

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-518936

(P2008-518936A)

(43) 公表日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 S	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/12	
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 205 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-539201 (P2007-539201)	(71) 出願人	504333972
(86) (22) 出願日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		メディミュン、インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月29日 (2007.6.29)		アメリカ合衆国 20878 メリーラン
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/039091		ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
(87) 国際公開番号	W02006/050166		ュン ウエイ
(87) 国際公開日	平成18年5月11日 (2006.5.11)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	60/623, 821		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成16年10月29日 (2004.10.29)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	60/675, 724	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成17年4月27日 (2005.4.27)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロソンスキー、ジュネヴィーヴ
(31) 優先権主張番号	60/681, 233		アメリカ合衆国 21131 メリーラン
(32) 優先日	平成17年5月13日 (2005.5.13)		ド州、フェニックス、ブレンヘイム ファ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ーム レーン 57

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RSV感染症および関連状態を予防および治療する方法

## (57) 【要約】

本発明は、対象における呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいは上気道RSV感染症(URI)および/または下気道RSV感染症(LRI))、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/または反応性気道疾患(RAD))を予防、管理、治療および/または改善するための方法であって、1種または複数のRSV抗原に、高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーで免疫特異的に結合する1種または複数の抗体の有効量を前記のヒトに投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、1種または複数の抗体が、修飾したIgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む結果、in vivo血清半減期が長くなる。特定の実施形態では、本発明の方法は、1種または複数のRSV抗原に、少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の結合速度( $k_{on}$ )および $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満の解離速度( $k_{off}$ )で免疫特異的に結合する1種または複数の修飾抗体の有効量を対象に投与することを含む。

## A

DIQNTQSPST LEASVGDRTV ITKCOLSVGYNH WYQOKPG 40  
CDR L1

KAPKLIF DTSLAS GVPGR FGGSGGTET TLTMSLOPD 80  
CDR L2

DFATYYC FGGSGYPT FGGSTLEK 108  
CDR L3

## B

QVTLRESGPA LVKPTQTLT TCTFSGFSL TSGMSVG WIR 40  
CDR H1

QPFQKALEWL A DWWDDKKDYNNFLKS RLT ISKDTSKNOV 80  
CDR H2

VLKVTNRDPA DTATYYCAR SMTHWYFDY W QASTTVTVSS 120  
CDR H3

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の結合速度( $k_{on}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 2】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満の解離速度( $k_{off}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

10

## 【請求項 3】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、1000pM未満の解離定数( $K_d$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 4】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $10^9 \text{M}^{-1}$ の結合定数( $K_a$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 5】

上気道から下気道へのRSV感染症の進行を予防する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の結合速度( $k_{on}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

20

## 【請求項 6】

上気道から下気道へのRSV感染症の進行を予防する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満の解離速度( $k_{off}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 7】

上気道から下気道へのRSV感染症の進行を予防する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、1000pM未満の解離定数( $K_d$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

30

## 【請求項 8】

上気道から下気道へのRSV感染症の進行を予防する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $10^9 \text{M}^{-1}$ の結合定数( $K_a$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 9】

RSV疾患またはその症状を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の結合速度( $k_{on}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 10】

RSV疾患またはその症状を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満の解離速度( $k_{off}$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

40

## 【請求項 11】

RSV疾患またはその症状を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、1000pM未満の解離定数( $K_d$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

## 【請求項 12】

RSV疾患またはその症状を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、RSV抗原に免疫特異的に結合し、少なくとも $10^9 \text{M}^{-1}$ の結合定数( $K_a$ )を有する抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

50

## 【請求項 13】

RSV抗原がRSV F抗原である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

抗体の $k_{on}$ が少なくとも $4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 15】

抗体の $k_{on}$ が少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ である、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

抗体の $k_{on}$ が少なくとも $7.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ である、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 17】

抗体の $k_{off}$ が少なくとも $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ である、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

$K_d$ が50pMである、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 19】

抗体の $K_a$ が少なくとも約 $10^{10} M^{-1}$ である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 20】

抗体の $K_a$ が少なくとも約 $10^{11} M^{-1}$ である、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 21】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、前記方法は、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体の有効量を患者に投与することを含み、前記抗体が、

(1) 配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖可変(VH)部、

(2) 配列番号254のアミノ酸配列を有するVH鎖、

(3) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、

(4) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、

(5) 配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、

(6) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、

(7) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、

(8) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、または

(9) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3

を含む(a) 重鎖、ならびに/あるいは

(1) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)部、

(2) 配列番号255のアミノ酸配列を有するVL鎖、

(3) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、

(4) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列、

(5) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3、または

(6) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3

を含む(b) 軽鎖

を含んでいる方法。

## 【請求項 22】

上気道から下気道へのRSV感染症の進行を予防する方法であって、前記方法は、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体の有効量を患者に投与することを含み、前記抗体が、

- (1) 配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖可変(VH)部、
  - (2) 配列番号254のアミノ酸配列を有するVH鎖、
  - (3) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、
  - (4) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、
  - (5) 配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、
  - (6) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、
  - (7) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、
  - (8) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、または
  - (9) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む(a) 重鎖、ならびに/あるいは
  - (1) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)部、
  - (2) 配列番号255のアミノ酸配列を有するVL鎖、
  - (3) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、
  - (4) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列、
  - (5) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3、または
  - (6) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む(b) 軽鎖
- を含んでいる方法。
- 【請求項 23】
- RSV疾患またはその症状を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、前記方法は、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体の有効量を患者に投与することを含み、前記抗体が、
- (1) 配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖可変(VH)部、
  - (2) 配列番号254のアミノ酸配列を有するVH鎖、
  - (3) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、
  - (4) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、
  - (5) 配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、
  - (6) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列、
  - (7) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、
  - (8) 配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3、または
  - (9) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2配列および配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む(a) 重鎖、ならびに/あるいは
  - (1) 配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)部、
  - (2) 配列番号255のアミノ酸配列を有するVL鎖、
  - (3) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、
  - (4) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列、
  - (5) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3、または

(6) 配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2配列および配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3

を含む(b) 軽鎖  
を含んでいる方法。

【請求項 2 4】

上気道RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の有効量を哺乳動物に投与することを含む方法。

10

【請求項 2 5】

前記抗体が、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のCDRのアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記抗体が、配列番号1、配列番号2および配列番号3を含む重鎖と、配列番号4、配列番号5および配列番号6を含む軽鎖とを含んでいない、請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

CDRが重鎖可変(VH)CDRである、請求項26に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

CDRが軽鎖可変(VL)CDRである、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記抗体が、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH CDRのアミノ酸配列を有するVH CDRと、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVL CDRのアミノ酸配列を有するVL CDRとを含む、あるいはそれらの組合せを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 0】

前記抗体が、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH部のアミノ酸配列を有するVH部を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記抗体が、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVL部のアミノ酸配列を有するVL部を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

前記抗体が、抗体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVL部のアミノ酸配列を有するVL部を更に含む、請求項30に記載の方法。

50

## 【請求項 3 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

前記抗体がFab断片である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

前記抗体が、図13Aに示すVH部のVHフレームワーク領域アミノ酸配列と、表2および/または表3A～3Cに示す1つまたは複数のVH CDRアミノ酸配列とを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 3 7】

前記抗体が、図13Bに示すVL部のVLフレームワーク領域アミノ酸配列と、表2および/または表3D～3Fに示す1つまたは複数のVL CDRアミノ酸配列とを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記抗体が、図1Bに示すVH部のVHフレームワーク領域アミノ酸配列と、表2および/または表3A～3Cに示す1つまたは複数のVH CDRアミノ酸配列とを含み、前記抗体がパリビズマブではない、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記抗体が、図1Aに示すVL部のVLフレームワーク領域アミノ酸配列と、表2および/または表3D～3Fに示す1つまたは複数のVL CDRアミノ酸配列とを含み、前記抗体がパリビズマブではない、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 4 0】

前記抗体がIgG定常部を含む、請求項1～39のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

IgG定常部がIgG1定常部である、請求項40に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版に記載のEU指標に従って付番した場合、IgG1定常部は、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸を含む、請求項41に記載の方法。

30

## 【請求項 4 3】

前記抗体の生体内半減期は、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸がないIgG1定常部を含む同じ抗体と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、または約10倍延長されている、請求項42に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記抗体は、第2の抗体と比較して、ヒト組織試料との交差反応性が減少しているか全くない、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

前記第2の抗体がA4B4抗体、または前記第2の抗体が、RSV以外の抗原に対するヒトIgG1モノクローナル抗体である、請求項44に記載の方法。

40

## 【請求項 4 6】

前記組織試料が皮膚または肺である、請求項45に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

前記抗体が治療剤と複合している、請求項1～46のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

前記有効量が、約30mg/kg、約25mg/kg、約20mg/kg、約15mg/kg、約10mg/kg、約5mg/kg、約3mg/kg、約1.5mg/kg、約1mg/kg、約0.75mg/kg、約0.5mg/kg、約0.25mg/kg、約0.1mg/kg、約0.05mg/kg、または約0.025mg/kgである、請求項1～47のいずれか一項に記載の方法

50

。

【請求項 49】

前記有効量が約15mg/kg未満である、請求項48に記載の方法。

【請求項 50】

前記有効量が、約10mg/kg、約5mg/kg、約3mg/kg、または約1.5mg/kgである、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

前記有効量が、約1mg/kg、約0.75mg/kg、約0.5mg/kg、約0.25mg/kg、約0.1mg/kg、約0.05mg/kg、または約0.025mg/kgである、請求項49に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体が噴霧器または吸入器により投与される、請求項1～51のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 53】

前記抗体が、鼻腔内送達、筋肉内送達、皮内送達、腹腔内送達、静脈内送達、皮下送達、経口送達、肺送達、またはそれらの組合せにより患者に投与される、請求項1～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

前記抗体が、RSV流行期中に5回、4回、3回、2回、または1回投与される、請求項1～53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記抗体が、RSV流行期前の3カ月以内、2カ月以内、または1カ月以内に3回、2回、または1回患者に投与される、請求項1～53のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 56】

前記抗体が、鼻腔内送達により患者に投与され、前記有効量が、約15mg/kg、約10mg/kg、約5mg/kg、約3mg/kg、約1.5mg/kg、約1mg/kg、約0.75mg/kg、約0.5mg/kg、約0.25mg/kg、約0.1mg/kg、約0.05mg/kg、および0.025mg/kgからなる群から選択される、請求項1～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記患者は、1日当たり1回、2回、3回、4回、5回または6回抗体を投与される、請求項56に記載の方法。

30

【請求項 58】

前記患者は、1日当たり1回、2回、3回、4回、5回または6回で、2日、3日、4日、5日、6日、7日または14日の間抗体を投与される、請求項56に記載の方法。

【請求項 59】

前記哺乳動物がヒトである、請求項1～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記ヒトが、骨髄移植を受けたヒト、高齢のヒト、あるいは嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症または後天性免疫不全症に罹っているヒトである、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

前記ヒトが乳幼児である、請求項59に記載の方法。

40

【請求項 62】

前記ヒトが、未熟児生まれの乳幼児か、またはRSV感染症で入院の危険性がある、請求項59に記載の方法。

【請求項 63】

抗ウイルス剤の有効量を投与することを更に含む、請求項1～62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

抗IL-9抗体またはEphA2/エフリンA1モジュレーターの有効量を投与することを更に含む、請求項1～63のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 6 5】

呼吸状態が、喘息、喘鳴、反応性気道疾患またはそれらの組合せである、請求項1～4のいずれか一項または請求項21に記載の方法

## 【請求項 6 6】

配列番号48のアミノ酸配列を有するVH部と、配列番号11のアミノ酸配列を有するVL部を含む抗体。

## 【請求項 6 7】

前記抗体がA4B4L1FR-S28R (MEDI-524)である、請求項66に記載の抗体。

## 【請求項 6 8】

ヒトIgG1定常部を含む、請求項66に記載の抗体。

10

## 【請求項 6 9】

Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版に記載のEU指標に従って付番した場合、前記IgG1定常部が、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸を含む、請求項68に記載の抗体。

## 【請求項 7 0】

前記抗体がMEDI-524-YTEである、請求項69に記載の抗体。

## 【請求項 7 1】

請求項66～70のいずれか一項に記載の抗体を含む医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、"Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for the Prophylaxis and Treatment of Upper Respiratory Tract and Middle Ear Infections"という名称のGenevieve Losonskyにより2004年10月29日に出願された米国仮出願第60/623,821号(代理人整理番号10271-149-888); "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment of Upper Respiratory Tract and Middle Ear Infections"という名称のGenevieve Losonskyにより2005年4月27日に出願された米国仮出願第60/675,724号(代理人整理番号10271-156-888); "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment of RSV Infections and Respiratory Conditions"という名称のGenevieve Losonskyにより2005年5月13日に出願された米国仮出願第60/681,233号(代理人整理番号10271-162-888); "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment of RSV Infections and Respiratory Conditions"という名称のGenevieve Losonskyにより2005年9月21日に出願された米国仮出願第60/718,719号(代理人整理番号RS 108P4); "Methods of Preventing and Treating RSV Infections and Related Conditions"という名称の2005年10月14日に出願された米国仮出願第60/727,043号(代理人整理番号10271-165-888);および"Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment of RSV Infections and Respiratory Conditions"という名称のGenevieve Losonskyにより2005年10月14日に出願された米国仮出願第60/727,042号(代理人整理番号10271-174-888)の各々に対する優先権を主張しており、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

40

## 【0002】

1. 緒言

本発明は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)抗原に高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーで免疫特異的に結合する抗体を提供する。幾つかの実施形態では、該抗体は、FcRnを結合するIgG定常部(定常ドメイン)またはその一部であって、該定常部またはその断片のFcRnに対するアフィニティーを増加させる1つまたは複数のアミノ酸修飾を有するものが存在するために、生体内半減期が増加した修飾抗体である。本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいは上気道RSV感染症(URI)および/または下気道RSV感染症

50



(LRI))を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本明細書に示す該抗体(例えば、1種または複数の修飾または非修飾抗体)の1種または複数の有効量をヒト対象に投与することを含む方法も提供する。本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいは上気道RSV感染症(URI)および/または下気道RSV感染症(LRI))を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本明細書に示す該抗体(例えば、1種または複数の修飾または非修飾抗体)の1種または複数の有効量をヒト対象に投与することを含む方法も提供する。本発明は、RSV感染症に付随し、または惹起される耳感染症(中耳炎など)またはその症状を予防、治療、管理および/または改善する方法も提供する。更に、本発明は、それだけに限らないが、喘息、喘鳴、反応性気道疾患(RAD)、またはその組合せを含み、RSV感染症に付随し、または惹起される呼吸状態を予防、治療、管理および/または改善する方法も提供する。 10

#### 【背景技術】

#### 【0003】

### 2. 発明の背景

#### 2.1 呼吸器合胞体ウイルス

呼吸器感染症は、上気道(例えば、鼻、耳、副鼻腔および喉)ならびに下気道(例えば、気管、気管支および肺)の一般的感染症である。上気道感染症の症状には、鼻水または鼻づまり、過敏性、不穏、食欲減退、活動性の低下、咳、発熱などが挙げられる。ウイルス性上気道感染症は、咽頭炎、風邪、クループおよびインフルエンザを惹起し、および/または伴う。下気道感染症の臨床症状には、肺中に痰を生じる浅い咳、発熱、呼吸困難などが挙げられる。 20

#### 【0004】

呼吸器合胞体ウイルス(RSV)は、世界的に呼吸器疾患の主因の一つである。米国では、RSVが年間、数万件の入院および数千件の死亡の原因である(RSVの生物学および管理に関する最近の総説としてはBlack, C.P., Resp. Care 2003 48(3): 209-31を参照されたい)。乳幼児および子供は、下気道に移行して肺炎や細気管支炎を起こす重篤RSV感染症に罹る危険性が最も高い。実際、小児細気管支炎の80%および乳幼児肺炎の50%は、RSVが原因である。該ウイルスは、ほぼすべての子供たちが2歳までに感染してしまう程、普遍的で感染力が高い。感染により持続性の免疫はできないが、再感染は比較的軽く済む傾向があるため、年長の子供および健康な成人では、RSVは、上気道および/または下気道を冒すが、下気道の重篤障害には進行しない風邪またはインフルエンザ様疾病を発症する。しかし、RSV感染症は、高齢または免疫不全の成人では重篤になり得る。(Evans, A.S., eds., 1989, Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control, 3<sup>rd</sup> ed., Plenum Medical Book, New Yorkの525~544ページ; Falsey, A.R., 1991, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12:602-608;およびGarvie et al., 1980, Br. Med. J. 281:1253-1254; Hertz et al., 1989, Medicine 68:269-281)。 30

#### 【0005】

現在のところ、RSVに対するワクチンはなく、商業的に利用できる有効な治療も全くない。最近の臨床データによれば、RSV感染症の治療に認可された唯一の薬物である抗ウイルス剤リバビリンに対する初期の見込みを支持できなかった(Black, C.P., Resp. Care 2003 48(3): 209-31)。その結果、米国小児科学会は、リバビリンの使用を最も重度の症例だけに制限することを提案する新ガイドラインを発行した(感染症委員会、米国小児科学会、1996年。Pediatrics 97:137-140; Randolph, A.G., and E.E. Wang., 1996, Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 150:942-947)。 40

#### 【0006】

ワクチンまたは商業的に利用可能な有効な治療は未だ得られていないが、RSVが起こす重篤な下気道疾患の危険性が高い乳幼児に対する予防分野、ならびにLRIの削減においてはある程度の成功が実現された。特に、高危険度の乳幼児を重症LRIから保護するために認可された免疫グロブリン基準療法が二法ある。即ち、RSV-IGIV(RespiGam(商標)の名でも知られている静脈内RSV免疫グロブリン)およびパリビズマブ(SYNAGIS(登録商標))であ 50

る。しかし、RSV-IGIV、パリビズマブのいずれも、重篤な下気道急性RSV疾患の予防剤以外の用途には認可されていない。

#### 【0007】

RSVは、汚染した分泌物との物理的接触で容易に伝播する。該ウイルスは、手の上で少なくとも30分、調理台および使用済みティッシュペーパーの上で数時間生存できる。RSVの高い伝染性は、重篤感染症への罹患に関係する危険因子から明白である。最大の危険因子の1つは入院であり、幾つかの事例では小児科病棟職員の50%強が感染していることが判明した(Black, C.P., Resp. Care 2003 48(3): 209-31)。このような成人感染症の20%までもが無症状であるが、それでもウイルスが、実質的にまき散らされる。他の危険因子には、デイケアセンターへの参加、混雑した生活条件、家庭での通学年齢の兄弟姉妹の存在などが挙げられる。重要なことは、上気道および/または下気道から該ウイルスを一掃するのに有効な薬剤は、その伝染の予防にも多分有効なことである。したがって、重篤なRSV感染症およびその後の疾患を予防する有望な一手法は、上気道から該ウイルスを一掃するか、ウイルス量を低下させる治療薬の開発であり、それによって、ウイルスの下気道への進展を予防することである。

10

#### 【0008】

RSV-IGIVおよびパリビズマブは、下気道急性RSV疾患の予防および下気道感染症の軽減における大幅な進歩を表すが、いずれも、上気道中の該ウイルスに対する許容投薬量での効力、およびその結果としてのRSV感染症の下気道への進行の考え得る予防を実証したことはない。実際、RSV-IGIVでは、処置群の各動物における肺内RSVの一掃に有効な量で鼻腔用スプレーとして投与したとき、鼻腔内RSVを一掃できなかった(1989年1月24日発行のPrince他の米国特許第4,800,078号)。腹腔内投与経路でも、下気道と同じ効力で上気道からRSVを一掃できなかった。上気道感染症が引き起こす免疫反応は、下気道感染症が誘発するものとは異なることが最近認められた(van Benten I.J. et al., J. Med. Virol. 2003 Oct.; 71(2): 290-7)。したがって、RSV URIの治療を介した肺内の急性RSV疾患の予防、ならびに/あるいは該ウイルスの下気道への進行の予防および/または減少に対する必要性が存在する。

20

#### 【0009】

### 2.2 中耳炎

中耳炎は、中耳の感染症または炎症である。この炎症は、咽頭炎、風邪、または他の呼吸もしくは息継ぎ障害を起こす感染症が、中耳に拡がるときに始まることが多い。このような感染症は、ウイルス性、細菌性のいずれもあり得る。RSVは、中耳炎との相関性が示された主要なウイルスである。子供たちの75%は、3回目の誕生日までに中耳炎の発作を少なくとも1回経験する。この子供たちのほぼ半数は、3歳までの間に耳感染症に3回以上罹ると思われる。米国では、中耳炎が原因の医療費および逸失賃金は、年間50億ドルに達すると推定される(Gates GA, 1996, Cost-effectiveness considerations in otitis media treatment. Otolaryngol Head Neck Sur. 114 (4): 525-530)。中耳炎は主に乳幼児および若年児童の疾患であるが、成人も罹ることがある。

30

#### 【0010】

中耳炎は激痛を起こすだけでなく、治療しないと重篤な合併症を起こすこともある。治療していない感染症は、中耳から、脳を含めた頭の近接部へと移動する恐れがある。中耳炎が原因の難聴は普通一時的なものであるが、中耳炎を治療しないと聴力障害が恒久的になる恐れがある。中耳内に持続する体液および慢性中耳炎のために、発話・言語の発達に肝要な時期の子供の聴力が低下する恐れがある。頻繁な耳感染症で早期聴力障害のある子供は、発話・言語障害を起こす恐れがある。

40

#### 【0011】

耳感染症の治療に抗生物質の使用を勧める医者が多いが、抗生物質耐性が該疾患の有効な治療をする上で重要な問題となっており、ウイルス性中耳炎は治療されない。その上、中耳炎、特にRSVとの関連があるウイルス感染症を予防または治療するために、新しい治療薬が必要とされている。

50

## 【 0 0 1 2 】

2.3 喘息および反応性気道疾患(RAD)

米国内の約1200万人が喘息に罹っており、喘息は子供にとって入院の主因である。The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (17th ed., 1999)。

## 【 0 0 1 3 】

喘息は、気道過敏性("AHR")、気管支収縮(即ち、喘鳴)、好酸球性炎症、粘液分泌過多、上皮下線維症およびIgE量増加を特徴とする、肺の炎症性疾患である。喘息発作は、環境誘因(例えば、コナダニ、昆虫、動物(例えば、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、マウス、ラットおよび鳥類)、菌類、大気汚染物質(例えば、タバコの煙)、刺激性のガス、煙霧、蒸気、エアロゾル、化学物質または花粉)、運動、または寒気によって誘発されることがある。喘息の原因は不明である。しかし、喘息の家系(London et al., 2001, Epidemiology 12(5): 577-83)、チリダニ、タバコの煙、ゴキブリなどのアレルゲンへの早期曝露(Melen et al., 2001, 56(7): 646-52)、およびRSVなどの呼吸器感染症(Wenzel et al., 2002, Am J Med, 112(8): 672-33およびLin et al., 2001, J Microbiol Immuno Infect, 34(4): 259-64)が、喘息を発症する危険性を高めるのではないかと推測されてきた。危険因子、動物モデルおよび炎症マーカーを含めた喘息の総説は、その全体を参照により本明細書に組み込んであるO'Byrne and Postma (1999), Am. J. Crit. Care Med. 159: S41-S66に見出すことができる。

## 【 0 0 1 4 】

現在の療法は喘息の管理を主な狙いとしており、アドレナリン薬(例えば、エピネフリンおよびイソプロテレノール)、テオフィリン、抗コリン薬(例えば、アトロピンおよび臭化イプラトルピウム)、コルチコステロイドおよびロイコトリエン阻害剤の投与を包含する。このような療法は、薬物相互作用、口渇、かすみ目、子供の成長抑制、月経時女性の骨粗鬆症などの副作用を伴う。炎症細胞からのメディエーター放出を阻害し、気道過敏性を抑制し、アレルゲンに対する反応を阻止するために、クロモリンおよびネドクロミルが予防的に投与される。しかし、喘息を発症する危険性が高まっている対象において、喘息の発症を予防する療法は現在のところ得られていない。したがって、副作用がより少なく、予防効果および/または治療効果がより良好な新しい療法が、喘息に対して必要とされている。

## 【 0 0 1 5 】

反応性気道疾患は、喘息様症状のより広い(また、しばしば同義の)特徴表現であり、一般に、慢性的咳、痰の発生、喘鳴または呼吸困難を特徴としている。

## 【 0 0 1 6 】

2.4 喘鳴

喘鳴(呻軋音としても知られている)は、一般に、狭まった呼吸管、特に肺の奥にある狭い小気道の中を通る空気が発する騒音を特徴とする。喘鳴は、RSV感染症、および喘息、細気管支炎などの二次的RSV状態の一般的症状である。喘鳴の臨床的重要性は、それが気道狭窄の指標であり、呼吸困難を示す恐れがあることである。

## 【 0 0 1 7 】

喘鳴は呼気(息の吐き出し)の際に最も顕著であるが、吸気(息の吸い込み)、呼気のいずれかの間に起こることもある。喘鳴は細気管支(胸奥の呼吸管)から発することが最も多いが、より大きな気道が塞がれても起こる場合がある。

## 【 0 0 1 8 】

本明細書において参考文献を引用または考察するが、それが本発明の先行技術であることを認めるものとみなしてはならない。

## 【発明の開示】

## 【 0 0 1 9 】

3. 発明の概要

本発明は、RSV Fタンパク質などのRSV抗原に対して高いアフィニティーおよび/またはアビディティーを有する抗体であって、下気道感染症だけの予防に用いるバリビズマブの

10

20

30

40

50

用量未満、またはほぼ等しい用量で下気道だけでなく上気道のRSV感染症の抑制にも有効な抗体を提供する。

【0020】

その上、本発明は、上気道RSV感染症(URI)および/または下気道RSV感染症(LRI)の予防、治療および/または改善をするために、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティーおよび/またはアビディティーを有する抗体であって、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、修飾Fc部(Fcドメイン)もしくはヒンジ-Fc部)内に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含み、そのため、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fcもしくはヒンジ-Fc部)、およびそこに結合する任意の分子の生体内半減期が増加し、その修飾領域を含むIgGまたはそのFcRn結合性断片のFcRnに対するアフィニティーが増加している抗体(即ち、「修飾抗体」)を提供する。該アミノ酸修飾は、ある残基の任意の修飾であってもよく(および幾つかの実施形態では、特定位置のその残基は修飾されないが、既に所望の残基を有しており)、好ましくは残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数での修飾である。他の実施形態では、該抗体は、定常部またはそのFcRn結合性断片において、252位にチロシン(252Y)、254位にスレオニン(254T)、および/または256位にグルタミン酸(256E)を含む(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版(「Kabat等」)に記載のEU指標に従った定常部の付番)。他の実施形態では、該抗体は、定常部またはそのFcRn結合性断片において、252Y、254Tおよび256E(上記Kabat等のEU指標を参照されたい)を含む(以後は「YTE」、例えば図35を参照されたい)。

10

20

【0021】

本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)を予防、管理、治療、中和および/または改善する方法であって、高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーでRSV抗原に免疫特異的に結合する、本明細書に示す抗体(修飾または非修飾抗体)の有効量を前記対象に投与することを含む方法を提供する。公知の抗体(例えば、パリビズマブ)の有効血清力価より低くおよび/または持続性である、本発明の抗体の血清力価が、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の予防、管理、治療および/または改善により有効であると思われるので、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の予防、管理、治療および/または改善に有効な血清力価を得るために使用する該抗体の用量は、より少量および/またはより少数、例えばRSV流行期当たり1個または複数の用量で済ませることができる。RSV抗原に免疫特異的に結合する本発明の抗体の用量をより少量および/またはより少数使用するために、有害作用が起こる見込みは減少し、治療の期間に亘って例えば乳幼児に投与しても、より安全である(例えば、公知の抗体(例えば、パリビズマブ)と比較して、血清力価が低く、血清半減期が長く、ならびに/あるいは上気道および/または下気道への同在化が良好なために)。

30

【0022】

したがって、本発明は、公知の抗体(例えば、パリビズマブ)と比較して、高い効力を有し、ならびに/あるいはRSV抗原(好ましくはRSV F抗原)に対する高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有する抗体、および該抗体を使用する方法を提供する。幾つかの実施形態では、該抗体は、修飾されたIgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含み、その結果、体内血清半減期の増加(即ち、本発明の修飾抗体)が、修飾されたIgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含んでいない抗体、例えば、その修飾を含んでいない抗体(即ち、非修飾抗体)またはパリビズマブなどの別のRSV抗体と比較した際に、起こる。ある種の実施形態では、該抗体はRSV流行期当たり1回投与される。

40

【0023】

一態様では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、修飾されたIg

50

G定常部を含んでいない抗体(例えば、MEDI-524)や修飾されたIgG定常部を含んだ修飾抗体(例えば、MEDI-524-YTE)などの、本明細書に記載の抗体(即ち、本発明の抗体)の有効量を対象(例えば、それを必要とする)に投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、上気道、下気道両方のRSV感染症、および/または急性RSV疾患を管理、治療または改善することができる。他の実施形態では、RSV感染症に関連する症状または呼吸状態は、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せである。本発明の方法は、RSV URIおよび/またはLRIに付随するか、またはそれを原因とする二次的状态の予防も包含する。

【0024】

第2の態様では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量、および本発明の抗体以外の1種または複数の治療薬の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体(例えば、MEDI-524-YTE)である。

10

【0025】

第3の態様では、本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するための方法であって、前記対象の血清抗体力価が約0.1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約800  $\mu\text{g/ml}$  となるように、本発明の抗体の少なくとも第1の用量を前記対象に投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、該血清抗体力価が、対象中で数時間、数日、数週間、および/または数カ月存在する。一実施形態では、本発明の抗体の該第1の用量は、持続放出製剤中で、および/または肺送達もしくは鼻腔内送達により投与される。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体である。

20

【0026】

第4の態様では、本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するための方法であって、前記対象の鼻甲介および/または鼻汁の抗体濃度が約0.01  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約2.5  $\mu\text{g/ml}$  となるように、本発明の抗体の第1の用量を前記対象に投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、鼻甲介および/または鼻汁の該抗体濃度が、対象中で数時間、数日、数週間、および/または数カ月存在する。本発明の抗体の該第1の用量は、予防上または治療上有効な用量とし得る。一実施形態では、本発明の抗体の該第1の用量は、持続放出製剤中で、および/または肺送達もしくは鼻腔内送達により投与される。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体である。

30

【0027】

第5の態様では、本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するための方法であって、本発明の抗体(例えば、修飾抗体)の有効量を投与することを含み、該有効量が鼻甲介および/または鼻汁中のRSV力価の減少を起こす方法を提供する。鼻甲介および/または鼻汁中のRSV力価の該減少は、陰性対照(プラシーボ(プラセボ)など)、別療法(それだけに限らないが、パリーブズマブ治療を含む)、または抗体投与以前のその患者における該力価に匹敵し得る。

40

【0028】

第6の態様では、本発明は、予防上または治療上有効な血清力価を実現するために、本

50

発明の抗体を用いて上気道内および/または下気道内、あるいは中耳内のRSVを中和する方法を提供する。幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体である。

#### 【0029】

第7の態様では、本発明は、本発明の方法に従って使用でき、RSV F抗原などのRSV抗原に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有する、修飾抗体を含めた高効力抗体を提供する。一実施形態では、該抗体は、本明細書に記載の技法または当業者に公知の技法(例えば、BIAcore アッセイ)により評価した場合、公知の抗RSV抗体(例えば、パリビズマブ)より7倍高いアフィニティーをRSV抗原に対して有している。

#### 【0030】

第8の態様では、本発明の方法に従って使用する該抗体(例えば、修飾抗体を含む)は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、約 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  ~ 約 $10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の結合速度定数または $k_{on}$ 速度(抗体(Ab)+抗原(Ag)  $\xrightarrow{k_{on}}$  Ab-Ag)を有する。幾つかの実施形態では、該抗体は、約 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  ~ 約 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、好ましくは約 $2.5 \times 10^5$ または $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $7.5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ の $k_{on}$ を有する高効力抗体である。このような抗体は、高いアフィニティー(例えば、約 $10^9 \text{M}^{-1}$ )を有してもよく、より低いアフィニティーを有してもよい。一実施形態では、本発明の方法に従って使用できる該抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、公知の抗RSV抗体(例えば、パリビズマブ)より少なくとも1.5倍高い $k_{on}$ 速度を有する。

#### 【0031】

第9の態様では、本発明の方法に従って使用する該抗体(例えば、修飾抗体を含む)は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 未満から $10 \times 10^{-10} \text{s}^{-1}$ 未満の $k_{off}$ 速度(Ab-Ag  $\xrightarrow{K_{off}}$  Ab+Ag)を有する。一実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、公知の抗RSV抗体(例えば、パリビズマブ)より少なくとも1.5倍低い $k_{off}$ 速度を有する。

#### 【0032】

第10の態様では、本発明の方法に従って使用できる該抗体(例えば、修飾抗体を含む)は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、約 $10^2 \text{M}^{-1}$  ~ 約 $5 \times 10^{15} \text{M}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^4 \text{M}^{-1}$ のアフィニティー定数または $K_a(k_{on}/k_{off})$ を有する。幾つかの実施形態では、該抗体は、約 $10^9 \text{M}^{-1}$ 、好ましくは $10^{10} \text{M}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^{11} \text{M}^{-1}$ の $K_a$ を有する高効力抗体である。

#### 【0033】

第11の態様では、本発明の方法に従って使用する、例えば本発明の修飾抗体を含めた該抗体は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、約 $5 \times 10^{-2} \text{M}$  ~ 約 $5 \times 10^{-16} \text{M}$ の解離定数または $K_d(k_{off}/k_{on})$ を有する。

#### 【0034】

第12の態様では、本発明の方法に従って使用できる該抗体は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、本明細書に記載のアッセイまたは当業者に公知のアッセイ(例えば、BIAcoreアッセイ)を用いて評価した場合、約25pM ~ 約3000pMの解離定数( $K_d$ )を有している。

#### 【0035】

第13の態様では、本発明の方法に従って使用する、例えば本発明の修飾抗体を含めた該抗体は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、生体外微量中和アッセイにおいて約6nM ~ 約0.01nMの中央値阻害濃度( $IC_{50}$ )を有する。ある種の実施形態では、該微量中和アッセイは、本明細書に記載されている(例えば、本明細書の実施例6.4、6.8および6.18に記載)か、またはJohnson et al., 1999, J. Infectious Diseases 180: 35-40に記載の微量中和アッセイである。幾つかの実施形態では、該抗体の $IC_{50}$ は、生体外微量中和アッセイにおいて3nM未満、好ましくは1nM未満である。

#### 【0036】

第14の態様では、本発明の該抗体(例えば、修飾抗体)は、対象におけるRSV感染症(例え

10

20

30

40

50

ば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために使用でき、前記方法は、本発明の該抗体の有効量を鼻腔内投与することを含み、該予防、管理、治療および/または改善が感染後になされる。

#### 【0037】

第15の態様では、例えば修飾抗体を含めた本発明の抗体は、ヒト組織との交差反応性が低下しているか、または全くない。ある種の実施形態では、本発明の抗体(例えば、MEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)は、別の抗RSV抗体(A4B4など)と比較して、ヒト組織(例えば、皮膚および/または肺組織)との交差反応性が低下している。

10

#### 【0038】

第16の態様では、本発明は、本発明の1種または複数の抗体(例えば、修飾または非修飾抗体)を対象(例えば、乳幼児、未熟児生まれの乳幼児、免疫不全対象、医療従事者)に予防的に投与する方法を提供する。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、RSV感染症が1個人から別の個人に伝染するのを防止するか、または伝染する該感染症を弱めるように、対象に投与される。幾つかの実施形態では、該対象は、RSV感染症の別の個人に既に曝されたか(無症状の場合も、そうでない場合もある)、または曝される恐れがある。好ましくは、該抗体は、RSV感染者に潜在的または実際に曝された後、約1~2週間、1日1回または数回(例えば、1回、2回、4回など)、該対象の鼻腔内に投与される。ある種の実施形態では、該抗体は、約60mg/kg~約0.025mg/kg、より好ましくは約0.025mg/kg~約15mg/kgの用量で投与される。

20

#### 【0039】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVH部(VHドメイン)および/またはVL部(VLドメイン)を含む抗体の使用を包含する。好ましい実施形態では、本発明の方法は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVH鎖および/またはVL鎖を含む抗体の使用を包含する。ある種の実施形態では、該抗体は、修飾Fc部またはそのFcRn結合性断片を含み、修飾Fc部を含まないA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(即ち、非修飾A4B4L1FR-S28R)のFc部より、FcRn受容体に対する高いアフィニティを有している。

30

#### 【0040】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、修飾抗体、例えば、修飾IgG1などの修飾IgGの定常部を含む本明細書記載の任意の抗体の使用を包含し、該修飾IgG定常部は、好ましくは残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数で残基の修飾(また、幾つかの実施形態では非修飾残基)を含み、その結果、該IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fcもしくはヒンジ-Fc部)、およびそこに結合する任意の分子の生体内半減期が増加し、該IgGまたはその結合性断片のFcRnに対するアフィニティが増加する。ある種の実施形態では、該IgG定常部はYTE修飾を含む。幾つかの実施形態では、本発明の修飾抗体(およびその抗体を使用する方法)は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVH鎖および/またはVL鎖、ならびに修飾IgG1などの修飾IgGの定常部を含み、そのFc部はYTE修飾を含む。他の実施形態では、本発明の修飾抗体は、表2に列挙した抗体の任意のVH部および/またはVL部、ならびに修飾IgG1などの修飾IgGの定常部を含み、そのFc部はYTE修飾を含む。他の実施形態では、本発明の修飾抗体は、表2に列挙した抗体の任意のVH鎖および/またはVL鎖、ならびに修飾IgG1などの修飾IgGの定常部を含み、そのFc部はYTE修飾を含む。

40

#### 【0041】

### 3.1 用語

「約」("about")または「およそ」("approximately")という用語は、所与の値または範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内(または1%以下)を意味する。

#### 【0042】

本明細書で使用する場合、「投与する」("administer")または「投与」("administrati

50

on")とは、体外に存在するときにその物質(例えば、本発明の抗体)を、例えば、それだけに限らないが、肺(例えば、吸入)、粘膜(例えば、鼻腔内)、皮内、静脈内、筋肉内の各送達および/または本明細書に記載もしくは当分野で公知の他の任意の物理的送達法によって、患者に注入、または他の方法で物理的に送達する行為を指す。ある疾患またはその症状を治療しようとするとき、該物質の投与は、該疾患またはその症状が発症した後に通常行う。ある疾患またはその症状を予防しようとするとき、該物質の投与は、該疾患またはその症状が発症する前に通常行う。

#### 【0043】

ポリペプチドに関しては、本明細書で使用する場合の「類縁体」("analog")という用語は、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片または抗RSV抗体と類似または同一の機能を有するが、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片または抗RSV抗体と類似または同一のアミノ酸配列を含むとは限らず、あるいはRSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片または抗体と類似または同一の構造を有するとは限らない、ポリペプチドを指す。類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、以下の少なくとも1つを満足するポリペプチドを指す。(a) RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列と、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド。(b) 少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、または少なくとも150アミノ酸残基の、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に、厳密な(stringent)条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列がコードするポリペプチド(例えば、Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい)。(c) RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列と、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列がコードするポリペプチド。RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体と類似の構造を有するポリペプチドとは、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体と類似の二次、三次または四次構造を有するポリペプチドを指す。ポリペプチドの構造は、それだけに限らないが、X線結晶解析、核磁気共鳴、結晶解析的電子顕微鏡観察を含めた、当業者に公知の方法によって決定できる。

#### 【0044】

2種のアミノ酸配列または2種の核酸配列の同一率(%)を決定するためには、最適な比較をするために両配列を整列させる(例えば、第1のアミノ酸配列または核酸配列中に、第2のアミノ酸配列または核酸配列と最適な比較をするために、ギャップを導入できる)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドの比較を行う。第1配列中のある位置が、第2配列中の対応位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、両分子はその位置において同一である。両配列間の同一率(%)は、両配列が共有する同一位置の個数の関数である(即ち、同一%=重複する同一位置の個数/全位置数×100%)。一実施形態では、両配列の長さは同じである。

#### 【0045】

両配列間の同一率(%)の決定は、数学アルゴリズムを用いて行うこともできる。両配列の比較に利用される数学アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul



et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264 2268のアルゴリズム、またはKarlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873 5877におけるようなその改良版である。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTおよびXBLASTのプログラム中に組み込まれている。BLASTヌクレオチド探索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、例えばスコア=100、ワード長=12に対するNBLASTヌクレオチドプログラムのパラメーターセットを用いて実行できる。BLASTタンパク質探索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、例えばスコア=50、ワード長=3に対するXBLASTプログラムのパラメーターセットを用いて実行できる。比較のためにギャップ付き整列を得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 3402に記載のように、Gapped BLASTを利用できる。あるいは、分子間の遠縁関係を検知する繰り返し探索を実行するために、PSI BLASTを使用できる(同上)。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI BLASTの各プログラムを利用する際、個々のプログラムの(例えば、XBLASTおよびNBLASTの)デフォルトパラメーターを使用できる(例えば、worldwide web, ncbi.nlm.nih.gov上の全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)を参照されたい)。配列間の比較に利用される数学アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4: 11 17のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列整列ソフトウェアパッケージの一部をなすALIGNプログラム(バージョン2.0)中に組み込まれている。アミノ酸配列間の比較をするためにALIGNプログラムを利用する際、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用できる。

10

20

#### 【0046】

2配列間の同一率(%)は、ギャップを認めるか、認めないに関わらず、上記技法に類似の技法を用いて決定できる。同一率(%)の計算では、厳密な一致だけが通常算入される。

#### 【0047】

「RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体」、「抗RSV抗体」という用語、および本明細書で使用する類似の用語は、修飾抗体(即ち、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含む抗体)および非修飾抗体(即ち、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含まない抗体)の両方を含めて、RSVポリペプチドに特異的に結合する抗体を指す。RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体またはその断片は、関連抗原と交差反応性を有してもよい。好ましくは、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体またはその断片は、他の抗原と交差反応性を有していない。RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体またはその断片は、例えば、免疫アッセイ、BIAcore、または当業者に公知の他の技法により、同定できる。抗体またはその断片は、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)などの実験技法を用いて決定した場合、任意の交差反応性抗原に対するより高いアフィニティーでRSV抗原に対して結合するとき、RSV抗原に免疫特異的に結合する。抗体特異性に関する考察のためには、例えば、Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New Yorkの332~336ページを参照されたい。

30

#### 【0048】

本発明の抗体は、それだけに限らないが、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、多重特異抗体(二重特異抗体を含めて)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内抗体(intrabody)、一本鎖Fvs(scFv)(例えば、単一特異的、二重特異的などを含めて)、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fvs(sdFv)、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、および前記いずれものエピトープ結合性断片を含む。特に、本発明の抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫活性部、即ちRSV抗原(好ましくはRSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗原結合部位(例えば、抗RSV抗体の1個または複数の相補性決定領域(CDR))を含んだ分子を包含する。本発明の抗体は、免疫グロブリン分子のいずれのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、いずれのクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)、またはいずれのサブクラス(例えば、IgG2aおよびIgG2b)であってもよい。好ましい実施形態では、本発明の修飾抗体は、IgG抗体またはそのクラ

40

50

ス(例えば、ヒトIgG1)もしくはサブクラスである。

【0049】

「定常部」("constant domain")という用語は、免疫グロブリンのその他の部分、抗原結合部位を含んだ可変部に対して、より保存されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子中の部分を指す。該定常部は、重鎖のCH1部、CH2部およびCH3部、ならびに軽鎖のCHL部を含んでいる。

【0050】

ポリペプチドに関しては、本明細書で使用する場合の「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失または付加の導入によって変化した、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、またはRSVポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用する場合の「誘導体」という用語は、例えば、任意種の分子を当該ポリペプチドに共有結合することによって化学的に修飾された、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、またはRSVポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体をも指す。限定するわけではないが例えば、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/封鎖基による誘導体化、タンパク質開裂、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などにより、化学的に修飾し得る。RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または抗体の誘導体は、それだけに限らないが、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、チュニカマイシンの代謝合成などを含めた当業者に公知の技術を用いた化学修飾によって、化学的に修飾し得る。更に、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または抗体の誘導体は、1種または複数の非古典的アミノ酸を含んでもよい。ポリペプチド誘導体は、RSVポリペプチド、RSVポリペプチドの断片、または本明細書に記載の抗体と類似または同一の機能を保有している。

【0051】

本明細書で使用する場合の「有効量」という用語は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含めて)の重度および/または持続期間を低下および/または改善すること; RSV URIのLRIへの進展もしくは進行、肺における臨床的に重要な急性RSV疾患、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防すること(例えば、上気道RSV疾患の下気道RSV疾患への進行を予防すること); RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含めて)の再発、発現または発症を予防すること;ならびに/あるいは別療法(例えば、本発明の抗体以外の治療薬)の予防効果または治療効果を増強および/または改善することのために、十分な治療薬(例えば、本発明の修飾抗体または他の抗体)の量を指す。本発明の抗体の有効量の非限定的な例は、下記のセクション5.3に示されている。幾つかの実施形態では、本発明の抗体の該有効量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.80mg/kg、約1.0mg/kg、約1.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kgまたは約60mg/kgである。一実施形態では、本発明の抗体の有効量は、対象の体重1kg当たり抗体約15mgである。

【0052】

本明細書で使用する場合の「有効中和力価」("effective neutralizing titer")という用語は、臨床的に有効であるか(ヒトにおいて)、または例えばコottonラットにおいてウイルスを99%削減することが示された動物(ヒトまたはコottonラット)の血清中に存在する量に相当する、抗体の量を指す。その99%削減は、例えばRSV $10^3$ pfu、 $10^4$ pfu、 $10^5$ pfu、 $10^6$ pfu、 $10^7$ pfu、 $10^8$ pfuまたは $10^9$ pfuの特定の接種によって定義される。

【0053】

本明細書で使用する場合の「高齢」という用語は、65歳以上のヒト対象を指す。

## 【0054】

本明細書で使用する場合の「エピトープ」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおいて、抗原または免疫原活性を有するRSVポリペプチドの断片を指す。免疫原活性を有するエピトープは、動物において抗体反応を誘発するRSVポリペプチド(例えば、RSV Fタンパク質)の断片である。抗原活性を有するエピトープは、当分野で周知の任意の方法、例えば本明細書に記載の免疫アッセイにより決定した場合、抗体が免疫特異的に結合する、RSVポリペプチドの断片である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。

## 【0055】

本明細書で使用する場合の「賦形剤」という用語は、薬物のために希釈剤、媒体、保存剤、結合剤または安定化剤として一般に使用される不活性物質を指し、それだけに限らないが、タンパク質(例えば、血清アルブミンなど)、アミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、グリシン、ヒスチジンなど)、脂肪酸およびリン脂質(例えば、アルキルスルホン酸、カプリル酸など)、界面活性剤(例えば、SDS、ポリソルベート、非イオン界面活性剤など)、糖類(例えば、スクロース、マルトース、トレハロースなど)、ならびにポリオール(例えば、マニトール、ソルビトールなど)を包含する。その全体を本明細書に組み込んであるRemington's Pharmaceutical Sciences (by Joseph P. Remington, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA)も参照されたい。

## 【0056】

本明細書で使用する場合の「FcRn受容体」または「FcRn」という用語は、ヒトもしくは霊長類の胎盤、または卵黄嚢(ウサギ)を介して胎児へ、および初乳から小腸を介して新生児へ、母性IgGを移動させることに関与することが知られているFc受容体(「n」は新生児を示す)を指す。FcRnは、IgG分子に結合し、それを血清中に再循環することにより、血清IgG量を一定に維持することに関与していることも知られている。FcRnのIgG分子への結合はpH依存性で、pH6.0で最適に結合する。FcRnは、分子量が各々約50kDと15kDの2種のポリペプチドのヘテロ二量体である。50kDポリペプチドの細胞外ドメインは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)のクラスI鎖と関係しており、15kDポリペプチドは、非多形 $\beta_2$ ミクログロブリン( $\beta_2$ -m)であることが示された。胎盤および新生児小腸以外に、FcRnは、種を越えた様々な組織、ならびに各種の内皮細胞系においても発現する。FcRnは、成人の血管内皮、筋肉血管系および肝臓にも発現しており、内皮細胞が、ヒトおよびマウスにおける血清IgG量の維持を最も担っていると提案されている。ヒトFcRnおよびマウスFcRnのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号337(図21A)および配列番号338(図21B)により示される。FcRn活性を有するこれらの配列の相同体も、包含される。

## 【0057】

ペプチドまたはポリペプチドに関しては、本明細書で使用する場合の「断片」という用語は、RSVポリペプチドまたはRSVポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体のアミノ酸配列のうち、少なくとも5個の隣接アミノ酸残基、少なくとも10個の隣接アミノ酸残基、少なくとも15個の隣接アミノ酸残基、少なくとも20個の隣接アミノ酸残基、少なくとも25個の隣接アミノ酸残基、少なくとも40個の隣接アミノ酸残基、少なくとも50個の隣接アミノ酸残基、少なくとも60個の隣接アミノ酸残基、少なくとも70個の隣接アミノ酸残基、少なくとも80個の隣接アミノ酸残基、少なくとも90個の隣接アミノ酸残基、少なくとも100個の隣接アミノ酸残基、少なくとも125個の隣接アミノ酸残基、少なくとも150個の隣接アミノ酸残基、少なくとも175個の隣接アミノ酸残基、少なくとも200個の隣接アミノ酸残基、または少なくとも250個の隣接アミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、ペプチドまたはポリペプチドを指す。特定の実施形態では、RSVポリペプチドまたはRSV抗原に免疫特異的に結合する抗体の断片は、該ポリペプチドまたは抗体の少なくとも1種、少なくとも2種または少なくとも3種の機能を保持する。

## 【0058】

本明細書で使用する場合の「融合タンパク質」という用語は、抗体のアミノ酸配列と、異種のポリペプチドまたはタンパク質(即ち、通常、該抗体の一部ではないポリペプチド

10

20

30

40

50

またはタンパク質(例えば、非抗RSV抗原性の抗体))のアミノ酸配列とを含むポリペプチドを指す。

【0059】

本明細書で使用する場合の「高効力」という用語は、本明細書に記載するような様々な生物活性アッセイ(例えば、RSVの中和)で決定した場合、高い効力を示す抗体を指す。例えば、本発明の高効力抗体は、微量中和アッセイにより決定した場合、5nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満、1.75nM未満、1.5nM未満、1.25nM未満、1nM未満、0.75nM未満、0.5nM未満、0.25nM未満、0.1nM未満、0.05nM未満、0.025nM未満、または0.01nM未満の $IC_{50}$ 値を有する。ある種の実施形態では、該微量中和アッセイは、本明細書に記載されている(例えば、本明細書の実施例6.4、6.8および6.18に記載のような)か、またはJohn 10  
son et al., 1999, J. Infectious Diseases 180: 35-40にあるような微量中和アッセイである。更に、本発明の高効力抗体は、 $10^5$ pfuを接種してから5日後、前記抗体未投与のコットンラットに対して、RSV力価を少なくとも75%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%低下させる。本発明のある種の実施形態では、本発明の高効力抗体は、1種または複数のRSV抗原に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティを示す(例えば、1種または複数のRSV抗原に対して少なくとも $2 \times 10^8 M^{-1}$ 、好ましくは $2 \times 10^8 M^{-1} \sim 5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $2.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{12} M^{-1}$ のアフィニティーを有する抗体)。 20

【0060】

本明細書で使用する場合の「宿主」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを指す。

【0061】

本明細書で使用する場合の「宿主細胞」という用語は、核酸分子をトランスフェクトされた特定の対象細胞、およびこのような細胞の子孫または潜在的子孫を指す。このような細胞の子孫は、後世代に起こり得る突然変異もしくは環境影響、または該核酸分子の宿主細胞ゲノム中への組み込みのために、核酸分子をトランスフェクトされた親細胞とは同一でない場合がある。

【0062】

本明細書で使用する場合の「ヒト乳幼児」という用語は、月齢24カ月未満、好ましくは16カ月未満、12カ月未満、6カ月未満、3カ月未満、2カ月未満、または1カ月未満のヒトを指す。

【0063】

本明細書で使用する場合の「未熟児生まれのヒト乳幼児」("human infant born prematurely")という用語は、妊娠期間40週未満、好ましくは妊娠期間35週未満で生まれた乳幼児で、6月齢未満、好ましくは3月齢未満、より好ましくは2月齢未満、最も好ましくは1月齢未満のヒトを指す。

【0064】

本明細書で使用する場合の「IgG Fc領域」("IgG Fc region")、「Fc領域」("Fc region")、「Fc部」("Fc domain")、「Fc断片」("Fc fragment")という用語、および他の類似用語は、IgG分子のパパイン消化により得られる結晶性断片と関連する、IgG分子の部分を指す。Fc領域は、ジスルフィド結合で連結されているIgG分子の重鎖2本のC末端側半分からなる。Fc領域は、抗原結合活性はないが、炭水化物部分と、FcRn受容体を含めた補体およびFcの受容体に対する結合部位とを含有している(以下を参照されたい)。例えば、Fc断片は、第2定常部CH2の全体(ヒトIgG1の残基231~340、例えば図20Bを参照されたい)(例えば、配列番号339)および第3定常部CH3(ヒトIgG1の残基341~447、例えば図20Bを参照されたい)(例えば、配列番号340)を含有している。本明細書で使用する付番はすべて、別途指示のない限り、EU指標に従っている(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of imm 40  
unological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版)。 50

## 【0065】

本明細書で使用する場合の「IgGヒンジ-Fc領域」または「ヒンジ-Fc断片」という用語は、EU指標に従って(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版)、Fc領域(残基231~447、例えば図20Bを参照されたい)と、Fc領域のN末端から延びているヒンジ領域(残基216~230、例えば配列番号341、例えば図20Bを参照されたい)からなる、IgG分子の領域を指す。ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列の一例は、配列番号342である(図20Aおよび20Bも参照されたい)。

## 【0066】

本明細書で使用する場合の「免疫調節剤」("immunomodulatory agent")という用語、および、それだけには限らないが免疫調節剤を含めた変形語は、宿主免疫系を調節する作用剤を指す。ある種の実施形態では、免疫調節剤は免疫抑制剤である。他のある種の実施形態では、免疫調節剤は免疫賦活剤である。本発明によれば、本発明の併用療法に使用される免疫調節剤は、抗RSV抗体またはその断片を含まない。免疫調節剤には、それだけには限らないが、低分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、抗体、無機分子、模倣剤、有機分子などが挙げられる。

## 【0067】

本明細書で使用する場合、他の治療薬の投与に関する「併用して」という用語は、複数の治療薬の使用を指す。「併用して」という用語の使用は、感染症対象に投与される治療薬の順序を制限するものではない。RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する呼吸状態に罹っていたか、罹っているか、罹り易い対象に対して、第1治療薬の投与後(例えば、1分、45分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週または12週)、それと同時に、またはその投与前(例えば、1分、45分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週または12週)に、第2治療薬を投与することができる。任意の追加治療薬を、その他の追加治療薬と共に、任意の順序で投与することができる。ある種の実施形態では、本発明の抗体は、1種または複数の治療薬(例えば、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、ならびに/あるいは、それらに関連する症状または呼吸状態もしくは他の症状を予防、治療、管理および/または改善するために、現在投与される、本発明の抗体以外の治療薬)と併用して投与することができる。本発明の抗体と併用して投与できる治療薬の非限定的な例には、鎮痛剤、麻酔剤、抗生物質または免疫調節剤、あるいは米国薬局方および/または医師用卓上参考書(Physician's Desk Reference)に列挙された他の任意の作用剤が挙げられる。

## 【0068】

本明細書で使用する場合、「感染症」("infection")および「RSV感染症」という用語は、宿主内でのRSVの生活環の全段階(それだけには限らないが、RSVによる侵入および細胞内または体組織内でのその複製を含めて)、ならびにRSVによる侵入およびその複製に起因する病状を指す。RSVによる侵入およびその増殖は、それだけには限らないが、以下の段階、即ちRSV粒子の細胞への結合、ウイルスの細胞膜との融合、ウイルス遺伝情報の細胞内への導入、RSVタンパク質の発現、新たなRSV粒子の産生およびRSV粒子の細胞外への放出を含む。RSV感染症は、上気道RSV感染症(URI)、下気道RSV感染症(LRI)、またはその組合せの場合がある。特定の実施形態では、RSVによる侵入およびその複製に起因する病状は、急性RSV疾患である。本明細書で使用する場合の「急性RSV疾患」という用語は、RSV感染症の結果起こる肺または下気道内の臨床的に重要な疾患を指し、肺炎および/または細気管支炎として発症することがあり、その症状には低酸素症、無呼吸症、呼吸困難、呼吸促進、喘鳴、チアノーゼなどが含まれる。急性RSV疾患に対しては、罹患者は、入院、酸素補給、挿管および/または換気などの医療介入を受けることが必要である。

## 【0069】

本明細書で使用する場合の「無機塩」という用語は、炭素を含有せず、酸の水素または

10

20

30

40

50

酸の一部または全部を金属または金属様に挙動する基で代替して生成し、医薬組成物および生物材料調製物における等張化化合物として使用されることが多い、任意の化合物を指す。最も一般的な無機塩は、NaCl、KCl、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ などである。

#### 【0070】

本明細書で使用する場合の「生体内半減期」という用語は、所与の動物の循環血における特定型のIgG分子またはFcRn結合部位を含むその断片の生物学的半減期を指し、該動物中に投与された量の半分が、動物の循環血および/または他の組織から消失するのに要する時間で表わされる。所与のIgGのクリアランス曲線を時間の関数として描くと、その曲線は普通二相性であり、血管内および血管外空隙の間での注入IgG分子の平衡化を表わし、部分的に分子のサイズにより決定される急速相と、血管内空隙におけるIgG分子の異化を表わす長期相とからなる。「生体内半減期」という用語は、相でのIgG分子の半減期に事実上相当する。本明細書で使用する場合、修飾されたIgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含む抗体の「増加した生体内血清半減期」、または「延長した生体内血清半減期」とは、修飾されたIgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含んでいない抗体と比較した際(例えば、定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含んでいない抗体(即ち、非修飾抗体)と比較した際、あるいはパリビズマブなどの別のRSV抗体と比較した際)の、該抗体の生体内血清半減期の増加を指す。

10

#### 【0071】

「単離された」または「精製された」抗体は、該タンパク質の由来源である細胞または組織源の細胞物質または他の汚染タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成した場合には、前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、単離または組換え産生した源の細胞の細胞成分から抗体を分離した、該抗体の調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含まない抗体は、異種タンパク質(本明細書では「汚染タンパク質」とも称する)が約30%、20%、10%または5%(乾重量基準)より少ない抗体の調製物を包含する。該抗体を組換え産生した場合は、好ましくは培地も実質的に含まない、即ち培地は、そのタンパク質調製物の体積の約20%、10%または5%より少ない。該抗体を化学合成した場合は、好ましくは前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まない、即ち該抗体は、そのタンパク質の合成に関わる前駆体化学物質または他の化学物質から分離される。したがって、該抗体のこのような調製物は、前駆体化学物質または該対象抗体以外の化合物を約30%、20%、10%、5%(乾重量基準)より少量有している。好ましい実施形態では、本発明の抗体は単離または精製されている。

20

30

#### 【0072】

単離された核酸分子は、該核酸分子の天然源中に存在する他の核酸分子から分離された分子である。その上、cDNA分子などの「単離」核酸分子は、組換え技術により産生した場合、他の細胞物質または培地を実質的に含まないか、あるいは化学合成した場合には、前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まないものにできる。特定の実施形態では、本発明の抗体をコードする核酸分子は単離または精製されている。

40

#### 【0073】

「下気」道("lower respiratory" tract)という用語は、気管支、細気管支および肺胞を含めた、気管および肺を包含する下気道の主要な通気路および構造を指す。

#### 【0074】

本明細書で使用する場合、「低耐性」("low tolerance")という用語は、患者が治療薬の副作用に苦しむため、患者は、治療薬から受益せず、および/または有害作用のためにそれを継続する見込みがなく、ならびに/あるいは副作用の害が治療薬の便益を上回る状態を指す。

#### 【0075】

本明細書で使用する場合の「少量ないし検出限界以下の凝集」という語句は、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)により測定した場合、タンパク質の重量基準で凝集物

50

を5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、最も好ましくは0.5%以下含む試料を指す。

【0076】

本明細書で使用する場合の「少量ないし検出限界以下の断片化」という用語は、例えば、HPSECで決定した場合の単一ピーク、または還元キャピラリーゲル電気泳動(rCGE)による2本ピーク(重鎖および軽鎖)であって、非分解抗体またはその非分解断片を表す該ピーク中に、全タンパク質の80%、85%、90%、95%、98%または99%に等しい量が、それより多量を含み、しかも各々が全タンパク質の5%強、4%強、3%強、2%強、1%強、または0.5%強を有する他の各単一ピークを含んでいない試料を指す。本明細書で使用する場合の「還元キャピラリーゲル電気泳動」という用語は、抗体またはその断片中のジスルフィド結合を還元するのに十分な還元条件下で行う、キャピラリーゲル電気泳動を指す。

10

【0077】

本明細書で使用する場合、「管理する」("manage")、「管理すること」および「管理」という用語は、感染症の治癒を起こさない治療薬(例えば、予防剤または治療剤)から対象が引き出す有益作用を指す。ある種の実施形態では、対象は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、その1種または複数の症状、あるいはRSV感染症に付随し、それにより増強され、またはそれを増強する呼吸状態を「管理」することにより、該感染症の進行または悪化を予防するために、1種または複数の治療薬(例えば、本発明の抗体などの予防剤または治療剤)を投与される。

【0078】

本明細書で使用する場合、「修飾抗体」という用語は、抗体定常部(好ましくはIgG、より好ましくはIgG1の定常部)またはそのFcRn結合性断片の所与の位置にあるアミノ酸残基に対して、1個または複数の「修飾」を含む本明細書記載の任意の抗体を包含し、該抗体は、公知の抗RSV抗体(例えば、パリピズマブ)と比較して、ならびに/あるいはIgG定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含まない同じ抗体と比較して、例えば、前記抗体の該定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくはFc部またはヒンジ-Fc部)と、新生児Fc受容体(FcRn)との相互作用に関与することが確認されたアミノ酸残基における1個または複数の修飾の結果、生体内半減期が増加している。IgG定常部配列中の自然変異のために(例えば、上記のKabat等を参照されたい)、ある種の例では、第1のアミノ酸残基は、所与の位置で第2のアミノ酸残基で置換されることがあり(例えば、図20Bに示した配列中で252位のMetはTyrで置換し得る)、あるいは、第2残基は抗体中の該所与の位置に既に存在することがあり、その場合置換は不要である(例えば、252位のMetはMetのままである)。したがって、「修飾抗体」という用語は、前記残基の1個または複数を示した位置に自然に含んだ抗体も包含する(例えば、該残基は、修飾せずに分子中の前記位置に既に存在している)。定常部の位置の付番は、EU指標(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版)に準じている。ヒトIgG1定常部の例示的なヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域は、図20Bに示してあり、付番は上記Kabat等のEU指標に準じている。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、Fc部またはヒンジ-Fc部、最も好ましくはIgG1定常部のアミノ酸残基に対して修飾を含む。幾つかの実施形態では、本発明の「修飾抗体」(例えば、修飾されたIgG定常部、Fc部またはそれらのFcRn結合性断片を含み、生体内半減期が増加した抗体)は、修飾されたIgG定常部、Fc部またはそれらのFcRn結合性断片を含まない同じ抗体と比べ、FcRnに対して高いアフィニティーを有する。他の実施形態では、本発明の修飾抗体(例えば、修飾されたIgG定常部、Fc部またはそれらのFcRn結合性断片を含み、生体内半減期が増加した抗体)は、パリピズマブのFc部と比べ、FcRnに対して高いアフィニティーを有する。本明細書で使用する場合、「修飾抗体」は、高効力、高アフィニティーおよび/または高アビディティーの修飾抗体の場合もあり、そうでない場合もある。ある種の実施形態では、該修飾抗体は高効力抗体であり、最も好ましくは高効力、高アフィニティーの修飾抗体である。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、修飾されたIgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片を含み、252位にTyr、254位にThrおよび256位にGlu(「YTE」)を含む(図35を参照されたい)が、その際付番は上記Kabat等のEU指標に準じている(図20Bも

20

30

40

50

参照されたい)。

【0079】

本明細書で使用する場合、本発明の抗体の定常部またはそのFcRn結合性断片に関する、1個または複数の「アミノ酸残基に対する修飾」は、該抗体の定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)の配列中の1個または複数のアミノ酸残基の任意の変異、置換、挿入または欠失を指す。好ましくは、1個または複数の該修飾は置換である。好ましい実施形態では、1個または複数の該修飾は、位置251~256、285~290、308~314、385~389および428~436でなされるが、その際付番は上記Kabat等のEU指標に準じている(図20Bも参照されたい)。好ましいある種の実施形態では、IgG定常部は、252位にY(252Y)、254位にT(254T)および/または256位にE(256E)を含む。IgG定常部配列中の自然変異のために(例えば、上記のKabat等を参照されたい)、ある種の例では、第1のアミノ酸残基は、所与の位置で第2のアミノ酸残基で置換されることがあり(例えば、図20Bに示した配列中で252位のMetはTyrで置換し得る)、あるいは、第2残基は抗体中の該所与の位置に既に存在することがあり、その場合置換は不要である(例えば、252位のMetはMetのままである)。したがって、IgG定常部における例示的「修飾」、例えば252Y、254Tおよび/または256Eに関する本明細書での考察は、前記残基を指示した位置に自然に含んだ分子(例えば、該残基は分子中の前記位置に既に存在している)、および/または修飾することにより(例えば、アミノ酸置換によって)、前記残基を指示した位置に含んだ分子の両方を包含することを意図している。本明細書で使用するアミノ酸位置の付番は、Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版(「Kabat等」)に記載のEU指標に準じている。

10

20

【0080】

本明細書で使用する場合、「パリビズマブ標準的基準品」("palivizumab standard reference")という用語および類似の用語は、医師用卓上参考書2002年第56版に記載の通り、市販の凍結乾燥パリビズマブを指す。液戻し後のパリビズマブは、例えば以下の賦形剤、即ち47mMヒスチジン、3.0mMグリシンおよび5.6%マンニトールと、濃度100mg/ml溶液の有効成分である該抗体を含み得る。

【0081】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、様々な近似的長さのアミノ酸配列を指示するために使用される。例えば、ペプチドは、ペプチド結合で繋がった2個以上のアミノ酸、一般には約50個未満のアミノ酸残基の連鎖を指すが、ポリペプチドは、それより長いアミノ酸連鎖を指す。タンパク質の一部をなすポリペプチドに関しては、該ポリペプチドは、タンパク質の長さより短いアミノ酸連鎖である。「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基の連鎖の厳密な長さを指すことを意図しておらず、ある場合には、この2語を相互に交換して使用してもよい。

30

【0082】

本明細書で使用する場合の「医薬として許容できる」という用語は、連邦政府または州政府の規制機関により認可されているか、あるいは動物、特に人間に使用するために、米国薬局方、欧州薬局方または他の一般認知された薬局方に掲載されていることを意味する。

40

【0083】

本明細書で使用する場合の「ポリオール」という用語は、通常の糖類と比較して多数の-OH基を含んだ糖を指す。

【0084】

本明細書で使用する場合、「予防する」、「予防すること」および「予防」という用語は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の完全または部分阻害;対象におけるRSVの上気道から下気道への疾患進行、ならびに/あるいはLRI、急性RSV疾患、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態の発現または発症の完全または部分阻害;治療薬(例えば、予防剤または治療剤)の投与で起こる、上気

50



道RSV感染症から下気道RSV感染症への進行、中耳炎、またはそれらに関連する呼吸状態の完全または部分阻害；併用治療薬（例えば、予防剤または治療剤の併用）の投与で起こる、上気道および/または下気道RSV感染症、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態の完全または部分阻害；RSV感染症の完全または部分阻害；急性RSV疾患の完全または部分阻害を指す。

#### 【0085】

本明細書で使用する場合、「予防剤」という用語は、対象におけるRSVの上気道から下気道への疾患進行の発現または発症を予防または阻害することができ、ならびに/あるいはLRI、急性RSV疾患、中耳炎、および/またはRSV感染症に関連する症状もしくは呼吸状態を予防または阻害することができる任意の作用剤であって、上気道RSV感染症、下気道RSV感染症、急性RSV疾患、中耳炎、またはそれらに関連する呼吸状態の予防または阻害が治療薬（例えば、予防剤または治療剤）の投与で起こる、任意の作用剤を指す。該用語は、RSV感染症（例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態（それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含めて）の再発、広がりまたは発症を予防または阻害することも指し、ならびに/あるいは上気道RSV感染症の下気道RSV感染症への進行、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防する。ある種の実施形態では、「予防剤」という用語は本発明の抗体を指す。他のある種の実施形態では、「予防剤」という用語は、本発明の抗体以外の作用剤を指す。好ましくは、予防剤は、急性RSV疾患および/またはLRIを予防し、あるいはRSV感染症（好ましくは、RSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態の発症、発現、進行および/または重度を阻害するために、有用であることが知られており、または使用されてきており、もしくは現に使用されている作用剤である。幾つかの実施形態では、該予防剤は本発明の修飾抗体である。

#### 【0086】

本発明のある種の実施形態では、「予防に有効な血清力価」は、肺のRSV感染症を予防し、ならびに/あるいは対象におけるRSV感染症（例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態の発生率を低下させる、前記対象、好ましくはヒトにおける血清力価である。該用語は、RSV URIおよび/またはLRI、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態（それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含めて）の再発、広がりまたは発症を予防または阻害し、ならびに/あるいは上気道RSV感染症の下気道RSV感染症への進行、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防または阻害する、対象における血清力価も指す。幾つかの実施形態では、予防に有効な該血清力価は、上気道RSV感染症の下気道RSV感染症への進行、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態を予防する。好ましくは、予防に有効な該血清力価は、RSV感染症に起因する合併症を起こしている確率が最も高い人（例えば、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症もしくは後天性免疫不全症の人、骨髄移植を受けたことがある人、乳幼児、または高齢者）における感染症の発生率を低下させる。本発明の他のある種の実施形態では、「予防に有効な血清力価」は、コットンラットにおいて、 $10^5$  pfuの接種後5日のRSV力価を、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体の投与を受けていないコットンラットにおけるRSV  $10^5$  pfuの接種後5日のRSV力価より99%低下させる血清力価である。

#### 【0087】

本明細書で使用する場合、「不応性」という用語は、1種または複数の治療薬（例えば、現在利用可能な治療薬）に反応しない、RSV感染症（例えば、急性RSV疾患、ならびに/あるいはRSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、またはそれらに関連する呼吸状態を指す。ある種の一実施形態では、治療薬に不応性である、RSV感染症（例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、またはそれらに関連する呼吸状態とは、前記のRSV感染症（例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI）、中耳炎、またはそ

れらに関連する呼吸状態に付随する症状の少なくとも相当な部分が、その治療薬によって消失または減少することがないことを意味する。RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する呼吸状態が不応性であるか否かの判定は、該感染症、中耳炎またはそれらに関連する呼吸状態に対して治療薬の有効性を試験するための当分野で公知の任意の方法によって、生体内、生体外のいずれでも行うことができる。

【0088】

「RSV抗原」という用語は、抗体が免疫特異的に結合するRSVポリペプチドを指す。RSV抗原は、RSVポリペプチドまたはその断片の類縁体または誘導体であって、抗体が免疫特異的に結合するものも指す。幾つかの実施形態では、RSV抗原は、RSV F抗原、RSV G抗原またはRSV SH抗原である。

10

【0089】

本明細書で使用する場合の「糖類」という用語は、多価アルコールの誘導体である一群の分子を指す。糖類は通常炭水化物と称され、異なる量の糖(糖類)単位を含んでもよく、例えば単糖類、二糖類および多糖類である。

【0090】

本明細書で使用する場合の「血清力価」という用語は、対象10個体以上、好ましくは20個体以上、最も好ましくは40個体以上で、最大約100、1000体以上までの集団における平均血清力価を指す。

【0091】

本明細書で使用する場合、「副作用」という用語は、治療薬(例えば、予防剤または治療剤)の不要で有害な作用を包含する。不要な作用は必ずしも有害ではない。治療薬(例えば、予防剤または治療剤)の有害作用は、有害または不快または危険なこともあると思われる。副作用の例には、それだけに限らないが、URI、中耳炎、鼻炎、下痢、咳、胃腸炎、喘鳴、悪心、嘔吐、摂食障害、腹部痙攣、発熱、疼痛、体重減少、脱水、脱毛、呼吸困難、不眠、めまい、粘膜炎、神経筋作用、疲労、口渇および食欲不振、投与部位の発疹または腫脹、発熱、悪寒、疲労などのインフルエンザ様症状、消化管障害、ならびにアレルギー反応が挙げられる。患者が受けるその他の不要作用は多数あり、当分野で知られている。そのような多数の作用が、医師用卓上参考書(第58版、2004年)に記載されている。

20

【0092】

「低分子」という用語および類似の用語は、それだけに限らないが、ペプチド、ペプチド模倣物質、アミノ酸、アミノ酸類縁体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類縁体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体、分子量約10,000g/モル未満の有機または無機化合物(即ち、ヘテロ有機および/または有機金属化合物を含む)、分子量約5,000g/モル未満の有機または無機化合物、分子量約1,000g/モル未満の有機または無機化合物、分子量約500g/モル未満の有機または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステルおよび医薬として許容できる他の形態を包含する。

30

【0093】

RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体を含む液体製剤に関して、本明細書で使用する場合の「安定性」および「安定な」という用語は、製造、製剤、輸送および貯蔵の条件下で、製剤中の該抗体が、熱的・化学的アンフォールディング、凝集、分解または断片化に対して示す耐性を指す。本発明の「安定な」製剤は、所与の製造、製剤、輸送および貯蔵の条件下で、80%、85%、90%、95%、98%、99%または99.5%に等しいか、それより高い生物活性を保持している。該抗体の安定性は、それだけに限らないが、還元キャピラリー電気泳導(rCGE)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳導(SDS-PAGE)およびHPSECを含めた当業者に公知の方法によって、基準品、即ち市販凍結乾燥パリビズマブの6%マンニトール含有50mMヒスチジン/3.2mMグリシン緩衝液(pH6.0)中100mg/mlの液戻し品と比較した凝集、分解または断片化の程度により、評価できる。該基準品は、HPSECにより常に単一ピーク(97%の面積)を示す。RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体を含む製剤の総合的安定性は、RSVの特定のエピトープを用いた各種免疫アッセイ、例えばELISAお

40

50

よび放射免疫アッセイによって評価できる。

【0094】

本明細書で使用する場合、「対象」および「患者」という用語は相互に交換して使用される。本明細書で使用する場合、対象は、好ましくは非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)、霊長類(例えば、サルおよびヒト)などの哺乳動物、最も好ましくはヒトである。一実施形態では、該対象は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)または中耳炎の哺乳動物、好ましくはヒトである。別の実施形態では、該対象は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)または中耳炎を発現する危険性のある哺乳動物、好ましくはヒトである(例えば、免疫不全の、もしくは免疫抑制された哺乳動物、または遺伝的素因のある哺乳動物)。一実施形態では、該対象は、RSV感染症に由来、起因または付随する呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴またはRADを含む)のヒトである。幾つかの実施形態では、該対象は、0~5歳、または好ましくは0~2歳(例えば、0~12月齢)の乳幼児である。他の実施形態では、該対象は高齢対象である。

10

【0095】

本明細書で使用する場合の「界面活性剤を実質的に含まない」という用語は、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体の製剤において、界面活性剤を0.0005%未満、0.0003%未満もしくは0.0001%未満、および/または界面活性剤を0.0005%未満、0.0003%未満もしくは0.0001%未満含む製剤を指す。

20

【0096】

本明細書で使用する場合の「塩を実質的に含まない」という用語は、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体の製剤において、無機塩を0.0005%未満、0.0003%未満または0.0001%未満含む製剤を指す。

【0097】

本明細書で使用する場合の「界面活性剤」という用語は、両親媒性構造を有する、即ち、溶解性が反対の基、通常、油性炭化水素鎖および水溶性イオン基からなる有機物質を指す。界面活性剤は、界面活性部の電荷に応じて陰イオン、陽イオンおよび非イオン界面活性剤に分類できる。界面活性剤は、様々な医薬組成物および生物材料調製物のために、湿潤剤、乳化剤、可溶化剤および分散剤として使用されることも多い。

30

【0098】

本明細書で使用する場合、「治療剤」という用語は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の治療、管理または改善に使用できる任意の作用剤を指す。ある種の実施形態では、「治療剤」という用語は本発明の抗体を指す。他のある種の実施形態では、「治療剤」という用語は、本発明の抗体以外の作用剤を指す。好ましくは、治療剤は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、および/またはそれらに関連する1種もしくは複数の症状もしくは呼吸状態の治療、管理または改善のために、有用であることが知られており、または使用されてきており、もしくは現に使用されている作用剤である。ある種の実施形態では、該治療剤は本発明の修飾抗体である。

40

【0099】

本明細書で使用する場合の「相乗的」という用語は、任意の2種以上の単一の治療薬の相加効果より有効な治療薬(例えば、予防剤または治療剤の使用)の併用を指す。例えば、予防剤または治療剤の併用による相乗効果によって、該併用剤の1種もしくは複数の使用用量を減らし、および/またはRSV感染症の対象に対する前記作用剤の投与頻度を減らすことができる。予防用治療薬または治療用治療薬の用量を減らして利用し、および/または前記治療薬の投与頻度を減らすことができるため、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せ)の予防、管理、治療または改善において、前記治療薬の効果を低下させずに、前記治療薬の対象に対する投与

50

に伴う毒性が減少する。その上、相乗効果は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せ)の予防、管理、治療または改善において、治療薬の効力を改善することができる。最後になるが、治療薬(例えば、予防剤または治療剤)の併用による相乗効果によって、任意の単一治療薬の使用に伴う有害または不要な副作用を回避し、または低下させ得る。

#### 【0100】

本発明のある種の実施形態では、「治療上有効な血清力価」とは、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)に伴う重度、持続期間および/または症状を低下させる、前記対象、好ましくはヒトにおける血清力価である。好ましくは、治療上有効な該血清力価は、RSV感染症に起因する合併症を起こしている確率が最も高い人(例えば、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症もしくは後天性免疫不全症の人、骨髄移植を受けたことがある人、乳幼児、または高齢者)におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)に伴う重度、持続期間および/または症状数を低下させる。本発明の他のある種の実施形態では、「治療上有効な血清力価」は、コットンラットにおいて、 $10^5$ pfuの接種後5日のRSV力価を、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体の投与を受けていないコットンラットにおけるRSV  $10^5$ pfuの接種後5日のRSV力価より99%低下させる血清力価である。

#### 【0101】

本明細書で使用する場合、「治療」("therapy")という用語は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せ)の予防、管理、治療および/または改善において使用できる、任意の処方、方法および/または作用剤を指す。ある種の実施形態では、「治療」("therapies"および"therapy")という用語は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せ)の予防、管理、治療および/または改善に有用で、医療要員などの当業者に公知の生物療法、支持療法および/または他の療法を指す。

#### 【0102】

本明細書で使用する場合、「治療する」、「治療」および「治療すること」という用語は、1種または複数の治療薬の投与(それだけに限らないが、本発明の抗体などの1種または複数の予防剤または治療剤の投与を含む)で起こる、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せ)の進行、重度および/または持続期間の減少または改善を指す。特定の実施形態では、このような用語は、RSVの複製の減少または阻害、RSVの他の組織または対象への伝播(例えば、下気道への伝播)の阻害または減少、細胞のRSV感染の阻害または減少、急性RSV疾患の阻害または減少、中耳炎の阻害または減少、LRIからURIへの進行の阻害または減少、RSV感染症に起因または付随する呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の阻害または減少、ならびに/あるいはRSV感染症に付随する1種または複数の症状の阻害または減少を指す。

#### 【0103】

「上気」道という用語は、鼻または鼻孔、鼻腔、口、喉(咽頭)、および発声器(喉頭)を含めた上気道の主要な通気路および構造を指す。

#### 【0104】

本明細書で使用する場合の「生物活性が僅かないし全くない」という用語は、それだけに限らないが、ELISAおよび放射免疫アッセイを含めた各種免疫アッセイで測定した場合、抗体のRSV抗原に対する特異的結合能を含む抗体活性を指す。一実施形態では、本発明の製剤の抗体は、当業者に公知または本明細書に記載の免疫アッセイで測定した際、基準抗体(例えば、パリピズマブ)と比較して、RSV抗原に対する特異的結合能の約50%、好ましくは55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%を保持している。例えば、

ELISA基準アッセイを用いて、抗体のRSV抗原に対する特異的結合能をパリビズマブ基準標準品と比較し得る。このアッセイでは、プレートをRSV抗原で被覆し、設定濃度のパリビズマブ基準標準品の結合シグナルを同濃度の試験抗体の結合シグナルと比較する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0105】

#### 5. 発明の詳細な説明

本発明は、RSV F抗原などのRSV抗原に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有し、下気道感染症だけを予防するのに使用されるパリビズマブの投与量より少ない、またはほぼ等しい投与量で上気道ならびに下気道感染症を低減する上で有効な抗体を提供する。

【0106】

その上、本発明は、上気道RSV感染症(URI)および/または下気道RSV感染症(LRI)の予防、治療および/または改善のために、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有する抗体であって、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、修飾されたFc部もしくはヒンジ-Fc部)中に1個または複数のアミノ酸修飾を含み、そのためIgG定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fcもしくはヒンジ-Fc部)、およびそこに結合する任意の分子の生体内半減期が増加し、その修飾領域を含むIgGまたはそのFcRn結合性断片のFcRnに対するアフィニティーが増加している抗体(即ち、「修飾抗体」)を提供する。該アミノ酸修飾は、ある残基の任意の修飾であってよく(および、幾つかの実施形態では、特定位置の残基は修飾されずに、既に所望の残基を有している)、好ましくは残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数での修飾であり、該修飾は、その修飾領域を含むIgGまたはそのFcRn結合性断片のFcRnに対するアフィニティーを増加させる。他の実施形態では、該抗体は、定常部またはそのFcRn結合性断片において、252位にチロシン(252Y)、254位にスレオニン(254T)、および/または256位にグルタミン酸(256E)を含む(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版(「Kabat等」)に記載のEU指標に従った定常部の付番)。他の実施形態では、該抗体は、定常部またはそのFcRn結合性断片において、252Y、254Tおよび256E(上記Kabat等のEU指標を参照されたい)を含む(以後は「YTE」、例えば図35を参照されたい)。

【0107】

本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)を予防、管理、治療、中和および/または改善する方法であって、高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーでRSV抗原に免疫特異的に結合する、本明細書に示す抗体(修飾または非修飾抗体)の有効量を前記対象に投与することを含む方法を提供する。公知の抗体(例えば、パリビズマブ)の有効血清力価より低くおよび/または持続性である、本発明の抗体の血清力価が、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の予防、管理、治療および/または改善により有効であると思われるので、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の予防、管理、治療および/または改善に有効な血清力価を得るために使用する該抗体の用量は、より少量および/またはより少数、例えばRSV流行期当たり1個または複数の用量で済ませることができる。RSV抗原に免疫特異的に結合する本発明の抗体の用量をより少量および/またはより少数使用するために、有害作用が起こる見込みは減少し、治療の期間に亘って例えば乳幼児に投与しても、より安全である(例えば、公知の抗体(例えば、パリビズマブ)と比較して、血清力価が低く、血清半減期が長く、ならびに/あるいは上気道および/または下気道への局在化が良好なために)。ある種の実施形態では、抗体はRSV流行期当たり1回または2回投与される。

【0108】

したがって、本発明は、公知のRSV抗体(例えば、パリビズマブ)と比較して、高い効力を有し、ならびに/あるいはRSV抗原(好ましくはRSV F抗原)に対する高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有する抗体、および該抗体を使用する方法を提供す

る。幾つかの実施形態では、該抗体は、修飾されたIgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含み、その結果、体内血清半減期の増加が、例えば、修飾されたIgG定常部またはそのFc結合性断片を含んでいない抗体と比較した際に、起こる(例えば、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含んでいない同じ抗体(即ち、同一の非修飾抗体)と比較した際に、あるいはバリビズマブなどの別のRSV抗体と比較した際に)。幾つかの実施形態では、該抗体は、ヒト対象の対象に投与される。ある種の実施形態では、該対象はその療法を必要としている。幾つかの実施形態では、該対象は、自分自身が療法を必要としていることを主観的に認識している。他の実施形態では、該対象は、自分自身が療法を必要としていることを主観的に認識していない。

10

#### 【0109】

特定の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本明細書に記載の抗体、例えば修飾抗体または非修飾抗体(即ち、本発明の抗体)の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、急性RSV疾患または急性RSV疾患への進行を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、RSV感染症に関連する該症状または呼吸状態は、喘息、喘鳴、RAD、鼻詰まり、鼻孔拡大、咳、頻呼吸(咳き込み)、息切れ、発熱、クループ性の咳、またはそれらの組合せである。幾つかの実施形態では、上気道および下気道RSV感染症が、共に予防、治療、管理および/または改善される。好ましい実施形態では、上気道感染症から下気道感染症への進行が、予防、治療、管理および/または改善される。他の好ましい実施形態では、急性RSV疾患または急性RSV疾患への進行が、予防、治療、管理および/または改善される。

20

#### 【0110】

特定の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の有効量と、本発明の抗体以外の治療薬の有効量とを対象に投与することを含む方法を提供する。好ましくは、このような治療薬は、RSV感染症(好ましくは、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、または中耳炎の予防、管理、治療および/または改善に有用である。好ましい実施形態では、本発明の方法に従って予防、治療、管理および/または改善される該中耳炎は、RSV感染症、好ましくはRSV URIおよび/またはLRIに由来し、惹起され、または付随する。

30

40

#### 【0111】

本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の少なくとも第1の用量を対象に投与することにより、前記対象の血清抗体力価を約0.1  $\mu$ g/ml ~ 約800  $\mu$ g/ml、例えば0.1  $\mu$ g/ml ~ 500  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml ~ 250  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml ~ 100  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml ~ 50  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml ~ 25  $\mu$ g/ml、または0.1

50

μg/ml ~ 10 μg/ml とすることを含む方法を提供する。ある種の実施形態では、該血清抗体力価は、少なくとも 0.1 μg/ml、少なくとも 0.2 μg/ml、少なくとも 0.4 μg/ml、少なくとも 0.6 μg/ml、少なくとも 0.8 μg/ml、少なくとも 1 μg/ml、少なくとも 1.5 μg/ml、少なくとも 2 μg/ml、少なくとも 5 μg/ml、少なくとも 10 μg/ml、少なくとも 15 μg/ml、少なくとも 20 μg/ml、少なくとも 25 μg/ml、少なくとも 30 μg/ml、少なくとも 35 μg/ml、少なくとも 40 μg/ml、少なくとも 45 μg/ml、少なくとも 50 μg/ml、少なくとも 55 μg/ml、少なくとも 60 μg/ml、少なくとも 65 μg/ml、少なくとも 70 μg/ml、少なくとも 75 μg/ml、少なくとも 80 μg/ml、少なくとも 85 μg/ml、少なくとも 90 μg/ml、少なくとも 95 μg/ml、少なくとも 100 μg/ml、少なくとも 105 μg/ml、少なくとも 110 μg/ml、少なくとも 115 μg/ml、少なくとも 120 μg/ml、少なくとも 125 μg/ml、少なくとも 130 μg/ml、少なくとも 135 μg/ml、少なくとも 140 μg/ml、少なくとも 145 μg/ml、少なくとも 150 μg/ml、少なくとも 155 μg/ml、少なくとも 160 μg/ml、少なくとも 165 μg/ml、少なくとも 170 μg/ml、少なくとも 175 μg/ml、少なくとも 180 μg/ml、少なくとも 185 μg/ml、少なくとも 190 μg/ml、少なくとも 195 μg/ml、少なくとも 200 μg/ml、少なくとも 250 μg/ml、少なくとも 300 μg/ml、少なくとも 350 μg/ml、少なくとも 400 μg/ml、少なくとも 450 μg/ml、少なくとも 500 μg/ml、少なくとも 550 μg/ml、少なくとも 600 μg/ml、少なくとも 650 μg/ml、少なくとも 700 μg/ml、少なくとも 750 μg/ml、または少なくとも 800 μg/ml である。一実施形態では、予防または治療有効用量は、約 75 μg/ml 以下、約 60 μg/ml 以下の血清抗体力価を生じ、約 50 μg/ml 以下、約 45 μg/ml 以下、約 30 μg/ml 以下、好ましくは少なくとも 2 μg/ml、より好ましくは少なくとも 4 μg/ml、最も好ましくは少なくとも 6 μg/ml の血清抗体力価を生じる。本発明の抗体は、修飾 IgG (例えば、IgG1) 定常部またはその FcRn 結合性断片 (例えば、Fc 部またはヒンジ-Fc 部) を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該抗体は、YTE を含んだ IgG 定常部を含む (例えば、MEDI-524 YTE)。

10

20

30

40

50

#### 【0112】

幾つかの実施形態では、前記血清抗体濃度は、本発明の抗体の第1の用量を投与した後であり、その次の用量を場合により投与する前の約12~24時間に、またはその間、対象中に存在する。幾つかの実施形態では、前記血清抗体濃度は、本発明の抗体の第1の用量を投与した後であり、その次の用量を場合により投与する前のある一定の日数の間、対象中に存在し、前記一定の日数は、約20日~約180日(または、もっと長期)、例えば20日~90日、20日~60日または20日~30日であり、ある種の実施形態では、少なくとも20日、少なくとも25日、少なくとも30日、少なくとも35日、少なくとも40日、少なくとも45日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも75日、少なくとも90日、少なくとも105日、少なくとも120日、少なくとも135日、少なくとも150日、少なくとも165日、少なくとも180日またはそれより長い日数である。ある種の実施形態では、前記血清抗体濃度を生じる該抗体の第1の用量は、約60mg/kg以下、約50mg/kg以下、約45mg/kg以下、約40mg/kg以下、約30mg/kg以下、約20mg/kg以下、約15mg/kg以下、約10mg/kg以下、約5mg/kg以下、約4mg/kg以下、約3mg/kg、約2mg/kg以下、約1.5mg/kg以下、約1.0mg/kg以下、約0.80mg/kg以下、約0.40mg/kg以下、約0.20mg/kg以下、約0.10mg/kg以下、約0.05mg/kg以下、または約0.025mg/kg以下である。幾つかの実施形態では、本発明の抗体の第1用量は、前記血清抗体濃度のいずれか1つを生じる予防または治療有効用量である。一実施形態では、本発明の抗体の第1用量は、持続放出製剤中で、または鼻腔内送達もしくは肺送達により投与される。本発明の抗体は、修飾 IgG (例えば、IgG1) 定常部またはその FcRn 結合性断片 (例えば、Fc 部またはヒンジ-Fc 部) を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくはYTE修飾を含む (例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0113】

本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であっ

て、本発明の抗体の第1用量を対象に投与することにより、前記対象のRSVウイルス肺力価および/またはRSVウイルス唾液力価(本明細書に記載の方法(例えば、実施例6.9)または当分野で公知の他の方法を用いて決定した場合)を、陰性対照、例えばブラシーボを受けた対象と比較して、本発明の抗体の第1用量を投与する前の対象における力価と比較して、または別のRSV抗体(例えば、パリビズマブ)を受けた対象と比較して、低下させることを含む方法も提供する。該抗体が本発明の修飾抗体である実施形態では、減少する該RSVウイルス肺力価および/またはRSVウイルス唾液力価を、IgG定常部に修飾を受けていない同じ抗体と更に比較してもよい。

#### 【0114】

本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の第1用量を対象に投与することにより、前記対象の鼻甲介および/または鼻汁の抗体濃度を約0.01  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約2.5  $\mu\text{g/ml}$  (またはそれより大)とすることを含む方法を提供する。ある種の実施形態では、鼻甲介および/または鼻汁の該抗体濃度は、少なくとも0.01  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.011  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.012  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.013  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.014  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.015  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.016  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.017  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.018  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.019  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.02  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.025  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.03  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.035  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.04  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.05  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.06  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.07  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.08  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.09  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.11  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.115  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.12  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.125  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.13  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.135  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.14  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.145  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.15  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.155  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.16  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.165  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.17  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.175  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.18  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.185  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.19  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.195  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.3  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.4  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.6  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.7  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.8  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.9  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.0  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.3  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.4  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.6  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.7  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.8  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.9  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.0  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.3  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.4  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2.5  $\mu\text{g/ml}$ またはそれより高い濃度である。本発明の抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0115】

幾つかの実施形態では、鼻甲介および/または鼻汁の前記抗体濃度は、本発明の抗体の第1用量を投与した後であり、その次の用量を場合により投与する前の約12~24時間に、またはその間、対象中に存在する。幾つかの実施形態では、鼻甲介および/または鼻汁の前記抗体濃度は、本発明の抗体の第1用量を投与した後であり、その次の用量を場合により投与する前のある一定の日数の間存在し、前記一定の日数は、約20日~約180日(または、もっと長期)、ある種の実施形態では、少なくとも20日、少なくとも25日、少なくとも30日、少なくとも35日、少なくとも40日、少なくとも45日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも75日、少なくとも90日、少なくとも105日、少なくとも120日、少なくとも135日、少なくとも150日、少なくとも165日、少なくとも180日またはそれより長い日数である。ある種の実施形態では、鼻甲介および/または鼻汁の前記抗体濃度を生じる該抗体の第1用量は、約60mg/kg以下、約50mg/kg以下、約45mg/kg以下、約40mg/kg以下、約30mg/kg以下、約20mg/kg以下、約15mg/kg以下、約10mg/kg以下、約5mg/kg以下、約4mg/kg以



下、約3mg/kg、約2mg/kg以下、約1.5mg/kg以下、約1.0mg/kg以下、約0.80mg/kg以下、約0.40mg/kg以下、約0.20mg/kg以下、約0.10mg/kg以下、約0.05mg/kg以下、または約0.025mg/kg以下である。幾つかの実施形態では、本発明の抗体の第1用量は、鼻甲介および/または鼻汁の前記抗体濃度のいずれか1つを生じる予防または治療有効用量である。一実施形態では、本発明の抗体の第1用量は、持続放出製剤中で、ならびに/あるいは鼻腔内送達および/または肺送達により投与される。本発明の抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

【0116】

特定の実施形態では、本発明は、対象におけるRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の抗体の有効量を投与することを含み、該有効量が、鼻甲介および/または鼻汁中のRSV力価を約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍、またはそれより高い倍率で減少させる方法を提供する。鼻甲介および/または鼻汁中のRSV力価の前記減少倍率は、陰性対照(プ  
ラシーボなど)、別療法(それだけに限らないが、パリビズマブによる治療を含む)、抗体投与前の患者における力価、または修飾抗体の場合には、同じ非修飾抗体(例えば、定常部修飾前の同じ抗体)と比較してもよい。本発明の抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

【0117】

本発明は、予防上または治療上有効な血清力価を実現するために、本発明の抗体を用いて上気道内および/または下気道内、あるいは中耳内のRSVを中和する方法であって、前記有効な血清力価が、投与後約20日間、25日間、30日間、35日間、40日間、45日間、約60日  
間、75日間、90日間、105日間、120日間、135日間、150日間、165日間、180日間、またはそれより長期間、他の用量を全く投与せずに30 µg/ml未満(好ましくは約2 µg/ml、より好ましくは約4 µg/ml、最も好ましくは約6 µg/ml)となる方法を提供する。本発明の抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

【0118】

好ましい実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、RSV抗原に対する高いアフィニティーを有する。一実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、公知の抗体(例えば、パリビズマブまたは他の野生型抗体)より、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対する高いアフィニティーを有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)により評価した場合、公知の抗RSV抗体より、RSV抗原に対して20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、90倍、100倍またはそれより高いアフィニティーを有する。より特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)により評価した場合、パリビズマブより、RSV F抗原に

対して20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、90倍、100倍またはそれより高いアフィニティーを有する。好ましい実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)により評価した場合、パリビズマブより、RSV F抗原に対して65倍、好ましくは70倍以上のアフィニティーを有する。これらの実施形態に従えば、該抗体のアフィニティーは、一実施形態ではBIAcoreアッセイにより評価される。

#### 【0119】

一実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、約 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  ~ 約 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (または、それより高い値)の結合速度定数または $k_{on}$ 速度(抗体(Ab)+抗原(Ag)  $\rightarrow$   $k_{on}$   $\rightarrow$  Ab-Ag)を有し、ある種の実施形態では、その値が、少なくとも $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ である。別の実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、公知の抗RSV抗体より1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍または5倍高い $k_{on}$ 速度を有する。好ましい実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、パリビズマブより1倍、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれより高い $k_{on}$ 速度を有する。速度定数およびアフィニティーの個々の計算に関するより詳細な説明は、BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)およびKuby (1994) Immunology, 2<sup>nd</sup> Ed. (W. H. Freeman & Co., New York, NY)に見出すことができる。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0120】

特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-1} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-3} \text{s}^{-1}$ 未満、好ましくは $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-5} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-6} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-7} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-8} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-9} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-10} \text{s}^{-1}$ 未満、または $10^{-10} \text{s}^{-1}$ 未満の $k_{off}$ 速度(Ab-Ag  $\rightarrow$   $k_{off}$   $\rightarrow$  Ab+Ag)を有する。別の実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、公知の抗RSV抗体より1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍または100倍低い $k_{off}$ 速度を有する。好ましい実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、パリビズマブより1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍または100倍以上低い $k_{off}$ 速度を有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0121】

特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、約 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  ~ 約 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (または、それより高い値)の $k_{on}$ を有し、ある種の実施形態では、その値が、少なくとも $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ であり、また $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-1} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-3} \text{s}^{-1}$ 未満、好ましくは $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-4} \text{s}^{-1}$ 未満、 $7.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-5} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-6} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-7} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-8} \text{s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ 未満、 $10^{-9} \text{s}^{-1}$ 未満、5

$\times 10^{-10} \text{s}^{-1}$ 未満、または $10^{-10} \text{s}^{-1}$ 未満の $k_{\text{off}}$ 速度を有する。一実施形態では、本発明の抗体は、パリビズマブより約2倍、約3倍、約4倍もしくは約5倍、またはそれより高い $k_{\text{on}}$ を有する。別の実施形態では、本発明の抗体は、パリビズマブより約2倍、約3倍、約4倍もしくは約5倍、またはそれより低い $k_{\text{off}}$ を有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0122】

特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、約 $10^2 \text{M}^{-1}$ ～約 $5 \times 10^{15} \text{M}^{-1}$ のアフィニティー定数または $K_a(k_{\text{on}}/k_{\text{off}})$ を有し、ある種の実施形態では、それが少なくとも $10^2 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^3 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^4 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^5 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^8 \text{M}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^9 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} \text{M}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{15} \text{M}^{-1}$ である。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0123】

一実施形態では、本発明の方法に従って使用する該抗体は、 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 未満、 $10^{-2} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 未満、 $10^{-3} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 未満、 $10^{-4} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 未満、 $10^{-5} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 未満、 $10^{-6} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 未満、 $10^{-7} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 未満、 $10^{-8} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 未満、 $10^{-9} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 未満、 $10^{-10} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 未満、 $10^{-11} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 未満、 $10^{-12} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 未満、 $10^{-13} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 未満、 $10^{-14} \text{M}$ 未満、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 未満、 $10^{-15} \text{M}$ 未満、または $5 \times 10^{-16} \text{M}$ 未満の解離定数または $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ を有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0124】

特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)を用いて評価した場合、3000pM未満、2500pM未満、2000pM未満、1500pM未満、1000pM未満、750pM未満、500pM未満、250pM未満、200pM未満、150pM未満、100pM未満、75pM未満の解離定数( $K_d$ )を有する。別の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)を用いて評価した場合、25～3400pM、25～3000pM、25～2500pM、25～2000pM、25～1500pM、25～1000pM、25～750pM、25～500pM、25～250pM、25～100pM、25～75pM、25～50pMの解離定数( $K_d$ )を有する。別の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、本明細書に記載または当業者に公知の技法(例えば、BIAcoreアッセイ)を用いて評価した場合、500pM、好ましくは100pM、より好ましくは75pM、最も好ましくは50pMの解離定数( $K_d$ )を有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0125】

本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、ならびに/あるいは上気道および/または下気道、中耳のRSV感染症および/またはRSV疾患に関連する1種または複数の症状を予防、管理、治療および/または改善するための方法であって、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、例えばパリビズマブなどの公知の抗体より高いアフィニティーおよび/または高いアビディティを有する、本発明の1種または複数の抗体(例えば、1種または複数のRSV抗原に対して約 $2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  ~ 約 $5 \times 10^{12} \text{M}^{-1}$ (またはそれより高い値)、好ましくは、少なくとも $2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $2.5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^9 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} \text{M}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^{12} \text{M}^{-1}$ のアフィニティを有する抗体または抗体断片)を含んだ組成物を対象に投与する(例えば、肺送達または鼻腔内送達により)ことを含む方法も提供する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

10

20

30

40

50

#### 【0126】

$\text{IC}_{50}$ は、生体外微量中和アッセイでRSVの50%を中和する抗体の濃度である。ある種の実施形態では、該微量中和アッセイは、本明細書に記載されている(例えば、本明細書の実施例6.4、6.8および6.18に記載)か、またはJohnson et al., 1999, J. Infectious Diseases 180: 35-40に記載の微量中和アッセイである。特定の実施形態では、本発明の方法に従って使用される該抗体は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、生体外微量中和アッセイにおいて6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満、1.75nM未満、1.5nM未満、1.25nM未満、1nM未満、0.75nM未満、0.5nM未満、0.25nM未満、0.1nM未満、0.05nM未満、0.025nM未満、または0.01nM未満の中央値阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ )を有する。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0127】

本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に使用する任意のVH鎖のアミノ酸配列を有する重鎖可変(VH)鎖を含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に列挙する任意のVH部のアミノ酸配列を有するVH部を含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、更に、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2および/または表3A~3Cに列挙する1個または複数のVH CDRのアミノ酸配列を有する1個または複数の(例えば、1個、2個または3個)のVH相補性決定領域(CDR)を含む抗体の使用も包含する。好ましい実施形態では、該抗体は、図13Aに示すものと同様のVHフレームワーク領域を含む。他の実施形態では、該抗体は、図1Bに示すVHフレームワーク領域と同様のVHフレームワーク領域を含む。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0128】

本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に使用する任意のVL鎖のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)鎖を含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に列挙する任意のVL部のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)部を含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2および/または表3D~3Fに列挙する1個または複数のVL CDRのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDRを含む抗体の使用も包含する。好ましい実施形態では、該抗体は、図13Bに示すものと同様のVLフレームワーク領域を含む。他の実施形態では、該抗体は、図1

Aに示すものと同一のVHフレームワーク領域を含む。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

【0129】

本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に列挙する任意のVH鎖のアミノ酸配列を有するVH鎖と、表2に列挙する任意のVL鎖のアミノ酸配列を有するVL鎖とを含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2に列挙する任意のVH部および任意のVL部のアミノ酸配列を有するVH部およびVL部を含む抗体の使用も包含する。本発明の方法は、更に、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体、即ち表2および/または表3A~3Fに列挙する、1個または複数のVH CDRおよび1個または複数のVL CDRのアミノ酸配列を有する、任意の1個または複数(例えば、1個、2個または3個)のVH CDRならびに任意の1個または複数(例えば、1個、2個または3個)のVL CDRを含む抗体の使用も包含する。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

【0130】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は表2に列挙する抗体の使用を包含する。ある種の実施形態では、表2に列挙する該抗体は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む。好ましい実施形態では、本発明の方法は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)抗体またはその修飾抗体の使用を含む。一実施形態では、該抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体のVHおよび/またはVLの各部(複数も)または各鎖(複数も)を含む。ある種の実施形態では、該A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む。好ましい実施形態では、該A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体は、YTEを含んだ、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。

【0131】

したがって、本発明の方法は、公知の抗RSV抗体と比較して、例えば、修飾抗体のFc部とFcRn受容体との相互作用に關与することが確認されたアミノ酸残基における1個または複数の修飾の結果、生体内半減期が増加した前記修飾抗体の使用を包含する。一実施形態では、本発明の方法は、高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーでRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体(例えば、RSV F抗原に対してパリビズマブより高いアフィニティーおよび/またはアビディティーを有し、それだけに限らないが、表2に記載のものを含めた抗体)であって、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、該修飾IgG定常部のために、修飾IgG定常部を含まない同じ抗体、またはパリビズマブのFc部などの別のRSV抗体と比較して、該修飾IgG定常部のFcRnに対するアフィニティーが増加している抗体の使用を包含する。この実施形態によれば、前記修飾抗体のFc部のアフィニティーが増加した結果、前記修飾抗体の生体内半減期が約20日~約180日(または、それより長期)となり、幾つかの実施形態では、それは少なくとも20日、少なくとも25日、少なくとも30日、少なくとも35日、少なくとも40日、少なくとも45日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも75日、少なくとも90日、少なくとも105日、少なくとも120日、少なくとも135日、少なくとも150日、少なくとも165日、少なくとも180日またはそれより長期である。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVHおよびVLの各部もしくは各鎖、またはそのFcRn結合性断片、ならびに、例えばパリビズマブのFc部と比較して、FcRn受容体に対するアフィニティーが増加しているFc部を含む。ある種の実施形態では、該修飾抗体はYTE修飾を含む。

【0132】

本発明の方法は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し

、しかもPEG化されている1種または複数の抗体(修飾または非修飾)の使用を包含する。一実施形態では、本発明の方法は、高いアビディティーおよび/または高いアフィニティー(例えば、RSV F抗原に対してパリピズマブより高いアフィニティー)でRSV抗原(好ましくは、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、それだけに限らないが、表2に記載のものを含めた1種または複数のPEG化抗体の使用を包含する。好ましい実施形態では、該抗体は、PEG化A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体またはその抗原結合性断片である。

#### 【0133】

一実施形態では、本発明の方法は、より高いアフィニティーおよび/または高いアビディティー(例えば、パリピズマブより高い)でRSV抗原に免疫特異的に結合する、1種または複数のPEG化抗体の使用を包含する。特定の実施形態では、該PEG化抗体は、表2記載の抗体のVHおよび/またはVLの各部または各鎖を含む。好ましい実施形態では、該PEG化抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVHおよび/またはVLの各部もしくは各鎖、あるいはその抗原結合性断片を含む。一実施形態では、該抗体は、表2記載の抗体のVHおよび/またはVLの各部または各鎖を含む。好ましい実施形態では、該PEG化抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のVH鎖およびVL鎖を含む。ある種の実施形態では、該PEG化抗体は修飾PEG化抗体である。

#### 【0134】

### 5.1 抗体

RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は、当分野で知られていることは認識されたい。例えば、パリピズマブは、小児患者におけるRSV感染症の予防に現在使用されているヒト化モノクローナル抗体である。本発明は、本発明の抗RSV抗体(好ましくは、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)またはその抗原結合性断片)の有効量を対象に投与することによって、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法を提供する。

#### 【0135】

本発明は、本発明の抗RSV抗体の有効量を対象に投与することによって、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、該抗体が、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む方法も提供する。好ましい実施形態では、該修飾抗体が、修飾されたA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体(例えば、MEDI-524-YTE)である。該アミノ酸修飾は、ある残基の任意の修飾であってよく(および、幾つかの実施形態では、特定位置の残基は修飾されずに、既に所望の残基を有している)、好ましくは残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数の修飾であり、該修飾は、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)、およびそれに結合する任意の分子の生体内半減期を増加させ、該修飾IgGまたはその断片のFcRnに対するアフィニティーを増加させる。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、上記Kabat等に記載のEU指標に従った付番を用いると、第2定常CH2部(ヒトIgG1の残基231~340)(例えば、配列番号339)(例えば図20Bを参照されたい)および/または第3定常CH3部(ヒトIgG1の残基341~447)(例えば、配列番号340)(例えば図20Bを参照されたい)において1個または複数のアミノ酸修飾を有する。ある種の実施形態では、該抗体は、定常部またはそのFcRn結合性断片において、252位にチロシン(252Y)、254位にスレオニン(254T)、および/または256位にグルタミン酸(256E)(例えば、M252Y、S254Tおよび/またはT256Eの変異を含む(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版に記載のEU指標を参照されたい)。

#### 【0136】

以下に本発明の各種態様内に包含される抗体に関して、より詳細に説明する。

## 【 0 1 3 7 】

本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合する抗体(修飾および非修飾)を提供する。好ましくは、本発明の抗体は、RSVの株に依らず1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合する。本発明は、1つのRSV株由来のRSV抗原に、別のRSV株に対して示差的または選択的に結合する抗体も提供する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSV Fの糖タンパク質、G糖タンパク質またはSHタンパク質に免疫特異的に結合する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV Fの糖タンパク質に免疫特異的に結合する。別の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV F糖タンパク質のA、BまたはC抗原部位に結合する。

## 【 0 1 3 8 】

本発明の抗体は、それだけに限らないが、モノクローナル抗体、多重特異抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単一部抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fvs (scFv)一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fvs (sdFv)細胞内抗体、および抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、ならびに前記いずれものエピトープ結合性断片を含む。特に、本発明の抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫活性部、即ちRSV抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含んだ分子を包含する。本発明の免疫グロブリン分子は、いずれのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、いずれのクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)、またはいずれのサブクラスの免疫グロブリン分子であってもよい。特定の実施形態では、本発明の抗体(修飾および非修飾)は、IgG抗体、好ましくはIgG1抗体である。別の特定の実施形態では、本発明の抗体はIgA抗体ではない。

## 【 0 1 3 9 】

本発明の抗体は、鳥類および哺乳類(例えば、ヒト、げっ歯類、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリ)を含めて任意の動物源に由来してもよい。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトの、またはヒト化したモノクローナル抗体である。本明細書で使用する場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリー、またはヒト遺伝子由来の抗体を発現するマウスから単離した抗体を含む。

## 【 0 1 4 0 】

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはより大きな多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は、RSVポリペプチドの異なるエピトープに特異的でもよく、またはRSVポリペプチドならびに異種ポリペプチドや固体支持物質などの異種エピトープの両方に特異的でもよい。例えば、PCT公報の国際公開第93/17715号、国際公開第92/08802号、国際公開第91/00360号および国際公開第92/05793号、Tutt, et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991)、米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号および第5,601,819号、ならびにKostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)を参照されたい。

## 【 0 1 4 1 】

特定の実施形態では、本発明の方法に使用する抗体は、二重特異性T細胞関与抗体(bispecific T cell engager)(BiTE)である。二重特異性T細胞関与抗体(BiTE)は、標的の抗原特異的除去のためにT細胞を誘導し直すことができる二重特異性抗体である。BiTE分子は、T細胞抗原(例えば、CD3)に結合する抗原結合部をその分子の一端に有し、更に標的細胞上の抗原に結合することになる抗原結合部を有する。BiTE分子は、参照により本明細書に組み込まれている国際公報の国際公開第99/54440号に最近記載された。この公報には、CD19およびCD3抗原(CD19×CD3)に対する結合部位を含む、新規な単鎖多機能ポリペプチドが記載されている。この分子は、2種の抗体、B細胞上のCD19に結合する抗体およびT細胞上のCD3に結合する抗体から誘導された。これらの異なる抗体の可変領域は、ポリペプチド配列により連結され、したがって単一分子を創出している。重鎖(VH)可変部および軽鎖(VL)可変部が柔軟なリンカーで連結されることにより、単鎖二重特異性抗体を創出していることも記載されている。

## 【0142】

本発明の一実施形態では、RSVポリペプチドを免疫特異的に結合する抗体またはリガンドが、BiTE分子の一部を構成することになる。例えば、RSVポリペプチドを結合する抗体のV<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>が、前記分子などの抗CD3結合部と融合することにより、該RSVポリペプチドを標的とするBiTE分子を創出することができる。RSVポリペプチドに対する抗体のVH部および/またはVL部以外に、該RSVポリペプチドを結合する他の分子もBiTE分子を構成することができる。別の実施形態では、該BiTE分子は、他のT細胞抗原(CD3以外の)に結合する分子を含むことができる。例えば、CD2、CD4、CD8、CD11a、TCR、CD28などのT細胞抗原に免疫特異的に結合するリガンドおよび/または抗体は、本発明の一部をなすと想定している。この羅列は、徹底的なものではなく、T細胞抗原に免疫特異的に結合できる他の分子がBiTE分子の一部として使用できることを、単に例示することを意図している。このような分子には、該抗体のVH部および/またはVL部、あるいは天然リガンド(例えば、CD3を天然リガンドとするLFA3)を挙げることができる。

10

## 【0143】

ある種の実施形態では、本発明で使用するべき抗体は、細胞内エピトープと結合する、即ち細胞内抗体である。細胞内抗体は、抗原に免疫特異的に結合できる抗体の少なくとも一部を含んでおり、好ましくはその分泌をコードする配列を含有していない。このような抗体は、細胞内で抗原と結合するであろう。一実施形態では、該細胞内抗体は一本鎖Fv(「scFv」)を含んでいる。scFvは、抗体のVH部およびVL部を含み、この両部が1本のポリペプチド鎖中に存在している抗体断片である。一般に、scFvポリペプチドは、VH部およびVL部の間にポリペプチドリinkerを更に含み、そのためscFvが所望の抗原結合構造を形成できる。scFvの総説としては、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)中のPluckthunを参照されたい。更なる実施形態では、該細胞内抗体は、作動可能な分泌配列をコードしておらず、したがって細胞内に留まっているのが好ましい(全般的には、Marasco, WA, 1998, Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications, Springer: New Yorkを参照されたい)。

20

## 【0144】

本発明は、本明細書に記載のアッセイで高い効力を示す抗体を提供する。高効力抗体は、同時係属中の米国特許出願第60/168,426号、第60/186,252号、米国出願公開第2002/0098189号、および米国特許第6,656,467号(それらの全体を参照により本明細書に組み込んでいる)に開示した方法、ならびに本明細書に記載の方法によって産生できる。例えば、高効力抗体は、適当な抗体遺伝子配列を遺伝子操作し、適切な宿主中に該抗体配列を発現させることにより、産生できる。産生した該抗体をスクリーニングすることにより、例えば、BIAcoreアッセイで高い $k_{on}$ 値を有する抗体を特定することができる。

30

## 【0145】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、当分野で公知または本明細書に記載のアッセイ(例えば、BIAcoreアッセイ)で評価した場合、パリビズマブまたはその抗体結合性断片より、およそ20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、90倍、100倍またはそれより高い、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対するアフィニティーを有する。別の実施形態では、本発明の抗体は、当分野で公知または本明細書に記載のアッセイで評価した場合、パリビズマブまたはその抗原結合性断片より、およそ1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、またはそれより倍率の高い $K_D$ を有する。別の実施形態では、本発明の抗体は、生体外微量中和アッセイにおいて、パリビズマブまたはその抗原結合性断片より、およそ1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、または20倍以上効力が高い。ある種の実施形態では、該微量中和アッセイは、本明細書に記載されている(例えば、本明細書の実施例6.4、6.8および6.18に記載)か、またはJohnson et al., 1999, J. Infectious Diseases 180: 35-40に記載の微量中和アッセイである。パリビズマブのアミノ酸配列は、例えば、Johnson et al., 1997, J. Infectious Diseases 176: 1215-1224および米国特

40

50



許第5,824,307号に開示されており、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、配列番号7のVH部(もしくは配列番号208のVH鎖)および/または配列番号8のVL部(もしくは配列番号209のVL鎖)を含む抗体である。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、配列番号7のVH部(もしくは配列番号208のVH鎖)および/または配列番号8のVL部(もしくは配列番号209のVL鎖)を含む抗体である。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。他の実施形態では、本発明の修飾抗体は、修飾パリビズマブ抗体であるか、あるいは配列番号7のVH部(もしくは配列番号208のVH鎖)および/または配列番号8のVL部(もしくは配列番号209のVL鎖)を含む修飾抗体である。

10

【0146】

本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、図1に示す軽鎖可変(VL)部および/または重鎖可変(VH)部あるいは可変軽鎖および/または可変重鎖中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有するパリビズマブのアミノ酸配列を含む抗体を提供する。本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、1個もしくは複数のVL CDRおよび/または1個もしくは複数のVH CDR中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有するパリビズマブのアミノ酸配列を含む抗体も提供する。特定の実施形態では、抗体は、表1の太字および下線で示したアミノ酸残基の1個または複数のアミノ酸残基置換を有するパリビズマブのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、抗体は、表1の太字および下線で示したアミノ酸残基の1個または複数のアミノ酸残基置換と、パリビズマブの可変部のフレームワーク領域の1個または複数のアミノ酸残基置換(例えば、重鎖および/または軽鎖可変部のフレームワーク領域4における変異)とを有するパリビズマブのアミノ酸配列を含む。このような実施形態によれば、該アミノ酸残基置換は保存的、非保存的のいずれでもよい。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。パリビズマブのVH部、VH CDR、VL部および/またはVL CDR中に置換を導入することにより生成した該抗体は、例えば、RSV F抗原に対する結合能、RSVに対する中和能、あるいはRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する能力について、生体外および/または生体内で試験することができる。ある種の実施形態では、該抗体は、パリビズマブのVH鎖および/またはVL鎖を含んでいない。幾つかの実施形態では、該抗体は、パリビズマブのVH部および/またはVL部を含んでいない。他の実施形態では、該抗体は、パリビズマブのVH CDR1、VH CDR2および/またはVH CDR3を含んでいない。更に他の実施形態では、該抗体は、パリビズマブのVL CDR1、VL CDR2および/またはVL CDR3を含んでいない。特定の実施形態では、該抗体はパリビズマブではない。

20

30

## 【表 1】

表1.パリビズマブのCDR配列

CDR	配列*	配列番号
VH1	<u>T</u> <u>S</u> GMSVG	1
VH2	DIWWDD <u>DKK</u> DYNPSL <u>K</u> <u>S</u>	2
VH3	<u>S</u> MITN <u>W</u> YFDV	3
VL1	<u>K</u> CQLSVGYMH	4
VL2	D <u>T</u> SKLAS	5
VL3	FQGS <u>G</u> YP <u>F</u> T	6

10

\*太字及び下線のアミノ酸残基は、置換されるべき好ましい残基である。

## 【0147】

本発明の抗体は、表2、実施例の項、および本願中の他所で言及した抗体および抗体の抗原結合性断片を包含する。全例において、該抗体は、修飾抗体(即ち、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む)であってもよく、あるいは非修飾抗体(即ち、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含まない)であってもよい。特定の実施形態では、本発明の抗体は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4抗体である。別の実施形態では、本発明の抗体は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の抗原結合性断片(例えば、Fab断片)を含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)抗体またはその抗原結合性断片である。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

20

30

## 【0148】

幾つかの実施形態では、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4抗体は、パリビズマブのフレームワーク領域を含む(図1を参照)。好ましい実施形態では、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4抗体は、パリビズマブのフレームワーク領域を含むが、但し、重鎖フレームワーク4(FR4)中のA105Q(Kabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版)(即ち、配列番号7(パリビズマブVH部)の112位)、および軽鎖FR4中のL104V(即ち、配列番号8(パリビズマブVL部)の103位)のアミノ酸置換を例外とする。このようなVHおよびVLの単一変異を有するフレームワークを含む抗体の例が、図2(1X-493L1FR)および図13(MEDI-524)に示されている。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

40

## 【0149】

50

特定の実施形態では、本発明は、1種または複数のRSV F抗原に免疫特異的に結合し、AFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4のVH鎖および/またはVL鎖のアミノ酸配列を有するVH鎖および/またはVL鎖を含む、1種または複数の抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、前記抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のVH鎖および/またはVL鎖のアミノ酸配列を有するVH鎖および/またはVL鎖を含む。別の実施形態では、本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、AFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4のVH部および/またはVL部のアミノ酸配列を有するVH部および/またはVL部を含む、1種または複数の抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、前記抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のVH部および/またはVL部のアミノ酸配列を有するVH部および/またはVL部を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

**【0150】**

別の実施形態では、本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、AFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4の1個、2個、3個もしくはより多数個のCDRのアミノ酸配列を有する1個、2個、3個もしくはより多数個のCDRを含む、抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、前記抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)の1個、2個、3個またはより多数個のCDRのアミノ酸配列を有する1個、2個、3個またはより多数個のCDRを含む。別の実施形態では、本発明は、1種または複数のRSV F抗原に免疫特異的に結合し、AFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4のVH CDRおよび/またはVL CDRのアミノ酸配列を有するVH CDRおよび/またはVL CDRの組合せを含む、1種または複数の抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、前記抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のVH CDRおよび/またはVL CDRのアミノ酸配列を有するVH CDRおよび/またはVL CDRの組合せを含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

20

30

**【0151】**

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH鎖を含む抗体を提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

40

**【0152】**

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH部を含む抗体も提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

50

## 【 0 1 5 3 】

本発明は、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合し、表2および/または表3A～3Cに列挙したVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR(例えば、VH CDR1、VH CDR2および/またはVH CDR3)を含む抗体も提供する。本発明のある種の実施形態では、表2および/または表3A～3Cに列挙したVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む抗体は、パリビズマブではない。幾つかの実施形態では、該抗体は、表2および/または表3A～3Cに列挙したVH CDRの1種、2種または3種を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。幾つかの実施形態では、表2および/または表3A～3Cに列挙したVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む修飾抗体は、修飾されたパリビズマブである。

【表 2】

表2.抗体およびその断片

抗体名	VH鎖	VH ドメイン	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL鎖	VL ドメイン	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
**パリビズマブ	SEQ ID NO:208	SEQ ID NO:7	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:209	SEQ ID NO:8	KCQLSVGYMH (SEQ ID NO:4)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:6)
***AFFf	SEQ ID NO:210	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:211	SEQ ID NO:13	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:16)
***P12f2	SEQ ID NO:212	SEQ ID NO:17	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYN PSLKD (SEQ ID NO:19)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:213	SEQ ID NO:21	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTEYLSS (SEQ ID NO:23)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:24)
***P12f4	SEQ ID NO:214	SEQ ID NO:24	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYN PSLKD (SEQ ID NO:25)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:215	SEQ ID NO:26	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTRGLPS (SEQ ID NO:27)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:28)
***P11d4	SEQ ID NO:216	SEQ ID NO:28	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYN PSLKD (SEQ ID NO:25)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:217	SEQ ID NO:30	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTMRLAS (SEQ ID NO:32)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:33)
***A1e9	SEQ ID NO:218	SEQ ID NO:33	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYN PSLKD (SEQ ID NO:25)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:219	SEQ ID NO:34	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTEKLSS (SEQ ID NO:35)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:36)
***A12a6	SEQ ID NO:220	SEQ ID NO:36	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKD (SEQ ID NO:37)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:221	SEQ ID NO:38	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTEKLSS (SEQ ID NO:35)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:40)
***A13c4	SEQ ID NO:222	SEQ ID NO:40	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKRSYN PSLKD (SEQ ID NO:41)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:223	SEQ ID NO:42	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:44)
***A17d4	SEQ ID NO:224	SEQ ID NO:44	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKRSYN PSLKD (SEQ ID NO:45)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:225	SEQ ID NO:46	LPSSRVGYMH (SEQ ID NO:47)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:48)
***A4B4	SEQ ID NO:226	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYN PSLKD (SEQ ID NO:19)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:227	SEQ ID NO:49	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTEFLDS (SEQ ID NO:50)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:51)
***A8c7	SEQ ID NO:228	SEQ ID NO:51	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKRSYN PSLKD (SEQ ID NO:45)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:229	SEQ ID NO:52	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTRYQSS (SEQ ID NO:53)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:54)
*IX- 493LlFR	SEQ ID NO:230	SEQ ID NO:343	TSGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:231	SEQ ID NO:54	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGGYPFPT (SEQ ID NO:6)

10

20

30

40

*H3-3F4	SEQ ID NO:232	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:233	SEQ ID NO:56	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*M3H9	SEQ ID NO:234	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:235	SEQ ID NO:70	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTYKQTS (SEQ ID NO:57)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*Y10H6	SEQ ID NO:236	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:237	SEQ ID NO:58	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTRYLSS (SEQ ID NO:59)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*DG (aka D95/G93)	SEQ ID NO:238	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:239	SEQ ID NO:56	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
AFFF(1)	SEQ ID NO:240	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:241	SEQ ID NO:60	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*6H8	SEQ ID NO:242	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:243	SEQ ID NO:62	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:63)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*L1-7E5	SEQ ID NO:244	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:245	SEQ ID NO:64	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*L2-15B10	SEQ ID NO:246	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:247	SEQ ID NO:65	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:66)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*A13a11	SEQ ID NO:248	SEQ ID NO:67	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:2)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:249	SEQ ID NO:68	SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:31)	DTYRHSS (SEQ ID NO:69)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
*A1h5	SEQ ID NO:250	SEQ ID NO:33	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:25)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:251	SEQ ID NO:71	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:72)	DTEFHRS (SEQ ID NO:73)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
A4B4(1)	SEQ ID NO:252	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:19)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:253	SEQ ID NO:74	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTLLDLS (SEQ ID NO:75)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
***A4B4L1F R-S28R (aka MEDI-524)	SEQ ID NO:254	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:19)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:255	SEQ ID NO:11	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
***A4B4- F52S	SEQ ID NO:256	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYN PSLKS (SEQ ID NO:19)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:257	SEQ ID NO:76	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	DTSFLDS (SEQ ID NO:77)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)

10

20

30

40

***A17d4(1)	SEQ ID NO:222	SEQ ID NO:40	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:41)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:225	SEQ ID NO:46	LPSSRVGYMH (SEQ ID NO:47)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:5)
***A3e2	SEQ ID NO:303	SEQ ID NO:304	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:305)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:306	SEQ ID NO:307	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	DTFYLHS (SEQ ID NO:308)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:6)
***A14a4	SEQ ID NO:309	SEQ ID NO:310	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:45)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:311)	SEQ ID NO:312	SEQ ID NO:313	LLSSRVGYMH (SEQ ID NO:314)	DTYIOTS (SEQ ID NO:315)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:7)
***A16b4	SEQ ID NO:316	SEQ ID NO:317	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:19)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:318	SEQ ID NO:319	LLSSRVGYMH (SEQ ID NO:320)	DTMYQAS (SEQ ID NO:321)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:8)
***A17b5	SEQ ID NO:322	SEQ ID NO:323	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:19)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:324	SEQ ID NO:325	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTYILPS (SEQ ID NO:326)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:9)
***A17f5	SEQ ID NO:327	SEQ ID NO:328	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:329)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:330	SEQ ID NO:331	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	DTERHTS (SEQ ID NO:332)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:10)
***A17h4	SEQ ID NO:218	SEQ ID NO:33	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKKSYN PSLKD (SEQ ID NO:25)	DMIFENWFYFDV (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:333	SEQ ID NO:334	SPSSSVGYMH (SEQ ID NO:335)	DTYILAS (SEQ ID NO:336)	FOGSGYPFT (SEQ ID NO:11)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である、産生したFab断片(\*)；産生したモノクローナル抗体(\*\*)；  
産生したFab断片およびモノクローナル抗体(\*\*\*)。

【表 3】

表3A-VH CDR1配列

TSGMSVG (SEQ ID NO:1)
TAGMSVG (SEQ ID NO:10)
TPGMSVG (SEQ ID NO:18)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。

表3B-VH CDR2配列

DIWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:2)	DIWWDGKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:100)
DIWDDKKDYNPSLKD (SEQ ID NO:86)	DIWWDGKKDYNPSLKD (SEQ ID NO:103)
DIWDDKKHHYNPSLKS (SEQ ID NO:82)	DIWWDGKKHHYNPSLKS (SEQ ID NO:106)
DIWDDKKHHYNPSLKD (SEQ ID NO:19)	DIWWDGKKHHYNPSLKD (SEQ ID NO:25)
DIWDDKKSYNPSLKS (SEQ ID NO:109)	DIWWDGKKSYNPSLKS (SEQ ID NO:114)
DIWDDKKSYNPSLKD (SEQ ID NO:111)	DIWWDGKKSYNPSLKD (SEQ ID NO:41)
DIWDDKKGDYNPSLKS (SEQ ID NO:384)	DIWWDGKKGDYNPSLKS (SEQ ID NO:390)
DIWDDKKGDYNPSLKD (SEQ ID NO:385)	DIWWDGKKGDYNPSLKD (SEQ ID NO:391)
DIWDDKKGHYNPSLKS (SEQ ID NO:386)	DIWWDGKKGHYNPSLKS (SEQ ID NO:392)
DIWDDKKGHYNPSLKD (SEQ ID NO:387)	DIWWDGKKGHYNPSLKD (SEQ ID NO:393)
DIWDDKKGSYNPSLKS (SEQ ID NO:388)	DIWWDGKKGSYNPSLKS (SEQ ID NO:394)
DIWDDKKGSYNPSLKD (SEQ ID NO:389)	DIWWDGKKGSYNPSLKD (SEQ ID NO:395)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。

表3C-VH CDR3配列

SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:3)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:83)
SMITNWFYFDV (SEQ ID NO:12)	DMITNWFYFDV (SEQ ID NO:29)
SMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:94)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:79)
SMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:97)	DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:20)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。



表3D-VL CDR1配列

KCQLSVGYMH (SEQ ID NO:4)	SCQLSVGYMH (SEQ ID NO:127)	LCQLSVGYMH (SEQ ID NO:204)
KCQLRVGYMH (SEQ ID NO:87)	SCQLRVGYMH (SEQ ID NO:132)	LCQLRVGYMH (SEQ ID NO:206)
KCQLFVGYMH (SEQ ID NO:396)	SCQLFVGYMH (SEQ ID NO:436)	LCQLFVGYMH (SEQ ID NO:476)
KCQSSVGYMH (SEQ ID NO:80)	SCQSSVGYMH (SEQ ID NO:129)	LCQSSVGYMH (SEQ ID NO:205)
KCQSRVGYMH (SEQ ID NO:84)	SCQSRVGYMH (SEQ ID NO:130)	LCQSRVGYMH (SEQ ID NO:203)
KCQSFVGYMH (SEQ ID NO:397)	SCQSFVGYMH (SEQ ID NO:437)	LCQSFVGYMH (SEQ ID NO:477)
KCQVSVGYMH (SEQ ID NO:398)	SCQVSVGYMH (SEQ ID NO:438)	LCQVSVGYMH (SEQ ID NO:478)
KCQVRVGYMH (SEQ ID NO:399)	SCQVRVGYMH (SEQ ID NO:439)	LCQVRVGYMH (SEQ ID NO:479)
KCQVFVGYMH (SEQ ID NO:400)	SCQVFVGYMH (SEQ ID NO:440)	LCQVFVGYMH (SEQ ID NO:480)
KCSLSVGYMH (SEQ ID NO:112)	SCSLSVGYMH (SEQ ID NO:142)	LCSLSVGYMH (SEQ ID NO:196)
KCSL RVGYMH (SEQ ID NO:119)	SCSL RVGYMH (SEQ ID NO:148)	LCSL RVGYMH (SEQ ID NO:198)
KCSL FVGYMH (SEQ ID NO:401)	SCSL FVGYMH (SEQ ID NO:441)	LCSL FVGYMH (SEQ ID NO:481)
KCSSSVGYMH (SEQ ID NO:115)	SCSSSVGYMH (SEQ ID NO:144)	LCSSSVGYMH (SEQ ID NO:197)
KCSSRVGYMH (SEQ ID NO:117)	SCSSRVGYMH (SEQ ID NO:146)	LCSSRVGYMH (SEQ ID NO:195)
KCSSFVGYMH (SEQ ID NO:402)	SCSSFVGYMH (SEQ ID NO:442)	LCSSFVGYMH (SEQ ID NO:482)
KCSVSVGYMH (SEQ ID NO:403)	SCSVSVGYMH (SEQ ID NO:443)	LCSVSVGYMH (SEQ ID NO:483)
KCSVRVGYMH (SEQ ID NO:404)	SCSVRVGYMH (SEQ ID NO:444)	LCSVRVGYMH (SEQ ID NO:484)
KCSVFVGYMH (SEQ ID NO:405)	SCSVFVGYMH (SEQ ID NO:445)	LCSVFVGYMH (SEQ ID NO:485)
KAQLSVGYMH (SEQ ID NO:182)	SAQLSVGYMH (SEQ ID NO:207)	LAQLSVGYMH (SEQ ID NO:486)
KAQLRVGYMH (SEQ ID NO:180)	SAQLRVGYMH (SEQ ID NO:190)	LAQLRVGYMH (SEQ ID NO:487)
KAQLFVGYMH (SEQ ID NO:406)	SAQLFVGYMH (SEQ ID NO:446)	LAQLFVGYMH (SEQ ID NO:488)
KAQSSVGYMH (SEQ ID NO:181)	SAQSSVGYMH (SEQ ID NO:191)	LAQSSVGYMH (SEQ ID NO:489)
KAQSRVGYMH (SEQ ID NO:179)	SAQSRVGYMH (SEQ ID NO:189)	LAQSRVGYMH (SEQ ID NO:490)
KAQSFVGYMH (SEQ ID NO:407)	SAQSFVGYMH (SEQ ID NO:447)	LAQSFVGYMH (SEQ ID NO:491)
KAQVSVGYMH (SEQ ID NO:408)	SAQVSVGYMH (SEQ ID NO:448)	LAQVSVGYMH (SEQ ID NO:492)
KAQVRVGYMH (SEQ ID NO:409)	SAQVRVGYMH (SEQ ID NO:449)	LAQVRVGYMH (SEQ ID NO:493)
KAQVFVGYMH (SEQ ID NO:410)	SAQVFVGYMH (SEQ ID NO:450)	LAQVFVGYMH (SEQ ID NO:494)
KASLSVGYMH (SEQ ID NO:186)	SASLSVGYMH (SEQ ID NO:188)	LASLSVGYMH (SEQ ID NO:495)
KASLRVGYMH (SEQ ID NO:184)	SASLRVGYMH (SEQ ID NO:187)	LASLRVGYMH (SEQ ID NO:496)
KASLFVGYMH (SEQ ID NO:411)	SASLFVGYMH (SEQ ID NO:451)	LASLFVGYMH (SEQ ID NO:497)
KASSSVGYMH (SEQ ID NO:185)	SASSSVGYMH (SEQ ID NO:14)	LASSSVGYMH (SEQ ID NO:498)

KASSRVGYMH (SEQ ID NO:183)	SASSRVGYMH (SEQ ID NO:39)	LASSRVGYMH (SEQ ID NO:499)
KASSFVGYMH (SEQ ID NO:412)	SASSFVGYMH (SEQ ID NO:452)	LASSFVGYMH (SEQ ID NO:500)
KASVSVGYMH (SEQ ID NO:413)	SASVSVGYMH (SEQ ID NO:453)	LASVSVGYMH (SEQ ID NO:501)
KASVRVGYMH (SEQ ID NO:414)	SASVRVGYMH (SEQ ID NO:454)	LASVRVGYMH (SEQ ID NO:502)
KASVFVGYMH (SEQ ID NO:415)	SASVFVGYMH (SEQ ID NO:455)	LASVFVGYMH (SEQ ID NO:503)
KLQLSVGYMH (SEQ ID NO:89)	SLQLSVGYMH (SEQ ID NO:134)	LLQLSVGYMH (SEQ ID NO:504)
KLQLRVGYMH (SEQ ID NO:98)	SLQLRVGYMH (SEQ ID NO:140)	LLQLRVGYMH (SEQ ID NO:505)
KLQLFVGYMH (SEQ ID NO:416)	SLQLFVGYMH (SEQ ID NO:456)	LLQLFVGYMH (SEQ ID NO:506)
KLQSSVGYMH (SEQ ID NO:92)	SLQSSVGYMH (SEQ ID NO:136)	LLQSSVGYMH (SEQ ID NO:507)
KLQSRVGYMH (SEQ ID NO:95)	SLQSRVGYMH (SEQ ID NO:138)	LLQSRVGYMH (SEQ ID NO:508)
KLQSFVGYMH (SEQ ID NO:417)	SLQSFVGYMH (SEQ ID NO:457)	LLQSFVGYMH (SEQ ID NO:509)
KLQVSVGYMH (SEQ ID NO:418)	SLQVSVGYMH (SEQ ID NO:458)	LLQVSVGYMH (SEQ ID NO:510)
KLQVRVGYMH (SEQ ID NO:419)	SLQVRVGYMH (SEQ ID NO:459)	LLQVRVGYMH (SEQ ID NO:511)
KLQVFFVGYMH (SEQ ID NO:420)	SLQVFFVGYMH (SEQ ID NO:460)	LLQVFFVGYMH (SEQ ID NO:512)
KLSLSVGYMH (SEQ ID NO:101)	SLSLSVGYMH (SEQ ID NO:120)	LLSLSVGYMH (SEQ ID NO:513)
KLSLRVGYMH (SEQ ID NO:110)	SLSLRVGYMH (SEQ ID NO:125)	LLSLRVGYMH (SEQ ID NO:514)
KLSLFVGYMH (SEQ ID NO:421)	SLSLFVGYMH (SEQ ID NO:461)	LLSLFVGYMH (SEQ ID NO:515)
KLSSSVGYMH (SEQ ID NO:104)	SLSSSVGYMH (SEQ ID NO:122)	LLSSSVGYMH (SEQ ID NO:516)
KLSSRVGYMH (SEQ ID NO:107)	SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:22)	LLSSRVGYMH (SEQ ID NO:517)
KLSSFVGYMH (SEQ ID NO:422)	SLSSFVGYMH (SEQ ID NO:462)	LLSSFVGYMH (SEQ ID NO:518)
KLVS SVGYMH (SEQ ID NO:423)	SLVS SVGYMH (SEQ ID NO:463)	LLVS SVGYMH (SEQ ID NO:519)
KLSVRVGYMH (SEQ ID NO:424)	SLSVRVGYMH (SEQ ID NO:464)	LLSVRVGYMH (SEQ ID NO:520)
KLSVFVGYMH (SEQ ID NO:425)	SLSVFVGYMH (SEQ ID NO:465)	LLSVFVGYMH (SEQ ID NO:521)
KPQLSVGYMH (SEQ ID NO:163)	SPQLSVGYMH (SEQ ID NO:177)	LPQLSVGYMH (SEQ ID NO:200)
KPQLRVGYMH (SEQ ID NO:159)	SPQLRVGYMH (SEQ ID NO:173)	LPQLRVGYMH (SEQ ID NO:202)
KPQLFVGYMH (SEQ ID NO:426)	SPQLFVGYMH (SEQ ID NO:466)	LPQLFVGYMH (SEQ ID NO:522)
KPQSSVGYMH (SEQ ID NO:161)	SPQSSVGYMH (SEQ ID NO:176)	LPQSSVGYMH (SEQ ID NO:201)
KPQSRVGYMH (SEQ ID NO:157)	SPQSRVGYMH (SEQ ID NO:171)	LPQSRVGYMH (SEQ ID NO:199)
KPQSFVGYMH (SEQ ID NO:427)	SPQSFVGYMH (SEQ ID NO:467)	LPQSFVGYMH (SEQ ID NO:523)
KPQVSVGYMH (SEQ ID NO:428)	SPQVSVGYMH (SEQ ID NO:468)	LPQVSVGYMH (SEQ ID NO:524)
KPQVRVGYMH (SEQ ID NO:429)	SPQVRVGYMH (SEQ ID NO:469)	LPQVRVGYMH (SEQ ID NO:525)

KPQVFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:430)	SPQVFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:470)	LPQVFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:526)
KPSLSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:155)	SPSLSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:169)	LPSLSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:192)
KPSLRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:152)	SPSLRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:166)	LPSLRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:194)
KPSLFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:431)	SPSLFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:471)	LPSLFVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:527)
KPSSSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:153)	SPSSSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:168)	LPSSSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:193)
KPSSRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:150)	SPSSRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:31)	LPSSRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:47)
KPSSEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:432)	SPSSEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:472)	LPSSEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:528)
KPSVSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:433)	SPSVSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:473)	LPSVSVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:529)
KPSVRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:434)	SPSVRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:474)	LPSVRVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:530)
KPSVFEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:435)	SPSVFEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:475)	LPSVFEVG $\overline{\text{YMH}}$ (SEQ ID NO:531)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。

表3E-VL CDR2配列

DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	DTFKLAS (SEQ ID NO:15)	DTYKLAS (SEQ ID NO:799)	DTRKLAS (SEQ ID NOS:113&174)	DTMKLAS (SEQ ID NOS:121&162)	DTKKLAS (SEQ ID NO:1211)	DTLKLAS (SEQ ID NO:135)
DTSKLSS (SEQ ID NO:165)	DTFKLSS (SEQ ID NO:96)	DTYKLSS (SEQ ID NO:800)	DTRKLSS (SEQ ID NO:175)	DTMKLSS (SEQ ID NO:164)	DTKKLSS (SEQ ID NO:1212)	DTLKLSS (SEQ ID NO:1355)
DTSKLKS (SEQ ID NO:532)	DTFKLKS (SEQ ID NO:660)	DTYKLKS (SEQ ID NO:801)	DTRKLKS (SEQ ID NO:943)	DTMKLKS (SEQ ID NO:1076)	DTKKLKS (SEQ ID NO:1213)	DTLKLKS (SEQ ID NO:1356)
DTSKLRS (SEQ ID NO:533)	DTFKLRS (SEQ ID NO:661)	DTYKLRS (SEQ ID NO:802)	DTRKLRS (SEQ ID NO:944)	DTMKLRS (SEQ ID NO:1077)	DTKKLRS (SEQ ID NO:1214)	DTLKLRS (SEQ ID NO:1357)
DTSKLHS (SEQ ID NO:534)	DTFKLHS (SEQ ID NO:662)	DTYKLHS (SEQ ID NO:803)	DTRKLHS (SEQ ID NO:945)	DTMKLHS (SEQ ID NO:1078)	DTKKLHS (SEQ ID NO:1215)	DTLKLHS (SEQ ID NO:1358)
DTSKLPS (SEQ ID NO:102)	DTFKLPS (SEQ ID NO:663)	DTYKLPS (SEQ ID NO:804)	DTRKLPS (SEQ ID NO:118)	DTMKLPS (SEQ ID NO:1079)	DTKKLPS (SEQ ID NO:1216)	DTLKLPS (SEQ ID NO:1359)

DTSKLTS (SEQ ID NO:535)	DTFKLTS (SEQ ID NO:664)	DTYKLTS (SEQ ID NO:805)	DTRKLTS (SEQ ID NO:946)	DTMKLTS (SEQ ID NO:1080)	DTKKLTS (SEQ ID NO:1217)	DTLKLTS (SEQ ID NO:1360)
DTSKLDS (SEQ ID NO:128)	DTFKLDS (SEQ ID NO:665)	DTYKLDS (SEQ ID NO:806)	DTRKLDS (SEQ ID NO:947)	DTMKLDS (SEQ ID NO:1081)	DTKKLDS (SEQ ID NO:1218)	DTLKLDS (SEQ ID NO:131)
DTSKHAS (SEQ ID NO:536)	DTFKHAS (SEQ ID NO:666)	DTYKHAS (SEQ ID NO:807)	DTRKHAS (SEQ ID NO:948)	DTMKHAS (SEQ ID NO:1082)	DTKKHAS (SEQ ID NO:1219)	DTLKHAS (SEQ ID NO:1361)
DTSKHSS (SEQ ID NO:537)	DTFKHSS (SEQ ID NO:667)	DTYKHSS (SEQ ID NO:808)	DTRKHSS (SEQ ID NO:949)	DTMKHSS (SEQ ID NO:1083)	DTKKHSS (SEQ ID NO:1220)	DTLKHSS (SEQ ID NO:1362)
DTSKHKS (SEQ ID NO:538)	DTFKHKS (SEQ ID NO:668)	DTYKHKS (SEQ ID NO:809)	DTRKHKS (SEQ ID NO:950)	DTMKHKS (SEQ ID NO:1084)	DTKKHKS (SEQ ID NO:1221)	DTLKHKS (SEQ ID NO:1363)
DTSKHRS (SEQ ID NO:539)	DTFKHRS (SEQ ID NO:669)	DTYKHRS (SEQ ID NO:810)	DTRKHRS (SEQ ID NO:951)	DTMKHRS (SEQ ID NO:1085)	DTKKHRS (SEQ ID NO:1222)	DTLKHRS (SEQ ID NO:1364)
DTSKHHS (SEQ ID NO:540)	DTFKHHS (SEQ ID NO:670)	DTYKHHS (SEQ ID NO:811)	DTRKHHS (SEQ ID NO:952)	DTMKHHS (SEQ ID NO:1086)	DTKKHHS (SEQ ID NO:1223)	DTLKHHS (SEQ ID NO:1365)
DTSKHPS (SEQ ID NO:541)	DTFKHPS (SEQ ID NO:671)	DTYKHPS (SEQ ID NO:812)	DTRKHPS (SEQ ID NO:953)	DTMKHPS (SEQ ID NO:1087)	DTKKHPS (SEQ ID NO:1224)	DTLKHPS (SEQ ID NO:1366)
DTSKHTS (SEQ ID NO:542)	DTFKHTS (SEQ ID NO:672)	DTYKHTS (SEQ ID NO:813)	DTRKHTS (SEQ ID NO:954)	DTMKHTS (SEQ ID NO:1088)	DTKKHTS (SEQ ID NO:1225)	DTLKHTS (SEQ ID NO:1367)
DTSKHDS (SEQ ID NO:543)	DTFKHDS (SEQ ID NO:673)	DTYKHDS (SEQ ID NO:814)	DTRKHDS (SEQ ID NO:955)	DTMKHDS (SEQ ID NO:1089)	DTKKHDS (SEQ ID NO:1226)	DTLKHDS (SEQ ID NO:1368)
DTSKQAS (SEQ ID NO:139)	DTFKQAS (SEQ ID NO:674)	DTYKQAS (SEQ ID NO:815)	DTRKQAS (SEQ ID NO:170)	DTMKQAS (SEQ ID NO:154)	DTKKQAS (SEQ ID NO:1227)	DTLKQAS (SEQ ID NO:1369)

DTSKQSS (SEQ ID NO:141)	DTFKQSS (SEQ ID NO:675)	DTYKQSS (SEQ ID NO:816)	DTRKQSS (SEQ ID NO:172)	DTMKQSS (SEQ ID NO:156)	DTKKQSS (SEQ ID NO:1228)	DTLKQSS (SEQ ID NO:1370)
DTSKQKS (SEQ ID NO:544)	DTFKQKS (SEQ ID NO:676)	DTYKQKS (SEQ ID NO:817)	DTRKQKS (SEQ ID NO:956)	DTMKQKS (SEQ ID NO:1090)	DTKKQKS (SEQ ID NO:1229)	DTLKQKS (SEQ ID NO:1371)
DTSKQRS (SEQ ID NO:545)	DTFKQRS (SEQ ID NO:677)	DTYKQRS (SEQ ID NO:818)	DTRKQRS (SEQ ID NO:957)	DTMKQRS (SEQ ID NO:1091)	DTKKQRS (SEQ ID NO:1230)	DTLKQRS (SEQ ID NO:1372)
DTSKQHS (SEQ ID NO:546)	DTFKQHS (SEQ ID NO:678)	DTYKQHS (SEQ ID NO:819)	DTRKQHS (SEQ ID NO:958)	DTMKQHS (SEQ ID NO:1092)	DTKKQHS (SEQ ID NO:1231)	DTLKQHS (SEQ ID NO:1373)
DTSKQPS (SEQ ID NO:547)	DTFKQPS (SEQ ID NO:679)	DTYKQPS (SEQ ID NO:820)	DTRKQPS (SEQ ID NO:959)	DTMKQPS (SEQ ID NO:1093)	DTKKQPS (SEQ ID NO:1232)	DTLKQPS (SEQ ID NO:1374)
DTSKQTS (SEQ ID NO:548)	DTFKQTS (SEQ ID NO:680)	DTYKQTS (SEQ ID NO:821)	DTRKQTS (SEQ ID NO:960)	DTMKQTS (SEQ ID NO:1094)	DTKKQTS (SEQ ID NO:1233)	DTLKQTS (SEQ ID NO:1375)
DTSKQDS (SEQ ID NO:549)	DTFKQDS (SEQ ID NO:681)	DTYKQDS (SEQ ID NO:822)	DTRKQDS (SEQ ID NO:961)	DTMKQDS (SEQ ID NO:1095)	DTKKQDS (SEQ ID NO:1234)	DTLKQDS (SEQ ID NO:1376)
DTSGLAS (SEQ ID NO:105)	DTFGLAS (SEQ ID NO:682)	DTYGLAS (SEQ ID NO:823)	DTRGLAS (SEQ ID NO:116)	DTMGLAS (SEQ ID NO:1096)	DTKGLAS (SEQ ID NO:1235)	DTLGLAS (SEQ ID NO:1377)
DTSGLSS (SEQ ID NO:550)	DTFGLSS (SEQ ID NO:683)	DTYGLSS (SEQ ID NO:824)	DTRGLSS (SEQ ID NO:962)	DTMGLSS (SEQ ID NO:1097)	DTKGLSS (SEQ ID NO:1236)	DTLGLSS (SEQ ID NO:1378)
DTSGLKS (SEQ ID NO:551)	DTFGLKS (SEQ ID NO:684)	DTYGLKS (SEQ ID NO:825)	DTRGLKS (SEQ ID NO:963)	DTMGLKS (SEQ ID NO:1098)	DTKGLKS (SEQ ID NO:1237)	DTLGLKS (SEQ ID NO:1379)
DTSGLRS (SEQ ID NO:552)	DTFGLRS (SEQ ID NO:685)	DTYGLRS (SEQ ID NO:826)	DTRGLRS (SEQ ID NO:964)	DTMGLRS (SEQ ID NO:1099)	DTKGLRS (SEQ ID NO:1238)	DTLGLRS (SEQ ID NO:1380)

DTSG $\overline{\text{LH}}\text{S}$ (SEQ ID NO:553)	DTFG $\overline{\text{LH}}\text{S}$ (SEQ ID NO:686)	DTYGL $\overline{\text{H}}\text{S}$ (SEQ ID NO:827)	DTRGL $\overline{\text{H}}\text{S}$ (SEQ ID NO:965)	DTMGL $\overline{\text{H}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1100)	DTKGL $\overline{\text{H}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1239)	DTLGL $\overline{\text{H}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1381)
DTSG $\overline{\text{LP}}\text{S}$ (SEQ ID NO:108)	DTFG $\overline{\text{LP}}\text{S}$ (SEQ ID NO:687)	DTYGL $\overline{\text{P}}\text{S}$ (SEQ ID NO:828)	DTRGL $\overline{\text{P}}\text{S}$ (SEQ ID NO:966)	DTMGL $\overline{\text{P}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1101)	DTKGL $\overline{\text{P}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1240)	DTLGL $\overline{\text{P}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1382)
DTSG $\overline{\text{LT}}\text{S}$ (SEQ ID NO:554)	DTFG $\overline{\text{LT}}\text{S}$ (SEQ ID NO:688)	DTYGL $\overline{\text{T}}\text{S}$ (SEQ ID NO:829)	DTRGL $\overline{\text{T}}\text{S}$ (SEQ ID NO:967)	DTMGL $\overline{\text{T}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1102)	DTKGL $\overline{\text{T}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1241)	DTLGL $\overline{\text{T}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1383)
DTSG $\overline{\text{LD}}\text{S}$ (SEQ ID NO:555)	DTFG $\overline{\text{LD}}\text{S}$ (SEQ ID NO:689)	DTYGL $\overline{\text{D}}\text{S}$ (SEQ ID NO:830)	DTRGL $\overline{\text{D}}\text{S}$ (SEQ ID NO:968)	DTMGL $\overline{\text{D}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1103)	DTKGL $\overline{\text{D}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1242)	DTLGL $\overline{\text{D}}\text{S}$ (SEQ ID NO:1384)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{AS}$ (SEQ ID NO:556)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{AS}$ (SEQ ID NO:690)	DTYGH $\overline{\text{AS}}$ (SEQ ID NO:831)	DTRGH $\overline{\text{AS}}$ (SEQ ID NO:969)	DTMGH $\overline{\text{AS}}$ (SEQ ID NO:1104)	DTKGH $\overline{\text{AS}}$ (SEQ ID NO:1243)	DTLGH $\overline{\text{AS}}$ (SEQ ID NO:1385)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{SS}$ (SEQ ID NO:557)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{SS}$ (SEQ ID NO:691)	DTYGH $\overline{\text{SS}}$ (SEQ ID NO:832)	DTRGH $\overline{\text{SS}}$ (SEQ ID NO:970)	DTMGH $\overline{\text{SS}}$ (SEQ ID NO:1105)	DTKGH $\overline{\text{SS}}$ (SEQ ID NO:1244)	DTLGH $\overline{\text{SS}}$ (SEQ ID NO:1386)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{KS}$ (SEQ ID NO:558)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{KS}$ (SEQ ID NO:692)	DTYGH $\overline{\text{KS}}$ (SEQ ID NO:833)	DTRGH $\overline{\text{KS}}$ (SEQ ID NO:971)	DTMGH $\overline{\text{KS}}$ (SEQ ID NO:1106)	DTKGH $\overline{\text{KS}}$ (SEQ ID NO:1245)	DTLGH $\overline{\text{KS}}$ (SEQ ID NO:1387)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{RS}$ (SEQ ID NO:559)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{RS}$ (SEQ ID NO:693)	DTYGH $\overline{\text{RS}}$ (SEQ ID NO:834)	DTRGH $\overline{\text{RS}}$ (SEQ ID NO:972)	DTMGH $\overline{\text{RS}}$ (SEQ ID NO:1107)	DTKGH $\overline{\text{RS}}$ (SEQ ID NO:1246)	DTLGH $\overline{\text{RS}}$ (SEQ ID NO:1388)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{HS}$ (SEQ ID NO:560)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{HS}$ (SEQ ID NO:694)	DTYGH $\overline{\text{HS}}$ (SEQ ID NO:835)	DTRGH $\overline{\text{HS}}$ (SEQ ID NO:973)	DTMGH $\overline{\text{HS}}$ (SEQ ID NO:1108)	DTKGH $\overline{\text{HS}}$ (SEQ ID NO:1247)	DTLGH $\overline{\text{HS}}$ (SEQ ID NO:1389)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{PS}$ (SEQ ID NO:561)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{PS}$ (SEQ ID NO:695)	DTYGH $\overline{\text{PS}}$ (SEQ ID NO:836)	DTRGH $\overline{\text{PS}}$ (SEQ ID NO:974)	DTMGH $\overline{\text{PS}}$ (SEQ ID NO:1109)	DTKGH $\overline{\text{PS}}$ (SEQ ID NO:1248)	DTLGH $\overline{\text{PS}}$ (SEQ ID NO:1390)
DTSG $\overline{\text{H}}\text{TS}$ (SEQ ID NO:562)	DTFG $\overline{\text{H}}\text{TS}$ (SEQ ID NO:696)	DTYGH $\overline{\text{TS}}$ (SEQ ID NO:837)	DTRGH $\overline{\text{TS}}$ (SEQ ID NO:975)	DTMGH $\overline{\text{TS}}$ (SEQ ID NO:1110)	DTKGH $\overline{\text{TS}}$ (SEQ ID NO:1249)	DTLGH $\overline{\text{TS}}$ (SEQ ID NO:1391)

DTSGHDS (SEQ ID NO:563)	DTFGHDS (SEQ ID NO:697)	DTYGHDS (SEQ ID NO:838)	DTRGHDS (SEQ ID NO:975)	DTMGHDS (SEQ ID NO:1111)	DTKGHDS (SEQ ID NO:1250)	DTLGHDS (SEQ ID NO:1392)
DTSGQAS (SEQ ID NO:564)	DTFGQAS (SEQ ID NO:698)	DTYQAS (SEQ ID NO:839)	DTRQAS (SEQ ID NO:976)	DTMQAS (SEQ ID NO:1112)	DTKGQAS (SEQ ID NO:1251)	DTLGQAS (SEQ ID NO:1393)
DTSGQSS (SEQ ID NO:565)	DTFGQSS (SEQ ID NO:699)	DTYQSS (SEQ ID NO:840)	DTRQSS (SEQ ID NO:977)	DTMQSS (SEQ ID NO:1113)	DTKGQSS (SEQ ID NO:1252)	DTLGQSS (SEQ ID NO:1394)
DTSGQKS (SEQ ID NO:566)	DTFGQKS (SEQ ID NO:700)	DTYQKS (SEQ ID NO:841)	DTRQKS (SEQ ID NO:978)	DTMQKS (SEQ ID NO:1114)	DTKGQKS (SEQ ID NO:1253)	DTLGQKS (SEQ ID NO:1395)
DTSGQRS (SEQ ID NO:567)	DTFGQRS (SEQ ID NO:701)	DTYQRS (SEQ ID NO:842)	DTRQRS (SEQ ID NO:979)	DTMQRS (SEQ ID NO:1115)	DTKGORS (SEQ ID NO:1254)	DTLGORS (SEQ ID NO:1396)
DTSGQHS (SEQ ID NO:568)	DTFGQHS (SEQ ID NO:702)	DTYQHS (SEQ ID NO:843)	DTRQHS (SEQ ID NO:980)	DTMQHS (SEQ ID NO:1116)	DTKGQHS (SEQ ID NO:1255)	DTLGQHS (SEQ ID NO:1397)
DTSGQPS (SEQ ID NO:569)	DTFGQPS (SEQ ID NO:703)	DTYQPS (SEQ ID NO:844)	DTRQPS (SEQ ID NO:981)	DTMQPS (SEQ ID NO:1117)	DTKGQPS (SEQ ID NO:1256)	DTLGQPS (SEQ ID NO:1398)
DTSGQTS (SEQ ID NO:570)	DTFGQTS (SEQ ID NO:704)	DTYQTS (SEQ ID NO:845)	DTRQTS (SEQ ID NO:982)	DTMQTS (SEQ ID NO:1118)	DTKGQTS (SEQ ID NO:1257)	DTLGQTS (SEQ ID NO:1399)
DTSGQDS (SEQ ID NO:571)	DTFGQDS (SEQ ID NO:705)	DTYQDS (SEQ ID NO:846)	DTRQDS (SEQ ID NO:983)	DTMQDS (SEQ ID NO:1119)	DTKGQDS (SEQ ID NO:1258)	DTLGQDS (SEQ ID NO:1400)
DTSRLAS (SEQ ID NO:123)	DTFRLAS (SEQ ID NO:706)	DTYRLAS (SEQ ID NO:847)	DTRRLAS (SEQ ID NO:984)	DTMRLAS (SEQ ID NO:32)	DTKRLAS (SEQ ID NO:1259)	DTLRLAS (SEQ ID NO:1401)
DTSRLLS (SEQ ID NO:572)	DTFRLLS (SEQ ID NO:707)	DTYRLSS (SEQ ID NO:848)	DTRRLSS (SEQ ID NO:985)	DTMRLSS (SEQ ID NO:1120)	DTKRLSS (SEQ ID NO:1260)	DTLRLSS (SEQ ID NO:1402)

10

20

30

40

DTSRLKS (SEQ ID NO:573)	DTFRLKS (SEQ ID NO:708)	DTYRLKS (SEQ ID NO:849)	DTRRLKS (SEQ ID NO:986)	DTMRLKS (SEQ ID NO:1121)	DTRRLKS (SEQ ID NO:1261)	DTLRLKS (SEQ ID NO:1403)
DTSRLRS (SEQ ID NO:574)	DTFRLRS (SEQ ID NO:709)	DTYRLRS (SEQ ID NO:850)	DTRRLRS (SEQ ID NO:987)	DTMRLRS (SEQ ID NO:1122)	DTRRLRS (SEQ ID NO:1262)	DTLRLRS (SEQ ID NO:1404)
DTSRLHS (SEQ ID NO:575)	DTFRLHS (SEQ ID NO:710)	DTYRLHS (SEQ ID NO:851)	DTRRLHS (SEQ ID NO:988)	DTMRLHS (SEQ ID NO:1123)	DTRRLHS (SEQ ID NO:1263)	DTLRLHS (SEQ ID NO:1405)
DTSRLPS (SEQ ID NO:576)	DTFRLPS (SEQ ID NO:711)	DTYRLPS (SEQ ID NO:852)	DTRRLPS (SEQ ID NO:989)	DTMRLPS (SEQ ID NO:1124)	DTRRLPS (SEQ ID NO:1264)	DTLRLPS (SEQ ID NO:1406)
DTSRLTS (SEQ ID NO:577)	DTFRLTS (SEQ ID NO:712)	DTYRLTS (SEQ ID NO:853)	DTRRLTS (SEQ ID NO:990)	DTMRLTS (SEQ ID NO:1125)	DTRRLTS (SEQ ID NO:1265)	DTLRLTS (SEQ ID NO:1407)
DTSRLDS (SEQ ID NO:578)	DTFRLDS (SEQ ID NO:713)	DTYRLDS (SEQ ID NO:854)	DTRRLDS (SEQ ID NO:991)	DTMRLDS (SEQ ID NO:1126)	DTRRLDS (SEQ ID NO:1266)	DTLRLDS (SEQ ID NO:1408)
DTSRHAS (SEQ ID NO:579)	DTFRHAS (SEQ ID NO:714)	DTYRHAS (SEQ ID NO:855)	DTRRHAS (SEQ ID NO:992)	DTMRHAS (SEQ ID NO:1127)	DTRRHAS (SEQ ID NO:1267)	DTLRHAS (SEQ ID NO:1409)
DTSRHSS (SEQ ID NO:580)	DTFRHSS (SEQ ID NO:715)	DTYRHSS (SEQ ID NO:856)	DTRRHSS (SEQ ID NO:993)	DTMRHSS (SEQ ID NO:1128)	DTRRHSS (SEQ ID NO:1268)	DTLRHSS (SEQ ID NO:1410)
DTSRHKS (SEQ ID NO:581)	DTFRHKS (SEQ ID NO:716)	DTYRHKS (SEQ ID NO:857)	DTRRHKS (SEQ ID NO:994)	DTMRHKS (SEQ ID NO:1129)	DTRRHKS (SEQ ID NO:1269)	DTLRHKS (SEQ ID NO:1411)
DTSRHRS (SEQ ID NO:582)	DTFRHRS (SEQ ID NO:717)	DTYRHRS (SEQ ID NO:858)	DTRRHRS (SEQ ID NO:995)	DTMRHRS (SEQ ID NO:1130)	DTRRHRS (SEQ ID NO:1270)	DTLRHRS (SEQ ID NO:1412)
DTSRHHS (SEQ ID NO:583)	DTFRHHS (SEQ ID NO:718)	DTYRHHS (SEQ ID NO:859)	DTRRHHS (SEQ ID NO:996)	DTMRHHS (SEQ ID NO:1131)	DTRRHHS (SEQ ID NO:1271)	DTLRHHS (SEQ ID NO:1413)



DTSRHPS (SEQ ID NO:584)	DTSRHPS (SEQ ID NO:719)	DTSRHPS (SEQ ID NO:860)	DTSRHPS (SEQ ID NO:997)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1132)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1272)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1414)
DTSRHPS (SEQ ID NO:585)	DTSRHPS (SEQ ID NO:720)	DTSRHPS (SEQ ID NO:861)	DTSRHPS (SEQ ID NO:998)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1133)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1273)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1415)
DTSRHPS (SEQ ID NO:586)	DTSRHPS (SEQ ID NO:721)	DTSRHPS (SEQ ID NO:862)	DTSRHPS (SEQ ID NO:999)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1134)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1274)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1416)
DTSRHPS (SEQ ID NO:587)	DTSRHPS (SEQ ID NO:722)	DTSRHPS (SEQ ID NO:863)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1000)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1135)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1275)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1417)
DTSRHPS (SEQ ID NO:588)	DTSRHPS (SEQ ID NO:723)	DTSRHPS (SEQ ID NO:864)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1001)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1136)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1276)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1418)
DTSRHPS (SEQ ID NO:589)	DTSRHPS (SEQ ID NO:724)	DTSRHPS (SEQ ID NO:865)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1002)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1137)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1277)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1419)
DTSRHPS (SEQ ID NO:590)	DTSRHPS (SEQ ID NO:725)	DTSRHPS (SEQ ID NO:866)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1003)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1138)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1278)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1420)
DTSRHPS (SEQ ID NO:591)	DTSRHPS (SEQ ID NO:726)	DTSRHPS (SEQ ID NO:867)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1004)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1139)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1279)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1421)
DTSRHPS (SEQ ID NO:592)	DTSRHPS (SEQ ID NO:727)	DTSRHPS (SEQ ID NO:868)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1005)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1140)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1280)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1422)
DTSRHPS (SEQ ID NO:593)	DTSRHPS (SEQ ID NO:728)	DTSRHPS (SEQ ID NO:869)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1006)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1141)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1281)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1423)
DTSRHPS (SEQ ID NO:594)	DTSRHPS (SEQ ID NO:729)	DTSRHPS (SEQ ID NO:870)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1007)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1142)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1282)	DTSRHPS (SEQ ID NO:1424)

DTSYLAS (SEQ ID NOS:81&143)	DTFYLAS (SEQ ID NO:99)	DTYYLAS (SEQ ID NO:871)	DTRYLAS (SEQ ID NO:178)	DTMYLAS (SEQ ID NO:158)	DTKYLAS (SEQ ID NO:1283)	DTLYLAS (SEQ ID NO:1425)
DTSYLSS (SEQ ID NOS:85&145)	DTFYLSS (SEQ ID NO:90)	DTYYLSS (SEQ ID NO:872)	DTRYLSS (SEQ ID NO:59)	DTMYLSS (SEQ ID NO:160)	DTKYLSS (SEQ ID NO:1284)	DTLYLSS (SEQ ID NO:1426)
DTSYLKS (SEQ ID NO:595)	DTFYLKS (SEQ ID NO:730)	DTYYLKS (SEQ ID NO:873)	DTRYLKS (SEQ ID NO:1008)	DTMYLKS (SEQ ID NO:1143)	DTKYLKS (SEQ ID NO:1285)	DTLYLKS (SEQ ID NO:1427)
DTSYLRS (SEQ ID NO:596)	DTFYLRs (SEQ ID NO:731)	DTYYLRS (SEQ ID NO:874)	DTRYLRS (SEQ ID NO:1009)	DTMYLRS (SEQ ID NO:1144)	DTKYLRS (SEQ ID NO:1286)	DTLYLRS (SEQ ID NO:1428)
DTSYLHS (SEQ ID NO:597)	DTFYLHS (SEQ ID NO:732)	DTYYLHS (SEQ ID NO:875)	DTRYLHS (SEQ ID NO:1010)	DTMYLHS (SEQ ID NO:1145)	DTKYLHS (SEQ ID NO:1287)	DTLYLHS (SEQ ID NO:1429)
DTSYLPS (SEQ ID NO:598)	DTFYLPS (SEQ ID NO:733)	DTYYLPS (SEQ ID NO:876)	DTRYLPS (SEQ ID NO:1011)	DTMYLPS (SEQ ID NO:1146)	DTKYLPS (SEQ ID NO:1288)	DTLYLPS (SEQ ID NO:1430)
DTSYLTS (SEQ ID NO:599)	DTFYLTS (SEQ ID NO:734)	DTYYLTS (SEQ ID NO:877)	DTRYLTS (SEQ ID NO:1012)	DTMYLTS (SEQ ID NO:1147)	DTKYLTS (SEQ ID NO:1289)	DTLYLTS (SEQ ID NO:1431)
DTSYLDs (SEQ ID NO:600)	DTFYLDs (SEQ ID NO:735)	DTYYLDs (SEQ ID NO:878)	DTRYLDs (SEQ ID NO:1013)	DTMYLDs (SEQ ID NO:1148)	DTKYLDs (SEQ ID NO:1290)	DTLYLDs (SEQ ID NO:1432)
DTSYHAS (SEQ ID NO:601)	DTFYHAS (SEQ ID NO:736)	DTYYHAS (SEQ ID NO:879)	DTRYHAS (SEQ ID NO:1014)	DTMYHAS (SEQ ID NO:1149)	DTKYHAS (SEQ ID NO:1291)	DTLYHAS (SEQ ID NO:1433)
DTSYHSS (SEQ ID NO:602)	DTFYHSS (SEQ ID NO:737)	DTYYHSS (SEQ ID NO:880)	DTRYHSS (SEQ ID NO:1015)	DTMYHSS (SEQ ID NO:1150)	DTKYHSS (SEQ ID NO:1292)	DTLYHSS (SEQ ID NO:1434)
DTSYHKS (SEQ ID NO:603)	DTFYHKS (SEQ ID NO:738)	DTYYHKS (SEQ ID NO:881)	DTRYHKS (SEQ ID NO:1016)	DTMYHKS (SEQ ID NO:1151)	DTKYHKS (SEQ ID NO:1293)	DTLYHKS (SEQ ID NO:1435)

DTSYHRS (SEQ ID NO:604)	DTFYHRS (SEQ ID NO:739)	DTYYHRS (SEQ ID NO:882)	DTRYHRS (SEQ ID NO:1017)	DTMYHRS (SEQ ID NO:1152)	DTKYHRS (SEQ ID NO:1294)	DTLYHRS (SEQ ID NO:1436)
DTSYHHS (SEQ ID NO:605)	DTFYHHS (SEQ ID NO:740)	DTYYHHS (SEQ ID NO:883)	DTRYHHS (SEQ ID NO:1018)	DTMYHHS (SEQ ID NO:1153)	DTKYHHS (SEQ ID NO:1295)	DTLYHHS (SEQ ID NO:1437)
DTSYHPS (SEQ ID NO:606)	DTFYHPS (SEQ ID NO:741)	DTYYHPS (SEQ ID NO:884)	DTRYHPS (SEQ ID NO:1019)	DTMYHPS (SEQ ID NO:1154)	DTKYHPS (SEQ ID NO:1296)	DTLYHPS (SEQ ID NO:1438)
DTSYHTS (SEQ ID NO:607)	DTFYHTS (SEQ ID NO:742)	DTYYHTS (SEQ ID NO:885)	DTRYHTS (SEQ ID NO:1020)	DTMYHTS (SEQ ID NO:1155)	DTKYHTS (SEQ ID NO:1297)	DTLYHTS (SEQ ID NO:1439)
DTSYHDS (SEQ ID NO:608)	DTFYHDS (SEQ ID NO:743)	DTYYHDS (SEQ ID NO:886)	DTRYHDS (SEQ ID NO:1021)	DTMYHDS (SEQ ID NO:1156)	DTKYHDS (SEQ ID NO:1298)	DTLYHDS (SEQ ID NO:1440)
DTSYQAS (SEQ ID NO:147)	DTFYQAS (SEQ ID NO:744)	DTYYQAS (SEQ ID NO:887)	DTRYQAS (SEQ ID NO:1022)	DTMYQAS (SEQ ID NO:1157)	DTKYQAS (SEQ ID NO:1299)	DTLYQAS (SEQ ID NO:1441)
DTSYQSS (SEQ ID NO:149)	DTFYQSS (SEQ ID NO:745)	DTYYQSS (SEQ ID NO:888)	DTRYQSS (SEQ ID NO:1023)	DTMYQSS (SEQ ID NO:1158)	DTKYQSS (SEQ ID NO:1300)	DTLYQSS (SEQ ID NO:1442)
DTSYQKS (SEQ ID NO:609)	DTFYQKS (SEQ ID NO:746)	DTYYQKS (SEQ ID NO:889)	DTRYQKS (SEQ ID NO:1024)	DTMYQKS (SEQ ID NO:1159)	DTKYQKS (SEQ ID NO:1301)	DTLYQKS (SEQ ID NO:1443)
DTSYQRS (SEQ ID NO:610)	DTFYQRS (SEQ ID NO:747)	DTYYQRS (SEQ ID NO:890)	DTRYQRS (SEQ ID NO:1025)	DTMYQRS (SEQ ID NO:1160)	DTKYQRS (SEQ ID NO:1302)	DTLYQRS (SEQ ID NO:1444)
DTSYQHS (SEQ ID NO:611)	DTFYQHS (SEQ ID NO:748)	DTYYQHS (SEQ ID NO:891)	DTRYQHS (SEQ ID NO:1026)	DTMYQHS (SEQ ID NO:1161)	DTKYQHS (SEQ ID NO:1303)	DTLYQHS (SEQ ID NO:1445)
DTSYQPS (SEQ ID NO:612)	DTFYQPS (SEQ ID NO:749)	DTYYQPS (SEQ ID NO:892)	DTRYQPS (SEQ ID NO:1027)	DTMYQPS (SEQ ID NO:1162)	DTKYQPS (SEQ ID NO:1304)	DTLYQPS (SEQ ID NO:1446)

DTSYQTS (SEQ ID NO:613)	DTFYQTS (SEQ ID NO:750)	DTYYQTS (SEQ ID NO:893)	DTRYQTS (SEQ ID NO:1026)	DTMYQTS (SEQ ID NO:1161)	DTKYQTS (SEQ ID NO:1305)	DTLYQTS (SEQ ID NO:1447)
DTSYQDS (SEQ ID NO:614)	DTFYQDS (SEQ ID NO:751)	DTYYQDS (SEQ ID NO:894)	DTRYQDS (SEQ ID NO:1027)	DTMYQDS (SEQ ID NO:1162)	DTKYQDS (SEQ ID NO:1306)	DTLYQDS (SEQ ID NO:1448)
DTSF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:615)	DTFF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:752)	DTYF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:895)	DTRF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:1028)	DTMF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:1163)	DTKF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:1307)	DTLF <sub>FLAS</sub> (SEQ ID NO:1449)
DTSF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:616)	DTFF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:753)	DTYF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:896)	DTRF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:1029)	DTMF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:1164)	DTKF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:1308)	DTLF <sub>LSS</sub> (SEQ ID NO:1450)
DTSF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:617)	DTFF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:754)	DTYF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:897)	DTRF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:1030)	DTMF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:1165)	DTKF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:1309)	DTLF <sub>FLKS</sub> (SEQ ID NO:1451)
DTSF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:618)	DTFF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:755)	DTYF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:898)	DTRF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:1031)	DTMF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:1166)	DTKF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:1310)	DTLF <sub>FLRS</sub> (SEQ ID NO:1452)
DTSF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:619)	DTFF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:756)	DTYF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:899)	DTRF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:1032)	DTMF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:1167)	DTKF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:1311)	DTLF <sub>FLHS</sub> (SEQ ID NO:1453)
DTSF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:620)	DTFF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:757)	DTYF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:900)	DTRF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:1033)	DTMF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:1168)	DTKF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:1312)	DTLF <sub>FLPS</sub> (SEQ ID NO:1454)
DTSF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:621)	DTFF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:758)	DTYF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:901)	DTRF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:1034)	DTMF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:1169)	DTKF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:1313)	DTLF <sub>FLTS</sub> (SEQ ID NO:1455)
DTSF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:77)	DTFF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:50)	DTYF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:902)	DTRF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:1035)	DTMF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:1170)	DTKF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:1314)	DTLF <sub>FLDS</sub> (SEQ ID NO:1456)
DTSF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:622)	DTFF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:759)	DTYF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:903)	DTRF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:1036)	DTMF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:1171)	DTKF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:1315)	DTLF <sub>FHAS</sub> (SEQ ID NO:1457)

DTSFHSS (SEQ ID NO:623)	DTFFHSS (SEQ ID NO:760)	DTYFHSS (SEQ ID NO:904)	DTRFHSS (SEQ ID NO:1037)	DTMFHSS (SEQ ID NO:1172)	DTKFHSS (SEQ ID NO:1316)	DTLFHSS (SEQ ID NO:1458)
DTSFHKS (SEQ ID NO:624)	DTFFHKS (SEQ ID NO:761)	DTYFHKS (SEQ ID NO:905)	DTRFHKS (SEQ ID NO:1038)	DTMFHKS (SEQ ID NO:1173)	DTKFHKS (SEQ ID NO:1317)	DTLFHKS (SEQ ID NO:1459)
DTSEHRS (SEQ ID NO:625)	DTFFHRS (SEQ ID NO:762)	DTYFHRS (SEQ ID NO:906)	DTRFHRS (SEQ ID NO:1039)	DTMFHRS (SEQ ID NO:1174)	DTKFHRS (SEQ ID NO:1318)	DTLFHRS (SEQ ID NO:1460)
DTSFHHS (SEQ ID NO:626)	DTFFHHS (SEQ ID NO:763)	DTYFHHS (SEQ ID NO:907)	DTRFHHS (SEQ ID NO:1040)	DTMFHHS (SEQ ID NO:1175)	DTKFHHS (SEQ ID NO:1319)	DTLFHHS (SEQ ID NO:1461)
DTSFHPS (SEQ ID NO:627)	DTFFHPS (SEQ ID NO:764)	DTYFHPS (SEQ ID NO:908)	DTRFHPS (SEQ ID NO:1041)	DTMFHPS (SEQ ID NO:1176)	DTKFHPS (SEQ ID NO:1320)	DTLFHPS (SEQ ID NO:1462)
DTSFHTS (SEQ ID NO:628)	DTFFHTS (SEQ ID NO:765)	DTYFHTS (SEQ ID NO:909)	DTRFHTS (SEQ ID NO:1042)	DTMFHTS (SEQ ID NO:1177)	DTKFHTS (SEQ ID NO:1321)	DTLFHTS (SEQ ID NO:1463)
DTSFHDS (SEQ ID NO:629)	DTFFHDS (SEQ ID NO:766)	DTYFHDS (SEQ ID NO:910)	DTRFHDS (SEQ ID NO:1043)	DTMFHDS (SEQ ID NO:1178)	DTKFHDS (SEQ ID NO:1322)	DTLFHDS (SEQ ID NO:1464)
DTSEFQAS (SEQ ID NO:630)	DTFFQAS (SEQ ID NO:767)	DTYFQAS (SEQ ID NO:911)	DTRFQAS (SEQ ID NO:1044)	DTMFQAS (SEQ ID NO:1179)	DTKFQAS (SEQ ID NO:1323)	DTLFQAS (SEQ ID NO:1465)
DTSEFQSS (SEQ ID NO:631)	DTFFQSS (SEQ ID NO:768)	DTYFQSS (SEQ ID NO:912)	DTRFQSS (SEQ ID NO:1045)	DTMFQSS (SEQ ID NO:1180)	DTKFQSS (SEQ ID NO:1324)	DTLFQSS (SEQ ID NO:1466)
DTSEFQKS (SEQ ID NO:632)	DTFFQKS (SEQ ID NO:769)	DTYFQKS (SEQ ID NO:913)	DTRFQKS (SEQ ID NO:1046)	DTMFQKS (SEQ ID NO:1181)	DTKFQKS (SEQ ID NO:1325)	DTLFQKS (SEQ ID NO:1467)
DTSEFORS (SEQ ID NO:633)	DTFFORS (SEQ ID NO:770)	DTYFORS (SEQ ID NO:914)	DTRFORS (SEQ ID NO:1047)	DTMFORS (SEQ ID NO:1182)	DTKFORS (SEQ ID NO:1326)	DTLFORS (SEQ ID NO:1468)

DTSFQHS (SEQ ID NO:634)	DTFFQHS (SEQ ID NO:771)	DTYFQHS (SEQ ID NO:915)	DTRFQHS (SEQ ID NO:1048)	DTMFQHS (SEQ ID NO:1183)	DTKFQHS (SEQ ID NO:1327)	DTLFQHS (SEQ ID NO:1469)
DTSFQPS (SEQ ID NO:635)	DTFFQPS (SEQ ID NO:772)	DTYFQPS (SEQ ID NO:916)	DTRFQPS (SEQ ID NO:1049)	DTMFQPS (SEQ ID NO:1184)	DTKFQPS (SEQ ID NO:1328)	DTLFQPS (SEQ ID NO:1470)
DTSFQTS (SEQ ID NO:636)	DTFFQTS (SEQ ID NO:773)	DTYFQTS (SEQ ID NO:917)	DTRFQTS (SEQ ID NO:1050)	DTMFQTS (SEQ ID NO:1185)	DTKFQTS (SEQ ID NO:1329)	DTLFQTS (SEQ ID NO:1471)
DTSFQDS (SEQ ID NO:637)	DTFFQDS (SEQ ID NO:774)	DTYFQDS (SEQ ID NO:918)	DTRFQDS (SEQ ID NO:1051)	DTMFQDS (SEQ ID NO:1186)	DTKFQDS (SEQ ID NO:1330)	DTLFQDS (SEQ ID NO:1472)
DTSLLAS (SEQ ID NO:124)	DTFLLAS (SEQ ID NO:775)	DTYLLAS (SEQ ID NO:919)	DTRLAS (SEQ ID NO:1052)	DTMLLAS (SEQ ID NO:1187)	DTKLLAS (SEQ ID NO:1331)	DTLLLAS (SEQ ID NO:1473)
DTSLSS (SEQ ID NO:638)	DTFLSS (SEQ ID NO:776)	DTYLLSS (SEQ ID NO:920)	DTRLSS (SEQ ID NO:1053)	DTMLSS (SEQ ID NO:1188)	DTKLLSS (SEQ ID NO:1332)	DTLLSS (SEQ ID NO:1473)
DTSLKLS (SEQ ID NO:639)	DTFLKLS (SEQ ID NO:777)	DTYLLKLS (SEQ ID NO:921)	DTRLKLS (SEQ ID NO:1054)	DTMLKLS (SEQ ID NO:1189)	DTKLLKLS (SEQ ID NO:1333)	DTLLKLS (SEQ ID NO:1474)
DTSLIRS (SEQ ID NO:640)	DTFLIRS (SEQ ID NO:778)	DTYLLIRS (SEQ ID NO:922)	DTRLIRS (SEQ ID NO:1055)	DTMLIRS (SEQ ID NO:1190)	DTKLLIRS (SEQ ID NO:1334)	DTLLIRS (SEQ ID NO:1475)
DTSLLHS (SEQ ID NO:641)	DTFLLHS (SEQ ID NO:779)	DTYLLHS (SEQ ID NO:923)	DTRLHS (SEQ ID NO:1056)	DTMLHS (SEQ ID NO:1191)	DTKLLHS (SEQ ID NO:1335)	DTLLHS (SEQ ID NO:1476)
DTSLLPS (SEQ ID NO:642)	DTFLLPS (SEQ ID NO:780)	DTYLLPS (SEQ ID NO:924)	DTRLPS (SEQ ID NO:1057)	DTMLPS (SEQ ID NO:1192)	DTKLLPS (SEQ ID NO:1336)	DTLLPS (SEQ ID NO:1477)
DTSLITS (SEQ ID NO:643)	DTFLITS (SEQ ID NO:781)	DTYLLITS (SEQ ID NO:925)	DTRLITS (SEQ ID NO:1058)	DTMLITS (SEQ ID NO:1193)	DTKLLITS (SEQ ID NO:1337)	DTLLITS (SEQ ID NO:1478)

10

20

30

40

DTSLIDS (SEQ ID NO:126)	DTFLIDS (SEQ ID NO:782)	DTYLIDS (SEQ ID NO:926)	DTRLIDS (SEQ ID NO:1059)	DTMLIDS (SEQ ID NO:1194)	DTKLIDS (SEQ ID NO:1338)	DTLLIDS (SEQ ID NO:75)
DTSLHAS (SEQ ID NO:644)	DTFLHAS (SEQ ID NO:783)	DTYLHAS (SEQ ID NO:927)	DTRLHAS (SEQ ID NO:1060)	DTMLHAS (SEQ ID NO:1195)	DTKLHAS (SEQ ID NO:1339)	DTLLHAS (SEQ ID NO:1479)
DTSLHSS (SEQ ID NO:645)	DTFLHSS (SEQ ID NO:784)	DTYLHSS (SEQ ID NO:928)	DTRLHSS (SEQ ID NO:1061)	DTMLHSS (SEQ ID NO:1196)	DTKLHSS (SEQ ID NO:1340)	DTLLHSS (SEQ ID NO:1480)
DTSLHKS (SEQ ID NO:646)	DTFLHKS (SEQ ID NO:785)	DTYLHKS (SEQ ID NO:929)	DTRLHKS (SEQ ID NO:1062)	DTMLHKS (SEQ ID NO:1197)	DTKLHKS (SEQ ID NO:1341)	DTLLHKS (SEQ ID NO:1481)
DTSLHRS (SEQ ID NO:647)	DTFLHRS (SEQ ID NO:786)	DTYLHRS (SEQ ID NO:930)	DTRLHRS (SEQ ID NO:1063)	DTMLHRS (SEQ ID NO:1198)	DTKLHRS (SEQ ID NO:1342)	DTLLHRS (SEQ ID NO:1482)
DTSLHHS (SEQ ID NO:648)	DTFLHHS (SEQ ID NO:787)	DTYLHHS (SEQ ID NO:931)	DTRLHHS (SEQ ID NO:1064)	DTMLHHS (SEQ ID NO:1199)	DTKLHHS (SEQ ID NO:1343)	DTLLHHS (SEQ ID NO:1483)
DTSLHPS (SEQ ID NO:649)	DTFLHPS (SEQ ID NO:788)	DTYLHPS (SEQ ID NO:932)	DTRLHPS (SEQ ID NO:1065)	DTMLHPS (SEQ ID NO:1200)	DTKLHPS (SEQ ID NO:1344)	DTLLHPS (SEQ ID NO:1484)
DTSLHTS (SEQ ID NO:650)	DTFLHTS (SEQ ID NO:789)	DTYLHTS (SEQ ID NO:933)	DTRLHTS (SEQ ID NO:1066)	DTMLHTS (SEQ ID NO:1201)	DTKLHTS (SEQ ID NO:1345)	DTLLHTS (SEQ ID NO:1485)
DTSLHDS (SEQ ID NO:651)	DTFLHDS (SEQ ID NO:790)	DTYLHDS (SEQ ID NO:934)	DTRLHDS (SEQ ID NO:1067)	DTMLHDS (SEQ ID NO:1202)	DTKLHDS (SEQ ID NO:1346)	DTLLHDS (SEQ ID NO:1486)
DTSLQAS (SEQ ID NO:652)	DTFLQAS (SEQ ID NO:791)	DTYLQAS (SEQ ID NO:935)	DTRLQAS (SEQ ID NO:1068)	DTMLQAS (SEQ ID NO:1203)	DTKLQAS (SEQ ID NO:1347)	DTLLQAS (SEQ ID NO:1487)
DTSLQSS (SEQ ID NO:653)	DTFLQSS (SEQ ID NO:792)	DTYLQSS (SEQ ID NO:936)	DTRLQSS (SEQ ID NO:1069)	DTMLQSS (SEQ ID NO:1204)	DTKLQSS (SEQ ID NO:1348)	DTLLQSS (SEQ ID NO:1488)

<u>DTSLOKS</u> (SEQ ID NO:654)	<u>DTFLQKS</u> (SEQ ID NO:793)	<u>DTYLQKS</u> (SEQ ID NO:937)	<u>DTRLQKS</u> (SEQ ID NO:1070)	<u>DTMLQKS</u> (SEQ ID NO:1205)	<u>DTKLQKS</u> (SEQ ID NO:1349)	<u>DTLLQKS</u> (SEQ ID NO:1489)
<u>DTSLQRS</u> (SEQ ID NO:655)	<u>DTFLQRS</u> (SEQ ID NO:794)	<u>DTYLQRS</u> (SEQ ID NO:938)	<u>DTRLQRS</u> (SEQ ID NO:1071)	<u>DTMLQRS</u> (SEQ ID NO:1206)	<u>DTKLQRS</u> (SEQ ID NO:1350)	<u>DTLLQRS</u> (SEQ ID NO:1490)
<u>DTSLOHS</u> (SEQ ID NO:656)	<u>DTFLQHS</u> (SEQ ID NO:795)	<u>DTYLQHS</u> (SEQ ID NO:939)	<u>DTRLQHS</u> (SEQ ID NO:1072)	<u>DTMLQHS</u> (SEQ ID NO:1207)	<u>DTKLQHS</u> (SEQ ID NO:1351)	<u>DTLLQHS</u> (SEQ ID NO:1491)
<u>DTSLOPS</u> (SEQ ID NO:657)	<u>DTFLQPS</u> (SEQ ID NO:796)	<u>DTYLQPS</u> (SEQ ID NO:940)	<u>DTRLQPS</u> (SEQ ID NO:1073)	<u>DTMLQPS</u> (SEQ ID NO:1208)	<u>DTKLQPS</u> (SEQ ID NO:1352)	<u>DTLLQPS</u> (SEQ ID NO:1492)
<u>DTSLOTS</u> (SEQ ID NO:658)	<u>DTFLQTS</u> (SEQ ID NO:797)	<u>DTYLQTS</u> (SEQ ID NO:941)	<u>DTRLQTS</u> (SEQ ID NO:1074)	<u>DTMLQTS</u> (SEQ ID NO:1209)	<u>DTKLQTS</u> (SEQ ID NO:1353)	<u>DTLLQTS</u> (SEQ ID NO:1493)
<u>DTSLODS</u> (SEQ ID NO:659)	<u>DTFLQDS</u> (SEQ ID NO:798)	<u>DTYLQDS</u> (SEQ ID NO:942)	<u>DTRLQDS</u> (SEQ ID NO:1075)	<u>DTMLQDS</u> (SEQ ID NO:1210)	<u>DTKLQDS</u> (SEQ ID NO:1354)	<u>DTLLQDS</u> (SEQ ID NO:1494)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。

表3F-VL CDR3配列

<u>FQSGYPFT</u> (SEQ ID NO:6)
<u>FQGSFYPT</u> (SEQ ID NO:61)
<u>FQGSYYPT</u> (SEQ ID NO: 1495)
<u>FQGSWYPT</u> (SEQ ID NO: 1496)

太字及び下線のアミノ酸残基は、パリビズマブのアミノ酸配列と異なる残基である。



一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号10または配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR1を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号2、配列番号19、配列番号25、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号305または配列番号329のアミノ酸配列を有するVH CDR2を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号3、配列番号12、配列番号20、配列番号29、配列番号79または配列番号311のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号10または配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR1と、配列番号2、配列番号19、配列番号25、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号305または配列番号329のアミノ酸配列を有するVH CDR2と、配列番号3、配列番号12、配列番号20、配列番号29、配列番号79または配列番号311のアミノ酸配列を有するVH CDR3とを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を有するVH CDR1と、配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR2と、配列番号20のアミノ酸配列を有するVH CDR3とを含む。このような実施形態によれば、該抗体はRSV F抗原に免疫特異的に結合する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

## 【0156】

一実施形態では、本発明の抗体のVH部アミノ酸配列は、次式の通りである：

## 【化1】

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

20

30

(配列番号48)

## 【0157】

式中、3下線領域は、各々VH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3領域を示し、4非下線領域は、各々VH FR1、FR2、FR3、FR4と相関しており、星印は、図1Bに示したパリビズマブのVH FR4(配列番号7)と比較した場合のVH FR4におけるA→Q変異の位置を示す。このVH部(配列番号48)は、本明細書の他所に記載し、図13Aに示したMEDI-524(およびMEDI-524-YTE)抗体のVH部と同一である。幾つかの実施形態では、このVH FRは、表1および/または表3A~Cで確認されるVH CDRのいずれかと組み合わせて使用できる。一実施形態では、MEDI-524抗体は、図13AのVH部(配列番号48)、ならびにJohnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC-<sub>1</sub>(nG1m)定常部を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号208のアミノ酸配列を有するVH鎖、および/または配列番号7のアミノ酸配列を有するVH部を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号254のアミノ酸配列を有するVH鎖を含む。別の実施形態では、本発明の修飾抗体は、配列番号48のアミノ酸配列を有するVH部を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば

40

50

、MEDI-524-YTE)を含む。

【0158】

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVL鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL鎖を含む抗体を提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0159】

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL部を含む抗体も提供する。本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDRを含む抗体も提供する。幾つかの実施形態では、前記抗体は、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRの1種、2種または3種を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0160】

本発明の一実施形態では、該抗体は、配列番号4、配列番号14、配列番号22、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号72、配列番号314、配列番号320または配列番号335のアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号5、配列番号15、配列番号23、配列番号27、配列番号32、配列番号35、配列番号43、配列番号50、配列番号53、配列番号57、配列番号59、配列番号63、配列番号66、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号308、配列番号315、配列番号321、配列番号326、配列番号332または配列番号336のアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号6、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号4、配列番号14、配列番号22、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号72、配列番号314、配列番号320または配列番号335のアミノ酸配列を有するVL CDR1と、配列番号5、配列番号15、配列番号23、配列番号27、配列番号32、配列番号35、配列番号43、配列番号50、配列番号53、配列番号57、配列番号59、配列番号63、配列番号66、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号308、配列番号315、配列番号321、配列番号326、配列番号332または配列番号336のアミノ酸配列を有するVL CDR2と、配列番号6、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列を有するVL CDR3とを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号39のアミノ酸配列を有するVL CDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するVL CDR3とを含む。特定の実施形態では、該抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティを有する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0161】

一実施形態では、本発明の抗体のVL部アミノ酸配列は、次式の通りである：

【化2】

```

D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   T   L   S   A   S   V
G   D   R   V   T   I   T   C   S   A   S   S   R   V   G
Y   M   H   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L

```

P C T / M S D I S T R I C T L A S G V P S R  
 F S G S G S G T E F T L T I S  
 S L Q P D D F A T Y Y C F O G  
S G Y P F T F G G G T K V\* E I

K

(配列番号11)

10

## 【 0 1 6 2 】

式中、3下線領域は、各々VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3領域を示し、4非下線領域は、各々VL FR1、FR2、FR3、FR4と関連しており、星印は、図1Aに示したパリピズマブのVL FR4と比較した場合のVL FR4におけるL V変異の位置を示す。このVL部(配列番号11)は、本明細書の他所に記載し、図13Bに示したMEDI-524抗体のVL部と同一である。幾つかの実施形態では、このVLフレームワークは、表1および/または表3D~3Fで確認されるVL CDRのいずれかと組み合わせて使用できる。一実施形態では、MEDI-524抗体は、図13BのVL部(配列番号209)、ならびにJohnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC- 定常部を含み、前記抗体は、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号209のアミノ酸配列を有するVL鎖および/または配列番号8のアミノ酸配列を有するVL部を含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号255のアミノ酸配列を有するVL鎖および/または配列番号11のアミノ酸配列を有するVL部を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

20

## 【 0 1 6 3 】

本発明は、更に、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVH鎖を、本明細書に開示する任意のVL鎖または任意の他のVL鎖と組み合わせて含む抗体を提供する。本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVL鎖を、本明細書に開示する任意のVH鎖または任意の他のVH鎖と組み合わせて含む抗体も提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

30

## 【 0 1 6 4 】

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVH部を、本明細書に開示する任意のVL部または任意の他のVL部と組み合わせて含む抗体も提供する。本発明は、更に、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVL部を、本明細書に開示する任意のVH部または任意の他のVH部と組み合わせて含む抗体も提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

40

## 【 0 1 6 5 】

特定の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、配列番号7、配列番号9、配列番号17、配列番号24、配列番号28、配列番号33、配列番号36、配列番号40、配列番号44、配列番号48、配列番号51、配列番号55、配列番号67、配列番号78、配列番号304、配列番号310、配列番号317、配列番号323または配列番号328のアミノ

50

酸配列を有するVH部と、配列番号8、配列番号13、配列番号21、配列番号26、配列番号30、配列番号34、配列番号38、配列番号42、配列番号46、配列番号49、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号65、配列番号68、配列番号70、配列番号71、配列番号74、配列番号76、配列番号307、配列番号313、配列番号319、配列番号325、配列番号331または配列番号334のアミノ酸配列を有するVL部とを含む。好ましい実施形態では、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体は、配列番号48のアミノ酸配列を有するVH部と、配列番号11のアミノ酸配列を有するVL部とを含む。別の特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティを有する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

#### 【0166】

本発明は、更に、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVH CDR1を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR2(もしくは他のVH CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR3(もしくは他のVH CDR3)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR1(もしくは他のVL CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR2(もしくは他のVL CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR3(もしくは他のVL CDR3)と組み合わせて含む、抗体を提供する。本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVH CDR2を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR1(もしくは他のVH CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR3(もしくは他のVH CDR3)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR1(もしくは他のVL CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR2(もしくは他のVL CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR3(もしくは他のVL CDR3)と組み合わせて含む、抗体も提供する。本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVH CDR3を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR1(もしくは他のVH CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR2(もしくは他のVH CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR1(もしくは他のVL CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR2(もしくは他のVL CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR3(もしくは他のVL CDR3)と組み合わせて含む、抗体も提供する。本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVL CDR1を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR1(もしくは他のVH CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR2(もしくは他のVH CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR3(もしくは他のVH CDR3)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR2(もしくは他のVL CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR3(もしくは他のVL CDR3)と組み合わせて含む、抗体も提供する。本発明は、更に、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVL CDR2を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR1(もしくは他のVH CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR2(もしくは他のVH CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR3(もしくは他のVH CDR3)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR1(もしくは他のVL CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR3(もしくは他のVL CDR3)と組み合わせて含む、抗体も提供する。本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に特異的に結合し、本明細書に開示する任意のVL CDR3を、場合により本明細書に開示する任意のVH CDR1(もしくは他のVH CDR1)と組み合わせて、および/また

20

30

40

50

は場合により本明細書に開示する任意のVH CDR2(もしくは他のVH CDR2)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVH CDR3(もしくは他のVH CDR3)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR1(もしくは他のVL CDR1)と組み合わせて、および/または場合により本明細書に開示する任意のVL CDR2(もしくは他のVL CDR2)と組み合わせて含む、抗体も提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MED1-524-YTE)を含む。

【0167】

本発明は、表2および/または表3A~3Fに列挙した1種または複数のVH CDRと、1種または複数のVL CDRとを含む抗体も提供する。特に、本発明は、VH CDR1およびVL CDR1、VH CDR1およびVL CDR2、VH CDR1およびVL CDR3、VH CDR2およびVL CDR1、VH CDR2およびVL CDR2、VH CDR2およびVL CDR3、VH CDR3およびVL CDR1、VH CDR3およびVL CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH1 CDR1、VH CDR2およびVL CDR1; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR1; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3;あるいは表2および/または表3A~3Fに列挙したVH CDRならびにVL CDRのこれらの任意の組合せを含む抗体を提供する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティーを有する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MED1-524-YTE)を含む。

【0168】

本発明は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、VH CDR1およびVL CDR1、VH CDR1およびVL CDR2、VH CDR1およびVL CDR3、VH CDR2およびVL CDR1、VH CDR2およびVL CDR2、VH CDR2およびVL CDR3、VH CDR3およびVL CDR1、VH CDR3およびVL CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH1 CDR1、VH CDR2およびVL CDR1; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR1; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR1; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3;あるいは上記の表2および/または表3A~3Fに列挙したVH CDRならびにVL CDRのこれらの任意の組合せを含む抗体

10

20

30

40

50

を提供する。別の特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に対して高いアフィニティーおよび/または高いアビディティを有する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0169】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号10または配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR1と、配列番号4、配列番号14、配列番号22、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号314、配列番号320または配列番号335のアミノ酸配列を有するVL CDR1とを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号10または配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR1と、配列番号5、配列番号15、配列番号23、配列番号27、配列番号32、配列番号35、配列番号43、配列番号50、配列番号53、配列番号57、配列番号59、配列番号63、配列番号66、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号308、配列番号315、配列番号321、配列番号326、配列番号332または配列番号336のアミノ酸配列を有するVL CDR2とを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号1、配列番号10または配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR1と、配列番号6、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列を有するVL CDR3とを含む。このような実施形態によれば、該抗体はRSV F抗原に免疫特異的に結合する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

【0170】

別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号2、配列番号19、配列番号25、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号305または配列番号329のアミノ酸配列を有するVH CDR2と、配列番号4、配列番号14、配列番号22、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号314、配列番号320または配列番号335のアミノ酸配列を有するVL CDR1とを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号2、配列番号19、配列番号25、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号305または配列番号329のアミノ酸配列を有するVH CDR2と、配列番号5、配列番号15、配列番号23、配列番号27、配列番号32、配列番号35、配列番号43、配列番号50、配列番号53、配列番号57、配列番号59、配列番号63、配列番号66、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号308、配列番号315、配列番号321、配列番号326、配列番号332または配列番号336のアミノ酸配列を有するVL CDR2とを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号2、配列番号19、配列番号25、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号305または配列番号329のアミノ酸配列を有するVH CDR2と、配列番号6、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列を有するVL CDR3とを含む。このような実施形態によれば、該抗体はRSV F抗原に免疫特異的に結合する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

30

【0171】

別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号3、配列番号12、配列番号20、配列番号29、配列番号79または配列番号311のアミノ酸配列を有するVH CDR3と、配列番号4、配列番号14、配列番号22、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号314、配列番号320または配列番号335のアミノ酸配列を有するVL CDR1とを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、配列番号3、配列番号12、配列番号20、配列番号29、配列番号79または配列番号311のアミノ酸配列を有するVH CDR3と、配列番号5、配列番号15、配列番号23、配列番号27、配列番号32、配列番号35、配列番号43、配列番号50、配列番号53、配列番号57、配列番号59、配列番号63、配列番号66、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号308、配列番号315、配列番号321、配列番号326、配列番号332または配列番号336のアミノ酸配列を有するVL CDR2とを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列

40

50

番号3、配列番号12、配列番号20、配列番号29、配列番号79または配列番号311のアミノ酸配列を有するVH CDR3と、配列番号6、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列を有するVL CDR3とを含む。このような実施形態によれば、該抗体はRSV F抗原に免疫特異的に結合する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0172】

幾つかの実施形態では、修飾抗体は、図13AのVH部(配列番号48)、図13BのVL部ならびに Johnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC- -1(nG1m)定常部を含む修飾MEDI-524抗体であって、前記抗体は、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。他の実施形態では、修飾抗体は、図13AのVH部(配列番号48)、図13BのVL部ならびに Johnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC- -1(nG1m)定常部を含む修飾MEDI-524抗体であって、前記抗体は、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸の1種または複数を含み(上記Kabatに記載のEU指標に従って付番した場合)、好ましくはYTE修飾を含む(即ち、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸)。ある種の実施形態では、修飾抗体は、図13AのVH部(配列番号48)、図13BのVL部ならびに Johnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC- -1(nG1m)定常部を含む修飾MEDI-524抗体であって、前記抗体は、252位にチロシン、254位にスレオニン、および256位にグルタミン酸を含む(上記Kabatに記載のEU指標に従って付番した場合)(以後「MEDI-524-YTE」)。

#### 【0173】

本発明は、本発明の抗体(修飾または非修飾)をコードする核酸分子も提供する。幾つかの実施形態では、本発明の抗体をコードする該核酸分子は単離されている。他の実施形態では、本発明の抗体をコードする該核酸分子は単離されていない。更に他の実施形態では、本発明の抗体をコードする該核酸分子は、例えば、染色体DNAまたは発現ベクター中に組み込まれている。特定の実施形態では、本発明の該核酸分子は、表2に参照される抗体または該抗体の抗原結合性断片、およびその修飾抗体をコードする。一実施形態では、本発明の核酸分子は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4抗体の抗原結合性断片をコードする。一実施形態では、本発明の核酸分子は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)またはその抗原結合性断片をコードする。ある実施形態では、本発明の核酸分子はMEDI-524-YTEをコードする。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0174】

別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH鎖を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH部を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Aに列挙したVH CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR1を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Bに列挙した

VH CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR2を含む抗体をコードする。更に別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Cに列挙したVH CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む抗体をコードする。幾つかの実施形態では、該核酸はMEDI-524-YTE抗体をコードする。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0175】

別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVL鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL鎖を含む抗体をコードする。一実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL部を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Dに列挙したVL CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Eに列挙したVL CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む抗体をコードする。更に別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3Fに列挙したVL CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む抗体をコードする。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0176】

別の実施形態では、核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体のVH部をコードするヌクレオチド配列を含み、該VH部は、表2および/または表3A~3Cに列挙したVH CDRの1種、2種または3種のアミノ酸配列を有する1種、2種または3種のVH CDRを含む。一実施形態では、核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体のVL部をコードするヌクレオチド配列を含み、該VL部は、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRの1種、2種または3種のアミノ酸配列を有する1種、2種または3種のVL CDRを含む。別の実施形態では、核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体のVH鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、該VH鎖は、表2および/または表3A~3Cに列挙したVH CDRの1種、2種または3種のアミノ酸配列を有する1種、2種または3種のVH CDRを含む。別の実施形態では、核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体のVL鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、該VL鎖は、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRの1種、2種または3種のアミノ酸配列を有する1種、2種または3種のVL CDRを含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0177】

別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH部を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH鎖のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL部を含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH部と、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL部とを含む抗体をコードする。別の実施形態では、本発明の核酸分子は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、表2および/または表3A~3Fに列挙したアミノ酸配列を有するVH CDR1、VL CDR1、VH CDR2、VL CDR2、VH CDR3、VL CDR3またはそれらの任意の組合



せを含む修飾抗体をコードする。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0178】

別の実施形態では、本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、VH CDR1およびVL CDR1、VH CDR1およびVL CDR2、VH CDR1およびVL CDR3、VH CDR2およびVL CDR1、VH CDR2およびVL CDR2、VH CDR2およびVL CDR3、VH CDR3およびVL CDR1、VH CDR3およびVL CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH1 CDR1、VH CDR2およびVL CDR1; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR1; VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR2; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3; VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3;あるいは上記の表2および/または表3A~3Fに列挙したVH CDRならびにVL CDRのこれらの任意の組合せを含む抗体をコードする核酸分子を提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

【0179】

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体であって、本明細書に記載され、RSV抗原に免疫特異的に結合するVH部、VH CDR、VL部およびVL CDRの誘導体を含む抗体も提供する。本発明は、パリズマブの誘導体AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4を含み、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体も提供する。例えば、アミノ酸置換を起こす部位選択的変異、PCR介在変異を含めた、当業者に公知の標準的技法を用いて、本発明の分子をコードするヌクレオチド配列中に変異を導入することができる。好ましくは、該誘導体は、その有機分子に対して、25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、または2未満のアミノ酸置換を含む。好ましい実施形態では、該誘導体は、1個または複数の予測される非必須アミノ酸残基において保守的アミノ酸置換を受ける。「保守的アミノ酸置換」とは、当該アミノ酸残基が、類似電荷の側鎖を有するアミノ酸残基で代替される置換である。類似電荷の側鎖を有するアミノ酸残基の各群が、当分野において確定されている。このような各群は、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を包含する。あるいは、飽和変異などによってコード配列の全部または一部に沿って、変異をランダムに導入することができ、産生変異体の生物活性をスクリーニングして活性を保持する変異体を特定する

30

40

50

ことができる。変異の後、コードされるタンパク質を発現することができ、該タンパク質の活性を決定することができる。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0180】

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の重鎖可変部および/または軽鎖可変部あるいはその抗原結合性断片のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変部および/または軽鎖可変部あるいはその抗原結合性断片中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有する抗体を提供する。本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の重鎖可変部および/または軽鎖可変部あるいはその抗原結合性断片のアミノ酸配列を含み、1種もしくは複数のVH CDRおよび/または1種もしくは複数のVL CDR中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有する抗体も提供する。AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH CDRおよびVL CDR中にあり、置換し得るアミノ酸残基の非限定的な例は、表2に太字で示してある。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

30

40

【0181】

本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH部および/またはVL部あるいはその抗原結合性断片のアミノ酸配列を含み、1種もしくは複数のVHフレームワークおよび/または1種もしくは複数のVLフレームワーク中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有する抗体も提供する。AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH部、VH CDR、VL部、VL CDRおよび/またはフレームワークの中に置換を導入することによって生成した該抗体は、例えば、RSV抗原に対する結合能、あるいはRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する能力について、生体外および/または生体内で試験することができる。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

40

【0182】

特定の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、パリビズマブAFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5

50

、A17f5、A17h4またはその抗原結合性断片をコードするヌクレオチド配列に対して、厳密な条件下、例えば、 $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45 の後、 $0.2\times$ SSC/ $0.1\%$ SDS中約50～65 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合DNAに対するハイブリッド形成、非常に厳密な条件下、例えば、 $6\times$ SSC中約45 の後、 $0.1\times$ SSC/ $0.2\%$ SDS中約68 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合核酸に対するハイブリッド形成、あるいは当業者に公知の他の厳密なハイブリッド形成条件下(例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの6.3.1～6.3.6ページおよび2.10.3ページを参照されたい)で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0183】

別の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5もしくはA17h4またはその抗原結合性断片のアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一である、アミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)またはその抗原結合性断片のアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0184】

特定の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、表2に列挙したVH部および/またはVL部のいずれか1つをコードするヌクレオチド配列に対して、厳密な条件下、例えば、 $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45 の後、 $0.2\times$ SSC/ $0.1\%$ SDS中約50～65 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合DNAに対するハイブリッド形成、非常に厳密な条件下、例えば、 $6\times$ SSC中約45 の後、 $0.1\times$ SSC/ $0.2\%$ SDS中約68 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合核酸に対するハイブリッド形成、あるいは当業者に公知の他の厳密なハイブリッド形成条件下(例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの6.3.1～6.3.6ページおよび2.10.3ページを参照されたい)で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるVH部のアミノ酸配列および/またはVL部のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は、表2および/または表3A～3Fに列挙したVH CDRまたはVL CDRのいずれか1つをコードするヌクレオチド配列に対して、厳密な条件下、例えば、 $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45 の後、 $0.2\times$ SSC/ $0.1\%$ SDS中約50～65 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合DNAに対するハイブリッド形成、非常に厳密な条件下、例えば、 $6\times$ SSC中約45 の後、 $0.1\times$ SSC/ $0.2\%$ SDS中約68 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合核酸に対するハイブリッド形成、あるいは当業者に公知の他の厳密なハイブリッド形成条件の下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるVH CDRのアミノ酸配列またはVL CDRのアミノ酸配列を含む。更に別の実施形態では、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は、表2および/または表3A～3Fに列挙した各々VH CDRおよびVL CDRのいずれか1つをコードするヌクレオチド配列に対して、厳密な条件下、例えば、 $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45 の後、 $0.2\times$ SSC/ $0.1\%$ SDS中約50～65 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合DNAに対するハイブリッド形成、非常に厳密な条件下、例えば、 $6\times$ SSC中約45 の後、 $0.1\times$ SSC/ $0.2\%$ SDS中約68 で1回または複数回の洗浄によるフィルター結合核酸に対するハイ

30

40

50

ブリッド形成、あるいは当業者に公知の他の厳密なハイブリッド形成条件の下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるVH CDRのアミノ酸配列およびVL CDRのアミノ酸配列を含む。

【0185】

別の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、表2に列挙したVH部のいずれか1つに、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であるVH部のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は、表2および/または表3A~3Cに列挙したVH CDRのいずれかに、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一である1種または複数のVH CDRのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、RSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体は、表2に列挙したVL部のいずれか1つに、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であるVL部のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体は、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRのいずれかに、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一である1種または複数のVL CDRのアミノ酸配列を含む。

【0186】

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)との結合に対して、表2に列挙した抗体またはFab断片と競合する抗体も包含する。本発明は、RSV F抗原との結合に対して、表2に列挙したVL部および/またはVH部を含むポリペプチド、タンパク質またはペプチドと競合する、VL部および/またはVH部を含むポリペプチド、タンパク質およびペプチドも包含する。更に、本発明は、RSV F抗原との結合に対して、表2および/または表3A~3Fに列挙したVL CDRおよび/またはVH CDRを含むポリペプチド、タンパク質またはペプチドと競合する、VL CDRおよび/またはVH CDRを含むポリペプチド、タンパク質およびペプチドも包含する。

【0187】

本発明の抗体は、化学的に、即ち任意種の分子の抗体への共有結合により修飾されている誘導体を包含する。限定するわけではないが、例えば、該抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/封鎖基による誘導体化、タンパク質分解開裂、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって、化学修飾された抗体が挙げられる。それだけに限らないが、特異的な化学開裂、アセチル化、ホルミル化、チュニカマイシンの代謝合成などを含めた公知の技法によって、多種の化学修飾のいずれをも実施し得る。その上、該誘導体は1種または複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【0188】

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、当業者に公知のフレームワーク領域(例えば、ヒトまたは非ヒト断片)を含む抗体も提供する。該フレームワーク領域は、天然またはコンセンサスのフレームワーク領域であってもよい。好ましくは、本発明の抗体のフレームワーク領域は、ヒト由来である(ヒトフレームワーク領域の一覧については、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれているChothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479を参照されたい)。特定の実施形態では、本発明の抗体はA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のフレームワーク領域を含む。

【0189】

特定の実施形態では、本発明は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、表2に列挙した抗体

(即ち、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4)のCDRの1種もしくは複数、および/または表3A~3F中のCDRの1種もしくは複数と、以下の残基、(a)マウス抗体フレームワーク(即ち、ドナー抗体フレームワーク)とヒト抗体フレームワーク(即ち、アクセプター抗体フレームワーク)との間に相違がある、希少フレームワーク残基、(b)ドナー抗体フレームワークとアクセプター抗体フレームワークとの間に相違がある場合のVenier帯残基、(c)ドナー抗体フレームワークとアクセプター抗体フレームワークとの間に相違がある、VH/VL界面の連鎖間充填残基、(d)ドナー抗体フレームワークとアクセプター抗体フレームワークとの配列間に相違がある場合の正準残基、特にマウス抗体CDRループの正準クラスの定義に肝要なフレームワーク領域、(e)CDRに隣接する領域、(g)抗原との相互作用が可能な残基、(h)CDRとの相互作用が可能な残基、および(i)VH部とVL部との接点残基、の1個、2個、3個またはそれより多数個における1個または複数のアミノ酸置換を有するヒトフレームワーク領域とのアミノ酸配列を含む抗体を提供する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

**【0190】**

本発明は、RSV F抗原に免疫特異的に結合し、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH部および/またはVL部あるいはその抗原結合性断片であって、フレームワーク領域中に変異(例えば、1個または複数のアミノ酸置換)を有するアミノ酸配列を含む抗体を包含する。ある種の実施形態では、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のVH部および/またはVL部あるいはその抗原結合性断片であって、VH部および/またはVL部のフレームワーク領域中に1個または複数のアミノ酸残基置換を有するアミノ酸配列を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

20

30

**【0191】**

本発明は、1種または複数のRSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、フレームワーク領域中に変異(例えば、1個または複数のアミノ酸置換)を有するA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のアミノ酸配列を含む抗体も包含する。ある種の実施形態では、1種または複数のRSV F抗原に免疫特異的に結合する抗体は、VH部および/またはVL部のフレームワーク領域中に1個または複数のアミノ酸残基置換と、定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)中に1個または複数の修飾とを有するA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、1種または複数のRSV F抗原に免疫特異的に結合する修飾抗体は、図2または図13に示すフレームワーク領域を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

40

**【0192】**

本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、表2にある抗体(即ち、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、Ale9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4)のVH部お

50

よび/またはVL部であって、超可変領域およびフレームワーク領域中に変異(例えば、1個または複数のアミノ酸残基置換)を有するアミノ酸配列を含む抗体も包含する。好ましくは、超可変領域およびフレームワーク領域における該アミノ酸置換は、該抗体のRSV抗原に対する結合を改善する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0193】

本発明は、1種または複数のRSV F抗原に免疫特異的に結合し、可変領域およびフレームワーク領域中に変異(例えば、1個または複数のアミノ酸残基置換)を有するA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のアミノ酸配列を含む抗体も包含する。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

#### 【0194】

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合し、当業者に公知の定常領域(例えば、Johnson et al. (1997), J. Infect. Dis. 176, 1215-1224および米国特許第5,824,307号に記載のC-1(G1m)定常部)を含む抗体も包含する。好ましくは、本発明の修飾または非修飾該定常領域は、ヒト由来である。特定の実施形態では、本発明の抗体はA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)の定常領域を含む。他の実施形態では、本発明の修飾抗体は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む。ある種の実施形態では、本発明の修飾抗体は、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。好ましい実施形態では、前記修飾抗体は、YTEを含んだ、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。

20

#### 【0195】

本発明は、本明細書に示し、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体と異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質も提供する。好ましくは、抗体が融合する該異種ポリペプチドは、呼吸器上皮細胞を該抗体の標的とするために有用である。

#### 【0196】

本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体集団も提供する。特定の実施形態では、本発明は、異なる結合速度定数、異なる解離速度定数、RSV抗原に対する異なるアフィニティーおよび/またはRSV抗原に対する異なる特異性を有する、各抗体集団を提供する。本発明は、抗体個数約10、好ましくは約25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950もしくは約1000またはそれより多数個の集団を提供する。抗体集団は、例えば、ELISAなどのアッセイのために96穴プレート中で使用できる。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

30

#### 【0197】

##### 5.1.1 半減期増加のための抗体の修飾

40

本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、生体内半減期が延長した(または増加した)修飾抗体を提供する。特に、本発明は、RSV抗原に免疫特異的に結合し、対象、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおける半減期が、約3日~約180日(または、それより長期)、幾つかの実施形態では、3日強、7日強、10日強、15日強、20日強、25日強、30日強、35日強、40日強、45日強、50日強、60日強、75日強、90日強、105日強、120日強、135日強、150日強、165日強または180日強である修飾抗体を提供する。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含む結果、生体内半減期の延長を生じる。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、YTEを含んだ、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片を含む。幾つかの実施形態では、該修飾抗体はMEDI-524-YTEである。

50

## 【0198】

ある種の実施形態では、該修飾抗体の生体内半減期は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含んでいない同じ抗体と比較して、本明細書に記載または当分野で公知の方法(実施例6.17を参照されたい)を用いて決定した場合、増加している。幾つかの実施形態では、該修飾抗体の生体内半減期は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含んでいない同じ抗体と比較して、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍またはそれより高倍率増加する。ある種の実施形態では、該修飾抗体の生体内半減期は、修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片中に1個または複数の修飾を含んでいない同じ抗体と比較して、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、25日、30日またはそれより長期間増加する。

10

## 【0199】

特定の実施形態では、生体内半減期が増加した修飾抗体は、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部断片)中に1個または複数のアミノ酸修飾(即ち、置換、挿入または欠失)を導入することにより、生成する。例えば、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている、国際公報の国際公開第02/060919号、国際公開第98/23289号および国際公開第97/34631号、ならびに米国特許第6,277,375号を参照されたい。好ましい実施形態では、該修飾抗体は、第2定常CH2部(ヒトIgG1の残基231~240)(例えば、配列番号339)および/または第3定常CH3部(ヒトIgG1の残基341~447)(例えば、配列番号340)の中に1個または複数のアミノ酸修飾を有し、付番は上記Kabat等のEU指標に準じている(例えば、図20Bを参照されたい)。

20

## 【0200】

本発明は、アミノ酸残基と、および/またはFcRnと相互作用する、定常部(例えば、IgG分子の)の特定部分における修飾とを提供し、該修飾によりIgGまたはその断片のFcRnに対するアフィニティーが増加する。したがって、本発明は、FcRnと相互作用する1つまたは複数の領域中に1個または複数のアミノ酸修飾(即ち、置換、挿入、欠失および/または天然残基)を有する、IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部断片)を含む、分子、好ましくはタンパク質、より好ましくは免疫グロブリン(本願中のセクション5.1または他所に開示した任意の抗体を含めて)を提供し、該修飾によりIgGまたはその断片のFcRnに対するアフィニティーが増加し、該分子の生体内半減期も増加する。ある種の実施形態では、1個または複数の該アミノ酸修飾は、IgGヒンジ-Fc領域(例えば、図20B、図22または配列番号342に示したヒトIgG1ヒンジ-Fc領域において)の残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数、またはアミノ酸配列の整列により決定した場合の、他のIgGヒンジ-Fc領域中の類似残基においてなされる。残基の付番はKabat et al. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版に記載のEU指標に準じている。例示的なヒトIgG1定常部のヒンジ-Fc領域は図20Bに示してあるが、その付番は上記Kabat等に記載のEU指標に準じている。IgG定常部配列(例えば、上記のKabat等を参照されたい)の自然変異のために、ある種の例では、第1のアミノ酸残基は、所与の位置にある第2のアミノ酸残基で置換されることがあり(例えば、図20Bに示した配列では、252位のMetがTyrで置換されることがある)、あるいは、第2残基は抗体中の該所与の位置に既に存在していることもあり、その場合置換は不要である(例えば、252位のMetはMetのままである)。抗体修飾については、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、同時所有、同時係属の米国出願第10/020,354号に記載されている。

30

40

## 【0201】

好ましい実施形態では、該アミノ酸修飾は、ヒトIgG1定常部(例えば、上記Kabat等に記載のもの)などのヒトIgG定常部、またはそのFcRn結合性断片(好ましくは、Fc部またはヒンジ-Fc部断片)においてなされる。ある種の実施形態では、該修飾は、該IgG定常部の残基252、254または256ではなされない(即ち、すべての修飾は、残基251、253、255、285~290、308~314、385~389または428~436の1個または複数でなされる)。一実施形態では

50

、該アミノ酸修飾は、残基252でのロイシン、254でのセリンおよび/または256位でのフェニルアラニンによる置換ではない。特にある種の実施形態では、IgG定常部、ヒンジ-Fc部、ヒンジ-Fc部または他のそのFcRn結合性断片がマウス由来の場合、このような修飾はなされない。

#### 【0202】

該アミノ酸修飾は、例えば、残基251～256、285～290、308～314、385～389および428～436(例えば、図20Bを参照されたい)の1個または複数においてなされ、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)、およびそれに結合する任意の分子の生体内半減期を増加させ、IgGまたはその断片のFcRnに対するアフィニティーを増加させる任意の修飾であってもよい。幾つかの実施形態では、該修飾抗体は、示したアミノ酸位置に1個または複数のアミノ酸置換、天然アミノ酸、あるいはその組合せを含む。また、好ましくは、1個または複数の該修飾により、定常部またはそのFcRn結合性断片のFcRnに対する結合アフィニティーが、pH7.4よりpH6.0で高くなる。他の実施形態では、該修飾は、その分子の生体利用性を変化させ(即ち、増加または減少)させ、特に、標的組織の粘膜表面(例えば、肺の)または他の部分への該分子の輸送(または濃度または半減期)を変化(即ち、増加または減少)させる。好ましい実施形態では、該アミノ酸修飾は、該分子の肺への輸送または濃度または半減期を変化(好ましくは増加)させる。他の実施形態では、該アミノ酸修飾は、該分子の心臓、すい臓、肝臓、腎臓、膀胱、胃、大腸または小腸、気道、リンパ節、神経組織(中枢および/または末梢神経組織)、筋肉、上皮、骨、軟骨、関節、血管、骨髓、前立腺、卵巣、子宮、腫瘍または癌組織などへの輸送(または濃度または半減期)を変化(好ましくは増加)させる。好ましい実施形態では、該アミノ酸修飾は、当分野で周知であり、常套的な方法で決定できるような、エフェクターまたは受容体に対する定常部の他の免疫性結合機能、例えば、それだけに限らないが、補体結合、ADCCならびにFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIへの結合を損なわず、好ましくは変化させない。別の好ましい実施形態では、定常部の修飾FcRn結合性断片は、免疫エフェクター機能または他の受容体結合をもたらす配列を含んでいない。このような断片は、非IgG即ち非免疫グロブリン分子と複合することにより、その生体内半減期を増加させるのに特に有用となり得る。更に別の実施形態では、エフェクター機能は選択的に変化させられる(例えば、エフェクター機能の増加または減少)。

#### 【0203】

ある種の実施形態では、該IgG定常部は、残基308、309、311、312および314の1個または複数において修飾を含む。幾つかの実施形態では、修飾抗体は、308位にスレオニン、309位にプロリン、311位にセリン、312位にアスパラギン酸、および/または314位にロイシンを含む。他の実施形態では、修飾抗体は、308位にイソロイシン、309位にプロリン、および/または311位にグルタミン酸を含む。更に別の実施形態では、修飾抗体は、308位にスレオニン、309位にプロリン、311位にロイシン、312位にアラニン、および/または314位にアラニンを含む。したがって、ある種の実施形態では、修飾抗体は定常部を含み、その中で308位の残基がスレオニンまたはイソロイシン、309位の残基がプロリン、311位の残基がセリン、グルタミン酸またはロイシン、312位の残基がアラニン、ならびに/あるいは314位の残基がロイシンまたはアラニンを含む。一実施形態では、修飾抗体は、308位にスレオニン、309位にプロリン、311位にセリン、312位にアスパラギン酸、および/または314位にロイシンを含む。

#### 【0204】

ある種の実施形態では、修飾抗体は、残基251、252、254、255および256の1個または複数が修飾されている定常部を含む。特定の実施形態では、残基251はロイシンまたはアルギニン、残基252はチロシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファンまたはスレオニン、残基254はスレオニンまたはセリン、残基255はアルギニン、ロイシン、グリシンまたはイソロイシン、ならびに/あるいは残基256はセリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギンまたはスレオニンである。より特定の実施形態では、残基251はロイシン、残基252はチロシン、残基254はスレオニンもしくは



はセリン、残基255はアルギニン、および/または残基256はグルタミン酸である。ある種の実施形態では、252位の残基はチロシン、残基254の残基はスレオニンもしくはセリン、残基255はアルギニン、および/または残基256はグルタミン酸である。好ましい実施形態では、修飾IgG1などの修飾IgG定常部またはそのFcRn結合性断片は、YTE修飾を含む、即ち、252位の残基はチロシン(Y)、残基254の残基はスレオニン(T)、および残基256の残基はグルタミン酸(E)である。好ましい実施形態では、該修飾抗体はMEDI-524-YTEである。

#### 【0205】

特定の実施形態では、該アミノ酸修飾は、残基428、433、434および436の1個または複数における置換である。幾つかの実施形態では、残基428はスレオニン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリン、残基433はリジン、アルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、グルタミンまたはヒスチジン、残基434はフェニルアラニン、チロシンまたはヒスチジン、ならびに/あるいは残基436はヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、スレオニン、リジンまたはメチオニンである。より特定の実施形態では、428位および/または434位の残基は、各々メチオニンおよび/またはヒスチジンで置換されている。

10

#### 【0206】

他の実施形態では、該アミノ酸配列は、残基385、386、387および389の1個または複数における修飾を含む。特定の実施形態では、残基385はアルギニン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、アラニンまたはグリシン、残基386はスレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リジン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニン、残基387はアルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、スレオニンまたはアラニン、ならびに/あるいは残基389はプロリン、セリンまたはアスパラギンである。より特定の実施形態では、位置385、386、387および389の1個または複数は、各々アルギニン、スレオニン、アルギニンおよびプロリンである。更に別の実施形態では、位置385、386および389の1個または複数は、各々アスパラギン酸、プロリンおよびセリンである。

20

#### 【0207】

幾つかの実施形態では、アミノ酸修飾は、残基251、252、254、255、256、308、309、311、312、314、385、386、387、389、428、433、434および/または436の1個または組合せでなされ、該修飾は、このような残基に対して直前に記載したアミノ酸残基である。

#### 【0208】

幾つかの実施形態では、本発明の分子は、以下の1個または複数、残基251のロイシン、残基252のチロシン、残基254のスレオニンまたはセリン、残基255のアルギニン、残基308のスレオニン、残基309のプロリン、残基311のセリン、残基312のアスパラギン酸、残基314のロイシン、残基385のアルギニン、残基386のスレオニン、残基387のアルギニン、残基389のプロリン、残基428のメチオニン、および/または残基434のチロシンを有する、Fc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。

30

#### 【0209】

ある種の実施形態では、該FcRn結合性断片は、残基251、252、254、255、256、308、309、311、312、314、385、386、387、389、428、433、434および/または436の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個または全18個において修飾を有する。

40

#### 【0210】

IgG定常部配列(例えば、上記のKabat等を参照されたい)の自然変異のために、ある種の例では、第1のアミノ酸残基は、所与の位置にある第2のアミノ酸残基で置換(または、他の方式で修飾)されることがあり(例えば、図20Bに示した配列では、252位のMetがTyrで置換されることがある)、あるいは、第2残基は抗体中の該所与の位置に既に存在していることもあり、その場合置換は不要である(例えば、252位のMetはMetのままである)。アミノ酸修飾は、当分野で公知の任意の方法によりなすことができ、このような多数の方法は、当業者にとって周知であり、常套的である。限定するわけではないが、例えば、アミノ酸の置換、欠失および挿入は、PCR基準の任意の周知方法を用いて実現し得る。アミノ酸置

50

換は、部位選択的変異によってなし得る(例えば、共にその全体が参照により本明細書に組み込まれている、Zoller and Smith, Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500, 1982; Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82: 488, 1985を参照されたい)。FcRnに対するアフィニティーの増加および生体内半減期の増加を起こす変異体は、下記のセクション5.5および5.6に記載のような周知で常套的なアッセイを用いて、容易にスクリーニングできる。好ましい実施形態では、アミノ酸置換は、IgG定常部またはそのFcRn結合性断片中の1個または複数の残基において導入され、該変異定常部または断片は、バクテリオファージの表面上に発現され、次いでそのFcRn結合アフィニティーの増加がスクリーニングされる(特に、下記のセクション5.5および5.6を参照されたい)。

#### 【0211】

好ましくは、該修飾アミノ酸残基は表面露出残基である。その上、アミノ酸置換をする際、好ましくは、置換対象のアミノ酸残基は保存的アミノ酸置換であり、例えば、極性残基は極性残基で置換され、親水性残基は親水性残基で置換され、疎水性残基は疎水性残基で置換され、正荷電残基は正荷電残基で置換され、または負荷電残基は負荷電残基で置換される。更にまた、好ましくは、該アミノ酸残基は、種間にまたがって高度または完全には保存されておらず、および/または定常部三次構造およびFcRn結合性を維持するために、それが肝要である。限定するわけではないが、例えば、残基310のヒスチジンの修飾は好ましくない。

#### 【0212】

FcRnに対するアフィニティーが増加した特定のFc部変異体は、残基308~314(310位のヒスチジンおよび313位のトリプトファンは固定)に変異を有するヒトIgG1変異体分子のライブラリーから第3回パンニング(セクション6.17に記載)後に単離したもの、残基251~256(253位のイソロイシンは固定)に対するライブラリーの第5回パンニング後に単離したもの、残基428~436(429位のヒスチジン、430位のグルタミン酸、431位のアラニン、432位のロイシン、および435位のヒスチジンは固定)に対するライブラリーの第4回パンニング後に単離したもの、ならびに残基385~389(388位のグルタミン酸は固定)に対するライブラリーの第6回パンニング後に単離したものであり、下記の表33に列挙してある。野生型ヒトIgG1は、308~314位にVal-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu(配列番号344)、251~256位にLeu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr(配列番号345)、428~436位にMet-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr(配列番号346)、および386~389位にGly-Gln-Pro-Glu-Asn(配列番号347)の配列を有する。

#### 【0213】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、Fc領域の251~256位にあるアミノ酸残基のうち、以下の残基:残基252はチロシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファンまたはスレオニンであり、残基254はスレオニンであり、残基255はアルギニン、ロイシン、グリシンまたはイソロイシンであり、残基256はセリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはスレオニンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有するFc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。特定の実施形態では、少なくとも1個のアミノ酸修飾は、以下の残基:残基251はロイシン、残基252はチロシン、残基254はスレオニン、残基255はアルギニン、および残基256はグルタミン酸からなる群から選択される。ある種の実施形態では、残基252はロイシン、アラニンまたはバリンではなく、残基253はアラニンではなく、残基254はセリンまたはアラニンではなく、残基255はアラニンではなく、ならびに/あるいは残基256はアラニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、グリシンまたはアスパラギンではない。

#### 【0214】

別の実施形態では、本発明の修飾抗体は、Fc領域の285~290位にあるアミノ酸残基のうち、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有するFc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。特定の実施形態では、残基285はアラニンではなく、残基286はアラニン、グルタミン、セリンまたはアスパラギン酸ではなく、残基288はアラニンではなく、残基289はアラニンではなく、ならびに/あるいは残基290はアラニン、グルタミン、セリン、グルタ

ミン酸、アルギニンまたはグリシンではない。

【0215】

幾つかの実施形態では、本発明の修飾抗体は、Fc領域の308～314位にあるアミノ酸残基のうち、以下の残基:308位のスレオニン、309位のプロリン、311位のセリン、および312位のアスパラギン酸からなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有するFc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。別の実施形態では、本発明の抗体は、308位のイソロイシン、309位のプロリン、および311位のグルタミン酸からなる群から選択される、1個または複数の特定の修飾を含む。別の実施形態では、修飾抗体は、308位のスレオニン、309位のプロリン、および311位のロイシンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を含む。ある種の実施形態では、309位はアラニンではなく、310位はアラニンではなく、311位はアラニンまたはアスパラギンではなく、312位はアラニンではなく、ならびに/あるいは314位はアルギニンではない。

10

【0216】

したがって、ある種の実施形態では、修飾抗体は、Fc領域中に以下の残基:308位の残基はスレオニンまたはイソロイシン、309位の残基はプロリン、311位の残基はセリン、グルタミン酸またはロイシン、312位の残基はアスパラギン酸、および314位の残基はロイシンまたはアラニンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有する定常部を含む。一実施形態では、該修飾抗体は、Fc領域中に以下の残基:308位にスレオニン、309位にプロリン、311位にセリン、312位にアスパラギン酸、および314位にロイシンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有する定常部を含む。

20

【0217】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、Fc領域の385～389位にあるアミノ酸残基のうち、以下の残基:残基385はアルギニン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、アラニンまたはグリシンであり、残基386はスレオニン、プロリン、アスパラギン酸、セリン、リジン、アルギニン、イソロイシンまたはメチオニンであり、残基387はアルギニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、スレオニンまたはアラニンであり、および残基389はプロリン、セリンまたはアスパラギンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有するFc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。特定の実施形態では、位置385、386、387および389にあるアミノ酸残基の1個または複数は、各々アルギニン、スレオニン、アルギニンおよびプロリンである。別の特定の実施形態では、位置385、386および389にあるアミノ酸残基の1個または複数は、各々アスパラギン酸、プロリンおよびセリンである。特定の実施形態では、位置386、388および389のいずれか1つにあるアミノ酸は、アラニンではない。

30

【0218】

幾つかの実施形態では、該アミノ酸修飾は、残基428～436の1つまたは複数においてなされる。特定の実施形態では、残基428はスレオニン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはセリンであり、残基433はアルギニン、セリン、イソロイシン、プロリン、グルタミンまたはヒスチジンであり、残基434はフェニルアラニン、チロシンまたはヒスチジンであり、ならびに/あるいは残基436はヒスチジン、アスパラギン、アルギニン、スレオニン、リジンまたはメチオニンである。より特定の実施形態では、428位および/または434位の残基は、各々メチオニンおよび/またはヒスチジンで置換されている。幾つかの実施形態では、430位のアミノ酸残基はアラニンではなく、433位のアミノ酸残基はアラニンまたはリジンではなく、434位のアミノ酸はアラニンまたはグルタミンではなく、435位のアミノ酸はアラニン、アルギニンまたはチロシンではなく、ならびに/あるいは436位のアミノ酸はアラニンまたはチロシンではない。

40

【0219】

別の実施形態では、本発明の抗体は、Fc領域中に、残基251のロイシン、残基252のチロシン、残基254のスレオニン、残基255のアルギニン、残基308のスレオニン、残基309のプロリン、残基311のセリン、残基312のアスパラギン酸、残基314のロイシン、残基385のア

50

ルギニン、残基386のスレオニン、残基387のアルギニン、残基389のプロリン、残基428のメチオニンおよび残基434のチロシンからなる群から選択される、1個または複数の特定のアミノ酸残基を有するFc領域またはそのFcRn結合性断片を含んでいる。

【0220】

一実施形態では、本発明は、非修飾分子と比べ、生体内半減期およびFcRnに対するアフィニティーを増加させた(幾つかの実施形態では、粘膜表面または他の標的組織への輸送の増減などの生体利用性の変化も)修飾免疫グロブリン分子を提供する。このような免疫グロブリン分子は、自然にFcRn結合性断片を含有するIgG分子、および他の非IgG免疫グロブリン(例えば、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、またはFcRn結合性断片を含有するように操作された免疫グロブリン(即ち、非IgG免疫グロブリンまたはその一部およびFcRn結合性断片を含む融合タンパク質)の断片を包含する。両方の例で、該FcRn結合性断片は、FcRnに対する定常部断片のアフィニティーを増加させる、上記のような1個または複数のアミノ酸修飾を有する。

10

【0221】

該修飾免疫グロブリンは、当分野で周知であり、本明細書に記載した、特異的な抗原-抗体結合をアッセイするための免疫アッセイにより決定した場合、抗原を結合し(好ましくは、免疫特異的に、即ち、非特異的結合と競合しない)、FcRn断片を含んだ任意の免疫グロブリン分子を包含する。このような抗体には、それだけに限らないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、ジスルフィド連結Fvs、ならびにVL部、VH部のいずれか、またはCDRさえも含み、抗原に特異的に結合し、ある種の例では、FcRn結合性断片を含むか、またはそれと融合するように操作されている断片が挙げられる。

20

【0222】

本発明のIgG分子およびそのFcRn結合性断片は、好ましくはIgGのIgG1サブクラスであるが、所与の動物の他の任意のIgGサブクラスであってもよい。例えば、ヒトのIgGクラスは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含み、マウスのIgGクラスは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cおよびIgG3を含む。ある種のIgGサブクラス、例えば、マウスのIgG2bおよびIgG2cは、例えばIgG1より高いクリアランス速度を有する(Medesan et al., Eur. J. Immunol., 28: 2092-2100, 1998)。したがって、IgG1以外のIgGサブクラスを使用する場合、IgG1配列と異なる、特にCH2部およびCH3部中の残基の1個または複数を、IgG1の残基で置換することにより、該他種のIgGの生体内半減期を増加させることが、有利となり得る。

30

【0223】

該免疫グロブリン(および本明細書で使用する他のタンパク質)は、鳥類および哺乳類を含めて、任意の動物源に由来してもよい。好ましくは、該抗体は、ヒト、げっ歯類(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリである。本明細書で使用する場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、下記、および例えば、Kucherlapati他による米国特許第5,939,598号に記載のように、ヒト免疫グロブリンライブラリー、または1種もしくは複数のヒト免疫グロブリンにトランスジェニックで、内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離される抗体を包含する。

40

【0224】

本発明の抗体(例えば、RSV抗原に対するアフィニティーおよび/またはアビディティが増加した抗体)および/または他の治療用抗体の修飾により、生体内半減期を高めると、該治療用抗体の有効投与量の減少および/または投与頻度の減少が可能となる。このような修飾による生体内半減期の増加は、診断用免疫グロブリンを改善するためにも、例えば、十分な診断感度を実現するために用量を減らした投与を可能とするためにも、有用となり得る。

【0225】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体の生体内血清循環を延長するために、高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などの不活性ポリマー分子を、多官能リンカーの使用の有無

50

に関係なく、抗体のN末端もしくはC末端に対する該PEGの部位特異的複合により、またはリジン残基上に存在する -アミノ基を介することにより、該抗体に結合する。生物活性の喪失を最小限に留める、線状または分岐ポリマーによる誘導体化を使用する。PEG分子の該抗体への適当な複合を保証するために、複合の程度はSDS-PAGEおよび質量分析により綿密にモニターできる。未反応のPEGは、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって、抗体-PEG複合体から分離できる。PEG誘導体化抗体は、当業者に周知の方法、例えば本明細書に記載の免疫アッセイを用いて、その結合活性ならびに生体内効力について試験することができる。

#### 【0226】

別の実施形態では、本発明の抗体は、該抗体の生体内安定性を高め、またはその生体内半減期を延ばすために、アルブミンと複合される。その技法は当分野で周知であり、例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれている、国際公報の国際公開第93/15199号、国際公開第93/15200号および国際公開第01/77137号、ならびに欧州特許EP第413,622号を参照されたい。

#### 【0227】

定常部のアミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436における1個または複数の修飾は、当業者に公知の任意の技法を利用して導入し得る。アミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436に1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片は、例えば結合アッセイによってスクリーニングすることにより、FcRn受容体に対するアフィニティーが増加した定常部またはその断片を特定し得る(例えば、下記のセクション5.5および5.6に記載するように)。定常部またはその断片のFcRn受容体に対するアフィニティーを増加させる、ヒンジ-Fc部またはその断片における修飾を抗体中に導入することにより、前記抗体の生体内半減期を増加させることができる。更に、定常部またはその断片のFcRnに対するアフィニティーを増加させる、定常部またはその断片における修飾を生物活性分子と融合することにより、前記生物活性分子の生体内半減期を増加させる(および、好ましくは、該分子の生体利用性を変化(増減)させる、例えば、粘膜表面(または他の標的組織)(例えば、肺)への輸送を増減させる)ことができる。

#### 【0228】

##### 5.1.2 抗体複合体および融合タンパク質

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、診断剤、検出可能剤もしくは治療剤、または他の任意の分子に複合または組換え融合される。生体内半減期を増加させることが望ましい場合、前記抗体は修飾抗体とすることができる。該複合または組換え融合抗体は、特定の治療薬の効力決定などの臨床試験手順の一部として、例えば、RSV URIおよび/またはLR Iあるいは中耳炎の発症、展開、進行および/または重度をモニターまたは予知するために、有用なものとし得る。このような診断および検出は、それだけには限らないが、各種酵素、例えば、それだけには限らないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼ;補欠分子族、例えば、それだけには限らないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチン;蛍光物質、例えば、それだけには限らないが、ウンベリフェロン、フルオレッセイン、フルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレッセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリン;発光物質、例えば、それだけには限らないが、ルミノール;生物発光物質、例えば、それだけには限らないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリン;放射性物質、例えば、それだけには限らないが、ヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ および $^{121}\text{I}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、硫黄( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、インジウム( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ および $^{111}\text{In}$ )、テクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム( $^{201}\text{Ti}$ )、ガリウム( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{113}\text{Sn}$ および $^{117}\text{Sn}$ ;ならびに各種ポジトロン放出断層撮影を用いるポジトロン放出金属および非放射

10

20

30

40

50

性常磁性金属イオンを含めた、検出可能物質に抗体をカップリングすることにより、実現できる。

【0229】

本発明は、更に、治療性部分(または1種もしくは複数の治療性部分)に複合または組換え融合した、本発明の抗体の使用を包含する。該抗体は、細胞毒、例えば細胞分裂阻害剤もしくは細胞破壊剤、治療剤、または放射性金属イオン、例えば線源などの治療性部分に複合または組換え融合してもよい。細胞毒または細胞毒性物質は、細胞に有害な任意の物質を包含する。治療性部分には、それだけには限らないが、抗代謝物質(例えば、メソトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロルエタミン、チオテバクロランブシル、メルファラン、カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシスジクロロジアミン白金(II)(DDP)およびシスプラチン)、アンスラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(以前のダウノマイシン)およびドキソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミスラマイシンおよびアンスラマイシン(AMC))、アウリスタチン分子(例えば、アウリスタチンPHE、プライオスタチン1、およびソラストチン10;いずれも参照により本明細書に組み込まれている、Woyke et al., Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002), Woyke et al., Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., Anticancer Drugs 12:735-40 (2001), Wall et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80 (1999), Mohammad et al., Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999)を参照されたい)、ホルモン(例えば、グルココルチコイド、プロゲステロン、アンドロゲンおよびエストロゲン)、DNA修復酵素阻害剤(例えば、エトポシドまたはトポテカン)、キナーゼ阻害剤(例えば、化合物ST1571、メシル酸イマチニブ(Kantarjian et al., Clin Cancer Res. 8(7): 2167-76 (2002))), 細胞傷害剤(例えば、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、マイトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピュロマイシンならびにそれらの類縁体または同族体、更に米国特許第6,245,759号、第6,399,633号、第6,383,790号、第6,335,156号、第6,271,242号、第6,242,196号、第6,218,410号、第6,218,372号、第6,057,300号、第6,034,053号、第5,985,877号、第5,958,769号、第5,925,376号、第5,922,844号、第5,911,995号、第5,872,223号、第5,863,904号、第5,840,745号、第5,728,868号、第5,648,239号、第5,587,459号に開示される化合物)、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば、R115777、BMS-214662、および例えば米国特許第6,458,935号、第6,451,812号、第6,440,974号、第6,436,960号、第6,432,959号、第6,420,387号、第6,414,145号、第6,410,541号、第6,410,539号、第6,403,581号、第6,399,615号、第6,387,905号、第6,372,747号、第6,369,034号、第6,362,188号、第6,342,765号、第6,342,487号、第6,300,501号、第6,268,363号、第6,265,422号、第6,248,756号、第6,239,140号、第6,232,338号、第6,228,865号、第6,228,856号、第6,225,322号、第6,218,406号、第6,211,193号、第6,187,786号、第6,169,096号、第6,159,984号、第6,143,766号、第6,133,303号、第6,127,366号、第6,124,465号、第6,124,295号、第6,103,723号、第6,093,737号、第6,090,948号、第6,080,870号、第6,077,853号、第6,071,935号、第6,066,738号、第6,063,930号、第6,054,466号、第6,051,582号、第6,051,574号および第6,040,305号により開示されているもの)、トポイソメラーゼ阻害剤(例えば、カンプトテシン、イリノテカン、SN-38、トポテカン、9-アミノカンプトテシン、GG-211(GI147211)、DX-8951f、IST-622、ルピテカン、ピラゾロアクリジン、XR-5000、サイントピン、UCE6、UCE1022、TAN-1518A、TAN1518B、KT6006、KT6528、ED-110、NB-506およびレベッカマイシン)、ブルガレイン、Hoescht dye 33342およびHoescht dye 33258などのDNA副溝結合剤、ニチジン、ファガロニン、エピベルベリン、コラリン、-ラバコン、BC-4-1、ビスホスホネー

10

20

30

40

50

ト(例えば、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、チルドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルバンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート)、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤(例えば、ロバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、セリバスタチン、レスコール、ルピトール、ロスバスタチンおよびアトルバスタチン)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、米国特許第6,277,832号、第5,998,596号、第5,885,834号、第5,734,033号および第5,618,709号に開示されているもの)、アデノシンデアミナーゼ阻害剤(例えば、フルダラビンリン酸塩および2-クロロデオキシアデノシン)、イブリツモマブチウキセタン(Zevalin(登録商標))、トシツモバブ(Bexxar(登録商標))、ならびにそれらの医薬として許容可能な塩、溶媒和物、包接体およびプロドラッグが挙げられる。

10

#### 【0230】

更に、本発明の抗体は、所与の生物学的応答を調節する治療性部分または薬物部分に複合または組換え融合してもよい。該治療性部分または薬物部分は、古典的な化学療法剤に限られるとみなすべきではない。例えば、該薬物部分は、所望の生物活性を保有するタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、コレラ毒素またはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、アボトシス剤、例えばTNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIM I(国際公報の国際公開第97/33899号を参照されたい)、AIM II(国際公報の国際公開第97/34911号を参照されたい)、Fasリガンド(Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567-1574を参照されたい)およびVEGF(国際公報の国際公開第99/23105号を参照されたい)、抗血管形成剤、例えばアンジオスタチン、エンドスタチンまたは凝固経路の成分(例えば、組織因子)；あるいは生物学的応答調節物質、例えばリンホカイン(例えば、 $\alpha$ -インターフェロン、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-5(「IL-5」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、インターロイキン-7(「IL-7」)、インターロイキン-9(「IL-9」)、インターロイキン-10(「IL-10」)、インターロイキン-12(「IL-12」)、インターロイキン-15(「IL-15」)、インターロイキン-23(「IL-23」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)および顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、または成長因子(例えば、成長ホルモン(「GM」))、または凝固剤(例えば、カルシウム、ビタミンK、それだけに限らないが、ハーゲマン因子(第XII因子)などの組織因子、高分子キニノーゲン(HMWK)、プレカリクレイン(PK)、血液凝固タンパク質の第II因子(プロトロンビン)、第V、XIIa、VIII、XIIIa、XI、XIa、IX、IXa、Xの各因子、リン脂質およびフィブリン単量体)が挙げられる。

20

30

#### 【0231】

本発明は、異種のタンパク質またはポリペプチド(またはその断片、好ましくはアミノ酸が約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個または約100個のポリペプチド)に組換え融合または化学複合し、融合タンパク質を生成する、本発明の抗体(例えば、修飾抗体)を包含する。特に、本発明は、本発明の抗体の抗原結合性断片(例えば、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、VH部、VH CDR、VL部、またはVL CDR)と、異種のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。好ましくは、抗体が融合する該異種のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、特定の細胞型を該抗体の標的とするのに有用である。例えば、特定の細胞型により発現される細胞表面受容体(例えば、免疫細胞)に免疫特異的に結合する抗体は、本発明の修飾抗体に融合または複合してもよい。

40

#### 【0232】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4抗体と、異種ポリペプチドとを

50

含む。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の抗原結合性断片と、異種ポリペプチドとを含む。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH部、または表2に列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL部と、異種ポリペプチドとを含む。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2および/または表3A~3Cに列挙したVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDRと、異種ポリペプチドとを含む。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2および/または表3D~3Fに列挙したVL CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDRと、異種ポリペプチドとを含む。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2に列挙した少なくとも1種のVH部および少なくとも1種のVL部と、異種ポリペプチドとを含む。更に別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2および/または表3A~3Fに列挙した少なくとも1種のVH CDRおよび少なくとも1種のVL CDR部と、異種ポリペプチドとを含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

#### 【0233】

その上、本発明の抗体は、放射性金属イオン、例えば $^{213}\text{Bi}$ などの線源などの治療性部分に、またはそれだけに限らないが、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{131}\text{Lu}$ 、 $^{131}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{Ho}$ 、 $^{131}\text{Sm}$ を含めた放射性金属イオンのポリペプチドへの複合化に有用な大環状キレート化剤に複合できる。ある種の実施形態では、該大環状キレート化剤は、リンカー分子を介して抗体に結合できる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。このようなリンカー分子は、当分野で一般に公知であり、各々の全体が参照により組み込まれている、Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7;およびZimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。

20

#### 【0234】

その上、本発明の抗体は、精製を促進するために、ペプチドなどのマーカー配列に融合できる。好ましい実施形態では、該マーカーアミノ酸配列は、その多くが市販されている中でも、pQEベクター(QIAGEN, Inc.)中に入れられるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。例えばGentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載のように、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質を都合よく精製する。精製に有用な他のペプチドタグには、それだけに限らないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質(Wilson et al., 1984, Cell 37:767)由来のエピトープに相当するヘマグルチニン(「HA」)タグ、および「フラッグ」タグが挙げられる。

30

#### 【0235】

抗体に治療性部分(ポリペプチドを含めて)を融合または複合する方法は、周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58;ならびに米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,34

40

50



9,053号、第5,447,851号、第5,723,125号、第5,783,181号、第5,908,626号、第5,844,095号および第5,112,946号；欧州特許第307,434号、欧州特許第367,166号、欧州特許第394,827号；PCT公報の国際公開第91/06570号、国際公開第96/04388号、国際公開第96/22024号、国際公開第97/34631号および国際公開第99/04813号；Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991；Traunecker et al., Nature, 331:84-86, 1988；Zheng et al., J. Immunol., 154:5590-5600, 1995；Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341, 1992；ならびに"Methods of Preventing and Treating RSV Infections and Related Conditions"という名称の2005年10月14日出願された米国仮出願第60/727,043号(代理人整理番号10271-165-888)；および"Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment of RSV Infections and Respiratory Conditions"という名称のGenevieve Losonskyにより2005年10月14日出願された米国仮出願第60/727,042号(代理人整理番号10271-174-888)を参照されたいが、いずれもその全体を参照により本明細書に組み込んである。

10

20

30

40

50

#### 【0236】

特に、融合タンパク質は、例えば、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリングおよび/またはコドンシャッフリング(「DNAシャッフリング」と総称する)の技法により生成し得る。本発明の抗体の活性を変化させる(例えば、アフィニティを高め、解離速度を落とした抗体)ために、DNAシャッフリングを採用してもよい。全般的には、米国特許第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号および第5,837,458号；Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Hara yama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；ならびに Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308- 313(これらの特許および刊行論文は、各々その全体を参照により本明細書に組み込んである)を参照されたい。抗体またはコードされた抗体は、変異性PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法により、組換え前にランダム変異を起こして改変してもよい。本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、1種または複数の異種分子の1個または複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組換えてもよい。

#### 【0237】

本発明の抗体は、その全体を参照により本明細書に組み込んである米国特許第4,676,980号に記載のように、第2の抗体と複合することにより、抗体異種複合体を形成することもできる。

#### 【0238】

RSV抗原に免疫特異的に結合する本発明の抗体に対して、複合または組換え融合する該治療性の部分または薬物は、所望の予防効果または治療効果を発揮するように選択すべきである。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体である。本発明の抗体に複合または組換え融合する治療性の部分または薬物は、いずれにすべきかを決定する場合、臨床家または他の医療従事者は、以下のこと、疾患の特性、疾患の重度、および対象の状態を考慮すべきである。

#### 【0239】

本発明の抗体は、固相支持体に結合してもよく、それは免疫アッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。このような固相支持体には、それだけに限らないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

#### 【0240】

#### 5.1.3 治療薬としての細胞内抗体タンパク質

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は細胞内抗体である。細胞内抗体を産生する方法は、下記のセクション5.7で考察する。一実施形態では、組換え発現した細胞内抗体タンパク質が患者に投与される。このような細胞内抗体ポリペプチドは、予防効果または治療効果をもたらすために細胞内に由来しなければならない。本発明のこの実施形態では、該細胞内抗体ポリペプチドは「膜透過性配列」と結合している。膜透過性配列は、細胞膜を

通って細胞外部から細胞内部へ進入できるポリペプチドである。別のポリペプチドと連結している際、膜透過性配列は、そのポリペプチドの細胞膜を貫く移行も誘導することができる。

#### 【0241】

一実施形態では、該膜透過性配列は、シグナルペプチドの疎水性領域である(例えば、その全体がいずれも参照により本明細書に組み込まれているHawiger, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89-94; Hawiger, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:189-94; 米国特許第5,807,746号および第6,043,339号を参照されたい)。膜透過性配列の該配列は、任意のシグナルペプチドの疎水性領域に基づくことができる。該シグナルペプチドは、例えばSIGPEPデータベースから選択できる(例えば、von Heijne, 1987, Prot. Seq. Data Anal. 1:41-2; von Heijne and Abrahmsen, 1989, FEBS Lett. 224:439-46を参照されたい)。特定の細胞型を細胞内抗体ポリペプチドの挿入に対する標的とする場合、該膜透過性配列は、その細胞型に内因性のシグナルペプチドに基づくのが好ましい。別の実施形態では、該膜透過性配列はウイルスタンパク質である(例えば、ヘルペスウイルスタンパク質VP22)(例えば、Phelan et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16:440-3を参照されたい)。特定の細胞内抗体および/または特定の標的細胞型に対して適当な性質を有する膜透過性配列は、各膜透過性配列が該細胞内抗体の細胞膜を貫く移行を誘導する能力を評価することによって、実験的に決定できる。膜透過性配列の例には、それだけに限らないが、表4に開示した配列が挙げられる。

#### 【表4】

表4

配列	配列番号
Ala Ala Val Ala Leu Lue Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro	SEQ ID NO:37
Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro	SEQ ID NO:38
Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly	SEQ ID NO:39

#### 【0242】

別の実施形態では、該膜透過性配列は誘導体でもよい。この実施形態では、膜透過性配列のアミノ酸配列は、アミノ酸残基の置換、欠失、付加および/または修飾の導入によって変化させた。限定するわけではないが、例えば、ポリペプチドは、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/封鎖基による誘導体化、タンパク質開裂、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などにより、修飾してもよい。膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、それだけに限らないが、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、チュニカマイシンの代謝合成などを含めた当業者に公知の技術を用いた化学修飾によって、修飾してもよい。更に、膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、1個または複数の非古典的アミノ酸を含んでもよい。一実施形態では、ポリペプチド誘導体は、非改変ポリペプチドと類似または同一の機能を保有する。別の実施形態では、膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、非改変ポリペプチドと比較したとき、改変された活性を有する。例えば、膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、より効率的に細胞膜を通して移行し、またはタンパク質分解に対してより高い抵抗性を示すことができる。

#### 【0243】

該膜透過性配列は、幾つもの方法で細胞内抗体に結合することができる。一実施形態では、該膜透過性配列および該細胞内抗体は、融合タンパク質として発現される。この実施形態では、該膜透過性配列をコードする核酸が、該細胞内抗体をコードする核酸に標準的な組換えDNA技法を用いて結合される(例えば、Rojas et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16:370-5を参照されたい)。更なる実施形態では、該膜透過性配列および該細胞内抗体をコードする両核酸の間に、スペーサーをコードする核酸が配置される。別の実施形態では、該膜透過性配列ポリペプチドは、該細胞内抗体ポリペプチドに、各々を別々に組換え発現させてから結合される(例えば、Zhang et al., 1998, PNAS 95:9184-9を参照されたい)。この実施形態では、両ポリペプチドは、当分野で標準的な方法で、ペプチド結合または非

ペプチド結合により連結できる(例えば、グルタルアルデヒドやチアゾリジノ連結基などの架橋剤を用いて、例えば、Hawiger, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89-94を参照されたい)。

#### 【0244】

該膜透過性配列-細胞内抗体の投与は、非経口投与により、例えば、標的細胞を有する組織もしくは器官に供給する血管を介した局所灌流を含めた、静脈内注射により、あるいはエアロゾルの吸入、皮下または筋肉内注射、鼻腔内投与、皮膚の創傷および病変に対する場合などの局所投与、移植用に調製した、例えば骨髓細胞中への直接移入とその後の対象への移植、ならびに器官中への直接移入とその後の対象への移植によりなし得る。更なる投与法には、特に該複合体がカプセル入りの場合の経口投与、特に該複合体の剤形が坐剤の場合の直腸投与が挙げられる。医薬として許容できる担体は、生物学的に、または他の面から不都合ではない任意の物質を包含する、即ち、該物質は、不都合な生物作用を起こさず、またはそれを含む医薬組成物の任意の他成分と有害に相互作用せずに、選択した複合体と共に個体へ投与し得る。

#### 【0245】

該膜透過性配列-細胞内抗体のポリペプチドを投与するための条件は、当分野の教示があれば容易に決定できる(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., E. W. Martin (ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990)を参照されたい)。例えば、器官または腫瘍に局所灌流することにより、生体内の特定の細胞型を標的にするのであれば、該組織細胞からの細胞を生検することができ、その組織中に該複合体を移入する最適用量を生体外で決定することにより、濃度および期間を含めて生体内用量を最適化することができる。あるいは、同じ細胞型の培養細胞を用いて、標的細胞に対する生体内用量を最適化することもできる。

#### 【0246】

### 5.2 抗体の予防的使用および治療的使用

本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、対象、好ましくはヒト(例えば、その治療薬を必要とする対象)に本発明の抗体を投与することを伴う、抗体系治療薬に向けたものである。本発明の予防剤および治療剤は、それだけに限らないが、本発明の抗体(本明細書に記載するような、その類縁体および誘導体を含む)ならびに本発明の抗体をコードする核酸(本明細書に記載するような、その類縁体および誘導体と、抗イディオタイプ抗体を含む)を包含する。本発明の抗体は、当分野で公知または本明細書に記載(例えば、セクション5.1および5.3を参照されたい)の医薬として許容できる組成物中に入れてもよい。本発明の方法に従って使用される該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部もしくはヒンジ-Fc部)を含んでもよく、または含まなくてもよい。ある種の実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。

#### 【0247】

RSV感染症のアンタゴニストとして機能する本発明の抗体は、RSV URIおよび/またはLRI、中耳炎(好ましくは、RSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、あるいは/ならびにそれらに関連する症状または呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を治療、予防、または改善するために、対象、好ましくはヒトに投与できる。例えば、RSV抗原と宿主細胞受容体との相互作用を妨害または予防する抗体は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、対象、好ましくはヒトに投与してもよい。

## 【 0 2 4 8 】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSVの宿主細胞受容体との結合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイ、例えば競合アッセイ(例えば、実施例6.8を参照されたい)または微量中和アッセイ(例えば、実施例6.6を参照されたい)において、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下での宿主細胞受容体とのRSV結合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。別の実施形態では、本発明の抗体の併用は、RSVの宿主細胞受容体との結合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイにおいて、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下での宿主細胞受容体とのRSV結合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。ある種の実施形態では、本発明の1種または複数の修飾および/または非修飾抗体は、単独で、または併用して投与することができる。幾つかの実施形態では、本発明の抗体の併用は、RSVの宿主および受容体との結合を防止または阻害するために、ならびに/あるいはRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する際に、相乗的に作用する。

10

20

## 【 0 2 4 9 】

特定の実施形態では、本発明の抗体(修飾または非修飾)は、RSV誘発融合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイ(例えば、実施例6.6を参照されたい)において、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのRSV誘発融合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。別の実施形態では、本発明の抗体の併用は、RSV誘発融合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイにおいて、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのRSV誘発融合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。

30

40

## 【 0 2 5 0 】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、ウイルスの細胞接着後のRSV誘発融合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイ(例えば、実施例6.6を参照されたい)において、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのウイルスの細胞接着後のRSV誘発融合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。別の実施形態では、本発明の抗体

50

の併用は、ウイルスの細胞接着後のRSV誘発融合を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイにおいて、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのウイルスの細胞接着後のRSV誘発融合に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%防止または阻害する。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。

10

#### 【0251】

RSVの宿主細胞受容体との結合を防止しないが、RSV複製を阻害もしくは下方調節し、または細胞とのRSV融合を阻害する本発明の抗体も、RSV URIおよび/またはLRI、中耳炎(RSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、あるいは/ならびにそれらに関連する症状または呼吸状態(それだけには限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を治療、予防、または改善するために、対象に投与できる。本発明の抗体がRSV複製を阻害または下方調節する能力は、本明細書に記載の技法または当分野で公知の他の技法(例えば、実施例6.4を参照されたい)により決定し得る。例えば、RSV複製の阻害または下方調節は、対象、好ましくはヒトの肺におけるRSV力価を検出することにより、決定できる。更なる実施形態では、RSV複製の阻害または下方調節は、当分野で公知の方法(例えば、

20

#### 【0252】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、肺におけるRSV力価を約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍またはそれより高い倍率、減少させる。RSV力価の減少倍率は、陰性対照(ブラシーボなど)と比較、別の治療(それだけには限らないが、パリーブズマブによる治療を含む)と比較、または抗体投与前の該患者の力価と比較してもよい。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。該抗体が本発明の修飾抗体である実施形態では、IgG定常部に修飾がない同じ抗体を受ける対象と、該減少を更に比較してもよい。

30

#### 【0253】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、RSV複製を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイ(例えば、実施例6.4を参照されたい)において、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのRSV複製に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%阻害または下方調節する。別の実施形態では、本発明の抗体の併用は、RSV複製を、当業者に公知または本明細書に記載のアッセイにおいて、前記抗体の不在下または陰性対照の存在下でのRSV複製に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少

40

50

なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%阻害または下方調節する。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。

【0254】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、上気道におけるRSV力価を約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍またはそれより高い倍率、減少させる。RSV力価の減少倍率は、陰性対照(ブラシーボなど)と比較、別の治療(それだけに限らないが、パリビズマブによる治療を含む)と比較、または抗体投与前の該患者の力価と比較してもよい。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。該抗体が本発明の修飾抗体である実施形態では、IgG定常部に修飾がない同じ抗体を受ける対象と、該減少を更に比較してもよい。

10

【0255】

他の実施形態では、本発明の抗体は、下気道におけるRSV力価を約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍またはそれより高い倍率、減少させる。RSV力価の減少倍率は、陰性対照(ブラシーボなど)と比較、別の治療(それだけに限らないが、パリビズマブによる治療を含む)と比較、または抗体投与前の該患者の力価と比較してもよい。ある種の実施形態では、上記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは該修飾IgG定常部がYTE修飾を含む(例えば、MEDI-524 YTE)。したがって、幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体であり、他の実施形態では、該抗体は修飾抗体ではない。該抗体が本発明の修飾抗体である実施形態では、IgG定常部に修飾がない同じ抗体を受ける対象と、該減少を更に比較してもよい。

20

30

【0256】

本発明の1種または複数の抗体(例えば、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)は、本明細書に記載の技法または当分野で公知の他の技法(例えば、実施例6.19を参照されたい)により決定した場合、別の抗RSV抗体と比較して、ヒト、ラット(例えば、コットンラット)、および/またはサル(例えば、カニクイザルまたはチンパンジー)の組織試料との交差反応性の低下または消失を示す。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、A4b4と比較して(例えば、実施例6.19を参照されたい)、交差反応性の低下または消失を示す。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、陰性対照抗体(例えば、本発明の抗体と抗原特異性が異なる、ヒトモノクローナルIgG1抗体などの抗ヒトIgG抗体)で認められるものと比較して、交差反応性の低下または消失を示す。ある種の実施形態では、該組織試料は皮膚または肺である。他の実施形態では、該組織試料は、副腎、白血球、血管(例えば、内皮)、骨髄、脳(例えば、大脳または小脳)、胸(乳腺)、眼、結腸、大腸、小腸、食道、胃、心臓、腎臓(例えば、糸球体または尿細管)、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、ファローピウス管(例えば、卵管)、すい臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、脊髄、脾臓、横紋筋(例えば、骨格筋)、睾丸、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱および/または子宮(例えば、内膜または頸部)組織である。ある種の実施形態では、該抗体(例えば、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)は、別の抗RSV抗体(例えば、A4b4)と比較して、ヒト組織試料(例えば、皮膚または肺)との交差反応

40

50

性が約100倍、約90倍、約80倍、約70倍、約60倍、約50倍、約40倍、約30倍、約20倍、約10倍、約5倍または約2倍低下している。好ましい実施形態では、該組織は皮膚または肺であり、該抗体(例えば、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)は、本明細書に記載の技法または当分野で公知の他の技法(例えば、実施例6.19を参照されたい)により決定した場合、A4b4と比較して、該組織との交差反応性の低下または消失を示す。

#### 【0257】

1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合する、本発明の1種または複数の抗体は、予防剤または治療剤として体内で局所的または全身的に使用し得る。本発明の抗体は、他の抗体(例えば、モノクローナル抗体またはキメラ抗体)と、あるいはリンホカインまたは造血成長因子(例えば、IL-2、IL-3およびIL-7など)と組み合わせて有利に利用してもよいが、そのようなものは、例えば、該抗体と相互作用するエフェクター細胞の個数または活性の増加に役立つ。本発明の抗体は、他の抗体(例えば、モノクローナル抗体またはキメラ抗体)と、あるいはリンホカインまたは造血成長因子(例えば、IL-2、IL-3およびIL-7など)と組み合わせて有利に利用してもよいが、そのようなものは、例えば、免疫反応を高めるのに役立つ。本発明の抗体は、例えば抗ウイルス剤などの、RSV感染症の治療に使用する1種または複数の薬物と組み合わせて有利に利用してもよい。本発明の抗体は、以下の薬物:リバビリン(Valent Pharmaceuticals International)、NIH-351(Gemini Technologies)、組換えRSVワクチン(MedImmune Vaccines)、RSVf-2(Intracel)、F-50042(Pierre Fabre)、T-786(Trimeris)、VP-36676(ViroPharma)、RFI-641(American Home Products)、VP-14637(ViroPharma)、PPF-1およびPPF-2(American Home Products)、RSVワクチン(Avant Immunotherapeutics)、F-50077(Pierre Fabre)、ならびに国際公開第05/061513号(Biota Scientific Management Pty Ltd.)の1種または複数と組み合わせて使用してもよい。特定の実施形態では、本発明の抗体の有効量および別の治療薬の有効量が使用される。

#### 【0258】

本発明の抗体は、単独で、または他種の治療薬(例えば、ホルモン治療薬、免疫治療薬および抗炎症剤)と併用して投与してもよい。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、他の治療薬と相乗的に作用する。一般に、患者と同種である、種由来または種反応性の産物(抗体の場合)を投与することが好ましい。したがって、好ましい実施形態では、ヒト由来の、またはヒト化した抗体、誘導体、類縁体または核酸が、治療または予防のためにヒト患者に投与される。

#### 【0259】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、1種または複数の抗IL-9抗体(米国出願公開第2005/0002934号に開示されたものなど)と併用して、それだけで、あるいは本発明の1種または複数の修飾抗体および/または他種の治療薬もしくは他の薬剤(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国出願公開第2005/0002934号に開示されたものなどのホルモン治療薬、免疫治療薬および抗炎症剤)と組み合わせて投与される。

#### 【0260】

RSVに対する免疫アッセイと、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善とのいずれに対しても、RSV抗原に免疫特異的に結合する、高アフィニティーおよび/または有効生体内阻害性の抗体、ならびに/あるいは中和性抗体を使用することが好ましい。RSVに対する免疫アッセイと、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)のための治療薬とのいずれに対しても、RSV抗原に免疫特異的に結合する、高アフィニティーおよび/または有効生体内阻害性の抗体、ならびに/あるいは中和性抗体をコードするポリヌクレオチドを使用することも好ましい。このような抗体は、RSV F糖タンパク質および/または該F糖タンパク質の断片に対してアフィニティーを有

することが好ましいであろう。

【0261】

本発明の方法は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)に罹患している患者、または罹患すると予想される患者(例えば、上記のものに対して、遺伝的素因のある患者または以前に罹ったことのある患者)に、本発明の1種または複数の抗体を投与することを含む。このような患者は、RSV感染症、中耳炎またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態に対して、例えば、本発明の修飾抗体以外の治療薬で以前に治療された可能性があり、または現在治療されている。一実施形態では、本発明の方法は、免疫低下しているか、または免疫抑制されている患者に、本発明の1種または複数の抗体を投与することを含む。別の実施形態では、本発明の抗体は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症または後天性免疫不全症のヒト、または骨髄移植を受けたヒトに投与される。別の実施形態では、本発明の抗体は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、乳幼児、好ましくは、未熟児生まれの乳幼児、またはRSV感染のために入院する危険性のある乳幼児に投与される。更に別の実施形態では、本発明の抗体は、高齢者またはグループホーム(例えば、ナーシングホームまたはリハビリテーションセンター)の人々に投与される。本発明によれば、本発明の抗体は、それだけに限らないが、第1、第2、第3、第4および/または第5方針の治療を含めて、任意方針の治療として使用してもよい。更に、本発明によれば、本発明の抗体は、本発明の抗体以外の治療薬の任意の有害作用または不耐性が生じる前、または後に使用できる。本発明は、急性RSV疾患の発症を予防するため、ならびに/あるいはRSV URIおよび/またはLRIや中耳炎の再発を治療または軽減するために、本発明の1種または複数の抗体を投与する方法を包含する。

【0262】

一実施形態では、本発明は、現行治療薬の代替として、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法も提供する。特定の実施形態では、該現行治療薬は、患者にとって毒性が高過ぎることが判明したか、または判明し得る。別の実施形態では、本発明の抗体は、現行治療薬と比較して副作用を減少させる。別の実施形態では、患者は現行治療薬に不応であることが判明した。このような実施形態では、本発明は、他の抗感染症治療薬を全く用いずに本発明の1種または複数の抗体を投与する。ある種の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の患者は、その感染症が目立って消失せず、および/またはその症状が目立って軽減しなかった場合、治療薬に不応である。患者が不応か否かの判定は、感染症に対する治療薬の有効性をアッセイする当分野で公知の任意の方法により、生体内、生体外のいずれかで、このような関係における「不応」の当分野認知の意味を用いて下すことができる。様々な実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の患者は、ウイルスの複製が、治療後に減少せず、または増加した場合、不応である。

【0263】

ある種の実施形態では、本発明の1種または複数の抗体は、RSV感染症(例えば、急性RSV



疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含めて)を治療するために、別の治療薬の代わりに、患者に投与することができる。一実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法を提供する。本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、または中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)の発症または再発を、このような感染症または中耳炎を発現する危険性のある患者において予防する方法も包含する。

10

#### 【0264】

ある種の実施形態では、本発明の1種または複数の修飾抗体の有効量が、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、1種または複数の支持的手段と併用して対象に投与される。支持的手段の非限定的例には、超音波ネブライザーによる空気の加湿、ラセミ体エピネフリンエアロゾル、経口デキサメタゾン、静脈内輸液、挿管、解熱剤(例えば、イブプロフェン、アセトメタフィン)、抗生物質および/または抗菌治療薬(即ち、細菌および/または菌類の二次感染症を予防または治療するため)などが挙げられる。

20

#### 【0265】

特定の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量を、単独で、あるいは、それだけに限らないが、アマンタジン、リマンタジン、オセルタミビル、ザナミビル、リバビリン、RSV-IVIG(即ち、免疫グロブリン静脈点滴)(RESPIGAM(商標))、EphA2/EphrinA1モジュレーター、および/または抗IL-9抗体(例えば、米国出願公開第2005/0002934号を参照されたい)、および/または国際公開第05/061513号に開示された抗ウイルス性多環化合物のいずれか1種と組み合わせて対象に投与することを含む方法を提供する。

30

#### 【0266】

特定の実施形態では、本発明は、一次ウイルス感染に対する1種または複数の二次反応を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量を、単独で、あるいは、他の治療薬(例えば、他の予防剤または治療剤)の有効量と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。一次ウイルス感染に対する二次反応の例には、それだけに限らないが、粘膜刺激に対する喘息様反応性、全呼吸抵抗の増加、ウイルス、細菌および菌類の二次感染症に対する感受性増加、ならびにそれだけに限らないが、細気管支炎、肺炎、クループ、熱性気管支炎などの状態の発現が挙げられる。

40

#### 【0267】

特定の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量を、EphA2/EphrinA1モジュレーター(その全体が参照により本明細書に組み込まれている、"Use of Modulators of EphA2 and EphrinA1 for the Treatment and Prevention of Infections"という名称の2004年10月27日出願した米国仮出願第60/622,489号)の有効量と組み合わせて対象に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、

50

あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量を、シブリツマブ(MedImmune, Inc.、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、国際公報の国際公開第02/069904号)の有効量と組み合わせて対象に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、1種または複数の抗体の有効量を、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国出願公開第2005/0002934号に開示されているような、1種または複数の抗IL-9抗体の有効量と組み合わせて対象に投与することを含む方法を提供する。更に別の実施形態では、本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法であって、本発明の1種または複数の抗体の有効量を、以下の2種以上: EphA2/EphrinA1モジュレーター、抗IL-9抗体および/またはシブリツマブの有効量と組み合わせて対象に投与することを含む方法を提供する。

10

20

**【0268】**

本発明は、従来の治療薬に対する有害反応に感受性の患者においてRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法も包含する。本発明は、更に、他の抗ウイルス治療薬が利用できない、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法も包含する。

30

**【0269】**

本発明は、本発明の修飾抗体以外の治療薬に不応と判明したが、もはやこのような治療薬の投与を受けていない患者において、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法を包含する。ある種の実施形態では、本発明の方法に従って治療されている患者は、抗生物質、抗ウイルス剤、抗菌剤または他の生物療法/免疫療法で既に治療されている患者である。このような患者には、不応性患者、あまりに年少なため従来の治療薬が使用できない患者、ならびに現行の治療薬による治療をしてもRSV URIおよび/またはLRI、あるいは中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、あるいはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)が再発する患者が含まれる。

40

**【0270】**

本発明は、従来の他の治療薬の代替として、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法を包含する。特定の実施形態では、本発明の方法に従って治療されている患者は、他の治療薬に不応であるか、またはこのような治療薬の有害反応に感受性である。

50

該患者は、免疫系が抑制されている人(例えば、術後患者、化学療法患者および免疫不全症患者)、腎機能または肝機能に障害のある患者、高齢者、子供、乳幼児、未熟児生まれの乳幼児、神経精神障害者または向精神薬服用者、発作経歴のある人、あるいは、RSV URIおよび/またはLRI、あるいは中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、あるいはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を予防、管理、治療および/または改善するために使用する従来薬剤との相互作用が、不良であった受療者の場合がある。

#### 【0271】

本明細書に示す投与量および投与頻度は、「有効量」、「治療上有効な」および「予防上有効な」という用語によって包含される。該用量および頻度は、投与する治療剤または予防剤、感染症の重度および種類、投与経路ならびに患者の年齢、体重、反応および過去の病歴に応じた各患者に特異的な要因により、通常更に変化するであろう。適当な投与計画は、このような要因を考慮し、例えば、文献中に報告され、医師卓上参考書(58版、2004年)で推奨されている用量に従うことによって、当業者により選択できる。本発明が提示する、治療剤または予防剤の例示的な投与量および投与頻度は、セクション5.3を参照されたい。

#### 【0272】

特定の実施形態では、ある動物に投与される本発明の抗体は、その動物の種と同じ種由来であり、または種反応性を示す。したがって、好ましい実施形態では、ヒト由来の、もしくはヒト化した抗体、またはヒトもしくはヒトをコードする核酸が、治療または予防のためにヒト患者に投与される。

#### 【0273】

好ましい実施形態では、生体内半減期が延長した本発明の修飾抗体は、受動免疫療法で(治療、予防のいずれかのために)使用することができる。延長した半減期のために、受動免疫治療または予防は、該抗体の用量および/または投与頻度を減らして実現でき、その結果、副作用の減少、患者コンプライアンスの改善、治療/予防薬費用の低下などが実現される。好ましい実施形態では、該治療/予防薬は、RSVに結合する抗体、例えば、上記セクション5.1(または本明細書の他所)に記載した抗RSV抗体の1種または複数であり、前記抗体は修飾抗体である。ある種の実施形態では、本発明の非修飾抗体は、単独で、または本発明の修飾抗体と組み合わせて受動免疫療法に使用できる。

#### 【0274】

### 5.3 抗体の投与法、頻度および用量設定

本発明は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための、本発明の1種または複数の抗体(修飾抗体を含む)を含んだ組成物を更に提供する。特定の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5および/またはA17h4抗体を含む。別の特定の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR

、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4の抗原結合性断片を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0275】

別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH部を含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Aに列挙したVH CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR1を含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Bに列挙したVH CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR2を含んだ1種または複数の抗体を含む。好ましい実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Cに列挙したVH CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR3を含んだ1種または複数の抗体を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0276】

別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2に列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL部を含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2または表3Dに列挙したVL CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR1を含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Eに列挙したVL CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR2を含んだ1種または複数の抗体を含む。好ましい実施形態では、RSV

感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Fに列挙したVL CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR3を含んだ1種または複数の抗体を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0277】

別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2に列挙したVH部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH部と、表2に列挙したVL部のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL部とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Aに列挙したVH CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR1と、表2および/または表3Dに列挙したVL CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR1とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Aに列挙したVH CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR1と、表2および/または表3Eに列挙したVL CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR2とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Aに列挙したVH CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR1と、表2および/または表3Fに列挙したVL CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR3とを含んだ1種または複数の抗体を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0278】

別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Bに列挙したVH CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR2と、表2および/または表3Dに列挙したVL CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR1とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息

10

20

30

40

50

、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Bに列挙したVH CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR2と、表2および/または表3Eに列挙したVL CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR2とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Bに列挙したVH CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR2と、表2および/または表3Fに列挙したVL CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR3とを含んだ1種または複数の抗体を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0279】

別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Cに列挙したVH CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR3と、表2および/または表3Dに列挙したVL CDR1のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR1とを含んだ1種または複数の抗体を含む。別の実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Cに列挙したVH CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR3と、表2および/または表3Eに列挙したVL CDR2のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR2とを含んだ1種または複数の抗体を含む。好ましい実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、表2および/または表3Cに列挙したVH CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVH CDR3と、表2および/または表3Fに列挙したVL CDR3のいずれか1つのアミノ酸配列を有する1個または複数のVL CDR3とを含んだ1種または複数の抗体を含む。好ましい実施形態では、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に使用するための組成物は、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)またはその抗原結合性断片を含む。更に別の実施形態では、本発明の組成物は、本発明の1種または複数の融合タンパク質を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0280】

下記でより詳細に考察するように、本発明の組成物は、単独で、または他の組成物と組み合わせ使用してもよい。該抗体は、N末端またはC末端で異種ポリペプチドに組換え融合してもよく、あるいはポリペプチドまたは他の組成物に化学的に複合(共有結合的複合および非共有結合的複合)してもよい。例えば、本発明の抗体は、異種ポリペプチド、薬

物、放射性核種、毒素などの、検出アッセイの標識およびエフェクター分子として有用な分子に組換え融合または複合してもよい。例えば、国際公報の国際公開第92/08495号、国際公開第91/14438号、国際公開第89/12624号、米国特許第5,314,995号および欧州特許第396,387号を参照されたい。

#### 【0281】

本発明の抗体は、例えば、生体外および生体内の診断法および治療法のいずれでも、RSV抗原を精製し、検出し、標的とするために使用してもよい。例えば、該修飾抗体は、唾液などの生体試料中でRSV量を定性的および定量的に測定するための免疫アッセイに、用途を有する。例えばHarlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)(その全体が参照により本明細書に組み込まれている)を参照されたい。

10

#### 【0282】

本発明は、抗体、または本発明の抗体を含む医薬組成物の有効量を対象に投与することによって、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法も提供する。好ましい態様では、抗体は実質的に精製されている(即ち、その効果を制限するか、または望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない)。治療薬を投与される該対象は、好ましくは、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)または霊長類(例えば、カイクイザルなどのサル、またはヒト)である。好ましい実施形態では、該対象はヒトである。別の好ましい実施形態では、該対象は、乳幼児または未熟児生まれの乳幼児である。別の実施形態では、該対象は、RSV URIおよび/またはLRI、RSV感染症に由来し、惹起され、もしくは付随する中耳炎、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症または後天性免疫不全症の人、骨髄移植を受けたことがある人、あるいは高齢者である。

20

#### 【0283】

多様な送達系が知られており、予防剤または治療剤(例えば、本発明の修飾抗体)を投与するために使用できるが、そのような系には、それだけに限らないが、リボソーム、微粒子、マイクロカプセル中への封入、抗体を発現できる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス(例えばWu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)を参照されたい)、レトロウイルスや他のベクターの一部としての核酸の構築が挙げられる。予防もしくは治療剤(例えば、本発明の抗体)、または医薬組成物を投与する方法には、それだけに限らないが、非経口投与(例えば、皮膚内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下)、硬膜外または粘膜(例えば、鼻腔内および他の経路)が挙げられる。特定の実施形態では、予防もしくは治療剤(例えば、本発明の抗体)、または医薬組成物は、鼻腔内、筋肉内、静脈内または皮下に投与される。該予防もしくは治療剤または組成物は、任意の都合よい経路により、例えば、注入またはボラス注入により、上皮または粘膜皮膚層(例えば、口内粘膜、鼻腔内粘膜、直腸および腸粘膜など)を介した吸収により投与してもよく、他の生物活性剤と共に投与してもよい。投与は全身的でも局所的でもよい。その上、例えば、吸入器またはネブライザーおよびエアロゾル化剤を含む処方の使用により、肺投与も採用できる。例えば、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号および第4,880,078号、ならびにPCT公報の国際公開第92/19244号、国際公開第97/32572号、国際公開第97/44013号、国際公開第98/31346号および国際公開第99/66903号を参照されたい。特定の実施形態では、本発明の抗体または本発明の組成物は、Alkermes AIR(商標)肺薬物送達技術(Alkermes, Inc., Cambridge, MA)を用いて投与される。

30

40

#### 【0284】

特定の実施形態では、予防もしくは治療剤または本発明の医薬組成物は、治療を要する区域に局所的に投与することが望ましい場合もある。これは、限定するわけではないが、

50



例えば、局所注入、局所投与(例えば、鼻腔内スプレー)、注射またはインプラントによって実現し得るが、前記インプラントは、シアラスティック(sialastic)膜などの膜や繊維を含めた多孔質、非多孔質またはゼラチン質材料からなる。本発明の抗体を投与する際、好ましくは、該抗体を吸収しない材料を使用するように注意しなければならない。

#### 【0285】

別の実施形態では、予防もしくは治療剤または本発明の組成物は、小胞中、特にリポソーム中で送達できる(Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327を参照されたい。全般的には同書を参照されたい)。

10

#### 【0286】

別の実施形態では、予防もしくは治療剤または本発明の組成物は、制御放出系または持続放出系で送達できる。一実施形態では、制御放出または持続放出を実現するために、ポンプを使用してもよい(Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。別の実施形態では、予防もしくは治療剤(例えば、本発明の抗体)または本発明の組成物の制御放出または持続放出を実現するために、ポリマー材料を使用できる(例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい。Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neural. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許第5,679,377号、米国特許第5,916,597号、米国特許第5,912,015号、米国特許第5,989,463号、米国特許第5,128,326号;PCT公報国際公開第99/15154号およびPCT公報国際公開第99/20253号も参照されたい)。持続放出製剤で使用されるポリマーの例には、それだけに限らないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-co-ビニルアセテート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリアンヒドリド、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)、ポリオルトエステルなどが挙げられる。好ましい実施形態では、持続放出製剤で使用される該ポリマーは、不活性で、溶出性不純物を含まず、貯蔵時安定で、無菌であり、生分解性である。別の実施形態では、制御または持続放出系は、治療標的、即ち鼻腔または肺の近傍に配置することにより、全身用量の一部だけで済ませることができる(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。

20

30

#### 【0287】

制御放出系は、Langer(1990, Science 249: 1527-1533)による総説で考察されている。当業者に公知の任意の技法が、本発明の1種または複数の抗体を含む持続放出製剤を作製するために使用できる。例えば、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第4,526,938号、PCT公報国際公開第91/05548号、PCT公報国際公開第96/20698号、Ning et al., 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854およびLam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたい。

40

50



## 【0288】

本発明の組成物が予防または治療剤(例えば、本発明の抗体)をコードする核酸である特定の実施形態では、該核酸を適当な核酸発現ベクターの一部として構築した後、例えば、レトロベクター(米国特許第4,980,286号を参照されたい)の使用、または直接注入、または微粒子衝撃(例えば、遺伝子銃としてDupont製Biolistic)の使用や脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤による被覆の使用により、該核酸が細胞内に入るように投与するか、あるいは核に入ることが知られている(例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照されたい)ホメオボックス様ペプチドに連結して投与することなどにより、コードされた予防または治療剤の発現を促進するために、該核酸を生体内に投与できる。あるいは、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによる発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

10

## 【0289】

特定の実施形態では、本発明の組成物は、本発明の1種、2種またはより多種の抗体を含む。別の実施形態では、本発明の組成物は、本発明の1種、2種またはより多種の抗体と、本発明の抗体以外の予防または治療剤とを含む。好ましくは、該薬剤は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、有用であることが知られており、あるいはこれまで使用されており、または現在使用されているものである。予防または治療剤の他に、本発明の組成物は担体も含んでもよい。

20

## 【0290】

本発明の組成物は、単位剤形の調製に使用できる医薬組成物(例えば、対象または患者への投与に適切な組成物)の製造に有用な、薬物のバルク組成物を包含する。好ましい実施形態では、本発明の組成物は医薬組成物である。このような組成物は、予防または治療有効量の1種もしくは複数の予防または治療剤(例えば、本発明の修飾抗体あるいは他の予防または治療剤)と、医薬として許容できる担体とを含む。好ましくは、該医薬組成物は、対象への投与の経路に適するように製剤される。

## 【0291】

特定の実施形態では、「担体」という用語は、治療薬と共に投与する、希釈剤、アジュバント(例えば、フロイントのアジュバント(完全および不完全))、賦形剤または媒体を指す。このような医薬担体は、無菌液、例えば水、およびピーナッツ油、大豆油、鉱油、ごま油などの石油、動物、植物または合成起源の油であってよい。該医薬組成物を静脈内に投与する場合、水は好ましい担体である。塩水溶液ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液も、特に注射液用の液担体として使用できる。適切な医薬賦形剤には、澱粉、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、白墨、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、該組成物は、少量の湿潤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤を含むこともできる。このような組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、持続放出製剤などの剤形を取ることができる。経口製剤は、医薬等級のマニトール、乳糖、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的担体を含むことができる。適切な医薬担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。このような組成物は、予防または治療有効量の該抗体を好ましくは純粋形態で、適当量の担体と共に含むことにより、患者への投与に適当な剤形をもたらすことになる。該製剤は投与方式に適合すべきである。

30

40

## 【0292】

好ましい実施形態では、該組成物は、人間への静脈内投与に適した医薬組成物として常套的手順に従って製剤される。静脈内投与用組成物は、通常、無菌、等張の緩衝水溶液で

50

ある。必要であれば、該組成物は、安定化剤と、注射部位の痛みを改善するために、リグノカムネ(lignocamne)とを含んでもよい。しかし、このような組成物は、静脈内投与以外の経路により投与してもよい。

【0293】

本発明の組成物の成分は、一般に、単位剤形中に、例えば、活性成分の量を示すアンプルやサッシェなどの気密容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、別々にまたは混合して供給される。該組成物を注入により投与しようとする場合、滅菌した医薬等級の水または塩水を含んだ注入瓶でそれを調合できる。該組成物を注射により投与する場合、注射滅菌水または塩水のアンプルを用意し、投与前に各成分を混合することができる。

【0294】

本発明は、本発明の抗体が、抗体の量を示すアンプルやサッシェなどの気密容器中に包装されることも提供する。一実施形態では、該抗体は、気密容器中の滅菌乾燥した凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給され、対象に投与するために、例えば水または塩水で適当な濃度に液戻しすることができる。好ましくは、該抗体は、気密容器中の滅菌乾燥した凍結乾燥粉末として、少なくとも0.5mg、少なくとも1mg、少なくとも2mgまたは少なくとも3mg、より好ましくは、少なくとも5mg、少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも30mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも60mgまたは少なくとも75mgの単位用量で供給される。該凍結乾燥抗体は、元の容器中2~8で保存でき、液戻し後、該抗体は、12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内、または1時間以内に投与できる。代替的实施形態では、修飾抗体は、該抗体の量および濃度を示す気密容器中、液状形態で供給される。好ましくは、該抗体の液状形態は、気密容器中少なくとも0.1mg/ml、少なくとも0.5mg/mlまたは少なくとも1mg/ml、より好ましくは、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも3mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/ml、少なくとも25mg/ml、少なくとも30mg/mlまたは少なくとも60mg/mlで供給される。

【0295】

本発明の組成物は、中和形または塩形として製剤することができる。医薬として許容できる塩には、塩酸、リン酸、酢酸、蔞酸、酒石酸などから誘導される塩などの、陰イオンで形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導される塩などの、陽イオンで形成されるものが挙げられる。

【0296】

RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に有効と思われる、予防もしくは治療剤(例えば、本発明の抗体)または本発明の組成物の量は、標準的な臨床技法によって決定できる。例えば、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に有効と思われる、予防もしくは治療剤または本発明の抗体を含む組成物の用量は、該組成物をコットンラットに投与し、該コットンラットに $10^5$ pfuのRSVを接種した後のRSV力価を測定し、該予防もしくは治療剤または該組成物を投与していないコットンラットで得られたRSV力価と、前記RSV力価を比較することによって決定できる。したがって、 $10^5$ pfuのRSVを接種したが、該予防もしくは治療剤または該組成物を投与していないコットンラットに比較して、 $10^5$ pfuのRSVを接種したコットンラットにおけるRSVの2口グ減少または99%低下を起こす用量が、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはR

10

20

30

40

50

AD)の予防、管理、治療および/または改善のために、ヒトに投与できる該組成物の用量である。

【0297】

RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善に有効と思われる組成物の用量は、該組成物を動物モデル(例えば、コットンラットまたはサル)に投与し、RSV抗原に免疫特異的に結合する修飾抗体の血清力価、肺濃度、あるいは鼻甲介および/または鼻汁の濃度を測定することによって決定できる。したがって、血清力価が約0.1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 約450  $\mu\text{g/ml}$ 、幾つかの実施形態では、少なくとも0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.4  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.6  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.8  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1.5  $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは、少なくとも2  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも5  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも10  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも15  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも20  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも25  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも30  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも35  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも40  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも50  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも75  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも100  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも125  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも150  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも200  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも250  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも300  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも350  $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも400  $\mu\text{g/ml}$ 、または少なくとも450  $\mu\text{g/ml}$ となる、抗体または組成物の用量を、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善のために、ヒトに投与できる。その上、生体外アッセイを場合により用いて、最適な用量範囲を確定する補助としてもよい。幾つかの実施形態では、該抗体は修飾抗体である(例えば、MEDI-524-YTE)。

10

20

【0298】

製剤中で使用すべき精確な用量は、投与経路ならびにRSV URIおよび/またはLRIあるいは中耳炎の重度にも依存することになるから、医師の判断および各患者の状況に従って決定すべきである。有効用量は、生体外または動物モデル(例えば、コットンラットもしくはカニクイザル)の試験系から導かれる用量反応曲線から外挿してもよい。

【0299】

本発明の抗体に関しては、患者に投与する用量は、患者体重基準で通常0.025mg/kg ~ 10mg/kgである。幾つかの実施形態では、患者に投与する用量は、患者体重基準で約3mg/kg ~ 60mg/kgである。患者に投与する用量は、好ましくは患者体重基準で0.025mg/kg ~ 20mg/kg、より好ましくは患者体重基準で1mg/kg ~ 15mg/kgである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫反応のために、人体中で他種由来の抗体より長い半減期を有する。したがって、より低い用量のヒト抗体で、投与頻度を減らすことが可能なことも多い。更に、本発明の抗体の投与量および投与頻度は、例えば脂質化などの修飾により、該抗体の取り込みおよび組織浸透(例えば、鼻腔および/または肺中への)を高めることによって、減少し得る。好ましい実施形態では、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)またはその抗原結合性断片(MEDI-524-YTEなどの修飾A4B4L1FR-S28R抗体を含む)の投与すべき用量は、患者体重基準で約60mg/kg、約50mg/kg、約40mg/kg、約30mg/kg、約15mg/kg、約10mg/kg、約5mg/kg、約3mg/kg、約2mg/kg、約1mg/kg、約0.80mg/kg、約0.50mg/kg、約0.40mg/kg、約0.20mg/kg、約0.10mg/kg、約0.05mg/kgまたは約0.025mg/kgである。

30

40

【0300】

特定の実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物は、RSV流行期の直前(例えば、3カ月以内、2カ月以内、1カ月以内)またはその間に月1回投与される。別の実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物は、RSV流行期の直前またはその間に2カ月毎に投与される。別の実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物は、RSV流行期の直前またはその間に3カ月毎に投与される。好ましい実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物は、RSV流行期の直前ま

50

たはその間に1回投与される。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、RSV流行期の間に2回、最も好ましくは1回投与される。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、RSV流行期の直前に投与され、場合により、RSV流行期の間に1回投与することができる。幾つかの実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物は、RSV流行期の直前またはその間に少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、最長1週間24時間毎に投与される。特定の実施形態では、本発明の抗体、または本発明の抗体を含む組成物の毎日の投与は、RSV感染を初めて認めた直後(即ち、患者が鼻づまりおよび/または他の上気道症状を示すとき)であるが、下気道疾患を予防するように、臨床的に有意な肺内疾患の発現前(即ち、下気道疾患の発症前)に行われる。別の実施形態では、本発明の修飾抗体、または本発明の修飾抗体を含む組成物は、患者がRSV流行期中にRSV URIの症状を呈している間、1日1回約3日間鼻腔内に投与される。あるいは、別の実施形態では、本発明の修飾抗体、または本発明の修飾抗体を含む組成物は、患者がRSV流行期中にRSV URIの症状を呈している間、2日に1回、少なくとも1週間鼻腔内に投与される。「RSV流行期」という用語は、RSV感染が最も起こり易い時期を指す。北半球でのRSV流行期は、通常、11月に始まり、4月まで続く。好ましくは、該抗体はA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVH部およびVL部、またはその抗原結合性断片を含む。好ましい実施形態では、前記抗体はA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)である。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

#### 【0301】

一実施形態では、本発明の抗体は、およそ60mg/kg以下、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、またはおよそ1.5mg/kg以下、RSV流行期中に5回、4回、3回、2回、好ましくは1回、対象、好ましくはヒトに投与される。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、RSV流行期中に約1~12回対象に投与され、該用量は、医師が決定した場合、必要であれば例えば、1週毎、2週毎、1月毎、2月毎、3月毎に投与してもよい。幾つかの実施形態では、RSV流行期中、低用量(例えば、5~15mg/kg)を高頻度(例えば、3~6回)に投与することができる。他の実施形態では、RSV流行期中、高用量(例えば、30~60mg/kg)を低頻度(例えば、1~3回)に投与することができる。しかし、当業者には明らかと思われるが、他の投与量および投与計画も容易に決定でき、本発明の範囲に入る。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、表2における1種もしくは複数のVH部もしくはVH鎖および/または1種もしくは複数のVL部もしくはVL鎖を含み、本明細書で特定したIgG定常部中の残基における修飾(セクション5.1.1を参照されたい)などの、前記した修飾定常部を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

30

#### 【0302】

一実施形態では、本発明の抗体は、およそ60mg/kg以下、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、RSV流行期中に5回患者に、対象に、好ましくはヒトの筋肉内または鼻腔内に投与される。別の実施形態では、本発明の抗体は、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、RSV流行期中に3回患者に、対象に、好ましくはヒトの筋肉内または鼻腔内に投与される。更に別の実施形態では、本発明の抗体は、およそ60mg/k

40

50

g、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、RSV流行期中に2回、最も好ましくは1回、対象に、好ましくはヒトの筋肉内または鼻腔内に投与される。別の実施形態では、本発明の修飾抗体は、およそ1mg/kg以下、およそ0.1mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg、RSV流行期中に1日1回少なくとも3日間、あるいは2日に1回少なくとも1週間、対象に、好ましくはヒトの鼻腔内に投与される。好ましくは、該修飾抗体はA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)(図13)のVH部およびVL部、またはその抗原結合性断片を含む。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

### 【0303】

特定の実施形態では、持続放出製剤中の本発明の抗体は、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、対象、好ましくはヒトに投与され、それにより、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する。別の特定の実施形態では、持続放出製剤ではない本発明の抗体のボーラスは、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、対象、好ましくはヒトに投与され、それにより、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善し、ある一定期間の後、持続放出製剤中の本発明の抗体が、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、RSV流行期中に対象に、好ましくはヒトの筋肉内または鼻腔内に2回、3回または4回(好ましくは1回)、前記対象(例えば、筋肉内または鼻腔内)に投与される。この実施形態によれば、ある一定期間は1~5日、1週、2週または1月の場合がある。別の実施形態では、持続放出製剤中の本発明の修飾抗体は、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、RSV流行期中に対象に、好ましくはヒトの筋肉内または鼻腔内に2回、3回または4回(好ましくは1回)投与され、それにより、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する。好ましくは、該抗体はA4B4L1FR-S28Rまたはその抗原結合性断片である。

20

30

40

50

ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0304】

別の実施形態では、本発明の1種または複数の抗体は、およそ60mg/kg、およそ45mg/kg以下、およそ30mg/kg以下、およそ15mg/kg以下、およそ10mg/kg以下、およそ5mg/kg以下、およそ3mg/kg以下、およそ2mg/kg以下、およそ1.5mg/kg以下、およそ1mg/kg以下、およそ0.80mg/kg以下、およそ0.50mg/kg以下、およそ0.40mg/kg以下、およそ0.20mg/kg以下、およそ0.10mg/kg以下、およそ0.05mg/kg以下、またはおよそ0.025mg/kg以下、対象の鼻腔内に投与され、それにより、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する。一実施形態では、本発明の抗体は対象の鼻腔内に投与され、それにより、URIを治療し、下気道感染症および/またはRSV疾患を予防する。好ましくは、該抗体はA4B4L1FR-S28Rまたはその抗原結合性断片である。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0305】

ある種の実施形態では、本発明の修飾抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量が患者に投与され、該用量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg、あるいは約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kgまたは約75mg/kgからなる群から選択される。特定の実施形態では、本発明の修飾抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量は、年1回またはRSV流行期の間に1回、あるいはRSV流行期前の3カ月以内、2カ月以内または1カ月以内に1回投与される。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0306】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量は、1年が経過するまで(あるいはRSV流行期が経過するまで)、2週(例えば、約14日)間隔で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26の回数患者に投与され、該用量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg、あるいは約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kgまたはそれらの組合せからなる群から選択される(即ち、1月毎の各用量は同じでも異なってもよい)。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0307】

別の実施形態では、本発明の抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量は、1年が経過するまで(あるいはRSV流行期が経過するまで)、約1月(例えば、約30日)間隔で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12の回数患者に投与され、該用量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg、あるいは約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg

g、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kgまたはそれらの組合せからなる群から選択される(即ち、1月毎の各用量は同じでも異なってもよい)。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0308】

一実施形態では、本発明の抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量は、1年が経過するまで(あるいはRSV流行期が経過するまで)、約2月(例えば、約60日)間隔で2、3、4、5または6の回数患者に投与され、該用量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg、あるいは約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kgまたはそれらの組合せからなる群から選択される(即ち、2カ月毎の各用量は同じでも異なってもよい)。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0309】

幾つかの実施形態では、本発明の抗体(好ましくは、MEDI-524抗体またはMEDI-524-YTEなどの修飾MEDI-524抗体)の単回用量は、1年が経過するまで(あるいはRSV流行期が経過するまで)、約3月(例えば、約120日)間隔で2、3または4の回数患者に投与され、該用量は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg、あるいは約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kgまたはそれらの組合せからなる群から選択される(即ち、3カ月毎の各用量は同じでも異なってもよい)。ある種の実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載の修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

#### 【0310】

ある種の実施形態では、本発明の抗体の用量を患者に投与する経路は、鼻腔内、筋肉内、静脈内またはそれらの組合せであるが、本明細書に記載の他の経路も許容できる。各用量は、同一の投与経路によって投与してもよいし、投与しなくてもよい。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、多数の投与経路を介して、同時に、または本発明の同じもしくは異なる抗体の他の用量後に、投与してもよい。

#### 【0311】

ある種の実施形態では、本発明の抗体は、対象(例えば、乳幼児、未熟児生まれの乳幼児、免疫障害対象、医療従事者または高齢対象)に予防的に投与される。本発明の抗体は、RSV感染症が個体間で伝染するのを予防するため、または伝染する該感染症を弱めるように、予防的に対象に投与できる。幾つかの実施形態では、該対象は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の別の個体に既に曝されたか(無症状の場合も、そうでない場合もある)、または曝される恐れがある。例えば、前記対象には、それだけに限らないが、別のRSV感染児童または他のRSV感染者と同じ学校またはデイケアにいる児童、他のRSV感染者と同じナーシングホームにいる高齢者、あるいはRSV感染児童または他のRSV感染者と同じ家庭にいる個人、RSV感染患者の院内医療担当者などが挙げられる。対象に予防的に投与される該抗体は、好ましくは鼻腔内に投与されるが、本明細書に記載の他の投与経路も許容できる。ある種の好ましい実施形態では、本発明の抗体はMEDI-524またはMEDI-524-YTEである。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、約0.025mg/kg、約0.05mg/kg、約0.10mg/kg、約0.20mg/kg、約0.40mg/kg、約0.50mg/kg、約0.80mg/kg

、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約30mg/kg、約40mg/kgまたは約50mg/kgの用量で投与される(例えば、鼻腔内に)。より低い用量で、より低い頻度の投与、例えば、2～4時間、4～6時間、6～8時間、8～10時間、10～12時間、12～14時間、14～16時間、16～18時間、18～20時間、20～22時間、22～24時間毎に1回(好ましくは、1日1回もしくは2回)、約3日間、約5日間または約7日間の、あるいはRSV感染者に潜在的または現実的に曝された後、別に必要な場合の鼻腔内投与(または他の経路)が好ましい。本明細書に記載の本発明の任意の抗体を使用してもよく、ある種の実施形態では、該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。ある種の実施形態では、該抗体は、液体製剤組成物として、好ましくは鼻腔内に投与される。

10

#### 【0312】

##### 5.3.1 本発明の抗体を含む液体製剤

本発明は、界面活性剤、無機塩および/または他の賦形剤の不在下で、安定性と、少量ないし検出限界以下の抗体断片化および/または凝集とを示し、製造、調製、輸送および貯蔵の間に抗体または抗体断片の生物活性をほとんどないし全く失わない、本発明の抗体の液体製剤を提供する。本発明の液体製剤は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)の予防、管理、治療および/または改善のための本発明の抗体の投与を促進する。特に、本発明の液体製剤によって、凍結乾燥剤形に必要とされるような投与前に該抗体を正確、無菌的に液戻しすることの必要なく、医療従事者は、本発明の抗体の滅菌用量を素早く投与することができる。このような液体製剤は、凍結乾燥、凍結-乾燥などの長時間の乾燥段階が液体製剤では不要なので、凍結乾燥製剤より容易に、コスト効率良く製造できる。好ましい実施形態では、該液体製剤は、製剤される抗体が精製・製剤工程を通して水相中にある方法により作製される。好ましくは、該液体製剤は、乾燥段階、限定するわけではないが、例えば、凍結乾燥、凍結-乾燥、噴霧乾燥または風乾の段階を含んでいない方法により作製される。本発明の方法において使用できる液体製剤は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、同時所有、同時係属の米国出願第10/461,863号に記載されている。

20

30

#### 【0313】

本明細書に記載のRSV抗原に免疫特異的に結合する、本発明の抗体の全液体製剤は、「本発明の液体製剤」、「本発明の抗体液体製剤」、「本発明の抗体の液体製剤」、「抗RSV抗体の液体製剤」および類似の用語で総称される。

#### 【0314】

本発明は、界面活性剤および/または無機塩を実質的に含まない抗体液体製剤を提供する。本発明は、界面活性剤および他の賦形剤を実質的に含まない抗体液体製剤も提供する。本発明は、界面活性剤、無機塩および他の賦形剤を実質的に含まない抗体液体製剤も提供する。更に、本発明は、水または適当な溶媒および本発明の抗体は別にして、他の成分を含まない抗体液体製剤も提供する。

40

#### 【0315】

一実施形態では、本発明の液体製剤は、水性担体中に本発明の抗体約15mg/mlとヒスチジンとを含み、界面活性剤および無機塩を実質的に含まない。この実施形態によれば、該液体製剤は、グリシンおよび/または他の賦形剤を更に含む得る。別の実施形態では、本発明の液体製剤は、水性担体中に本発明の抗体約15mg/mlとヒスチジンとを含み、界面活性剤、無機塩および他の賦形剤を実質的に含まない。

#### 【0316】

一実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれる本発明の抗体の濃度は、約15mg/ml、約20mg/ml、約25mg/ml、約30mg/ml、約35mg/ml、約40mg/ml、約45mg/ml、約50mg/ml、約55mg/ml、約60mg/ml、約65mg/ml、約70mg/ml、約75mg/ml、約80mg/ml、約85mg/ml、約90mg

50



/ml、約95mg/ml、約100mg/ml、約105mg/ml、約110mg/ml、約115mg/ml、約120mg/ml、約125mg/ml、約130mg/ml、約135mg/ml、約140mg/ml、約150mg/ml、約200mg/ml、約250mg/mlまたは約300mg/mlである。別の実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれる本発明の抗体の濃度は、約15mg/ml～約300mg/ml、約40mg/ml～約300mg/ml、約50mg/ml～約300mg/ml、約75mg/ml～約300mg/ml、または約100mg/ml～約300mg/mlである。

【0317】

本発明の液体製剤は、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、使用することができる。一実施形態では、本発明の液体製剤は、表2または表3に列挙された抗体、またはRSV抗原に免疫特異的に結合するその誘導体、類縁体もしくは断片を含む。好ましい実施形態では、本発明の液体製剤はA4B4-L1S28R(MEDI-524)を含む。別の好ましい実施形態では、本発明の液体製剤は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部、または本明細書に記載したそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含んだ本発明の抗体を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

【0318】

本発明の液体製剤は、RSV感染症を検出、診断またはモニターするための診断目的にも使用できる。したがって、本発明は、検出可能な物質または標識に複合または融合したRSV抗原に免疫特異的に結合する、抗体またはその断片を含み、RSV感染症を検出、診断またはモニターするために使用できる液体製剤を包含する。

【0319】

一実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるヒスチジンの濃度は、約1mM～約100mM、約10mM～約50mM、約20mM～約30mMまたは約23mM～約27mMの範囲にある。別の実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるヒスチジンの濃度は、1mM以上、10mM以上、15mM以上、20mM以上、25mM以上、30mM以上、35mM以上、40mM以上、45mM以上、50mM以上、55mM以上、60mM以上、65mM以上、70mM以上、75mM以上、80mM以上、85mM以上、90mM以上、95mM以上、または100mM以上である。好ましい実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるヒスチジンの濃度は約25mMである。ヒスチジンは、L-ヒスチジン、D-ヒスチジンまたはその混合物の形態を取り得るが、L-ヒスチジンが最も好ましい。ヒスチジンは水和物の形態も取り得る。ヒスチジンは、塩酸塩(例えば、一塩酸塩および二塩酸塩)、臭化水素酸塩、硫酸塩、酢酸塩などの医薬として許容できる塩の形態で使用してもよい。ヒスチジンの純度は、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも99.5%とすべきである。

【0320】

該製剤のpHは、製剤中に使用する特定の抗体の等電点と等しくしてはならず、約5.0～約7、好ましくは約5.5～約6.5、より好ましくは約5.8～約6.2の範囲、最も好ましくは約6.0になり得る。

【0321】

ヒスチジンおよび本発明の抗体の他に、本発明の液体製剤はグリシンを更にも含む。一実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるグリシンの濃度は約0.1mMから約100mMである。別の実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるグリシンの濃度は、100mM未満、50mM未満、3.0mM未満、2.0mM未満、または1.8mM未満である。好ましい実施形態では、本発明の液体製剤中に含まれるグリシンの濃度は1.6mMである。該製剤中のグリシン量は、等電点での抗体沈殿を回避できるように、有意な緩衝作用を起こすべきではない。グリシンも、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、酢酸塩などの医薬として許容できる塩の形態で使用してもよい。グリシンの純度は、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも99.5%とすべきである。特定の実施形態では、グリシンは本発明の液体製剤中に含まれる。

【0322】

10

20

30

40

50

場合により、本発明の液体製剤は、糖類(例えば、蔗糖、マンノース、トレハロースなど)、ポリオール(例えば、マンニトール、ソルビトールなど)などの他の賦形剤を更にも含んでもよい。一実施形態では、他の該賦形剤は糖類である。特定の実施形態では、該糖類は蔗糖であり、その濃度は約1%~約20%、好ましくは約5%~約15%、より好ましくは約8%~10%の範囲である。別の実施形態では、他の該賦形剤はポリオールである。しかし、好ましくは、本発明の液体製剤はマンニトールを含まない。特定の実施形態では、該ポリオールはポリソルベート(例えば、Tween 20)であり、その濃度は約0.001%~約1%、好ましくは約0.01%~約0.1%の範囲である。

#### 【0323】

本発明の液体製剤は、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)により評価した場合、38 ~ 42 の温度範囲で少なくとも60日で、幾つかの実施形態では120日以下、20 ~ 24 で少なくとも1年、2 ~ 8 で(特に4 で)少なくとも3年、少なくとも4年、または少なくとも5年、-20 で少なくとも3年、少なくとも4年、または少なくとも5年、安定性を示す。即ち、本発明の液体製剤は、上記のように定めた期間保存した後、本明細書に規定したような凝集および/または断片化の少量ないし検出限界以下を示す。好ましくは、該抗体または抗体断片の5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、最も好ましくは0.5%以下が、HPSECで測定した場合、上記のように定めた期間保存した後、凝集体を形成する。その上、本発明の液体製剤は、それだけに限らないが、抗体または抗体断片がRSV抗原に免疫特異的に結合する能力を測定するための酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)および放射免疫アッセイを含めた各種免疫アッセイ、ならびに抗体の補体活性化能を測定するためのC3 a/C4aアッセイによって評価した場合、前記条件下での延長した貯蔵中に、該抗体または抗体断片の生物活性の低下をほとんど示さない。特定の実施形態では、該液体製剤は、例えばELISAなどの抗体結合アッセイで測定した場合、基準抗体と比較して、該製剤の抗体または抗体断片の生物活性の低下をほとんどないし全く示さない。本発明の液体製剤は、前記期間の貯蔵後、貯蔵前の該製剤の初期生物活性を80%超、85%超、90%超、95%超、98%超、99%超、または99.5%超保持している。

#### 【0324】

本発明の液体製剤は、単位剤形として調製できる。例えば、バイアル1個の単位用量は、本発明の抗体の様々な濃度が約15mg/ml ~ 約300mg/mlの範囲にある0.1ml、0.25ml、0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15mlまたは20mlを含み得る。必要であれば、このような製剤は、各バイアルに滅菌希釈剤を添加することにより所望の濃度に調整できる。

#### 【0325】

本発明は、本発明の単一抗体を含む安定な液体製剤を包含するが、但し、前記抗体はパリピズマブではない。本発明は、本発明の2種以上の抗体を含む安定な液体製剤も包含する。一実施形態では、本発明の安定な液体製剤は、本発明の2種以上の抗体を含み、該抗体の1種はパリピズマブまたはその断片である。代替的实施形態では、本発明の安定な液体製剤は、本発明の2種以上の抗体を含むが、但し、該抗体はパリピズマブまたはその断片を包含しない。

#### 【0326】

本発明は、例えば医療従事者が使用するための本発明の抗体の液体製剤を含むキットも提供する。本発明は、本発明の液体製剤を投与することにより、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善する方法も提供する。本発明の液体製剤は、急性RSV疾患、RSV URIまたはRSV LRIなどのRSV感染症を検出、診断またはモニターするためにも使用できる。

#### 【0327】

ある種の実施形態では、本発明の液体製剤と、RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)の予防、管理、治療および/または改善に有用な、1種また

は複数の他の治療薬(例えば、1種または複数の他の予防剤または治療剤)は、約3週末満のサイクルで、2週毎に約1回、10日毎に約1回、または毎週約1回投与される。1サイクルには、各サイクル約90分、各サイクル約1時間、各サイクル約45分に及ぶ注入による、治療薬(例えば、治療剤または予防剤)の投与を含むことができる。各サイクルには、少なくとも1週の安静、少なくとも2週の安静、少なくとも3週の安静を含むことができる。投与するサイクル数は、約1~約12サイクル、より典型的には約2~約10サイクル、より典型的には約2~約8サイクルである。ある種の実施形態では、本発明の液体製剤は、数時間(例えば、約1~6時間毎、6~12時間毎、12~18時間毎、または18~24時間毎)から数日(例えば、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、または7日毎)のサイクルに入る。ある種の実施形態では、本発明の液体製剤は鼻腔内に送達される。幾つかの実施形態では、該抗体は本発明の非修飾抗体である。他の実施形態では、該抗体は、修飾IgG(例えば、IgG1)定常部またはそのFcRn結合性断片(例えば、Fc部またはヒンジ-Fc部)を含み、好ましくは、該修飾IgG定常部はYTE修飾(例えば、MEDI-524-YTE)を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0328】

##### 5.3.2 本発明の液体製剤を調製する方法

本発明は、抗体、特に表2または表3に列挙した抗体(または本明細書記載の本発明の他の抗体)、あるいはRSV抗原に免疫特異的に結合するその誘導体、類縁体または断片の液体製剤を調製する方法も提供する。図34は、精製された抗RSV抗体を調製する概要を示す概略図である。本発明の液体製剤を調製する方法は、適当な分子量(MW)カットオフ(例えば、完全な抗体分子およびF(ab')<sub>2</sub>断片に対しては30kDで、Fab断片などの抗体断片に対しては10kD)を有する半透膜を用いて、精製した抗体または断片を含む分画を約15mg/ml、約20mg/ml、約30mg/ml、約40mg/ml、約50mg/ml、約60mg/ml、約70mg/ml、約80mg/ml、約90mg/ml、約100mg/ml、約110mg/ml、約125mg/ml、約150mg/ml、約200mg/ml、約250mg/mlまたは約300mg/mlの抗体または断片の最終濃度へ濃縮し、同じ膜を用いて製剤緩衝液中に該濃縮抗体分画のダイアフィルトレーションを行うことを含む。RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体またはその断片を含有する培養上清のCUNO濾過を行い、濾過した抗体のHS50陽イオン交換クロマトグラフィーを行う。次いで、HS50陽イオン交換クロマトグラフィーから得た分画のrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーを行った後、低pHで処理する。低pH処理の後、抗体分画のsuper Q650陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、次いでナノ濾過を行う。ナノ濾過後に得られた抗体の分画は、次いでダイアフィルトレーションで処理することにより、該抗体分画を同じ膜を用いて製剤緩衝液中に濃縮する。

#### 【0329】

本発明の製剤緩衝液は、約1mM~約100mM、約10mM~約50mM、約20mM~約30mMまたは約23mM~約27mMの範囲の濃度でヒスチジンを含む。好ましくは、本発明の製剤緩衝液は約25mMの濃度でヒスチジンを含む。該製剤は、100mM未満、50mM未満、3.0mM未満、2.0mM未満、または1.8mM未満の濃度でグリシンを更に含む。好ましくは、該製剤は1.6mMの濃度でグリシンを含む。該製剤中のグリシン量は、等電点での抗体沈殿を回避するために、有意な緩衝作用を起こすべきではない。該製剤のpHは、約5.0~約7.0、好ましくは約5.5~約6.5、より好ましくは約5.8~約6.2の範囲、最も好ましくは約6.0になり得る。特定の抗体に対して適当なpHを得るために、ヒスチジン(および、添加する場合のグリシン)を先ず水に溶解して所望のpHより高いpHの緩衝液を得た後、HClの添加により該pHを所望のレベルに下げる。このようにして、無機塩の形成(例えば、ヒスチジン塩酸塩をヒスチジンとして、例えば使用し、pHをNaOHの添加により上げた場合のNaClの形成)を回避できる。

#### 【0330】

本発明の液体製剤は、1回分の液体製剤の一定分量を含んだバイアルを調製することにより、単位剤形として調製できる。例えば、バイアル1個の単位用量は、本発明の抗体の様々な濃度が約15mg/ml~約300mg/mlの範囲にある0.1ml、0.25ml、0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15mlまたは20mlを含み得る。必要であれば、このような製剤は、各バイアルに滅菌希釈剤を添加することにより、所望の濃度に調整できる。

## 【0331】

本発明の液体製剤は、滅菌濾過、放射線などを含めた様々な滅菌法により滅菌してもよい。最も好ましい実施形態では、ダイアフィルトレーション後の抗体製剤は、0.2または0.22ミクロンの予備滅菌フィルターで濾過滅菌される。本発明の滅菌済み液体製剤は、RSV感染症、その1種または複数の症状、あるいはRSV感染症に付随し、それにより増強され、それを増強する呼吸状態を予防、治療、管理または改善するために、対象に投与し得る。

## 【0332】

好ましくは、本発明の液体製剤は、調製中いつも抗体を水溶液中に維持することにより調製される。換言すれば、該液体製剤は、例えば、凍結乾燥、真空乾燥などにより抗体または製剤自体を乾燥する段階を全く伴わずに、調製される。

10

## 【0333】

本発明は非凍結乾燥液体製剤を対象とするが、本発明の製剤は、所望であれば凍結乾燥し得ることに、同等の目的のために留意すべきである。したがって、本発明は、このような凍結乾燥製剤は必要ではなく、そのため好ましくないが、本発明の製剤の凍結乾燥形態を包含する。

## 【0334】

5.3.3 抗体製剤の安定性および凝集をモニターする方法

タンパク質(例えば、抗体またはその断片)の物理的・化学的構造ならびにその生物活性に基づいて、本発明の液体製剤の安定性を評価する各種方法が利用できる。例えば、タンパク質の変性を調べるために、電荷移動吸収、熱分析、蛍光分光、円二色性、NMR、HPSECなどの方法が利用できる。例えばWang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(Suppl):S4-S26を参照されたい。

20

## 【0335】

rCGEおよびHPSECは、タンパク質凝集体の形成、タンパク質分解およびタンパク質断片化を評価するための最も一般的で最も簡単な方法である。したがって、本発明の液体製剤の安定性は、これらの方法により評価してもよい。

## 【0336】

例えば、ピークの面積率(%)が非分解抗体または非分解抗体断片を表わす場合、本発明の液体製剤の安定性は、HPSECまたはrCGEにより評価してもよい。詳細には、RSV抗原に免疫特異的に結合する該抗体または抗体断片をおよそ250  $\mu$ g (10mg/mlの前記抗体または抗体断片を含む液体製剤およそ25  $\mu$ l)、TSK SWx1ガードカラム(6.0mm CX 4.0cm)を取り付けたTosoH Biosep TSK G3000SW<sub>XL</sub>カラム(7.8mm x 30cm)上に注入する。該抗体または抗体断片は、0.1M 硫酸ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含有する0.1M リン酸二ナトリウムを用い、0.8~1.0ml/分の流速で定組成で溶出する。溶出したタンパク質は、280nmでのUV吸光度を用いて検出する。パリビズマブ基準標準品を対照としてアッセイにおいて流下し、その結果は、およそ12~14分に認められる内包体積ピークを除外した他の全ピークと比較した、生成物単量体ピークの面積率(%)として報告する。単量体ピークより早く溶出するピークを凝集体率(%)として報告する。

30

## 【0337】

本発明の液体製剤は、HPSECまたはrCGEで測定した場合、少量ないし検出限界以下の凝集、即ち、タンパク質重量に対して凝集体が5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、最も好ましくは0.5%以下を示し、また、少量ないし検出限界以下の断片化、即ち、未変化の抗体またはその断片を表わすピーク中に、全ピーク面積の80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、もしくは99%以上、または99.5%以上を示す。SDS-PAGEの場合は、染色したか、または放射性同位体で標識した各バンドの濃度または放射活性を測定することができ、非分解抗体またはその断片を表わすバンドの%濃度または%放射活性を得ることができる。

40

## 【0338】

本発明の液体製剤の安定性は、該製剤中にある抗体またはその断片の生物活性を評価する、任意のアッセイによっても評価できる。抗体の生物活性には、それだけに限らないが

50

、抗原結合活性、補体活性化活性、Fc受容体結合活性などが挙げられる。該抗体の抗原結合活性は、それだけに限らないが、ELISA、放射免疫アッセイ、ウェスタンブロットなどを含めた、当業者に公知の任意の方法により測定できる。補体活性化活性は、RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体が、補体成分の存在下、RSV抗原を発現する細胞と反応する系において、C3a/C4aアッセイにより測定できる。Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)(その全体が参照により本明細書に組み込まれている)も参照されたい。ELISA基準アッセイは、例えば、抗体またはその断片がRSV抗原に免疫特異的に結合する能力をパリビズマブ基準標準品と比較するために、使用し得る。このアッセイでは、プレートにRSV抗原で被覆し、パリビズマブ基準標準品の設定濃度の結合シグナルを、試験用抗体または抗体断片の同濃度の結合シグナルと比較する。

10

#### 【0339】

本発明の抗体液体製剤の純度は、例えばHPSECなどの当業者に周知の任意の方法により、測定し得る。抗体液体製剤の無菌度は以下のように評価し得る。即ち、公称孔径0.45  $\mu$ mの無菌フィルターで抗体液体製剤を濾過することにより、試験用抗体液体製剤を無菌の大豆カゼイン消化培地および液体チオグリコレート培地に接種する。Sterisure(商標)法またはSteritest(商標)法を用いる場合、各フィルター器具を無菌の大豆カゼイン消化培地または液体チオグリコレート培地およそ100mlで無菌的に満たす。従来法を用いる場合、試験濾過したフィルターを大豆カゼイン消化培地または液体チオグリコレート培地100mlに無菌的に移す。該培地を適当な温度でインキュベートし、14日間に亘って3度観察し、細菌または菌類の増殖の証拠を調べる。

20

#### 【0340】

### 5.4 遺伝子治療

特定の実施形態では、本発明の抗体またはその機能性誘導体をコードする配列を含む核酸は、遺伝子治療によってRSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、および/またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(例えば、喘息、喘鳴および/またはRAD)を予防、管理、治療および/または改善するために、投与される。遺伝子治療とは、発現しているか、または発現し得る核酸の対象への投与により行う治療を指す。本発明の一実施形態では、該核酸はコードされた抗体を産生し、該抗体は予防効果または治療効果を発揮する。

30

#### 【0341】

当分野で利用できる遺伝子治療のための方法は、いずれも本発明に従って使用できる。例示的な方法を以下に説明する。

#### 【0342】

遺伝子治療の方法に関する一般的総説については、Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932;およびMorgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215を参照されたい。当分野で一般的に知られており、使用できる組換えDNA技術の方法は、Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993);およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。

40

#### 【0343】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、本発明の抗体をコードする核酸を含み、前記核酸は、適切な宿主中で該抗体あるいはそのキメラタンパク質または重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、抗体コード領域と作動的に連結したプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、前記プロモーターは、誘導型または構成型であり、場合により、組織特異的である。別の特定の実施形態では、抗体コード配列および他の任意の所望配列が、ゲノム中の所望部位で相同組換えを促進す

50

る領域と隣接している核酸が使用され、そのため該抗体コード核酸が染色体内で発現する (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。幾つかの実施形態では、発現する該抗体分子は一本鎖抗体であり、あるいは、該核酸配列は、該抗体の重鎖、軽鎖の両方またはそれらの断片をコードする配列を含む。

#### 【0344】

該核酸の対象中への送達は、該核酸または核酸担持ベクターに対象を直接曝す直接的送達、先ず細胞を該核酸で生体外で形質転換し、次いで対象中に移植する間接的送達のいずれでもよい。このような2つの手法は、各々、生体内または生体外(ex vivo)遺伝子治療の名で知られている。

10

#### 【0345】

特定の実施形態では、該核酸配列は生体内に直接投与され、該配列が発現することにより、コードされた産物を産生する。これは、当分野で公知の多種の方法のいずれでも、例えば、該配列を適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、該ベクターを投与することにより、該配列を細胞内に導入することによって、例えば、欠陥もしくは弱毒レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いた感染によって(米国特許第4,980,286号を参照されたい)、または裸出DNAの直接注入によって、または微粒子衝撃の使用(例えば、遺伝子銃のBiolistic, Dupont)や、脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤による被覆、リボソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル中の封入によって、または核内に入ることが知られているペプチドに連結した該配列の投与によって、受容体介在エンドサイトーシスを受けるリガンドに連結した該配列の投与によって(例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい)(受容体の特異的に発現する細胞型を標的とするために、使用できる)などで実現できる。別の実施形態では、リガンドが融合ウイルスペプチドを含むことにより、エンドソームを破壊し、核酸のリソソーム分解を回避できる、核酸-リガンド複合体を形成できる。更に別の実施形態では、特定の受容体を標的とすることによって、生体内での該核酸の細胞特異的取り込みおよび発現のための標的とすることができる(例えば、PCT公報の国際公開第92/06180号、国際公開第92/22635号、国際公開第92/20316号、国際公開第93/14188号、国際公開第93/20221号を参照されたい)。あるいは、該核酸を細胞内に導入し、相同組換えによる発現のために、宿主細胞DNA内に組み込むことができる(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935;およびZijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

20

30

#### 【0346】

特定の実施形態では、本発明の抗体をコードする核酸配列を含んだウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが使用できる(Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照されたい)。このようなレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージングおよび宿主細胞DNA中への組み込みに必要な成分を含有している。遺伝子治療で使用するつもりの抗体をコードする該核酸配列は、1種または複数のベクター中にクローニングすることができ、それにより、その遺伝子の対象中への送達が促進される。レトロウイルスベクターに関するより詳細な説明は、Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302に見出すことができ、そこでは、造血幹細胞へmdr 1遺伝子を送達することにより、該幹細胞の化学療法に対する耐性を高めるためのレトロウイルスベクターの使用が記載されている。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示する他の参考文献は、Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141;およびGrossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114である。

40

#### 【0347】

アデノウイルスは、遺伝子治療で使用する他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸上皮に遺伝子を送達するための特に魅力的な媒体である。アデノウイルスは、呼吸上皮に自然に感染し、軽度の疾患を起こす。アデノウイルス依拠送達系の他の標的

50

は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスには、非分裂細胞に感染できるという利点がある。Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503は、アデノウイルス依拠遺伝子治療を総説している。Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子に移入するためのアデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子治療におけるアデノウイルスベクターの他の使用例は、Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT公報国際公開第94/12649号;およびWang et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783に見出すことができる。好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。

【0348】

10

アデノ随伴ウイルス(AAV)も、遺伝子治療における使用に対して提案されてきた(Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300;および米国特許第5,436,146号)。

【0349】

遺伝子治療に対する別の手法では、電気穿孔、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ウイルス感染などの方法によって、組織培養における細胞に遺伝子に移入される。該移入法は、細胞への選択マーカースの移入を普通包含する。次いで、該細胞は、移入遺伝子を取り込んで、発現している細胞を分離するために、選別される。次いで、そのような細胞が対象に送達される。

【0350】

20

この実施形態では、核酸を細胞内に導入後、生成した組換え細胞を生体内に投与する。このような導入は、それだけには限らないが、トランスフェクション、電気穿孔、微量注入、該核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージのベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子移入、微小核体媒介遺伝子移入、スフェロプラスト融合などを含めた、当分野で公知の任意の方法によって実施できる。外来遺伝子を細胞内に導入するための多種の技法(例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985))を参照されたい)が知られており、受入れ細胞の発生上、生理上必要な機能が損なわれない限り、本発明に従って使用してもよい。該技法は、核酸が細胞により発現可能となり、好ましくは、遺伝可能で子孫細胞により発現可能となるように、核酸を細胞に安定に移入すべきである。

30

【0351】

生成する組換え細胞は、当分野で公知の各種方法によって対象に送達することができる。組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞または前駆細胞)は、好ましくは静脈内に投与される。使用に想定される細胞量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者により決定できる。

【0352】

遺伝子治療のために核酸を導入できる細胞は、所望の利用可能な任意の細胞型を包含しており、それだけには限らないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞;Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球;例えば、骨髓、臍帯血、末梢血、胎児肝などから得られる各種幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞が挙げられる。

40

【0353】

好ましい実施形態では、遺伝子治療に使用される細胞は、対象にとって自家性である。

【0354】

組換え細胞を遺伝子治療に使用する一実施形態では、本発明の抗体をコードする核酸配列は、細胞または子孫細胞により発現可能となるように細胞内に導入され、次いで、該組換え細胞が治療効果のために生体に投与される。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞が使用される。分離し、生体外で維持できる任意の幹細胞および/または前駆細胞が、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用できる(例えば、PCT公報国際公開第94/08598号

50

; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; および Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照されたい)。

#### 【0355】

特定の実施形態では、遺伝子治療のために導入すべき核酸は、転写の適当な誘導因子の有無を制御することによって該核酸の発現が調節できるように、コード領域に作動的に連結した誘導型プロモーターを含む。

#### 【0356】

### 5.5 抗体の診断用途

RSV抗原に免疫特異的に結合する、本発明の標識抗体(修飾または非修飾)ならびにその誘導体および類縁体は、RSV URIおよび/またはLRI、あるいは中耳炎(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRIなどのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)を検出、診断またはモニターするための診断目的に使用できる。本発明は、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を検出する方法であって、(a)RSV抗原に免疫特異的に結合する本発明の1種または複数の抗体を用いて、対象の細胞中または組織試料中にあるRSV抗原の発現をアッセイすること、および(b)該RSV抗原の量を対照の量、例えばRSVに感染していない健常組織試料中の量と比較することを含み、RSV抗原の対照量と比較したRSV抗原のアッセイ量の増加が、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を示す方法を提供する。

#### 【0357】

本発明は、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を診断するための診断アッセイであって、(a)RSV抗原に免疫特異的に結合する本発明の1種または複数の抗体を用いて、個体の細胞中または組織試料中にあるRSV抗原の発現をアッセイすること、および(b)該RSV抗原の量を対照の量、例えばRSVに感染していない健常組織試料中の量と比較することを含み、RSV抗原の対照量と比較したRSV抗原のアッセイ量の増加が、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)を示す診断アッセイを提供する。RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)の診断がより決定的であると、医療従事者は、より早期に予防措置または積極的治療を施し、それにより、該RSV疾患または中耳炎の発現または一層の進行を防止できると思われる。

#### 【0358】

本発明の抗体は、本明細書に記載または当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生体試料中のRSV抗原量をアッセイするために使用できる(例えば、Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; および Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096を参照されたい)。タンパク質遺伝子発現の検出に有用な他の抗体準拠法は、酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)などの免疫アッセイを包含する。適切な抗体アッセイ標識は、当分野で公知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識、ヨウ素( $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、硫黄( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、インジウム( $^{121}\text{I}$ )



、テクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )などの放射標識、ルミノールなどの発光標識、およびフルオレッsein、ローダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを包含する。

【0359】

本発明の一態様は、ヒトにおけるRSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)の検出および診断である。一実施形態では、診断は、a)RSV抗原に免疫特異的に結合する標識抗体の有効量を対象に投与する(例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に)こと、b)対象中のRSV抗原が発現する部位(例えば、鼻腔、肺、口腔および耳)に標識抗体が選択的に濃縮できるように(および非標識分子がバックグランドレベルまで一掃されるように)、投与後のある期間待機すること、c)バックグランドレベルを決定すること、ならびにd)対象中の標識抗体を検出し、その結果、標識抗体の検出量がバックグランドレベルを超えていれば、該対象は、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)に罹っていることを示すことからなる。バックグランドレベルは、標識分子の検出量を特定の系についてあらかじめ決定した標準値と比較することを含めた、各種方法により決定できる。

10

20

【0360】

対象の寸法および使用する結像装置が、診断画像の形成に必要な結像部分の量を決定することは、当分野では理解されよう。ヒト対象に対する放射性同位体部分の場合、注入する放射活性量は、 $^{99}\text{Tc}$ で通常約5~20ミリキュリーの範囲となろう。次いで、標識抗体は、特定のタンパク質を含有する細胞の部位に選択的に蓄積するであろう。生体内腫瘍画像形成は、S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))に記載されている。

【0361】

使用する標識の種類および投与方式を含めた数種の変量に応じて、対象中の部位に標識抗体を選択的に濃縮させ、非複合化標識抗体をバックグランドレベルまで消失させる、投与後の該期間は、6~48時間、または6~24時間、または6~12時間である。別の実施形態では、投与後の該期間は、5~20日または5~10日である。

30

【0362】

一実施形態では、RSV URIおよび/またはLRIのモニターは、RSV URIおよび/またはLRIの診断法を繰り返すことによって、例えば、初診から1カ月後、初診から6カ月後、初診から1年後などに実施される。

【0363】

標識分子の存在は、当分野で公知の方法、例えば生体内スキャンを用いて対象中に検出できる。このような方法は、使用する標識の種類に依存する。当業者であれば、特定の標識を検出する適当な方法を決定できよう。本発明の診断法に使用し得る方法および装置には、それだけに限らないが、コンピュータ断層撮影(CT)、ポジトロン放出断層撮影(PET)などの全身スキャン、磁気共鳴映像(MRI)、超音波診断などが挙げられる。

40

【0364】

特定の実施形態では、該分子は、放射性同位体で標識され、放射線反応性外科装置を用いて患者内で検出される(Thurston他、米国特許第5,441,050号)。別の実施形態では、該分子は、蛍光化合物で標識され、蛍光応答性スキャン装置を用いて患者内で検出される。別の実施形態では、該分子は、ポジトロン放出性金属で標識され、ポジトロン放出断層撮影を用いて患者内で検出される。更に別の実施形態では、該分子は、常磁性標識で標識され、磁気共鳴映像(MRI)を用いて患者内で検出される。

50

## 【0365】

## 5.6 修飾抗体の生物活性および半減期延長アッセイ

本発明の抗体の特性は多種の方法で決定し得る。特に、本発明の抗体は、RSV抗原に対する免疫特異的結合能についてアッセイし得る。このようなアッセイは、溶液中で(例えばHoughten, 1992, Bio/Techniques 13:412-421)、ビーズ上で(Lam, 1991, Nature 354:82-84)、チップ上で(Fodor, 1993, Nature 364:555-556)、細菌上で(米国特許第5,223,409号)、胞子上で(米国特許第5,571,698号; 第5,403,484号; および第5,223,409号)、プラスミド上で(Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869)、またはファージ上で(Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382; およびFelic i, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310)行ってもよい(これらの参考文献は、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれている)。RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合すると確定した抗体には、次いでRSV抗原に対するその特異性およびアフィニティをアッセイすることができる。

10

## 【0366】

本発明の修飾抗体には、当分野で公知の任意の方法によって、RSV抗原に対する免疫特異的結合能および他の抗原との交差反応性のアッセイを行い得る。免疫特異的結合および交差反応性を分析するために使用できる免疫アッセイには、それだけに限らないが、ほんの幾つか名を出せば、ウェスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイが挙げられる。このようなアッセイは、常套的であり、当分野において周知である(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれているAusubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい)。例示的免疫アッセイを以下に簡単に説明する(しかし、限定する意図はない)。

20

## 【0367】

免疫沈降法の手順は、一般に、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼ阻害剤(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム)を補ったRIPA緩衝液(1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、pH7.2の0.01M リン酸ナトリウム、1% Trasylol)などの溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解し、細胞溶解液に対象とする抗体を添加し、40℃である時間(例えば、1~4時間)インキュベートし、プロテインAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解液に添加し、40℃で約1時間以上インキュベートし、該ビーズを溶解緩衝液中で洗浄し、該ビーズをSDS/試料緩衝液中に再懸濁することからなる。該対象抗体が特定の抗原を免疫沈降できるか否かは、例えばウェスタンブロット分析で評価できる。当業者であれば、抗体の抗原との結合性を高め、バックグラウンドを下げるために変更できるパラメーターに関して熟知されよう(例えば、セファロースビーズによる細胞溶解液の予備清浄化)。免疫沈降法手順に関する更なる考察のためには、例えばAusubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York中の10.16.1を参照されたい。

30

40

## 【0368】

ウェスタンブロット分析は、一般に、タンパク質試料の調製、該タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル(例えば、抗原の分子量に応じて8%~20%SDS-PAGE)中での電気泳動、該タンパク質試料のポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDF、ナイロンなどの膜への転写、ブロッキング溶液(例えば、3%BSA入りPBSまたは無脂肪ミルク)中での該膜のインキュベーション、洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween 20)中での該膜の洗浄、ブロッキング緩衝液中で希釈した一次抗体(対象抗体)との該膜のインキュベーション、洗浄緩衝液中での該膜の洗浄、ブロッキング緩衝液中で希釈した、酵素基質(例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)または放射性分子(例えば、 $^{32}\text{P}$ または $^{125}\text{I}$ )

50

1)との複合化二次抗体(一次抗体を認識するもの、例えば抗ヒト抗体)と共に該膜をインキュベートすること、洗浄緩衝液中での該膜の洗浄、および抗原の存在の検出からなる。当業者であれば、検出されるシグナルを増加させ、バックグラウンドノイズを低下させるために変更できるパラメーターに関して熟知されたいよう。ウェスタンブロット手順に関する更なる考察のためには、例えばAusubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York中の10.8.1を参照されたい。

#### 【0369】

ELISAは、抗原を調製し、96穴マイクロタイタープレートの穴を該抗原で被覆し、酵素基質(例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)などの検出可能な化合物に複合した対象抗体を該穴に添加した後、ある時間インキュベートし、抗原の存在を検出することからなる。ELISAでは、対象抗体は、検出可能な化合物に複合する必要はなく、代わりに、検出可能な化合物に複合した二次抗体(対象抗体を認識する)を該穴に添加してもよい。更に、抗原で穴を被覆する代わりに、抗体を穴に被覆してもよい。この場合、対象抗原の添加後、検出可能な化合物に複合した二次抗体を被覆穴に添加してもよい。当業者であれば、検出されるシグナルを増加させるために変更できるパラメーター、ならびに当分野で公知のELISAに関する他の変化に関して熟知されたいよう。ELISAに関する更なる考察のためには、例えばAusubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York中の11.2.1を参照されたい。

#### 【0370】

抗体の抗原に対する結合アフィニティーおよび抗体-抗原相互作用の解離速度(off-rate)は、競争的結合アッセイによって決定できる。競争的結合アッセイの一例は、増量させていく非標識抗原の存在下での標識抗原(例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ )の対象抗体とのインキュベーション、および標識抗原に結合した該抗体の検出を含む放射免疫アッセイである。本発明の抗体のRSV抗原に対するアフィニティーおよび解離速度は、スキャッチャードプロット分析によりそのデータから決定できる。二次抗体との競争も放射免疫アッセイを用いて決定できる。この場合、RSV抗原は、増量させていく非標識二次抗体の存在下、標識化合物(例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ )に複合した本発明の抗体とインキュベートする。

#### 【0371】

好ましい実施形態では、BIAcore速度分析は、RSV抗原に対する抗体の結合速度および解離速度を決定するために使用される。BIAcore速度分析は、表面上に抗体を固定化したチップからRSV抗原の結合および解離を分析することを含む。

#### 【0372】

本発明の抗体は、当業者に公知の技法を用いて、RSVの宿主細胞受容体との結合に対するその阻害能についてもアッセイすることができる。例えば、RSVに対する受容体を発現する細胞を、抗体の存在下または不在下でRSVと接触させることができ、該抗体のRSV結合阻害能を、例えばフローサイトメトリーまたはシンチレーションアッセイにより測定できる。RSV(例えば、F糖タンパク質やG糖タンパク質などのRSV抗原)または該抗体は、RSVと宿主細胞受容体との相互作用の検出を可能とするために、放射性標識(例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ および $^{125}\text{I}$ )や蛍光標識(例えば、フルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレスカミン)などの検出可能な化合物で標識することができる。あるいは、RSVの受容体との結合に対する抗体の阻害能は、無細胞アッセイにおいて決定できる。例えば、RSV、またはG糖タンパク質などのRSV抗原は、抗体と接触させることができ、RSVまたはRSV抗原の宿主細胞受容体との結合に対する該抗体の阻害能を決定できる。好ましくは、該抗体を固相支持体上に固定化し、RSVまたはRSV抗原を検出可能な化合物で標識する。あるいは、RSVまたはRSV抗原を固相支持体上に固定化し、該抗体を検出可能な化合物で標識する。RSVまたはRSV抗原は、部分的もしくは完全に精製してもよく(例えば、他のポリペプチドを部分的もしくは完全に含まない)、または細胞溶解液の一部であってもよい。更に、RSV

抗原は、RSV抗原と、グルタチオニンSトランスフェラーゼなどのドメインとを含む融合タンパク質であってもよい。あるいは、RSV抗原は、当業者に周知の技法(例えば、Pierce Chemicals; Rockford, ILのビオチニル化キット)を用いてビオチニル化できる。

#### 【0373】

本発明の抗体について、当業者に公知の技法を用いて、RSV複製を阻害または下方調節する能力もアッセイできる。例えば、Johnson et al., 1997, Journal of Infectious Diseases 176:1215-1224に記載のようなブランクアッセイによりアッセイできる。本発明の修飾抗体について、RSVポリペプチドの発現を阻害または下方調節する能力もアッセイできる。それだけに限らないが、ウェスタンブロット分析、ノーザンブロット分析およびRT-PCRを含めた当業者に公知の技法が、RSVポリペプチドの発現を測定するために、使用できる。更に、本発明の抗体について、合胞体形成の防止能もアッセイできる。

10

#### 【0374】

本発明の抗体はヒトにおいて使用する前に、その所望の治療または予防活性を生体外、次いで生体内で試験するのが好ましい。例えば、本発明の特定の抗体または組成物の投与が指示されるか否かを判定するために使用できる生体外アッセイは、生体外細胞培養アッセイを包含し、その場合、対象の組織試料を培養で成長させ、それに本発明の抗体または組成物を曝し、またはそうでない場合は投与し、本発明のそのような抗体または組成物の該組織試料に対する効果を観察する。様々な特定の実施形態では、RSV感染症に關与する細胞型(例えば、呼吸上皮細胞)の代表的細胞を用いて生体外アッセイを実施し、それにより、本発明の抗体または組成物がそのような細胞型に所望の効果を及ぼすか否かを判定できる。好ましくは、本発明の抗体または組成物は、ヒトに投与する前に、生体外アッセイおよび動物モデル系においても試験される。特定の実施形態では、コットンラットに本発明の抗体または組成物を投与し、RSV $10^5$ pfuを接種し、4日以上後に該ラットを犠牲にし、RSV力価および抗RSV抗体の血清力価を決定する。更に、この実施形態によれば、犠牲ラットから得た組織(例えば、肺組織)の組織変化を検査することができる。

20

#### 【0375】

本発明によれば、本発明の修飾抗体の予防効力および/または治療効力を実証するために、ヒト対象を用いた臨床試験を行う必要はない。該抗体を用いた生体外および動物モデル試験は、ヒトに外挿することができ、前記抗体の予防的および/または治療的有用性を実証するために十分である。

30

#### 【0376】

治療に使用するための本発明の抗体または組成物の毒性は、それだけに限らないが、ラット、マウス、ウシ、サルおよびウサギを含む適当な動物モデル系において、試験することができる。抗体または組成物の毒性の生体内試験に対しては、当分野で公知の任意の動物モデル系を使用してもよい。

#### 【0377】

RSV感染症(例えば、急性RSV疾患、あるいはRSV URIおよび/またはLRI)を予防、管理、治療および/または改善する際の効力は、本発明の抗体または組成物が、該ウイルスの複製を阻害する能力、伝染を阻害するか、または該ウイルスの宿主中での定着を予防する能力、RSV URIおよび/またはLRIの発症率を低下させる能力、上気道RSV感染症の下気道RSV感染症への進行を予防し、または低下させる能力、あるいはRSV URIおよび/またはLRIに付随する1種または複数の症状を予防、改善または緩和する能力を決定することによって、明示し得る。中耳炎を治療、予防またはそうならない場合に管理する際の効力は、本発明の抗体または組成物が、中耳炎の発症率を低下させる能力、中耳炎の持続期間を低下させる能力、RSV URIおよび/またはLRIの中耳炎への進行を予防し、または低下させる能力、あるいは中耳炎の1種または複数の症状を改善する能力を決定することによって、明示し得る。本発明の抗体または組成物を投与した後、例えば、ウイルス保有量の減少、RSV URIおよび/またはLRIあるいは中耳炎の1種または複数の症状、あるいはそれに関連する呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)の改善、RSV URIおよび/またはLRIあるいは中耳炎の持続期間の減少、下気道RSV感染症の減少、あ

40

50

るいは死亡率および/または罹患率の減少が見られれば、治療薬は、治療有効とみなされる。更に、1種または複数のRSV抗原に免疫特異的に結合する1種または複数の抗体を投与した後、免疫反応に増加が見られれば、その治療は治療有効とみなされる。

【0378】

本発明の抗体または組成物について、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15などのサイトカインの発現を誘導するその能力を生体内および生体外で試験することができる。当業者に公知の技法が、サイトカインの発現量を測定するために使用できる。例えば、サイトカインの発現量は、例えばRT-PCRおよびノーザンブロット分析によるサイトカインのRNA量の分析、ならびに例えば免疫沈降法と、その後のウェスタンブロット分析およびELISAによるサイトカイン量の分析によって測定できる。好ましい実施形態では、本発明の抗体または組成物について、IFN- $\gamma$ の発現を誘導するその能力が試験される。

【0379】

本発明の抗体または組成物について、免疫細胞、好ましくはヒト免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞およびナチュラルキラー細胞)の生物活性を調節するその能力を生体内および生体外で試験することができる。本発明の抗体または組成物が免疫細胞の生物活性を調節する能力は、抗原の発現量の検出、免疫細胞の増殖量の検出、シグナル伝達分子の活性化量の検出、免疫細胞のエフェクター機能の検出、または免疫細胞の分化量の検出によって評価できる。当業者に公知の技法が、このような活性の測定のために使用できる。例えば、細胞増殖量は、 $^3\text{H}$ チミジン取り込みアッセイおよびトリパンブルー細胞計数によって評価できる。抗原発現は、それだけには限らないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ、FACS分析などの技法を用いる競争的および非競争的アッセイ系を含めた、例えば免疫アッセイによって、アッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えばキナーゼアッセイおよび電気泳動移動アッセイ(EMSA)によってアッセイできる。

【0380】

本発明の抗体または組成物について、生体外(in vitro)、生体外(ex vivo)および生体内のアッセイで、そのウイルス複製の阻害能またはウイルス保有量の減少能を試験することもできる。本発明の抗体または組成物について、RSV感染症(例えば、RSV URIおよび/またはLRI)、中耳炎(好ましくは、下気道および/または上気道感染症などのRSV感染症に由来し、惹起され、または付随する)、またはそれらに関連する症状もしくは呼吸状態(それだけに限らないが、喘息、喘鳴、RADまたはそれらの組合せを含む)の時間経過を短縮するその能力を試験することもできる。本発明の抗体または組成物について、RSV感染症(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRI)に罹っているヒトの生存期間を少なくとも25%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%延長するその能力を試験することもできる。更に、本発明の抗体または組成物について、RSV感染症(好ましくは、RSV URIおよび/またはLRI)に罹っているヒトの入院期間を少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%短縮するその能力を試験することもできる。本発明の抗体または組成物の機能を生体内で分析するために、当業者に公知の技法を使用できる。

【0381】

IgGおよびIgG定常部またはそのFcRn断片のFcRnに対する結合能は、様々な生体外アッセイによって特徴付けることができる。WardによるPCT公報の国際公開第97/34631号は、様々な方法を詳細に開示しており、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0382】

例えば、本発明の修飾抗体またはその断片のFcRn結合能を非修飾または野生型IgGの該結合能と比較するためには、該修飾IgGまたはその断片と、該非修飾または野生型IgGとを放射標識し、FcRn発現細胞と生体外で反応させることができる。次いで、細胞結合分画の

放射活性を計数し、比較することができる。このアッセイに使用すべきFcRn発現細胞は、好ましくは、B10.DBA/2マウスの肺に由来するマウス肺毛細血管内皮細胞(B10、D2.PCE)およびC3H/HeJマウスに由来するSV40形質転換内皮細胞(SVEC)(Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, 1994)を含めた内皮細胞系である。しかし、10~14日齢の授乳期マウスから分離され、十分な個数のFcRnを発現する腸刷子縁などの他の細胞型も、使用できる。あるいは、選択した種の組換えFcRnを発現する哺乳動物細胞も、使用できる。修飾IgGの結合分画の放射活性、あるいは非修飾型または野生型の放射活性を計数した後、該結合分子を洗浄剤で抽出し、細胞の単位個数当たりの放出率(%)を計算し、比較することができる。

#### 【0383】

修飾IgGのFcRnに対するアフィニティーは、前記したように例えばBIAcore 2000(BIAcore Inc.)を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)測定により、測定できる(いずれもその全体が参照により本明細書に組み込まれている、Popov et al., Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Karlsson et al., J. Immunol. Methods, 145:229-240, 1991)。この方法では、FcRn分子をBIAcoreセンサーチップ(例えば、Pharmacia製CM5チップ)に結合し、固定化FcRnに対する修飾IgGの結合をある一定の流速で測定することにより、BIA評価2.1ソフトウェアを用いてセンサーグラムを得て、それに基づいて該修飾IgG、定常部またはその断片のFcRnに対する結合速度および解離速度を計算できる。

#### 【0384】

修飾IgGまたはその断片、および非修飾または野生型IgGのFcRnに対する相対的アフィニティーは、単純な競争結合アッセイによっても測定できる。非標識の修飾IgGあるいは非修飾または野生型IgGを、FcRnを固定化した96穴プレートの穴に様々な量で添加する。次いで、放射標識した非修飾または野生型IgGの一定量を各穴に添加する。非標識の修飾IgGあるいは非修飾または野生型IgGの量に対して、結合分画の放射活性率(%)をプロットし、修飾ヒンジ-Fcの相対的アフィニティーを曲線の傾斜から計算できる。

#### 【0385】

更にまた、修飾IgGまたはその断片、および野生型IgGのFcRnに対するアフィニティーは、飽和試験およびスキャッチャード分析によっても測定できる。

#### 【0386】

修飾IgGまたはその断片のFcRnによる細胞の通過は、放射標識したIgGまたはその断片およびFcRn発現細胞を用い、細胞単層の一方の面の放射活性を他方の面の放射活性と比較する生体外移動アッセイによって、測定できる。あるいは、このような移動は、10~14日齢の授乳期マウスに放射標識した修飾IgGを飼料から投与し、腸から循環系(または他の任意の標的組織、例えば肺)へのIgGの移動を示す血液試料中の放射活性を、周期的に計数することによって、生体内で測定できる。腸を介したIgG移動の用量依存的阻害を試験するために、ある一定比の放射標識IgGおよび非標識IgGの混合物をマウスに投与し、血漿の放射活性を周期的に測定することができる(Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994)。

#### 【0387】

修飾IgGまたはその断片の半減期は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Kim等(Eur. J. of Immuno. 24: 542, 1994)による記載の方法に従った薬物動態試験によって、測定することができる。この方法によれば、放射標識した修飾IgGまたはその断片をマウスの静脈内に注射し、その血漿濃度を時間の関数として、例えば注射後3分~72時間に周期的に測定する。こうして得られるクリアランス曲線は、二相、即ち 相および 相からなるはずである。修飾IgGまたはその断片の生体内半減期を決定するために、相におけるクリアランス速度を計算し、非修飾または野生型IgGの速度と比較する。

#### 【0388】

### 5.7 抗体の作製方法

抗原に免疫特異的に結合する本発明の抗体は、抗体の合成のための当分野における任意の方法、特に化学合成、または好ましくは組換え発現技法によって作製することができる。本発明の実行には、別途指示しない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子分析、組換え

10

20

30

40

50

DNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチドの合成および修飾、核酸ハイブリッド形成、および当分野の技術に入る関連分野における従来技法が使用される。このような技法は、本明細書に引用した参考文献中に記載され、それらの文献中に十分に説明されている。例えば、Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987および年次最新版); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987および年次最新版) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren et al. (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

10

#### 【0389】

抗原に免疫特異的に結合するポリクローナル抗体は、当分野で周知の各種手順により作製できる。それだけに限らないが、ウサギ、マウス、ラットなどを含めた様々な宿主動物に、例えば、ヒト抗原を投与することによって、そのヒト抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘発することができる。多様なアジュバントを用いて、宿主の種に応じた免疫応答を高めてもよく、そのようなものには、それだけに限らないが、フロイントのアジュバント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳濁液、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、およびBCG(*bacille Calmette-Guerin*)、コリネバクテリウム・パルヴムなどの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられる。このようなアジュバントも当分野で周知である。

20

#### 【0390】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換えおよびファージディスプレイの各技術、またはその組合せの使用を含めた、当分野で公知の非常に多様な技法を用いて調製できる。例えば、モノクローナル抗体は、当分野で知られており、例えば、Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)(前記参考文献は、その全体が参照により組み込まれている)に教示されている技法を含めたハイブリドーマ技法を用いて作製できる。本明細書で使用する場合の「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を通して作製される抗体に限らない。「モノクローナル抗体」という用語は、真核性、原核性またはファージ性の任意のクローンを含めた、単一クローンに由来する抗体を指し、それを作製する方法を指すものではない。

30

#### 【0391】

ハイブリドーマ技術を用いて特異抗体を作製し、スクリーニングする方法は、当分野で常套的であり、周知のものである。手短に言えば、マウスをRSV抗原で免疫することができ、免疫反応が一旦検出されると、例えば、RSV抗原(好ましくは、RSV F抗原)に特異的な抗体がマウス血清中に検出されると、マウス脾臓を採取し、脾臓細胞を分離する。次いで、周知の技法によって、該脾臓細胞を適当な任意の骨髓腫細胞、例えばATCCから入手できる細胞系SP20の細胞と融合する。ハイブリドーマを選択し、制限希釈によりクローニングする。その上、RIMMS(反復免疫多重部位)技法を用いて動物を免疫することができる(その全体が参照により組み込まれている、Kilpatrick et al., 1997 *Hybridoma* 16:381-9)。次いで、当分野で公知の方法により、該ハイブリドーマクローンをアッセイし、本発明のポリペプチドに結合できる抗体を分泌する細胞を求める。一般に高濃度の抗体を含む腹水は、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫することにより生成できる。

40

#### 【0392】

したがって、本発明は、本発明の修飾抗体を分泌するハイブリドーマ細胞の培養による抗体の生成方法であって、好ましくは、該ハイブリドーマが、RSV抗原で免疫したマウス

50

から分離した脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合した後、融合で生じるハイブリドーマをスクリーニングして、RSV抗原(好ましくは、RSV F抗原)に結合できる抗体を分泌するハイブリドーマクローンを求めることによって生成する、抗体の生成方法を提供する。

#### 【0393】

特定のRSV抗原(好ましくは、RSV F抗原)を認識する抗体断片は、当業者に公知の任意の方法により生成し得る。例えば、本発明のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、パパイン(Fab断片の作製)やペプシン(F(ab')<sub>2</sub>断片の作製)などの酵素を用いた、免疫グロブリン分子のタンパク分解的切断により作製し得る。F(ab')<sub>2</sub>断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1部を含む。更に、本発明の抗体は、当分野で公知の各種ファージディスプレイ法を用いても生成できる。

#### 【0394】

例えば、抗体は、各種ファージディスプレイ法を用いても生成できる。ファージディスプレイ法では、抗体機能部が、その機能部をコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。詳細に言えば、VH部およびVL部をコードするDNA配列が、動物のcDNAライブラリー(例えば、ヒトまたはマウスの罹患組織のcDNAライブラリー)から増幅される。VH部およびVL部をコードする該DNA配列は、PCRによってscFvリンカーと共に組換えられ、ファージミドベクター中にクローニングされる。該ベクターは、大腸菌(E.coli)内に電気穿孔され、大腸菌はヘルパーファージの感染を受ける。このような方法に使用するファージは、通常、fdおよびM13を含めた糸状ファージであり、VH部およびVL部は、普通、該ファージの遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIに組換え融合される。特定の抗原に結合する抗原結合部を発現するファージは、抗原、例えば、標識抗原、または固相表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて、選択または特定することができる。本発明の抗体を作製するために使用できるファージディスプレイ法の例には、Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT出願PCT/GB第91/01134号、国際公報の国際公開第90/02809号、国際公開第91/10737号、国際公開第92/01047号、国際公開第92/18619号、国際公開第93/11236号、国際公開第95/15982号、国際公開第95/20401号および国際公開第97/13844号;ならびに米国特許第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号および第5,969,108号に開示された方法が挙げられ、その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0395】

上記参考文献に記載のように、ファージ選択後、ファージからの抗体コード領域を分離し、使用することにより、ヒト抗体または他の所望する任意の抗原結合性断片を含み、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含めた所望する任意の宿主中に発現される、完全な抗体を生成することができる。Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>断片を組換えで作製する技法も、PCT公報国際公開第92/22324号; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34;およびBetter et al., 1988, Science 240:1041-1043(前記各参考文献は、その全体が参照により組み込まれている)に開示される方法などの当分野で公知の方法を用いて採用することができる。

#### 【0396】

完全な抗体を生成するために、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限酵素部位、および制限酵素部位を保護するための隣接配列を含んだPCRプライマーを使用することにより、scFvクローン中の該VHまたはVL配列を増幅することができる。当業者に公知のクローニング技法を利用して、VH定常領域、例えばヒト 4定常領域を発現するベクター中に該PCR増幅VH部をクローニングすることができ、VL定常領域、例えばヒト 定常領域を発現するベクター中に該PCR増幅VL部をクローニングすることができる。好ましくは、VH部またはVL部を発現するベクターは、EF-1 プロモーター、分泌シグナル、該可変部用クロー

10

20

30

40

50



ニング部位、定常部、およびネオマイシンなどの選択マーカーを含む。該VH部およびVL部は、必要な定常領域を発現する1つのベクター中にクローニングしてもよい。次いで、当業者に公知の技法を用いて、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターを細胞系中に同時移入することにより、完全長抗体、例えばIgGを発現する、安定または過渡的な細胞系を生成する。

#### 【0397】

抗体のヒト生体内使用および生体外検出アッセイを含む幾つかの用途に対しては、ヒト抗体またはキメラ抗体の使用が好ましい場合がある。完全ヒト抗体は、ヒト対象の治療的処置に特に好ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いて、前記のファージディスプレイ法を含めた当分野で公知の多様な方法により作製

10

#### 【0398】

ヒト抗体は、機能的な内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて、作製することもできる。例えば、ヒトの重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体をランダムに、または相同的組換えにより、マウス胚性幹細胞中に導入してもよい。あるいは、ヒトの該重鎖および軽鎖遺伝子以外に、ヒトの可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞中に導入してもよい。マウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同的組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別に、またはそれと同時に非機能性にしてもよい。特に、J<sub>H</sub>領域のホモ接合型欠失により、内因性抗体の産生が防止される。該修飾胚性幹細胞は、増殖させ、胚盤胞に顕微注入することにより、キメラマウスを作製する。次いで、該キメラマウスを繁殖させて、ヒト抗体を発現するホモ接合体の子を産生する。該トランスジェニックマウスは、選択した抗原、例えば、本発明のポリペプチドの全体または一部で普通どおりに免疫される。該抗原に対するモノクローナル抗体は、免疫済みの該トランスジェニックマウスから従来のハイブリドーマ技術を用いて得られる。トランスジェニックマウス中に潜むヒト免疫グロブリン移入遺伝子は、B細胞分化中に再編成された後、クラス転換および体細胞変異を受ける。したがって、このような技法を用いて治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を作製することが可能である。ヒト抗体を作製するためのこの技術の概要については、Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのこの技術、ならびにこのような抗体を作製するための手順に関する詳細な考察については、例えば、その全体が各々参照により本明細書に組み込まれている、PCT公報の国際公開第98/24893号、国際公開第96/34096号および国際公開第96/33735号、ならびに米国特許第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号および第5,939,598号を参照されたい。その上、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)およびGenpharm (San Jose, CA)は、上記に類似の技術を用いて、選択抗原に対するヒト抗体を提供する事業を行うことができる。

20

30

#### 【0399】

キメラ抗体は、その抗体の異なる部分が異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を作製する方法は、当分野において公知である。例えば、その全体が各々参照により本明細書に組み込まれている、Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202;ならびに米国特許第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号および第6,331,415号を参照されたい。

40

#### 【0400】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域と、非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRとを含む、抗体もしくはその変異体、またはその断片である。ヒト化抗体は

50

、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリン(即ち、ドナー抗体)のCDR領域に対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のフレームワーク領域である、少なくとも1つ、通常は2つの可変部(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab<sub>2</sub>、Fv)の実質的にすべてを含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、通常はヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分も含む。普通は、該抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変部とを共に含有するであろう。該抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4各領域を含んでもよい。該ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含めた免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含めた任意のイソタイプから選択することができる。該定常部は、ヒト化抗体が細胞傷害活性を示すことが望ましい場合、普通は補体結合性定常部であり、そのクラスは通常IgG1である。このような細胞傷害活性が望ましくない場合、該定常部はIgG2クラスである。本発明のある種の実施形態で使用するVLおよびVHの定常部の例には、それだけに限らないが、Johnson et al. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215-1224に記載のC およびC 1(nG1m)、ならびに米国特許第5,824,307号に記載のものが挙げられる。該ヒト化抗体は、複数のクラスまたはイソタイプ由来の配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常部を選択することは、当分野における通常の技術に入る。ヒト化抗体のフレームワーク領域およびCDR領域は、親配列に精確に一致する必要はなく、例えば、ドナーCDRまたはコンセンサスフレームワークは、少なくとも1個の残基の置換、挿入または欠失で変異する結果、その部位でのCDRまたはフレームワークの残基がコンセンサスまたは移入抗体に一致しなくてもよい。しかし、このような変異は広範ではなからう。普通はヒト化抗体残基の少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%超は、FRおよびCDRの親配列の残基に一致するであろう。ヒト化抗体は、それだけに限らないが、CDRグラフト化(欧州特許第239,400号;国際公報国際公開第91/09967号;ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号)、化粧張り法(veneering)または再舗装法(resurfacing)(欧州特許第592,106号および第519,596号、Molecular Immunology 28(415):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; およびRoguska et al., 1994, PNAS 91:969-973)、連鎖シャッフルリング(米国特許第5,565,332号)、ならびに例えば、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開第9317105号、Tan et al., J. Immunol. 169:1119-1125 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods 20(3):267-279 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene 150(2):409-10 (1994) およびPedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994)に開示されている技法を含めた、当分野で公知の多様な技法を用いて作製できる。その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許出願公報第2005/0042664号も参照されたい。フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換されることがしばしばあり、その結果、抗原結合性を変化させ、好ましくは改善するであろう。このようなフレームワーク置換は、当分野で周知の方法、例えばCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデル化により特定され、その結果、抗原結合性および配列比較に重要なフレームワーク残基が特定され、それにより特定位置にある異常なフレームワーク残基が特定される(例えば、その全体が各々参照により本明細書に組み込まれている、Queen他(米国特許第5,585,089号、およびReichmann et al., 1988, Nature 332:323を参照されたい)。

#### 【0401】

単一部抗体、例えば、軽鎖を欠いた抗体は、当分野で周知の方法により作製できる。その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている、Reichmann et al., 1999, J. Immunol. 231:25-38; Nuttall et al., 2000, Curr. Pharm. Biotechnol. 1(3):253-263; Muylderman, 2001, J. Biotechnol. 74(4):277-302; 米国特許6,005,079号;ならびに 国際公報の国際公開第94/04678号、国際公開第94/25591号および国際公開第01/44301号を参照

10

20

30

40

50

されたい。

【0402】

更に、当業者に周知の技法を用いて、抗原を「模倣」した抗イディオタイプ抗体を生成するために、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する抗体を利用できる(例えば、Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7(5):437-444;およびNissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438を参照されたい)。

【0403】

細胞内抗体の生成は、当業者に周知であり、例えば、その全体が各々参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第6,004,940号;第6,072,036号;第5,965,371号に記載されている。更に、細胞内抗体の構築は、その参考文献の全体が各々参照により本明細書に組み込まれている、Ohage and Steipe, 1999, J. Mol. Biol. 291:1119-1128; Ohage et al., 1999, J. Mol. Biol. 291:1129-1134;およびWirtz and Steipe, 1999, Protein Science 8:2245-2250において考察されている。抗体の組換え作製のために記載されている技法などの分子生物学的組換え技法も、細胞内抗体の生成に使用し得る。

【0404】

一実施形態では、本発明の細胞内抗体は、完全抗体(即ち、全定常部ならびに可変領域を有する)の抗原に対する結合有効性の約75%を保持する。より好ましくは、該細胞内抗体は、完全抗体の結合有効性の少なくとも約85%を保持する。更により好ましくは、該細胞内抗体は、完全抗体の結合有効性の少なくとも約90%を保持する。一層より好ましくは、該細胞内抗体は、完全抗体の結合有効性の少なくとも約95%を保持する。

【0405】

細胞内抗体を作製する際、対象とする $V_H$ 鎖、 $V_L$ 鎖両方に対する可変領域をコードするポリヌクレオチドは、このようなドメインのPCR増幅用鋳型として、例えば、ハイブリドーマmRNAまたは脾臓mRNAを使用することにより、クローニングできる(Huse et al., 1989, Science 246: 1276)。好ましい一実施形態では、 $V_H$ 部および $V_L$ 部をコードするポリヌクレオチドは、リンカーをコードするポリヌクレオチドによって接続されることにより、一本鎖抗体(scFv)を作る。該scFvは、通常、 $V_H$ -リンカー- $V_L$ または $V_L$ -リンカー- $V_H$ の配列を有する単一ペプチドを含む。該リンカーは、重鎖および軽鎖が、立体配座の適当な配向で一緒に結合できるように選択される(例えば、参照により本明細書に組み込まれているHuston et al., 1991, Methods in Enzym. 203:46-121を参照されたい)。更なる実施形態では、該リンカーは、可変部の各々との融合点の間の距離(例えば、3.5nm)に及ぶ長さを有し、それにより天然のFv立体配座のひずみを最小限に抑えることができる。このような実施形態では、該リンカーは、少なくとも5アミノ酸残基、10アミノ酸残基、15アミノ酸残基、またはそれより多数のアミノ酸残基のポリペプチドである。更なる実施形態では、該リンカーは、合体部位の $V_H$ 部および $V_L$ 部と立体障害を起こすべきではない。このような実施形態では、該リンカーは、アミノ酸35個以下、アミノ酸30個以下、またはアミノ酸25個以下である。したがって、最も好ましい実施形態では、該リンカーは、長さが15~25アミノ酸残基である。更なる実施形態では、該リンカーは、親水性であり、 $V_H$ 部および $V_L$ 部が抗原の検出に必要な立体配座を取ることができるように、十分に柔軟である。細胞内抗体は、同じ $V_H$ 部および $V_L$ 部の間に異なるリンカー配列を用いて生成できる。 $V_H$ 部および $V_L$ 部の特定の一对にとって適当な性質を有するリンカーは、各部に対する抗原結合性の程度を評価することによって、実験的に決定できる。リンカーの例には、それだけに限らないが、表5に開示した配列が挙げられる。

【表5】

表5

配列	配列番号
(Gly Gly Gly Gly Ser) <sub>3</sub>	SEQ ID NO:260

Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	SEQ ID NO:261
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr	SEQ ID NO:262
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln	SEQ ID NO:263
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp	SEQ ID NO:264
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly	SEQ ID NO:265
Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp	SEQ ID NO:266
Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp	SEQ ID NO:267

## 【 0 4 0 6 】

一実施形態では、細胞内抗体は細胞質中に発現する。他の実施形態では、細胞内抗体は、多様な細胞内位置に局在化する。このような実施形態では、特定の局在化配列を細胞内抗体ポリペプチドに結合することにより、特定の位置へ細胞内抗体を誘導できる。細胞内抗体は、例えば、以下の細胞内位置へ局在化できる。即ち、その位置は、小胞体(Munro et al., 1987, Cell 48:899-907; Hangejorden et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:6015)、核(Lanford et al., 1986, Cell 46:575; Stanton et al., 1986, PNAS 83:1772; Harlow et al., 1985, Mol. Cell Biol. 5:1605; Pap et al., 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)、核小体部分(Seomi et al., 1990, J. Virology 64:1803; Kubota et al., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 162:963; Siomi et al., 1998, Cell 55:197)、エンドソーム区画(Bakke et al., 1990, Cell 63:707-716)、ミトコンドリア基質(Pugsley, A.P., 1989, "Protein Targeting", Academic Press, Inc.)、ゴルジ装置(Tang et al., 1992, J. Bio. Chem. 267:10122-6)、リボソーム(Letourneur et al., 1992, Cell 69:1183)、ペルオキシソーム(Pap et al., 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)、トランスゴルジ網(Pap et al., 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)、および形質膜(Marchildon et al., 1984, PNAS 81:7679-82; Henderson et al., 1987, PNAS 89:339-43; Rhee et al., 1987, J. Virol. 61:1045-53; Schultz et al., 1984, J. Virol. 133:431-7; Ootsuyama et al., 1985, Jpn. J. Can. Res. 76:1132-5; Ratner et al., 1985, Nature 313:277-84)である。局在化シグナルの例には、それだけに限らないが、表6に開示した配列が挙げられる。

## 【 表 6 】

表6

局在化	配列	配列番号
小胞体	Lys Asp Glu Leu	SEQ ID NO:268
小胞体	Asp Asp Glu Leu	SEQ ID NO:269
小胞体	Asp Glu Glu Leu	SEQ ID NO:270
小胞体	Gln Glu Asp Leu	SEQ ID NO:271
小胞体	Arg Asp Glu Leu	SEQ ID NO:272
核	Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	SEQ ID NO:273
核	Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser	SEQ ID NO:274
核	Gln Pro Lys Lys Pro	SEQ ID NO:275
核	Arg Lys Lys Arg	SEQ ID NO:276
核	Lys Lys Lys Arg Lys	SEQ ID NO:277
核小体領域	Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln	SEQ ID NO:278

局在化	配列	配列番号
核小体領域	Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg	SEQ ID NO:279
核小体領域	Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro Thr Pro	SEQ ID NO:280
エンドソーム区画	Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro	SEQ ID NO:281
ミトコンドリア基質	Met Leu Phe Asn Leu Arg Xaa Xaa Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg His Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Xaa	SEQ ID NO:282
ペルオキシソーム	Ala Lys Leu	SEQ ID NO:283
トランスゴルジ網	Ser Asp Tyr Gln Arg Leu	SEQ ID NO:284
形質膜	Gly Cys Val Cys Ser Ser Asn Pro	SEQ ID NO:285
形質膜	Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu	SEQ ID NO:286
形質膜	Gly Gly Glu Leu Ser Gln His Glu	SEQ ID NO:287
形質膜	Gly Asn Ser Pro Ser Tyr Asn Pro	SEQ ID NO:288
形質膜	Gly Val Ser Gly Ser Lys Gly Gln	SEQ ID NO:289
形質膜	Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu	SEQ ID NO:290
形質膜	Gly Gln Thr Leu Thr Thr Pro Leu	SEQ ID NO:291
形質膜	Gly Gln Ile Phe Ser Arg Ser Ala	SEQ ID NO:292
形質膜	Gly Gln Ile His Gly Leu Ser Pro	SEQ ID NO:293
形質膜	Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser	SEQ ID NO:294
形質膜	Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu	SEQ ID NO:295

10

20

30

40

50

## 【0407】

VH部およびVL部は、保存された構造的ジスルフィド結合を一般に有する免疫グロブリンのドメインで構成される。細胞内抗体が還元性環境(例えば、細胞質)で発現する実施形態では、このような構造的特徴は存在できない。細胞内抗体のポリペプチド配列に変異を起こすことにより、ジスルフィド結合形成の欠如から生じる免疫グロブリン構造の安定性の低下を補償することができる。一実施形態では、細胞内抗体のVH部およびVL部は、1個または複数の点変異を含むことにより、その発現が還元性環境で安定化される(Steipe et al., 1994, J. Mol. Biol. 240:188-92; Wirtz and Steipe, 1999, Protein Science 8:22 45-50; Ohage and Steipe, 1999, J. Mol. Biol. 291:1119-28; Ohage et al., 1999, J. Mol Biol. 291:1129-34を参照されたい)。

## 【0408】

## 5.7.1 抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明は、RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する本発明の抗体(修飾または非修飾)をコードする、ヌクレオチド配列を含んだポリヌクレオチドを提供する。本発明は、本発明の修飾抗体をコードするポリヌクレオチドに、例えば前に規定したような、高厳密度、中間的または低厳密度の条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

## 【0409】

当分野で公知の任意の方法により、該ポリヌクレオチドを得てもよく、該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定してもよい。AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8C7、1X-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R (MEDI-524)、A4B4-F52S、A17d4(1)、A3e2、A14a4、A16b4、A17b5、A17f5またはA17h4のアミノ酸配列は公知なので(例えば、表2を参照されたい)、これらの抗体およびこれらの抗体の修飾変体をコードするヌクレオチド配列は、当分野で周知の方法を用いて決定できる、即ち、その抗体をコードする

核酸を生成するように、特定のアミノ酸をコードすることが知られているヌクレオチドコドン寄せ集める。該抗体をコードするそのようなポリヌクレオチドは、化学合成したオリゴヌクレオチド(例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載)から組み立ててもよく、その方法は、手短かに言うと、該抗体、断片またはその変異体をコードする配列の一部分を含んだオーバーラップオリゴヌクレオチドの合成、そのようなオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに該連結オリゴヌクレオチドのPCRによるその後の増幅を伴う。

#### 【0410】

あるいは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、適当な供給源からの核酸から生成してもよい。もしも、特定の抗体をコードする核酸を含んだクローンを入手できないが、該抗体分子の配列が知られていれば、該免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成するか、あるいは、適当な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または、本発明の抗体を発現するように選択したハイブリドーマ細胞などの、該抗体を発現する任意の組織もしくは細胞から生成したcDNAライブラリー、または、該組織もしくは細胞から単離した核酸、好ましくはポリA+RNA)から、該配列の3'および5'末端にハイブリッド形成可能な合成プライマーを用いたPCR増幅により、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたクローニングにより、例えば、cDNAライブラリーに由来し、該抗体をコードするcDNAクローンを特定することによって、得てもよい。次いで、PCRにより生成した増幅核酸は、当分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクター中にクローニングしてもよい。

#### 【0411】

##### 5.7.2 変異誘発

抗体のヌクレオチド配列が一旦決定されると(例えば、下記のセクション5.7.4を参照されたい)、該抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列操作のための当分野で周知の方法、例えば、組換えDNA技法、部位選択的変異誘発、PCRなど(例えば、その全体が共に参照により本明細書に組み込まれている、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技法を参照されたい)を用いて操作することにより、例えば、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入を創作するために、異なったアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。ある種の実施形態では、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入は、抗体のエピトープ結合ドメイン領域中、および/またはFcRnとの相互作用に関わる抗体のヒンジ-Fc領域中に導入される。好ましい実施形態では、アミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および428~436の1個または複数で、ヒンジ-Fc部中に1個または複数の修飾を有する抗体が、生成する。

#### 【0412】

特定の実施形態では、CDRの1個または複数が、常套的な組換え技法を用いてフレームワーク領域内に挿入される。該フレームワーク領域は、天然またはコンセンサスのフレームワーク領域であり、好ましくはヒトのフレームワーク領域であってもよい(ヒトのフレームワーク領域の一覧表については、例えばChothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278:457-479を参照されたい)。好ましくは、フレームワーク領域とCDRとの組合せにより生成するポリヌクレオチドは、特定の抗原(例えば、IL-9ポリペプチド)に免疫特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、1個または複数のアミノ酸置換を該フレームワーク領域内に起こしてもよく、好ましくは、該アミノ酸置換が該抗体のその抗原に対する結合性を改善する。その上、このような方法を用いて、連鎖内ジスルフィド結合に関わる1個または複数の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を起こし、それによって1個または複数の連鎖内ジスルフィド結合を欠いた抗体分子を生成してもよい。該ポリヌクレオチドに対する他の変化は、本発明により包含されており、当分野の技術に入る。

#### 【0413】

変異誘発は、それだけに限らないが、抗体の定常部またはその断片(例えば、CH2部また

はCH3部)の修飾すべき配列内での1個または複数の修飾を有するオリゴヌクレオチドの合成を含む、当分野で公知の技法のいずれかに従って、行い得る。所望する変異のDNA配列ならびに十分な個数の隣接ヌクレオチドをコードする特定のオリゴヌクレオチド配列の使用により、サイズおよび配列複雑度が十分なプライマー配列を得ることにより、横切る欠失接合部の両側に安定な二重鎖を形成することによって、部位特異的な変異誘発から変異体を産生できる。通常、長さが約17～約75ヌクレオチド、またはそれより長く、改変される該接合部の両側には残基が約10～約25個、またはそれより多数個あるプライマーが好ましい。異なる多様な変異を1つまたは複数の位置に導入するこのような多数のプライマーを使用して、変異体のライブラリーを生成し得る。

#### 【0414】

部位特異的な変異誘発の技法は、様々な刊行資料(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-82, 1987を参照されたい)によって例示されるように、当分野で良く知られている。一般に、部位選択的な変異誘発は、最初に、所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列内に含む、一本鎖ベクターを得るか、または二本鎖ベクターを2本の鎖に融解分離することによって、行われる。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成によって調製される。次いで、このプライマーは、該一本鎖ベクターと共にアニーリングし、T7 DNAポリメラーゼなどのDNA合成酵素に曝すことによって、変異保有鎖の合成を完了する。したがって、1本の鎖が元の非変異配列をコードし、第2の鎖が所望の変異を保有する、ヘテロ二本鎖が形成される。次いで、このヘテロ二本鎖ベクターを使用して大腸菌細胞などの適当な細胞を形質転換し、またはその中に形質移入した後、該変異配列構成を保有する組換えベクターを含んだクローンを選択する。お分かりのことと思うが、この技法では、一本鎖、二本鎖の両形態で存在するファージベクターを通常使用する。部位選択的な変異誘発において有用な代表的ベクターには、M13ベクターなどのベクターが含まれる。このようなベクターは商業的に容易に入手でき、その使用法は、当業者に一般に良く知られている。二本鎖プラスミドも、部位選択的な変異誘発において常套的に使用されており、その場合は、対象とする遺伝子をプラスミドからファージに移す段階が除かれる。

#### 【0415】

あるいは、Taq DNAポリメラーゼなどの市販熱安定酵素を用いたPCR(商標)の使用で、変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを増幅DNA断片中に組み込んでもよく、次いでその断片を適当なクローニングまたは発現ベクター中にクローニングできる。PCR(商標)媒介変異誘発手順に関しては、例えば、その全体が本明細書に共に組み込まれている、Tomic et al., *Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987およびUpender et al., *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995を参照されたい。熱安定ポリメラーゼ以外に熱安定リガーゼを用いるPCR(商標)の使用で、リン酸化変異誘発オリゴヌクレオチドを増幅DNA断片中に組み込んでもよく、次いでその断片を適当なクローニングまたは発現ベクター中にクローニングしてもよい(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994を参照されたい)。

#### 【0416】

抗体またはその断片のFc部の配列変異体を作製する、当業者公知の他の方法が、使用できる。例えば、抗体またはその断片の定常部のアミノ酸配列をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの変異誘発剤で処理することにより、配列変異体を得てもよい。

#### 【0417】

### 5.7.3 パンニング

アミノ酸残基251～256、285～290、308～314、385～389および/または428～436において、1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片を発現するベクター、特にファージは、FcRnに対するアフィニティーの増加した定常部またはその断片を特定するためにスクリーニングし、それにより、ファージ集団からアフィニティー最高の結合性ファージを選出できる。アミノ酸残基251～256、285～290、308～314、385～389および/または428

10

20

30

40

50

~436において、1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片のFcRnに対する結合性を分析するために使用できる免疫アッセイには、それだけに限らないが、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイなどが挙げられる。このようなアッセイは、常套的であり、当分野で周知である(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい)。例示的な免疫アッセイは、以下の本明細書で簡単に説明されている(しかし、限定することは意図していない)。BIAcore速度分析も、アミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および/または428~436において、1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片のFcRnに対する結合速度および解離速度を決定するために、使用できる。BIAcore速度分析は、その表面にFcRnを固定化したチップ(本明細書のセクション5.1および6を参照されたい)から、アミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および/または428~436において、1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片のFcRnに対する結合および解離を分析することからなる。

【0418】

#### 5.7.4 配列決定

例えば、可変領域、ならびに/あるいはアミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389および/または428~436において、1個または複数の修飾を有する定常部またはその断片をコードするヌクレオチド配列を直接、配列決定するために、当分野で公知の多様な配列決定反応のいずれも使用できる。配列決定反応の例には、Maxim and Gilbert (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560, 1977)またはSanger (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463, 1977)により開発された技法に基づく反応が挙げられる。また、多様な自動化配列決定手順のいずれも利用でき(*Bio/Techniques*, 19:448, 1995)、それには質量分析による配列決定(例えば、PCT 公報国際公開第94/16101号, Cohen et al., *Adv. Chromatogr.*, 36:127-162, 1996およびGriffin et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38:147-159, 1993を参照されたい)も含まれることも想定している。

【0419】

#### 5.7.5 抗体の組換え発現

RSV抗原(例えば、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する本発明の抗体(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖、または本発明の一本鎖抗体)の組換え発現には、該抗体をコードするポリヌクレオチドを含んだ発現ベクターの構築が必要である。本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはそれらの断片(必ずというわけではないが、好ましくは、重鎖および/または軽鎖の可変部を含む)をコードするポリヌクレオチドが一旦得られてしまうと、該抗体分子の産生用ベクターが、当分野で周知の技法を用いた組換えDNA技術により産生し得る。したがって、抗体コードヌクレオチド配列を含んだポリヌクレオチドの発現によるタンパク質の調製法は、本明細書に記載されている。抗体コード配列と、適当な転写および翻訳調節シグナルとを含んだ発現ベクターを構築するために、当業者に周知の方法を使用できる。このような方法には、例えば、生体外組換えDNA技法、合成技法、生体内遺伝子組換えなどが挙げられる。したがって、本発明は、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変部、またはそれらの断片、あるいは重鎖もしくは軽鎖CDRをコードし、プロモーターに作動的に連結したヌクレオチド配列を含んだ、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、該抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列(例えば、国際公報の国際公開第86/05807号および国際公開第89/01036号;ならびに米国特許第5,122,464号を参照されたい)を含んでもよく、該抗体の可変部は、全重鎖、全軽鎖、または全重鎖、全軽鎖の両方を発現するために、このようなベクター中にクローニングし得る。

【0420】

該発現ベクターは、従来技法により宿主細胞へ移入され、次いで、移入済みの該細胞は従来技法により培養され、本発明の抗体を産生する。したがって、本発明は、本発明の抗体またはその断片、あるいはその重鎖もしくは軽鎖またはその断片、あるいは本発明の一



本鎖抗体をコードし、異種プロモーターに作動的に連結するポリヌクレオチドを含んだ宿主細胞を包含する。二重鎖抗体を発現するための好ましい実施形態では、以下に詳述するように、重鎖、軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞中に同時発現させ、それにより、完全な免疫グロブリン分子を発現させてもよい。

#### 【0421】

多様な宿主-発現ベクター系を利用することにより、本発明の抗体分子を発現し得る(例えば、米国特許第5,807,715号を参照されたい)。このような宿主-発現系は、対象とするコード配列を産生した後、精製し得る媒体を表わすが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換または形質移入すると、本発明の抗体分子をその場で発現し得る細胞も表す。このような系には、それだけに限らないが、抗体コード配列を含む、バクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAの組換え発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌および枯草菌(*B. subtilis*));抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス・ピチア(*Saccharomyces Pichia*))などの微生物;抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系;抗体コード配列を含む、組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV、タバコモザイクウイルスTMV)に感染したか、または組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは哺乳動物細胞のゲノム(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)由来のプロモーターを含んだ組換え発現構築体を潜ませた哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、NS0および3T3細胞)が挙げられる。特に完全な組換え抗体分子を発現するための、好ましくは大腸菌などの細菌細胞、より好ましくは真核細胞が、組換え抗体分子を発現するために使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、ヒトのサイトメガロウイルス由来の中初期主遺伝子プロモーター要素と共用すると、抗体にとって有効な発現系である(Foecking et al., 1986, Gene 45:101およびCockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2)。特定の実施形態では、RSV抗原(好ましくは、RSV F抗原)に免疫特異的に結合する本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成プロモーター、誘導プロモーターまたは組織特異的プロモーターによって調節される。

#### 【0422】

細菌系では、発現される抗体分子に対して意図する用途に応じて、多数の発現ベクターを有利に選択し得る。例えば、抗体分子の医薬組成物を生成するために、このような抗体を多量に作製しようとする場合、精製容易な高濃度の融合タンパク産物の発現を誘導するベクターが、所望のベクターとなり得る。このようなベクターには、それだけに限らないが、抗体コード配列が、*lac Z*コード領域とフレーム内でベクター中に個別に連結されることにより、融合タンパク質を産生し得る大腸菌発現ベクターpUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791)、pINベクター(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)などが挙げられる。pGEXベクターも、グルタチオン5-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために、使用し得る。一般に、このような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズに吸着・結合した後、遊離グルタチオンの存在下で溶出することにより、容易に精製できる。該pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がGST部分から放出できるように、トロニンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されている。

#### 【0423】

昆虫系では、オートグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして用い、外来遺伝子を発現させる。該ウイルスはスポドプテラ・フルギパーダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞中で増殖する。抗体コード配列は、非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)中に個別にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に配置し得る。

## 【0424】

哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルス系発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合では、対象とする抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび三分割リーダー配列に連結し得る。次いで、このキメラ遺伝子は、生体外または生体内組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入し得る。該ウイルスの非必須領域(例えば、E1またはE3領域)中に挿入されると、生存でき、感染宿主細胞中で抗体分子を発現できる組換えウイルスが作製されることになる(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照されたい)。挿入した抗体コード配列を効率的に翻訳するには、特定の開始シグナルも必要となり得る。このようなシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。更に、該挿入配列全体の翻訳を確実にするには、該開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームと同相でなければならない。このような外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然、合成いずれもの多様な起源に由来し得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含むことによって、促進し得る(例えば、Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照されたい)。

10

## 【0425】

その上、該挿入配列の発現を調節するか、または所望する特定の様式で遺伝子産物を修飾し、プロセシングする宿主細胞系を選択し得る。タンパク質産物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセシング(例えば、切断)は、該タンパク質の機能にとって重要となり得る。様々な宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物に翻訳後プロセシングおよび修飾をするための特徴的・特異的な機構を有している。発現する外来タンパク質の適正な修飾およびプロセシングを確実にするために、適切な細胞系または宿主系を選択することができる。このために、一次転写物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化をするための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用してもよい。このような哺乳動物宿主細胞には、それだけに限らないが、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NS0(免疫グロブリン鎖を全く内生しないマウス骨髄腫細胞系)、CRL7030、HsS78Bstなどの各細胞が挙げられる。

20

## 【0426】

組換えタンパク質を長期高収量で作製するためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞系を操作してもよい。ウイルスの複製源を含んだ発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞は、適当な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択マーカーにより制御されたDNAで形質転換をすることができる。外来DNAの導入後、操作した細胞を強化培地中で1~2日間増殖させてもよく、次いで選択培地に切り換える。組換えプラスミド内の選択マーカーは、この選択に対して耐性を賦与し、細胞は、該プラスミドを染色体中に安定に組み込み、増殖してフォーカスを形成でき、次いでこれをクローニングし、増殖して細胞系にすることができる。この方法は、抗体分子を発現する細胞系を操作するために、有利に使用し得る。このような操作細胞系は、該抗体分子と直接的または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価において、特に有用となり得る。

30

## 【0427】

それだけに限らないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチンギャニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17)の各遺伝子を含めた多数の選択系を使用してもよく、そのような遺伝子は、各々tk細胞、hgprt細胞またはaprt細胞中で使用できる。また、代謝拮抗物質耐性も、以下の遺伝子に対する選択基準として使用できる。そのような遺伝子は、メソトレキセートに対して耐性を賦与するdhfr (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)、ミコフェノール酸に対して耐性を賦与するgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)、アミノグリコシドG-418に対して耐性を賦

40

50

与するneo (Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932およびMorgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215)、およびハイグロマイシンに対して耐性を賦与するhygro (Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147)である。組換えDNA技術に関して当分野で一般に知られている方法は、所望の組換えクローンを選択するために常套的に適用してもよく、このような方法は、例えば、Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)ならびにDracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994)の12章および13章; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1に記載されているが、それらのものは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

10

#### 【0428】

抗体分子の発現量は、ベクター増幅によって増加させることができる(総説としては、Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクター系中のマーカが増幅可能である場合、宿主細胞の培養液に存在する阻害剤の量的増加によって、マーカー遺伝子のコピー数が増加するであろう。該増幅領域は抗体遺伝子と関係しているので、抗体の産生も増加するであろう(Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257)。

20

#### 【0429】

宿主細胞には、第1ベクターが重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2ベクターが軽鎖由来ポリペプチドをコードする2種の発現ベクターを同時にトランスフェクションしてもよい。2種の該ベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの等量発現を可能とする同一の選択マーカーを含んでもよい。あるいは、重鎖、軽鎖の両ポリペプチドをコードし、両方を発現できる単一ベクターを使用してもよい。このような状況では、軽鎖を重鎖の前に配置して、過剰の有毒な遊離重鎖を回避すべきである(Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52およびKohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197-2199)。重鎖および軽鎖に対するコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを構成してもよい。

30

#### 【0430】

本発明の抗体分子が組換え発現により一旦產生したら、免疫グロブリン分子を精製するための当分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインAの後の特異抗原に対するアフィニティー、およびサイズ識別カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製を目的とする他の任意の標準的技法によって、該抗体を精製してもよい。更に、本発明の抗体は、本明細書に記載または当分野の他所で公知の異種ポリペプチド配列と融合することにより、精製を促進してもよい。

#### 【0431】

### 5.8 キット

本発明は、本明細書に示した1種または複数の修飾または非修飾抗体などの、本発明の医薬組成物の成分1種または複数で満たした1個または複数の容器からなる医薬用パックまたはキットも提供する。場合によって、医薬または生物学製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形式を採り、人体投与に対する製造、使用または販売の当機関による認可を示す注意書きを、このような容器に添えることができる。

40

#### 【0432】

本発明は、前記方法において使用できるキットを提供する。一実施形態では、キットは、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を1個または複数の容器中に含む。特定の実施形態では、本発明のキットは、実質的に単離されたRSV抗原を対照として含有する。好ましくは、本発明のキットは、RSV抗原と反応しない対照抗体を更に含む。別の特定の実施形態では、本発明のキットは、修飾抗体のRSV抗原との結合を検出する手段を含有する(例

50

えば、該抗体は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物、発光化合物などの検出可能な基質と複合してもよいし、または該第1の抗体を認識する第2の抗体が、検出可能な基質と複合してもよい)。特定の実施形態では、該キットは、組換え産生または化学合成したRSV抗原を含んでもよい。キット中に入れる該RSV抗原は、固相支持体に結合してもよい。より特定の実施形態では、前記キットの検出手段は、RSV抗原を結合した固相支持体を含む。このようなキットは、非複合化型のレポーター標識抗ヒト抗体を含んでもよい。この実施形態では、抗体のRSV抗原との結合は、前記レポーター標識抗体の結合によって検出できる。

#### 【実施例】

#### 【0433】

### 6. 実施例

#### 6.1 実施例: BIAcore(商標)によるヒト化RSV mAbの反応速度の解析

一般的な反応速度試験は0.05% Tween-20を含むPBS緩衝液(PBS/Tween)でさまざまな濃度(25~300nM)のモノクローナル抗体(「mAb」)250  $\mu$ Lを注入して行った。流速は75  $\mu$ L/分を維持し、解離時間は15分間とした。解離速度を判定するため、mAb注入後にPBS/Tween緩衝液の注入に切り換え、PBS/Tween緩衝液を30分間注入した。サイクルの間に100mM HClを1分間パルス注入してセンサーチップを再生した。再生のステップが原因である固定化Fタンパク質の結合能の減少は最小限であった(1サイクル当たり4%減少)。この小幅な減少は、算出した結合速度定数および解離速度定数(それぞれ、 $k_{on}$ および $k_{off}$ とも呼ばれる)の値を変化させなかった。

#### 【0434】

更に詳しくは、 $k_{assoc}$ (即ち $k_{on}$ )の測定では、EDC/NHS法(EDC=N-エチル-N'-[3-ジエチルアミノプロピル]-カルボジイミド)によってFタンパク質を直接固定化した。簡単に説明すると、25  $\mu$ g/mLのFタンパク質を含む10mM NaOAc(pH5.0)を調製して約5~10  $\mu$ Lを注入すると、上記対照条件では約30~50RU(反応単位)のFタンパク質が固定化された。反応速度解析のため、ブランクを差し引いた。カラムは100mM HClを用いて再生することが可能であった(完全に再生するためには、60秒間の接触時間が必要である)。この処置により、固定化抗原にダメージを与えることなく結合したFabが完全に解離し、この処理により、40回以上再生して使用することが可能であった。 $k_{on}$ 測定では、Fab濃度は0.39nM、0.75nM、1.56nM、3.13nM、12.5nM、25nM、50nM、および100nMとした。解離反応は約900秒間解析した。反応速度を1:1のラングミュアフィッティングにて解析した(グローバルフィッティング)。測定はHBS-EP緩衝液(10mM HEPES, pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% (v/v) Surfactant P20)中で行った。

#### 【0435】

本明細書で開示するように、組合せ(combinatorial)クローンの測定では $k_{on}$ および $k_{off}$ は個別に測定した。 $k_{on}$ は単一変異クローンの条件と同一の条件で測定し、同様にして解析した。

#### 【0436】

$k_{off}$ の測定では、以下の条件を用いた。簡単に説明すると、ブランクとして用いたCM-デキストランでFタンパク質4,100RUを(上記のようにして)固定化した。ここに3,000RUのFabが結合した(解離しているFabは機器のばらつきを相殺するのに十分な量であった)。5nM(解離平衡定数 $K_d$ よりも約350~2,000倍高濃度)のFタンパク質を含むHBSを緩衝液として用いた。流速5  $\mu$ L/分では、解離反応は6~15時間であった。ここで用いた条件下では、解離したFabの再結合は最小限であった。詳細については、本バイオセンサーのマニュアルを参照すること。

#### 【0437】

解離に関する一次速度定数の結合または会合に関する二次速度定数に対する比( $K_d=k_{off}/k_{on}$ )から、本明細書で開示する、高アフィニティー抗RSV抗体とFタンパク質またはRSVの他のエピトープ部位との結合を算出した。 $k_{on}$ 値は比に関する以下の式に従って算出した。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 3 8 】

$$dR/dt = k_{on}[mAb]R_{max} - (k_{on}[mAb] + k_{off})R$$

ここで、 $R$ および $R_{max}$ はそれぞれ、時間 $t$ および無限時間での反応単位である。 $dr/dt$ を $R$ の関数としてプロットすると、傾き $(k_{on}[mAb] + k_{off})$ が得られる。この傾きは $[mAb]$ と線形関係にあるので、傾きを $[mAb]$ に対して再プロットすると $k_{on}$ 値を算出することができる。新しい線の傾きが $k_{on}$ である。 $k_{off}$ 値は $y$ 切片から外挿することができるが、より正確な値は $k_{off}$ の直接測定により決定した。 $mAb$ を注入した後、PBS/Tween緩衝液をセンサーチップに流入させた。この時点からは $[mAb]=0$ である。よって、 $dR/dt$ に関する上記の式は、以下のように変形される。

## 【 0 4 3 9 】

$$dr/dt = k$$

または、

$$dR/R = k_{off} dt$$

この式を積分すると、以下の式となる。

## 【 0 4 4 0 】

$$\ln(R_0/R_t) = k_{off} t$$

ここで、 $R_0$ および $R_t$ はそれぞれ、時間0(解離反応の開始時点)および時間 $t$ での反応単位である。最後に、 $\ln(R_0/R_t)$ を $t$ の関数としてプロットすると、傾き $k_{off}$ が算出される。

## 【 0 4 4 1 】

抗体変異体でのこれらの数値を以下の表7～10に示す。

## 【 表 7 】

表7. 高活性抗体の反応動力学定数の要約

抗体	$k_{on} \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} \times 10^{-4} (s^{-1})$	$IC_{50} (nM)$
**バリビズマブ	2.04; 1.89; 2.18	7.64; 7.38; 7.02	3.57
**AFFF(1)	1.08; 0.96; 1.24	2.74; 2.66; 2.06	
*1X-493L1FR	1.85	6.5	
*H3-3F4	4.59; 4.67; 5.72; 6.25; 5.33	4.45; 4.02	
*M3H	6.05	3.38	
*Y10H6	7.57	4.62	
*DG	2.65; 2.83; 4.16; 3.18; 2.88	1.67; 4.44	
*AFFF(1)	2.12; 1.56; 1.86	2.45; 4.46; 2.68	
*6H8	3.14; 4.44	1.78; 4.73	
*L1-7E5	3.29; 3.57; 4.05; 3.35; 4.26	1.92; 3.31; 2.29	
*L2-15B10	3.69; 2.82; 3.12; 5.33; 3.78	1.34; 4.16; 2.70	
*P12f2	6.63	2.82	0.65
*P12f4	5.27	2.99	0.70
*P11d4	5.70; 5.72	7.17	>20
*Ale9	7.9	4.53	2.5
*A12a6	7.43	2.30	0.62
*A13a11	7.35	2.50	2.04
*A13c4	7.81; 7.35	2.80	0.52

## 【 0 4 4 2 】

【表 8】

表8

モノクローナル抗体 対 Bac-F(1:1)				
	<b>kon (x E+5)</b>	<b>koff (x E-5)</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>Chi2</b>
P12f2	4.07	12.8	0.31 (13)	0.9
P12f4	4.95	5.55	0.11 (35)	0.6
A13c4	3.00	3.96	0.13 (30)	1.2
A12a6	4.60	1.65	0.04 (98)	1.2
A1e9	4.33	14.3	0.33 (12)	2.5
A8c7	4.17	8.75	0.21 (19)	1.8
P11d4	4.66	28.9	0.62 (6)	1.0
A17d4(1)	4.56	4.07	0.09 (43)	0.5
A4B4	4.34	1.06	0.02 (195)	1.5
パリビズマブ	1.32	51.5	3.90 (1)	0.6

10

【 0 4 4 3 】

【表 9】

表9

モノクローナル抗体 対 NUF4(1:1)				
	<b>kon (x E+5)</b>	<b>koff (x E-5)</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>Chi2</b>
P12f2	5.41	17.8	0.33 (26)	1.2
P12f4	9.43	22.9	0.24 (36)	0.9
A13c4	3.65	27.2	0.75 (12)	1.8
A12a6	4.00	29.1	0.73 (12)	1.9

20

A1e9	8.43	58.4	0.69 (13)	0.9
A8c7	8.25	53.5	0.65 (13)	0.7
P11d4	9.04	76.6	0.85 (10)	2.5
A17d4(1)	4.99	36.2	0.73 (12)	2.0
A4B4	4.96	28.2	0.57 (15)	1.9
パリビズマブ	3.04	265	8.70 (1)	0.4

30

【 0 4 4 4 】

【表 10】

表10

モノクローナル抗体 対 NUF4(2:1)				
	<b>kon (x E+5)</b>	<b>koff (x E-5)</b>	<b>KD (nM)</b>	<b>Chi2</b>
P12f2	2.82	23.6	0.84 (371)	1.5
P12f4	2.73	63.6	2.33 (134)	4.9
A13c4	3.20	22.5	0.70 (446)	1.7
A12a6	2.18	40.8	1.87 (167)	1.9
A1e9	3.29	139	4.22 (74)	2.8
A8c7	4.30	114	2.65 (118)	2.0
P11d4	3.66	313	8.55 (36)	3.6
A17d4(1)	2.64	29.2	1.11 (281)	1.7
A4B4	2.03	40.06	2.00 (156)	1.4
パリビズマブ	0.78	2420	312 (1)	1.3

40

50

## 【0445】

表1で示したCDRの下線付き太字のアミノ酸残基は、本明細書ならびに同時係属の出願特許第60/168,426号および第60/186,252号に記載の方法で作製した高活性抗体のCDR内の重要な位置に存在するアミノ酸残基を表す。例えば、 $k_{on}$ 値を増加させることによって抗体の活性を増加させるためには、基準抗体として本明細書に教示され表1において下線付き太字の残基で示した重要な位置に存在するアミノ酸を、表2および/または表3のCDRの下に記載したアミノ酸によって置換する。したがって、これらの1文字コードは、活性を増加させようとする基準抗体について図2に示したCDRの重要な位置(または、最も重要な位置)で基準アミノ酸を置換しているアミノ酸(表2の配列での太字の残基)を表す。

## 【0446】

## 6.2 BIAcore(商標)によるA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)の結合の反応速度解析

A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)およびパリビズマブとRSV Fタンパク質との相互作用の反応速度は、BIAcore 3000機器(BIAcore社製、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いて、表面プラズモン共鳴法(Jonssonら1991, Biotechniques 11(5):620-627、およびJohns, B. (1989). Epitope mapping by surface plasmon resonance in the BIAcore. Molecular Biotechnology 9(1):65-71などを参照)により判定した。これらの試験の抗原としては、組換えにより作製したC末端切断RSV(A2株)Fタンパク質(Wathenら1989, J Infect Dis 159(2):255-264)を用いた。膜アンカーを欠く短縮Fタンパク質は、組換えバキュロウイルス発現系を用いて分泌産物として作製し、コンカナバリンAおよびQ-セファロースカラムクロマトグラフィーのステップを繰り返して精製した。メーカーのプロトコールに従い、精製したFタンパク質と、N-ヒドロキシコハク酸イミド-N-エチル-N'-[3-ジエチルアミノプロピル]-カルボジイミド(EDC/NHS)で活性化したCM5センサーチップとを、低いタンパク質密度で共有結合させた。反応しなかった活性エステル基は1Mエタノールアミンでブロックした。対照用として、抗原を全く含まないブランク表面を同一の固定化条件で調製した。

## 【0447】

反応速度測定のため、機器用緩衝液(HBS/Tween-20、BIAcore社製)で調製した各mAbの2倍段階希釈系列(100nm~0.2nm)の試料を、直列に接続したFタンパク質および対照用の細胞表面に注入した。各解析では、チップ表面に100mM HClを短時間パルス注入することにより、解離反応後にも結合したままであった抗体をセンサーチップから除去した。全データセットを収集した後、BIA評価ソフトウェア(BIAcore社製、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いて、得られた結合曲線を1:1のラングミュア結合モデルにグローバルフィッティングさせた。このアルゴリズムにより、結合速度( $k_{on}$ )と解離速度定数( $k_{off}$ )の両方が算出され、各抗体の見かけ上の結合平衡定数 $K_d$ は $k_{on}$ および $k_{off}$ から2つの速度定数の比 $k_{off}/k_{on}$ として導き出される。各速度定数の算出方法についての詳細な説明は、BIA評価ソフトウェアハンドブック(BIAcore社製、ニュージャージー州ピスカタウェイ)に記載されている。

## 【0448】

BIAcoreを用いた評価による結合の反応速度解析(表11)から、用いた低密度表面の条件では、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)はRSV Fタンパク質とのアフィニティーがパリビズマブよりも約70倍高いことが明らかになった。MEDI-524のRSV Fタンパク質とのアフィニティーの増加は、結合速度が4倍増加し、解離速度が約17分の1に減少していることが原因である。MEDI-524がFタンパク質の表面から解離する速度は、BIAcore 3000機器の検出限界に近いので、MEDI-524について算出した解離速度は推定値である。

## 【表 1 1】

表11. 結合の反応動力学解析

mAb	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_d (pM)$
パリビズマブ	1.14 E+05	3.95 E-04	3460
MEDI-524	4.73 E+05	2.35 E-05	50

## 【 0 4 4 9 】

## 6.3 実施例:微量中和アッセイ

本発明の抗体の中和能は微量中和アッセイにより判定した。この微量中和アッセイは、Andersonらによる手順(1985, J. Clin. Microbiol. 22:1050-1052、その開示内容の全体が参照により本明細書に組み込まれている)の変法である。ここで用いた手順はJohnsonら1999, J. Infectious Diseases 180:35-40)に記載され、その開示内容の全体が参照により本明細書に組み込まれている抗体の希釈は96ウェルプレートを用いて三重に反復して行った。10 TCID<sub>50</sub>の呼吸器合胞体ウイルス(RSV Long株)を、試験される抗体(またはFab)の段階希釈液と96ウェルプレートのウェル中で37℃で2時間インキュベートした。次に、RSV感受性HEp-2細胞(2.5 × 10<sup>4</sup>個)を各ウェルに加え、5% CO<sub>2</sub>中で37℃で5日間培養した。5日後に培地を吸引除去して細胞を洗浄し、80%がメタノールで20%がPBSである溶液で細胞をプレートに固定化した。その後、Fタンパク質の発現によりRSV複製を判定した。固定化した細胞をビオチン複合化抗Fタンパク質モノクローナル抗体(pan Fタンパク質、C部位特異的mAb 133-1H)とインキュベートし、洗浄して、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化アビジンをウェルに添加した。ウェルを再び洗浄し、基質であるTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)の代謝回転を450nmで測定した。中和価は、450nmでの吸光度(OD<sub>450</sub>)をウイルスのみを含む対照細胞よりも50%以上減少させる抗体濃度で表した。表2に記載のモノクローナル抗体およびFab断片に関するこのアッセイの結果を、上記の表11および表12に示す。

10

20



【表 1 2】

表12. 高速度変異体IgGおよびFabの終点RSV微量中和力価

分子	平均IC <sub>50</sub> (曲線) μg/mL	STDEV 曲線 IC <sub>50</sub>	倍率差 (曲線 IC <sub>50</sub> )	平均IC <sub>50</sub> (コントロール) μg/mL	STDEV コントロール IC <sub>50</sub>	倍率差 (コントロール IC <sub>50</sub> )	n (アッセイ 回数)
**パリビズマブ	0.4527	0.208	-	0.5351	0.238	-	8
**A1e9	0.0625	0.0268	7	0.0645	0.223	8	3
**A17d4(1)	0.0342	0.022	13	0.0354	0.0187	15	4
**P11d4	0.0217	0.0331	21	0.0289	0.0110	19	5
**P12f2	0.0231	0.0141	20	0.0223	0.0083	24	6
**A8c7	0.0337	0.0309	13	0.0383	0.0283	14	5
**A12a6	0.0357	0.0316	13	0.0354	0.0261	15	7
**P12f4	0.0242	0.0163	19	0.0235	0.0076	23	7
**A13c4	0.0376	0.0268	12	0.0375	0.0213	14	6
**A4B4	0.0171	0.0018	27	0.0154	0.00417	35	2
*A1e9	0.157	-	3	0.125	-	4	1
*A17d4(1)	0.0179	-	25	0.0171	-	31	1
*P11d4	>1.00	-	-	>1.00	-	-	1
*P12f2	0.0407	0.0112	11	0.0326	0.00905	16	2
*A8c7	0.177	-	3	0.157	-	34	1
*A12a6	0.0287	0.00417	16	0.0310	0.00982	17	2
*P12f4	0.0464	0.00791	10	0.0351	0.0126	15	2
*A13c4	0.0264	0.00141	17	0.0258	0.00071	21	2
*A4B4	0.0414	-	11	0.0411	-	13	1
*A13a11	0.120	0.0222	4	0.1022	0.0260	5	2
*A1h5	0.194	0.462	2	0.176	0.0625	3	2
** モノクローナル抗体							

## 【 0 4 5 0 】

## 6.4 RSV微量中和アッセイ

A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)およびパリビズマブの生体外でのRSV(Long株)複製阻害活性を、RSV微量中和アッセイを用いて評価した。このアッセイは、Johnsonら(Johnson et al. 1997, J Infect Dis 176: 1215-1224)に記載されるように、Andersonらによる手順(Anderson et al. 1985, J Clin Microbiol 22: 1050-1052)の変法である。抗体の希釈は96ウェルプレートのウェルでn=2~4で行った。希釈抗体が入った各ウェルに約100~1,000 TCID<sub>50</sub>のRSV(Long株)を添加し、37℃で2時間インキュベートした。次に、継代数が少ないRSV感受性HEp-2細胞(2×10<sup>4</sup>個)を各ウェルに加え、加湿した5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で5日間培養した。4日後または5日後に細胞をPBS-0.1% Tween 20で洗浄した後、80%がアセトンで20%がPBSである溶液で細胞をプレートに固定した。Fタンパク質特異的なELISAを用いたFタンパク質の発現の定量により、RSV複製を判定した。固定化した細胞をC部位特異的なpa RSV Fタンパク質mAb 133-1H(Chemicon社製)とインキュベートし、洗浄して、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ヤギ抗マウスIgGとインキュベートして再び洗浄した。ペルオキシダーゼ基質であるTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を各ウェルに添加し、20分後に2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて基質の代謝回転を450nm(OD<sub>450</sub>)で測定した。中和価は、ウイルスのみを含む対照ウェルよりOD<sub>450</sub>値を少なくとも50%以上減少させる抗体濃度(IC<sub>50</sub>)で表す。図3に示したこのアッセイの結果から、MEDI-524(平均IC<sub>50</sub>=18ng/mL)はパリビズマブ(平均IC<sub>50</sub>=315ng/mL)よりも活性が約18倍高いことが示された。

## 【 0 4 5 1 】

## 6.5 カニクイザルBAL試料を用いたRSV微量中和アッセイ

投与動物の肺に存在するMEDI-524の生体外でのRSV複製阻害活性を、RSV微量中和アッセイを用いて評価した。雌の幼若カニクイザル4匹(平均体重2.0kg)をテラゾール(Telazol)

で鎮静化し、MEDI-524 30mg/kg体重を外部輸液ポンプを使って伏在静脈から静脈内投与した。4日後、動物をテラゾールで麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で右肺の一肺葉に気管支肺胞洗浄(BAL)を施行した。MEDI-524特異的なELISAを用いて、気管支肺胞洗浄液中のMEDI-524の力価を判定した。上記のRSV微量中和アッセイではBAL試料は非希釈および2倍段階希釈で試験し、コントロールとして精製MEDI-524を含めた。図4に示したこのアッセイの結果から、投与から4日後にMEDI-524はカニクイザルの肺で完全なRSV中和能を維持していることが示される。

【0452】

#### 6.6 RSV融合阻害アッセイ

ウイルスが細胞に吸着した後の本発明の抗体のRSV誘導融合阻害活性を融合阻害アッセイで測定した。このアッセイは、抗体添加の4時間前にRSV(Long株)を細胞に感染させる以外は、微量中和アッセイと同一である(Taylorら1992, J. Gen. Virol. 73:2217-2223)。

【0453】

#### 6.7 等温滴定熱量測定

抗体とRSVウイルスの結合部位を模倣する抗原であるRSV F糖タンパク質(NUF4)との相互作用に関する等温滴定熱量測定(ITC)の測定値から、熱力学的な結合アフィニティーおよびエンタルピーを決定した。

【0454】

#### 方法および材料

##### 抗体および抗原

A13c4、A17d4(1)、A4B4、およびパリピズマブを透析液で希釈し、最大ピーク吸光度280nmでの吸光係数 $217,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用い、Perkin-Elmer Lambda 4B分光光度計で測定したUVスペクトル吸光測定値により濃度を判定した。大量の試料を使用してロスすることなしに正確な濃度を決定するには吸光係数が低過ぎるので、元の試料の希釈試料に対する質量比から、希釈したNUF4の濃度を算出した。

【0455】

#### ITC測定

VP滴定熱量計(Microcal社製)を用いたITC測定により、抗体の熱力学的な結合を決定した。このVP滴定熱量計は、断熱式容器に密閉された試料用容器と対照用容器(1.409mL)の対応対と、リガンド溶液を試料用容器に滴下するための回転式攪拌シリンジとからなる。ITC測定は25 および35で行った。試料用容器には抗体を含むリン酸緩衝液を入れ、対照用容器にはリン酸緩衝液のみを入れた。リン酸緩衝液はHyClone社製の67mM  $\text{PO}_4$  (pH7.4)生理食塩水であった。結合の飽和が熱交換シグナルの消失で確認できるまで、0.05~0.1mM NUF4溶液を5 $\mu\text{L}$ または10 $\mu\text{L}$ ずつ、抗体試料溶液に3~4分間隔で滴下した。一部の抗体試料溶液では、抗体の結合が飽和した後でも、滴下したときに一定量の熱が観察された。これは滴定液NUF4の希釈熱が原因であったので、データ解析前に、滴定中に発生した滴定熱から差し引いた。

【0456】

以下の式(1)に従い、Microcal社製の非線形最小二乗ソフトウェアプログラムOrigin 5.0(Microcal社製)を用い、総熱量 $Q_t$ のうちの*i*回目の滴定での熱発生量( $Q(i)$ )を滴定液総濃度 $X_t$ に適合させた。

【0457】

$$Q_t = nC_t \cdot H_b^\circ \cdot V \{ [1 + X_t/nC_t + 1/nK_b C_t] - [(1 + X_t/nC_t + 1/nK_b C_t)^2 - 4X_t/nC_t]^{1/2} \} / 2 \quad (1a)$$

$$Q(i) = Q(i) + dVi/2V \{ Q(i) + Q(i-1) \} - Q(i-1) \quad (1b)$$

ここで、 $C_t$ は試料用容器中の抗体の初期濃度、 $V$ は試料用容器の容量、 $n$ は結合反応の化学量論比であり、 $K_b$ 、 $H_b^\circ$ 、および $n$ の値が求められる。 $K_b$ の決定に最適な試料濃度の範囲は $K_b$ 値に依存しており、以下の関係式によって定義される。

【0458】

$$C_t \cdot K_b \cdot n = 500 \quad (2)$$

したがって、1 $\mu\text{M}$ では測定され得る $K_b$ の最大値は $2.5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 未満である。滴定液の最

10

20

30

40

50

初の滴下が結合等温線に適合しなかった場合、シリンジ開口部と溶液の境界面での気泡の発生を反映している可能性があるので、最終解析ではその値は無視した。

【0459】

#### 結果

ITCの結果を表13に要約する。表9で化学量論比が2を超えていれば、抗体またはNUF4の濃度判定が不正確であったことを示す。35℃ではアミノ酸配列がA13c4およびA17d4(1)である抗体に加えて、同一のNUF4試料が滴定液として使用されたが、少なくとも一方の滴定では化学量論比は正確な値である2になったので、滴定液の濃度は正しく、 $n$ が大きな値となったことは抗体濃度の不適切な測定が原因であると考えられる。但し、結合定数は滴定液の濃度に非常に大きく依存することが示されているので、 $n$ が2~3の範囲であっても、結合定数は正しい。アミノ酸配列がA4B4およびA13c4である抗体の25℃での結合定数は、ITCによる測定上限値(式2)に近く、入手可能なNUF4の量が限られていたので、結合アフィニティーを含めるための基準温度として35℃を用いることにした。表13に結果を要約したように、NUF4への結合アフィニティーはA4B4>A13c4>A17d4(1)>パリビズマブの順である。

10

【表13】

表13. NUF4と抗体との平均結合定数およびエンタルピー

抗体	$K_b$	$\Delta H_b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
A4B4	$269 \pm 74 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 又は $\sim 3.7 \text{ nM}^*$	$92.8 \pm 1.0$
A13c4	$107 \pm 28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 又は $9 \text{ nM}$	$67 \pm 17$
A17d4(1)	$75 \pm 14 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 又は $13 \text{ nM}$	$68 \pm 10$
パリビズマブ	$1.23 \pm 0.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 又は $810 \text{ nM}$	$71 \pm 5$

20

\*35℃での最適な滴定実験のみに基づく値である;4.0nMはITCの $1/K_b$ の範囲の下限である(ITCの範囲は[抗体]<sub>n</sub>  $K_b=500$ に限定される。ここで、 $n$ は化学量論、[抗体]は細胞内の抗体濃度である)。

【0460】

#### 6.8 実施例:非常に高活性な抗RSV抗体

本実施例の情報は、先の実施例で示した幾つかの抗体を詳細にキャラクター化し、これらの幾つかの抗体の作製を説明するものであるが、特定の抗体に関する特定のアクセシに関する予備的または追加的な結果を含めてもよいことを留意されたい。

30

【0461】

本実施例では、抗体の $k_{off}$ を減少させることによるRSV Fタンパク質へのアフィニティーの増加は、Fab断片のRSV中和能の大幅な増加を引き起こした。 $k_{on}$ 増加によってアフィニティーが増加した結果、FabとIgGの両方でウイルス中和能が大きく改善した。更に、IgGまたはF(ab')<sub>2</sub>型のどちらでも、Fタンパク質との二価の結合は、Fabによる一価の結合よりもウイルス中和においてかなり有益である。

【0462】

#### 材料および方法

##### Fタンパク質

40

RSV A2のFタンパク質の細胞外ドメインをバキュロウイルス発現系(Wathen et al. (1989) J Infect. Dis. 159, 255-264)で発現させ、C部位特異的なマウス抗RSV Fタンパク質モノクローナル抗体である1331H(Beeler et al. (1989) J. Virol. 63, 2941-2950)を用いた抗体ベースのアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0463】

##### パリビズマブV領域のファージベクターへのクローニング

記載の方法(Wu et al. (1999) J. Mol. Biol. 294, 151-162; Kunkel et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492)に従い、パリビズマブ(パリビズマブ)のV領域を、ヒトCH1および定常領域を含むファージ発現ベクターM13IX104CSにクローニングした。適切なリバースプライマーおよびビオチン化フォワードプライマーを用いて、プラス

50

ミドからパリビズマブの $V_H$ および 軽鎖可変領域( $V_K$ )を増幅させた。PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって精製し、電気溶出してT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Roche社製)でリン酸化した。 $V_H$ または $V_K$ をコードしているマイナス鎖の一本鎖DNAは、二本鎖のPCR産物を水酸化ナトリウムで解離させて単離し、プラス鎖のビオチン化一本鎖はストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズで回収した。単離した $V_H$ および $V_K$ の一本鎖DNAと、ウリジル化した鋳型M13IX104CSとをアニーリングさせ、アニーリングした産物にT4 DNAポリメラーゼ(Roche社製)、T4 DNAリガーゼ(Roche社製)、および合成用高濃度緩衝液を添加した。合成したDNAをDH10B細胞にエレクトロポレーションし、XL-1 Blueの菌叢で力価を測定した。何個かの独立したプラークを単離してファージDNAを調製し、シーケンスしてクローニングを確認した。パリビズマブFabをコードしている、得られたファージDNAをIX-493と命名した。

【0464】

#### パリビズマブのフレームワーク領域4および軽鎖CDR1領域の修飾

アフニティ成熟の前に、部位特異的突然変異誘発法(Kunkel et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492)によってパリビズマブV領域に幾つかの修飾を行った。3種類のオリゴヌクレオチドを合成してリン酸化し、ウリジル化した鋳型IX-493とアニーリングさせて、LCDR1の $K_{24}C_{25}Q_{26}L_{27}$ を $S_{24}A_{25}S_{26}S_{27}$ に、軽鎖FR4のL104をVに、重鎖FR4のA105をQに変異させた。ここで用いた番号付けについては、Kabat et al. (1991)によるSequences of proteins of immunological interest.(米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版を参照されたい。DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、および合成用緩衝液を添加して変異誘発反応を完了し、DH10BにエレクトロポレーションしてXL-1 Blueの菌叢で力価を測定した。DNAシーケンスにより多数のクローンをスクリーニングし、所望の変異すべてが導入されていたクローンを493L1FRと命名した。このクローンをアフニティ成熟の鋳型として用いた。

【0465】

#### フォーカスCDRライブラリーおよび組合せライブラリーの構築

記載の方法(Wu et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6037-6042; Glaser et al. (1992) J. Immunol. 149, 3903-3913; WuおよびAn (2003) Tailoring kinetics of antibodies using focused combinatorial libraries. In Methods in Molecular Biology, 第207巻: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy: Methods and Protocols (Welschof, M.およびKrauss, J.編), pp. 213-233, Humana Press, Totowa, NJ)に従い、各CDRの位置で1個の変異をコードしている6つCDRライブラリーをM13IX104CSベクターで同時に構築した。CDR領域は、Kabat et al. (1991)がSequences of proteins of immunological interest.(米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版で示すように定義した。元のクローンがライブラリーに混入することを避けるため、ライブラリー構築の前に、部位特異的突然変異誘発法(Kunkel et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492)によって各CDRを欠失させた。変異誘発されたオリゴヌクレオチドは、終止コドンTAAおよびフレームシフトを起こす追加の1塩基(A)を含む配列で各CDR領域を置換するようにデザインされた。対応するCDRライブラリーを構築するため、得られたクローンを鋳型として用いた。記載(Glaser et al. (1992) J. Immunol. 149, 3903-3913)に従って各CDR部位にNNKを導入して単一変異をコードしているオリゴヌクレオチドを合成し、ライブラリー構築のための変異誘発反応で使用した。構築したライブラリーをDH10Bにエレクトロポレーションし、キャラクタリゼーションとスクリーニングのためにXL-1 Blueの菌叢に播いた。Fabの発現をプラークリフトアッセイによって、導入した変異の分布をDNAシーケンスによって検討し、ライブラリーの質を調べた。各ライブラリーで変異が適切に分布していることが確認された。 $k_{off}$ および $k_{on}$ を最適化するため、それぞれ493L1FRおよびD95/G93を鋳型として用いて、別のフォーカスCDRライブラリーを構築した。D95/G93クローンは、 $k_{off}$ 最適化最良変異体の1つであるAFFF(1)のHCDR3とLCDR3の両方の変異誘発に由来した。HCDR3の変異S95DおよびLCDR3の変異F93Gは、AFFF(1)の $k_{on}$ を中等度に増加させた。

【0466】

組合せライブラリーを構築し、各CDRからすべての有益な変異を導入した。 $k_{off}$ を最適化するため、HCDR1、HCDR3、LCDR2およびLCDR3の元の残基および有益な変異をコードしている縮重オリゴヌクレオチドを合成し、アニーリングでの偏りを排除するために関連する4つのCDRを欠失させたCDR欠失493L1FRのウリジル化した鋳型とアニーリングさせた。次に、記載(Wu et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6037-6042; Kunkel et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492)に従って、アニーリングさせた混合液を処理した。組合せライブラリーの質はフォーカスCDRライブラリーと同様に調べた。 $k_{on}$ を最適化するため、同様の変異誘発法を用いて、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、およびLCDR2の有益な変異をクローンD95/G93に導入した。

【0467】

10

#### ライブラリーのスクリーニング

まず、パリビズマブFab変異体を含むライブラリーをキャプチャーリフト法(Watkins et al. (1998) Anal. Biochem. 256, 169-177)によってスクリーニングした。マウス吸収済みヤギ抗ヒト抗体(Southern Biotechnology Associates社製)10  $\mu$ m/mLを固定化したニトロセルロースフィルターをファージ感染菌叢に当て、発現したFab変異体を採取した。22のインキュベーター内で一晩インキュベートした後、はがしたフィルターを4ng/mL(約0.07nM)のFタンパク質溶液内で室温で2時間インキュベートした。このフィルターを0.1% Tween 20/PBS緩衝液で4回洗浄した後、アルカリホスファターゼ複合化マウス抗Fタンパク質モノクローナル抗体1331H(Beeler et al. (1989) J. Viral. 63, 2941-2950)と室温で1時間反応させて発色(developed)させた。フィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼ

20

【0468】

キャプチャーリフトアッセイで同定した陽性クローンをELISA法で更にスクリーニングした(Watkins et al. (1997) Anal. Biochem. 253, 37-45)。このアッセイでは、Fab変異体の相対的なアフィニティーを迅速に評価することが可能であった。 $k_{off}$ を最適化するため、IMMULON-1マイクロタイタープレートに2  $\mu$ m/mLヤギ抗ヒトFab抗体でコーティングし、0.5% BSAを含むPBSでブロックした。Fabを含む大腸菌培養液の上清50  $\mu$ Lをマイクロタイタープレートの各ウェルに37で1時間添加した。このプレートを0.1% Tween 20を含むPBSで3回洗浄した後、40ng/mLのFタンパク質と37で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ複合化抗体1331Hと室温で1時間インキュベート

30

【0469】

$k_{on}$ を最適化するため、抗原酵素プレ複合体を用いたELISAによる異なるスクリーニング法を開発した。手短に説明すると、IMMULON-1Bプレートを1  $\mu$ m/mLヤギ抗ヒト抗体でコーティングし、1% BSAを含むPBSでブロックした。Fabを含む大腸菌培養液の上清200  $\mu$ Lを各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートを0.1% Tween 20を含むPBSで3回洗浄した。0.5nMピオチン化Fタンパク質、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ストレプトアビジン、およびピオチン化西洋わさびペルオキシダーゼをモル比1:4:9で37で30分間混合して抗原酵素プレ複合体を形成させた。抗原酵素プレ複合体50  $\mu$ Lを各ウェルに添加し、室温で10分間インキュベートした。プレートを30秒より短い時間で素早く

40

【0470】

#### ELISA法による結合解析

Fab遺伝子を有するM13ファージを15mLのXL-1 Blueに感染させることにより、パリビズマブFab変異体を発現させた(Watkins et al. (1997) Anal. Biochem. 253, 37-45)。記載(WuおよびAn (2003)、上記)に従ってFab変異体を含むペリプラズム抽出液を調製し、4段階階希釈して、Fタンパク質500ng/mLを含む炭酸コーティング緩衝液でコーティングしたIMMULON-1マイクロタイタープレートに添加した。次に、プレートを洗浄し、0.05% Tween 20を含むPBSで1,000倍希釈したアルカリホスファターゼ複合化ヤギ抗ヒト抗体で抗体の結合を検出した。FabまたはIgGの精製パリビズマブ変異体の幾つかについては、固定化

50

Fタンパク質およびRSV感染細胞でも力価を測定した。精製Fタンパク質との結合については、プレートを100ng/mLのFタンパク質でコーティングした以外は上記と同一の手順を行い、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ヤギ抗ヒト抗体で結合した抗体を検出した。RSV感染細胞を調製するため、 $1 \times 10^3$ 個/ウェルのHEp-2細胞(ヒト喉頭上皮癌)(100  $\mu$ l)にRSV Long株を0.25の感染多重度で3日間感染させた。次いで、細胞を0.1% Tween 20を含むPBSで慎重に1回洗浄した後、80%がアセトンで20%がPBSである冷却した溶液中で、4℃で15分固定化した。固定化溶液を除去し、細胞を室温で20分間乾燥させた。5倍段階希釈された精製抗体を固定化した細胞に添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートして3回洗浄し、結合した抗体を西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ヤギ抗ヒト抗体で検出した。

#### 【0471】

$k_{off}$ 改善変異体のFタンパク質への結合特異性について試験するため、Fab変異体100ng/mLを含む細菌のペリプラズム抽出液と、等容量の4倍段階希釈された(希釈開始濃度は224  $\mu$ m/mL)のパリビズマブIgGとを混合した。この混合液を500ng/mLのFタンパク質でコーティングした96ウェルプレートに添加した。プレートを室温で16時間インキュベートした後、結合していない抗体を洗浄によって除き、Fab重鎖のカルボキシ末端のデカペプチドタグを認識するアルカリホスファターゼ複合化モノクローナル抗体で、結合したFabを検出した。組換えパリビズマブFabはFab変異体と同一の検出用のペプチドタグを持っておりこのアッセイには適さないので、このアッセイではFabの代わりにパリビズマブIgGを用いた。 $k_{on}$ 改善変異体のFタンパク質への結合特異性について試験するため、精製Fab変異体200 ng/mLと、等容量の4倍段階希釈された(希釈開始濃度448  $\mu$ m/mL)のパリビズマブIgGとを混合した。次に、Fタンパク質との結合のためのインキュベーション時間を37℃で4時間に短縮した以外は $k_{off}$ 改善変異体と同様の手順に従い、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化抗hisタグ抗体で結合したFabを検出した。

#### 【0472】

##### Fabの発現および精製

アラビノース調節BADプロモーターの制御を受ける過剰発現ベクターに、多数のFab断片をクローニングした。また、精製を容易にするために、6個のヒスチジンからなるタグをFab重鎖のカルボキシ末端と融合させた。一般的には、細菌の培養液を1Lで培養し、細胞を回収して、20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、500mM NaCl、0.1mM AEBSF(プロテアーゼ阻害剤)、1  $\mu$ M ペプスタチンA、および10  $\mu$ M ロイペプチンを含む緩衝液(pH7.5)10mLに再懸濁した。再懸濁した細胞をソニケーションし、1,000U DNase I(Sigma社製)と4℃で30分間インキュベートした。ニッケルキレート樹脂を用いて細胞抽出物からFabを精製した。FabをMono S FPLCカラムで更に精製した。通常、SDS-PAGEにより判定した純度は95%を超えていた。

#### 【0473】

##### IgGの発現および精製

パリビズマブFab変異体のVH領域をPCRでファージから増幅し、オーバーラッピングPCRにより重鎖シグナル配列を含む他のPCR産物と融合させた。次いで、結合させたPCR産物とパリビズマブ重鎖定常領域(1)とを連結した。これを行うため、PCR産物をHindIIIおよびSacIで消化し、3,544 bpのSacI-BglII断片および2,142 bpのBglII-HindIII断片(両断片はパリビズマブ重鎖発現ベクターpMI226に由来)と3断片ライゲーション法で結合させた。この結果、ヒトサイトメガロウイルス主要前初期エンハンサー/プロモーター、およびSV40初期ポリ阿德ニル化領域による転写調節を受ける各パリビズマブ重鎖変異体の発現ベクターが得られた。

#### 【0474】

同様のストラテジーを用い、ファージから増幅したVL遺伝子と、シグナル配列およびパリビズマブ軽鎖発現ベクター(pMI223)から増幅した定常領域とを、オーバーラッピングPCRを用いて結合することより、パリビズマブ変異体の軽鎖遺伝子を合成した。次に、3断片ライゲーション法を用いて、結合させたPCR産物を同一のパリビズマブ軽鎖発現ベクターにクローニングした。得られたベクターには、ヒトサイトメガロウイルス主要前初期エンハンサー/プロモーター、およびSV40初期ポリ阿德ニル化領域による転写調節を受ける

10

20

30

40

50

各軽鎖遺伝子が含まれる。また、このベクターには、グルタミン非含有培地での生育を可能とする選択マーカーとして使用される、グルタミン合成酵素の遺伝子もフレームワーク領域に含まれる。

#### 【0475】

通常どおりに、重鎖および軽鎖発現ベクターの両方をHEK293細胞またはCOS細胞に一過性にトランスフェクションすると、通常は少量のIgGが産生された。大量に産生させるために、NS0細胞の安定発現株を作製した。このためには、重鎖発現ベクターからの重鎖発現カセットの全領域を含む4.2 kbのBg111-SalI断片を、軽鎖発現カセットの下流にあたる軽鎖発現ベクターのBamHI-SalI部位にクローニングすることにより、単一発現ベクターを構築した。エレクトロポレーションによりNS0細胞にトランスフェクトする前に、このベクターをSal消化によって直鎖状にした。トランスフェクトした細胞は、選択のためにグルタミン非含有培地で培養した。

10

#### 【0476】

両方の一過性トランスフェクションからまたは安定発現させた細胞株から得られた抗体は、プロテインAカラムのクロマトグラフィーにより精製した。

#### 【0477】

#### フローサイトメトリー

IgGのパリビズマブ、A4b4およびAFFF(1)のRSV感染細胞表面上のFタンパク質への結合を、フローサイトメトリーによって検討した。HEp-2細胞にRSV Long株を1.5の感染多重度で感染させた。感染の24時間後に、細胞を剥離、洗浄して、FACS緩衝液(1% BSAを含むDPBS)に再懸濁した。再懸濁した細胞(1試料当たり $2 \times 10^6$ 個)を抗体 $3 \mu\text{g/mL}$ と室温で15~20分間インキュベートした。次に、細胞を回収してFACS緩衝液で洗浄した。細胞表面に結合した抗体をAlexa 647複合化ヤギ抗ヒトIgG (H+L)で検出し、FACSで解析した。

20

#### 【0478】

#### BIAcore解析

パリビズマブ変異体とRSV Fタンパク質との反応速度論的な相互作用をBIAcore 1000、2000、または3000機器(Biacore社製、スウェーデン、ウプサラ)を用いた表面プラズモン共鳴法により判定した。精製した組換えC末端切断Fタンパク質と、(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩)/N-ヒドロキシコハク酸イミドで活性化したCM5センサーチップとを、低いタンパク質密度で共有結合させた(Johnsson et al. (1991) Anal. Biochem. 198, 268-277)。反応しなかった活性エステル基は1Mエタノールアミンでブロックした。対照用として、BIAcore 2000または3000機器を使用した場合は、抗原を全く含まないブランク表面を同一の固定化条件で調製した。Fタンパク質のロットが異なることで生じる結合のばらつきを最小限にするため、ほとんどの抗体を同一ロットのFタンパク質で測定した。異なるロットのFタンパク質が用いられた幾つかの例では、それらのロットが主に使用したロットと同様の結合特性を持つことを確認するために、パリビズマブIgGへの結合を対照として用いた。

30

#### 【0479】

HBS/Tween 20緩衝液(BIAcore社製)で調製した精製抗体の2倍段階希釈(0.2nm~100nm)を、直列に接続したFタンパク質および対照用の細胞表面に注入した。測定毎に100mM HClを短時間パルス注入することにより、残っている抗体をセンサーチップから除去した。BIA評価プログラムを用いて、結合曲線を1:1のラングミュア結合モデルにグローバルフィッティングさせた。このアルゴリズムにより、 $k_{on}$ および $k_{off}$ が算出される。見かけ上の解離平衡定数 $K_d$ は2つの速度定数の比 $k_{off}/k_{on}$ として導き出される。

40

#### 【0480】

#### RSV微量中和アッセイ

記載(Johnson et al. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215-1224)に従い、RSV微量中和アッセイを用いて、精製パリビズマブ変異体の生体外でのRSV(Long株)複製阻害活性を解析した。抗体の希釈は96ウェルプレートで2重~4重で行った。

#### 【0481】

50

希釈抗体が入った各ウェルに約100～1,000 TCID<sub>50</sub>のRSVを添加し、37℃で2時間インキュベートした。次に、継代数が少ないRSV感受性HEp-2細胞(2.5×10<sup>4</sup>個)を各ウェルに加え、加湿した5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で4～5日間培養した。インキュベート後に細胞を0.1% Tween 20/PBSで洗浄した後、80%がアセトンで20%がPBSである溶液で細胞をプレートに固定した。Fタンパク質特異的なELISAでの発現Fタンパク質の定量により、RSV複製を判定した。固定化した細胞をマウス抗RSV Fタンパク質抗体1331Hとインキュベートし、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ヤギ抗マウスIgGとインキュベートした。基質であるTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を各ウェルに添加し、450nmでプレートの吸光度を測定した。中和価(IC<sub>50</sub>)は、中和能がない試料よりもOD<sub>450</sub>値(バックグラウンドを差し引いた値)を50%減少させる抗体濃度で表す。IC<sub>50</sub>値は、Sigma Plotプログラムを用いて、シグモイド型用量-反応曲線の4パラメーター曲線に適合させて導き出した。

10

【0482】

## 結果

### パリビズマブのヒト化、および軽鎖CDR1の回復

パリビズマブのアフィニティー成熟の前に、この抗体に2、3個の修飾を行った。軽鎖CDR1(LCDR1)の24～27番目のアミノ酸KCQLを、元のマウスモノクローナル抗体の1129番目の配列SASSに変更した。KCQLという配列は、前のヒト化プロセス中の合成エラーによって導入された4つのランダムな残基で、ヒトとマウスのどちらの配列でもない(Johnson et al. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215-1224)。また、免疫原性を有する可能性を減少させるため、第4フレームワーク(FR4)領域のマウスの残基をヒトの残基で置換した。重鎖FR4では、ヒトJH6生殖細胞系列の配列と完全に一致させるため、アミノ酸置換A105Qが行われた。軽鎖FR4では、ヒトJK4生殖細胞系列の配列と完全に一致させるため、アミノ酸置換L104Vが行われた。得られたクローン493L1FRはヒトのフレームワーク領域の配列(図6)を完全に含んでおり、バクテリオファージ発現ベクターにより発現させた。BIAcoreバイオセンサーを用いた表面プラズモン共鳴法によるFab493L1FRとパリビズマブFabとの結合解析から、これらの両分子は同様の反応速度でRSV Fタンパク質と結合することが示された(表14)。構造モデルに基づく以前の予測(Johnson et al. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215-1224)に反し、この結果からは、マウスの重鎖FR4の残基A105と軽鎖FR4の残基L104はどちらもFタンパク質の結合に有意には関与しないことが示された。同様に、LCDR1の最初の4残基をSASSに変化させても結合にはほとんど影響しない。

20

30

【表14】

表14. k<sub>off</sub>-改善抗体の動力学およびウイルス中和

	配列				Fab			Fab	IgG
クローン	H1	H3	L2	L3	K <sub>on</sub> (x 10 <sup>5</sup> ) M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	K <sub>off</sub> (x10 <sup>4</sup> ) s <sup>-1</sup>	K <sub>d</sub> nM	微量中和(IC <sub>50</sub> ) μg/mL(nM) <sup>e</sup>	
Kabat位置	32	100	52	93					
パリビズマブ	S	W	S	G	1.26	6.62	5.25	27.46 (549.2)	0.453 (3.02)
パリビズマブ <sup>a</sup>	S	W	S	G	1.19	7.22	6.07		

40



493LFRLESLIS/350C53L					1.85	6.51	3.52	26.30 (526.0)	n.d.
パリビズマブ <sup>a</sup>	S	W	S	G	1.19	7.22	6.07	26.30 (526.0)	n.d.
単一変異									
S32A	A	-	-	-	1.96	0.93	0.47	4.85 (97.0)	0.465 (3.10)
S32P <sup>b</sup>	P	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
W100F	-	F	-	-	1.65	0.84	0.51	2.60 (52.0)	0.876 (5.84)
S52F	-	-	F	-	2.06	1.75	0.85	7.27 (1454)	n.d.
S52Y	-	-	Y	-	1.70	1.25	0.74	5.99 (119.8)	n.d.
G93F	-	-	-	F	1.63	1.74	1.07	8.84 (176.8)	n.d.
G93Y	-	-	-	Y	1.62	1.53	0.94	6.26 (125.2)	n.d.
G93W	-	-	-	W	1.50	1.40	0.93	6.57 (131.4)	n.d.
組合せ変異									
AHH(1) <sup>c</sup>	A	F	F	F	1.34	$\leq 0.05^d$	$\leq 0.037$	0.0715 (1.43)	0.306 (2.04)
AFFY <sup>c</sup>	A	F	F	Y	1.22	$\leq 0.05^d$	$\leq 0.041$	0.0754 (1.51)	0.407 (2.71)
PFFF	P	F	F	F	1.10	$\leq 0.05^d$	$\leq 0.045$	n.d.	n.d.
AFSF <sup>c</sup>	A	F	-	F	1.13	$\leq 0.05^d$	$\leq 0.044$	0.0908 (1.82)	0.521 (3.47)
AFFG <sup>c</sup>	A	F	F	-	1.33	$\leq 0.05^d$	$\leq 0.038$	0.249 (4.98)	0.453 (3.02)
PFFY <sup>b</sup>	P	F	F	Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PFFW <sup>b</sup>	P	F	F	W	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PFYF <sup>b</sup>	P	F	Y	F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d., 判定せず;H1, HCDR1;H3, HCDR3;L2, LCDR2;L3, LCDR3.

<sup>a</sup>このパリビズマブFabはパリビズマブIgGをパパインによって切断して調製した。本文献で使用した他のパリビズマブFabは組換えファージの発現により作製した。

<sup>b</sup>ELISAによる力価測定で他の単一変異と比較すると、S32Pは中程度に有益な変異であった。したがって、表面プラズモン共鳴法によるさらなるキャラクタリゼーションは行わなかった。組合せ変異体についても同様に、ELISAによる力価測定で判定された5つの最適な変異体のみを表面プラズモン共鳴法によって更にキャラクタリゼーションしたが、PFFY、PFFW、およびPFYFについては行わなかった。

<sup>c</sup>これらのIgG組合せ変異体の動力学も表面プラズモン共鳴法によりキャラクタリゼーションした。それらのFabで観察されたのと同様に、BIAcore 3000バイオセンサーの測定限界値( $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )を超えてしまい正確に測定できなかったため、すべての $k_{\text{off}}$ 値が $5 \times 10^{-6}$ 以下である。これらの変異体の $k_{\text{on}}$ 値は以下の通りである: AFFF(1),  $1.27 \times 10^5$ ; AFFY,  $1.44 \times 10^5$ ; AFSF,  $1.47 \times 10^5$ ; AFFG,  $1.47 \times 10^5$ 。

<sup>d</sup>これらの組合せクロンの $k_{\text{off}}$ 値はBIAcore 3000バイオセンサーの測定限界値( $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )を超えてしまい正確に測定できなかった。

<sup>e</sup>比較のため、 $\text{IC}_{50}$ 値をnMの単位に換算し、括弧内に示す。

$k_{off}$ 起因アフィニティー成熟

確立された定方向進化法(Wu et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6037-6042)を用いて493L1FRのRSV Fタンパク質へのアフィニティーを改善した。Fab493L1FRを6つのCDR領域それぞれの各残基で集中的に変異させた。変異誘発の程度に基づいたプールへの多様性分離を可能とするコドンドーピング法からなるコドン基準変異誘発法の変法を用いて、各CDRについて個別のライブラリーを作製した(Glaser et al. (1992) J. Immunol. 149, 3903-3913; WuおよびAn (2003)、上記)。各CDRライブラリーは、各CDR残基で生じる可能性があるすべての単一変異を含むように構築した。140~320変異体が含まれるこれらのフォーカスライブラリーでは、各CDR位置で生じる可能性があるすべてのアミノ酸でのアフィニティー改善の可能性を探索することが容易であった。

10

## 【0484】

493L1FRのFab変異体を発現しているM13のブランクをFタンパク質へのアフィニティー増加を指標にスクリーニングした。一次スクリーニングはフィルターベースのキャプチャーリフト法(Watkins et al. (1998) Anal. Biochem. 256, 169-177)、二次スクリーニングは半定量的ELISA法(Watkins et al. (1997) Anal. Biochem. 253, 37-45)により行った。同定したクローンでのアフィニティーの改善は、固定化Fタンパク質でELISAによる力価測定を行って確認した。アフィニティーが増加したクローンのDNAシーケンスから、4つのCDR位置で8つの明確に有益な変異が明らかになった。つまり、重鎖CDR1(HCDR1)のS32AおよびS32P、重鎖CDR3(HCDR3)のW100F、軽鎖CDR2(LCDR2)のS52FおよびS52Y、ならびに軽鎖CDR3(LCDR3)のG93F、G93Y、およびG93W(図7A)である。 $k_{off}$ または $k_{on}$ にとって重要なCDR残基の三次元配置の視覚化に役立て、それらの残基の相対的な位置の比較を支援するため、パリビズマブFabの結晶構造(データ示さず)に基づく分子モデル(Guex et al. (1997) Electrophoresis, 18, 2714-2723)でこれらの有益な位置を示した。これらの変異体のうち7つをBIAcoreバイオセンサーにより解析したところ、Fab493L1FRよりもアフィニティーが3~7倍改善されていることが示された(表14)。アフィニティーは主に、 $k_{off}$ の低下によって改善されていた。 $K_d$ は、最適な単一変異S32Aでは0.47nM、パリビズマブFabでは5.25nMであった。

20

## 【0485】

この特別な実験中に、重鎖CDR2(HCDR2)またはLCDR1では、有益である重要な変異は全く同定されなかった。しかし、さらなるキャラクタリゼーションを行うクローンとしてアフィニティーが大幅に増加しているクローンのみを同定して選択するようにスクリーニングの閾値を十分に高く設定したので、HCDR2およびLCDR1が結合で役割を果たしている可能性があることを否定することはできない。実際に、LCDR1では追加的な2つの有益な変異、A25LおよびS27Vが更に同定された(データ示さず)。後に、変異A25Lは $k_{on}$ 主体スクリーニング法でも同定された(表15)。

30

【表 15】

表15. 有益な $k_{on}$ 変異の要約

CDRs	H1	H2					H3			L1			L2				L3
Kabat番号	32	55	57	58	65	95	98	100	24	25	29	52	53	54	55	93	
パリビズマブ	S	D	K	D	S	S	T	W	K	C	S	S	K	L	A	G	
493L1FR	S	D	K	D	S	S	T	W	S	A	S	S	K	L	A	G	
AFFF(1) <sup>a</sup>	A	D	K	D	S	S	T	F	S	A	S	F	K	L	A	F	
D95/G93	A	D	K	D	S	D	T	F	S	A	S	F	K	L	A	G	
単一変異	P	G	G	H S	D	D	F	W	L	L P	R F	Y R M	G R Y F	H Q	S K R H P T D	G	
組合せ変異 <sup>b</sup>																	
Ale9	A	G	K	H	D	D	F	W	S	L	R	F	K	L	S	G	
Alh5	A	G	K	H	D	D	F	W	S	L	S	F	F	H	R	G	
A3e2	A	G	G	H	D	D	F	W	S	A	S	F	Y	L	H	G	
A4b4	A	D	K	H	D	D	F	F	S	A	R	F	F	L	D	G	
A8c7	A	D	K	S	D	D	F	W	S	P	R	R	Y	Q	S	G	
A12a6	A	G	K	D	D	D	F	F	S	A	R	F	K	L	S	G	
A13a11	A	D	K	H	D	D	F	W	S	P	R	Y	R	H	S	G	
A13c4	A	G	K	S	D	D	F	F	S	L	R	M	Y	Q	S	G	
A14a4	A	D	K	S	D	D	T	W	L	L	R	Y	Y	Q	T	G	
A16b4	A	D	K	H	D	D	F	W	L	L	R	M	Y	Q	A	G	
A17b5	A	D	K	H	D	D	F	W	S	L	R	Y	Y	L	P	G	
A17d4(1)	A	G	K	S	D	D	F	F	L	P	R	M	Y	Q	S	G	
A17f5	A	D	K	D	D	D	F	W	S	L	R	F	R	H	T	G	
A17h4	A	G	K	H	D	D	F	W	S	P	S	Y	Y	L	A	G	
P11d4	P	G	K	H	D	D	F	W	S	P	R	M	R	L	A	G	
P12f2	P	D	K	H	D	D	F	F	S	L	R	F	Y	L	S	G	
P12f4	P	G	K	H	D	D	F	F	S	L	R	R	G	L	P	G	

<sup>a</sup>クローンAFFF(1)は、パリビズマブの $k_{off}$ 起因アフィニティー成熟で得られた、アフィニティーおよびウイルス中和能に関して最適な組合せ変異体である。AFFF(1)を $k_{on}$ 変異誘発の最初の鋳型として使用した。

<sup>b</sup>これよりもかなり多くの組合せ変異体が同定された。この表には、 $k_{on}$ の改善に基づき、上位17位までの変異体のみを示す。

## 【0486】

縮重オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的突然変異誘発法により、8つの有益な変異を組み合わせた組合せライブラリーを構築した。軽鎖および重鎖CH1の末端に融合させたデカペプチドタグの発現を検出したブランクリフトアッセイから、組合せライブラリーのクローンの約27%がFabを発現していることが示された。25個のランダムな機能性クローンのDNAをシーケンスしたところ、LCDR2中のS52Y、HCDR1中のS32A、およびHCDR3中のW100Fの発現が不十分である可能性がある以外は、変異の大多数は予想通りに分布していることが示された。2,400個以上のクローンをキャプチャーリフト法でスクリーニングした後でELISAによってスクリーニングすると、最適な単一変異変異体であるクローンS32Aより

もアフィニティーが高い48変異体が同定された。抗原の力価測定およびDNAシーケンスによるさらなるキャラクタリゼーションから、20種類の特有な組合せ変異体が明らかになった。抗原の力価測定から、組合せ変異体はS32Aよりもアフィニティーが有意に増加していることが示された(図8A)。各変異体には2~4つの有益な変異が含まれ、アフィニティーと有益な変異の数との間には弱い相関関係がみられた(データ示さず)。最適なクローンには、HCDR3に変異W100Fが含まれるが、それ以外には明らかなパターンは観察されなかった。この組合せライブラリーでは最適な単一変異S32Aのクローンが少なかったため、この変異と4つの最適なクローン(PFFF、AFSF、AFFG、PFFY)に由来する組合せ情報を組み合わせることとした(表14)。したがって、クローンAFFF(1)(図6)およびAFFYを部位特異的突然変異誘発法によって構築した。両クローンは、4つの最適なクローンと比べて非常にアフィニティーが高かった。これは、スクリーニング中に多くの重複クローンが同定されたが、少ないクローンを単離できるほど徹底的に組合せライブラリーがスクリーニングされなかったことを示す。8つの最適な変異体を表14に要約する。5つの最適な変異体のBIAcore解析から、それらのアフィニティーはパリビズマブFabのアフィニティーよりも117倍以上高く、アフィニティーの増加は $k_{off}$ の改善が原因であることが示された(表14)。 $K_d$ は、FabのクローンAFFF(1)では0.037nM以下、パリビズマブFabでは5.25nMであった。これらの組合せパリビズマブFab変異体はセンサーチップ上の固定化Fタンパク質と非常に強く結合するので、正確な解離速度を決定することができなかったことが理解されよう(BIAcore 3000の $k_{off}$ 検出限界は $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ である。 )。

#### 【0487】

ペリプラズム抽出液中の $k_{off}$ 改善クローンS32A、AFFF(1)、AFFY、PFFF、AFSF、AFFG、およびPFFYへのこれらの変異体の結合特異性を確認するため、パリビズマブIgGと競合させてFタンパク質との結合をELISAで試験した。試験したすべての変異体がパリビズマブと競合し、変異体の競合作用はそれらのアフィニティーと相関していた。一般的な阻害曲線を図8Bに示す。

#### 【0488】

#### $k_{off}$ 改善パリビズマブ変異体の機能のキャラクタリゼーション

生物学的機能の改善を指標としたパリビズマブ変異体の一次スクリーニングアッセイとして、RSV微量中和アッセイを用いた(Johnson et al. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215-1224; Anderson (1985) J Clin. Microbiol. 22, 1050-1052)。このアッセイはRSV IVIgのドナーのスクリーニングに使用されて良好な結果を出しており、偽陽性をほとんど生じたことがない(Sibe et al. (1992) J. Infect. Dis. 165, 456-463)。 $k_{off}$ 改善精製パリビズマブ組合せFab変異体を微量中和アッセイで解析すると、組換えパリビズマブFabよりも活性が110~384倍高いことが示された(表14および図9A)。単一変異および組合せFab変異体の両方で、アフィニティーと生体外でのRSV中和能との間に非常に良好な相関が観察された(表14および図10A)。

#### 【0489】

Fタンパク質へのアフィニティーおよびウイルス中和能に基づき、2つの最適な単一変異Fab変異体(S32A、W100F)、および4つの最適な組合せFab変異体(AFFF(1)、AFFY、AFSF、AFFG)を完全長のIgG1抗体に変換し、NS0細胞で発現させた。微量中和アッセイで精製した完全長抗体を試験したところ、驚いたことに、完全長のパリビズマブと比べ、生体外での活性はほとんど、または全く増加していなかった(表14および図9B)。表14に示した組合せ変異体の微量中和アッセイのデータは、2回以上の独立した実験の平均値であることに留意されたい。図9Aおよび図9Bに示すデータは典型的な中和曲線からのデータである。

#### 【0490】

#### 新規ELISAスクリーニング法による $k_{on}$ の最適化

$k_{off}$ 組合せ変異体の多くはFabのRSV中和能が強く、FabからIgGに変換しても活性はそれ以上増加しなかった。したがって、次に $k_{on}$ 最適化の可能性について検討した。理論的には、 $k_{on}$ がより速い抗体にはウイルスが細胞に感染する機会を得る前にウイルスに結合して中和する、より有利な機会があるはずである、と推測した。

## 【0491】

約10個のCDR変異ライブラリーのスクリーニングで使用された反復変異誘発法を用いて $k_{on}$ を段階的に改善した。1回目の $k_{on}$ 変異誘発ではクローンAFFF(1)(図6)を鋳型として用いた。この組合せFabは $k_{off}$ の改善が最適なクローンの1つであり、 $k_{off}$ 起因アフィニティー成熟に由来するウイルス中和能が最も高いクローンであった。HCDR3またはLCDR3の単一変異、HCDR3またはLCDR3の二塩基変異、HCDR3とLCDR3で各1個ずつ変異した二塩基変異からなるライブラリーを調製し、スクリーニングを行った。 $k_{on}$ が増加した変異体を同定するため、新規ELISAスクリーニング法を開発した。原則としては、 $k_{on}$ がより高い変異体の選択を行い易くするため、抗体と抗原との間の相互作用時間をできるだけ短縮させたかった。また、抗体抗原複合体の解離の影響を減少させるため、抗体抗原複合体が形成された後の洗浄回数および洗浄時間は最小限とした。BIAcore反応速度シミュレーションプログラムを用いて、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、会合時間、および解離時間などの幾つかの反応速度パラメーターおよび相互作用パラメーターをモデル化した(WuおよびAn (2003)、上記)。次に、ELISAでの適切な会合条件および解離条件を判定したので、 $k_{off}$ が低い変異体よりも $k_{on}$ が高い変異体をアウトプットシグナルで容易に選択することが可能となった。抗体と抗原との相互作用については、インキュベーション時間を10分間とし、30秒未満で素早く3回洗浄してスクリーニングした。また、従来の第2ステップ(二次検出抗体の添加)は省略した。その代わりに、ビオチン化Fタンパク質と西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ストレプトアビジンをあらかじめプレ複合体にしておき、最初のステップでこれを使用した。ELISAのシグナルを増強するため、ビオチン化HRPもプレ複合体に添加した。

10

20

## 【0492】

4つの重鎖変異体S95D、S95F、S95L、およびS95N/M96SはHCDR3ライブラリーから、3つの軽鎖変異体F93A、F93G、およびF93WはLCDR3ライブラリーから同定した。BIAcore解析から推定されるように、これらの変異のほとんどで結合速度がわずかに(80%未満)改善していた。変異F93Gが野生型残基に復帰していたことは興味深い。 $k_{off}$ の改善で選択したクローンAFFF(1)では、この残基は変異してFになっていた。493L1FR関連では、 $k_{off}$ は改善しているが $k_{on}$ には有益ではない、軽鎖の93番目のWへの変異も以前に同定されていた。次に、これらの有益な $k_{on}$ 変異からなる組合せライブラリーを構築し、スクリーニングした。最適な組合せクローンのうち2つは、S95DとF93GまたはF93Wとを組み合わせたクローンであった。

30

## 【0493】

D95/G93(または「DG」と表記される変異S95DおよびF93Gを含む変異体を2回目の $k_{on}$ 変異誘発での鋳型として用いた。D95/G93を基にした6つの単一変異CDRライブラリーを構築し、Fタンパク質の結合を指標にスクリーニングした。Fabの $k_{on}$ の改善に由来するFタンパク質とのアフィニティーを増加させる単一変異を同定した。これらの変異、ならびに以前に同定された変異S95DおよびF93Gを、図7Bおよび表15に記す。相対的に $k_{on}$ の増加が小さかったので、これらの単一変異の反応速度定数を詳細にはキャラクタリゼーションしなかった。493L1FR関連で最初のアフィニティー成熟の試みにおいて以前に同定されたHCDR1の32番目のプロリンへの変異が $k_{on}$ を改善する能力によって同定された(図7)。同様に、LCDR2の52番目のチロシンへの変異も以前に同定されていた。要約すると、32番目(HCDR1)、10番目(HCDR3)、52番目(LCDR2)、および93番目(LCDR3)を含む、 $k_{off}$ を改善する4つの位置すべてが、変異によって $k_{on}$ も改善することができた。三次元構造モデル(データ示さず)からは、 $k_{on}$ 変異はCDR全領域をカバーする広い範囲に位置していることが示されている。一方、 $k_{off}$ 変異は4つの位置のみに限定している。

40

## 【0494】

これら $k_{on}$ 変異の組合せライブラリーを構築し、スクリーニングした。Fab変異体が同定されたが(表15)、ほとんどではパリビズマブFabと比較して $k_{on}$ が4~5倍改善していた(表16)。これらの $k_{on}$ 変異体の結合特異性を確認するため、パリビズマブIgG存在下でのFタンパク質との結合について、幾つかの精製組合せFab変異体をELISAで試験した。また、固定化Fタンパク質との結合についても、精製組合せFab変異体の力価を測定した。試験した変

50

異体はすべてパリビズマブと競合した。ELISAによる典型的な力価測定曲線を図8C、阻害曲線を図8Dに示す。

【表 16】

表16.  $k_{on}$ -改善抗体の動力学およびウイルス中和

	Fab			IgG			Fab	IgG
クローン <sup>a</sup>	$k_{on}(x10^5)$	$k_{off}(x10^{-4})$	$K_d$	$k_{on}(x10^5)$	$k_{off}(x10^{-4})$	$K_d$ nM	微量中和 $\mu\text{g/ml}(\text{nM})^c$	
IC <sub>50</sub>	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	nM	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$			
パリビズマブ	1.26	6.62	5.25	1.27	4.300	3.386	27.46 (549.2)	0.453 (3.02)
AFFF(1) <sup>b</sup>	1.34	$\leq 0.05$	$\leq 0.037$	1.27	$\leq 0.05$	$\leq 0.039$	0.0715 (1.43)	0.306 (2.04)
D95/G93 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.126 (2.52)	n.d.
Ale9	5.23	1.13	0.216	4.33	1.430	0.330	0.157 (3.14)	0.0625 (0.42)
Alh5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.194 (3.88)	n.d.
A3e2	5.99	0.94	0.157	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A4b4	6.04	0.52	0.086	5.53	0.151	0.027	0.414 (0.83)	0.104 (0.069)
A8c7	6.47	3.00	0.464	4.17	0.875	0.210	0.177 (3.54)	0.0337 (0.22)
A12a6	5.19	2.19	0.422	4.60	0.165	0.036	0.0287 (0.57)	0.0357 (0.24)
A13a11	6.80	2.29	0.337	n.d.	n.d.	n.d.	0.0120 (2.40)	n.d.
A13c4	6.50	1.12	0.172	3.00	0.396	0.132	0.0264 (0.53)	0.0376 (0.25)
A14a4	3.32	2.40	0.723	n.d.	n.d.	n.d.	$>0.4^d$ ( $>8.0$ )	n.d.
A16b4	4.90	1.05	0.214	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A17b5	5.90	0.73	0.124	n.d.	n.d.	n.d.	0.406 (0.92)	n.d.
A17d4(1)	5.31	0.59	0.111	4.56	0.407	0.089	0.0179 (0.36)	0.0342 (0.23)
A17f5	5.44	0.84	0.154	n.d.	n.d.	n.d.	0.106 (2.12)	n.d.
A17h4	5.19	1.05	0.202	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P11d4	5.70	3.89	0.682	4.66	2.890	0.620	0.292 (5.84)	0.0217 (0.14)
P12f2	5.35	0.72	0.135	4.07	1.280	0.314	0.0407 (0.81)	0.0231 (0.15)
P12f4	n.d.	n.d.	n.d.	4.95	0.555	0.112	0.0464 (0.93)	0.242 (0.16)

10

20

30

40

<sup>a</sup>幾つかの抗体については、幾つかの条件の表面プラズモン共鳴法により解析した。これらの抗体の $k_{on}$ の平均値と標準偏差、および独立した測定回数(n)を以下に示す：パリビズマブIgG、 $1.27 \pm 0.33 \times 10^5$  (n=6);AFFF(1) IgG、 $1.27 \pm 0.31 \times 10^5$  (n=4);A4b4 IgG、 $5.53 \pm 1.63 \times 10^5$  (n=3);A3e2 Fab、 $5.99 \pm 0.20 \times 10^5$  (n=2);A4b4 Fab、 $6.04 \pm 2.67 \times 10^5$  (n=2);A13c4 Fab、 $6.50 \pm 1.43 \times 10^5$  (n=5);A16b4 Fab、 $4.90 \pm 0.00 \times 10^5$  (n=2);A17b5 Fab、 $5.90 \pm 0.35 \times 10^5$  (n=2);A17d4(1)、 $5.31 \pm 0.17 \times 10^5$  (n=2);A17f5 Fab、 $5.44 \pm 0.38 \times 10^5$  (n=2)。

<sup>b</sup>比較のため、 $k_{off}$ 組合せクローンAFFF(1)を含めている。

<sup>c</sup>相対的に $k_{on}$ の増加が小さかったので、D95/G93の反応動力学定数は詳細にはキャラクタリゼーションしなかった。

<sup>d</sup>Fab A14a4は、RSV微量中和アッセイでは最高0.4 $\mu$ g/mLの濃度で試験したが、ウイルス複製阻害は観察されなかった。このFab変異体がこれらの組合せクローンの中で最適なクローンではないことは明らかであったので、これよりも高濃度では試験しなかった。

<sup>e</sup>比較のため、 $IC_{50}$ 値をnMの単位に換算し、括弧内に示す。

#### 【0495】

AFFF(1)で $k_{on}$ を改善させると $k_{off}$ の改善が有意に減少した。FabAFFF(1)の $k_{off}$ はパリビズマブFabの $k_{off}$ よりも2log改善しているが、これらの $k_{on}$ 組合せFabの $k_{off}$ は2~13倍しか改善していない。これらの組合せクローンでは、AFFF(1)の有益な $k_{off}$ 変異の一部が $k_{on}$ 変異で置換されていたので、この結果は驚きではなかった。例えば、クローンP11d4はこのグループの中では $k_{off}$ が最悪である(表16)。クローンP11d4では、HCDR1の32番目のA、HCDR3の100番目のF、LCDR2の52番目のF、およびLCDR3の93番目のFなど、その $k_{off}$ 変異がすべて置換されていた(表15)。

#### 【0496】

幾つかの組合せクローンを完全長のIgG1/抗体に変換し、さらなるキャラクタリゼーションを行った。改善はわずかに減少したが、変換した完全長抗体でも $k_{on}$ の改善は維持されていた。これはBIAcore測定でのばらつきが原因の可能性があるが、IgGへの変換も原因であるかもしれない。全部ではないが一部の変換した抗体では、IgGへの変換がアビディティ増加を介して $k_{off}$ を確実に3~13倍改善させる。A4b4、A8c7、A12a6、およびA13c4では著しい改善がみられた。一方、パリビズマブ、ならびにA1e9、A17d4(1)、P11d4、およびP12f2などの一部の変異体では、IgGへの変換により $k_{off}$ はわずかに改善したに過ぎなかった(表16)。Fタンパク質を細胞表面に発現しているRSV感染細胞との結合について、FabおよびIgGのパリビズマブ、A4b4、およびAFFF(1)を更にキャラクタリゼーションした(図11Cおよび図11D)。ELISAによる力価測定から、A4b4とAFFF(1)は両方とも、アセトン固定したRSV Long株感染HEp-2細胞とパリビズマブよりもかなり強く結合することが示された。この結合能の増加は、固定化Fタンパク質へのそれらの結合についてBIAcore解析で観察された増加と同様であった(表14および16)。同一の抗体をアフィニティークラムで精製した組換えFタンパク質でも力価を測定した(図11AおよびB)。精製Fタンパク質または細胞で発現させたFタンパク質のどちらでアッセイしても、これらの抗体の結合プロファイルは(Fab、IgGのどちらであるかにかかわらず)非常に類似していた。また、フローサイトメトリによる予備試験を行い、IgGのパリビズマブ、A4b4、およびAFFF(1)のRSV感染HEp-2細胞への結合を3 $\mu$ g/mLで測定した。平均チャンネル蛍光法で測定した抗体の感染細胞への結合能は、ELISAによる力価測定の結果とよく相関していた(図12)。

#### 【0497】

##### $k_{on}$ 改善パリビズマブ変異体の機能のキャラクタリゼーション

$k_{on}$ の改善で選択した組合せFab変異体のほとんどは、親クローンであるパリビズマブFabよりも $k_{on}$ が4~5倍、 $k_{off}$ が2~13倍改善している。また、 $k_{on}$ の最適化により、親クローンと比べてウイルス中和能が大きく改善した。一般的に、 $k_{on}$ 改善Fab変異体では、 $k_{off}$ 改善変異体よりも中和能が大幅に改善している(表14および16)。 $k_{off}$ 最適化最良FabであるAFFF(1)では中和能が384倍改善しているが、キャラクタリゼーションされた、 $k_{on}$ 改善14のFab変異体のうち7つでは、中和能がAFFF(1)よりも改善している。Fab変異体A17d4(1)では

パリビズマブFabよりも $IC_{50}$ が1,534倍改善している。変異体A12a6およびA13c4では約1,000倍、変異体A4b4、A17b5、P12f2、およびP12f4では約600~700倍改善している(表16および図9C)。これらの7つの最適なFab変異体のうち6つが、有益な $k_{off}$ 変異であるHCDR3の100番目のフェニルアラニンを維持している(表15)。Fabの $k_{on}$ 改善変異体では、 $k_{off}$ がそれらの $IC_{50}$ の差に寄与していると考えられる。例えば、 $k_{on}$ が他のクローンと同様であるクローンP11d4は、 $k_{off}$ 値が最も速く、 $IC_{50}$ が最も悪い。これらの変異体の中では、クローンA17d4(1)は $k_{off}$ 値がほぼ最も遅く、 $IC_{50}$ が最も良い(表16)。これらの $k_{on}$ 改善クローンを完全長抗体に変換しても、パリビズマブIgGよりもはるかに高いウイルス中和能を示した(表16および図9D)。この結果は、IgGへの変換後に機能的な改善が大幅に消失した、 $k_{off}$ 組合せ変異体を用いて得られた結果とは非常に対照的である(表14および図9B)。生体外でのウイルス中和能に関して全体の中で最適な完全長抗体はA4b4である(表16および図6)。完全長のA4b4抗体は、BIAcore解析で推定したRSV Fタンパク質に対するアフィニティーは27pMであり、パリビズマブのアフィニティーよりも125倍改善している。IgGA4b4も微量中和アッセイでパリビズマブよりも44倍高い活性を示す。これらの $K_d$ および $IC_{50}$ の値は2回以上の独立した実験の平均値である。表16のデータを詳細に解析すると、変異体の1つであるP11d4では、FabからIgGへの変換により $k_{off}$ は有意には改善しないことが明らかになった。したがって、P11d4の $k_{off}$ および $k_{on}$ はIgGとそのFab断片で同様であるが、 $IC_{50}$ はIgGではFab断片よりも42倍改善されている(Fab5.84nMに対し、IgG0.14nM)。アビディティー増加を伴わないIgGへの変換による $IC_{50}$ の大きな改善は、パリビズマブFabのIgGへの変換で観察される改善と同様である。一方、クローンA12a6の $k_{off}$ はIgGへの変換により13倍改善したが、おそらくアビディティーに対する効果によるものと思われる。但し、このアビディティーの改善の結果、ウイルス中和能は大幅には改善しなかった( $IC_{50}$ はFab0.57nM、IgG0.24nM)。一般的にFabの $IC_{50}$ が既に大きく改善している変異体ではIgGへの変換による $IC_{50}$ 値の改善が小さい傾向があることも観察された。このような例として、変異体A12a6、A13c4、およびA17d4(1)がある(表16)。これらのFabの $IC_{50}$ 値は0.36~0.57nMであり、パリビズマブFabの値よりも約1,000~1,500倍改善されている。IgGへの変換後の $IC_{50}$ は0.23~0.25nMであり、Fabよりも2倍改善しただけである。一方、A8c7およびP11d4などの変異体では $IC_{50}$ 値はそれぞれ3.54nMおよび5.84nMであり、パリビズマブFabでの値よりも約94~155倍改善する(表16)。IgGに変換されると、これらの変異体の $IC_{50}$ 値は0.22nMおよび0.14nMであり、Fabよりも16~42倍改善する。 $k_{off}$ 改善変異体でも同様の観察が得られた(表14)。

【0498】

#### 考察

ファージ発現に基づく非常に効率的な定方向進化法(Wu et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6037-6042)を用いて、パリビズマブを完全にヒト化し、LCDR1の非野生型残基を元のマウスでの残基に復帰させ、構造情報への要求なしに $k_{off}$ が大きく改善した多くの変異体を同定した。HCDR3 (W100F)、LCDR2 (S52F、S52Y)、およびLCDR3 (G93F、G93Y、およびG93W)に位置する有益な $k_{off}$ 変異すべてが1つの共通な特徴、即ち、芳香族側鎖を共有している(図7A)。おそらくこれらの変異はRSV Fタンパク質との芳香環スタッキングを担っているのであろう。しかし、抗体耐性RSV変異体から260~275番目の位置であると推定されるFタンパク質のパリビズマブ結合部位(Crowe et al. (1998) Virology, 262, 373-375; Zhao et al. (2004) Virology, 318, 608-612)について調べると、そのような相互作用を起こし易い芳香族側鎖は存在しないことが明らかである。これらの芳香族アミノ酸は結合部位に隣接した残基と相互作用する可能性はあるが、共結晶構造の情報が存在しないので、この解釈は推論に留まる。

【0499】

有益な $k_{on}$ 変異を3~4つ含む組合せFab変異体のアフィニティーはパリビズマブFabのアフィニティーよりも117倍以上高く、それに伴ってRSVウイルス中和能は110倍以上改善する(表14)。しかし、これらの抗RSV抗体Fab変異体を理想的な製剤である完全長のIgG分子に変換すると、 $k_{off}$ が $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 以下であるそれらのIgG変異体は依然としてパリビズマブよりもはるかに高いアフィニティーを示したが(表14:脚注c)、活性の差はほとんど消失



した(表14および図10B)。相対的な活性が劇的に減少する第一の理由は、パリビズマブをFabからIgGに変換すると、生体外での活性が2log増加することがわかったからである。一方、一部の変異体はIgGに変換しても活性の増加は全く観察されなかった(表14、図10Aおよび図10B)。例えば、パリビズマブFabの $IC_{50}$ は549.2nM、パリビズマブIgGの $IC_{50}$ は3.02nMであり、IgGへの変換により活性が182倍増加する。一方、AFFF(1)のFabおよびIgG変異体の $IC_{50}$ 値はそれぞれ1.43nMおよび2.04nMである。この $k_{off}$ 改善変異体をFabからIgGに変換すると、 $IC_{50}$ は全く改善しない。パリビズマブの $K_d$ (および $k_{off}$ )はIgGへの変換によってごくわずかしき改善しなかったため、IgGが二価であることに由来するアビディティ増加では、パリビズマブIgGで示された中和能の増加を説明できない。一方、IgG変異体AFFF(1)はパリビズマブIgGよりもほぼ2log高い結合アビディティを示したが、 $IC_{50}$ の改善は2倍未満である(表14)。

10

#### 【0500】

$k_{off}$ 改善クローンでのこれらの予想外の結果により、我々はパリビズマブの $k_{on}$ を改善することとした。その後の組換え操作のための最初の分子として、 $k_{off}$ 最適化最良変異体AFFF(1)を選択した。CDRの段階的な変異およびスクリーニングにより、多くの有益な $k_{on}$ 単一変異が同定された。本研究および幾つかの既報<sup>12,20</sup>で観察されたように、選択した $k_{off}$ 単一変異は一般的には $k_{off}$ を2~13倍改善する。一方、本研究では $k_{on}$ 単一変異は $k_{on}$ を20~80%しか改善しなかったことがわかった(データ示さず)。幾つかの $k_{on}$ 変異を組み合わせると、 $k_{on}$ は全体で最大5倍改善した(表16)。はるかに小さいレベルではあったが、これらの組合せクローンすべてで $k_{off}$ が改善することを示した。幸いなことに、これらの $k_{on}$ 改善変異体はFabとIgGの両方で活性が大きく増加していたことを示した(表16、図10Cおよび図10D)。

20

#### 【0501】

抗体の結合速度が $IC_{50}$ で示したウイルス中和能に及ぼす影響を検討するため、表14および表16の全データセットを解析した。 $k_{off}$ 改善Fab変異体では、 $k_{off}$ と $IC_{50}$ との間で強い相関がみられた(図10A)。また、Fab断片では、 $k_{off}$ と $k_{on}$ の両方がウイルス中和能に影響することが観察された。しかし、ウイルス中和能の増加では、 $k_{on}$ がはるかに重要な役割を果たしていると考えられる。そのような例はFab変異体のW100FおよびA17f5である。両方とも $k_{off}$ が8倍改善し、A17f5ではW100Fよりも $k_{on}$ が更に3倍増加している。W100Fでは、 $k_{on}$ が8倍改善した結果、 $IC_{50}$ が11倍改善した。しかし、A17f5では $k_{on}$ が更に3倍改善した結果、 $IC_{50}$ が更に25倍改善した。変異体S52YおよびA1e9とパリビズマブFabとの間でも同様の比較が可能である。

30

#### 【0502】

完全長抗体では、 $k_{on}$ が $IC_{50}$ に及ぼす影響は維持されているが、 $k_{off}$ の影響ははるかに小さいと考えられる。パリビズマブと比較すると(表16)、 $k_{off}$ が約100倍改善したことによって(表14:脚注c)、AFFF(1)、AFFY、およびAFFGなど、 $k_{off}$ 組合せIgG変異体のすべてがはるかに高いアビディティを示したが、それらの $IC_{50}$ 値はパリビズマブの $IC_{50}$ 値と比べてほとんど何も改善していない(表14)。また、 $k_{on}$ 改善IgGのクローン、P11d4、P12f2、およびP12f4はすべて同様な $k_{on}$ 値を示すが、 $k_{off}$ 値は異なっていて $5.55 \times 10^{-5} \sim 2.89 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲がある。しかし、これらの $k_{off}$ の差は $IC_{50}$ に差を生じさせなかった(表16)。一方、 $k_{on}$ 組合せIgG変異体のP11d4では、パリビズマブよりも $k_{on}$ は4倍改善しているが $k_{off}$ はわずかに改善しているだけであることを示す( $2.89 \times 10^{-4}$ に対し、 $4.3 \times 10^{-4} s^{-1}$ )。しかし、その $IC_{50}$ はパリビズマブよりも大幅に(21倍)増加している。この $IC_{50}$ の改善は主にその $k_{on}$ の改善が原因である。但し、 $k_{on}$ が既に改善している場合には、 $k_{off}$ が更に大幅に改善すれば $IC_{50}$ に追加的な有益がもたらされる可能性があることには留意されたい。この例としてはIgGA4b4があり、パリビズマブよりも $k_{on}$ は4倍(他の $k_{on}$ クローンと同様)、 $k_{off}$ は28倍改善している。また、その $IC_{50}$ は44倍増加しており、 $k_{on}$ 改善完全長抗体のウイルス中和能に $k_{off}$ が影響を及ぼし得ることを示す。RSVウイルス中和で $k_{on}$ が顕著な役割を果たすという我々の結果は、 $k_{on}$ 値がより高い抗体はウイルスが細胞に感染する機会を得る前にウイルスにより迅速に結合して中和できるという可能性によって説明される可能性があ

40

50

る。しかし、パリビズマブがRSV感染を阻害する機序は分子レベルではまだ十分には解明されていないので、その他の可能性を否定することはできない。

#### 【0503】

また、 $k_{off}$ には $5 \times 10^{-6}$ 以下 $\sim 4.3 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲の差があったにもかかわらず、パリビズマブおよび全 $k_{off}$ 改善変異体のIgGへの変換後の $IC_{50}$ 値は約3nMであったことが観察された(表14および図10B)。パリビズマブを含むこれらのクローンでは、FabとIgGの両方で $k_{on}$ 値は同様であり、約 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ であった。 $k_{on}$ 改善変異体でも同様の挙動が観察され、 $k_{off}$ には $1.51 \times 10^{-5} \sim 2.890 \times 10^{-4} s^{-1}$ の範囲の差があったにもかかわらず、キャラクタリゼーションされたすべての $k_{on}$ 変異体のIgGへの変換後の $IC_{50}$ 値は約0.1~0.2nMであった(表16および図10D)。これらのクローンの $k_{on}$ 値はFabでは約 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、IgGでは約 $4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ に、同様に改善している。全体的にみて、完全長抗体では $k_{off}$ の差にかかわらず $k_{on}$ が4倍改善するとウイルス中和能が15~30倍改善する。

#### 【0504】

以上の観察に基づくと、2つの主要な要因( $k_{on}$ と、IgGが二価であることとである)がウイルス中和における完全長抗体の $IC_{50}$ に影響を及ぼすと考えられる。 $k_{off}$ の影響はFabとIgGとでかなり異なっており、Fabの $IC_{50}$ には強く影響するが、IgG分子の $IC_{50}$ にはほとんど影響しない。但し、この結論は $k_{off}$ がパリビズマブよりも低い分子に限定されるはずである。パリビズマブIgGの $k_{off}$ は $4.3 \times 10^{-4} s^{-1}$ であり、式 $T_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ で算出した抗原抗体複合体の理論的な解離半減期は27分である。 $k_{off}$ のウイルス中和への寄与はパリビズマブで既に最大であるので、変異体での解離速度をそれ以上改善させても、単純に中和能をそれ以上増加させることができない可能性はある。一価で結合してサイズがより小さいFabでは効果的にRSVを中和するのに必要な $k_{off}$ の閾値が上昇している可能性がある。このことによって、Fab変異体の $IC_{50}$ で $k_{off}$ が顕著な役割を果たしていたことが観察された理由が説明される可能性がある。

#### 【0505】

以前に考察したように、 $k_{off}$ 改善変異体と $k_{on}$ 改善変異体をFabからIgGに変換すると、一般にウイルス中和能に差がみられた(図9)。FabからIgGへの変換により、抗体のサイズと結合価が増加する。これらの変化のウイルス中和への寄与を理解するため、パリビズマブのF(ab')<sub>2</sub>断片およびその変異体の1つを調製し、微量中和アッセイで試験した。この試験では、2回の独立した実験の平均値から算出したパリビズマブおよびそのF(ab')<sub>2</sub>の $IC_{50}$ 値はそれぞれ3.6nMおよび1.4nM、変異体およびそのF(ab')<sub>2</sub>の $IC_{50}$ 値はそれぞれ0.23nMおよび0.15nMである。両方のF(ab')<sub>2</sub>の構築物では、それぞれの元のIgGと比較してサイズは150kDから100kDに減少したが、 $IC_{50}$ 値に大きな差は観察されなかった。これは、この範囲では抗体のサイズはウイルス中和に顕著な影響を及ぼさないことを示す。また、二価の結合能がFabからIgGへの変換により $IC_{50}$ 値を変化させる一因であることも示している。AFFFF(1)およびIgGの他の組合せ $k_{off}$ 変異体は、パリビズマブよりもはるかに高いアビディティを示したが、これらの分子すべてで $IC_{50}$ 値はパリビズマブと同等であった。二価の結合は、アビディティとは無関係な機序を介してウイルス中和に影響を及ぼすことができると考えられる。他の例では、パリビズマブまたはその変異体であるP11d4のFabからIgGへの変換により、 $K_d$ 値は顕著には変化しなかったが、 $IC_{50}$ 値は対応するFab断片よりも42~182倍改善した。これは、アビディティは役割を果たしていないが、二価の結合はウイルス中和を確実に変化させることを示す。固定化Fタンパク質での表面プラズモン共鳴法によりアビディティの値を測定したので、抗体のアビディティとウイルス中和との間で良好な相関性がみられなかった可能性はある。この人工実験系では、センサーチップ表面に提示されたウイルスのエピトープは、Fタンパク質を発現しているウイルス感染細胞表面またはビリオン上でのエピトープなどの自然な提示と完全には模倣していない可能性がある。また、同一の抗体のFabまたはIgGが異なる機序を介してウイルスを中和する可能性もあり、これはパリビズマブのFab変異体をIgGに変換したときに観察されたRSV中和の差を説明する可能性がある。

#### 【0506】

## 6.9 A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)によるコットンラット上気道RSV感染症の予防

コットンラットで筋肉内投与試験を実施し、上気道RSV感染症の減少における有効性をA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)とパリビズマブとで比較した。各試験では幼若コットンラット(*Sigmodon hispidus*、平均体重100g)を各群10匹からなる6群(MEDI-524、MEDI-524、パリビズマブ、およびコントロールのウシ血清アルブミン(BSA)について各2群ずつ)に分けた。動物をメトキシフルランで麻酔し、精製したmAbまたはBSA 0.2mLを筋肉内注射(i.m.)により投与した。各被験物について、1群は2.0mg/kg体重、1群は20.0mg/kg体重で投与した。24時間後に動物を再び麻酔して血清IgG定量のために採血し、RSV(Long株)を $1 \times 10^5$  pfu/匹で鼻腔内注入(i.n.)により投与した。4日後に動物を屠殺し、肺および鼻甲介を摘出した。肺および鼻甲介のホモジネートをハンクス平衡塩溶液(HBSS)で調製し、得られた懸濁液をコンフルエントなHEp-2細胞を用いたブランクアッセイによるウイルス価判定に使用した。屠殺時の肺ホモジネートおよび鼻甲介ホモジネートのヒトIgG価に加え、投与時の血清ヒトIgG価も、セクション5.1.4の記載に従って抗ヒトIgG抗体に特異的なELISAにより判定した。

10

## 【0507】

コットンラットでの予防試験2件の結果を以下の表17および表18、上記の図5Aおよび図5Bに示す。これらの試験結果から、同等の投与量で投与すると、MEDI-524およびパリビズマブはコットンラットの血清、肺、および鼻甲介で同等のレベルに達することが示された。2mg/kg投与量では、MEDI-524が上気道のRSV Long株のウイルス価を減少させる効果はパリビズマブよりも50~100倍強かった。MEDI-524は、コントロールのBSAと比べて鼻甲介でのRSVウイルス価を99%よりも大きく(>2log)減少させたが、パリビズマブは鼻甲介でのRSVウイルス価を60~80%(<1log)減少させただけであった。

20

## 【表17】

表17. コットンラットにおけるRSV(Long株)上気道感染症の筋肉内予防

処置	投与量 (mg/kg)	血清ヒトIgG (投与時)、 平均± 標準誤差 (μg/mL)	肺ヒトIgG (屠殺時) 平均± 標準誤差 (μg/mL)	鼻ヒトIgG (屠殺時) 平均± 標準誤差 (μg/mL)	肺ウイルス 力価 幾何平均± 標準誤差 (log <sub>10</sub> pfu/g)	鼻ウイルス 力価 幾何平均± 標準誤差 (log <sub>10</sub> pfu/g)
MEDI-524	2	20.7 ± 2.4	0.258 ± 0.114	0.169 ± 0.036	<2.0 ± 0.0*	2.3 ± 0.5
SYNAGIS	2	16.1 ± 4.4	0.182 ± 0.080	0.126 ± 0.037	2.3 ± 0.3	4.4 ± 0.1
BSA	2	0.0	0.0	0.0	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.3
MEDI-524	20	213.0 ± 71.7	2.0 ± 0.8	1.2 ± 0.6	<2.0 ± 0.0*	<2.0 ± 0.0*
SYNAGIS	20	166.0 ± 54.9	1.8 ± 0.9	1.1 ± 0.3	<2.0 ± 0.0*	2.1 ± 0.1
BSA	20	0.0	0.0	0.0	4.9 ± 0.4	5.1 ± 0.3

30

\*この群ではすべての動物でウイルス力価が100pfu/g未満であり、ブランクアッセイの検出下限値であった。

## 【0508】

40

【表 18】

表18. コットンラットにおけるRSV(Long株)上気道感染症の予防

処置	投与量 (mg/kg)	血清ヒトIgG (投与時)、 平均± 標準誤差 (μg/mL)	肺ヒトIgG (屠殺時) 平均±標準誤差 (μg/mL)	鼻ヒトIgG (屠殺時) 平均±標準誤差 (μg/mL)	肺ウイルス 力価 幾何平均± 標準誤差 (log <sub>10</sub> pfu/g)	鼻ウイルス 力価 幾何平均± 標準誤差 (log <sub>10</sub> pfu/g)
MEDI-524	2	12.0 ± 1.9	0.246 ± 0.050	0.123 ± 0.016	<2.0 ± 0.0*	3.2 ± 0.5
SYNAGIS	2	15.8 ± 1.2	0.250 ± 0.057	0.118 ± 0.012	<2.0 ± 0.0*	4.9 ± 0.4
BSA	2	0.0	0.0	0.0	4.5 ± 0.1	5.3 ± 0.2
MEDI-524	20	151.6 ± 41.8	2.7 ± 0.5	1.3 ± 0.1	<2.0 ± 0.0*	<2.0 ± 0.0*
SYNAGIS	20	149.2 ± 25.6	2.3 ± 0.4	1.1 ± 0.1	<2.0 ± 0.0*	2.3 ± 0.4
BSA	20	0.0	0.0	0.0	4.6 ± 0.4	5.1 ± 0.2

\*この群ではすべての動物でウイルス力価が100pfu/g未満であり、プラークアッセイの検出下限値であった。

## 【0509】

## 結果

これらの実験結果は、コットンラットの実験モデルで行われた実験により示され、表17、表18および図5A、図5Bに要約したように、MEDI-524はパリビズマブよりも生体内で上気道感染症を予防する効果が高いことを示す。2mg/kg投与量では、MEDI-524が上気道でRSV Long株のウイルス価を減少させる効果はパリビズマブよりも50～100倍強かった。また、MEDI-524は、コントロールのBSAと比べて鼻甲介でのRSVウイルス価を99%よりも大きく(>2log)減少させたが、パリビズマブは鼻甲介でのRSVウイルス価を60～80%(<1log)減少させただけであった。

## 【0510】

これらの結果は、ヒト、特に新生児での上気道感染症の予防にとって、更に、上気道感染症によって起こる下気道感染症(通常は肺に感染している)の発症の予防にとっても重要な意味がある。新生児の30～50%がRSVによる下気道感染症を起こしていると推定される。MEDI-524はパリビズマブよりも低用量で上気道感染症を予防する活性が有意に高いので、MEDI-524の使用は有益であろう。この結果として、受診回数の減少に加えて、新生児での上気道感染症および下気道感染症の発生率を低下させると予想される。

## 【0511】

## 6.10 コットンラットでの筋肉内投与試験

この実験から、A4b4、A4b4-F52S、またはA4b4/L1FR-S28Rをコットンラットに筋肉内投与すると、同じ濃度のパリビズマブをコットンラットに筋肉内投与するよりも、RSVウイルス価が大きく減少することが証明された。

## 【0512】

## 材料および方法

## コットンラットにおける筋肉内投与による予防

コットンラット(*S.hispidus*、平均体重100g)をメトキシフルランで麻酔し、精製したモノクローナル抗体(mAb)またはコントロールのBSA 0.1mLを筋肉内注射(i.m.)により投与した。24時間後に動物を再び麻酔して血清mAb濃度判定のために採血し、RSV Long株を10<sup>5</sup>pfuで鼻腔内注入(i.n.)により投与した。4日後に動物を屠殺して血清試料を採取し、肺を摘出した。肺を10倍量(wt/vol)のハンクス平衡塩溶液中でホモジネートし、得られた懸濁液をプラークアッセイによる肺ウイルス価判定に使用した。

## 【0513】

## コットンラットへの筋肉内投与での薬物動態

コットンラット(*S.hispidus*、平均体重100g)をメトキシフルランで麻酔し、精製したmAbまたはコントロールのBSA 0.1mLを筋肉内注射(i.m.)により投与した。24時間後にすべて

の動物から血清mAb濃度判定のために採血し、各群の半数の動物を屠殺して気管支肺胞洗浄(BAL)を実施した。4日後に残りの動物を屠殺して血清試料を採取し、BALを実施した。

【0514】

#### 結果

表19～21に示すように、A4b4、A4b4-F52S、またはA4b4/L1FR-S28Rは、パリピズマブと同レベルまたはそれ以下まで、肺でのRSVウイルス価を大きく減少させている。

【表19】

表19. コットンラットにおける筋肉内予防データ

	0.5 mg/kg				0.125 mg/kg			
	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	肺IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	ウイルス 力価 (pfu/gm)	log ウイルス 力価	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	肺IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	ウイルス 力価 (pfu/gm)	log ウイルス 力価
SYNAGIS	3.4	0.099	$7.3 \times 10^3$	3.9	0.893	0.024	$3.1 \times 10^4$	4.5
A4b4-F52S	2.9	0.089	$7.3 \times 10^2$	2.9	0.781	0.020	$8.6 \times 10^3$	3.9
A4b4/L1F	3.3	0.093	$6.1 \times 10^2$	2.8	0.748	0.016	$2.3 \times 10^4$	4.4
R-S28R								
BSA			$5.9 \times 10^4$	4.8				

10

【0515】

【表20】

表20. コットンラットにおける筋肉内予防データ

分子	0.5 mg/kg			1 mg/kg		
	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	肺IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	log(10) 肺ウイルス	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	肺IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	log(10) 肺ウイルス
A4b4	2.4	0.013	4.3	3.1	0.094	3.4
SYNAGIS	1.9	0.038	4.4	4.2	0.212	3.3
BSA						4.4

20

【0516】

【表21】

表21. コットンラットにおける筋肉内薬物動態データ

分子	24時間		96時間	
	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	BAL IgG (ng/ml)	血清IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	BAL IgG (ng/ml)
A4b4	3.4	2.2	2.6	1.4
SYNAGIS	4.1	5.3	2.8	3.5

30

【0517】

#### 6.11 臨床試験

生体外のアッセイおよび動物モデルで試験した本発明の抗体は、正常で健康な成人被験者群で安全性、忍容性、および薬物動態について更に評価してもよい。筋肉内投与、静脈内投与、または肺送達システムにより、RSV抗原(例えば、RSV Fタンパク質)と免疫特異的に結合する本発明の抗体0.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、30mg/kg、45mg/kg、または60mg/kgを被験者に単回投与する。抗体単回投与前の24時間以上、各被験者をモニタリングする。投与後は48時間以上に亘り、治験実施施設にて各被験者をモニタリングする。その後、投与から3、7、14、21、28、35、42、49、および56日後に被験者を外来患者としてモニタリングする。

40

【0518】

留置カテーテルまたは直接静脈穿刺により、赤キャップの10mL Vacutainerチューブを用いて、血液試料を以下の間隔で採取する。(1)抗体投与前;(2)抗体投与中;(3)抗体投与から5分、10分、15分、20分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、および48時間後、ならびに(4)抗体投与から3日、7日、14日、21日、28日、35日、42日、49日、および56日後。試料を室温で凝固させ、遠心後に血清を回収する。

50

## 【0519】

血清試料から抗体を部分精製し、試料中の抗体をELISAにより定量化する。簡単に説明すると、ELISA法では、マイクロタイタープレートに被験者に投与した抗体を認識する抗体で4デューウェンコーティングする。次にこのプレートをPBS-Tween-0.5% BSAで、室温で約30分間ブロッキングする。標準曲線は被験者に投与しなかった精製抗体を用いて作製する。試料をPBS-Tween-BSAで希釈する。試料および標準液を室温で約1時間インキュベートする。次に、結合した抗体を標識抗体(例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ヤギ抗ヒトIgG)で、室温で約1時間処理する。標識抗体の結合を分光光度計などで検出する。

## 【0520】

被験者の血清中の抗体濃度は、投与後の各採取間隔の血清濃度から投与前の血清濃度(バックグラウンドレベル)を差し引いて補正する。各被験者について、モデル非依存的アプローチ(Gibaldiら編1982, Pharmacokinetics, 第2版、Marcel Dekker, New York)に従って、補正後の血清中抗体濃度から薬物動態パラメーターを算出する。

## 【0521】

## 6.12 健康成人を対象としたMEDI-524の第1相臨床試験

背景:RSVは、新生児および幼若小児の細気管支炎および肺炎を世界中で毎年流行させている病原体であり、感染新生児の約2%が入院する。早産児、未熟児慢性肺疾患(CLD)の乳幼児、および血行動態に影響を及ぼす先天性心疾患を有する新生児は、これらのリスクファクターがない新生児と比べて、入院率が4~5倍高く、高い罹病率および死亡率が持続する。ヒト化抗RSVモノクローナル抗体であるパリビズマブ(パリビズマブ)はRSVのF糖タンパク質を標的としており、ハイリスク小児における重篤な急性RSV疾患の受動免疫的予防(薬)として、現在、FDAから承認されている。前臨床試験では、MEDI-524の抗RSV活性は20~100倍高かった。RSVのコットンラットモデルを用いて、有効性試験で評価したパリビズマブの投与量(15mg/kgを月1回投与)を選択した。コットンラットで肺RSVの $2\log_{10}$ の減少と関連する血清濃度を達成するためにこの投与量を選択した。ハイリスク小児にこの投与量を予防投与することにより、RSVによる入院率がプラセボと比較して全体で約50%減少した。

## 【0522】

本明細書の他の箇所で記載したように、MEDI-524は、パリビズマブの重鎖および軽鎖の相補性決定領域の生体外でのアフィニティー成熟により生成された、活性を増強させたRSV特異的モノクローナル抗体である。前臨床データからは、MEDI-524はパリビズマブよりもRSV Fタンパク質へのアフィニティー(BIAcoreで測定)が約70倍高く、微量中和アッセイでの活性が20倍強いことを示す。本明細書の先の実施例で記載したコットンラットモデルの試験では、同等の血清濃度では、MEDI-524は下気道における抗RSVウイルス活性がパリビズマブよりも50~100倍高いことを示す。また、MEDI-524は上気道のRSVを2~3log減少させるが、パリビズマブではこの作用はごく弱い。

## 【0523】

目的:本試験は、健康成人でMEDI-524の安全性、免疫原性、および薬物動態(PK)を評価した最初の投与試験であった。

## 【0524】

デザイン/方法:健康な成人を5つの投与群(各群は6例の健康な成人を含む)に分けた。第1~3群にはMEDI-524をそれぞれ3mg/kg、15mg/kg、または30mg/kg体重で単回静脈内投与した。第4群にはMEDI-524を3mg/kgで筋肉内注射により単回投与した。第5群にはMEDI-524を3mg/kgで0日および30日に筋肉内注射により2回投与した。第6群にはプラセボを投与した。

## 【0525】

最終投与から60日後に安全性に関する追跡調査を実施した。最終投与後の180日間に、PKおよび免疫原性に関する追跡調査を実施した。

## 【0526】

結果

10

20

30

40

50

安全性:全群でMEDI-524の忍容性は良好であった(4 S01)。用量制限毒性または重篤な有害作用(SAE)は報告されなかった。

【0527】

薬物動態:抗体の平均半減期は15~18日間であった。第1~3群でのMEDI-524の平均血清中トラフ濃度を図14に示す。平均半減期は15~18日間と算出された。

【0528】

免疫原性:13%の患者で抗イディオタイプ抗体への反応がみられた。しかし、この抗イディオタイプ反応は有害事象を付随しなかった。

【0529】

考察

結論:これらの結果は、MEDI-524はこれらの試験した投与量で安全かつ有効であり、その後実施された反復投与試験は適切であることを示している。

【0530】

6.13 ハイリスク小児を対象としたMEDI-524の反復投与第1/2相臨床試験

目的:本試験は、ハイリスク小児でMEDI-524の安全性、免疫原性、および薬物動態(PK)を評価した用量漸増法による反復投与試験であった。

【0531】

本試験は、小児集団で実施したMEDI-524の最初の試験であった。本試験は、早産児または未熟児CLDの小児へのRSV流行期間中のMEDI-524の用量漸増法による反復筋肉内(IM)投与での安全性、免疫原性、および薬物動態を説明するようデザインされた。

【0532】

デザイン/方法:在胎期間32~35週、年齢6カ月齢未満の早産児にMEDI-524を3mg/kg(N=6)または15mg/kg(N=24)で月1回筋肉内投与した。その後、未熟児CLDの2歳未満の新生児にも15mg/kgを投与した。臨床/臨床検査での有害事象(AE)、免疫原性、およびPKを最終投与の150日後まで評価した。

【0533】

本試験は、北半球および南半球それぞれのRSV流行期間中に実施された、用量漸増法による非盲検第1/2相試験であった。30日間の間隔をあけて、小児に被験物を最低2回から最高5回(小児がRSV流行期間のいつ本試験に登録されたかによる)投与した。

【表22】

表22. 登録被験者と投与処置

群	処置	筋肉内投与量	N	被験者
1	MEDI-524	3 mg/kg	6	6カ月齢以下の未熟児 (在胎期間32週以上35週以下)
2	MEDI-524	15 mg/kg	24 <sup>a</sup>	6カ月齢以下の未熟児 (在胎期間32週以上35週以下)
3	MEDI-524	15 mg/kg	187 <sup>b</sup>	6カ月齢以下の未熟児 (在胎期間32週以上35週以下)あるいは、 未熟児CLDの24カ月齢以下の未熟児で、 過去6カ月以内に安定用量または 用量を漸減して利尿薬、ステロイド、 または気管支拡張薬が投与された者。

<sup>a</sup>小児6例を登録した;許容可能な安全性をレビューした後、残りの18例を登録した。

<sup>b</sup>第1群および第2群の許容可能な安全性をレビューした後、第3群への登録を開始した。

【0534】

評価を表23に記載する。すべての小児に関する入手可能な安全性データの累積レビューは、安全性モニタリング委員会に30日毎に提出された報告書でメディカルモニターが行った。被験物との関連性を問わず、ベースラインの症状からのあらゆる有害な変化を有害事象(AE)に含めた。重篤な有害事象(SAE)には、死に至るもの、生命を脅かすもの、入院ま

10

20

30

40

50

たは入院期間の延長が必要となるもの、持続的または顕著な障害または機能不全に陥るもの、あるいは、重要な医学的事象を含めた。MEDI-524の血清濃度(検出限界1.56 µg/mL)および免疫原性を、ELISAを用いてアッセイした。免疫反応を検出するため、ウェルをMEDI-524でコーティングし、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化MEDI-524を検出試薬とした。

【表 2 3】

表23. 評価スケジュール

手順および評価	日								
	全患者						追加投与量	全患者	
	0	2	7	30	32	37	60/90/120	最終投与 から30日後	最終投与 から90日後

10

投与	X			X			X <sup>a</sup>		
鑑別を伴うCBC血液像	X		X	X		X	X <sup>b</sup>	X	
ALT, AST, BUN クレアチン	X		X	X		X	X <sup>b</sup>	X	
血清MEDI-524	X	X		X		X	X <sup>b</sup>	X	X
MEDI-524 免疫原性	X			X		X	X <sup>b</sup>	X	X
安全性評価	X	X	X	X	X	X	X	X	

20

<sup>a</sup>追加投与量は、その小児がRSV流行期間のいつ登録されたかに依存した。

<sup>b</sup>試験の60日に実施した。

【 0 5 3 5 】

患者集団: 合計217例の小児を本試験に組み入れた(3mg/kg投与群N=6、15mg/kg投与群N=11)。最初の40例の小児は2004年の冬の終わりに米国内で登録された。残りの177例の小児は南半球での2004年のRSV流行期間に南米で登録された。合計205例(94%)の小児が被験物の最終投与の90日後までの試験を完了した。112例(52%)の小児には被験物が5回投与された。

【 0 5 3 6 】

参加した小児の平均年齢は3.0カ月齢(範囲:0.1~21.2)、平均体重は4.1kg(範囲:1.8~12.1)であった。大多数がヒスパニック(167例、77%)で、次いで、白人/非ヒスパニック(41例、19%)が多かった。129例(59%)が男児、32例(15%)の小児が未熟児CLDを有していた。

30

【 0 5 3 7 】

結果

概要: 小児217例(米国40例、南米177例)にMEDI-524を2~5回投与した。追跡調査を実施中である。小児194例のデータでは、平均年齢は3カ月齢(範囲:1~21カ月齢)、平均在胎期間は33週間(範囲:25~35週間)、男児が62%であった。AEはハイリスク小児に典型的で、98%の重症度は軽度/中等度であった。関連があるかもしれないAEは、一過性の注射部位紅斑(N=16)、低色素性貧血(N=2)、SGOT増加(N=1)であった。すべての小児で、関連する重篤なAEまたはAE関連の投与中止は発生しなかった。15mg/kgを1回または2回投与してから30日後の薬剤の平均血清中トラフ濃度は、それぞれ51 µg/mL、69 µg/mLであった。(試験した185例中)1例の小児のみで免疫反応の徴候がみられた(3回目の投与から90日後)。この小児は臨床的に無症候性のままであり、投与中は薬剤の目標血清中レベルが維持された。

40

【 0 5 3 8 】

安全性-有害事象: 本試験中に、小児200例で計1,006件のAEが報告された。ほとんどのAEは参加した小児の潜在的な症状に特徴的な典型的な事象であり、一般的に、発現率は以前に報告されたパリビズマブのプラセボ対照第3相試験と同等であった。被験物の投与中止に至ったAEはなかった。

【 0 5 3 9 】

50



被験物3mg/kgを投与された小児6例で、AE 9件およびSAE 1件(単径ヘルニア)が報告された。この低投与量群で発現したAEには、被験物と関連ありと判断されたAEはなかった。すべてのAEの重症度はLevel 1または2であった。

【0540】

表24に15mg/kgを小児に投与した本試験で器官別に報告されたAEを記載する。比較のため、早産児および未熟児CLDの乳幼児にパリビズマブまたはプラセボを投与した主要な第3相試験で報告されたAEも含めている(Pediatrics (1998) 102:531-537)。

【0541】

15mg/kg MEDI-524を月1回反復投与した小児の93%では、本試験中に1件以上のAEが報告された。報告されたAEの大多数(997件中945件、95%)は重症度がLevel 1または2であった。消化管(35%)、全身(46.6%)、血液およびリンパ(56%)、ならびに呼吸器(60%)に分類されるAEを発現した被験者の割合が最も高かった。

【0542】

消化器系:高頻度に報告されたAEは、下痢(10.0%)、AST増加(8.1%)、新生児仙痛(7.1%)、便秘(6.6%)、胃食道逆流性疾患(6.2%)、ALT増加(6.2%)、および嘔吐(6.2%)であった。ALT(N=2)、AST(N=7)、ALTおよびAST(N=11)の増加がみられたすべての小児は無症候性であり、臨床検査による評価中にAEが検出された。これらの事象の3分の2の重症度はLevel 1または2であった。多くの場合、事象は投与を継続しても一過性および非再発性であったか、あるいは、最終評価時点でこれらの値が突発的に増加して1カ月以内に回復または改善した。

【0543】

全身:高頻度に報告された有害事象は、発熱(16.1%)、被験物による注射部位反応(16.6%)、および疼痛(11.8%)であった。発熱の2件のみが被験物投与と時間的に関連していた(それぞれ4回目の投与当日および2回目の投与の1日後に発現し、その後の投与では再発しなかった)。最も高頻度な注射部位反応は紅斑であり、31例(14.7%)の小児で報告された。被験物が原因の注射部位出血、疼痛、硬結、および浮腫が1~5例の小児で報告された。すべての注射部位反応は重症度がLevel 1で一過性であり、ほとんどは1日以内に回復した。

【表24】

表24. 全有害事象の発現率の要約(器官別)

器官	MI-CP104	MI-CP018	
	MEDI-524 15 mg/kg (N=211)	パリビズマブ 15 mg/kg (N=1002)	プラセボ (N=500)

10

20

30

AEの総数	997		5417		2737	
1件以上のAEが報告された小児の総数	196	(92.9%)	961	(95.9%)	482	(96.4%)
全身	98	(46.4%)	497	(49.6%)	247	(49.4%)
発熱	34	(16.1%)	272	(27.1%)	134	(26.8%)
注射部位反応	35	(16.6%)	27	(2.7%)	9	(1.8%)
心血管系	11	(5.2%)	25	(2.5%)	19	(3.8%)
消化器系 <sup>a</sup>	88	(41.7%)	456	(45.5%)	255	(51.0%)
ASTおよび/またはALT増加	20	(9.5%)	75	(6.9%)	30	(6.0%)
内分泌系	0		1	(0.1%)	0	
血液およびリンパ系 <sup>b</sup>	117	(55.5%)	27	(2.7%)	15	(3.0%)
貧血 <sup>c</sup>	107	(50.7%)	NT		NT	
代謝および栄養系	10	(4.7%)	34	(3.4%)	16	(3.2%)
筋骨格系	1	(0.5%)	5	(0.5%)	3	(0.6%)
神経系	20	(9.5%)	134	(13.4%)	62	(12.4%)
呼吸器系 <sup>d</sup>	126	(59.7%)	835	(83.3%)	411	(82.2%)
皮膚および付属器	59	(28.0%)	326	(32.5%)	161	(32.2%)
特殊感覚	35	(16.6%)	484	(48.3%)	233	(46.6%)
泌尿生殖器系	3	(1.4%)	28	(2.8%)	17	(3.4%)

<sup>a</sup>両試験ではルーチンの肝機能検査を必須とした。MEDI-524の第1/2相試験(5)では、パリビズマブの第3相試験(1)よりも投与後の時点を増やした。

<sup>b</sup>パリビズマブの第3相試験ではCBCを測定しなかったため、ベースラインからのCBCの変化を必要とする試験はMEDI-524群のみに含まれる。

<sup>c</sup>貧血、ヘモグロビン減少、または新生児貧血をコードする事象。NT=治験実施計画書に従い、検査されなかった。

<sup>d</sup>全群の呼吸器感染症を含む。

#### 【0544】

呼吸器系:高頻度に報告されたAEは、鼻咽頭炎(17.5%)、上気道感染症(17.5%)、気管支炎(16.1%)、咽頭炎(7.6%)、慢性気管支炎(7.1%)、および喘鳴(5.2%)であった。URIの2件以外には、被験物と関連ありと判断された事象はなかった。被験物投与から2日以内に喘鳴は発現しなかった。

#### 【0545】

血液およびリンパ系:最も高頻度に報告されたAEは、貧血およびその他の類似した事象(50.7%)であった。1件(最終的なHgbが8.6g/dL)を除くすべての事象の重症度がLevel 1または2であった。101例(90%)の小児が鉄分補給を受けた。ほとんどの小児(99例、88%)では、ヘモグロビン低値は最後の臨床検査までに回復または改善し、早産による貧血と一致していた。

#### 【0546】

被験物と関連があるかもしれないと判断されたAE:合計47例(22%)の小児で、被験物と関連がある可能性があるとして判断されたAEが1件以上発現した。関連したAEの大多数(117件中109件、93.2%)の重症度はLevel 1または2であった。最も高頻度(1%超)なAEは、注射部位反応(30件、14.2%)およびトランスアミナーゼ上昇(14件、6.6%)であった。

#### 【0547】

安全性-重篤な有害事象:表25は15mg/kgを小児に投与した本試験で器官別に報告されたSAEを記載する。比較のため、早産児および未熟児CLDの乳幼児にパリビズマブまたはプラセボを投与した主要な第3相試験で報告されたSAEを含めている。15mg/kg投与群の22例(10.4%)の小児で26件のSAEが発現した。ほとんどは呼吸器科に入院した(20件、77%)。被験物の永続的な投与中止に至ったSAEはなかった。本試験での全SAEの器官別の発現率は、以前の主要な第3相試験でパリビズマブまたはプラセボで報告された発現率と同等またはそれ

10

20

30

40

50

以下であると思われた。

【表 2 5】

表25. すべての重篤な有害事象の発現率の要約(器官別)

器官	MI-CP104		MI-CP018			
	MEDI-524 15 mg/kg (N=211)		パリビズマブ 15 mg/kg (N=1002)		プラセボ (N=500)	
SAEの総数	26		475		277	
1件以上のSAEが報告された小児の総数	22	(10.4%)	298	(29.7%)	170	(34.0%)
全身	2	(0.9%)	101	(10.1%)	53	(10.6%)
心血管系	0		3	(0.3%)	2	(0.4%)
消化器系	1	(0.5%)	93	(9.3%)	42	(8.4%)
血液およびリンパ系	1	(0.5%)	2	(0.2%)	1	(0.2%)
代謝および栄養系	0		5	(0.5%)	3	(0.6%)
筋骨格系	0		1	(0.1%)	2	(0.4%)
神経系	0		4	(0.4%)	2	(0.4%)
呼吸器系	18	(8.5%)	144	(14.4%)	82	(16.4%)
皮膚および付属器	0		0		2	(0.4%)
特殊感覚	0		25	(2.5%)	26	(5.2%)
泌尿生殖器系	2	(0.9%)	4	(0.4%)	5	(1.0%)

10

20

【 0 5 4 8 】

1件のSAEが、被験物と関連があるかもしれないと判断された。この小児は特発性血小板減少性紫斑病(ITP)と診断され、被験物の4回目の投与後に一過性で顕著な血小板減少がみられたが、治療をしなくても回復した。本試験期間中に何らかの血小板異常が認められた小児は、この他にはいなかった。

【 0 5 4 9 】

本試験中に小児2例が死亡した。どちらの死亡も被験物と無関係であると判断された。1件の死亡は初回投与の7日後に入院した小児1例であり、RSV気管支肺炎が原因であった。もう一方の死亡は剖検によりSIDSと判断され、被験物の最終投与から2カ月を超えてから発現した(3mg/kg投与群)。

30

【 0 5 5 0 】

免疫原性:MEDI-524投与期間中に抗MEDI-524結合反応(力価1:10以上と定義)は検出された小児はいなかった。15mg/kg投与群では、小児7例(3.3%)ではMEDI-524の最終投与後にMEDI-524に対する反応性が検出された。この7例のうち、3例(1.4%)では5回目の投与から30日後、4例(1.9%)では最終投与から90日後(3回目、4回目の投与後に各1例、5回目の投与後に2例)に検出された。5回目の投与から30日後の免疫反応は、この時点では検出可能な薬剤レベルとは関連していなかった。試験中に何らかの重要な有害事象が存在しなくてもこの反応は生じた。ITPを有する小児1例では、この事象の約2カ月後(4回目の投与から90日後)にMEDI-524に対する結合活性が検出された。

40

【 0 5 5 1 】

薬物動態:15mg/kgを月1回筋肉内投与している期間のMEDI-524の平均血清中トラフ濃度を図15に示す。投与中を通して90%以上の小児で30 µg/mL以上の濃度が維持され、投与を継続すると予想通りに濃度が増加した。表26に示すように、ハイリスク小児の圧倒的多数(90%超)で投与中を通して目標の血清中トラフ濃度(30 µg/mL以上)が達成される。

## 【表 2 6】

表26. MEDI-524の血清トラフ濃度

月の血清トラフ濃度が30 $\mu$ g/mL以上の患者の割合(%)	30日	60日	90日	120日	150日
MEDI-524	90%	96%	93%	94%	94%

## 【 0 5 5 2 】

## 考察

結論: ハイリスク小児への3mg/kgおよび15mg/kgのMEDI-524の最大5回の投与は、安全で忍容性が良好であると考えられた。有害事象の重症度は典型的にLevel 1または2で、ハイリスク集団での潜在的な症状と一致しており、発現率はパリーブズマブの以前の試験での発現率と同様であった。一過性でLevel 1の注射部位反応が16.6%で報告された。

10

## 【 0 5 5 3 】

免疫反応の発現率は低く(N=7、3%)、投与完了後(5回目の投与後、または最終投与から90日後)に検出された。5回目の投与後に検出された免疫反応(N=3)は、検出可能な薬剤の血清中レベルや重要な有害事象とは関連していなかった。ITPを有する小児1例では、この事象の約2カ月後(4回目の投与から90日後)にMEDI-524に対する結合活性が検出された。

## 【 0 5 5 4 】

薬物動態プロファイルは、IgG<sub>1</sub>と矛盾がなかった。90%以上の小児で投与中を通して目標の血清中トラフ濃度(30 $\mu$ g/mL以上)が達成され、その後は投与回数が増えるにしたがって濃度が増加した。同様の投与量でパリーブズマブを小児に投与した、良好な以前の主要な第3相試験では、2回目および4回目の投与後に、それぞれ79%および87%でこれらの目標レベルが達成された。

20

## 【 0 5 5 5 】

これらのデータは、ハイリスク小児へのMEDI-524 15mg/kgの月1回反復筋肉内投与では、安全性、免疫原性、およびPKプロファイルがパリーブズマブと同様であることを示す。これらのデータは、ハイリスク小児のRSVによる入院の予防に関するMEDI-524の評価を継続して行うことの根拠となり、これらのハイリスク小児のRSVによる入院の予防に関するMEDI-524の評価を行うことの根拠となる。

30

## 【 0 5 5 6 】

#### 6.14 RSV感染症を有する小児を対象としたMEDI-524の安全性に関する単回投与第1相臨床試験

目的: 本試験は、RSV下気道感染症(LRI)を有する小児でMEDI-524の安全性、免疫原性、および薬物動態(PK)を評価した単回投与試験であった。本試験は、小児集団で実施したMEDI-524の2番目の試験であった。RSV LRIで入院した患者におけるMEDI-524の単回静脈内(IV)投与での安全性、免疫原性、および薬物動態を説明するようデザインされた。また、安全性に関するこの第1相試験の一環として、MEDI-524は小児で自然感染したRSVのクリアランスを早めるか否かについて評価した。

## 【 0 5 5 7 】

デザイン/方法: RSV LRI(細気管支炎)で入院した小児30例を4投与群に無作為に割り付け、プラセボ(n=15)あるいは3mg/kg、15mg/kg、または30mg/kgのMEDI-524(1群当たりn=5)を静脈内投与した。臨床/臨床検査での有害事象(AE)、免疫原性、およびPKを評価した。ウイルス培養(PFU/mL)、抗原検出(Binax)、および定量RT-PCRによって、プラセボまたはMEDI-524の投与前、ならびに投与の1、2、および7日後に採取した鼻洗浄液中のRSVを測定した。

40

## 【 0 5 5 8 】

## 結果

被験物投与群およびプラセボ投与群間の重篤な有害作用の有害作用について同等であった。患者2例では、MEDI-524投与とは無関係であると判断された重篤な有害作用が報告さ

50

れたが、そのうち1例(EBV感染症および呼吸不全)はプラセボ投与群に、残りの1例(呼吸不全)は30mg/kg投与群に属していた。入院期間、酸素補給の使用、ICUの必要性、または機械的人工換気の必要性について、明確な差はみられなかった。

#### 【0559】

MEDI-524の血清および鼻汁中の力価:MEDI-524の血清および鼻汁中の濃度を表28に示す。予想通りに、投与量を増加させるにつれてMEDI-524の血清および鼻汁中の平均濃度が増加した。

#### 【表28】

表28. RSV感染症を有する小児の血清および鼻汁に存在するMEDI-524

	2日での血清平均 MEDI-524( $\mu\text{g/mL}$ )	1日での鼻汁MEDI-524	
		平均( $\mu\text{g/mL}$ )	陽性(%)
プラセボ	0	0	0
3 mg/kg	61.8	0.2	40
15 mg/kg	170.8	0.9	60
30 mg/kg	333.2	1.3	80

#### 【0560】

薬物動態:MEDI-524単回静脈内投与後の鼻汁中でのMEDI-524のPKプロファイルを図16に示す。鼻洗浄液中にMEDI-524が存在した被験者の割合はMEDI-524投与量と正比例していた。3mg/kgを投与した患者では投与から2日後にMEDI-524が鼻汁中に存在したが、15mg/kgまたは30mg/kgを投与した患者では投与の30日後までMEDI-524が鼻洗浄液中に存在した。

#### 【0561】

RSVウイルス価:投与から0日、1日、および2日後の各投与群での小児の鼻汁中のRSVウイルス価も評価した(図17)。MEDI-524を投与された被験者(併合した集団)(平均=-2.6、SD=1.6)では、プラセボを投与された被験者(平均=-0.9、SD=1.7)よりも試験の0日から1日の間に平均 $\log_{10}$ PFU/mLが有意に減少した( $p<0.05$ )。また、MEDI-524を投与した小児(15例中13例)では、プラセボを投与した小児(15例中5例)よりも試験の1日で抗原陰性である小児が多かった(データ示さず)。また、試験の7日にRT-PCR法によるウイルスRNAの回収率は、MEDI-524を投与した小児(57%)ではプラセボを投与した小児(93%)よりも低かった(データ示さず)。鼻汁を組織培養すると、MEDI-524群ではプラセボを投与した患者よりも組織培養から鼻汁中のRSV回収率が統計的に有意に低かった(図18)。これらのデータは、MEDI-524投与が上気道感染症に効果があることを示す。

#### 【0562】

#### 結果

結論:これらのデータは、RSV感染症で入院した小児への3mg/kg、15mg/kg、または30mg/kgのMEDI-524の単回静脈内投与では、安全性、免疫原性、およびPKプロファイルがプラセボと同様であることを示す。また、これらの結果はMEDI-524の単回投与により上気道中のRSVレベルを減少させることができることを示す。上気道からのRSVのクリアランスの改善は、中耳炎、喘息、喘鳴など、ウイルスが役割を果たすその他の疾患または症状や下気道疾患を予防する効果が増加するなど、現在の免疫予防薬よりも有益である可能性がある。これらのデータは、RSV LRIおよび/またはURIで入院した小児でMEDI-524の評価を継続して行うことの根拠となり、これらの小児の入院期間の短縮に関してMEDI-524の評価を行うことの根拠となる。

#### 【0563】

6.15 早産児、未熟児慢性肺疾患、または慢性心疾患を有するハイリスク小児を対象としたMEDI-524の第3相臨床試験

10

20

30

40

50

これらの試験は、上記の実施例6.13および実施例6.14の記載と同様の方法で実施される。早産児または未熟児慢性肺疾患の小児集団を、パリビズマブまたはMEDI-524を0日に15mg/kg、その後、1、2、3、および4カ月間に亘り30日間隔で単回静脈内投与する群(即ち、計5回投与し、各投与間の間隔を30日あける)に無作為に割り付ける。投与期間全体および最終投与から30日間に、各群で有効性および安全性を評価する。主要評価項目はRSVによる入院とする。副次的評価項目には、下気道感染症の発現率、RSV感染症、RSVウイルス価、ならびに中耳炎の発現率および頻度を含める。

#### 【0564】

上で概要を述べた試験と同様に、複合型慢性心臓疾患(CHD)を有する小児での追跡裏付け試験も追加的に実施する。

#### 【0565】

#### 6.16 A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)による中耳炎の予防

A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)はパリビズマブよりも低い投与量で上気道感染症を予防する効果があると仮定すれば、同様の投与試験を実施してMEDI-524およびパリビズマブがヒトで中耳炎を予防または治療する効果を判定してもよい。中耳炎発症のリスクがある成人(例えば、免疫不全、または免疫抑制がある成人)に加え、1歳の小児で投与試験を行ってもよい。投与回数に加え、ある範囲の投与量(例えば、2mg/kg~60mg/kg)で試験して、実験群と対照群(例えば、中耳炎ではないと判断された、または中耳炎発症のリスクがないと判断されたヒト新生児および成人)を比較してMEDI-524およびパリビズマブがヒトで中耳炎を予防または治療する効果を判定してもよい。当分野において周知であるいかなる方法、例えば、筋肉内投与または静脈内投与(i.v.)など、により抗体を投与してもよい。対照群(例えば、中耳炎ではないと判断された、または中耳炎発症のリスクがないと判断されたヒト新生児および成人)と比較して、実験群(例えば、生後1年以内のヒト新生児および中耳炎発症のリスクがある成人)では、MEDI-524はパリビズマブよりも顕著に低い投与量で中耳炎の予防および/または治療で有効であると予想される。

#### 【0566】

#### 6.17 修飾ヒンジ-Fc断片の作製、単離、およびキャラクタリゼーション

本実施例では、生体内での半減期がより長い、修飾ヒンジ-Fc断片の作製、単離、およびキャラクタリゼーションについて説明する。

#### 【0567】

#### 6.17.1 ライブラリーの構築

##### 6.17.1.1 試薬

すべての試薬は分析グレードであった。制限酵素およびDNA修飾酵素はNew England Biolabs社(マサチューセッツ州ビバリー)から購入した。オリゴヌクレオチドはMWG Biotech社(ノースカロライナ州ハイポイント)が合成した。pCANTAB5Eファージミドベクター、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化抗E-tag抗体、大腸菌株TG1、IgGセファロース6 Fast Flow、およびHiTrapプロテインAカラムはAPBiotech社(ニュージャージー州ピスカタウェイ)から購入した。VCSM13ヘルパーファージ、およびQuick change変異誘発キットはStratagene社(カリフォルニア州ラ・ホーヤ)から購入した。大腸菌CJ236はBio-Rad社(カリフォルニア州リッチモンド)から購入した。BCAタンパク質アッセイ試薬キットはPierce社(イリノイ州ロックフォード)から入手した。Lipofectamine 2000はInvitrogen社(カリフォルニア州カールズバッド)から購入した。

#### 【0568】

#### 6.17.1.2 マウスおよびヒトFcRnの発現および精製

ヒトおよびマウスFcRnのアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号84および85である(FiranらIntern. Immunol., 13:993-1002, 2001、PopovらMol. Immunol., 33:521-530, 1996も参照。両論文とも、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。)。標準的なPCRプロトコルを用いて、ヒト胎盤cDNA(Clontech社製、カリフォルニア州、パロアルト)から、ヒト 2ミクログロブリン遺伝子(Kabatら1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国立衛生研究所公衆衛生局、ワシントンD.C.)およびヒト 鎖の-23~26

10

20

30

40

50

7番目のコドン(StoryらJ Exp. Med., 180:2377-2381, 1994)を単離した後、ヒトFcRnも得た。元のシグナル配列(Kabatら1991、上記; Storyら、上記)に加え、軽鎖および重鎖をそれぞれpFastBac DUALおよびpFastBacIバクミドにクローニングし、メーカーの説明書(Invitrogen社、カリフォルニア州カールズバッド)に従って、ツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)の細胞(Sf9)でウイルスストックを作製した。市販のプロトコール(Invitrogen社)を用いて、鎖および鎖をコードしているバキュロウイルスをHigh-Five細胞に3の感染多重度で感染させた。組換えヒトFcRnは以下の手順で精製した。感染昆虫細胞の上清を50mM MES(2-N-[モルホリノ]エタンスルホン酸)(pH6.0)で透析し、10mLヒトIgGセファロース6 Fast Flowカラム(APBiotech社製、ニュージャージー州ピスカタウェイ)に供した。樹脂を200mLの50mM MES(pH6.0)で洗浄し、FcRnを0.1M Tris-Cl(pH8.0)で溶出させた。精製したFcRnを50mM MES(pH6.0)で透析し、急速凍結して-70 で保存した。タンパク質の純度はSDS-PAGEおよびHPLCで確認した。

10

【0569】

#### 6.17.1.3 TAAを含むssDNAウラシル鑄型の調製

ライブラリーの構築は、クンケル法(KunkelらMethods Enzymol. 154:367-382, 1987)に由来する部位特異的突然変異誘発法に基づいて行った。MEDI-493ヒトIgG1(JohnsonらJ. Infect. Disease, 176:1215-1224, 1997)に由来する226~478番目のアミノ酸残基の位置にあるヒトヒンジ-Fc遺伝子(Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版)をSfiI/NotI断片としてpCANT AB5Eファージミドベクターにクローニングした。251、252、254、255、256番目(ライブラリー1)、308、309、311、312、314番目(ライブラリー2)、385、386、387、389番目(ライブラリー3)、および428、433、434、436番目(ライブラリー4)の位置にランダム変異を導入することにより、4つのライブラリーを作製した。簡単に説明すると、変異誘発されたファージミドのみがFc提示ファージを産生するように、252番目(ライブラリー1)、310番目(ライブラリー2)、384番目(ライブラリー3)、または429番目(ライブラリー4)の位置に終止コドンTAAを1つそれぞれが含む、4つの異なるヒンジ-Fcの鑄型をオーバーラップ伸長PCR(HoらGene, 15:51-59, 1989)を用いて作製した。

20

【0570】

次に、TAAを含む各一本鎖DNA(TAAssDNA)を以下のように調製した。TAAを含む当該ファージミド4つのうち1つを有する大腸菌CJ236の単一コロニーを、10 µg/mLクロラムフェニコールおよび100 µg/mLアンピシリンを補充した2×YT培地10mLで増殖させた。OD<sub>600</sub>=1になった時点でVCSM13ヘルパーファージを最終濃度が10<sup>10</sup> pfu/mLとなるように添加した。2時間後に培養液を0.25 µg/mLウリジン、10 µg/mLクロラムフェニコール、30 µg/mLカナマイシン、および100 µg/mLアンピシリンを含む2×YT培地500mLに移し、37 で一晩培養した。標準プロトコール(Sambrookら1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 第1~3巻)を用いてPEG6000でファージを沈殿させ、メーカーの説明書に従って、QIAPREP Spin M13キット(Qiagen社製、カリフォルニア州バレンシア)を用いて精製した。ウラシルを含むTAAssDNAの各鑄型10~30 µgと、以下のリン酸化オリゴヌクレオチド(ランダム変異を導入する領域は下線付き)0.6 µgとを、最終容量250 µLの50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> (pH7.5)の中で混合した。

30

40

【化3】

ライブラリー1:

5'-CATGTGACCTCAGGSNNNSNNNGATSNNNSNNGGTGTCCTTGGGTTTT  
GGGGGG-3' (配列番号378)

ライブラリー2:

5'-GCACTTGTACTCCTTGCCATTSNNCCASNNSNNGTGSNNNSNNGGTGA  
GGACGC-3' (配列番号379)

ライブラリー3:

5'-GGTCTTGTAGTTSNNCTCSNNSNNSNNATTGCTCTCCC-3' (配列番号380)

ライブラリー4:

5'-GGCTCTTCTGCGTSNNGTGSNNSNNCAGAGCCTCATGSNNCACGGAGC  
ATGAG-3' (配列番号381)

N = A、C、T又はG及びS = G又はC。

【 0 5 7 1 】

#### 6.17.1.4 ヘテロ二本鎖DNAの合成

標準プロトコルを用いて、適切な縮重オリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下でリン酸化した。ssDNA U鑄型10~30 µgと、リン酸化オリゴヌクレオチド0.6 µgとを、最終容量250 µLの10mM MgCl<sub>2</sub>を含む50mM Tris-HCl (pH7.5)の中で混合させ、90で2分間、50で3分間、20で5分間インキュベートした。0.4mM ATP、1mM dNTPおよび6mM DTT存在下、T4 DNAリガーゼおよびT7 DNAポリメラーゼの両方を各30単位添加することによりヘテロ二本鎖DNAを合成し、この混合液を20で4時間インキュベートした。Qiagen QIAQUICK(登録商標)DNA精製キット(Qiagen社製、カリフォルニア州)を用いて、このようにして作製したヘテロ二本鎖DNAを精製、脱塩した。

【 0 5 7 2 】

#### 6.17.1.5 エレクトロポレーション

ライブラリーのサイズが $1 \times 10^8$  (ライブラリー1および2)または $1 \times 10^7$  (ライブラリー3および4)に達するまで、大腸菌TG1のエレクトロコンピテントセル300 µLにヘテロ二本鎖DNA 1~5 µgを電圧2.5kV、200 および静電容量25 µFでエレクトロポレーションした。この細胞を2mLのSOC培地に再懸濁し、この手順を6~10回繰り返した。多様性は組換え大腸菌の滴定により評価した。パルスした細胞を50mLのSOC培地中で攪拌しながら37で30分間インキュベートし、遠心分離した後、100 µg/mLアンピシリンおよび $10^{10}$  pfu/mLのVCSM13ヘルパーファージを含む500mLの2×YTに再懸濁した。この培養液を37で一晩インキュベートし、遠心分離により細胞をペレット状にさせた。前述(Sambrookら1989、上記)のように、GIIIコートタンパク質の変異したヒンジ-Fc部分を発現している上清中のファージをPEG 6000で沈殿させ、5mLの20mM MES (pH6.0)に再懸濁した。

【 0 5 7 3 】

#### 6.17.2 ライブラリーのパンニング

ELISAベースの手法を用いてファージをパンニングした。1ウェル当たり100 µLの0.01mg/mLマウスFcRnを含む炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0)を入れ、96ウェルELISAプレートを4で一晩コーティングした後、4%スキムミルクで、37で2時間ブロッキングした。コーティングしたプレートの各ウェルに、5%ミルクおよび0.05% Tween 20を含む20mM MES (pH6.0)に懸濁させたファージ懸濁液100-150 µL (合計ファージ約 $10^{13}$ 個を含む)を入れ、攪拌しながら37で2~3時間インキュベートした。

【 0 5 7 4 】

インキュベート後に、0.2% Tween 20および0.3M NaClを含む20mM MES (pH6.0)でウェルを約30回、室温で洗浄した。結合したファージを1ウェル当たり100 µLのPBS (pH7.4)で、37で30分間溶出させた。

【 0 5 7 5 】

次に、溶出させたファージを指数増殖期の大腸菌細胞の培養液に添加し、100 µg/mLアンピシリンおよび $10^{10}$  pfu/mLのVCSM13ヘルパーファージを含む250mLの2×YT中で、37で一晩増殖させた。増殖したファージを遠心分離によって回収し、その後、PEGで沈殿させた。このパンニングのプロセスを最大で6回繰り返した。

【 0 5 7 6 】

表29に示すように、308~314番目の残基(H310とW313は固定)に変異を含むファージライブラリーについて、FcRnに対するアフィニティーが高いヒンジ-Fc領域を発現しているフ

10

20

30

40

50



ァージを各パンニングのプロセスで濃縮させた。251～256番目の残基(1253は固定)の変異に関するライブラリーのパンニングの結果を表30、428～436番目の残基(H429、E430、A431、L432、およびH435は固定)に変異に関するライブラリーのパンニングの結果を表31に示す。また、385～389番目の残基(E388は固定)に変異に関するライブラリーのパンニングの結果を表32に示す。

【表 2 9】

表29

ライブラリーのパンニング(308～314番目の残基;H310とW313は固定)

pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn (マウス FcRn)

パンニング	結果		濃縮比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	$1.1 \times 10^5$	$0.5 \times 10^5$	2
第2ラウンド	$1 \times 10^4$	$0.2 \times 10^4$	5
第3ラウンド	$9 \times 10^4$	$0.3 \times 10^4$	30
第4ラウンド	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	15

10

【 0 5 7 7 】

【表 3 0】

表30

ライブラリーのパンニング(251～256番目の残基;1253は固定)

pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn

パンニング	結果		濃縮比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	$2.5 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	2.5
第2ラウンド	$6 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	3.0
第3ラウンド	$8 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	20
第4ラウンド	$1.2 \times 10^6$	$5 \times 10^4$	24
第5ラウンド	$3.0 \times 10^6$	$6 \times 10^4$	50

20

30

【 0 5 7 8 】

【表 3 1】

表31

ライブラリーのパンニング(428～436番目の残基;  
H429、E430、A431、L432、およびH435は固定)

pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn

パンニング	結果		濃縮比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	$2.3 \times 10^5$	$0.9 \times 10^5$	2.5
第2ラウンド	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	3
第3ラウンド	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	10
第4ラウンド	$8 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	16

40

【 0 5 7 9 】

## 【表 3 2】

表32

ライブラリーのパンニング(385～389番目の残基;E388は固定)

## pCANTABSE-KUNKEL-muFcRn

パンニング	結果		濃縮比
	+ FcRn	- FcRn	
第1ラウンド	$4.2 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	1.1
第2ラウンド	$5 \times 10^4$	$0.3 \times 10^4$	17
第3ラウンド	$3.5 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	35
第4ラウンド	$5.5 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	14
第5ラウンド	$7.5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	15
第6ラウンド	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	20

10

## 【0580】

## 6.17.3 パンニングで単離されたクローンの同定

各パンニングのプロセスの後、ファージを単離し、ABI3000ゲノムアナライザー (Applied Biosystems社製、カリフォルニア州、フォスターシティ)を用いて、ジデオキシヌクレオチドシーケンス法 (Sangerら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467, 1977)などの標準的なシーケンス法により、FcRnに結合する発現ペプチドをコードしている核酸をシー

20

## 【0581】

パンニングの結果、308～314番目の残基 (H310、W313は固定) に変異を含むファージライブラリーから2個の変異体、251～256番目の残基 (I253は固定) に関するファージライブラリーから13個の変異体、428～436番目の残基 (H429、E430、A431、L432、およびH435は固定) に関するファージライブラリーから6個の変異体、385～389番目の残基 (E388は固定) に関するファージライブラリーから9個の変異体が単離された。これらのライブラリーから単離された変異体を表33に記載する。

## 【表 3 3】

表33

パンニングにより単離された変異体

30

ライブラリー	変異体*
--------	------

ライブラリー	変異体*
251-256	<u>Leu Tyr Ile Thr Arg Glu</u> (SEQ ID NO:348)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:349)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Ser</i> (SEQ ID NO:350)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:351)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Gln</i> (SEQ ID NO:352)
	<i>Leu Trp Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:353)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Leu Gln</i> (SEQ ID NO:354)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Asp</i> (SEQ ID NO:355)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:356)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:357)
	<i>Leu Phe Ile Thr Gly Ala</i> (SEQ ID NO:358)
	<i>Leu Ser Ile Ser Arg Glu</i> (SEQ ID NO:359)
	<i>Arg Thr Ile Ser Ile Ser</i> (SEQ ID NO:360)
308-314	<u>Thr Pro His Ser Asp Trp Leu</u> (SEQ ID NO:361)
	<i>Ile Pro His Glu Asp Trp Leu</i> (SEQ ID NO:362)
385-389	<u>Arg Thr Arg Glu Pro</u> (SEQ ID NO:363)
	<i>Asp Pro Pro Glu Ser</i> (SEQ ID NO:364)
	<i>Ser Asp Pro Glu Pro</i> (SEQ ID NO:365)
	<i>Thr Ser His Glu Asn</i> (SEQ ID NO:366)
	<i>Ser Lys Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:367)
	<i>His Arg Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:368)
	<i>Lys Ile Arg Glu Asn</i> (SEQ ID NO:369)
	<i>Gly Ile Thr Glu Ser</i> (SEQ ID NO:370)
	<i>Ser Met Ala Glu Pro</i> (SEQ ID NO:371)
428-436	<i>Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His</i> (SEQ ID NO:372)
	<i>Met His Glu Ala Leu His Phe His His</i> (SEQ ID NO:373)
	<i>Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His</i> (SEQ ID NO:374)
	<i>Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg</i> (SEQ ID NO:375)
	<i>Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr</i> (SEQ ID NO:376)
	<i>Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr</i> (SEQ ID NO:377)

\*置換残基を太字で示す。

#### 【 0 5 8 2 】

表33の下線付き配列は最終回のパンニングで10～20倍出現した配列、イタリックの配列は最終回のパンニングで2～5倍出現した配列である。下線付きでもイタリックでもない配列は、最終回のパンニングで1倍出現した配列である。

#### 【 0 5 8 3 】

#### 6.17.4 可溶性ヒンジ-Fc領域変異体の発現および精製

10

20

30

40

50

変異したヒンジ-Fc断片をコードしている遺伝子を適切な制限酵素で切断し、V<sub>pel</sub>Bhisなどの発現ベクターに再クローニングする(Ward, J. Mol. Biol., 224:885-890, 1992)。c-mycタグ、デカペプチドタグ(HuseらScience, 246:1275-1281, 1989)、FLAG(商標)(Immunex社製)タグなど、その他のあらゆるタイプのタグ配列を含むベクターを使用することができる。大腸菌などの組換えクローンを培養し、可溶性ヒンジ-Fc断片の発現を誘導する。この可溶性ヒンジ-Fc断片は、使用したタグに基づき、または、当業者に周知であるその他のいかなる精製方法により、浸透圧ショックを与えた後に培地または細胞のライセートから単離し、以下に記載の方法によりキャラクタリゼーションすることが可能である。

【0584】

#### 6.17.5 IgG1変異体の構築、作製、および精製

I253A、M252Y/S254T/T256E、M252W、M252Y、M252Y/T256Q、M252F/T256D、V308T/L309P/Q311S、G385D/Q386P/N389S、G385R/Q386T/P387R/N389P、H433K/N434F/Y436H、およびN434F/Y436などの代表的なFc変異体をヒトIgG1 MEDI-493(パリビズマブ)に導入した(Johnsonら1997、上記)。Quick Change変異誘発キット(Stratagene社製、カリフォルニア州ラ・ホーヤ)を用い、メーカーの説明書に従って重鎖に部位特異的突然変異を誘発し、ABI3000型シーケンサー(Applied Biosystems社製、カリフォルニア州フォスターシティ)を用いてジドキシヌクレオチドシーケンス法により配列を確認した。CMV前初期プロモーター、およびIgG1/V<sub>H</sub>がIgG1/V<sub>L</sub>を同時に分泌されるジシストロニックオペロンを用いて、異なる構築物をヒト胎児腎臓293細胞で一過性に発現させた(Johnsonら1997、上記)。トランスフェクションはLipofectamine 2000(Invitrogen社製、カリフォルニア州カールズバッド)および標準プロトコルを用いて行った。メーカーの説明書に従い、ならし培地から1mL HiTrapプロテインAカラム(APBiotech社製)でIgGを直接精製した。

【0585】

#### 6.17.6 変異したヒンジ-Fc領域のキャラクタリゼーション

##### 6.17.6.1 HPLCおよびSDS-PAGEによる生体外でのキャラクタリゼーション

精製後に、SDS-PAGEおよびHPLCを含む、当業者に周知のさまざまな方法により、修飾ヒンジ-Fc断片の分子量および結合特性などの一般的な特性を検討してもよい。

【0586】

#### FcRn結合アッセイ

放射性標識した野生型ヒンジ-Fcまたは修飾ヒンジ-Fcを、マウスまたはヒトFcRnを発現している細胞とインキュベートすることによって、修飾ヒンジ-Fc断片の結合活性を測定することができる。一般的には、SV40をトランスフォームした内皮細胞(SVEC)(KimらJ Immunol., 40:457-465, 1994)などの内皮細胞株を使用する。ヒンジ-Fc断片と37℃で16~18時間インキュベートした後、細胞を培地で洗浄し、5mM Na<sub>2</sub>EDTAを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)と5分間インキュベートすることにより細胞を剥離させる。細胞10<sup>7</sup>個当たりの放射能を測定する。

【0587】

次いで、0.3mg/mL PMSF、25mg/mLペプスタチン、および0.1mg/mLアプロチニンを含む2.5mg/mL CHAPS、0.1M Tris-HCl(pH8.0)2mLに細胞を再懸濁し、室温で30分間インキュベートする。その後、細胞懸濁液を遠心分離し、上清を分離する。上清の放射能を測定し、10<sup>7</sup>個の細胞当たり抽出されたヒンジ-Fc断片の量を算出する。

【0588】

野生型ヒトIgG1とマウスおよびヒトFcRnとの相互作用のK<sub>d</sub>(それぞれ269nM、2,527nM)は、他によって判定された値(それぞれ265nM、2,350nM、Firanら2001、上記)とよく一致する。他による報告(KimらEur. J. Immunol., 29:2819-2825, 1991; ShieldsらJ. Biol. Chem., 276:6591-6604, 2001)と同様に、変異I253AはヒトおよびマウスFcRnとの結合を実質的に消失させる。この変異体では微量中和アッセイで野生型分子(パリビズマブ)と同一の特異的な活性が維持されているので(Johnsonら1997、上記;データ示さず)、これは、抗体のフォールディングが正しく行われなかった結果ではない。

【0589】

10

20

30

40

50

マウスおよびヒトFcRnへの結合アフィニティーが増加するヒトIgG1変異体が作製された(表33)。総合的に見て、ヒトIgG1-ヒトFcRnの対では、ヒトIgG1-マウスFcRnの対よりも複合体の安定性の改善は小さかった。野生型IgG1と比較すると、それぞれ30倍(N434F/Y436Hで  $G=2.0\text{kcal/mol}$ )、および11倍(M252Y/S254Y/S254T/T256Eで  $G=1.4\text{kcal/mol}$ )であった。しかし、ヒトとマウスのFcRnを比較すると、最も重要な位置の順位は変わっていなかった。IgG1-マウスFcRn複合体の安定性を最も大きく増加させたのは( $G>1.3\text{kcal/mol}$ )、252、254、256番目の位置の変異(M252Y/S254T/T256EおよびM252W)、および433、434、436(H433K/N434F/Y436HおよびN434F/Y436H)であった。同様に、同じ変異がIgG1-ヒトFcRnの相互作用に最も重大な影響を及ぼすことが明らかになり、複合体の安定性が最も大きく増加した( $G>1.0\text{kcal/mol}$ )。308、309、311、385、386、387、および389番目の位置での置換は、ヒトまたはマウスFcRnと関連するの複合体の安定性にほとんど、または全く影響を及ぼさなかった( $G<0.5\text{kcal/mol}$ )。Fc-FcRn結合部位の中央に位置する残基は、周辺部の残基よりも、複合体の安定性の改善により顕著に寄与する(図27)。

10

#### 【0590】

ヒトFcのマウスFcRnへの効率的な結合は、幾つかの野生型Fc残基の存在を明らかに必要とする。例えば、251番目のロイシン、255番目のアルギニン、310番目のアスパラギン酸、314番目のロイシン、および428番目のメチオニンは非常に保存されている(図24)。特異性に関するその他の傾向としては、308、309、および311番目の位置では、それぞれスレオニン、プロリン、およびセリンは対応する野生型残基よりも非常に強く好まれることが観察される(図24)。しかし、V308T/L309P/Q311SのヒトおよびマウスFcRnの両方との結合力の増加は野生型IgG1と比べて2倍未満なので、この強いコンセンサス配列の生成はアフィニティー増加の程度と相関していない(表34)。

20

#### 【0591】

アフィニティーの増加は、「ホットスポット」の位置での残基の置換に強く依存している可能性がある。例えば、単一変異M252YはマウスFcRnとの結合を9倍増加させるが、それ以外にも変異があっても、追加的な有益性はほとんど(M252Y/S254T/T256E)、または全く(M252Y/T256Q)得られない。程度は小さいものの、ヒト受容体についても同じ傾向が観察される。しかし、M252Y/S254T/T256EではM252Yよりもアフィニティーが有意に(2.5倍)改善する。これはおそらく、ヒトFcRnとマウスFcRnの結合部位の違いを反映しているのであろう(WestおよびBjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000)。

30

#### 【0592】

マウスFcRnへのアフィニティーの著しい増加( $G>1.3\text{kcal/mol}$ )を示すファージ由来のIgG1変異体は、pH7.2で野生型IgG1と比べて、この受容体への著しい結合活性も示した(図26A~26H)。アフィニティーが中等度に増加する( $G<0.3\text{kcal/mol}$ )IgG1変異体は、pH7.2ではほとんど結合しなかった(データ示さず)。一方、ヒトFcRnへのアフィニティーが大幅に増加する( $G>1.0\text{kcal/mol}$ )IgG1変異体は、pH7.4では野生型IgG1と比べて、ごく弱い結合を示すのみであった(図26A~26H)。

【表 3 4】

表34

IgG1/Fc変異体のマウスおよびヒトFcRnへの結合に関する解離定数および  
相対的な自由エネルギーの変化\*

変異体	Fc/マウスFcRnの 解離定数(nM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Fc/ヒトFcRnの 解離定数(mM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
野生型	269 ± 1		2527 ± 117	

10

変異体	Fc/マウスFcRnの 解離定数(nM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Fc/ヒトFcRnの 解離定数(mM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
I253A	NB	NA	NB	NA
M252Y/S254T/T256E	27 ± 6	1.4	225 ± 10	1.4
M252W	30 ± 1	1.3	408 ± 24	1.1
M252Y	41 ± 7	1.1	532 ± 37	0.9
M252Y/T256Q	39 ± 8	1.1	560 ± 102	0.9
M252F/T256D	52 ± 9	1.0	933 ± 170	0.6
V308T/L309P/Q311S	153 ± 23	0.3	1964 ± 84	0.1
G385D/Q386P/N389S	187 ± 10	0.2	2164 ± 331	0.1
G385R/Q386T/P387R/N389P	147 ± 24	0.4	1620 ± 61	0.3
H433K/N434F/Y436H	14 ± 2	1.8	399 ± 47	1.1
N434F/Y436H	9 ± 1	2.0	493 ± 7	1.0

20

30

\*アフィニティー測定は、上記のようにBIAcoreにより行った。残基の番号付けはEUに従っている(Kabatら, 1991、上記)。自由エネルギーの変化における差は、野生型と変異体の反応の $\Delta G$ sの差として算出する( $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{野生型}} - \Delta G_{\text{変異体}}$ )。NB、結合せず。NA、該当なし。

40

## 【0593】

## FcRn媒介移動アッセイ

このアッセイは、PCT公開W097/34631で開示されているプロトコールに従って行う。放射性標識した修飾ヒンジ-Fc断片をさまざまな濃度(1 µg/mL ~ 1mg/mL)でトランスウェルの片面に添加し、トランスウェルのもう一面の放射能を測定することにより、FcRn発現単層細胞を介した断片の移動を定量化することができる。

## 【0594】

## 6.17.6.2 生体内薬物動態試験

50

修飾IgGヒンジ-Fcの半減期を判定するために、修飾ヒンジ-Fc断片を $^{125}\text{I}$ (適切な比活性は約 $10^7\text{cpm}/\mu\text{g}$ )で放射性標識し、生理食塩水(pH7.2)に溶解する。甲状腺をブロックするためにNaIを含む水をあらかじめ与えておいたBALB/cマウス(Harlan社製、インディアナ州インディアナポリス)に、 $150\mu\text{L}$ 以下の体積、 $10 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6\text{cpm}$ の放射能でこの溶液を静脈内投与する。さまざまな時点(例えば、投与から3分後~72時間後)でマウスの(後方の)眼窩後洞からヘパリン毛細管に採血し、各試料から回収した血漿の放射能を測定した。

#### 【0595】

図28のデータを得るため、アッセイした各分子について動物10匹を使用し、動物1匹当たり抗体 $2.5\mu\text{g}$ を投与した。抗体の血清中レベルは抗ヒトIgGを用いたELISAで測定した(図28)。マウスFcRnへのアフィニティーと血清中での持続は逆相関していると考えられる。これは、この分子を分離(即ち、血清中から放出されないこと)させる、pH7.2で観察された変異体の著しい結合量が原因である可能性がある。予備的データ(ここでは示さず)からは、この変異体の肺への輸送が増加していることが示されている。また、変異体はマウスFcRnよりもヒトFcRnへの結合が少ないので(図26A~26H参照)、霊長類およびヒトでは抗体の血清中レベルがより高くなることが予想される。

#### 【0596】

##### 6.17.6.3 表面プラズモン共鳴法による解析

可溶性マウスおよびヒトFcRnと固定化ヒトIgG1変異体との相互作用をBIAcore 3000機器(Pharmacia Biosensor社製、スウェーデン、ウプサラ)を用いた表面プラズモン共鳴法によりモニターした。アフィニティー測定の際の障害となる可能性がある凝集物質はゲル濾過で検出されなかった(van der MerweらEMBO J., 12:4945-4954, 1993; van der MerweらBiochemistry, 33:10149-10160, 1994)。ヒトおよびマウスFcRnの両方についてはビシンコニン酸(BCA)法により、または野生型および変異体IgG1については280nmでの1%吸光係数(1.5)を用いて、タンパク質濃度を算出した。野生型および変異体IgG1については、記載(JohnssonらAnal. Biochem. 198 (1992) 268-277)に従い、Amine Couplingキットを用いて、CM5センサーチップ(Pharmacia Biosensor社製)のデキストランマトリックスと結合させた。 $10\text{mM}$ 酢酸ナトリウム(pH5.0)中でのタンパク質濃度は $3 \sim 5\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。流速 $10\mu\text{L}/\text{分}$ では活性化時間を7分間に設定した。流速 $10\mu\text{L}/\text{分}$ では固定化時間を10~20分間に設定した。 $1.0\text{M}$ エタノールアミン塩酸塩(pH8.5) $70\mu\text{L}$ を注入することにより、過剰な反応性エステルをクエンチングした。典型的にこの操作によって500~4,000レゾナンスユニット(RU)が固定化された。ヒトおよびマウスFcRnの緩衝液を、0.05% Tween 20を含む50mM PBS緩衝液(pH6.0)に交換した。希釈も同じ緩衝液で行った。結合実験はすべて、濃度 $120 \sim 1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、流速 $5 \sim 10\mu\text{L}/\text{分}$ 、25で行った。データを25~50分間収集し、表面を再生するためにPBS緩衝液(pH7.2)の1分間のパルス注入を3回行った。FcRnはコーティングしていない細胞上にも流入させ、このブランク測定でのセンサーグラムをIgG1を結合させたチップのセンサーグラムから差し引いた。各測定をBIA評価3.1ソフトウェア(Pharmacia社製)を用いて解析した。非特異的結合で補正した後、平衡状態での遊離型反応物および複合体の濃度を測定することにより、スキャッチャード解析から結合速度( $K_A$ )を判定した。BIAcoreによる平衡結合実験では(Karlssonら1991、上記; van der Merweら1993、上記; van der Merweら1994、上記; RaghavanらImmunity, 1:303-315, 1994; MalchiodiらJ. Exp. Med., 182:1833-1845, 1995)、複合体の濃度を定常状態の反応として直接評価することが可能である。解析物は試料注入中に絶えず補充されるので、遊離型解析物の濃度(ヒトまたはマウスFcRn)は、バルク解析物の濃度と同じである。センサーチップの表面上の遊離型リガンドの濃度は、 $K_A = R_{eq}/C(R_{max} - R_{eq})$ という式により、複合体の濃度、および表面の総結合能から導くことができる。ここで、Cは遊離型解析物の濃度、 $R_{eq}$ は定常状態での反応、 $R_{max}$ は表面の総結合能である。この式を変形すると、 $R_{eq}/C = K_A R_{max} - K_A R_{eq}$ という式が得られる。

#### 【0597】

異なる解析物濃度で $R_{eq}/C$ と $R_{eq}$ を対応させてプロットすると直線となり、この直線から $K_A$ を算出することができる(表34参照)。2回または3回の独立した判定の標準偏差として誤

10

20

30

40

50

差を推定したが、20%未満であった。

【0598】

ライブラリー1~4のパンニング後に同定された代表的な変異体(図24、表33)をヒトIgG1のFc部分に導入した。ヒトまたはマウスFcRnを異なる濃度で固定化IgG1変異体に注入すると、濃度依存的に結合した。変異体M252Y/S254T/T256EとマウスおよびヒトFcRnとの平衡結合に関する典型的な共鳴プロファイルを図25Aおよび25Bに示す。見かけ上の $K_A$ を推定するため、FcRnは濃度120~1 $\mu$ g/mLで用いた。すべての例で、平衡(または、ほぼ平衡)結合のレベルに50分以内に達した。タンパク質がバルク屈折率に及ぼす非特異的な効果によって生じるRUの増加を推定するため、FcRnのコートイングしていない細胞への結合を測定し、このブランク測定でのセンサーグラムをIgG1を結合させたチップのセンサーグラムから差し引いた。変異体M252Y/S254T/T256EのマウスおよびヒトFcRnへの結合に関するスキャッチャードプロットを図25Cおよび25Dに示す。プロットはすべて線形となり、該当する傾きから見かけ上の $K_A$ を算出した。測定は2重または3重で行い、固定化IgGが元の結合活性を維持していることを確認した。

【0599】

マウスIgG1に、マウスFcRnとのアフィニティーが等価ではない結合部位(130nM未満、および6 $\mu$ m)が2つ存在するので(SanchezらBiochemistry, 38:9471-9476, 1999; SchuckらMol. Immunol., 36:1117-1125, 1999; GhetieおよびWard, Ann. Rev. Immunol., 18:739-766, 2000)、IgG1が固定化FcRnと結合した場合に生じるアビディティーに対する効果を避けるために、この受容体を溶液中で使用した。これと矛盾せず、FcRnをバイオセンサーチップに固定化するとIgGよりも系統的に高いアフィニティーが観察される(Popovら1996、上記; VaughnおよびBjorkman, Biochemistry, 36:9374-9380, 1997; MartinおよびBjorkman, Biochemistry, 38:12639-12647; WestおよびBjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000)。我々のBIAcoreの実験条件では、スキャッチャードプロットの線形性によると、アフィニティーがより高い会合(即ち、一リガンド受容体)に対応する相互作用が主に測定される(図25Cおよび25D)。

【0600】

野生型IgG1と変異体IgG1のアフィニティーの比較にもBIAcore解析を用いた。pH6.0でマウスFcRnへのアフィニティーの著しい増加( $\Delta G$  1.0kcal/mol)を示すファージ由来のIgG1変異体は、pH7.2でもこのマウス受容体への顕著な結合を示し、飽和状態でのSPR signal<sub>pH7.4</sub>/SPR signal<sub>pH6.0</sub>比は0.6を超えた。pH6.0でマウスFcRnへのアフィニティーが中等度に増加する( $\Delta G$ <0.4kcal/mol)IgG1変異体は、pH7.2ではこのマウス受容体とほとんど結合しなかった。一方、pH6.0でヒトFcRnへのアフィニティーの大幅な増加( $\Delta G$  1.0kcal/mol)を示すIgG1変異体は、pH7.4ではヒト受容体に最少しか結合せず、飽和状態でのSPR signal<sub>pH7.4</sub>/SPR signal<sub>pH6.0</sub>比は0.15未満であった。

【0601】

#### 6.18 A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)修飾抗体の生成

本実施例では、A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)のM252Y/S254T/T256E(YTE)変異体の生成について説明する。

【0602】

ヒト化抗RSVモノクローナル抗体MEDI-524の重鎖を、ヒトサイトメガロウイルス前初期主要(hCMVie)エンハンサー、プロモーター、および5'-非翻訳領域をコードしている哺乳類発現ベクターにクローニングした(Boshart et al. (1985) Cell 41:521-530)。この系では、ヒト $\mu$ 鎖がヒト $\kappa$ 鎖と共に分泌される(Johnson et al. (1997) Infect. Dis. 176:1215-1224)。3つの変異(M252Y/S254T/T256E; 実施例6.17、およびDall'Acqua et al. (2002), J. Immunol. 169:5171-5180)を組み合わせるとMEDI-524の重鎖に導入した。252、254、および256番目(EU指標、Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.) 第5版と同様)の位置のこれら3つの変異(「YTE」と総称する)の作製は、メーカーの説明書に従い、Quick Change(登録商標)XL変異誘発キット(Stratagene社製、カリフォルニア州)ならびに、プライマー5'-GCATGTGAC



CTCAGGTTCCCGAGTGATATAGAGGGTGTCTTGGG-3' (配列番号382) および5'-CCCAAGGACACCCTCTATATCACTCGGGAACCTGAGGTCACATGC-3' (配列番号383)を用いて部位特異的突然変異誘発によって行った。これにより「MEDI-524-YTE」が作製された。ABI 3100型シーケンサーを用いて確認した配列を図29で報告する。その後、対応する抗体の構築物を、NS0細胞に安定的にトランスフェクトし、分泌された免疫グロブリンを発現させて標準プロトコルを用いて精製した。

#### 【0603】

##### 表面プラズモン共鳴(BIAcore)測定

可溶性ヒトおよびカニクイザルFcRnと固定化MEDI-524およびMEDI-524-YTE変異体との相互作用を、BIAcore 3000機器(Pharmacia Biosensor社製、スウェーデン、ウプサラ)を用いた表面プラズモン共鳴検出によりモニターした。ヒトおよびカニクイザルFcRnの両方についてはピシンコニン酸法により、またはMEDI-524およびMEDI-524-YTEの280nmでの1%吸光係数(1.47)を用いて、タンパク質濃度を算出した。Amine Couplingキットを用いて、記載(Johnsson et al. (1992) Anal. Biochem. 198:268-277)に従い、両方のIgGを表面密度947~1,244RUでCM5センサーチップ(Pharmacia Biosensor社製)のデキストランマトリックスと結合させた。ヒトおよびカニクイザルFcRnの緩衝液を、0.05% Tween 20を含む50mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH6.0、またはpH7.4)に交換した。希釈も同じ緩衝液で行った。結合実験はすべて、通常はFcRn濃度2.86~6 µg/mL、流速5 µL/分、25 °で行った。データを約50分間収集し、表面を再生するために0.05% Tween 20を含むPBS(pH7.4)の1分間のパルス注入を3回行った。FcRnはコーティングしていない細胞上にも流入させ、このブランク測定でのセンサーグラムをIgGを結合させたチップのセンサーグラムから差し引いた。各測定をBIA評価3.1ソフトウェア(Pharmacia社製)を用いて解析した。GraphPad Prism(GraphPad Software社製、カリフォルニア州)を用いて、結合等温線を単一結合部位モデルに適合させることにより解離定数( $K_d$ )を判定した。値を以下の表35で報告する。誤差を2回以上の独立した判定の標準偏差の平均値として推定した。表35に示すように、MEDI-524-YTEではMEDI-524よりもヒトFcRnおよびカニクイザルFcRnへのアフィニティーがそれぞれ11倍および9倍増加する。また、MEDI-524-YTEのヒトFcRnおよびカニクイザルFcRnへの結合はpHに有意に依存しており、pH7.4ではごくわずかし結合しない(図30参照)。

#### 【表35】

表35. MEDI-524およびMEDI-524-YTE変異体のヒトFcRnおよびカニクイザルFcRnへの結合に関する解離定数

分子	$K_d$ -カニクイザルFcRn (nM)	$K_d$ -ヒトFcRn (nM)
MEDI-524	1196 ± 240	2249 ± 84
MEDI-524-YTE	134 ± 7	210 ± 80

#### 【0604】

##### 微量中和アッセイ

微量中和アッセイは、基本的に記載(Johnson et al. (1997) Infect. Dis. 176:1215-1224)に従って実施した。簡単に説明すると、MEDI-524またはMEDI-524-YTEの希釈は96ウェルプレートのウェルをn=4で用いて行った。RSV(ATCC、バージニア州マナッサス)を各ウェルに添加し、5% CO<sub>2</sub>中で37 °で2時間インキュベートした。次に、2 × 10<sup>4</sup>個のHEp-2細胞(ATCC、バージニア州マナッサス)を各ウェルに加え、5% CO<sub>2</sub>中で37 °で5日間インキュベートした。次いで、細胞を0.1% Tween 20を含むPBSで3回洗浄し、アセトン固定した。マウス抗RSVモノクローナル抗体(Chemicon社製、米カリフォルニア州テメキュラ)、およびヤギ抗マウスIgGの西洋わさびペルオキシダーゼ複合体(TAGO社製、カリフォルニア州バーリントンゲーム)と連続的にインキュベートし、ウイルス複製を定量した。3,3',5,5'-テトラメ

チルベンジジン (TMB) でペルオキシダーゼ活性を検出し、2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  で反応を停止させた。吸光度を450nmで測定し、各抗体濃度と対応させてプロットした(図31参照)。図31に示すように、MEDI-524とMEDI-524-YTEの両方のRSV微量中和特性は区別がつかない。

【0605】

#### カニクイザルにおける薬物動態試験

薬物動態(PK)試験をGene Logic(Gene Logic Laboratories社、メリーランド州ゲイサーズバーグ)で実施した。雄のカニクイザル20匹を無作為化し、2試験群の一方に割り付けた。各動物にMEDI-524(第1群)またはMEDI-524-YTE(第2群)を30mg/kgで単回静脈内投与した。0日の投与前、投与から1時間および4時間後、ならびに投与から1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、20、24、31、41および55日後に血液試料を採取した。MEDI-524またはMEDI-524-YTEの血清試料中濃度は抗ヒトIgG酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)により決定した。このアッセイでは、マイクロタイタープレートにコーティングしたヤギ抗MEDI-524抗体(抗イディオタイプ抗体、MedImmune社製)でMEDI-524およびMEDI-524-YTEを捕獲する。結合したあらゆるMEDI-524またはMEDI-524-YTEを、ビオチンを結合させたヤギ抗ヒトIgG抗体を用いて検出する。比色反応の基質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ複合化ストレプトアビジン、その後、テトラメチルベンジジン(TMB)を用いる。対応する血清クリアランス曲線を図32に示す。各投与について、各動物の血清濃度データをノンコンパートメントモデルに適合させた。各薬物動態パラメーターについて記述統計値を算出し、以下の表36で報告する。Wilcoxon検定を用い、2つの投与群間で半減期およびAUC(表36の脚注を参照)を比較した。表36に示すように、第2群の半減期は第1群の半減期のほぼ4倍近かった。同様に、第2群のAUCは第1群のほぼ5倍近かった。Wilcoxon検定からは、投与群間での半減期およびAUCの差は統計的に有意であったことが示されている( $p < 0.001$ )。抗体の最高血清濃度の平均値は第1群と第2群との間で非常に類似しており、これは、MEDI-524およびMEDI-524-YTEが循環血に対して同様の分布をしていることを示す。

【表36】

表36. カニクイザルにおけるMEDI-524およびMEDI-524-YTEの薬物動態パラメーターに関する説明的要約

分子	$\beta$ 相 $t_{1/2}$ <sup>a</sup> (日)	$C_{\text{MAX}}$ <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AUC <sup>c</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ )
MEDI-524	5.7 $\pm$ (1.4)	644 $\pm$ (211)	61172 $\pm$ (15529)
MEDI-524-YTE	21.2 $\pm$ (9.1)	639 $\pm$ (248)	294836 $\pm$ (95212)

<sup>a</sup> 血清濃度半減期

<sup>b</sup> ピーク血清濃度

<sup>c</sup> 無限時間までの血清濃度-時間曲線下面積  
括弧内の数値は標準偏差である。

【0606】

#### 結論

したがって、非常に高活性な抗RSV mAbであるMEDI-524にFc変異M252Y/S254T/T256Eを導入した上記の結果に基づくと、血清中半減期はヒトでも同様に増加すると思われる。非常に高活性なMEDI-524と、Fc変異の半減期延長特性があるその他の高活性な(ならびに/あるいはアフィニティーが高いおよび/またはアビディティーが高い)抗体とを組み合わせることにより、全投与期間中(例えば、RSV流行期間)に、MEDI-524-YTEを含む本発明の修飾抗体の投与を1回または2回しか必要としない持続型薬剤として用いることが可能であると思われる。上記で考察したカニクイザルの試験から、このような構築物(Fc変異を有するMEDI-524(即ち、MEDI-524-YTE))では、野生型抗体MEDI-524よりも血清中半減期が約4倍増加

すること、曲線下濃度(PK)も大幅に(約5倍)増加することが既に示された(図32参照)。また、Fcの変異は微量中和アッセイでのMEDI-524のRSV中和能を変化させず、同種抗原への結合アフィニティーにも影響を及ぼさなかった。

【0607】

#### 6.19 A4b4L1FR-S28R(MEDI-524)修飾抗体の生成

##### 緒言

本試験の目的は、A4b4およびL1FR-528R(MEDI-524)とヒト肺および皮膚組織の凍結切片との潜在的交差反応性を評価することであった。このヒト組織交差反応性試験では、蛍光標識抗体A4b4およびL1FR-528R、即ちA4b4-FITCおよびL1FR-528R-FITCを用いて結合を評価した。

10

【0608】

この組織交差反応性試験で用いる試薬濃度および染色条件を決定する予備試験、ならびに組織交差反応性試験自体は、PAI標準作業書(SOP)およびUS FDAのGLP規制(21 CFR Part 58、およびその後の改訂)の「精神」に従って実施された。但し、本試験は調査研究とみなされ、GLP規制を遵守して実施された。予備試験により決定した試薬濃度は、組織交差反応性試験の陽性対照の再現性により妥当性を確認した。

【0609】

##### 材料および方法

結合を検出するため、非複合化A4b4およびL1FR-S28R、またはFITC複合化A4b4-FITCおよびL1FR-S28R-FITCを2種類の濃度(10 µg/mLおよび1 µg/mL)で正常ヒト組織(1組織につき1供給源)に添加した。剖検または外科生検により以前に採取した組織をTISSUE-TEK(登録商標)O.C.T.培地に包埋し、ドライアイスで凍結して、密閉したビニール袋の中で-70 以下で保存した。組織を約5 µmの切片にし、アセトンで10分間固定して、デシケーターに入れて一晩乾燥させた。染色するまでは、スライドは-70 以下で保管した。染色の直前にもスライドを10% NBFで10秒間固定した。

20

【0610】

スライドにUVで付着させた精製RSV Fを陽性対照として用いた。スライドにUVで付着させた副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)を陰性対照組織として用いた。他の対照は、同じ免疫グロブリンサブクラス(IgG1-)であるが被験物に対する抗原特異性が異なるヒト抗体(陰性対照抗体)の置換により、複合化FITCを用いて、または用いずに作製した。

30

【0611】

##### 抗体および試薬

本試験では以下の試薬を使用した。

【0612】

1.A4b4は、RSV Fタンパク質を標的とするヒトIgG1モノクローナル抗体で、ロット番号1411.153、PAI番号A3911、MedImmune社製(メリーランド州ゲイサースバーグ)である。当分野で公知の常套的方法を用いてA4b4抗体にFITCを複合し、A4b4-FITCと命名した。ロット番号AD290502B、PAI番号A3843である。

【0613】

2.L1FR-S28R(MEDI-524)は、RSV Fタンパク質を標的とするヒトIgG1モノクローナル抗体で、ロット番号1411.142、PAI番号A3912、MedImmune社製(メリーランド州ゲイサースバーグ)である。当分野で公知の常套的方法を用いてL1FR-S28R抗体にFITCを複合し、MEDI-493-FITCと命名した。ロット番号AD290502C、PAI番号A3842である。

40

【0614】

3.陰性対照抗体であるヒトモノクローナルIgG1- 抗体は、ロット番号071K9270、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、PAI番号A3914である。当分野で公知の常套的方法を用いて非複合化陰性対照抗体にFITCを複合し、HuIgG-FITCと命名した。ロット番号AD280602、PAI番号A3870である。

【0615】

4.非複合化マウス抗フルオレセインは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット

50

番号30K4884、PAI 番A3536である。

【 0 6 1 6 】

5. ENVISION(商標)キットは、Dako社製(カリフォルニア州カービンテリア)、ロット番号06220、PAI 番K699である。

【 0 6 1 7 】

6. カゼインは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号4IK0165である。

【 0 6 1 8 】

7. 塩化ナトリウムは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号121K16341である。

【 0 6 1 9 】

8. リン酸水素二ナトリウムは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号91K0117である。

【 0 6 2 0 】

9. リン酸一カリウムは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号101K0025である。

【 0 6 2 1 】

10. 正常ヤギ血清は、Vector Laboratories社製(カリフォルニア州バーリンゲーム)、ロット番号N0805である。

【 0 6 2 2 】

11. アセトンは、VWR社製(ペンシルベニア州ウェストチェスター)、ロット番号421622である。

【 0 6 2 3 】

12. 10% NBFは、EM Science社製(ニュージャージー州ギブスタウン)、ロット番号2145である。

【 0 6 2 4 】

13. -D(+)グルコースは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号111K0024である。

【 0 6 2 5 】

14. ヒト グロブリンは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号12K7603である。

【 0 6 2 6 】

15. グルコースオキシダーゼは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号31K3800である。

【 0 6 2 7 】

16. ウシ血清アルブミンは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号22K1266である。

【 0 6 2 8 】

17. アジ化ナトリウムは、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号41K0236である。

【 0 6 2 9 】

18. Trizma塩基は、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号100K5433である。

【 0 6 3 0 】

19. アビジンビオチンブロッキングキットは、Vector Laboratories社製(カリフォルニア州バーリンゲーム)、ロット番号N0503である。

【 0 6 3 1 】

20. ヤギ抗ヒトIgG抗体(Fc 断片特異的)は、Jackson Laboratories社製(ペンシルベニア州ウェストグロブ)、ロット番号52408である。

【 0 6 3 2 】

21. ABC「Elite」キットは、Vector Laboratories社製(カリフォルニア州バーリンゲーム)、ロット番号 PK-6100、PAI 番号K692である。

10

20

30

40

50

## 【 0 6 3 3 】

22.DAB錠は、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号51K8211である。

## 【 0 6 3 4 】

23. ノルマン(Norman)マウス血清は、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号98F9407である。

## 【 0 6 3 5 】

24. せん断したサケ精子DNAは、Eppendorf社製(ニューヨーク州ウェストベリー)、ロット番号KL176Aである。

## 【 0 6 3 6 】

25. 悪性高カルシウム血症因子(PTHrP)1-34は、Sigma社製(ミズーリ州セントルイス)、ロット番号79H49582である。

10

## 【 0 6 3 7 】

26. 凍結正常ヒト組織は、National Research Disease Interchange(ペンシルベニア州フィラデルフィア)、病理学検査提携先(メリーランド州フレデリック)から入手した。

## 【 0 6 3 8 】

27. 凍結正常コットンラットの組織は、治験依頼者であるMedImmune社(メリーランド州ゲイサースバーグ)から提供された。

## 【 0 6 3 9 】

28. 凍結正常カニクイザルおよびチンパンジーの肺は、病理学検査提携先であるCharles River社(メリーランド州フレデリック)から入手した。

20

## 【 0 6 4 0 】

組織染色法

用いた免疫ペルオキシダーゼ染色法を表37に記す。

## 【 表 3 7 】

表37. 免疫ペルオキシダーゼ染色法-ヒト組織

一次抗体	二次抗体	三次抗体	DAB
1.被験物(MEDI-493-FITC、 A4b4-FITC、またはL1FR-S28R-FITC) (2濃度)	X	X	X
2.陰性対照抗体 (ヒトIgG1κ-FITC) (2濃度)	X	X	X

30

## 【 0 6 4 1 】

間接的な免疫ペルオキシダーゼ手順を行った。アセトン/ホルマリン固定した凍結切片をリン酸緩衝生理食塩水(PBS [0.3M NaCl, pH7.2])で洗浄した。スライドをDako ENVISON(商標)キットに付属のペルオキシダーゼ溶液とインキュベートし、内在性ペルオキシダーゼをブロッキングした。次に、非特異的結合を減少させるようにデザインされたタンパク質ブロック液でスライドを処理した。タンパク質ブロック液は、次のようにして調製した: PBS [0.3M NaCl, pH7.2]、0.5%カゼイン、5%ヒト グロブリン、および1mg/mL熱凝集ヒトIgG(5mg/mL溶液を63℃で20分間加熱し、室温まで冷却して調製)。タンパク質ブロック液の後に、被験物および陰性対照抗体をスライドに室温で1時間添加した。次に、スライドをTBS(0.15M NaCl, pH7.8)で1回、PBS(0.3M NaCl, pH7.2)で2回洗浄し、非複合化二次抗体(マウス抗フルオレセイン)で室温で30分間処理した。次に、スライドをPBS(0.3M NaCl, pH7.2)で2回洗浄し、Dako ENVISON(商標)キットで提供されたペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGポリマーで30分間処理した。次に、スライドをPBS(0.3M NaCl, pH7.2)で2回洗浄し、Dako ENVISON(商標)キットで提供された基質-色原体(DAB)溶液で8分間処理した。すべてのスライドを水で洗浄し、ヘマトキシリンで対比染色し、脱水して、解釈のためにカバースリップをのせた。

40

50

## 【0642】

TBS (0.15M NaCl, pH7.8)+5%ヒト グロブリンをすべての抗体の希釈液として用いた。  
また、1mg/mL熱凝集ヒトIgGを一次抗体希釈液に添加した。

## 【0643】

すべてのスライドを病理学者が観察し、染色された組織または細胞の種類、ならびに染色強度(±[不明確]、1+[弱い]、2+[中等度]、3+[強い]、4+[非常に強い]、Neg[陰性]、に格付け)を識別した。

## 【0644】

## 結果および考察

## ヒト組織の陽性対照および陰性対照

結果を表38に要約する。

## 【表38】

表38. A4b4-FITCおよびL1FR-S28R-FITCと正常ヒト組織との交差反応性

組織	供給源	A4b4-FITC		L1FR-S28R-FITC		陰性対照 α-ヒトIgG-FITC	
		10 μg/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	1 μg/ml
精製RSV F タンパク質 (陽性対照)	RSV F タンパク 質	3-4+	2-3+	3-4+	2-3+	Neg	Neg
精製PTHrP タンパク質 (陰性対照)	PTHrP タンパク 質	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
肺	HT456						
上皮、肺胞、および 細気管支 (膜および細胞質)		2-3+ (高頻度)*	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
内皮 (細胞質)		2-3+ (高頻度)*	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
紡錘/樹状細胞 (細胞質)		2-3+ (ときどき)*	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
その他の要素		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
皮膚	HT545						
上皮、表面および 付属器、基底層 (膜および細胞質)		1-2+ (高頻度)*	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
内皮、皮膚の血管 (細胞質)		1-2+ (高頻度)*	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
その他の要素		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

1+=弱い、2+=中等度、3+=強い、4+=非常に強い、Neg=陰性、\*=特異性が不明確な反応性

## 【0645】

直接免疫ペルオキシダーゼ法を用いて、A4b4およびL1FR-S28R抗体は、スライドにUVで付着させた陽性対照の精製RSV Fを特異的に染色した。陽性対照抗原および組織の要素との反応性は、検討した両方の濃度(10 µg/mL、および1 µg/mL)で[強い] ~ 「非常に強い」であった。

【0646】

A4b4およびL1FR-S28R抗体は、スライドにUVで付着させた陰性対照PTHrPとは特異的には反応しなかった。陰性対照抗体HuIgG1- は、陽性対照抗原(RSV F)または陰性対照抗原(PTHrP)と特異的には反応しなかった。

【0647】

#### ヒト組織での交差反応性

結果を図33に示し、表38に要約する。皮膚および肺の組織では、特異性が不明確なA4b4抗体との交差反応性があると考えられる染色がみられた。このような染色が観察された細胞の種類は、肺では肺胞および細気管支の上皮(10 µg/mLで[中等度] ~ [強い]染色)、皮膚では表面および付属器の上皮(10 µg/mLで[弱い] ~ [中等度]の染色)、皮膚の血管では内皮(10 µg/mLで[弱い] ~ [中等度]の染色)であった。このような染色のほとんどは最高濃度の被験物で観察された。

【0648】

しかし、A4b4の結果とは対照的に、L1FR-S28Rは陰性対照のイソタイプ抗体と同様な組織交差反応性を示した。

【0649】

#### 7. 等価形態

当業者であれば、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態と等価な多くの形態を認識し、または常套的実験を行うだけでその等価形態を確認することができよう。このような等価形態は、添付の特許請求の範囲に含めることを意図している。

【0650】

個々の刊行物、特許または特許出願のそれぞれが本明細書に組み込まれるように、特別におよび個別に指示されているかの如く、同程度に、本明細書で言及した刊行物、特許および特許出願が、本明細書中に参照により組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0651】

【図1】 RSV抗原と結合するモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(A)および重鎖可変領域(B)のアミノ酸配列を示す図であり、それらの活性は、本明細書に記載の方法、または出願人の同時係属の出願第60/168,426号および第60/186,252号、ならびに米国特許第6,656,467号に記載の方法によって増強することができる。参考までに、これはJohnsonら, 1997, J. Infect. Dis. 176:1215-1224、および米国特許第5,824,307号で開示されているパリビズマブ抗体のアミノ酸配列である。ここでは、CDR領域に下線を付けた。下線を付けていない残基はこの抗体の可変領域のフレームワーク(FR)領域を形成する。この抗体では、CDRはマウス抗体に由来し、フレームワーク領域はヒト抗体に由来する。定常領域(図示されず)もヒト抗体に由来する。

【図2】 抗体配列の軽鎖可変領域(A)および重鎖可変領域(B)を示す図である。CDR領域に下線を付け、下線を付けていない残基はこの抗体の可変領域のフレームワークを形成する。この配列では、軽鎖のVH CDR1の最初の4残基、軽鎖FR4の103番目の残基、および重鎖FR4の112番目の残基の配列が、図1Aおよび図1Bで開示されている配列とは異なる。参考までに、これらのVLおよびVHの配列は、IX-493L1FRのVL部およびVH部と同一である(表2参照)。

【図3】 抗RSV抗体A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)およびパリビズマブによる生体外でのRSV(Long株)複製阻害能をRSV微量中和アッセイで比較した、抗RSV抗体A4B4L1FR-S28R(MEDI-524)およびパリビズマブを用いたRSV微量中和アッセイの結果を要約した図である。

【図4】 微量中和アッセイでのA4B4L1FR-S28R(MEDI-524)の生体外でのRSV(Long株)複製阻害能を示すRSV微量中和アッセイの結果を要約した図である。

10

20

30

40








50










【図 5 A】既知の抗RSV抗体パリーブズマブよりも有意に低い用量での、A4B4L1FR-S28R(MED I-524)のコットンラット上気道および/または下気道における生体内でのRSV(Long株)複製阻害能を示す実験結果を要約した図である。

【図 5 B】既知の抗RSV抗体パリーブズマブよりも有意に低い用量での、A4B4L1FR-S28R(MED I-524)のコットンラット上気道および/または下気道における生体内でのRSV(Long株)複製阻害能を示す実験結果を要約した図である。

【図 6】パリーブズマブ、493L1FR、AFFF(1)、およびA4b4のVH領域(A)、およびVL領域(B)のアミノ酸配列の比較を示した図である。Kabat et al. (1991)がSequences of proteins of immunological interest.(米国保健社会福祉省、ワシントンD.C.)第5版で示したCDR領域をイタリック体で示す。 $k_{off}$ が減少する変異を灰色に標示し、 $k_{on}$ が増加する変異は下線が付けられている。

【図 7】 $k_{off}$ および $k_{on}$ の有益な変異(太字で強調)を示す図である。(A)は $k_{off}$ の減少によりFタンパク質へのアフィニティーが増加する、493L1FRの単一変異を示す図である。(B)は $k_{on}$ の増加によりFタンパク質へのアフィニティーが増加する、 $k_{off}$ 改善最良パリーブズマブ変異体AFFF(1)における単一変異を示す図である。AFFF(1)に含まれる4つの有益な $k_{off}$ 変異が灰色の丸で囲まれている。

【図 8】パリーブズマブおよびその変異体のウイルス阻害アッセイ((A)及び(B))およびELISAアッセイ((C)及び(D))の結果を示す図である。(A)は固定化RSV Fタンパク質上での、493L1FRおよび $k_{off}$ 改善パリーブズマブFab変異体の力価測定を示す図である。(B)は $k_{off}$ 改善Fab変異体のFタンパク質への結合のパリーブズマブIgGによる阻害を示す図である。(A)および(B)の両方では、Fab変異体AFFF(1)()、AFSF(黒塗りの三角)、S32A()、493L1FR()、および無関係なFab()を含む細菌のペリプラズム抽出液を材料および方法の記載に従って試験した。阻害試験では、パリーブズマブIgG(1分子につきFab2個)のFab変異体に対するFabモル比をx軸にプロットした。(C)は固定化RSV Fタンパク質上での、パリーブズマブFab、およびその $k_{on}$ 改善Fab変異体の力価測定を示す図である。(D)は $k_{on}$ 改善Fab変異体のFタンパク質への結合のパリーブズマブIgGによる阻害を示す図である。(C)および(D)の両方では、精製されたFab変異体A4b4()、A12a6(黒塗りの丸)、パリーブズマブFab()、および無関係なFab()について試験した。

【図 9】微量中和アッセイの結果から作製した、パリーブズマブおよびその変異体のRSV中和曲線を示す図である。Fab形態(A)、またはIgG形態(B)の数種の $k_{off}$ 改善変異体について、HEp-2細胞でのRSV複製阻害能を測定した。変異体AFFF(1)()、AFSF(黒塗りの三角)、AFFF(1)()、パリーブズマブ()、およびBSA()の力価を測定した。Fab(C)、またはIgG(D)の数種の $k_{on}$ 改善変異体についても測定した。変異体A1e9()、A13c4()、A12a6()、A4b4()、およびパリーブズマブ()の力価を測定した。

【図 10】微量中和アッセイで決定した $IC_{50}$ の減少で示した場合の、 $k_{off}$ 、 $k_{on}$ および抗体の二価性のRSV中和に対する有益な効果の概要を示す図である。(A)はパリーブズマブFabとその $k_{off}$ 改善Fab変異体の $IC_{50}$ を比較した図である。Fab形態では、 $IC_{50}$ と $k_{off}$ との間で強い相関が観察された。 $k_{off}$ が2log減少する組合せ $k_{off}$ 変異体では、パリーブズマブよりもウイルス中和能が約300倍改善している。(B)はパリーブズマブおよびその $k_{off}$ 改善変異体のIgGへの変換を示す図である。二価の結合効果は、パリーブズマブおよびその単一変異 $k_{off}$ 変異体のウイルス中和能を有意に増加させたが、組合せ $k_{off}$ 変異体にはその増加を示さなかった。パリーブズマブIgGおよびその全 $k_{off}$ 変異体の $IC_{50}$ 値は約3nMに集中する。(C)は組合せ $k_{on}$  Fab変異体の $IC_{50}$ を示す図である。これらの変異体では $k_{on}$ が約4~5倍改善した結果、パリーブズマブと比べウイルス中和能が実質的に増強された。これらの $k_{on}$ 変異体間での $IC_{50}$ の差は、部分的にはそれらの $k_{off}$ の差による。 $k_{off}$ が $2.19 \times 10^{-4} s^{-1}$ であった外れ値1つは含めていない。(D)は組合せ $k_{on}$ 改善変異体のIgGへの変換を示す図である。IgGに変換すると、それらのFab形態で認められた差に関わらず、すべての組合せ $k_{on}$ 変異体の $IC_{50}$ 値は約0.1~0.2nMに集中する。この二価の効果は $k_{off}$ 変異体でも同様に観察された。全体的には、 $k_{on}$ が改善した結果、パリーブズマブIgGと比べてウイルス中和能が15~30倍増強された。

10

20

30

40

50



【図 1 1】パリビズマブ、ならびにその $k_{off}$ および $k_{on}$ が最適となる変異体各1つと、アフィニティー精製したFタンパク質およびRSV感染細胞のFタンパク質との結合の比較を示す図である。Fab形態(A)、またはIgG形態(B)の精製パリビズマブ( )、AFFF(1)( $k_{off}$ が改善; )、A4b4( $k_{on}$ が改善; )、および無関係な抗体( )について、IMMULON-1プレート上に100ng/mLで固定化した精製Fタンパク質との結合を測定した。Fab形態(C)、またはIgG形態(D)の同一の抗体について、アセトン固定したRSV Long株感染HEp-2細胞( $1 \times 10^3$ 個/ウェル)のFタンパク質との結合も測定した。

【図 1 2】フローサイトメトリーによって測定した、パリビズマブ、ならびにその最良の $k_{off}$ 変異体および $k_{on}$ 変異体それぞれ1種の各IgGと、RSV感染細胞表面のFタンパク質との結合を示す図である。感染後、各3  $\mu$ g/mLのパリビズマブ、AFFF(1)( $k_{off}$ 変異体)、およびA4b4( $k_{on}$ 変異体)で、HEp-2細胞をRSV Fタンパク質について染色した。

【図 1 3 A】MEDI-524VH部(配列番号48)のヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す図である。CDR配列に下線が付けられている。パリビズマブがMEDI-524とは異なる箇所では、パリビズマブのアミノ酸をMEDI-524の配列の下に示す。鋳型IX-493L1FR(図2も参照)に導入された残基は太字で示す。

【図 1 3 B】MEDI-524VL部(配列番号11)のヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す図である。CDR配列に下線が付けられている。パリビズマブがMEDI-524とは異なる箇所では、パリビズマブのアミノ酸をMEDI-524の配列の下に示す。鋳型IX-493L1FR(図2も参照)に導入された残基は太字で示す。

【図 1 4】健康成人に3mg/kg、15mg/kgまたは30mg/kgを単回静脈内投与した後の平均血清レベルを示す図である。

【図 1 5】ヒトの臨床試験で15mg/kgを月1回筋肉内投与している間のMEDI-524の平均血清トラフ濃度を示す図である。濃度は投与中を通して90%以上の小児で30  $\mu$ g/mL以上が維持され、投与を継続すると予想通りに増加した。

【図 1 6】RSV下気道感染症の小児に3mg/kg、15mg/kg、または30mg/kgのMEDI-524、あるいはプラセボを単回静脈内投与した後のMEDI-524の鼻汁中での薬物動態プロファイルを示す図である。鼻洗浄液中にMEDI-524が存在した対象の割合(%)はMEDI-524投与量と正比例していた。

【図 1 7】指示した用量のMEDI-524またはプラセボ投与後の0日、1日、および2日での小児の鼻汁中のRSVウイルス力価を示す図である。MEDI-524の投与を受けた参加者(各群を一括)(平均=-2.6、SD=1.6)では、プラセボ受容者(平均=-0.9、SD=1.7)よりも試験の0日から1日の間に平均 $\log_{10}$ PFU/mLが有意に減少した( $p < 0.05$ )。

【図 1 8】投与後の0日、1日および2日の組織培養から鼻汁中のRSVが回収された被験者の割合(%)を示す図である。MEDI-524投与患者では、プラセボ投与患者よりも組織培養から鼻汁中のRSVが回収される割合が統計的に有意に低かった。これは、上気道でのMEDI-524の生物活性を示す。

【図 1 9】IgGヒンジ-Fc領域の構造を示す図であり、FcRn受容体との相互作用に關与することが明らかにされている残基の位置を示す(Ghetieら, Immunology Today, 18(12):592-598, 1997)。

【図 2 0 A】ヒンジ領域(配列番号341)、CH2部(配列番号339)、およびCH3部(配列番号340)を含む、ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列(配列番号342)を示す図である。

【図 2 0 B】上記のKabatらのEU指標に従ってアミノ酸残基に番号を振り直した以外は図20Aと同様である図である。太字の領域は、好ましい実施形態のアミノ酸修飾領域である(セクション5.1.1を参照)。

【図 2 1 A】ヒトFcRn(配列番号337)のアミノ酸配列を示す図である。

【図 2 1 B】マウスFcRn(配列番号338)のアミノ酸配列を示す図である。

【図 2 2】ヒトIgG1ヒンジ-Fc領域のアミノ酸配列(配列番号342)を示す図であり、アミノ酸の置換により変異を受ける野生型残基を下線付きの太字で示す。

【図 2 3】ファージディスプレイした修飾ヒンジ-Fcライブラリーのパンニング法を示す概略図である。

10

20

30

40

50

【図 2 4】スクリーニングしたライブラリーの変異位置で選択された変異残基が出現する割合の要約を示す図である。

【図 2 5】(A)は、マウスFcRnと置換M252Y/S254T/T256Eを有する固定化IgG1との結合を示す図である。4,000レゾナンスユニット(resonance units(RU))のIgG1を結合させた表面に、1nM~556nMの10種類の異なる濃度のマウスFcRnを注入した。平衡に達した後、PBS(pH7.4)をパルス注入して残っている結合タンパク質を溶出させた。(B)は、ヒトFcRnと固定化IgG1/M252Y/S254T/T256Eとの結合を示す図である。1,000RUのIgG1を結合させた表面に、71nM~2.86 $\mu$ Mの8種類の異なる濃度のマウスFcRnを注入した。平衡に達した後、PBS(pH7.4)をパルス注入して残っている結合タンパク質を溶出させた。(C)および(D)はそれぞれ、非特異的結合について補正した後の(A)および(B)のデータのスキッチャード解析を示す図である。 $R_{eq}$ は、所与の濃度Cでの補正後の平衡反応である。プロットは線形性を示し、それぞれの相関係数は0.97および0.998である。見かけ上の $K_d$ はそれぞれ24nMおよび225nMである。

10

【図 2 6】(A)~(D)はマウスFcRnと、野生型ヒトIgG1(A)、M252Y/S254T/T256E(B)、H433K/N434F/Y436H(C)、およびG385D/G386P/N389S(D)とのpH6.0およびpH7.4での結合を、非特異的結合について補正した後、BIAcoreを用いて解析した結果をそれぞれ示す図である。1,000RUの野生型IgG1、1,000RUのM252Y/S254T/T256E、955RUのH433K/N434F/Y436H、および939RUのG385D/Q386P/N389Sを結合させた表面にマウスFcRnを濃度1.1 $\mu$ Mで注入した。(E)~(H)は、ヒトFcRnと、野生型ヒトIgG1(E)、M252Y/S254T/T256E(F)、H433K/N434F/Y436H(G)、およびG385D/Q386P/N389S(H)とのpH6.0およびpH7.4での結合を、非特異的結合について補正した後、BIAcoreを用いて解析した結果をそれぞれ示す図である。1,000RUの野生型IgG1、1,000RUのM252Y/S254T/T256E、955RUのH433K/N434F/Y436H、および939RUのG385D/Q386P/N389Sを結合させた表面にヒトFcRnを濃度1.4 $\mu$ Mで注入した。

20

【図 2 7】Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20:2361-2370のヒトIgG1構造に基づく、ヒトIgG1のFc断片表面の空間充填模型を示す図である。Fc-FcRn複合体の安定化による自由エネルギーの増加に従って残基を色分けしてある。赤は、これらの位置での置換はFc/ヒトFcRnの相互作用では少なくとも2.5倍、Fc/マウスFcRnの相互作用では少なくとも5倍のアフィニティーを増加させることが明らかになった残基である。青は、これらの位置での置換はFc-ヒトFcRn、およびFc-マウスFcRnの両方の相互作用で、アフィニティーを2倍未満増加させることが明らかになった残基である。この図はSwiss pdb viewer(Guex and Peitsch, 1997, Electrophoresis 18:2714-2723)を用いて作製した。

30

【図 2 8】野生型定常部を有する抗体(パリビズマブ)( ), または定常部にM252Y/S254T/T256E( ), G385D/Q386P/N389S( ), H433K/N434F/Y436H(黒塗りの丸)の変異を有する抗体の血清濃度([Mab]ng/mL)の経時的(日数)変化を示す図である。抗体濃度は抗ヒトIgGを用いたELISAで測定した。

【図 2 9 - 1】MEDI-524およびMEDI-524-YTEの重鎖のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図である。(A)はMEDI-524の重鎖のヌクレオチド配列を示す図である。(B)はMEDI-524の重鎖のアミノ酸配列を示す図である。(C)はMEDI-524-YTEの重鎖のヌクレオチド配列を示す図であり、M252Y/S254T/T256Eの修飾に相当するヌクレオチド配列に下線が付けられている。(D)はMEDI-524-YTEの重鎖のアミノ酸配列を示す図であり、M252Y/S254T/T256Eの修飾に下線が付けられている。

40

【図 2 9 - 2】図 2 9 - 1 の続きである。

【図 3 0】ヒトおよびカニクイザルのFcRnとMEDI-524-YTEとのpH6.0およびpH7.4での結合のBIAcoreを用いた解析を示す図である。約1,220RUのMEDI-524-YTEを結合させた表面にヒトおよびカニクイザルFcRnを濃度243nMで注入した。

【図 3 1】MEDI-524およびMEDI-524-YTEのRSV微量中和アッセイの結果を示す図である。

【図 3 2】MEDI-524およびMEDI-524-YTEをカニクイザルに30mg/kgで静脈内投与した後のクリアランス曲線を示す図である。各時点の値は、動物10匹での血清濃度の平均値を表す。標準偏差はエラーバーで示す。

【図 3 3】ヒトの皮膚および肺組織が、A4B4抗体との交差反応性を示すが、MEDI-524また

50

【図 3 4】RSV 抗原と免疫特異的に結合する精製抗体の調製に関する概略を示す図である。

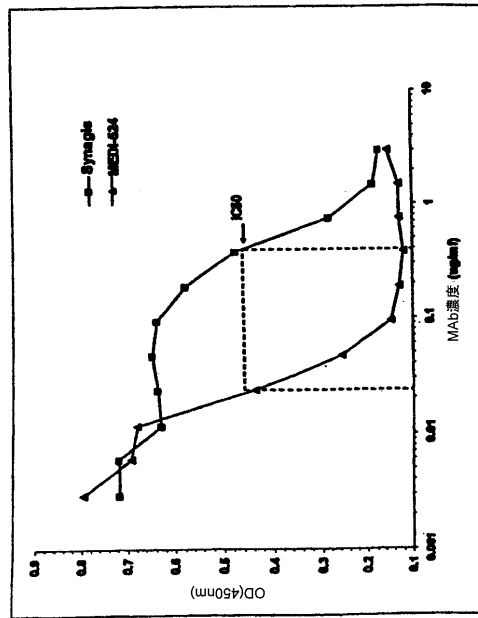
【図 3 5】IgG1 定常部中に M252Y/S254T/T256E の修飾を含む A4B4L1FR-S28R の VH 鎖 (配列番号 254) のアミノ酸配列を示す図である (MEDI-524-YTE)。

A	DIMONTOPST LSASVGDHVT ITCKOLSVGYNH WYOOKPG 40	<u>CDR L1</u>
	KAPKLLY DTKSLAS GVP8R F8G8G8GTEF TLT888LOPD 80	<u>CDR L2</u>
	DFATYYC F8G8GYFFI F8G8TLEIK 108	<u>CDR L3</u>
B	QVTLRESGPA LVKPTOTLT TCTF8GF8LS T8GMSVQ WIR 40	<u>CDR H1</u>
	OPPGKALEWL A DIWWDKDYNP8LS RLT 18KDT8KQV 80	<u>CDR H2</u>
	VLKVTNM8PA DTATTYCAR SMTHWYFDV W Q8T8T8TV8S 120	<u>CDR H3</u>

A	DICMTCBPST	LEASVGDVRYT	ITCSASSSGYMH	HYOQKPG	40
			<u>CDR I1</u>		
	KAPKLLY	DTKLAS	GVP6R	P6000GTTF	80
		<u>CDR I2</u>		TLT8SLQPD	
	DFATYYC	<u>F0GSGTPT</u>	F6GG	TKVEK	108
		<u>CDR I3</u>			
B	QVTLRESGA	LVKPTQTL	TCTSGFELS	TSGMSYG	40
			<u>CDR H1</u>		
	QPPGKALEWL	A	<u>DIWHDKDYHPSLKE</u>	RLT	80
			<u>CDR H2</u>	ISKDTSKNDV	
	VLKVTNMDPA	DTATYYCAR	<u>SMTHNYFDV</u>	WBOGTTVTY8S	120
			<u>CDR H3</u>		

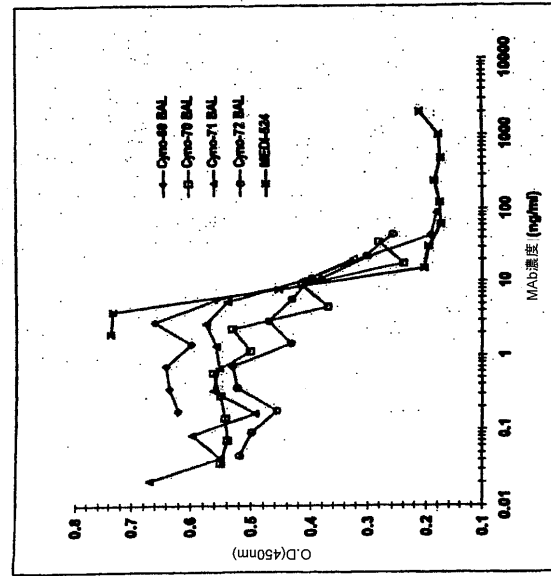
【図 3】

MED-524およびSynagis(登録商標)を用いたRSV微量中和アッセイ



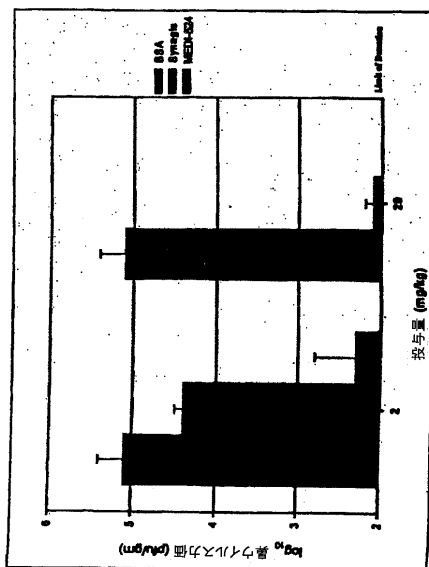
【図 4】

カニクイザルBAL試験を用いたRSV(Long株)微量中和アッセイ



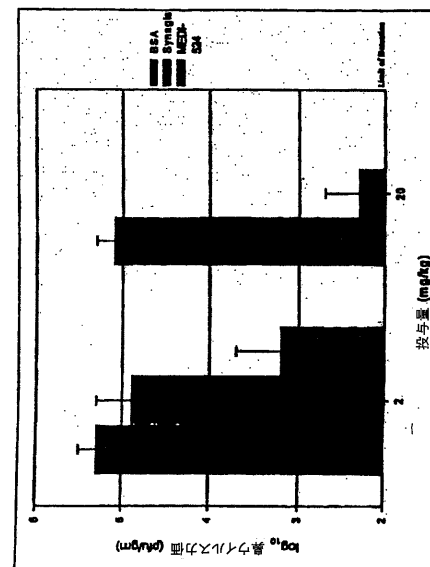
【図 5 A】

コットンラットにおけるRSV(Long株)上気道感染症の筋肉内予防



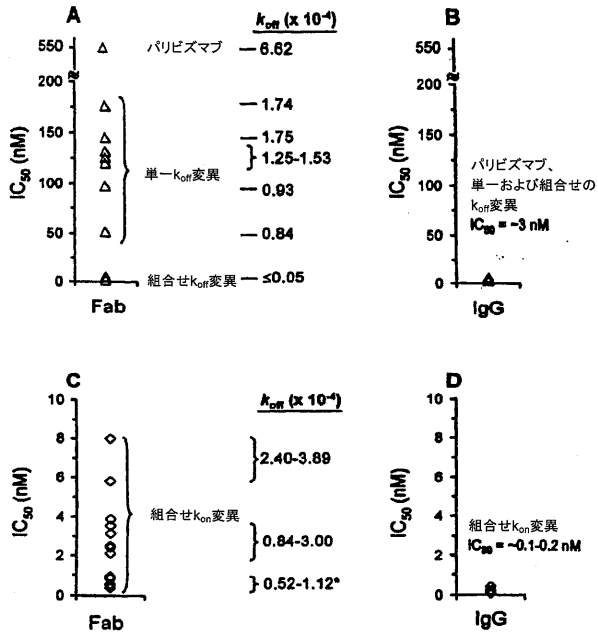
【図 5 B】

コットンラットにおけるRSV(Long株)上気道感染症の筋肉内予防

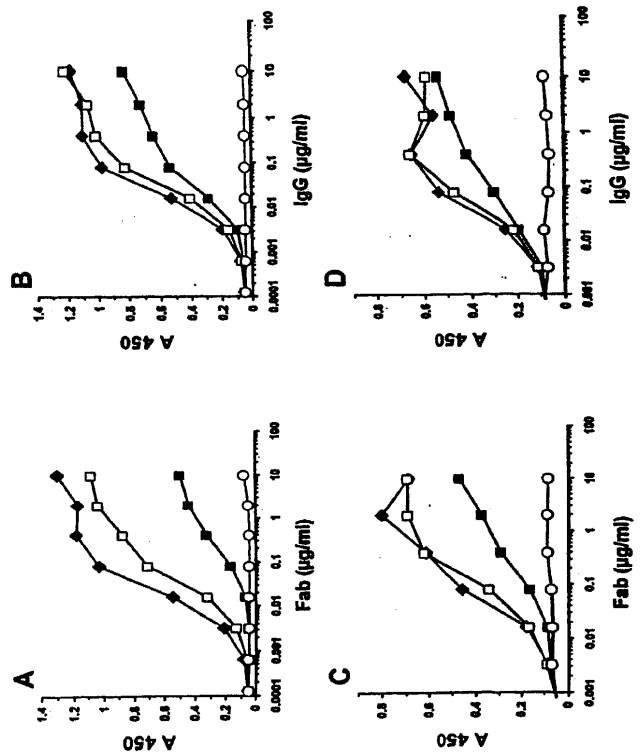




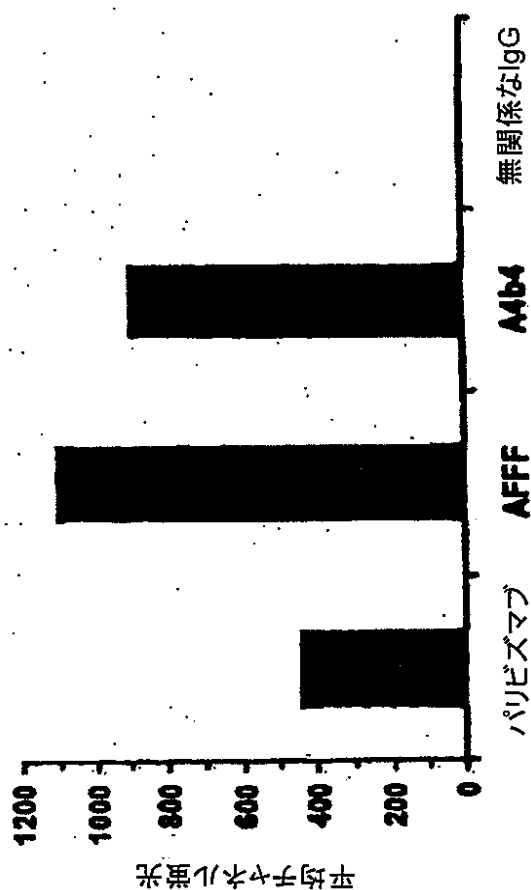
【図10】



【図11】



【図12】



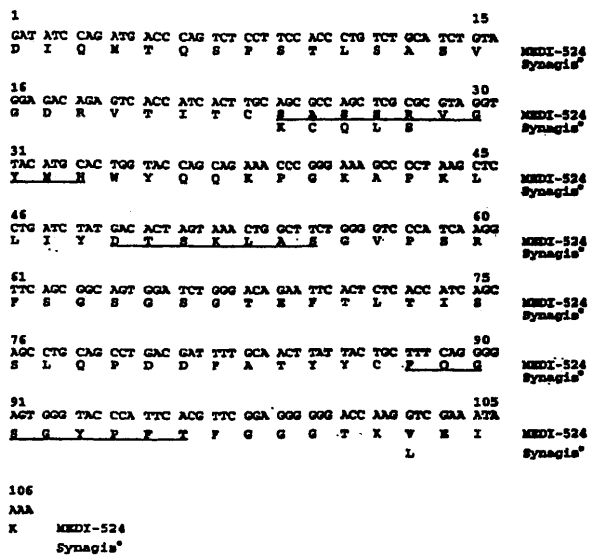
【図13A】

MEDI-524 VHのヌクレオチド配列、および翻訳されたアミノ酸配列

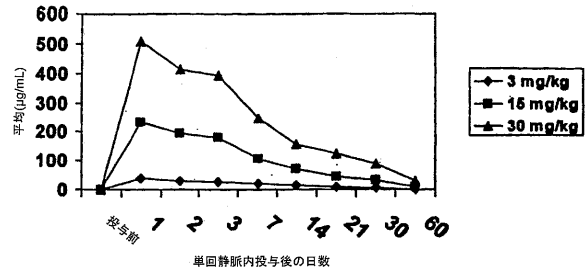
1	CAG GTC ACA CTG AGG GAG TCT GGT CCT GCG CTG GTG AAA CCC ACA	15	Q V T L R E S G P A L V K F T	MEDI-524 Synagis®
16	CAG ACC CTC ACA CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC	30	Q T L T L T C T F S G F S L S	MEDI-524 Synagis®
31	ACT GGC GGT ATG AGT GTA GGC TGG ATT CGT CAG CCC CCA GGG AAG	45	T A G M E V G W I R Q P P G K	MEDI-524 Synagis®
46	GCC CTG GAG TGG CTT GCA GAC ATT TGG TGG GAT GAC AAA AAG CAC	60	A E E W L A D I M M D D K K D	MEDI-524 Synagis®
61	TAT AAT CCA TCC CTG AAG GAC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC	75	X M P S L K D R L T I S K D T	MEDI-524 Synagis®
76	TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT AAA GTG ACC AAC ATG GAC CTT GCT	90	S K N Q V V L K V T N M D F A	MEDI-524 Synagis®
91	GAT ACT GGC ACT TAC TAC TGT GGT CGG GAT ATG ATC TTC AAC TTC	105	D T A T Y Y C A R D M I F M F	MEDI-524 Synagis®
106	TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAG GGG ACC ACG GTC ACC GTG AAG TCA	120	Y F D Y W G Q G T T V T V S S	MEDI-524 Synagis®

【図13B】

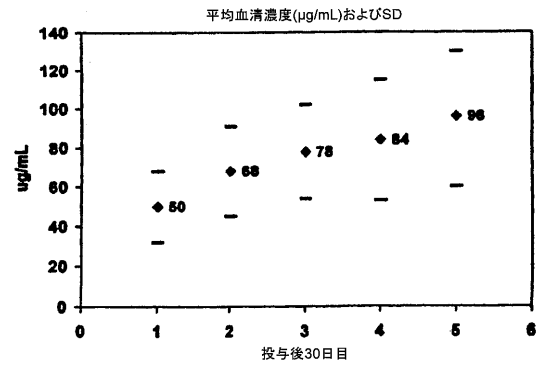
MEDI-524 VLのヌクレオチド配列、および翻訳されたアミノ酸配列



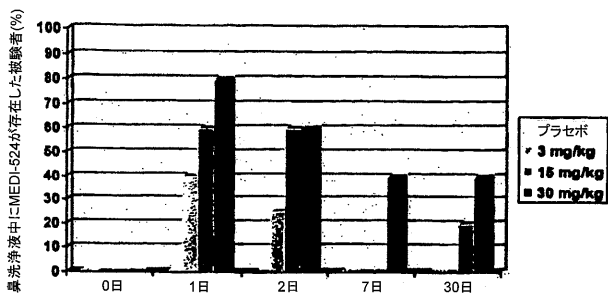
【図14】



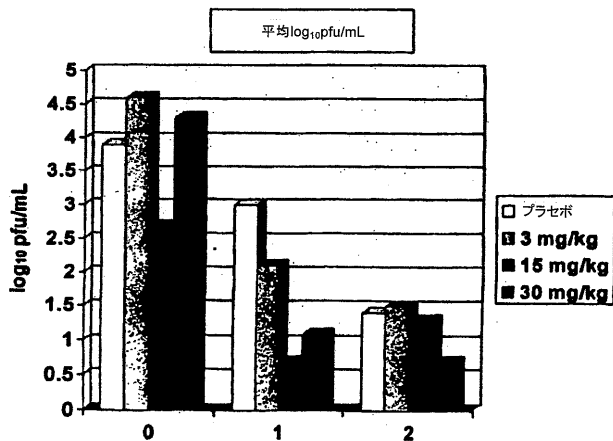
【図15】



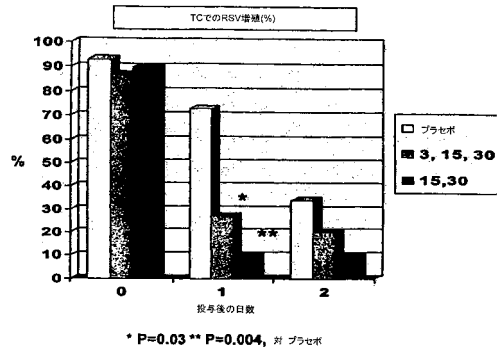
【図16】



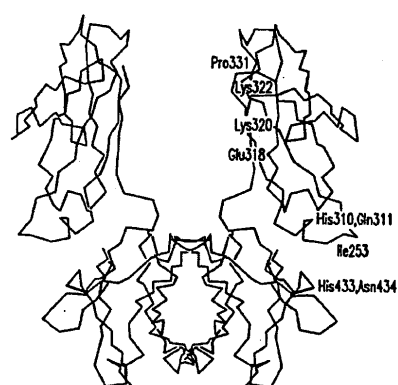
【図17】



【図18】



【図19】



## 【 図 2 0 A 】

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15  
|-----ヒンジ-----|  
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30  
|-----|  
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45  
|-----|  
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60  
|-----CH2-----|  
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80  
|-----|  
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95  
|-----|  
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110  
|-----|  
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125  
|-----|  
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
130 135 140  
|-----|  
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160  
|-----CH3-----|  
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175  
|-----|  
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
180 185 190  
|-----|  
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
195 200 205  
|-----|  
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
210 215 220  
|-----|  
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230  
|-----|

## 【 図 2 1 A 】

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Tyr  
20 25 30  
His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp  
35 40 45  
Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu  
50 55 60  
Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val  
65 70 75 80  
Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys  
85 90 95  
Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr  
100 105 110  
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val  
115 120 125  
Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp  
130 135 140  
Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile  
145 150 155 160  
Ser Gln Arg Trp Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr  
165 170 175  
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg  
180 185 190  
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys  
195 200 205  
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe  
210 215 220  
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu  
225 230 235 240  
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser  
245 250 255  
Phe His Ala Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His  
260 265 270  
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val  
275 280 285  
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val  
290 295 300  
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu  
305 310 315 320  
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg  
325 330 335  
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp  
340 345 350  
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala  
355 360 365

## 【 図 2 0 B 】

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
216 220 225 230  
|-----IgG1ヒンジ-----|  
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
235 240 245  
|-----IgG1 CH2-----|  
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
250 255 260  
|-----IgG1 CH2-----|  
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
265 270 275  
|-----IgG1 CH2-----|  
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
280 285 290 295  
|-----IgG1 CH2-----|  
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
300 305 310  
|-----IgG1 CH2-----|  
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
315 320 325  
|-----IgG1 CH2-----|  
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
330 335 340  
|-----IgG1 CH2-----|  
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
345 350 355  
|-----IgG1 CH3-----|  
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
360 365 370 375  
|-----IgG1 CH3-----|  
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
380 385 390  
|-----IgG1 CH3-----|  
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
395 400 405  
|-----IgG1 CH3-----|  
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
410 415 420  
|-----IgG1 CH3-----|  
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
425 430 435  
|-----IgG1 CH3-----|  
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
440 445  
|-----IgG1 CH3-----|

## 【 図 2 1 B 】

Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu  
1 5 10 15  
Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu  
20 25 30  
Thr Ala Val Ser Asn Pro Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr  
35 40 45  
Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln  
50 55 60  
Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp  
65 70 75 80  
Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Phe  
85 90 95  
Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Lys Ile Leu Asn Gly Thr Tyr Thr  
100 105 110  
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Ser Asp Asn Ser Ser Val  
115 120 125  
Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn  
130 135 140  
Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val  
145 150 155 160  
Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu  
165 170 175  
Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg  
180 185 190  
Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys  
195 200 205  
Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe  
210 215 220  
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu  
225 230 235 240  
Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser  
245 250 255  
Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His  
260 265 270  
Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val  
275 280 285  
Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val  
290 295 300  
Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu  
305 310 315 320  
Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser  
325 330 335  
Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu  
340 345 350  
Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser  
355 360 365

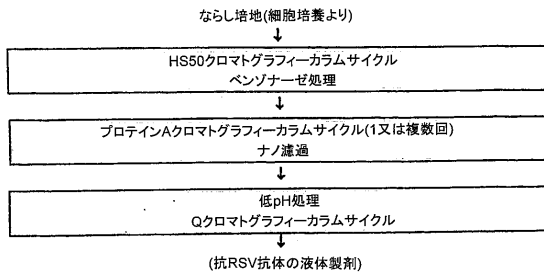








## 【図 3 4】



## 【図 3 5】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Cys Ile  
 245 250 255  
Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly Lys  
 450

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 11/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
	A 6 1 P 11/08	

- (31)優先権主張番号 60/718,719  
 (32)優先日 平成17年9月21日(2005.9.21)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/727,042  
 (32)優先日 平成17年10月14日(2005.10.14)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/727,043  
 (32)優先日 平成17年10月14日(2005.10.14)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

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

- (72)発明者 コナー, エドワード, エム.  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ゴールデン アッシュ ウェイ 2 0 0  
 (72)発明者 ヤング, ジェームズ, エフ.  
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州, ポトマック, リバー ビュー コート 9 9 0 5  
 (72)発明者 ウー, ヘレン  
 アメリカ合衆国 2 0 8 4 1 メリーランド州, ボイズ, ハーヴァースト ムーン ロード 1 4 4 0 5  
 (72)発明者 ダル' アクア, ウィリアム  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, チェスタータウン ストリート 5 6 4

F ターム(参考) 4C076 AA24 BB01 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27 CC07 CC10 CC11  
 CC15 CC18 CC29 CC31 CC35  
 4C084 AA19 MA02 MA13 MA52 MA59 MA66 NA14 ZA342 ZA362 ZA592  
 ZA892 ZB072 ZB332 ZB352 ZC022  
 4C085 AA13 AA14 BA51 BB36 CC05 DD61