

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2010/073647 A1

(43) 国際公開日

2010年7月1日(01.07.2010)

PCT

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2009/007159

(22) 国際出願日:

2009年12月24日(24.12.2009)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2008-330425 2008年12月25日(25.12.2008) JP
特願 2009-146832 2009年6月19日(19.06.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 財団法人阪大微生物病研究会(THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘3番1号大阪大学内 Osaka (JP). 株式会社ベネシス(Benesis Corporation) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 Osaka (JP). 株式会社医学生物学研究所(MEDICAL AND BIOLOGICAL LABO-

RATORIES CO., LTD) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号住友商事丸の内ビル5F Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 生田和良(İKUTA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 瀧瀬律子(KOKETSU, Ritsuko) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 奥野良信(OKUNO, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒7680061 香川県観音寺市八幡町2-9-41 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内 Kagawa (JP). 柚木幹弘(YUNO-KI, Mikihiro) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号株式会社ベネシス内 Osaka (JP). 井手野祥次(IDENO, Shoji) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号株式会社ベネシス内 Osaka (JP). 大下昌利(OSHITA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号株式会社ベネシス内 Osaka (JP). 久原基樹(KUHARA, Motoki) [JP/JP]; 〒3960002 長野県伊那市手良沢岡1063-103 株式会社医学生物学研究所内 Nagano (JP). 百田匡寿(MOMOTA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒3960002 長野県伊那市手良沢岡106

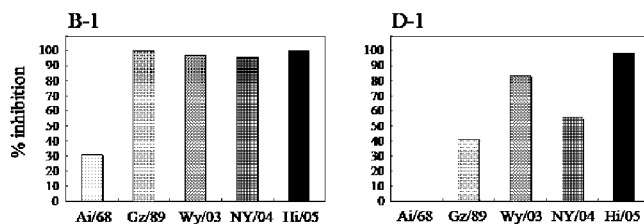
[続葉有]

(54) Title: HUMAN ANTI-HUMAN INFLUENZA VIRUS ANTIBODY

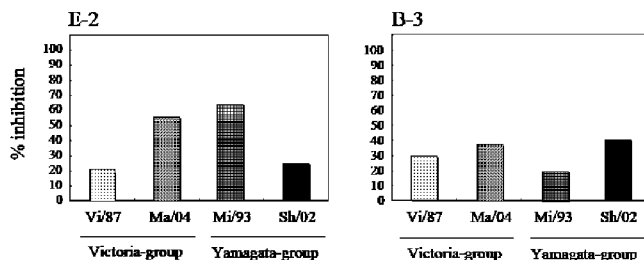
(54) 発明の名称: 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体

[図2]

A) AH3N2



B) B



(57) Abstract: Disclosed is a human antibody having a neutralization activity against a human influenza virus. Specifically disclosed is a human antibody which can recognize a highly conserved region in a human influenza A virus subtype H3N2 and a human influenza B virus and has a neutralization activity against the virus. More specifically disclosed is a human anti-human influenza virus antibody which has a neutralization activity against a human influenza A virus subtype H3N2 and is capable of binding to a hemagglutinin HA1 domain in a human influenza A virus subtype H3N2 or which has a neutralization activity against a human influenza B virus, wherein the nucleotide sequence of DNA that encodes a variable region of the antibody comprises any one sequence selected from those depicted in SEQ ID NO:5 to SEQ ID NO:12.

(57) 要約: 本発明は、ヒトインフルエンザウイルスに対して中和活性を有するヒト型抗体に関する。より詳しくは、ヒトインフルエンザ A 型ウイルスの H3N2 サブタイプ又はヒト

インフルエンザ B 型ウイルスに対して、高度に保存された領域を認識し、中和活性を有するヒト型抗体に関する。ヒトインフルエンザ A 型ウイルス H3N2 サブタイプに対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザ A 型ウイルス H3N2 サブタイプのヘマグルチニン HA1 領域に結合する、又は、ヒトインフルエンザ B 型ウイルスに対して中和活性を有する、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体であり、抗体の可変領域をコードする DNA の塩基配列が、配列番号 5 ~ 12 に示すいずれかの配列を含む抗体による。

WO 2010/073647 A1



3 - 1 0 3 株式会社医学生物学研究所内
Nagano (JP).

(74) 代理人: 庄司隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒
1030004 東京都中央区東日本橋 3 - 4 - 1 秋
場ビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(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), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体

技術分野

[0001] 本発明はヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプに対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1領域に結合する、又は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2008-330425号及び特願2009-146832号優先権を請求する。

背景技術

[0003] インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科に属し、A型、B型及びC型の3属に分類され、各々インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルスという。一般にインフルエンザウイルスは、特にA型及びB型をいう場合が多い。A型、B型及びC型の違いは、ウイルス粒子を構成するタンパク質のうち、M1タンパクとNPタンパクの抗原性の違いに基づく。また、同じA型やB型であっても、エンベロープの表面上の分子である赤血球凝集素（ヘマグルチニン、以下、単に「HA」ともいう。）やノイラミニダーゼ(NA)の抗原性の違いから、それぞれ複数の亜型と株に分類され、例えばインフルエンザA型ウイルスでは、H1N1、H2N2、H3N2などの各サブタイプに分類される。ヒトインフルエンザA型ウイルスは、周期的にHAやNAを変異させるために、従前のサブタイプに対応するワクチン接種を受けても、その効果が期待できないことが多い。

[0004] インフルエンザA型ウイルスのHAは、球状部領域(head region)と幹領域(stem region)という構造の異なる領域で構成され、球状部領域はウイルスが標的細胞に結合するための受容体結合部位を含み、HAの血球凝集活性に関与し、幹領域はウイルスのエンベロープと細胞のエンドソーム膜間の膜融合に必要な融合ペプチドを含み、融合活性に関与している（非特許文献1）。イ

ンフルエンザA型ウイルスのH1N1、H2N2各サブタイプを認識する抗HA抗体は、HAの球状部領域を認識するものが殆どである。しかし、この領域は最も抗原変異が起こり易い部位であり、これらの抗体はヒトインフルエンザA型ウイルスのサブタイプに共通して反応するものではなく、ウイルスのHAの抗原変化に伴い、認識性を消失する場合が多い。

[0005] 特許文献1及び非特許文献2において、インフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプの1種のHAの幹領域のアミノ酸配列よりポリペプチドを合成し、このポリペプチドに対する抗体を取得したことが開示されているが、これらの抗体はウイルスの中和活性が弱く（特許文献1）、また抗原として使用したポリペプチド自体も、H3N2サブタイプで免疫して得たウサギ抗ウイルス血清に反応を示さず、抗原性の点でも問題があった（非特許文献2）。

[0006] インフルエンザウイルスのサブタイプに共通で、HA分子やNA分子などにおいて抗原変異の生じ難い抗原部位を認識し、インフルエンザウイルスに対して中和活性を有する抗体を得ることができれば、ウイルスの感染による発症の診断、予防並びに治療に利用でき、かつ、該抗原部位自体もワクチンとして有用となる。インフルエンザA型ウイルスのH1N1サブタイプ及びH2N2サブタイプに対してウイルス中和活性を有し、H3N2サブタイプに対して中和活性を示さない抗体について開示がある（特許文献2、3）。また、インフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプの幹領域の特定のポリペプチド配列を認識するが、H1N1サブタイプ及びH2N2サブタイプを認識しない抗体について開示がある（特許文献4）。さらに、インフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプを中和するヒトFab抗体についての開示がある（特許文献5、非特許文献3）。

[0007] インフルエンザは、世界的な流行を起こし、多くの死者が出るのはA型のヒトインフルエンザである（特許文献2～4）。インフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプは、過去に世界的な流行を起こした亜型であり、近年ではアマンタジン等の抗インフルエンザウイルス作用を有する薬剤に対しても耐性株が増加していることが報告されている（ニューヨークタイムス、January 1

5, 2006)。しかしながら、インフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプやインフルエンザB型ウイルスについて、20年近く前より高度に保存された領域に対して、効果的に中和活性を示す抗体については、報告がない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表昭59-501714号公報

特許文献2：特開平6-100594号公報

特許文献3：特開平7-265077号公報

特許文献4：特開平7-304799号公報

特許文献5：特開2006-254777号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Rev. Biochem., 56, 365-394 (1987)

非特許文献2：Cell, 28, 477-487 (1982)

非特許文献3：Microbiol. Immunol., 52, 162-170 (2008)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、ヒトインフルエンザウイルスに対して中和活性を有するヒト型抗体を提供することを課題とする。より詳しくは、ヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプ又はヒトインフルエンザB型ウイルスに対して、高度に保存された領域を認識し、中和活性を有するヒト型抗体を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、インフルエンザワクチン接種した健常人より採取した末梢血単核球及びヒト由来リンパ球と高い効率で細胞融合が可能な細胞からハイブリドーマを作製し、インフルエンザウイルス由来タンパクに結合活性を有する抗体産生細胞を選別し、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体を産生することができた

。得られた抗体のうち、特にヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプ又はヒトインフルエンザB型ウイルスに対して、高度に保存された領域を認識し、中和活性を有するヒト型抗体を選別し、本発明の抗体を得た。

[0012] 本発明は、即ち以下よりなる。

1. ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1領域に結合する、又は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

2. 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体が、ヒトインフルエンザA型ウイルスH1サブタイプ及び同H2サブタイプに対して中和活性を有さない、前項1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

3. 抗インフルエンザ・ヒト型抗体であって、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和活性を有する抗体が、少なくともA/Hiroshima/52/05株に対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する抗体が、少なくともB/Malaysia/2506/04株に対して中和活性を有する、前項1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

4. 抗体が認識するエピトープが、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1を構成するアミノ酸配列のうち、N末端から数えて173-181番目のアミノ酸配列を含む領域及び／又は227-239番目のアミノ酸配列を含む領域である、前項1～3のいずれか1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

5. エピトープが、以下の配列番号1又は2に示すアミノ酸配列含むアミノ酸配列、あるいはこれらのアミノ酸配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかのアミノ酸配列からなる、前項4に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：

1) NFDKLYIWG（配列番号1）；

2) KFDKLYIWG（配列番号2）。

6. エピトープが、以下の配列番号3又は4に示すアミノ酸配列含むアミノ

酸配列、あるいはこれらのアミノ酸配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかのアミノ酸配列からなる、前項4に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：

- 1) SSRISIIYWTIVKP（配列番号3）；
- 2) PSRISIIYWTIVKP（配列番号4）。

7. 抗体の可変領域をコードするDNAの塩基配列が、以下の配列番号5～12に示すいずれかの塩基配列より選択される、あるいはこれらの塩基配列のうち、1～複数個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかの塩基配列を含む、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：

- 1) GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCTGTTCAACATCTCCAGGGACAATCCAAGGACACAGTGTTTCTGCAAATGACCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGGGAGGGTTATCGACCCTCAAAAGATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA（配列番号5）；
- 2) GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGTGGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAGAGCCCCTAG GCTCCTCATCTCTAGTGGTCCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAGTTCAGTGGCCGTGGAGAAGAG ACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCAGTTTACTACTGTCAACAGAGT TACAGTGACCTTCTCAGTTTGGCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA（配列番号6）；
- 3) CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTG CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCT TGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGCCAGGGCTTCACAGGACGGTT TGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGGAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACAC TGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTACGATATTTTACTGGTTATTATTATTACTTTGACTA CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号7）；
- 4) CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTG TGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAGACCCCAGGCCAGGC

TCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCCTGATCGTTCTCTGGCTCCTT
CCTTGGGAGCGACGCTGCCCTACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGATGAGTCTGATTATTTCTGTGT
GCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (配列番
号 8) ;

5) CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCCTCACCTG
CGTTGTCTCTGGTGACTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGCCAGCCCCAGAGAG
GGGCCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTACAACCCGGCCCTCAAGAGTCG
AACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCAGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCACCTGACTACAGTGACTACAAGGTTGGGAAGGGTTA
TTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9) ;

6) GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
CTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTGGTGTGAGCAGCA
TAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCACGGCTGGAGATTAAA (配列番号 10) ;

7) CAGGTGAAGTTGGTGCAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGAGGCGTCTGGATTGACTTCACTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT
TGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATT
CACCGTGTCCAGAGACAATCCCCAGAAGACAGTGTATCTGCAAATGAGTGGCCTGAGACCCGAGGACAC
GGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTTCTTTTCATGGGCATCTATGACTACGGCATGGACGCCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCCTCA (配列番号 11) ;

8) CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCATCATCTCTTG
TTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCCCAGGGGCGGCCCC
GAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTC
TGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGAAGT
TTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTGGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTACGT (配列番
号 12) 。

8. 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の抗原が、ヒトインフルエ

ンザウイルスのA/Hiroshima/52/05株又はB/Malaysia/2506/04株である、前項7に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

9. 抗体の可変領域をコードするDNAのうち、配列番号5～8に示す可変領域を有する抗体が、ヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプに対して中和活性を有する抗体であり、配列番号9～12に示す可変領域を有する抗体が、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する抗体である、前項7に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

10. 抗体の可変領域をコードするDNAのうち、配列番号5、7、9及び11に示すDNAが、重鎖可変領域をコードするDNAであり、配列番号6、8、10及び12に示すDNAが、軽鎖可変領域をコードするDNAである、前項8に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

11. 抗体が、インタクト抗体である、前項1～11のいずれか1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

12. 前項1～11のいずれか1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の可変領域をコードするDNAであり、以下の配列番号5～12に示すいずれかの塩基配列より選択される、あるいはこれらの塩基配列のうち、1～複数個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むDNA：

1) GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCTGTTCAACATCTCCAGGGACAATCCAAGGACACAGTGTCTGCAAATGACCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGGGAGGGTTATCGACCCTCAAAAGATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (配列番号5) ；

2) GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGTGGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAGAGCCCCTAG GCTCCTCATCTCTAGTGCCTCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAGTTCAGTGGCCGTGGAGAAGAG ACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCAGTTTACTACTGTCAACAGAGT

TACAGTGACCTTCTCAGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (配列番号 6) ;

3) CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTG
CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCT
TGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGCCAGGGCTTCACAGGACGGTT
TGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGGAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACAC
TGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTACGATATTTTGAAGTGGTTATTATTACTTTGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 7) ;

4) CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTG
TGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAGACCCCAGGCCAGGC
TCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCCTGATCGTTCTCTGGCTCCTT
CCTTGGGAGCGACGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGATGAGTCTGATTATTTCTGTGT
GCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (配列番
号 8) ;

5) CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCCTCACCTG
CGTTGTCTCTGGTGACTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGCCAGCCCCAGAGAG
GGGCCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTACAACCCGGCCCTCAAGAGTCG
AACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCAGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCACCTGACTACAGTGAAGTTGGGAAGGGTTA
TTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9) ;

6) GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
CTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTGGTGTGAGCAGCA
TAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCACGGCTGGAGATTAAA (配列番号 10) ;

7) CAGGTGAAGTTGGTGAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGAGGCGTCTGGATTGACTTCACTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT
TGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATT
CACCGTGTCCAGAGACAATCCCCAGAAGACAGTGTATCTGCAAATGAGTGGCCTGAGACCCGAGGACAC

GGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTCCTTTTCATGGGCATCTATGACTACGGGCATGGACGCCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCCTCA（配列番号 11）；

8）CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCATCATCTCTTG
TTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCCCAGGGGCGGCCCC
GAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTC
TGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGAAGT
TTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTACGT（配列番
号 12）。

13. 前項 1～11 のいずれか 1 に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・
ヒト型抗体を含む組成物。

発明の効果

- [0013] 本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体は、ヒトインフルエ
ンザA型ウイルスH3N2サブタイプ又はヒトインフルエンザB型ウイルスについ
て、各々高度に保存された領域に対して中和活性を有する。
- [0014] 具体的には、本発明の抗体のうち、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サ
ブタイプに対する抗体は、少なくともA/Hiroshima/52/05株(2005年分離)のウ
イルス株に対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する
抗体は、少なくともB/Malaysia/2506/04株(2004年分離)ウイルス株に対して
中和活性を有する。さらに各年代のインフルエンザウイルスワクチン株、例
えばA/Aichi/2/68株(1968年分離)、A/Guizhou/54/89株(1989年分離)、A/Wy
oming/3/03株(2003年分離)、A/New York/55/04株(2004年分離)及びA/Hiroshi
ma/52/05株(2005年分離)などのヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイ
プの各ウイルスに対しても中和活性を有し、あるいはB/Victoria/2/87株(198
7年分離)、B/Malaysia/2506/04株(2004年分離)、B/Mie/1/93株(1993年分離)
、B/Shanghai/261/02株(2002年分離)などのヒトインフルエンザB型ウイルス
の各ウイルスに対しても中和活性を有する。
- [0015] また、本発明のヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗
体は、in vivoにおいて予防的又は治療的に投与した場合に、少なくともイン

フルエンザウイルスA/Guizhou/54/89xA/PR/8/34 (H3N2) 株感染に対して生存率及び体重減少に対して効果を示す。

- [0016] つまり、本発明のヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗体は、20年近く前より保存されている領域に対して活性を有し、40年以上前より保存されている領域に対して活性を有するものも含まれる。また、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する抗体は、20年以上前より保存されている領域に対して活性を有する。一方、本発明の抗体は、HI (hemagglutination inhibition、赤血球凝集抑制) 活性は検出限界以下である。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]A-1、A-2、B-1、B-2、B-3、C-1、D-1、D-2、E-1、又はE-2単クローン抗体産生の各ハイブリドーマの培養上清の各インフルエンザウイルスのHAに対する反応性をウエスタンブロットアッセイで確認した結果を示す図である。

(実験例 1 - 2)

- [図2]ハイブリドーマの培養上清の、様々な年代のインフルエンザウイルスワクチン株に対する中和活性を確認した結果を示す図である。(実験例 1 - 4)

- [図3]B-1単クローン抗体の重鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

- [図4]B-1単クローン抗体の軽鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

- [図5]D-1単クローン抗体の重鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

- [図6]D-1単クローン抗体の軽鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

- [図7]E-2単クローン抗体の重鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

- [図8]E-2単クローン抗体の軽鎖可変領域の配列を示す図である。(実験例 1 - 5)

[図9] B-3単クローン抗体の重鎖可変領域の配列を示す図である。（実験例 1－5）

[図10] B-3単クローン抗体の軽鎖可変領域の配列を示す図である。（実験例 1－5）

[図11] A-2、B-1、B-2、D-1の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清について、インフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する染色像を確認した結果を示す図である。（実験例 1－6）

[図12] B-3及びE-2単クローン抗体の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清について、インフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する染色像を確認した結果を示す図である。（実験例 1－7）

[図13] ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプの各インフルエンザウイルスワクチン株のヘマグルチニンHA1領域に対して、B-1及びD-1の各単クローン抗体が認識するペプチド鎖（エピトープ）の配列を示す図である。（実験例 1－8）

[図14] B-1及びD-1の各単クローン抗体が認識するペプチド鎖のヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1領域の立体構造上の配置を示す図である。（実験例 1－8）

[図15] B-1及びD-1の各単クローン抗体が認識するペプチド鎖とデータベース上のエピトープの対比を示す図である。（実施例 1－8）

[図16] B-1及びD-1の各単クローン抗体を、マウス各 5 匹に予防的に投与したときの生存率を示す図である。（実験例 2－1）

[図17] B-1又はD-1の各単クローン抗体を、マウス各 5 匹に予防的に投与したときの体重変化を示す図である。プロットは、各個体の体重変化を示す。（実験例 2－1）

[図18] B-1又はD-1の各単クローン抗体を、マウス各々 5 匹に治療的に投与したときの生存率を示す図である。（実験例 2－2）

[図19] B-1又はD-1の各単クローン抗体を、マウス各 5 匹に治療的に投与したときの体重変化を示す図である。プロットは、各個体の体重変化を示す。（実

験例 2 - 2)

発明を実施するための形態

[0018] 本発明は、下記特性(a)～(c)を有する抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体に関する。

(a) ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのA/Hiroshima/52/05株(2005年分離)のウイルス株に対して中和活性を有し、あるいはヒトインフルエンザB型ウイルスのB/Malaysia/2506/04株(2004年分離)ウイルス株に対して中和活性を有する。

(b) HI (hemagglutination inhibition、赤血球凝集抑制)は、検出限界以下である。

(c) さらに、本発明の各抗体は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH1N1サブタイプ及び同H2N2サブタイプに対して中和活性を有さない。

[0019] ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する本発明の抗体は、少なくともA/Hiroshima/52/05株(2005年分離)に対して中和活性を有し、さらに各年代のインフルエンザウイルスワクチン株、A/Aichi/2/68株(1968年分離)、A/Guizhou/54/89株(1989年分離)、A/Wyoming/3/03株(2003年分離)及びA/New York/55/04株(2004年分離)などのヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプの各ウイルスに対して中和活性を有する。また、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する本発明の抗体は、少なくともB/Malaysia/2506/04株(2004年分離)に対して中和活性を有し、さらに各年代のインフルエンザウイルスワクチン株、B/Victoria/2/87株(1987年分離)、B/Mie/1/93株(1993年分離)、B/Shanghai/261/02株(2002年分離)などのヒトインフルエンザB型ウイルスの各ウイルスに対して中和活性を有する。

[0020] 上記特性を有する本発明の抗体のうち、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗体は、上記ヒトインフルエンザA型ウイルスのヘマグルチニンHA1を構成するアミノ酸配列のN末端から数えて173-181番目のアミノ酸配列を含む領域及び／又は227-239番目のアミノ酸配列を含む領域を認識する。ここで、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプを構成するア

ミノ酸配列は、A/Hiroshima/52/05株についてはGenBank Accession No. EU501660、A/Guizhou/54/89株についてはGenBank Accession No. D49963、A/Wyoming/3/03株についてはGenBank Accession No. AY531033、A/New York/55/04株についてはGenBank Accession No. EU501486に開示される。

[0021] 上記ヒトインフルエンザA型ウイルスのヘマグルチニンHA1を構成するアミノ酸配列のうち、N末端から数えて227番目のアミノ酸はS（セリン）又はP（プロリン）であるが、係る相違は中和活性には影響していない。文献上（Karoline et al Virology J. 2008, 5, 40）でも、同部位はS又はPである。同173番目の変異はN（アスパラギン）又はK（リシン）であり、1968年のA/Aichi以外はKであり、文献上はK又はE（グルタミン酸）である。また、229番目及び230番目については、文献上（Underwood, Mol. Immunol., 1987, 21, 7）、各々R（アルギニン）若しくはG（グリシン）、I（イソロイシン）若しくはV（バリン）の相違があり、238番目及び239番目においてもGenBankの登録配列では各々K若しくはN、P若しくはRのアミノ酸の相違が認められる。

[0022] 上記に鑑みて、173-181番目のアミノ酸配列を含む領域に係るペプチド鎖（エピトープ）は、具体的には配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であり、さらにこれらの配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加、導入されていてもよいアミノ酸配列からなる。227-239番目のアミノ酸配列を含む領域に係るペプチド鎖（エピトープ）は、具体的には配列番号3又は4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であり、又はこれらの配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加、導入されていてもよいアミノ酸配列からなる。

1) NFDKLYIWG（配列番号1）

2) KFDKLYIWG（配列番号2）

3) SSRISYWTIVKP（配列番号3）

4) PSRISYWTIVKP（配列番号4）

[0023] 上記特性を有する本発明の抗体の可変領域をコードするDNAの塩基配列は、具体的には以下に示される。

[0024] A-1. ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対するヒト型抗体
(B-1)

重鎖可変領域配列：GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGCAGACTCC
GTGAAGGGCCTGTTACCATCTCCAGGGACAATCCAAGGACACAGTGTCTGCAAATGACCAGCCTG
AGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGGGAGGGTTATCGACCCTCAAAA
GATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA（配列番号5）。

[0025] 軽鎖可変領域配列：GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGTGGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCA
GGGAGAGCCCCTAGGCTCCTCATCTCTAGTGCGTCCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAGTTCAGTG
GCCGTGGAGAAGAGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCAGTTTACT
ACTGTCAACAGAGTTACAGTGACCTTCTCAGTTTGGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA（配列
番号6）。

[0026] A-2. ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対するヒト型抗体
(D-1)

重鎖可変領域配列：CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGCCAGGGC
TTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGGAGATCAGCAGCCTA
AAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTACGATATTTTACTGGTTATTAT
TATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号7）。

[0027] 軽鎖可変領域配列：CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACA
GTCACACTCACTTGTGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAG
ACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCCTGATCGC
TTCTCTGGCTCCTTCCTTGGGAGCGACGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGATGAGTCT
GATTATTTCTGTGTGCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTTGGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTAGGT（配列番号8）。

[0028] B-1. ヒトインフルエンザB型ウイルスに対するヒト型抗体 (E-2)

重鎖可変領域配列 : CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACC
CTGTCCCTCACCTGCGTTGTCTCTGGTGA CTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGC
CAGCCCCCAGAGAGGGGCGCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTACAACCCG
GCCCTCAAGAGTCGAACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCT
GTGACCGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCACCTGACTACAGTGA CTACAAG
GTTGGGAAGGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9
) 。

軽鎖可変領域配列 : GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT
TGGTGTGAGCAGCATAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCACGGCTGGAGATTAAA (配列
番号 10) 。

[0029] B-2. ヒトインフルエンザB型ウイルスに対するヒト型抗体 (B-3)

重鎖可変領域配列 : CAGGTGAAGTTGGTGCAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGAGGCGTCTGGATTGCACTTCACTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTTGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGCGGACTCC
GTGAAGGGCCGATTACCGTGTCCAGAGACAATCCCCAGAAGACAGTGTATCTGCAAATGAGTGGCCTG
AGACCCGAGGACACGGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTCCTTTTCATGGGCATCTATGACTACGGC
ATGGACGCCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCGCCTCA (配列番号 11) 。

軽鎖可変領域配列 : CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG
GTCATCATCTCTTGTTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCC
CCAGGGGCGGCCCCGAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTGAGGATGAGGCTGAT
TATTACTGTGAAGTTTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTC
CTACGT (配列番号 12) 。

[0030] 本発明の抗体は、上記の特性を有する抗体であればよく、特に限定されな

い。例えば、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対するヒト型抗体の可変領域の塩基配列は、上記配列番号5～8のいずれかに示す塩基配列に限定されるものではなく、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和能を有するものであれば、上記配列のうち1～複数個のヌクレオチドが、置換、欠失、付加又は導入されたものであってもよい。1～複数個のヌクレオチドの置換の例として、例えばコドンの縮重等により、中和能を有するが、塩基配列の異なるものであってもよい。好ましくは、A型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和能を有する抗体が、さらには上述の各ペプチド鎖（エピトープ）のいずれかを認識する抗体であればよい。また、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対するヒト型抗体の可変領域の塩基配列も同様に、上記配列番号9～12のいずれかに示す塩基配列に限定されるものではない。ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和能を有するものであれば、上記配列のうち1～複数個のヌクレオチドが、置換、欠失、付加又は導入されたものであってもよい。1～複数個のヌクレオチドの置換の例として、例えばコドンの縮重等により、中和能を有するが、塩基配列の異なるものであってもよい。

[0031] 細胞融合法で得られる単クローン抗体は、通常は免疫動物種、例えばマウス由来であるが、マウス型抗体をヒトに投与すると異物として代謝されうるので、ヒトにおけるマウス型抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウス型抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体(HAMA)は、血清病又は他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起させる。このため、ヒトにおける他動物種型の単クローン抗体の医学療法的価値は制限されている。従って、単クローン抗体を医薬品等として、ヒトに投与する場合には、ヒト型抗体が強く望まれている。

[0032] ヒト型抗体の製造方法は、自体公知の方法、又は今後開発されるあらゆる方法を採用することができるが、ヒト型抗体において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、

中和活性を示すヒト型抗体を作製するためには種々の工夫が必要である。例えば、Sato, K. et al, Cancer Res., 53, 851-856, 1993や特開2008-161198号公報を参照することができる。ヒト型抗体のタイプとしては、特に限定されないが、Fab型であってもインタクトタイプであってもよい。抗体活性を効果的に発揮させるためには、インタクトタイプの抗体が望ましい。インタクトタイプの抗体は、特に限定されないが、例えば抗体の相補鎖決定領域 (complementarity determinig region: CDR) はもとの動物種に由来し、定常領域 (C領域) は適当なヒトに由来する抗体とすることができる。キメラ抗体は免疫動物種抗体のCDRを含む可変領域をヒト抗体の定常領域に連結したものが一般的で、遺伝子組換技術によって容易に構築することができる。また、免疫動物種抗体のCDRをヒト抗体の可変領域に移植するCDRグラフティングによるヒト型化抗体であってもよい。CDR領域はアミノ酸置換が頻繁に起こるので、抗原性の観点からはヒト由来CDRをもつヒト抗体と免疫動物種由来CDRを有していてもよい。

[0033] 上記特性(a)～(c)を有する本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体は、具体的には以下の方法により作製することができる。インフルエンザワクチン接種後、2～4週間後の健常人より血液10 mL分の末梢血単核球を採取し、ヒト由来リンパ球と高い効率で細胞融合が可能なヒト由来パートナー細胞、例えばSPYMEG細胞 (MBL社製) とポリエチレングリコール法などの方法を用いて細胞融合することで簡便かつ効率的にハイブリドーマを作製し、HAなどのインフルエンザウイルス由来精製タンパクを固相化したELISA法、又は、インフルエンザウイルス感染細胞を抗原とした染色法により、インフルエンザウイルス由来タンパクに結合活性を有する抗体産生細胞を選別することで抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体を産生することが可能となる。

[0034] 他の製造方法として、例えば大腸菌ファージの表面に、ヒト型抗体断片を提示した、いわゆるヒト・コンビナトリアル抗体ライブラリーを構築し、バイオパニングにより抗体をスクリーニングして所望のヒト型抗体を得ること

ができる。この場合は、動物への免疫作業を介さずに、所望の抗体をスクリーニングすることができる。

[0035] 本発明は、さらに本発明の抗体を含む組成物にも及ぶ。また、本発明の組成物を、医薬用途に用いる場合には、本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体のうち、1種又は複数種を有効量含み、さらに薬学的に許容し得る担体を含んでいても良い。本発明において、薬学上許容される塩とは、以下が挙げられる。

[0036] 塩基性付加塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；例えばアンモニウム塩；例えばトリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩；ジシクロヘキシルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ブロカイン塩等の脂肪族アミン塩；たとえばN，N-ジベンジルエチレンジアミン等のアラルキルアミン塩；例えばピリジン塩、ピコリン塩、キノリン塩、イソキノリン塩等の複素環芳香族アミン塩；例えばテトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアンモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルトリエチルアンモニウム塩、ベンジルトリブチルアンモニウム塩、メチルトリオクチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等の第4級アンモニウム塩；アルギニン塩；リジン塩等の塩基性アミノ酸塩等が挙げられる。

[0037] 酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、りん酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、過塩素酸塩等の無機酸塩；例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、りんご酸塩、くえん酸塩、アスコルビン酸塩等の有機酸塩；例えばメタンサルホン酸塩、イセチオン酸塩、ベンゼンサルホン酸塩、p-トルエンサルホン酸塩等のサルホン酸塩；例えばアスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等の酸性アミノ酸等を挙げることができる。

[0038] かかる組成物は、医薬組成物として経口的又は非経口的に投与することができる。経口投与による場合、本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒ

ト型抗体は通常の製剤、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤等の固形剤；水剤；油性懸濁剤；又はシロップ剤もしくはエリキシル剤等の液剤のいずれかの剤型としても用いることができる。非経口投与による場合、本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体は、水性又は油性懸濁注射剤、点鼻液として用いることができる。その調製に際しては、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤、水性溶剤、油性溶剤、乳化剤、懸濁化剤、保存剤、安定剤等を任意に用いることができる。

実施例

[0039] 本発明の理解を助けるために、以下に実施例及び実験例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものでないことはいうまでもない。

[0040] (実施例 1) 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の作製

本実施例では、ハイブリドーマを用いて、単クローン抗体を作製したものについて、説明する。

[0041] 1) ウイルスの調製

国立感染症研究所から分与されたヒトインフルエンザワクチン株、即ちA型ウイルスH1N1サブタイプとしてA/New Caledonia/20/99株、H3N2サブタイプとしてA/Hiroshima/52/05株を、ヒトインフルエンザB型ウイルスとしてB/Malaysia/2506/04株を用い、各々MDCK細胞（イヌ腎上皮細胞株）に感染させ、トリプシン存在下37℃で2～3日間培養後、ウイルスを採取した。

[0042] 2) インフルエンザウイルスHA抗原の精製

インフルエンザウイルスHA抗原の精製は、当業者には周知の方法で行った。上記各インフルエンザウイルスワクチン株を孵化鶏卵に接種し、33～35℃で2日間培養後、4℃で1晩放置し、感染尿膜腔液を採取した。次いで、限外ろ過法などで濃縮し、ショ糖密度勾配遠心法でウイルス粒子を精製した。すなわち、0～60%のショ糖密度勾配中で回転数35,000 rpmで超遠心し、ショ糖密度40%前後の画分を採取した。この濃縮ウイルス画分をエーテル処理した後、ホルマリンを添加し、ショ糖密度勾配遠心法でさらに精製してインフル

エンザHA抗原を得た。

[0043] 3) ハイブリドーマの作製

2006/2007年シーズンインフルエンザワクチン、具体的には、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプとしてA/Hiroshima/52/05株又はヒトインフルエンザB型ウイルスとしてB/Malaysia/2506/04株から調製したインフルエンザワクチンを接種した健常人より、ワクチン接種2～4週間後に、末梢血10 mLを採取し、Ficoll Paque Plus (GE Healthcare社製) などを用いて単核球画分を採取し、ハイブリドーマ作製用細胞画分とした。単核球画分を、細胞融合前に血清無添加DMEMで洗浄し、ハイブリドーマ作製用細胞としての単核球を得た。ハイブリドーマ作製のパートナー細胞として、マウスミエローマ細胞とヒト巨核芽球のハイブリッドミエローマ細胞であるSPYMEG細胞 (MBL社製) を用いた。SPYMEG細胞を10 %牛胎児血清添加DMEM培地で継代後2日間培養したものを、細胞融合前に血清無添加DMEMで洗浄した。

[0044] 次に、上記にて得た単核球とSPYMEG細胞を細胞数1:5～1:10の割合で混合し、遠心分離して上清を除去した。沈殿した細胞塊を充分ほぐした後、撹拌しながら、50 %ポリエチレングリコール1500-PBS溶液0.6 mLを1分間かけてゆっくりと添加した後、血清無添加DMEM 10 mLを2分間かけてゆっくり加えた。さらに血清無添加DMEM 10 mLを添加した後、牛胎児血清を1 mL添加し、細胞融合を完了させた。次に、遠心分離後上清を除き、血清無添加DMEM 20 mLで洗浄した。最後に、ゆるやかに細胞をほぐし、HAT培地 {15%牛胎児血清添加DMEMにHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) 及びBM condimed (Roche社製) などのヒトハイブリドーマ用培地添加剤を加えたもの} を120 mL加え、メスピペットを用いてゆるやかに細胞を懸濁した。

[0045] 4) ハイブリドーマのクローニング

上記3) の細胞懸濁液を培養用96ウェルマイクロプレート6枚に分注し、5 % CO₂を含む培養器中で、37 °Cで10～14日間培養した。この間、3～4日の間隔でHAT培地の半量交換を行った。続いて培養上清の一部を採り、ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0046] ELISA用96ウェルマイクロプレートに、上記2)で調製した精製HA抗原(1 μ g/ウェル)を固相化し、さらに5%脱脂粉乳のPBS-0.1% Tween 20 (TBS-T)溶液でブロッキングした。その後、上記の細胞懸濁液培養後の培養上清50 μ Lを該ELISA用マイクロプレートの各ウェルに加え、37°Cで30分反応させてウェルの固相上で精製HA抗原と抗HA抗原抗体(抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体)による一次免疫複合体を形成させた。該一次免疫複合体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗抗体との反応後、着色ペルオキシダーゼ反応により培養上清中の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体を検出した。

[0047] 次に該抗体産生が確認された細胞が増殖している培養用マイクロプレートの各ウェル中に含まれる細胞を取り出し、限界希釈法を3回行い、上記同手法により目的の細胞をクローニングした。クローニングされたハイブリドーマ株をR1D8、K4E7及びG4G11とした。

[0048] 5) 抗体の精製

各ハイブリドーマ株は、培養液中の牛胎児血清含有量を10%から2%に減少させ、最終的に無血清の培養液中で培養した。無血清培養液で3~7日間培養した各ハイブリドーマの培養上清100 mLを2,000rpm、10分遠心処理し、得られた上清を0.45 μ mフィルターで濾過して固形成分を除去し、Protein Gを固定化した6%アガロースゲル(HiTrap Protein G HPTM、GE Healthcare社製)1 mLにより精製した。ハイブリドーマ株 R1D8、K4E7及びG4G11が産生する単クローン抗体を、各々B-1、D-1及びE-2と命名した。同様に、単クローン抗体としてその他のハイブリドーマ上清からA-1、A-2、B-2、B-3、C-1、D-2及びE-1などの単クローン抗体を精製した。

[0049] (実験例1-1) 各ハイブリドーマの培養上清の性状

1) 中和活性

各ハイブリドーマ培養上清の各インフルエンザウイルスに対する中和活性測定は、Arch. Virol., 86, 129-135 (1985)、Microbiol. Immunol., 29, 327-335 (1985)に準じて行った。

[0050] 96ウェルマイクロプレート(中和活性測定用)に、MDCK細胞を 2×10^4 個/ウ

エル分注し、37°Cで一晩培養した。RDE処理により非特異インヒビター除去した各抗体の培養上清の8倍希釈液と、以下のインフルエンザウイルスワクチン株から得たウイルス溶液を各々100フォーカス形成単位/ウェルとなるように調製したものを等量混合し、37°Cで1 時間保温した。次にこの混合液の30 μ Lを、前記培養したMDCK細胞を加えたマイクロプレートの各ウェルに分注し、30分間、37°Cで保温した。次に各ウェルの溶液を除去し、PBSで各ウェルを洗浄し、牛胎児血清無添加MEMを添加した。37°Cで6~10時間保温後、添加液を除去し、細胞を室温下、無水エタノールで10分間処理し、細胞を固定した。各ウェルを乾燥させ、染色試験と同様の酵素抗体染色法により細胞の染色を行った。染色後、細胞を水道水で洗浄し、乾燥後、染色されたフォーカス数を光学顕微鏡下で計測した。中和活性は、フォーカス減数率で表示した。その結果を表1に示した。

[0051] ヒトインフルエンザウイルスワクチン株：

A. インフルエンザA型：A/New Caledonia/20/99株(H1)、A/Hiroshima/52/05株(H3N2)

B. インフルエンザB型：B/Malaysia/2506/04株

[0052] 2) 抗体の血球凝集阻害活性(HI)

RDE処理したハイブリドーマ培養上清の段階希液(2~64倍)を96ウェルマイクロプレート(血球凝集阻害活性(HI)測定用)の各ウェルに25 μ L加え、次に各上記1)で用いたウイルス(8HA単位/50 μ L) 25 μ Lと混合し、室温で30分間反応させた。その後、0.75 %モルモット赤血球50 μ Lを加えよく混和し、各ウイルスの血球凝集活性に及ぼすハイブリドーマ培養上清中の抗体の影響を調べた。その結果を表1に示した。

[0053]

[表1]

表1 インフルエンザウイルスに対するヒト型単クローン抗体

HuMAb	ELISA ^a			感染細胞染色 ^b			認識している ウイルス型	HI活性 ^c	中和活性 (% inhibition) ^c
	H1	H3	B	H1	H3	B		H1/H3/B	H1/H3/B
A-1	-	-	+	-	-	+	B	<2	0
A-2	-	+	-	-	+	-	AH3	<2	4.3
B-1	-	+	-	-	+	-	AH3	<2	98.9
B-2	-	+	-	-	+	-	AH3	<2	0
B-3	-	-	+	-	-	+	B	<2	31.7
C-1	-	-	+	-	-	+	B	<2	0
D-1	-	+	-	-	+	-	AH3	<2	80.5
D-2	-	-	+	-	-	+	B	<2	16.7
E-1	+	-	-	+	-	-	AH1	<2	0
E-2	-	-	+	-	-	+	B	<2	37.8

a ELISA用抗原ウイルス : H1, A/New Caledonia/20/99株、H3, A/Hiroshima/52/05株、
B, B/Malaysia/2506/04株 のウイルスワクチン抗原

b 感染細胞染色 : H1, A/New Caledonia/20/99株、H3, A/Hiroshima/52/05株、
B, B/Malaysia/2506/04株を感染させたMDCK細胞をエタノール
固定したものを用いた。

c HI活性及び中和活性 : 抗体が認識するH1, A/New Caledonia/20/99株、H3, A/Hiroshima/52/05株、
B, B/Malaysia/2506/04株のいずれかに対する活性を示した。

[0054] 各単クローン抗体産生ハイブリドーマ培養上清の、各インフルエンザウイルスに対する中和活性及びHI活性を調べた結果、B-1及びD-1の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ培養上清は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して高い中和活性を有することが確認され、B-3及びE-2の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ培養上清は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対してやや高い中和活性を有することが確認された。しかし、各培養上清について、HI活性はいずれも検出限界以下であった。

[0055] (実験例1-2) ハイブリドーマ培養上清の各ウイルスのHAに対するウェスタンブロッティングによる確認

A-1、A-2、B-1、B-2、B-3、C-1、D-1、D-2、E-1、又はE-2単クローン抗体産生のハイブリドーマ培養上清について、各ウイルスのHAに対してウェスタンブロットアッセイを行った。対象として、インフォームドコンセントにより患者より得た血漿を用いた。実施例1の2)で得た精製HA抗原をSDS-PAGE

で分画し、ポリフッ化ビリニデン (PVDF) 膜に転写した後、5% 脱脂粉乳のTBS-T溶液でブロッキングし、希釈していないハイブリドーマ培養上清あるいは、PBS-Tで2,000倍希釈した血漿で、室温、1時間インキュベートし、抗原抗体反応を行った。ブロッティングされた膜を、PBS-Tで数回洗浄し、続いてペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体を含む溶液内で、室温、1時間インキュベートした。現像はECL検出キット (Amersham Biosciences社製) によって行った。

[0056] その結果、D-1及びB-1単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのHAに対して結合活性を認め、A-1及びC-1単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザB型ウイルスのHAに対して結合活性を認めた (図1)。

[0057] (実験例1-3) ハイブリドーマ培養上清の各種インフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する染色活性

A-2、B-1、B-2、D-1ならびにA-1、B-3、C-1、D-2、E-2の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清について、以下に示すさまざまな年代のインフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する染色活性を調べた。染色試験は、J. Clin. Microbiol., 28, 1308-1313 (1990)に記載の方法に準じて行った。

[0058] 96ウェルマイクロプレート上で、実験例1の1) 中和活性測定の場合と同手法により、以下に示すヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ株又はB型ウイルス株に感染させたMDCK細胞を、PBS (pH7.4) で洗浄後、無水エタノールで室温下、10分間固定した。単クローン抗体を含むハイブリドーマ培養上清について、各々4倍段階希釈液を調製し、これらをウサギ抗ヒトIgG血清 (Jackson社製) の500倍希釈液、ヤギ抗ウサギIgG血清 (Cappel社製) の500倍希釈液、ペルオキシダーゼ-ウサギ抗ペルオキシダーゼ複合体 (Cappel社製) の1000倍希釈液で連続的に、40分間ずつ反応させ、PBSで洗浄した。最後にペルオキシダーゼ反応を、0.01 %の H_2O_2 と0.3 mg/mLの3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸のPBS溶液を用い、Graham、Karnovskyの方法、J. Histochem. Cytochem., 14, 291-302 (1966)で行った。染色された細胞は通常の光学顕微鏡で観察した。

[0059] A. インフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ株

Ai/68 : A/Aichi/2/68株(1968年分離)

Gz/89 : A/Guizhou/54/89株(1989年分離)

Wy/03 : A/Wyoming/3/03株(2003年分離)

NY/04 : A/New York/55/04株(2004年分離)

Hi/05 : A/Hiroshima/52/05株(2005年分離)

B. ヒトインフルエンザB型ウイルス株

Vi/87 : B/Victoria/2/87株(1987年分離)

Ma/04 : B/Malaysia/2506/04株(2004年分離)

Mi/93 : B/Mie/1/93株(1993年分離)

Sh/02 : B/Shanghai/261/02株(2002年分離)

[0060] [表2]

ハイブリドーマ培養上清の様々な年代のインフルエンザワクチン株
感染細胞に対する染色活性

HuMAb	A H3N2					B Victoria-group		B Yamagata-group	
	Ai/68	Gz/89	Wy/03	NY/04	Hi/05	Vi/87	Ma/04	Mi/93	Sh/02
A-2	>128	>128	>128	>128	>128				
B-1	128	>128	>128	>128	>128				
B-2	<2	>128	>128	128	>128				
D-1	<2	>128	>128	>128	>128				
A-1						>128	>128	>128	>128
B-3						32	8	32	32
C-1						128	128	>128	>128
D-2						<2	<2	<2	2
E-2						>128	128	128	>128

[0061] 表2の結果、A-2及びB-1の各単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ由来の各株に対して高い染色活性を示すことが確認され、A-1、C-1、E-2の各単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して高い染色活性を示すことが確認された。これにより、これらの単クローン抗体は、インフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ又はインフルエンザB型ウイルスに対して、約40年あるいは20年以上前より保存されている株に対して、染色活性を有することが確認された。

[0062] (実験例 1-4) ハイブリドーマ培養上清の各種インフルエンザウイルスワクチン株に対する中和活性

B-1、D-1ならびにE-2、B-3の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清について、実験例 3 に示すさまざまな年代のインフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する中和活性を調べた。中和活性の測定方法は、実験例 1 の手法に従った。

[0063] その結果、B-1単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザA型H3N2サブタイプ由来の各ウイルス株のうち、A/Aichi/2/68株(1968年分離)以降の各ウイルス株に対して中和活性を示し、D-1単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、A/Guizhou/54/89株(1989年分離)以降の各ウイルス株に対して中和活性を示した。E-2及びB-3の各単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザB型に対してB/Victoria/2/87株(1987年分離)以降の各ウイルス株に対して中和活性を示した。これにより、これらの単クローン抗体は、インフルエンザA型H3N2サブタイプ又はインフルエンザB型に対して、約40年あるいは20年以上前より保存されている株に対しても中和活性を示す抗体も確認された(図2)。

[0064] (実験例 1-5) 各抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の可変領域の塩基配列

上記の実験結果より、B-1、D-1及びE-2、B-3の各単クローン抗体(抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体)は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプあるいはヒトインフルエンザB型ウイルスに対して、40年あるいは20年近く前より保存されている領域を認識するものと考えられた。そこで、本実験例では、これらの単クローン抗体の可変領域をコードする塩基配列を調べた。

[0065] 1) total RNAの抽出及びヒト抗体(IgG)配列特異的RT-PCR

上記クローニングして得たハイブリドーマを、核酸抽出試薬(RNAiso™、タカラバイオ)中でホモジェナイズし、キットのプロトコールに順じてtotal RNAを精製した。

精製後のtotalRNAサンプルの一部と、以下のヒト抗体(IgG)遺伝子のH鎖、L鎖定常域配列特異的に設計された以下のRT プライマー又はdTプライマーを用いて、cDNA合成を行った。

Human_IgGH_RT_Primer : TGGAGGGCAGGTCACACGC (配列番号 1 3)

Human_IgGL_RT_Primer : TTGTGACGGGCGAGCTCAGGC (配列番号 1 4)

さらに、上記のプライマーの上流域に位置する以下のPCR プライマーを用いてRACE PCR反応を行った。

Human_IgGH_PCR_Primer : AAGGTGTGCAGCCGCTGGTC (配列番号 1 5)

Human_IgGL (κ) _PCR_Primer : GTGCTGCTGAGGCTGTAGGTG (配列番号 1 6)

Human IgL(λ) PCR Primer 1 : CCAYTGTCTTCTCCACRGTRCTCYC (配列番号 1 7)

Human IgL(λ) PCR Primer 2 : TCAGAGGAGGRYGGGAACAGAGTG (配列番号 1 8)

[0066] 2) 精製PCR産物

得られたPCR産物を3 %アガロースゲルで電気泳動を行い、得られたバンドよりPCR産物を精製した。精製PCR産物よりDNAの塩基配列を解析した。解析は、BigDye^(R) Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI社)を用い、ABI3730 Sequencer(ABI社)により行った。その結果、各単クローン抗体の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列について、以下の配列番号5～12に示す配列が確認された。さらに、各単クローン抗体の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列ならびに翻訳アミノ酸配列については、図3～10 (配列番号19～26)に示すとおりであった。

[0067] A-1. ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対するヒト型抗体 (B-1)

重鎖可変領域配列 : GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGCAGACTCC
GTGAAGGGCCTGTTACCATCTCCAGGGACAATCCAAGGACACAGTGTCTGCAAATGACCAGCCTG
AGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGGGAGGGTTATCGACCCTCAAAA

GATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA（配列番号5）。

[0068] 軽鎖可変領域配列：GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGTGGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCA
GGGAGAGCCCCTAGGCTCCTCATCTCTAGTGCGTCCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAGTTCAGTG
GCCGTGGAGAAGAGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCAGTTTACT
ACTGTCAACAGAGTTACAGTGACCTTCTCAGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA（配列
番号6）。

[0069] A-2. ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対するヒト型抗体
(D-1)

重鎖可変領域配列：CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGCCAGGGC
TTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTGACGACGGCATATCTGGAGATCAGCAGCCTA
AAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTACGATATTTTACTGGTTATTAT
TATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号7）。

[0070] 軽鎖可変領域配列：CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACA
GTCACACTCACTTGTGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAG
ACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCCTGATCGC
TTCTCTGGCTCCTTCCTTGGGAGCGACGCTGCCCTCACCATCACGGGGGGCCAGGCAGATGATGAGTCT
GATTATTTCTGTGTGCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTAGGT（配列番号8）。

[0071] B-1. ヒトインフルエンザB型ウイルスに対するヒト型抗体 (E-2)

重鎖可変領域配列：CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACC
CTGTCCCTCACCTGCGTTGTCTCTGGTGACTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGC
CAGCCCCCAGAGAGGGGCCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTACAACCCG
GCCCTCAAGAGTCGAACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCT
GTGACCGCCGCAGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCACCTGACTACAGTGAAGTACAAG
GTTGGGAAGGGTTATTTTACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号9）

）。

軽鎖可変領域配列：GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTAT
TGGTGTGAGCAGCATAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCACGGCTGGAGATTAAA（配列
番号 10）。

[0072] B-2. ヒトインフルエンザB型ウイルスに対するヒト型抗体（B-3）

重鎖可変領域配列：CAGGTGAAGTTGGTGCAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGAGGCGTCTGGATTGACTTCACTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTTGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGCGGACTCC
GTGAAGGGCCGATTACCGTGTCCAGAGACAATCCCAGAAGACAGTGTATCTGCAAATGAGTGGCCTG
AGACCCGAGGACACGGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTCCTTTCATGGGCATCTATGACTACGGC
ATGGACGCCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCGCCTCA（配列番号 11）。

軽鎖可変領域配列：CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG
GTCATCATCTCTTGTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCC
CCAGGGGCGGCCCCGAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTGAGGATGAGGCTGAT
TATTACTGTGAAGTTTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTGGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTC
CTACGT（配列番号 12）。

[0073] （実験例 1-6）ハイブリドーマ培養上清の各種インフルエンザウイルスワ
クチン株感染細胞に対する染色活性

A-2、B-1、B-2、D-1の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清並びにC43
抗体、F49抗体について、A/Hiroshima/52/05 (H3N2) 株感染細胞に対する染色
活性を調べた。染色試験は、通常の間接蛍光抗体法で行った。ここで、コン
トロールとして用いられたC43抗体は、ヒトインフルエンザA型ウイルスに対
する抗体であって、特に核タンパク (nucleoprotein: NP) に対するマウス単ク
ローン抗体である。また、F49抗体はヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サ

ブタイプに対する抗体であって、特にHAに対するマウス単クローン抗体である。

[0074] 8ウェルチャンバースライド上で、実験例1の1)中和活性測定の場合と同手法により、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプA/Hiroshima/52/05株を感染させたMDCK細胞をPBS(pH7.4)で洗浄した後、無水エタノールで室温下、10分間固定した。単クローン抗体を含むハイブリドーマ培養上清について、培養上清原液をフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate; FITC) 標識ウサギ抗ヒトIgG抗体(Jackson社製)の1000倍希釈液で連続的に60分間ずつ反応させ、PBSで洗浄した染色された細胞は蛍光顕微鏡で観察した。

[0075] その結果、A-1、B-1、B-2及びD-1単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザA型H3N2サブタイプのHAに対するマウス単クローン抗体F49と同様の染色パターンを示した(図11)。このことから、精製HA抗原を用いて得られたこれらの単クローン抗体は、インフルエンザA型H3N2サブタイプのHAに対する抗体であることが推察された。

[0076] (実験例1-7) ハイブリドーマ培養上清の各種インフルエンザウイルスワクチン株感染細胞に対する染色活性

B-3、E-2の各単クローン抗体産生ハイブリドーマ上清並びに9F3抗体、9E10抗体について、B/Malaysia/2506/04株感染細胞に対する染色活性を調べた。染色試験は、通常の間接蛍光抗体法で行った。ここで、コントロールとして用いられた9F3抗体は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する抗体であって、特にNPに対するマウス単クローン抗体である。また、9E10抗体はヒトインフルエンザB型ウイルスに対する抗体であって、特にHAに対するマウス単クローン抗体である。

[0077] 8ウェルチャンバースライド上で、実験例1の1)中和活性測定の場合と同手法により、ヒトインフルエンザB型ウイルスB/Malaysia/2506/04株を感染させたMDCK細胞を、PBS(pH7.4)で洗浄後、無水エタノールで室温下、10分間固定した。単クローン抗体を含むハイブリドーマ培養上清について、培養上清

原液をFITC標識ウサギ抗ヒトIgG抗体(Jackson社製)の1000倍希釈液で連続的に60分間ずつ反応させ、PBSで洗浄した染色された細胞は蛍光顕微鏡で観察した。

[0078] その結果、B-3、E-2単クローン抗体産生ハイブリドーマの培養上清は、ヒトインフルエンザB型のHAに対するマウス単クローン抗体9E10と同様の染色パターンを示した(図12)。このことから、精製HA抗原を用いて得られたこれらの単クローン抗体は、インフルエンザB型のHAに対する抗体であることが推察された。

[0079] (実験例1-8) エピトープマッピング

本実施例では、B-1及びD-1の各単クローン抗体についてエピトープ解析を行なった。

Hi/05 : A/Hiroshima/52/05株(2005年分離)のうち、シグナルペプチド部分を含むヘマグルチニンHA1領域を構成する345残基のアミノ酸から連続的に選択される15残基のペプチドであり、13残基がオーバーラップするように調整した計166セットのペプチドを合成した。上記166セットの各ペプチドをガラス表面に固定したペプチドアレイを調製し、ブロッキング用緩衝液(Pierce社Super Block^(R) TBS)でガラス表面をブロック後、該ブロッキング用緩衝液で10 μ g/mLに希釈した各単クローン抗体を反応させた。インキュベート後、0.1% Tween20を含むTBSで3回洗浄し、1 μ g/mLに希釈したCy5標識抗ヒトIgG(H+L)を反応させた。インキュベート後、上記トリス緩衝生理食塩水(TBS)で3回及び3 mM クエン酸緩衝液(SSC)で十分洗浄後乾燥させ、蛍光スキャナーで蛍光を測定し、単クローン抗体と反応するペプチドの検出を行った。コントロールとして単クローン抗体を添加せず、その他の操作は同様の実験も同時に行った。B-1又はD-1の各単クローン抗体と抗原抗体反応させ、オーバーラップペプチドスキャン法によりエピトープ解析を行なった。具体的にはRepliTopeTM Microarrays(JPT Peptide Technologies GmbH Germany)のプロトコールに準拠して実施した。

[0080] その結果、図13に示す部位において、中和活性が認められた。B-1及びD-

1単クローン抗体が反応したヘマグルチニンHA1の2箇所のペプチド鎖部分は、N末側の一残基を除いてH3N2ウイルス株5株で保存されており、変異は限定的であることが確認された。ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1を構成するアミノ酸配列のN末端から数えて227番目のアミノ酸はS（セリン）又はP（プロリン）であるが、係る相違は中和活性には影響していない。文献上（Karoline et al Virology J., 5, 40（2008））もこの部位はSかPである。同173番目の変異はN（アスパラギン）又はK（リシン）であり、1968年のA/Aichi以外Kであり、文献上はK又はE（グルタミン酸）である。また、229番目及び230番目において文献上（Underwood, Mol. Immunol., 21, 7（1987））、各々R（アルギニン）若しくはG（グリシン）、I（イソロイシン）若しくはV（バリン）のアミノ酸の相違があり、238番目及び239番目においてもGenBank登録配列では、各々K若しくはN、P若しくはRのアミノ酸の相違が認められる。

[0081] B-1及びD-1単クローン抗体が認識する2箇所のペプチド鎖部分は立体構造上近接していることから保存性の高い2鎖を立体構造的に認識していると推定され、ウイルスの変異に対する抵抗性が高いことが期待される（図14）。なお、B-1及びD-1単クローン抗体が認識するエピトープ部分は、公知のインフルエンザウイルス株を広く中和する抗体（F10抗体, J. Sui et al. Nature structural & molecular biology（2009））とはエピトープが異なり、中和できるウイルス型も異なっていると考えられる。

[0082] さらに、NIAID（National Institute of Allergy and Infectious Disease）にリンクするエピトープデータベース（<http://www.immuneepitope.org/doc//influenza/index.html>）で検索した結果、リニアエピトープに関してはB-1及びD-1単クローン抗体が認識する配列を含むより広い範囲をエピトープとするウサギポリクローナル抗体（No. 42, 63）が存在するものの、変異の多い部分を含んでいる。立体構造認識エピトープに関しては、229番目及び230番目が一部オーバーラップしているエピトープを認識するマウス単クローン抗体（No. 34）が存在するが、B-1及びD-1単クローン抗体が認識する部分に相当

するエピトープとは異なる。従ってB-1及びD-1単クローン抗体が認識するエピトープは新規であると考えられる（図15参照）。

[0083] 図15において、B-1及びD-1単クローン抗体の認識する部分を斜体で示した。横線は、上記データベースのTable 6又はB cell epitopeに記載の番号とエピトープ部分を示し、★印は同データベースでインフルエンザに対する立体構造認識抗体を記載したTable 9のNo. 34のエピトープ部分を示す。△は、上記5株以外の文献上又はPub Medに登録されていた株でアミノ酸置換が認められる部位を示す。

[0084] （実施例2）抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の産生

本実施例では、実施例1でクローニングしたハイブリドーマR1D8及びK4E7の培養について説明し、B-1単クローン抗体（以下B-1抗体）及びD-1単クローン抗体（以下D-1抗体）の産生について、説明する。

各ハイブリドーマは37°C、5%CO₂インキュベーター内で無血清培地(Hybridoma-SFM™; GIBCO)を用いて大量培養を行った。培養上清を回収し、Protein G Sepharose™ (Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow; GE Healthcare)カラムで抗体分子を吸着し、PBSで2回洗浄の後、0.17M、pH2.3のグリシン(Glycine)溶液で溶出した。溶出した抗体分子を、透析膜(Spectra/por[®])（分画分子量：6K～8K）；日本ジェネティクス）を用いてPBSで透析を行い、回収した。最終的な収量は、R1D8が0.249mg/L、K4E7が24.38mg/Lであった。

[0085] （実験例2-1）抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の効果（予防的效果）

本実験例では、実施例2において精製して得たB-1抗体又はD-1抗体を、マウスに予防的に投与したときの生存率及び体重変化に及ぼす効果を確認した。

[0086] 実施例2において精製して得たB-1抗体又はD-1抗体を、4週齢雌Balb/cマウス（1群5匹）に100μg/匹ずつ腹腔内投与し、24時間後にインフルエンザウイルスA/Guizhou/54/89xA/PR/8/34 (H3N2)株を1x10⁵FFU/匹ずつ経鼻接種した。各単クローン抗体の代わりにPBSを0.5mL/匹ずつ投与したものをコント

ロール群とした。A/Guizhou/54/89xA/PR/8/34 (H3N2) 株とは、A/PR/8/34 (H1N1) 株のHAとNAをA/Guizhou/54/89 (H3N2) 株に置換したリアソータントウイルスである。

[0087] コントロール群での生存率が0%であったのに対し、D-1抗体投与群では40%生存率、B-1抗体投与群では100%の生存率であった。特にB-1抗体で良好な効果が認められた(図16)。また、ウイルス感染後の体重変化については、B-1抗体投与群では軽度の体重減少であった。一方、D-1抗体投与群では、コントロール群と同程度の体重減少であった(図17)。図17では、各個体の体重変化を各プロットにおいて示している。

[0088] (実験例2-2) 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の効果(治療的効果)

本実験例では、実施例2において精製して得たB-1抗体又はD-1抗体を、マウスに治療的に投与したときの生存率及び体重変化に及ぼす効果を確認した。

[0089] インフルエンザウイルスA/Guizhou/54/89xA/PR/8/34 (H3N2) 株を、4週齢雌Balb/cマウス(1群5匹)に 1×10^5 FFU/匹ずつ経鼻接種し、24時間後に実施例2において精製して得たB-1抗体及びD-1抗体を $100 \mu\text{g}$ /匹ずつ腹腔内投与した。各単クローン抗体の代わりにPBSを 0.5mL /匹ずつ投与したものをコントロール群とした。

[0090] コントロール群での生存率が0%であったのに対し、D-1抗体投与群では40%の生存率、B-1抗体投与群では60%の生存率であった(図18)。また、ウイルス感染後の体重変化は、B-1抗体ではコントロール群に比べてやや軽度の体重減少であった。一方、D-1抗体では、コントロール群と同程度の体重減少であった(図19)。図19では、各個体の体重変化を各プロットにおいて示している。

産業上の利用可能性

[0091] 以上詳述したように、本発明の抗体のうちヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗体は、少なくともA/Hiroshima/52/05株(2005年分

離)のウイルス株に対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する抗体は、少なくともB/Malaysia/2506/04株(2004年分離)ウイルス株に対して中和活性を有する。さらに、本発明の抗体は、各年代のインフルエンザウイルスワクチン株、例えばA/Aichi/2/68株(1968年分離)、A/Guizhou/54/89株(1989年分離)、A/Wyoming/3/03株(2003年分離)及びA/New York/55/04株(2004年分離)などのヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプの各ウイルスに対して中和活性を有し、あるいはB/Victoria/2/87株(1987年分離)、B/Mie/1/93株(1993年分離)、B/Shanghai/261/02株(2002年分離)などのヒトインフルエンザB型ウイルスの各ウイルスに対して中和活性を有する。

[0092] つまり、本発明のヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗体は、20年近く前より保存されている領域に対して活性を有し、40年以上前より保存されている領域に対して活性を有するものも含まれる。また、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対する抗体は、20年以上前より保存されている領域に対して活性を有する。一方、本発明の抗体は、HI (hemagglutination inhibition、赤血球凝集抑制)活性は検出限界以下である。

[0093] また、本発明のヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対する抗体は、in vivoにおいて予防的又は治療的に投与した場合に、少なくともインフルエンザウイルスA/Guizhou/54/89xA/PR/8/34 (H3N2)株感染に対して生存率及び体重減少に対して効果を示す。

[0094] 本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体は、上記特性により、変異しやすいインフルエンザウイルスのうち、特に保存された領域に対して効果を示す抗体である。インフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタイプは、過去に世界的な流行を起こした亜型であり、近年ではアマンタジン等の抗インフルエンザウイルス作用を有する薬剤に対しても耐性株が増加しているが、今後新型のインフルエンザウイルスが発生・流行した場合であっても、本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体を含む組成物は、インフルエンザに対する治療効果が期待される。本発明の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体は、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ、又

はヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有することから、このような抗体を少なくとも1種、あるいは複数種含む組成物は、インフルエンザ治療薬や予防薬として、利用することが期待される。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1領域に結合する、又は、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。
- [請求項2] 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体が、ヒトインフルエンザA型ウイルスH1サブタイプ及び同H2サブタイプに対して中和活性を有さない、請求項1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。
- [請求項3] 抗インフルエンザ・ヒト型抗体であって、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプに対して中和活性を有する抗体が、少なくともA/Hiroshima/52/05株に対して中和活性を有し、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して中和活性を有する抗体が、少なくともB/Malaysia/2506/04株に対して中和活性を有する、請求項1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。
- [請求項4] 抗体が認識するエピトープが、ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプのヘマグルチニンHA1を構成するアミノ酸配列のうち、N末端から数えて173-181番目のアミノ酸配列を含む領域及び／又は227-239番目のアミノ酸配列を含む領域である、請求項1～3のいずれか1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。
- [請求項5] エピトープが、以下の配列番号1又は2に示すアミノ酸配列含むアミノ酸配列、あるいはこれらのアミノ酸配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項4に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：
- 1) NFDKLYIWG（配列番号1）；
 - 2) KFDKLYIWG（配列番号2）。

[請求項6] エピトープが、以下の配列番号 3 又は 4 に示すアミノ酸配列含むアミノ酸配列、あるいはこれらのアミノ酸配列のうち、1～2個のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項 4 に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：

- 1) SSRISIIYWTIVKP (配列番号 3) ；
- 2) PSRISIIYWTIVKP (配列番号 4) 。

[請求項7] 抗体の可変領域をコードするDNAの塩基配列が、以下の配列番号 5 ～ 12 に示すいずれかの塩基配列より選択される、あるいはこれらの塩基配列のうち、1～複数個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若しくは導入されたいずれかの塩基配列を含む、抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体：

- 1) GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCTGTTACCATCTCCAGGGACAATTCCAAGGACACAGTGTTTCTGCAATGACCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGGGAGGGTTATCGACCCTCAAAAGATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (配列番号 5) ；
- 2) GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCAACATCACTTGTGCGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAGAGCCCCTAGGCTCCTCATCTCTAGTGCGTCCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAGTTCAGTGGCCGTGGAGAAGAGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTCTGCAGTTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGACCTTCTCAGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (配列番号 6) ；
- 3) CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGC

CCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGG
AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTAC
GATATTTTGA CTGGTTATTATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCA (配列番号 7) ;

4) CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACAC
TCAC TTGTGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAG
ACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCC
TGATCGCTTCTCTGGCTCCTTCCTTGGGAGCGACGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGG
CAGATGATGAGTCTGATTATTTCTGTGTGCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTCGGC
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (配列番号 8) ;

5) CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCC
TCACCTGCGTTGTCTCTGGTGA CTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGC
CAGCCCCCAGAGAGGGGCCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTA
CAACCCGGCCCTCAAGAGTCGAACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCC
TGCAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCA
CCTGACTACAGTGA CTACAAGTTGGGAAGGGTTATTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAGCCCT
GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9) ;

6) GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCA
CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAG
GTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAG
ATTTTGCAGTTTATTGGTGT CAGCAGCATAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCA
CGGCTGGAGATTA A (配列番号 10) ;

7) CAGGTGAAGTTGGTGCAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGAGGCGTCTGGATTGACTTCA CTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTTGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGC
GGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTGTCCAGAGACAATCCCCAGAAGACAGTGTATCTGC
AAATGAGTGGCCTGAGACCCGAGGACACGGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTCCTTTC

ATGGGCATCTATGACTACGGCATGGACGCCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCCTC
A（配列番号 11）；

8）CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCATCA
TCTCTTGTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCC
CCAGGGGCGGCCCCGAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGA
CCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTG
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGAAGTTTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTGGGC
GGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTACGT（配列番号 12）。

[請求項8] 抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体の抗原が、ヒトインフル
エンザウイルスのA/Hiroshima/52/05株又はB/Malaysia/2506/04株で
ある、請求項7に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体
。

[請求項9] 抗体の可変領域をコードするDNAのうち、配列番号5～8に示す可変
領域を有する抗体が、ヒトインフルエンザA型ウイルスのH3N2サブタ
イプに対して中和活性を有する抗体であり、配列番号9～12に示す
可変領域を有する抗体が、ヒトインフルエンザB型ウイルスに対して
中和活性を有する抗体である、請求項7に記載の抗ヒトインフルエン
ザウイルス・ヒト型抗体。

[請求項10] 抗体の可変領域をコードするDNAのうち、配列番号5、7、9及び1
1に示すDNAが、重鎖可変領域をコードするDNAであり、配列番号6、
8、10及び12に示すDNAが、軽鎖可変領域をコードするDNAである
、請求項8に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

[請求項11] 抗体が、インタクト抗体である、請求項1～11のいずれか1に記載
の抗ヒトインフルエンザウイルス・ヒト型抗体。

[請求項12] 請求項1～11のいずれか1に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス
・ヒト型抗体の可変領域をコードするDNAであり、以下の配列番号5
～12に示すいずれかの塩基配列より選択される、あるいはこれらの
塩基配列のうち、1～複数個のヌクレオチドが置換、欠失、付加若し

くは導入されたいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む DNA :

1) GAGGAGAACCTGTTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTACGTTTAGTACTTACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGACAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCTCTATTAGCGGTAGTGGTGAAATTTCTATTACGC
AGACTCCGTGAAGGGCCTGTTACCATCTCCAGGGACAATTCCAAGGACACAGTGTTTCTGC
AAATGACCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCCGACGTTTGG
GAGGGTTATCGACCCTCAAAAGATGCTCTTCATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT
CTCTTCA (配列番号 5) ;

2) GACGTCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCA
CCATCACTTGTGGGCAAGTCAGAGCGTGAGCAATTATGTGAATTGGTATCAACAGAAGCCA
GGGAGAGCCCCTAGGCTCCTCATCTCTAGTGCGTCCAATTTGTGGGCTGGGGTCCCGCCAAG
TTCAGTGGCCGTGGAGAAGAGACAGACTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGA
TTCTGCAGTTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGACCTTCTCAGTTTCGGCGGAGGGACCA
AGGTGGAGATCAAA (配列番号 6) ;

3) CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGG
TTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCTCTTATTCTATATATTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAAGCTATGC
CCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTCGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGG
AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGATTAC
GATATTTTGA CTGGTTATTATTATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGT
CTCCTCA (配列番号 7) ;

4) CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCTGGAGGGACAGTCACAC
TCACTTGTGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTCCTAGTTACTACGCCAGCTGGTACCAGCAG
ACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAACACAAACACTCGCTCCTCTGGGGTCCC
TGATCGCTTCTCTGGCTCCTTCCTTGGGAGCGACGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGG
CAGATGATGAGTCTGATTATTTCTGTGTGCTGTATATGCCTAGTGGCGATTGGGTTTTCGGC
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT (配列番号 8) ;

5) CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCC
TCACCTGCGTTGTCTCTGGTGA CTCCATCAGCAGGGGTGGTTACTACTGGAGTTGGGTCCGC
CAGCCCCAGAGAGGGGCCTGGAGTGGATTGGGGACATCTATCACAGTGGGAGTACCAACTA
CAACCCGGCCCTCAAGAGTCGAACTACCATCTCAGTAGAGACGTCCAAGAACCAGTTCTCCC
TGCAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGCCTCCA
CCTGACTACAGTGA CTACAAGTTGGGAAGGGTTATTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAGCCCT
GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9) ;

6) GAAATTGTGTTGGCACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCA
CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGACCGTTGACACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATAAATGATGCATCCAAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAG
GTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCGGCCTAGAGCCTGAAG
ATTTTGCAGTTTATTGGTGT CAGCAGCATAGCAACTGGCCCCCACCTTCGGCCAAGGGTCA
CGGCTGGAGATTA A (配列番号 10) ;

7) CAGGTGAAGTTGGTGCAGTCTGGCGGAGGCGCAGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGAGGCGTCTGGATTGACTTCA CTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTTGAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAACGGAGGAAAAGCATATTATGC
GGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTGTCCAGAGACAATCCCCAGAAGACAGTGTATCTGC
AAATGAGTGGCCTGAGACCCGAGGACACGGCTACATATTACTGTGCGAGAGAGTTTCCTTTC
ATGGGCATCTATGACTACGGCATGGACGCCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCCTC
A (配列番号 11) ;

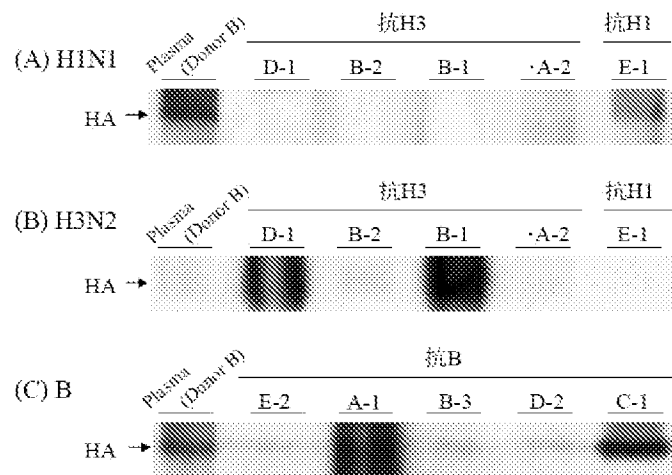
8) CAGTCTGTGCTGGCTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCATCA
TCTCTTGTCTGGAACCTCCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTCAACTGGTACCAGCACCCC
CCAGGGGCGGCCCCGAGACTCCTCATCTATACTACCGATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGA
CCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAATCTG
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGAAGTTTGGGATGACAGCCTGACTCGTCCGGTGTTCGGC
GGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTACGT (配列番号 12) 。

[請求項13]

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 に記載の抗ヒトインフルエンザウイルス
・ ヒト型抗体を含む組成物。

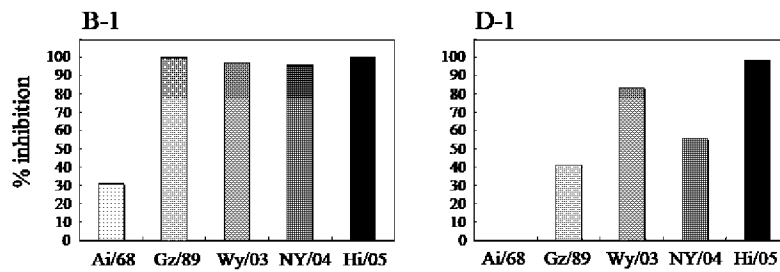
[図1]

ハイブリドーマ培養上清のウエスタンブロットアッセイ

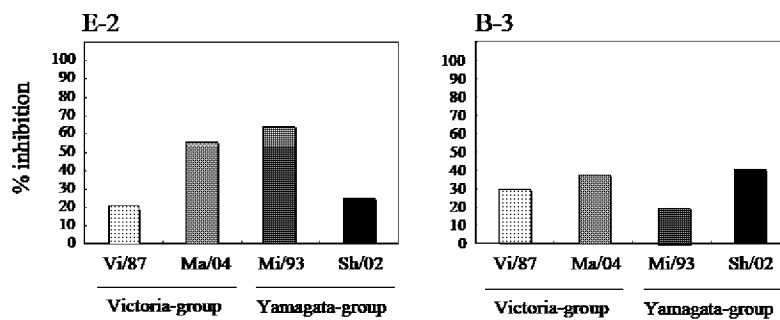


[図2]

A) AH3N2



B) B



[図3]

● B-1 (H3 認識)

【H 鎖】可変領域塩基配列 (配列番号 19)

* 下線部は配列表の配列番号5の可変領域を示す。

```

10   20   30   40   50   60   70   80   90   100  110  120
CTAATACGACTCAGTATAGGGGAAGCAGTGTGTATTAAGCCAGACTAGCGGGGAGCTCTGAGAGAGAGAGCCAGCCCTGGGAATTTTCAGGTETTTTCATTGGTGATCAGGACTGAAACAGA

130   140   150   160   170   180   190   200   210   220   230   240
GAGAACTCAGCATGGAGTTTGGGCTGAGTTGCGCTTTTCTGTGGCTATTTAAAGCTGTCCAGCTGTGAGGAGAACTCTTTCGAGCTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCGGGGGGTCC
  M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C E E N L L Q S G G L V Q P G G S L
      シグナル                      N 末

250   260   270   280   290   300   310   320   330   340   350   360
TGAGACTCTCTCTGTGCAGGCTCTGGATTCAAGTTTACTACTTAAGCCATGACCTGGGTCCGGCCAGGCTCCAGGACAGGGGCTGGAGTGGTCTCTCTATTAGCGGTAGTGTGAATTT
  R L S C A G S G F T F S T V A M T W V R Q A P G Q G L E W V S S I S G S G E I S
      ← CDR1 →                      ← CDR2 →

370   380   390   400   410   420   430   440   450   460   470   480
CCTATTAGCGAGACTCGGTGAAGGGCTGTTCACCATCTCCAGGGACAATTCCAGGACACAGTGTCTTCGCAATGACAGCTGAGAGCGGAAGACAGCGCGCTATATTACTGTGCGA
  Y Y A D S V K G L F T I S R D N S K D T V F L Q M T S L R A E D T A V Y Y C A K

490   500   510   520   530   540   550   560   570   580   590   600
AATCCGACGTTTGGGAGGTTTATCGACCCCTCAAAAGATGCTCTTCATATGTGGGGCAAGGACAAATGCTGTCACCGCTCTTCAGCCCTCCAGCCAGGGCCCATGGGTCTTTCCCGCTGGCAC
  S D V W E G Y R P S K D A L H M W G Q G T M V T V S S A S T K G P S V F P L A P
      CDR3 →                      CHI

610   620   630   640   650   660   670   680   690   700
CCTCTCCAMGAGACACTCTGTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGTGCTCAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGGAGCTCAGGCGGCT
  S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A
```

*** 下線部は配列表の配列番号6の可変領域を示す。

[illegible]

[図5]

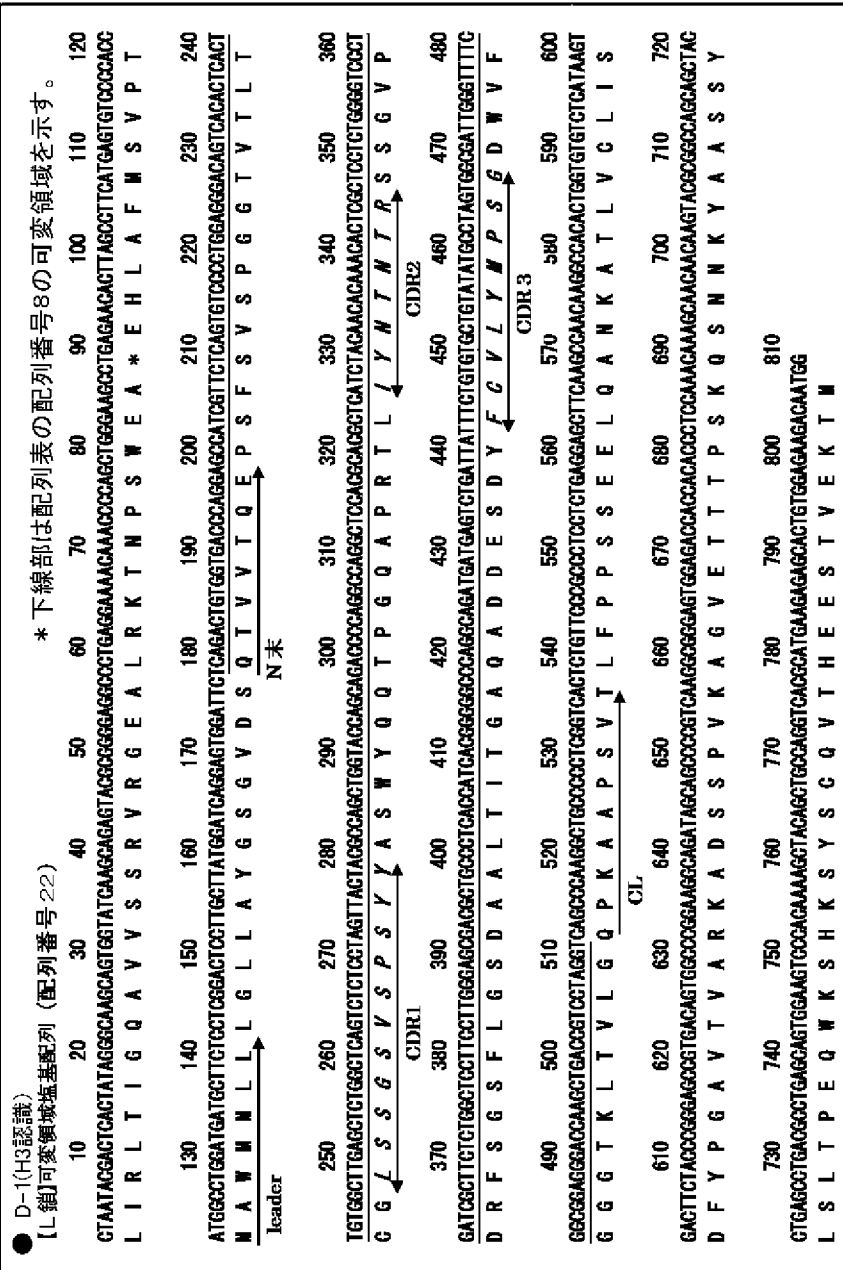
● D-1 (H3認識)

【H鎖】可変領域塩基配列 (配列番号 21)

* 下線部は配列表の配列番号7の可変領域を示す。

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
CTAATACGACTCACTATAGGCGCAGCAGCTGTTATCAAGCGAGTAGCGGGGACCCACACACACACCCCTCTTAAGACAGAGCCCTTAGACACAGCTCCACACCATGGACTGGACCT												M D W T W
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
GGAGATCCTCTTCTTGGCGCAGCAACAGGTGCCACTCCACAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGTCTGAGTTGAAGAGCCCTGAGGCTCAGTGAAGTTTCTTGCAGGCTTCTG												
R I L F L V A A A T G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G												
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
GATACACCTTCACCTTTATTCTATATATTGGTGGCAGAGGCCCTGGACAGGGCTTCAGTGGATGGATCAACACCAACACTGGGAACCCAGCTATGCCAGGGCTTCACAG												
Y T F T S V S I Y W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T N T G N P S Y A Q G F T G												CDR2
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	
GACGGTTTGTCTTCTCGACACCTCTGTGACAGCGCATATCTGGAGATCAGCAGCCTAAGGCTGAGGACACTGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAGATTAGGATATTTTGA												
R F V F S F D T S V S T A Y L E I S S L K A E D T A V Y Y C A R E G D Y D I L T												CDR3
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
CTGGTTATTATTACTTGTGACTGTGGGCGCAGGGAACCTGTGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCCAMGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCAGCCTCTGGGG												
G Y Y Y Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G												
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700			
GCACAGGGGCCCTGGGCTGCCTGTCAAGGACTACTTCCCGGACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGGCCCTGACCGGGCGGTGCACACCTT												
T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T												

[図6]



610 620 630 640 650
 ACGGCTCCAAATGGGTAATCCAGCAGAGTGTCACAGCAGCAGCAGCAGCAG
 A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S

[図9]

●B-3 (B認識)

【H鎖】可変領域 (配列番号25) * 下線部は配列表の配列番号11の可変領域を示す

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
AAGCAGTGTATCAAGCAGAGTACGCGGAGCTCTGGAGAGAGCCAGCAGTACAGAGTGGGGTGTTCATTCGGTGAACAGCAGCTGAACAGAGGACTCAACATGAGTTTG	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
A V V S T Q S T R G A L G E E P S T R S R R C F H S V N S T E H R G L T M E F G	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340
GGCTGATCTGGATTTCCTGCTCTTTTAGCAGGTGCCAGCTGTGAGGTGAAGTTGCTGGCAGTCTGGCGAGCGGAGTCCAGCTGGGAGGTCCCTGAGAGCTCTCTGTGAGGCGT	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450
L I W I F L V A L L G A Q C Q V K L V Q S G G G A V P G R S L R L S C E A S	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670
	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780

CTGGATTTCGACTTCAGTGTGTATGACATCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGAGCAAGGGGCTTCAGTGGGTGGCATCTATTTGGCATAAAGGAGGAAGCATATATTATGGGAGCTCCGTTGA
 G F D F T V Y D I H W V R Q A P G K G L E W V A S I W H N G C G K A Y Y A D S V K

AGGGCGGATTTCAGCGTCTCCAGAGACAATCCCGCAGAGACAGTGTATCTGCAATGAGTGGCTGAGACCCGAGGACACGGCTACATATTACTGTGGAGAGAGATTTCCTTCATGGCA
 G R F T V S R D N P Q K T V Y L Q M S G L R P E D T A T Y Y C A R E F F F M G I

TCTATGACTACGGCATGAGCGCTGGGCCAAGGGACACGGCTCAGCGTCCAGCTCCAGCTCCAGAGGCGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCAACCTCTCCAGAGGAGCTCTGGAGCA
 Y D Y G M D A W G Q G T T V T V A S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T

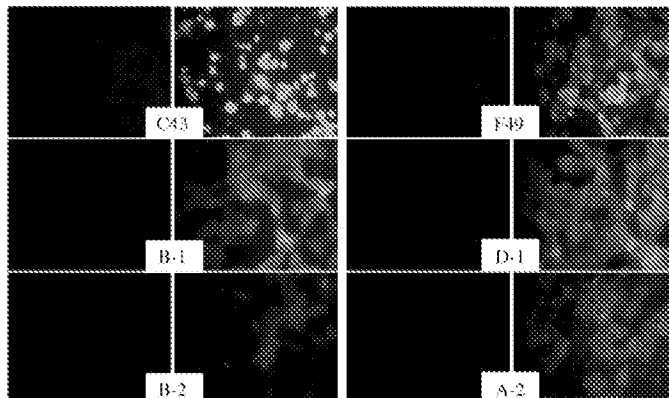
CAGCGCGCTGGGCTGCTGTGTCAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTGCTGGCACTCCAGGCGCCCTGACACGCGGCTGCACACCTT
 A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T

● B-3 (B級)

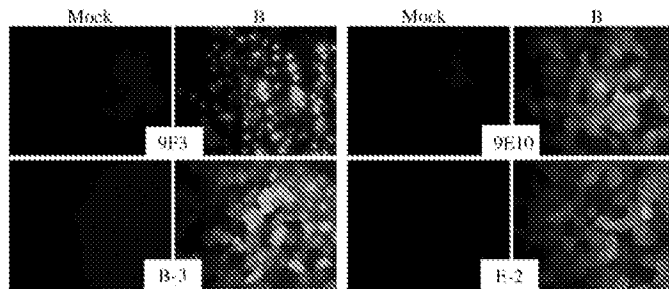
【L鎖】可変領域塩基配列 (配列番号26) * 下線部は配列表の配列番号12の可変領域を示す。

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 CTAAACGAGCTCAGTATAGGCGACGAGTGGTATCAACGCGAGAGTACGCGGGGAGCTTCAGCTGTGGGTAGAGAGACAGAGACTCAGGAG
 * Y D S L * G K Q W Y Q R R V R G K Q W Y Q R R V R G E L Q L W V E K T G L R T
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 ACTCTCCAGCATGAGCAGGTTCCCTCTGCTCAGCGTCCCTCAGCTGCTGAGAGTGCCTGGGCGCAGTCTGTGCTGAGCGACCGTTCAGGCGTCTGGGACGCCCGGGCAGAGGCT
 L S S M A S F P L L L T L L T L T H C A G S W A Q S V L A Q P P S A S G T P G Q R V
 leader N末
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GATCATCTGTGTTGTTGGAAGCTCCTCCAGACATCGGCGGTAATGTGTGAAGTGGTACGAGACACCCCGCAGGGGGGGCCCGGAGACTGCTCATCTATACTACCGATCAGGCGACCGTCAAGG
 I I S G S T S S N I G G M S V N W Y Q H P P G A A P R L L I Y T T D Q R P S G
 CDR1 CDR2
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 GGTCCCTGACCGCATCTCTGGCTCCGATGAGTGGGCTCCCATCTGAGGATGAGCTGATTATTACTGTGAAGTTTGGGATGGACAGCGTGAGCTGG
 V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L Q S E D E A D Y Y C E V W D D S L T R
 CDR3
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TCGGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGTTGACCGTCTAGCTCAGCGCGAGGCTGGCGCGCTGGGTCACTGTGTTCCGCGCGCTGCTGTGAGGAGGTTCAAGCGCACAGGCGCACACTGGTGTG
 P V F G G G T K L T V L R Q P K A A P S V T L F P P S E E L Q A N K A T L V C
 CL1
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 TCTCATAGTGACTTCTACCGGCGGAGCGGCTGACAGTGGCGCTGCAAGGCGAGATAGCGCGCGCTCAGAGCGGCGAGTGGAGAGACCGACCGCTCCGAACAAAGGCAACACAGTACGCGGCG
 L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T P S K Q S N N K Y A A
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820
 GAGCAGCTACCTGAGCGCTGAGCGCTGAGGAGTGGGAAGTCCGACAAAGCTACAGCTGGCAGGCTCAGCGATGAAGAGAGCAGCTGTGGAGAGAGCAATGG
 S S Y L S L T P E Q W K S H K S Y S G Q V T H E E S T V E K T M

Mock	H0/05 (H3)	Mock	H0/05 (H3)
1	0.00	1	0.00
2	0.00	2	0.00
3	0.00	3	0.00
4	0.00	4	0.00
5	0.00	5	0.00
6	0.00	6	0.00
7	0.00	7	0.00
8	0.00	8	0.00
9	0.00	9	0.00
10	0.00	10	0.00
11	0.00	11	0.00
12	0.00	12	0.00
13	0.00	13	0.00
14	0.00	14	0.00
15	0.00	15	0.00
16	0.00	16	0.00
17	0.00	17	0.00
18	0.00	18	0.00
19	0.00	19	0.00
20	0.00	20	0.00
21	0.00	21	0.00
22	0.00	22	0.00
23	0.00	23	0.00
24	0.00	24	0.00
25	0.00	25	0.00
26	0.00	26	0.00
27	0.00	27	0.00
28	0.00	28	0.00
29	0.00	29	0.00
30	0.00	30	0.00
31	0.00	31	0.00
32	0.00	32	0.00
33	0.00	33	0.00
34	0.00	34	0.00
35	0.00	35	0.00
36	0.00	36	0.00
37	0.00	37	0.00
38	0.00	38	0.00
39	0.00	39	0.00
40	0.00	40	0.00
41	0.00	41	0.00
42	0.00	42	0.00
43	0.00	43	0.00
44	0.00	44	0.00
45	0.00	45	0.00
46	0.00	46	0.00
47	0.00	47	0.00
48	0.00	48	0.00
49	0.00	49	0.00
50	0.00	50	0.00
51	0.00	51	0.00
52	0.00	52	0.00
53	0.00	53	0.00
54	0.00	54	0.00
55	0.00	55	0.00
56	0.00	56	0.00
57	0.00	57	0.00
58	0.00	58	0.00
59	0.00	59	0.00
60	0.00	60	0.00
61	0.00	61	0.00
62	0.00	62	0.00
63	0.00	63	0.00
64	0.00	64	0.00
65	0.00	65	0.00
66	0.00	66	0.00
67	0.00	67	0.00
68	0.00	68	0.00
69	0.00	69	0.00
70	0.00	70	0.00
71	0.00	71	0.00
72	0.00	72	0.00
73	0.00	73	0.00
74	0.00	74	0.00
75	0.00	75	0.00
76	0.00	76	0.00
77	0.00	77	0.00
78	0.00	78	0.00
79	0.00	79	0.00
80	0.00	80	0.00
81	0.00	81	0.00
82	0.00	82	0.00
83	0.00	83	0.00
84	0.00	84	0.00
85	0.00	85	0.00
86	0.00	86	0.00
87	0.00	87	0.00
88	0.00	88	0.00
89	0.00	89	0.00
90	0.00	90	0.00
91	0.00	91	0.00
92	0.00	92	0.00
93	0.00	93	0.00
94	0.00	94	0.00
95			



[図12]

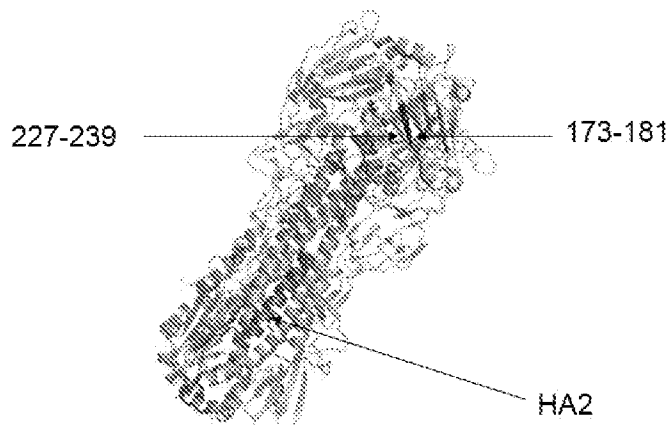


[図13]

	167	173 - 181										187								
AI/68	T	M	P	N	N	D	N	F	D	K	L	I	W	G	V	H	H	P	S	T
Gz/89	.	.	.	.	.	G	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I
Wy/03	.	.	.	.	.	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V
NY/04	.	.	.	.	.	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V
Hi/05	.	.	.	.	.	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G

	225	227 - 239										241					
AI/68	G	L	S	S	R	I	S	I	Y	W	T	I	V	K	P	G	D
Gz/89	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Wy/03	D	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NY/04	D	I	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hi/05	N	I	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

[図14]



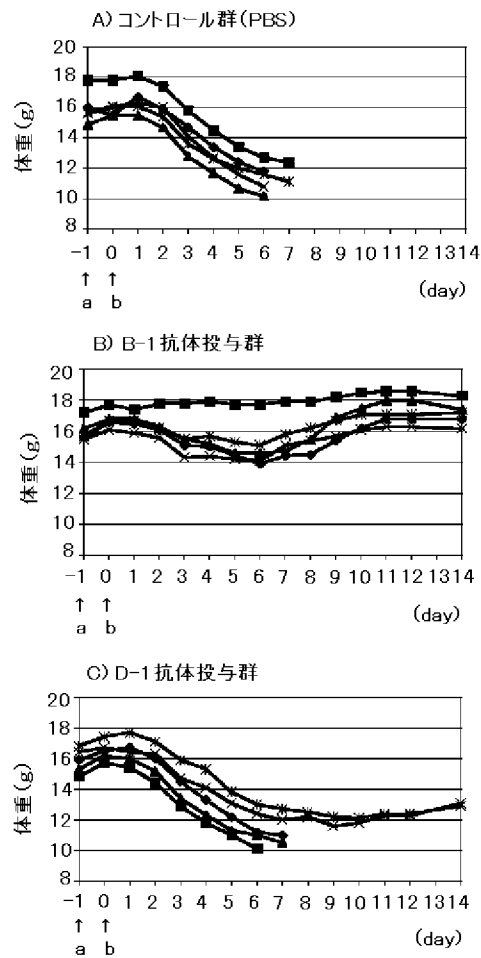
B-1, D-1単クローン抗体が認識するペプチド鎖の
ヒトインフルエンザA型ウイルスH3N2サブタイプ
のHA1領域の立体構造上の配置

B-1,D-1が認識するペプチド鎖とデータベースにあるエピソードの対比

No. 3	_____	No. 21	_____	No. 42	_____
No. 4	_____	No. 27	_____	No. 63	_____
		No. 51	_____		
		No. 55, 56	_____		
		No. 1498827	_____		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
			No. 1498931		
			No. 1004537		
			No. 1498827		
			No. 1498828		
			No. 1498829		
			No. 1003627		
			No. 1003795		
	</				

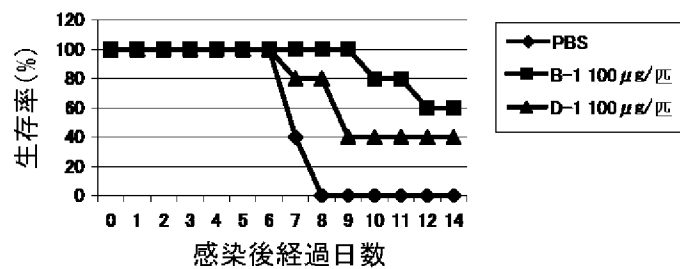
感染後経過日数	PBS (生存率 %)	B-1 100 μ g/匹 (生存率 %)	D-1 100 μ g/匹 (生存率 %)
0	100	100	100
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100
6	100	100	100
7	100	100	100
8	0	0	40
9	0	0	40
10	0	0	40
11	0	0	40
12	0	0	40
13	0	0	40
14	0	0	40

[図17]

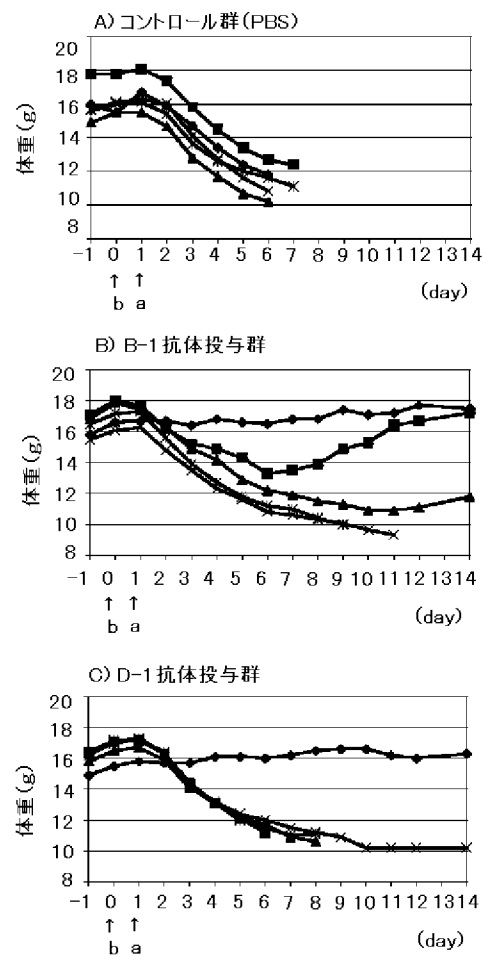


a: 抗体又はPBS投与
b: インフルエンザウイルス投与
各プロットは、個体ごとの体重変化を示す。

[図18]



[図19]



a: 抗体又はPBS投与
 b: インフルエンザウイルス投与
 各プロットは、個体ごとの体重変化を示す。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/007159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12N15/00, A61K39/395, A61P31/16, C07K16/10, C12N15/09

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 practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHIBUYA T., et al., Identification of a human monoclonal Fab with neutralizing activity against H3N2 influenza A strain from a newly constructed human Fab library., Microbiol. Immunol., 2008.03, vol. 52, no. 3, p. 162-170, entire text	1-13
Y	ATASSI M. Z. and WEBSTER R. G., Localization synthesis and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, vol. 80, no. 3, p. 840-844, entire text	1-13

☒ 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 application or patent 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
22 January, 2010 (22.01.10)

Date of mailing of the international search report
02 February, 2010 (02.02.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/007159

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KUBOTA-KOKETSU R., et al., Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009.09.11 (Epub. 2009.07.04), vol. 387, no.1, p. 180-185	1-13
A	GREEN N., et al., Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin., Cell, 1982, vol. 28, p. 477-487	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, A61K39/395, A61P31/16, C07K16/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SHIBUYA T., et al., Identification of a human monoclonal Fab with neutralizing activity against H3N2 influenza A strain from a newly constructed human Fab library., Microbiol. Immunol., 2008.03, vol. 52, no. 3, p. 162-170, 全文	1-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

中野 あい

4 B

3 7 5 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ATASSI M. Z. and WEBSTER R. G., Localization synthesis and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, vol. 80, no. 3, p. 840-844, 全文	1-13
PX	KUBOTA-KOKETSU R., et al., Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009.09.11(Epub. 2009.07.04), vol. 387, no. 1, p. 180-185	1-13
A	GREEN N., et al., Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin., Cell, 1982, vol. 28, p. 477-487	1-13