3陽性、FL4陰性) を、FACSVantage (登録商標) SEフローサイトメーター (Becton Dickinson) で分取した。

## 【 0 1 6 7 】

基本的には記載のように (シンドビスに基づくスクリーニング全般に関しては、WO1999/025876A1、抗体スクリーニングにおけるその応用に関しては、WO2008/055795A1を参照のこと。これらは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)、シンドビスに基づくscFv細胞表面ディスプレイライブラリーの構築のため、抗原特異的B細胞を使用した。RNase特異的ウサギポリクローナル抗体 (2.5 µg/ml; Abcam) およびFITC標識ロバ抗ウサギIgG抗体 (1.5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) と組み合わせた、RNase AにカップリングしたM2e (5 µg/ml) を使用して、またはM2特異的マウスmAb (0.5 µg/ml) およびFITC標識ロバ抗マウスIgG抗体 (1 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) と組み合わせた、Q-M2e (1 µg/ml) を使用して、M2e特異的scFv抗体をディスプレイする細胞を単離した。50%コンフルエントなBHKフィーダー細胞を含有している24穴プレートのウェルに、各細胞を分取した。ウイルス蔓延後 (分取の2日後)、M2e特異的scFv抗体をコードするウイルスクローンを同定するため、感染細胞をM2e結合についてFACS分析により試験した。

## 【 0 1 6 8 】

## 実施例2

遺伝子レスキュー、ELISAスクリーニング、およびM2特異的抗体の配列決定

各々モノクローナル組換えシンドビスウイルスを含有している、推定M2e特異的抗体をコードするBHK細胞の上清を、記載されたようにして (WO2008/055795A1を参照のこと) RT-PCRに供した。各々scFvコーディング領域を含む、得られたPCR産物を、制限エンドヌクレアーゼSfi1により消化し、CMVプロモーターの制御下でのC末端ヒトFc-1ドメインに融合したscFvタンパク質の発現を可能にする (WO2008/055795A1にSEQ ID NO:37として開示された) 発現ベクターpCEP-SP-Sfi-Fcへとクローニングした。

## 【 0 1 6 9 】

ELISA分析のため、クローンの各々を、製造業者の推奨に従って、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して、24穴プレートフォーマットで、HEK-293T細胞へトランスフェクトした。トランスフェクションの2~3日後、一過性発現されたscFv-Fc融合タンパク質を含有している上清を採集した。M2e特異的結合についてチェックするため、ELISAプレートを、4 で一夜、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の4 µg/mlの濃度のM2eコンジュゲート



RNAse Aによりコーティングした。平行して、scFv-Fc発現レベルを、サンドイッチELISAによりモニタリングした。このため、プレートの同一のセットを、2.5 µg/mlの濃度のFc特異的ヤギ抗ヒトF(ab')<sub>2</sub>抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 109-006-098) によりコーティングした。次いで、プレートを洗浄緩衝液 (PBS/0.05% Tween) により洗浄し、洗浄緩衝液中の3% BSAにより室温で2時間ブロッキングした。次いで、プレートを再び洗浄し、10倍希釈物から始まる細胞培養物上清の3倍段階希釈物と共にインキュベートした。全ての希釈を洗浄緩衝液で行った。プレートを室温で2時間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液により十分に洗浄した。次いで、HRPO標識Fc 特異的ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 109-035-098) との1時間のインキュベーションにより、結合したscFv-Fc融合タンパク質を検出した。洗浄緩衝液により十分に洗浄した後、プレートを、5~10分間、OPD溶液 (1つのOPD錠剤、25mlのOPD緩衝液、および8 µlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) により現像し、5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液により反応を中止した。次いで、ELISAリーダー (Biorad Benchmark) 上でOD450nmでプレートを読み取った。

10

20

30

40

50

#### 【0170】

各々、2~10ng/ml (およそ18~90pM) の範囲のEC<sub>50</sub>で結合するM2e特異的scFv抗体をコードする、全部で53のELISA陽性クローンを、記載されたようにして (W02008/055795A1を参照のこと) 配列決定した。全ての抗体配列が極めて類似しており、明らかにクローン関連性を有しており、重鎖可変領域はVH3ファミリー配列を含み、軽鎖可変領域はVK4ファミリー配列を含んでいた。53の全てのクローンの軽鎖のアミノ酸配列が、図1に示される。同一クローンの重鎖のアミノ酸配列は、図2に示される。これらの抗体の軽鎖および重鎖のSEQ ID NOの参照を含むCDR配列に関する概要は、表1および2に提供される。クローンにおいて観察されたLCVRとHCVRとの組み合わせ、およびこれらの組み合わせの各々の頻度が、表3に開示される。

#### 【0171】

クローンD005、E040、およびF052が、LCVRとHCVRとの最も豊富な組み合わせのうちの3つ (1A-1A、2A-1A、および3A-1A、表3を参照のこと) を表し、従って、さらなる分析のために代表的なクローンとして選ばれた。

#### 【0172】

##### 実施例3

##### M2特異的scFv-msFc 2c融合タンパク質の発現および精製

マウスモデルにおいてA型インフルエンザ感染に対するM2e特異的ヒト抗体の効果を調査するため、クローンD005、E040、およびF052を、scFv-マウスFc- 2c (msFc 2c) 融合タンパク質として発現させ、精製した。D005、E040、およびF052のscFv-マウスFc- 2c (msFc 2c) 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、SEQ ID NO:42、44、および46に相当する。D005、E040、およびF052のscFv-マウスFc- 2c (msFc 2c) 融合タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO:43、45、および47に相当する。対応するscFvコーディング領域を、制限エンドヌクレアーゼSfi1によりpCEP-SP-Sfi-Fc発現ベクターから切り出し、得られた断片を、発現ベクターpCEP-SP-Sfi-msFc 2c (SEQ ID NO:41) へクローニングした。モノクローナル抗体D005、E042、およびF052のSfi消化断片は、それぞれ、SEQ ID NO:38、39、および40に相当する。これらのSfi断片は、リンカー配列を含む、対応する抗体のscFv断片全体をコードするが、Fcドメインを含んでいない。

#### 【0173】

scFv-msFc 2c融合タンパク質の大規模発現をHEK-293T細胞で行った。トランスフェクションの1日前に、発現させたい各タンパク質について、10<sup>7</sup>個の293T細胞を14cm組織培養プレートへ播種した。次いで、製造業者の推奨に従って、Lipofectamine Plus (Invitrogen) を使用して、それぞれのscFv-msFc 2c融合構築物により細胞をトランスフェクトし、1日インキュベートし、1 µg/mlピューロマイシンの存在下で3枚の14cmディッシュに再播種した。3日間の選択の後、ピューロマイシン耐性細胞を6枚の14cmプレートに移し、コンフルエントになるまで培養した。最後に、細胞を、ポリ-L-リジンによりコーティングされたローラーボトルに移した。1~2日後、培地を無血清培地に交換し、それぞれのscFv-m

sFc 2c融合タンパク質を含有している上清を、3日毎に収集し、0.22  $\mu$ m Millex GV無菌フィルター（Millipore）で濾過した。

#### 【0174】

scFv-msFc 2c融合タンパク質の各々について、連続的な採集物をプールし、プロテインA-セファロースカラムに適用した。カラムを、カラム容量の10倍のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）により洗浄し、結合したタンパク質を0.1MグリシンpH3.6により溶出させた。中和のため0.1mlの1M Tris pH7.5を含有しているチューブに、1ml画分を収集した。タンパク質含有画分を、SDS-PAGEにより分析し、プールした。10,000 MWCO Slide-A-Lyzer透析カセット（Pierce）を使用した透析により、緩衝液をPBSに交換した。次いで、PBS中の精製されたタンパク質を、0.22  $\mu$ m Millex GV無菌フィルター（Millipore）で濾過し、分注した。ワーキングストックは4 で維持し、長期保管用の一定分量は液体窒素中で急速凍結させ、-80 で維持した。

#### 【0175】

##### 実施例4

scFv-msFc 2c融合タンパク質のM2由来ペプチドとの結合のELISA分析

scFv-msFc 2c融合タンパク質のM2eとの結合を確認するため、精製されたscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cを用いて、ELISA分析を実施した。従って、ELISAプレートを、37 で1時間、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の4  $\mu$ g/mlの濃度のRNase AにコンジュゲートしたM2e（SEQ ID NO:48）によりコーティングした。次いで、プレートを洗浄緩衝液（PBS/0.05% Tween）により洗浄し、洗浄緩衝液中の3% BSAにより37 で1時間ブロッキングした。次いで、プレートを再び洗浄し、精製されたscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cの段階希釈物と共にインキュベートした。プレートを37 で1.5時間室温でインキュベートし、次いで、洗浄緩衝液により十分に洗浄した。次いで、HRPO標識Fc 特異的ヤギ抗マウスIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories 115-035-071）との室温での1時間のインキュベーションにより、結合したscFv-Fc融合タンパク質を検出した。洗浄緩衝液により十分に洗浄した後、プレートを、10分間、OPD溶液（1つのOPD錠剤、25mlのOPD緩衝液、および8  $\mu$ lの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）で現像し、5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液により反応を中止した。次いで、ELISAリーダ（Biorad Benchmark）上でOD450nmでプレートを読み取った。抗体scFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cは、高い見かけの親和性で、固定化されたM2eに結合することが見出された。固定化されたM2eショート（SEQ ID NO:49）およびM2e-VN（SEQ ID NO:50）に対する同抗体の見かけの親和性を、同一の実験設定を使用して決定した。抗体と抗原との各組み合わせについての見かけの親和性が、表5に提供される。これらの値は、（実施例2に記載された）未精製の培養上清により入手されたものとよく対応する。

#### 【0176】

（表5）異なるバージョンのインフルエンザM2細胞外ドメインに対するscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cの見かけの親和性

抗体	M2e	M2eショート	M2e-VN
D005	81.5 pM	80.9 pM	51.5 pM
E040	88.3 pM	90.2 pM	46.4 pM
F052	50.6 pM	62.8 pM	45.9 pM

#### 【0177】

異なるM2由来ペプチドへのscFv-msFc 2c融合タンパク質の結合をさらに調査するため、競合ELISAも実施した。従って、ELISAプレートを、4 で一夜、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の4  $\mu$ g/mlの濃度のRNase AにコンジュゲートしたM2eによりコーティングした。次いで、プレートを洗浄緩衝液（PBS/0.05% Tween）により洗浄し、洗浄緩衝液中の3% BSAにより37 で2時間ブロッキングした。次いで、プレートを再び洗浄し、増加する濃度のM2e、H5N1 A型インフルエンザVN1203に由来するM2細胞外ドメインペプチド（M2e-VN；SEQ ID NO:50）、または短縮型M2eペプチド（M2eショート；SEQ ID NO:49）（表7）の非存在

下または存在下で、100ng/mlの濃度の精製されたscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cと共にインキュベートした。プレートを2時間室温でインキュベートし、次いで、洗浄緩衝液により十分に洗浄した。次いで、HRPO標識Fc 特異的ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 115-035-071) との1時間のインキュベーションにより、結合したscFv-Fc融合タンパク質を検出した。洗浄緩衝液により十分に洗浄した後、プレートをOPD溶液で現像し、上記のようにELISAリーダ上で読み取った。各抗体の固定化されたM2eへの結合は、3つの全てのペプチドにより、類似した程度に阻害され、そのことから、3つの全てのペプチドが同等に認識されることが示された (表6)。

#### 【 0 1 7 8 】

(表6) scFv-msFc 2cの固定化されたM2eとの結合の、可溶性M2ペプチドによる阻害。結合の阻害のEC50値 (μM) が示される。

scFv-msFc <sub>2c</sub>	M2e	M2e-VN	M2eショート
D005	18.8	32.5	27.5
E040	21.3	43.2	35.5
F052	22.0	50.8	46.8

#### 【 0 1 7 9 】

(表7) この研究において使用されたM2バリエーション。

M2eバリエーション	略号	亜型	SEQ ID NO	M2配列 <sup>(2)</sup>
コンセンサス <sup>(1)</sup>	M2e	n/a	48	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
短縮型	M2eショート	n/a	49	SLLTEVETPIRNEWGC
A/VN/1203/04	M2e-VN	H5N1	50	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
A/PR/8/34	M2-PR	H1N1	84	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGI LHLTLWILDRLLFFKCIYRRFKYGLKGGPSTE GVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE
A/VN/1203/04	M2-VN/PR	H5N1	85	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSDPLTIAANIIGI LHLTLWILDRLLFFKCIYRRFKYGLKGGPSTE GVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

(1) ヒトA型インフルエンザウイルスのH1亜型、H2亜型、およびH3亜型に由来するM2eコンセンサス配列。

(2) M2コンセンサス配列からの変動は太字で示される (Tompkins et al. 2007, Emerging Infectious Diseases Vol. 13, No. 3, pp. 426-435、その中の表を参照のこと)。全ての配列が、インビボで発現時に除去されるN末端メチオニンなしに示される。

#### 【 0 1 8 0 】

##### 実施例5

M2特異的scFv-msFc 2c融合タンパク質のM2発現L929細胞との結合

マウス適合H1N1 A型インフルエンザPR8に由来する全長M2 (M2-PR; SEQ ID NO:84) (表7) を発現するL929細胞のクローンであるL929-M2#E9細胞との反応性を分析することにより、組換え抗体の、ネイティブM2を認識する能力を査定した。従って、L929-M2#E9細胞を単一細胞懸濁物にし、FACS (登録商標) 緩衝液 (1% FCSを含有しているリン酸緩衝生理食塩水) 中のscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、またはscFv-F052-msFc 2cそれぞれの2倍段階希釈物と共にインキュベートした。氷上での1時間のインキュベーションの後、細胞をFACS (登録商標) 緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中のCy5標識ヤギ抗マウス抗体 (Jackson Immuno, Cat No 115-176-071) との氷上での30分間のインキュベーションにより、結合した抗体を検出した。最後の洗浄の後、染色された細胞の蛍光強度を、FACS caliber (登録商標) (Becton Dickinson) を使用したフローサイトメトリーにより分析した。抗体scFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cは、それぞれ

、0.68、0.73、および0.46nMのEC50で、高い親和性で、ネイティブ細胞表面発現M2-PRに結合することが見出された。

#### 【0181】

##### 実施例6

A型インフルエンザ感染のマウスモデルにおけるM2特異的scFv-msFc 2c融合タンパク質の防御効果

予防的環境での抗M2 scFv-msFc 2c抗体の効力を、A型インフルエンザ感染のマウスモデルにおいて試験した。このモデルは、ヒトにおけるインフルエンザ感染の免疫学的局面および組織学的局面の大部分を反映しており、従って、抗ウイルス剤の効力を査定するためにルーチンに使用されている。従って、6週齢雌C57BL/6マウスに、PBS中の500  $\mu$ gのscFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、scFv-F052-msFc 2c、またはマウスIgGを腹腔内注射した（各群6匹）。1日後、ELISAにより血中の抗体の存在を確認するため、マウスから採血した。抗体は、クローンD005を受容した1匹のマウス（このマウスは、その後、分析から排除された）を除く全てのマウスの血清に容易に検出可能であった（示されない）。さらに1日後（0日目）、マウスに、致死用量のマウス適合A型インフルエンザウイルスPR8（4  $\times$  LD50）を鼻腔内感染させ、続いて、12日間、体重減少および熱（温度降下）をモニタリングした。マウスIgGにより処理された対照マウスは、5～6日以内に、劇的な温度降下および体重減少を特徴とする重度の罹患の兆候を発症し、全て7日目または8日目に死亡した（図3C）。対照的に、M2特異的抗体により処理された動物は、罹患の兆候からほぼ完全に防御され、熱の兆候をほとんど発症せず、一時的にのみ減量した（図3AおよびB）。

#### 【0182】

予防的環境でマウスの完全な防御を達成するのに必要とされる抗体の最小量を決定するため、scFv-msFc 2c D005を滴定した。この目的のため、6週齢雌C57BL/6マウスに、減少する量の抗体（1匹当たり200、60、20、もしくは6  $\mu$ g）または対照としての200  $\mu$ gのマウスIgGを腹腔内注射した（各群6匹）。1日後、ELISAにより血中の抗体の存在を確認するため、マウスから採血した。抗体は、60  $\mu$ g用量を受容した1匹のマウス（このマウスは、その後、分析から排除された）を除く全てのマウスの血清に容易に検出可能であった（示されない）。さらに1日後（0日目）、動物に、致死用量のA型インフルエンザウイルス株PR/8/34（4  $\times$  LD50）を鼻腔内感染させ、21日間モニタリングした（図4A）。予想通り、対照マウスは、急速に疾患に罹り、2週間未満のうちに死亡した。対照的に、抗体D005は、試験された全ての用量で防御活性を示した。200、60、または20  $\mu$ gの抗体を受容したマウスの群においては、全ての動物が、致死チャレンジを生き延びた。6  $\mu$ g D005という最低用量ですら、マウスの半分以上が、感染から回復し、生存し、そのことから、M2特異的抗体が強力な予防剤であることが示された。

#### 【0183】

##### 実施例7

A型インフルエンザ感染のマウスモデルにおけるM2特異的scFv-msFc 2c融合タンパク質の治療活性

配列、親和性、および予防活性に関するクローンD005、E040、およびF052の類似性を考慮して、scFv-D005-msFc 2cのみを治療的環境で試験した。従って、6週齢雌C57BL/6マウスに、致死用量のマウス適合A型インフルエンザウイルスPR8（4  $\times$  LD50）を鼻腔内感染させた。1日後、2日後、または3日後、マウス群に、PBS中の200  $\mu$ gのscFv-D005-msFc 2cを腹腔内注射した（各群6匹）。対照として、各一つのマウス群に、感染の2日前に、scFv-D005-msFc 2cまたはマウスIgGを注射した。血中の抗体の存在を確認するため、抗体を受容した1日後、各マウスから採血した（示されない）。計21日間、罹患率（示されない）および死亡率（図4B）の兆候をモニタリングするため、マウスを注意深く観察した。対照抗体を受容した全てのマウスが最終的に死亡したが、感染の2日前にscFv-D005-msFc 2cの予防的注射を受容した全てのマウスが、少なくとも3週間生存した。有意に、感染の3日後に処理されたマウスの群においても、抗体の治療効力が示され得た。感染の1日後、2日

後、および3日後に処理されたマウスの生存率は、それぞれ、100%、83%、および17%であった。生存率の測定は、一般に死亡率（指定された集団における死亡の割合）に対応し、罹患率は、一般に（指定された集団における）疾患の発生率または疾病の率に対応する。

#### 【0184】

##### 実施例8

完全ヒトM2特異的IgG1の構築、発現、および精製

完全ヒトIgG1としてのクローンD005、E040、およびF052の発現を可能にする発現ベクターを生成した。従って、クローンD005、E040、およびF052により共有されるヒト1重鎖、ならびに独特の軽鎖の各々をコードするDNA配列を、完全遺伝子合成により作製した（SEQ ID NO:30、32、34、および36、GeneArt AG（Germany）による）。重鎖コーディング配列には、オープンリーディングフレーム（SEQ ID NO:30を参照のこと）の上流にAsc1認識部位、下流にPac1認識部位が隣接していた。軽鎖コーディング配列には、それぞれのオープンリーディングフレーム（SEQ ID NO:32、34、および36を参照のこと）の上流にNhe1認識部位、下流にPme1認識部位が隣接していた。シグナルペプチドを含むヒト1重鎖全体のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:31に示される。D005、E040、およびF052の軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO:33、35、および37に示される。

#### 【0185】

次いで、重鎖および軽鎖のコーディング領域を、（WO2008/055795A1のSEQ ID NO:104として開示された）EBNAに基づく発現ベクターpCB15と組み合わせた。従って、重鎖コーディング領域を、制限酵素Asc1およびPac1により消化し、Asc1-Pac1により消化されたpCB15とライゲートさせ、プラスミドpCB15-fh-HC-1-D005を生成した。次いで、このプラスミドを制限酵素Nhe1およびPme1により消化し、Nhe1-Pme1により消化された軽鎖コーディング領域の各々とライゲートさせ、プラスミドpCB15-fh-IgG1-D005、pCB15-fh-IgG1-E040、およびpCB15-fh-IgG1-F052を生成した。HEK-293T細胞におけるIgG1-D005、IgG1-E040、およびIgG1-F052の発現、ならびにプロテインA-セファロースクロマトグラフィーによる精製を、scFv-Fc融合タンパク質について記載されたようにして行った（実施例2）。

#### 【0186】

##### 実施例9

M2特異的完全ヒトIgG1のM2発現293T細胞との結合

配列、親和性、および予防活性に関するクローンD005、E040、およびF052の類似性を考慮して、IgG1-D005のみを、より詳細に分析した。全長M2バリエーションを発現している293T細胞との反応性を分析することにより、完全ヒトmAb IgG1-D005の、ネイティブ細胞表面発現M2を認識する能力を査定した。従って、293T細胞を、A/PR/8/34のM2タンパク質（M2-PR、SEQ ID NO:84）または融合タンパク質M2-VN/PR（SEQ ID NO:85）をコードする組換え発現ベクターにより、それぞれ、トランスフェクトした。M2-VN/PRは、M2-PRの膜貫通領域および細胞間領域（表7を参照のこと、イタリアック体で示されているSEQ ID NO:84の一部）のN末端に融合した、H5N1 A型インフルエンザ VN1203に由来する細胞外ドメイン（M2e-VN、SEQ ID NO:50）を含む。

#### 【0187】

次いで、トランスフェクトされた293T細胞を、単一細胞懸濁物にし、FACS緩衝液（1%FCSを含有しているリン酸緩衝生理食塩水）中のIgG1-D005の2倍段階希釈物と共にインキュベートした。氷上での1時間のインキュベーションの後、細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中のCy5標識ヤギ抗ヒト抗体との氷上での30分間のインキュベーションにより、結合した抗体を検出した。最後の洗浄の後、染色された細胞の蛍光強度を、FACS Calibur（Becton Dickinson）を使用したフローサイトメトリーにより分析した。mAb IgG1-D005は、3.9nMのEC50で、同一の親和性で、ネイティブ細胞表面に発現されたM2-PRおよびM2-VN/PRに結合した。

#### 【0188】

10

20

30

40

50

## 実施例10

M2特異的完全ヒトIgG1は、A型インフルエンザ感染のマウスモデルにおいて防御的であり、Fc受容体との相互作用を必要とする。

配列、親和性、および予防活性に関するクローンD005、E040、およびF052の類似性を考慮して、抗体D005のみを、A型インフルエンザ感染のマウスモデルにおいて、より詳細に分析した。一方では、完全ヒトIgG1k-D005の予防活性を試験し、scFv-D005-msFc 2c融合タンパク質と比較した。他方では、Fc受容体に結合することができない変異型ヒトFc 1に融合したscFv-D005抗体 (scFv-D005-hFc<sub>m</sub>) を使用することにより、抗体依存細胞傷害 (ADCC) の関与を調査した。従って、6週齢雌C57BL/6マウスに、PBS中の等モル量のIgG1-D005 (200 μg)、scFv-D005-msFc 2c (144 μg)、scFv-D005-hFc<sub>m</sub> (144 μg)、またはヒトIgG (200 μg) を腹腔内注射した (各群6匹)。1日後、ELISAにより血中の抗体の存在を確認するため、マウスから採血した。抗体は、全てのマウスの血清に容易に検出可能であった (示されない)。さらに1日後 (0日目)、マウスに致死用量のマウス適合A型インフルエンザウイルスPR8 (4 × LD<sub>50</sub>) を鼻腔内感染させ、16日間、体重減少および熱 (温度降下) をモニタリングした。マウスIgGにより処理された対照マウスは、6~7日以内に劇的な温度降下および体重減少を特徴とする重度の罹患の兆候を発症し、8~11日目に死亡した (図5)。対照的に、scFv-D005-msFc 2cにより処理された動物に類似して、hIgG1k-D005により処理されたものは、罹患の兆候からほぼ完全に防御され、熱の兆候をほとんど発症せず、一時的にのみ減量した (図5AおよびB)。従って、完全ヒトIgG1k-D005は、マウスにおいて強力な予防活性を有し、scFv-D005-msFc 2cと等しい効力を有する。有意に、scFv-D005-hFc<sub>m</sub>により処理されたマウスは、対照IgGにより処理されたマウスに類似して、防御されず、重度の罹患の兆候を発症した (図5AおよびB)。結果として、scFv-D005-hFc<sub>m</sub>により処理された動物は、全て、9日目までに疾患に罹り、死亡した (図5C)。従って、Fc受容体相互作用が防御のために必要とされており、このことから、ADCCが予防活性の主成分であることが示唆される。

【0189】

## 実施例11

Friguet-ELISAによる親和性の決定

溶液中の抗体のM2eとの結合の解離定数 (K<sub>d</sub>) は、基本的には記載したように (Friguet B. et al, 1985, J. Immunol. Meth. 77, 305-319) ELISAに基づく方法を使用して決定された。簡単に説明すると、scFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、またはscFv-F052-msFc 2cそれぞれの10ng/ml溶液を、PBS/1%BSA中のA型インフルエンザM2e (SEQ ID NO:48) にコンジュゲートしたRNaseの異なる濃度 (A型インフルエンザM2eの含量に関して10 nM~0.17pMの範囲の3倍段階希釈物) の存在下でインキュベートした。室温で2時間後、遊離の抗体を、実施例4に記載されたものに類似した古典的なELISAにより検出した。このため、4 で一夜、20ng/mlの濃度のRNase-M2eコンジュゲートによりコーティングされたELISAプレートを、洗浄緩衝液 (PBS/0.05%Tween) により洗浄し、洗浄緩衝液中の3%BSAにより37 で1時間ブロッキングした。次いで、プレートを再び洗浄し、室温で30分間、溶液結合反応物と共にインキュベートした。洗浄緩衝液により十分に洗浄した後、HRPO標識Fc 特異的ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 115-035-071) との室温での1時間のインキュベーションにより、結合したscFv-Fc 2c融合タンパク質を検出した。洗浄緩衝液により十分に洗浄した後、プレートを、15分間、OPD溶液 (1つのOPD錠剤、25mlのOPD緩衝液、および8 μlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) により現像し、5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液により反応を中止した。次いで、ELISAリーダ (Biorad Benchmark) 上でOD450nmでプレートを読み取った。K<sub>d</sub>値を、溶液結合反応物中に存在するRNase-M2e濃度の関数としてのELISAシグナルのEC<sub>50</sub>として決定した。抗体scFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cは、高い親和性で、可溶性RNase-M2eに結合することが見出された。K<sub>d</sub>値は、4pM (D005)、13pM (E040)、および6pM (F052) であることが見出された。

【0190】

同一のアッセイを、RNase-M2eコンジュゲートの代わりに遊離のM2eペプチド (SEQ ID N

10

20

30

40

50

0:48) を使用して、他は同一の条件の下で繰り返した。抗体scFv-D005-msFc 2c、scFv-E040-msFc 2c、およびscFv-F052-msFc 2cは、高い親和性で、可溶性M2eペプチドに結合することが見出された。Kd値は、4nM (D005、E040) および5nM (F052) であることが見出された。

#### 【0191】

##### 実施例12

##### 抗体D005の細胞会合型M2との優先的な結合

ネイティブ細胞会合型M2と不定形の可溶性M2eペプチドとを区別する抗体D005の能力を、フローサイトメトリーにより査定した。比較のため、マウスモノクローナル抗体14C2も分析した (Zebedee et al., 1988, J. Virol. 62(8): 2762-2772)。従って、scFv-D005-msFc 2cおよびmAb 14C2を、氷上で1時間、12nM可溶性M2eペプチドの存在下または非存在下で、0.5  $\mu$ g/mlの濃度で、FACS緩衝液中でインキュベートした。次いで、予め結合した抗体を、L929-M2#E9細胞を染色するために使用した。従って、L929-M2#E9細胞を単一細胞懸濁物にし、予め結合した抗体、または対照としてのFACS緩衝液と共にインキュベートした。氷上での50分間のインキュベーションの後、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中のCy5標識ヤギ抗マウス抗体 (Jackson Immuno, Cat No 115-176-071) との氷上での20分間のインキュベーションにより、結合した抗体を検出した。最後の洗浄の後、染色された細胞の蛍光強度を、FACScalibur (登録商標) (Becton Dickinson) を使用したフローサイトメトリーにより分析した (図6)。ペプチドの非存在下では、両方の抗体が、類似した効率で、ネイティブ細胞表面発現M2に結合することが見出された。しかしながら、ペプチドの存在下では、マウスmAb 14C2はL292/M2#E9細胞を効率的に認識しなかった。対照的に、抗体scFv-D005-msFc 2cは、過剰の競合ペプチドの存在にも関わらず、細胞を効率的に染色した。これは、抗体D005が、ネイティブ細胞表面M2にのみ存在する立体的エピトープに結合し、mAb 14C2はそうでないことを示している。

#### 【0192】

##### 実施例13

##### 抗体D005によるウイルス粒子の直接認識

抗体D005の、A型インフルエンザウイルス粒子と直接結合する能力を調査するため、捕捉ELISAを実施した。従って、ELISAプレートのウェルを、コーティング緩衝液中の10  $\mu$ g/mlの濃度のHA特異的マウスmAb H37-80により4 時間で一夜コーティングした。次いで、プレートを洗浄緩衝液 (PBS/0.05% Tween) により洗浄し、洗浄緩衝液中の5% BSAにより37 度で3時間ブロッキングした。次いで、プレートを再び洗浄し、洗浄緩衝液 / 1% BSA中の1ウェル当たり $10^8$  pfu、 $5 \times 10^7$  pfu、 $2.5 \times 10^7$  pfu、または $1.25 \times 10^7$  pfuのA型インフルエンザPR8と共にインキュベートした。室温で1時間のインキュベーションの後、プレートを再び洗浄し、洗浄緩衝液 / 1% BSA中の1  $\mu$ g/mlの完全ヒトIgG1k-D005または同アイソタイプの対照抗体 (ヒトIgG1k、Sigma, Cat. No. I5154) と共にインキュベートした。室温での1時間のインキュベーションの後、プレートを再び洗浄し、洗浄緩衝液 / 1% BSA中のHRPOコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (Jackson Immuno, Cat No 109-035-098) の1000倍希釈物と共にインキュベートした。室温での1時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液により十分に洗浄し、OPD溶液により現像し、上記のようにELISAリーダ上で読み取った。対照抗体では検出可能なELISAシグナルが入手されなかったが、hIgG1k-D005は、捕捉されたA型インフルエンザ粒子を用量依存的に容易に検出した (図7)。

#### 【0193】

##### 実施例14

##### 抗体D005により認識されるエピトープの交差反応性の分析および詳細マッピング

IgG1k-D005の固相結合ペプチドバリエーションとの結合を試験することにより、異なるA型インフルエンザ株に由来するM2配列との抗体D005の交差反応性を分析した (Pepscan Presto BV (Lelystad, the Netherlands) により実施された分析)。D005により認識されるエピトープは、16アミノ酸のペプチドM2eショート (SEQ ID NO:49) 内に含まれることが事前に見出されたため (実施例4)、この領域にかかるペプチドのみを合成した。それによ

り、表4にリストされた23残基ペプチド (SEQ ID NO:48、50~59、61~83、および90~92) のうちの35が、28の異なる16残基ペプチドによりカバーされた。2つの抗体濃度0.5  $\mu$ g/ml および0.05  $\mu$ g/ml で結合をアッセイしたところ、抗体D005は広く交差反応性であることが明らかになった。有意に、試験された全てのペプチドが認識され、ペプチドのうちの19は、M2eコンセンサス配列に相当するものと同等に認識された (図8A)。

#### 【0194】

ペプチドM2eショート (SEQ ID NO:49) に対応するペプチドの固相結合バリエーションとのIgG1k-D005の結合を試験することにより、同様に、最小エピトープを決定した (Pepscan Presto BV (Lelystad, the Netherlands) により実施された分析)。3つの型の分析を行った：第1は、N末端およびC末端の欠失；第2は、105の異なる3~16残基バリエーション全てを合成することによるエピトープスキニング；第3は、304の可能なアミノ酸バリエーション全てを合成することによる点変異であった。3つの分析は比較可能な結果を与えた (図8B)。N/C末端欠失分析およびエピトープスキニング分析によって、D005により認識される領域は、8残基ペプチドLLTEVETPにまで狭くなった。

10

#### 【図1-1】

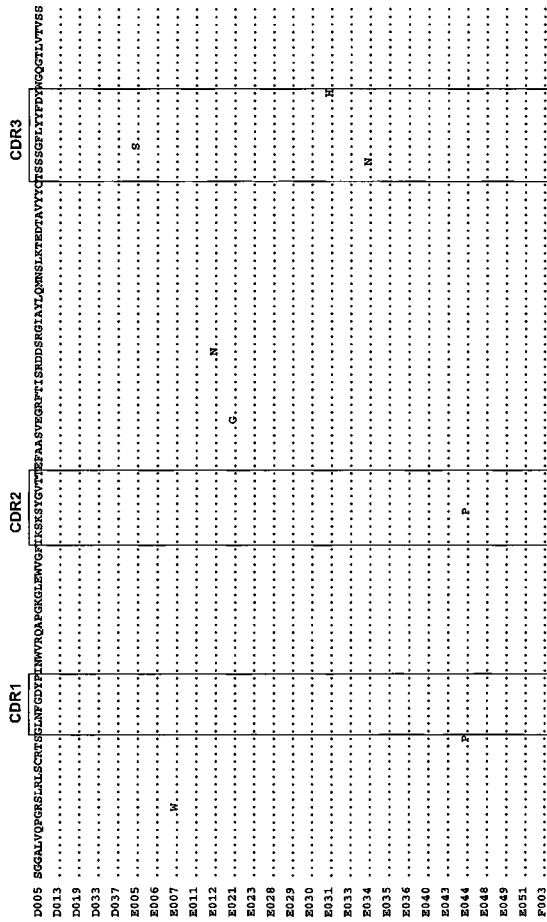
	CDR1	CDR2	CDR3
D005	TQSPDGLAVSLGERATINCKSSQSVLTSTNNNNYAGYQQKGGPPNLLIYASRESGVDPDFSGSGGDTFTINSVAQEDVAVYQDYTFWPTPEGGGTLEIK		
D013	.....	.....	.....
D019	.....V.....	.....	.....
D033	.....	.....	.....KV.....
D037	.....	.....	.....
D005	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
D006	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
D007	.....	.....	.....K.....
D011	.....H.....	.....	.....KV.....
D012	.....	.....G.....	.....
D021	.....	.....	.....K.....
D023	.....S..E..A.....R..K.....	.....	.....
D028	.....	.....	.....
D029	.....	.....	.....
D030	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
D031	.....	.....	.....K.....
D033	.....	.....M.....	.....
D034	.....	.....	.....
D035	.....	.....	.....A.....
D036	.....	.....	.....K.....
D040	.....S..E..A.....K.....	.....	.....A.....
D043	.....S..ED..A.....K.....	.....	.....
D044	.....	.....	.....
D048	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
D049	.....	.....	.....
D051	.....V.....	.....R.....	.....
F003	.....S..E..A.....K.....	.....	.....

#### 【図1-2】

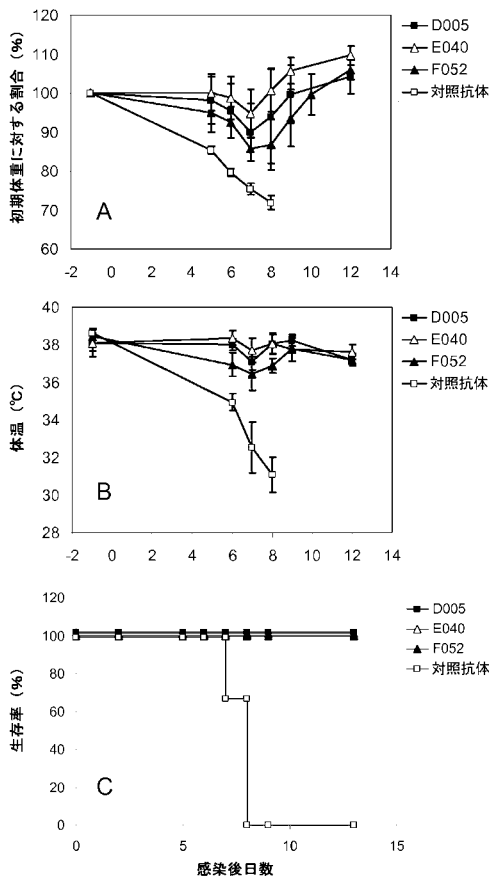
	CDR1	CDR2	CDR3
D005	TQSPDGLAVSLGERATINCKSSQSVLTSTNNNNYAGYQQKGGPPNLLIYASRESGVDPDFSGSGGDTFTINSVAQEDVAVYQDYTFWPTPEGGGTLEIK		
F004	.....	.....	.....KV.....
F005	.....A..P.....	.....	.....
F015	.....L..S.....A..K.....K.....	.....	.....
F020	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
F023	.....A.....K.....	.....	.....KV.....
F025	.....	.....	.....
F027	.....A.....	.....	.....
F037	.....L..S.....A..K.....K.....	.....	.....
F039	.....	.....	.....
F040	.....	.....	.....K.....
F044	.....S..E..A.....	.....	.....
F045	.....	.....	.....
F046	.....	.....	.....K.....
F048	.....N.....	.....	.....
F052	.....A.....L..S.....A..K.....K.....	.....E.....	.....
F054	.....	.....	.....
F057	.....	.....N.....	.....
F062	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
F065	.....	.....	.....
F066	.....S..E..A.....K.....	.....	.....
F071	.....	.....	.....
F075	.....	.....	.....
F076	.....H.....	.....	.....V.....
F077	.....A.....L..S.....A..K.....K.....	.....	.....
F084	.....N.....	.....	.....
F087	.....	.....	.....K.....



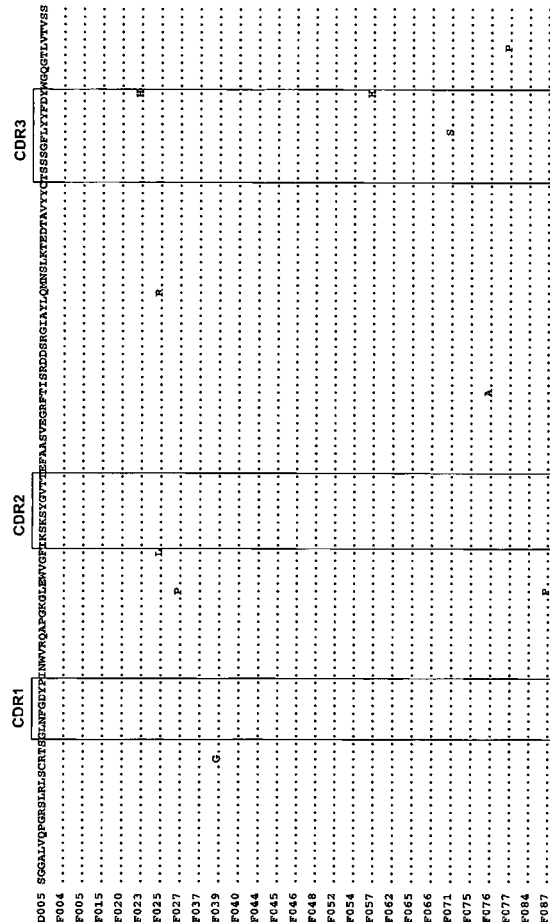
【 図 2 - 1 】



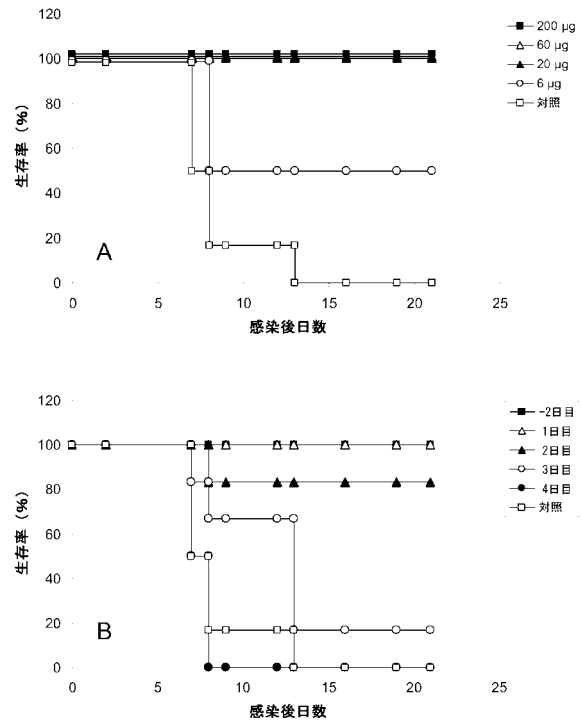
【 図 3 】



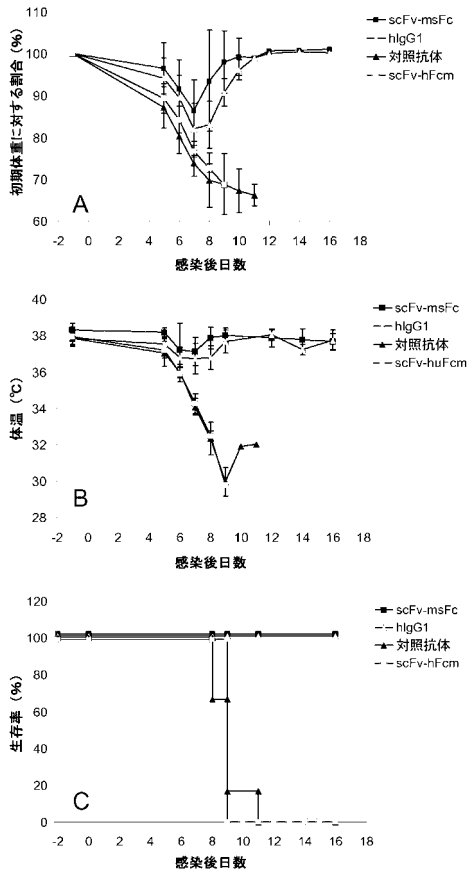
【 図 2 - 2 】



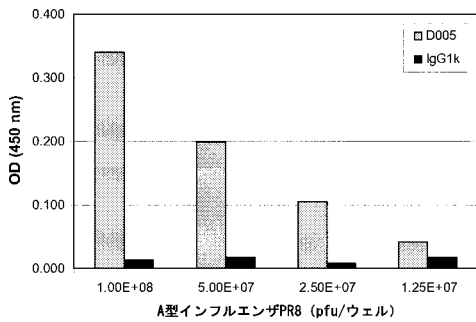
【 図 4 】



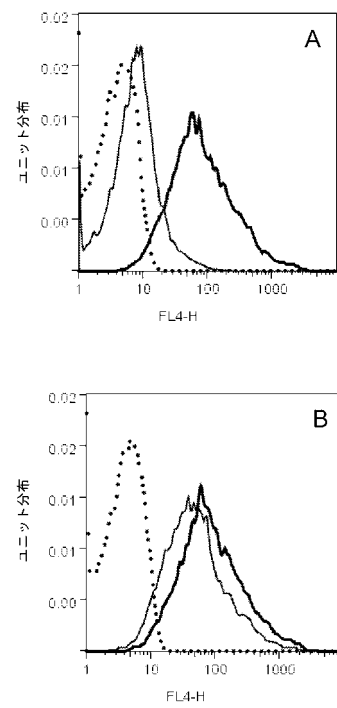
【図 5】



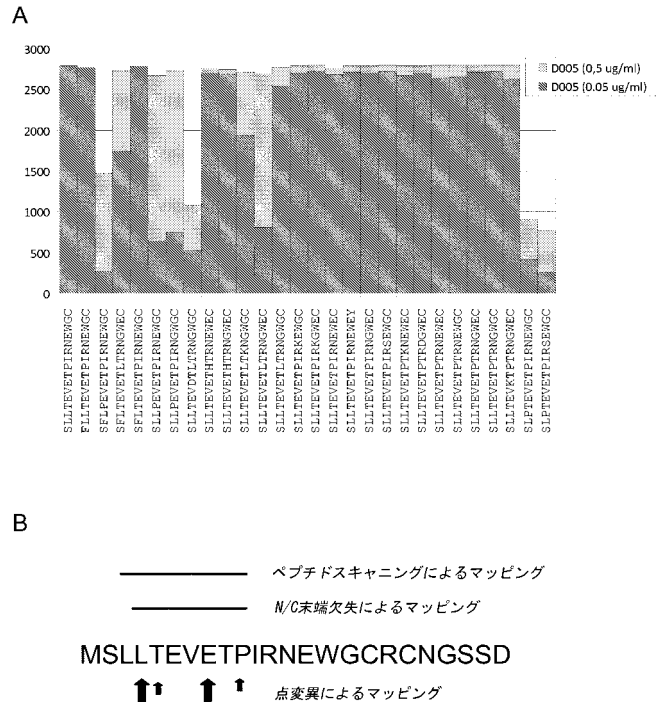
【図 7】



【図 6】



【図 8】



## 【配列表】

2012510802000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成23年9月7日(2011.9.7)

## 【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】

インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、ヒトモノクローナル抗体である、単離されたモノクローナル抗体であって、

該抗体が少なくとも1つの抗原結合部位を含み、

該抗原結合部位が以下のものを含む、モノクローナル抗体：

(a) (i) SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；ならびに

(b) (i) SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVR。

## 【請求項 2】

少なくとも1つの抗原結合部位が、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されたエピトープを認識する、請求項1記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

LC CDR1がSEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つのペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1または2のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 4】

LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1～3のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、かつLCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなる、請求項1～4のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 6】

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20のペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、請求項1～5のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 7】

ネイティブヒト抗体と比較して5つ以下のアミノ酸交換を有する、請求項1～6のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 8】

LCVRのCDRの外部に位置するアミノ酸配列が、ネイティブヒト領域のそれぞれと少なくとも85%同一である、請求項1～7のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

HCVRのCDRの外部に位置するアミノ酸配列が、ネイティブヒト領域のそれぞれと少なくとも85%同一である、請求項1～8のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 10】

SEQ ID NO:26、27、および28のいずれか1つのアミノ酸配列、好ましくはSEQ ID NO:26からなる少なくとも1つの軽鎖を含み、かつSEQ ID NO:29のアミノ酸からなる少なくとも1つの重鎖をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 11】

インフルエンザM2e抗原がA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインであり、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48～83および90～92のいずれかのペプチドであり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48のペプチドであり、前記モノクローナル抗体と該インフルエンザM2e抗原との解離定数(Kd)が、100nM以下である、請求項1～10のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 12】

請求項1～11のいずれか一項記載の抗体をコードする、核酸。

## 【請求項 13】

医薬として使用するための、請求項1～11のいずれか一項記載のモノクローナル抗体を含み、好ましくは、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤をさらに含む、薬学的組成物。

## 【請求項 14】

対象における、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防の方法において使用するためのモノクローナル抗体であって、該対象がヒトである、請求項1～11のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

さらなる局面において、本発明は、好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防のための医薬の製造における、本発明のモノクローナル抗体の使用に関する。さらに好ましくは、該モノクローナル抗体はIgG1である。

[請求項1001]

インフルエンザM2e抗原に特異的に結合し、ヒトモノクローナル抗体、好ましくは完全ヒトモノクローナル抗体である、単離されたモノクローナル抗体であって、該抗体が少なくとも1つの抗原結合部位を含み、

該抗原結合部位が以下のものを含む、モノクローナル抗体：

(a) (i) SEQ ID NO:1、2、3、4、5、および6のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:7のペプチドからなる1つのLC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:8、9、10、および11のいずれか1つのペプチドからなる1つのLC CDR3とを含む1つのLCVR；ならびに

(b) (i) SEQ ID NO:12のペプチドからなる1つのHC CDR1と；(ii) SEQ ID NO:13および14のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR2と；(iii) SEQ ID NO:15、16、17、18、および19のいずれか1つのペプチドからなる1つのHC CDR3とを含む1つのHCVR。

[請求項1002]

少なくとも1つの抗原結合部位が、アミノ酸配列LLTEVETP (SEQ ID NO:93) により構成されたエピトープを認識する、請求項1001記載のモノクローナル抗体。

[請求項1003]

LC CDR1がSEQ ID NO:1、4、および6のいずれか1つのペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1001または1002のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1004]

LC CDR1がSEQ ID NO:1のペプチドからなり、  
LC CDR2がSEQ ID NO:7のペプチドからなり、  
LC CDR3がSEQ ID NO:8のペプチドからなり、  
HC CDR1がSEQ ID NO:12のペプチドからなり、  
HC CDR2がSEQ ID NO:13のペプチドからなり、かつ  
HC CDR3がSEQ ID NO:15のペプチドからなる、  
請求項1001～1003のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1005]

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれか1つのペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなる、請求項1001～1004のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1006]

HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、請求項1001～1005のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1007]

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20、21、および22のいずれかのペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなる、請求項1001～1006のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1008]

LCVRの5～113位がSEQ ID NO:20のペプチドからなり、HCVRの7～121位がSEQ ID NO:23のペプチドからなり、好ましくは、LCVRの1～4位がSEQ ID NO:24のペプチドからなり、さらに好ましくは、HCVRの1～6位がSEQ ID NO:25のペプチドからなる、請求項1001～1007のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1009]

IgG、好ましくは、IgG1である、請求項1001～1008のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1010]

SEQ ID NO:26、27、および28のいずれか1つのアミノ酸配列、好ましくはSEQ ID NO:26を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの軽鎖を含み、かつSEQ ID NO:29のアミノ酸を含むかまたは好ましくはからなる少なくとも1つの重鎖をさらに含む、請求項1001～1009のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1011]

インフルエンザM2e抗原がA型インフルエンザM2タンパク質の細胞外ドメインであり、好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48～83および90～92のいずれかのペプチドであり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48のペプチドである、請求項1001～1010のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1012]

モノクローナル抗体とインフルエンザM2e抗原との解離定数 (Kd) が、高々100nM、好ましくは高々10nM、より好ましくは高々6nM、最も好ましくは高々5nMであり、さらに好ましくは、該インフルエンザM2e抗原がSEQ ID NO:48である、請求項1001～1011のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

[請求項1013]

請求項1001～1012のいずれか一項記載のモノクローナル抗体を含み、好ましくは、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤をさらに含む、薬学的組成物。

[請求項1014]

好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防の方法において使用するための、請求項1001～1012のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または請求項1013記載の薬学的組成物。

[請求項1015]

好ましくはヒトにおける、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または予防のための医薬の製造における、請求項1001～1012のいずれか一項記載のモノクローナル抗体の使用。

[請求項1016]

有効量の請求項1001～1012のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または有効量の請求項1013記載の薬学的組成物を対象へ投与する工程を含む、A型インフルエンザウイルス感染の処置および/または防止の方法であって、好ましくは、該対象がヒトであり、さらに好ましくは、該モノクローナル抗体がIgG1である、方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/066052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K39/395 A61P31/16 C07K16/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/061723 A (KIRIN BREWERY [JP]; KATO SHINICHIRO [JP]; WANG RONGFANG [JP] KIRIN BRE) 15 June 2006 (2006-06-15) examples 1-6 sequences 2,3	1-16
X	WANG RONGFANG ET AL: "Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein" ANTIVIRAL RESEARCH, vol. 80, no. 2, November 2008 (2008-11), pages 168-177, XP002517094 ISSN: 0166-3542 figure 1 tables 1-3	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2010

Date of mailing of the international search report

26/02/2010

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Cilensek, Zoran

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/066052

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/066052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/078600 A (GEMINI SCIENCE INC [US]; MIKAYAMA TOSHIFUMI [JP]; WANG RONGFANG [JP];) 25 September 2003 (2003-09-25) page 54 - page 67 sequences 1,11,12	1-16
A	LIU WANLI ET AL: "Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge" IMMUNOLOGY LETTERS, ELSEVIER BV, NL, vol. 93, no. 2-3, 13 April 2004 (2004-04-13), pages 131-136, XP002404044 ISSN: 0165-2478 the whole document	1-16
A	ZHANG M ET AL: "Fine specificity and sequence of antibodies directed against the ectodomain of matrix protein 2 of influenza A virus" MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 43, no. 14, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 2195-2206, XP025037291 ISSN: 0161-5890 [retrieved on 2006-07-01] figures 4,5; table 2	1-16
A	GABBARD J ET AL: "A humanized anti-M2 scFv shows protective in vitro activity against influenza" PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 22, no. 3, 2 December 2008 (2008-12-02), pages 189-198, XP002517095 ISSN: 1741-0126 [retrieved on 2008-12-02] the whole document	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/066052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006061723 A	15-06-2006	AU 2005313026 A1	15-06-2006
		CA 2585104 A1	15-06-2006
		EP 1819732 A2	22-08-2007
		JP 2008522610 T	03-07-2008
		KR 20070085439 A	27-08-2007
		US 2009196872 A1	06-08-2009
WO 03078600 A	25-09-2003	AU 2003223285 A1	29-09-2003
		CA 2478973 A1	25-09-2003
		CN 1652815 A	10-08-2005
		EP 1490099 A2	29-12-2004
		JP 2005519619 T	07-07-2005

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

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

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バッハマン マーティン  
スイス連邦 ウィンタートゥール カタリーナ ズルツァーブラッツ 8

(72)発明者 バウアー モニカ  
スイス連邦 チューリッヒ アルトシュテッターシュトラッセ 2 2 0

(72)発明者 ビアリー ロジャー  
スイス連邦 アドリコン ベイ レーゲンスドルフ ローヴィーゼンシュトラッセ 1 5

(72)発明者 シュミッツ ニコール  
スイス連邦 ウルドルフ バーンホーフシュトラッセ 1 0 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 DA02 EA04 GA13  
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01  
4C085 AA14 BA55 BB31 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06  
GG08  
4H045 AA11 BA10 BA41 CA01 DA76 EA20 FA74 GA26