

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4881874号
(P4881874)

(45) 発行日 平成24年2月22日 (2012. 2. 22)

(24) 登録日 平成23年12月9日 (2011. 12. 9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
請求項の数 19 (全 55 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2007-545022 (P2007-545022)	(73) 特許権者	000001029
(86) (22) 出願日	平成17年12月5日 (2005. 12. 5)		協和発酵キリン株式会社
(65) 公表番号	特表2008-522610 (P2008-522610A)		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(43) 公表日	平成20年7月3日 (2008. 7. 3)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/IB2005/004146		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02006/061723	(74) 代理人	100096183
(87) 国際公開日	平成18年6月15日 (2006. 6. 15)		弁理士 石井 貞次
審査請求日	平成20年12月3日 (2008. 12. 3)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/633, 846		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成16年12月6日 (2004. 12. 6)	(72) 発明者	加藤 慎一郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 92130 カリフォル
(31) 優先権主張番号	60/724, 198		ニア州, サンディエゴ, コルト アル
(32) 優先日	平成17年10月6日 (2005. 10. 6)		フレスコ 4338
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	ATCC PTA-5967		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザM2タンパク質に対するヒトモノクローナル抗体及びその生産方法及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザA型ウイルスタンパク質M2の細胞外ドメインに存在するエピトープに特異的に結合する単離抗体であって、ATCC PTA-5967として寄託されたCHO細胞又はATCC PTA-5968として寄託されたハイブリドーマにより産生された抗体が特異的に結合するエピトープに結合し、かつATCC PTA-5968として寄託されたハイブリドーマ又はATCC PTA-5967として寄託されたCHO細胞により産生された抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の配列を含む、前記単離抗体。

【請求項2】

配列番号34のアミノ酸残基20～137からなる重鎖可変領域の配列を有する成熟部分と、配列番号35のアミノ酸残基20～130からなる軽鎖可変領域の配列を有する成熟部分とを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

ATCC PTA-5967として寄託されたCHO細胞により産生された抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域及び定常領域の配列を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

ATCC PTA-5968として寄託されたハイブリドーマにより産生された抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域及び定常領域の配列を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項5】

配列番号37のアミノ酸残基20～467からなる重鎖可変及び定常領域の配列を有す

10

20

る成熟部分と、配列番号35のアミノ酸残基20～235からなる軽鎖可変及び定常領域の配列を有する成熟部分とを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項6】

A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 7 又は A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 8 として寄託された C H O 細胞株又はハイブリドーマにより産生された、請求項1に記載の抗体。

【請求項7】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体を発現する宿主細胞。

【請求項8】

A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 7 又は A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 8 として寄託された C H O 細胞株若しくはハイブリドーマにより産生された抗体をコードする核酸。

10

【請求項9】

ベクターをさらに含む、請求項8に記載の核酸。

【請求項10】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体及び抗ウイルス剤を含む組成物。

【請求項11】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体及び製薬上許容される担体又は賦形剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項12】

配列番号：34の20位～137位、配列番号：37の20位～137位、又は配列番号：35の20位～130位のアミノ酸配列で規定される、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする核酸。

20

【請求項13】

配列番号：36又は33で規定の重鎖可変及び定常領域配列、又は軽鎖可変及び定常領域配列をコードする核酸。

【請求項14】

請求項1～6のいずれか1項に記載のヒトM2抗体を生産する方法であって：

a) A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 7 又は A T C C 寄託番号 P T A - 5 9 6 8 として寄託された C H O 細胞株又はハイブリドーマを準備し、ヒトM2抗体を産生させること；及び

b) C H O 細胞株又はハイブリドーマから抗体を単離すること、を含む前記方法。

30

【請求項15】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体をコードする核酸。

【請求項16】

ベクターをさらに含む、請求項15に記載の核酸。

【請求項17】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項18】

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体を含む医薬組成物。

【請求項19】

請求項1～6のいずれか1項に記載のヒトM2抗体を生産する方法であって：

40

a) 請求項7に記載の宿主細胞を準備し、ヒトM2抗体を産生させること；及び

b) 宿主細胞から抗体を単離すること、を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、出願番号60/633,846（2004年12月6日出願）及び出願番号60/724,198（2005年10月6日出願）による優先権の利益を主張するもので、これらの出願は引用により本明細書に明確に含まれているものとする。

【0002】

本発明は、インフルエンザウイルスM2タンパク質に特異的に結合する抗体、より具体的

50

にはヒト抗体、ヒト化抗体及びキメラ抗体に関する。さらに、本発明は最小結合配列がLL TEVETPIR (配列番号1)である抗体、より具体的にはヒト抗体、ヒト化抗体及びキメラ抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

インフルエンザA型又はB型ウイルスは、ほぼ毎年、全ての国で流行する病気で、先進国世界で主な死亡原因となっている。アメリカ合衆国において、インフルエンザが流行すると、例年約20%の人が発症し、そのうち平均20,000人が死亡し、114,000人が入院する。インフルエンザを管理する現時点での対策は、不活化した全ウイルスワクチン又はサブユニットワクチンを毎年、予防接種することである。

10

【0004】

インフルエンザワクチンはインフルエンザ感染に対し予防効果があることが立証されてきた。しかしながら、毎年、循環ウイルス株と同時に、新たなインフルエンザウイルス抗原性変異株について監視する必要がある。新しい変異株を予測することが難しい場合には、ワクチンをタイムリーに生産できずにいた(Fraceら, Vaccine 17:2237 (1999))。最近、南アジアにおけるH5N1等の鳥インフルエンザウイルスの出現により、世界的な鳥インフルエンザの流行が大きな脅威となりつつある。現時点で入手可能なワクチンは、鳥ウイルスに対しておそらく効果がない(Lipatovら, J. Virology 78:8951 (2004)、Osterholmら, N Engl. Med. 352:1839 (2005))。現在のワクチンが抱える第3の問題は、例えば早産児、高齢者、AIDS及び移植患者といった免疫系に欠陥がある特定の集団では、効果がないことである。

20

【0005】

鳥ウイルスに対するワクチンは入手困難であるため、最近では、世界中の国家が抗インフルエンザ薬のタミフル(ノイラミニダーゼ阻害剤)を備蓄し、地球規模のインフルエンザの大流行の可能性に対して対抗しようとしている。該薬剤は現在、供給が不足している。最近、ベトナム在住の14歳の少女で薬剤耐性鳥ウイルスが発見された。タミフルへの耐性も、ヒトインフルエンザで同様に認められている(Mai Leら, Nature 437:1108 (2005))。タミフルが現時点で最も効果がある抗インフルエンザ薬であるため、この排泄ウイルスが他の人々へと感染した場合、問題となる可能性がある。タミフルに関する別の懸念は、タミフルは成人において、現在のインフルエンザ株による軽度の感染から回復を促すことができるが、重度の鳥インフルエンザに対して効果があるかは不明なことである。

30

【0006】

血球凝集素(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)は抗体産生を刺激する主な2つの抗原である。この2つのタンパク質は頻繁に抗原性変異を生じるので、抗体治療薬を開発する上で最適な標的とはならない。A型インフルエンザウイルスの第3膜貫通タンパクであるマトリックスタンパク2(M2)は、ウイルス感染細胞で豊富に発現され、ウイルス複製において、強制的に膜からプロトンを流入させると考えられている(Ciamporら, Virus Research 22:247 (1992)、Grambas and Hay, Virology 190:11 (1992)、Sugrueら, EMBO J. 9:3469 (1990))。HA及びNAと異なり、M2は一定に保たれているため、インフルエンザ患者に対する抗体に基づく受動免疫療法を開発する際、標的となり得る(Itoら, J. Virology 65:5491 (1991)、Slepishkinら, Vaccine 13:1399 (1995)、Neirynckら, Nature Med. 5:1157 (1999))。

40

【0007】

【特許文献1】出願番号60/724,198 (2005年10月6日出願)

【特許文献2】出願番号60/633,846 (2004年12月6日出願)

【非特許文献1】Fraceら, Vaccine 17:2237 (1999)

【非特許文献2】Lipatovら, J. Virology 78:8951 (2004)

【非特許文献3】Osterholmら, N Engl. Med. 352:1839 (2005)

【非特許文献4】Mai Leら, Nature 437:1108 (2005)

【非特許文献5】Ciamporら, Virus Research 22:247 (1992)

50

【非特許文献6】Grambas and Hay, Virology 190:11 (1992)

【非特許文献7】Sugrueら, EMBO J. 9:3469 (1990)

【非特許文献8】Itoら, J. Virology 65:5491 (1991)

【非特許文献9】Slepishkinら, Vaccine 13:1399 (1995)

【非特許文献10】Neirynckら, Nature Med. 5:1157 (1999)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

インフルエンザ感染を予防及び治療する組成物及び方法が提供される。該組成物は、インフルエンザマトリックスタンパク質2であるM2タンパク質をA/PR/8/34、A/HK/1/68及びその他の株／分離株と見分けて認識し、さらに異なるインフルエンザA型株／分離株及びサブタイプに対しても広い反応性を有する完全ヒト、ヒト化及びキメラ（例えば、ヒト／マウスキメラ）モノクローナル抗体を含む。該方法は、インフルエンザと接触、暴露又は感染する前後に、ヒト、ヒト化及びキメラ（例えば、ヒト／マウスキメラ）モノクローナル抗体をインフルエンザマトリックスタンパク質2であるM2タンパク質に結合させる受動免疫法を含む。

10

【0009】

インフルエンザA型に動物を感染させる前後にヒトモノクローナル抗M2抗体を投与する場合、A型インフルエンザウイルス(A/HK/1/68及びA/PR/8/34)による致命的攻撃からマウスを保護することができる。インフルエンザウイルス複製はin vivoで劇的に阻害された。ヒト抗M2抗体には広範囲の抗原特異性を有する抗体が含まれ、多種多様なM2配列に結合することができる。例えば、典型的な抗体は、世界的に流行／流行する可能性がある鳥インフルエンザ分離株から入手した変異株を含めたほとんどのM2配列変異株に結合する。M2変異株ペプチドに広い特異性があるそのようなヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体は、様々なインフルエンザ株／分離株及びサブタイプに対し有益である。

20

【0010】

従って、本発明はインフルエンザウイルスタンパクM2に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体、ヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物等のヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体を含んでなる組成物、及び抗体を含むキットを提供する。本発明のヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体は、感染前（予防として）か感染後に（治療として）インフルエンザを発症した又は発症のリスクがある被験体に対して行うインフルエンザ治療；ウイルス力価を測定することを含むインフルエンザの検出及び診断；全ウイルス又はM2タンパク質を単離又は精製することを含む精製／単離；及び他のアッセイ系において有益である。従って、本発明は該抗体を治療に使用（例えば、インフルエンザ感染に対する治療）する方法、診断など非治療的に使用（サンプル中のインフルエンザ又はM2タンパク質量を検出又は測定）する方法、及び精製（インフルエンザウイルス又はM2タンパク質を精製又は単離）する方法も提供する。

30

【0011】

1態様において、少なくともM2細胞外ドメインの一部（本明細書では、M2細胞外ドメイン(M2e)と称し、互換性をもって使用される）に特異的に結合するヒト抗体が提供される。特別な態様において、細胞外／外部ドメインはアミノ酸配列SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD（配列番号:2）、そのサブ配列、又はそのアミノ酸変異株（例えば、アミノ酸置換、挿入、欠失又は付加したもの）を含む又は該配列からなる。別の態様において、細胞外／外部ドメインは次の配列：

40

SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD（配列番号:3）、SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD（配列番号:4）SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD（配列番号:5）、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD（配列番号:6）、SLLTEVDTLT RNGWGCRCSDSSD（配列番号:7）、SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD（配列番号:8）、SLLTEVETLIRNGW GCRCSDSSD（配列番号:9）、SLLTEVETLTKNWGCRCSDSSD（配列番号:10）、SLLTEVETPIRSEWGC RYNDSSD（配列番号:11）、SLLTEVETPTRNGWECKSDSSD（配列番号:12）、SLLTEVETHTRNGWECKCS

50

DSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDS
SD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDDSSD
(配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCSGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDDSSD (配列番号:26)から選択されるアミノ酸配列を含む又は該配列からなる。さらなる態様において、該抗体は番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生される。

10

【0012】

本発明の抗体には、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体及びそれらの混合物が含まれ、それらはIgG、IgA、IgM、IgE、IgD、及び前記いずれかのアイソタイプであり得、例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4である。モノクローナル抗体の場合、典型的な抗体クラスはIgGである。IgGのサブクラスには、例えばIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が含まれる。抗体には、2つの完全長の重鎖及び2つの完全長の軽鎖 (例えば、重鎖及び軽鎖の可変領域配列の成熟部分)を含み、また同様にM2に特異的に結合する無傷な親抗体の少なくとも一部の機能(M2結合特異性、M2結合親和性、又は抗インフルエンザウイルス活性)を保持する重鎖又は軽鎖のサブ配列/断片を含む、無傷なヒト、ヒト化及びキメラ免疫グロブリン分子が含まれる。サブ配列は、無傷なヒト、ヒト化及びキメラ親抗体と同一又は実質的に同一の結合特性、結合親和性又は抗インフルエンザウイルス活性を有し得る。

20

【0013】

典型的なサブ配列は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、一本鎖Fvs (scFv)、ジスルフィド結合したFvs(sdFv)及びVL若しくはVH、又は他の無傷の免疫グロブリンのM2タンパク質結合断片を含む。従って、本発明の抗体は番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体の重鎖可変領域の配列及び軽鎖可変領域の配列を含む。

30

【0014】

本発明の抗体は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と同一又は実質的に同一の結合特性、親和性、又は抗インフルエンザウイルス活性を有するヒト、ヒト化及びキメラ抗体をさらに含む。特別な実施態様では、番号Z3G1 (ATCC寄託番号; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列であって、少なくとも1つの該M2変異体配列に結合する。さらに特別な実施態様では、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.

40

50

16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と実質的に同一の結合特異性を有する抗体が、番号Z3G1 (ATCC 寄託番号PTA-5967; America American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列であって、少なくとも5~10、10~15、15~20、20~25、又はそれより多い該M2変異体配列に、結合又は弱く結合する。さらに特別な実施態様では、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と実質的に同一の結合特異性を有する抗体は、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列であって、少なくとも10~15、15~20、20~25、又はそれより多い該M2変異体配列に、結合又は弱く結合するが、抗M2抗体L66、N547、C40G1又は14C2抗体が結合するM2配列には結合しないか極弱くしか結合しない。

【0015】

さらなる実施態様において、親和性又は抗インフルエンザウイルス活性は、比較抗体よりも約5~1000倍高い又は低い範囲にある。従って、比較抗体のKdが 10^{-9} Mである場合、例えば本発明の抗体は、Kdの範囲が 10^{-9} Mの5~1000倍高い又は低い抗体を含む。従って、1態様において、抗体は番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体よりも、約5~1000倍高い又は低い範囲の結合親和性を有する。

【0016】

さらなる態様において、抗体は比較抗体と同じエピトープに結合する。従って、1態様において、抗体は番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と同じエピトープに結合する。別の態様において、抗体は番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するエピトープに結合する。さらに別の態様において、抗体は例えば、SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:2)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD (配列番号:3)、SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD (配列番号:4)、SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCRCNDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:12)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:13)、SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:15)、SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:17)、SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:19)。

DSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGS
SD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD
(配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVEHTRNGWGCKCSDSSD (配列番号:25)、SLLPEVETHTRNGWGRCSDSSD (配列番号:26)及びLLTEVETPIR (配列番号:1)で
表されるM2アミノ酸配列のいずれかに存在するエピトープと結合する。

【0017】

本発明の抗体は、M2タンパク質の最小結合配列に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体
をさらに含む。様々な態様において、抗体はLLTEVETPIR (配列番号:1)内の最小結合配列
に結合する。特別な態様において、抗体結合に関する最小結合配列はLLTEVETPIR (配列番
号:1)である。さらなる態様において、ヒトM2抗体の最小結合配列は、LLTEVETPIR (配列
番号:1)と同一又は実質的に同一である。さらに付加的な態様は、次のいずれか：SLLTEVE
TPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:2)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:3)、SLLTEVETPIR
NEWECRCNGSSD (配列番号:4)、SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWG
CRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVDTLTRNGWGRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCNC
SDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRNGWGRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLTKNGWGRCSDSSD
(配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD (配
列番号:12)、SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD (配
列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGRCSDSSD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD (配列
番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGRCSDSSD (配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD (配列番
号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号
:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD (配列番号:2
2)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)
、SLLTGVEHTRNGWGCKCSDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGRCSDSSD (配列番号:26)
における最小結合配列と結合するM2抗体を含む。本発明の抗体は、例示された番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004
年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1) (ATCC寄託番号PTA-5968; American
Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示され
る細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体の機能又は活性
、例えばin vitro若しくはin vivoでウイルス感染を阻害することができ、又はin vitro
若しくはin vivoでM2が細胞(例えば、MDCK細胞)へ結合するのを阻害することができるヒ
ト、ヒト化及びキメラ抗体をさらに含む。様々な態様において、MDCK細胞へのインフルエ
ンザウイルス感染を阻害する抗体のEC50 (50%有効濃度)は、細胞ベースのELISAアッセ
イで測定すると、2.0~3.0、1.0~2.0、0.5~1.0、0.1~0.5未満又は0.1 µg/ml未満(例え
ば、0.05~0.1 µg/ml)である。さらなる態様において、MDCK細胞へのM2結合を阻害する抗
体のEC50は、細胞ベースのELISAアッセイで測定すると、2.0~3.0、1.0~2.0、0.5~1.0
、0.1~0.5未満又は0.1 µg/ml未満(例えば、0.05~0.1 µg/ml)である。さらなる態様にお
いて、インフルエンザウイルスは、A/PR/8/34 (H1N1)又はA/HK/1/68 (H3N2)株/分離株等
のインフルエンザA型ウイルス、又はH1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2
、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N
1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2又はH5N3等の他のサブタイプである。

【0018】

本発明の抗体は、異なるアミノ酸配列(例えば、異なるM2の細胞外／外部(ecto)ドメイ
ン配列、すなわちM2e)を有する2以上のM2タンパク質であって、異なるインフルエンザウ
イルス(例えば、株／分離株又はサブタイプ)上に任意で存在しうる該タンパク質に結合す
るヒト、ヒト化及びキメラ抗体をさらに含む。1実施態様において、該抗体は少なくともM
2細胞外／外部ドメイン配列(M2e)の一部に結合する。特別な態様において、M2e配列は
、アミノ酸配列SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:2)、そのサブ配列又はSLLTEVETPIRS
EWGCRCNDSSD (配列番号:3)等のそのアミノ酸変異株(例えば、アミノ酸置換、挿入、欠失
又は付加したもの)を含む又は該配列からなる。別の特別な態様において、M2e配列は以下
：SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:3)、SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD (配列番号:4)、SL

10

20

30

40

50

PTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLTKNWGCRCSDSSD (配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD (配列番号:12)、SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVEHTRNGWGCKCSDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:26)から選択されるアミノ酸配列を含む又は該配列からなる。本発明の抗体は、例えばオリゴマー化ドメイン(例えば、ロイシンジッパーモチーフ)の共有結合を介して、又は架橋剤(例えば、化学架橋剤)によりオリゴマーを形成するよう改変されたものを含む。したがって、本発明の抗体は多量体、例えば、二量体、三量体、四量体又はそれ以上の多量体のヒト、ヒト化及びキメラ抗体オリゴマーを含む。そのような多量体からなる抗体は通常、モノクローナル抗体と比べ、M2に対しより高い結合活性を示す。

【0019】

本発明の抗体は、M2に結合する抗体上に相異なる機能又は活性を付与する1以上の異種ドメインをさらに含む。1以上のアミノ酸が抗体から区別される(すなわち、それらが天然抗体の一部ではない)場合、該抗体はアミノ酸異種ドメインを含んでいる。1態様において、異種ドメインは、結合タンパク質(例えば、受容体又はリガンド結合)、酵素活性、薬剤、抗ウイルス剤、毒素、免疫調節剤、検出可能な成分又はタグを含む。1態様において、結合タンパク質は、インフルエンザタンパク質M2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体とは異なる結合特異性又は親和性を有する抗体を含む。従って、本発明は多特異性抗体及び多機能性抗体(例えば、それぞれ2以上の抗原に結合する抗体又は2以上の機能又は活性を有するような抗体、すなわち二重特異性抗体及び二機能性抗体)を、さらに提供する。

【0020】

本発明の抗体は、1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプ上に任意で存在するインフルエンザタンパク質M2に結合することができる。したがって、該抗体はM2或いはインフルエンザウイルスの感染力、複製、増殖、若しくは力価、インフルエンザに付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、罹患期間若しくは罹患可能性、又はインフルエンザウイルス感染の感受性、すなわち抗インフルエンザウイルス活性に関して、1以上の効果を有する。

【0021】

1実施態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプにより、*in vitro*若しくは*in vivo*での細胞への感染を阻害する又は*in vitro*若しくは*in vivo*で細胞へのインフルエンザの結合を阻害する。別の実施態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、インフルエンザウイルス力価又は1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプのインフルエンザウイルスタンパク量を減少させる。さらに別の実施態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、インフルエンザウイルス力価又は1以上のインフルエンザ株／分離株若しくはサブタイプのインフルエンザウイルスタンパク量の増加を阻害又は抑制する。さらにもう1つの実施態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、1以上のインフルエンザ株／分離株若しくはサブタイプに被験体が感染するのを予防し、又は該感染に対する被験体の感受性を減少させる。さらなる実施態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプによるインフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症(例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛、又は死亡)の増悪、重症度、罹患期間若しくは罹患可能

10

20

30

40

50

性を減少させる。様々な態様において、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体は、被験体に対し全身投与（例えば、静脈注射、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射）されるか、又は粘膜組織（例えば、鼻腔、副鼻腔、咽喉、喉頭、食道、耳、又は外耳道）若しくは肺へ局所投与される。様々な態様において、インフルエンザはインフルエンザA型であり、インフルエンザA型株はH1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2若しくはH5N3等の、A/PR/8/34（H1N1）又はA/HK/1/68（H3N2）株／分離株又はサブタイプから選択される。

【0022】

本発明のヒト、ヒト化又はキメラ抗体を発現する宿主細胞も提供される。細胞とは、細菌、酵母、植物、動物（例えば、ハイブリドーマ細胞株及びCHO細胞株等の哺乳類細胞）に限らず、非ヒト動物及び本発明のヒト、ヒト化又はキメラ抗体を発現する植物のような全生物の細胞を含む。宿主細胞に抗体を産生させ、それに続いて抗体を任意で単離又は精製させることができる。

【0023】

本発明の抗体をコードする核酸（そのサブ配列／断片及び変異株を含む）がさらに提供される。特別な態様において、核酸は実施例1で規定の重鎖配列又は軽鎖配列（例えば、配列番号：34、35及び37）、及びそのサブ配列（例えば、可変重鎖配列又は軽鎖配列）をコードする。核酸は、クローン化又は核酸の他の遺伝子操作又は溶液、細胞、若しくは任意の生物内での発現に用いるベクターを含む。したがって、核酸は溶液中（例えば、*in vitro* 翻訳）、細胞中（*in vitro*又は*in vivo*）で抗体を産生させることができ、それに続いて抗体を任意で単離又は精製させることができる。

【0024】

本発明の抗体を含む合成組成物も提供される。1実施態様において、組成物はインフルエンザM2タンパク質及び抗ウイルス剤に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を含む。別の実施態様において、組成物は、インフルエンザM2タンパク質に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体、及びインフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症（例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛、又は死亡）を阻害する物質を含む。

【0025】

本発明の抗体、及び製薬上許容される担体又は賦形剤を含んでなる医薬組成物が提供される。1実施態様において、担体は、被験体への全身投与、特定部位への投与、又は粘膜組織（例えば、鼻腔、副鼻腔、咽喉、喉頭、食道、耳、又は外耳道）若しくは肺への局所投与に適している。

【0026】

本発明の抗体を1以上含むキットも提供される。1実施態様において、キットは、被験体への1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプによるインフルエンザウイルス感染に付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、罹患期間若しくは罹患可能性を、（予防又は治療的に）治療、阻害、防止、感染し易さを低減、又は減少させることに關する使用説明書を含む。別の実施態様において、キットは被験体への吸入投与又は鼻腔内投与に適したエアロゾル、スプレー、又は小型容器又は他の投与手段等の製品を含む。さらに別の実施態様において、キット又は製品は、抗ウイルス剤（例えば、抗体又は薬剤）又はインフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症を阻害する物質を含む。

【0027】

被験体へのインフルエンザ感染を治療する方法が提供される。1実施態様において、方法には、被験体に対しインフルエンザ感染に治療有効量のインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を投与することが含まれる。様々な態様において、抗体は実質的には、被験体への感染と同時に又は感染後に、すなわち治療上の処置として投与される。別の実施態様において、該抗体は治療効果をもたらす。様々な実施態様において、治療効果には、インフルエンザ感染の1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、罹患期

10

20

30

40

50

間若しくは罹患可能性、又は1以上のインフルエンザ株のウイルス力価、ウイルス複製、又はウイルスタンパク量を緩和又は減少させることが含まれる。緩和又は減少させることができるインフルエンザ感染の症状及び合併症には、例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛、又は死亡が含まれる。さらに別の態様において、治療効果には被験体がインフルエンザ感染から回復するのを早めること又は促進することが含まれる。

【0028】

1以上のインフルエンザ株又は分離株による被験体への感染を阻害する方法も提供される。1実施態様は、被験体に対しインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体を有効量投与し、被験体への1以上のインフルエンザ株又は分離株の感染を阻害するか又はインフルエンザ感染に対する被験体の感受性を減少させることを含む方法である。様々な態様において、抗体は被験体への感染前（予防として）、実質的には感染と同時に又は感染後に投与される。別の態様において、抗体は治療効果をもたらす。様々な態様において、治療効果には、インフルエンザ感染の1以上の症状又は合併症（例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛、又は死亡）の発症若しくは増悪、重症度、発症頻度、罹患期間又は罹患可能性、1以上のインフルエンザ株若しくは分離株のウイルス力価若しくはウイルスタンパク量、又は1以上のインフルエンザ株若しくは分離株による被験者への感染のし易さを、緩和又は減少させることが含まれる。

【0029】

被験体におけるインフルエンザウイルス力価、ウイルス複製、ウイルス増殖又はインフルエンザウイルスタンパク量の増加を防止する方法が、さらに提供される。1実施態様は、被験体に対しインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体を有効量投与し、被験体におけるインフルエンザウイルス力価、ウイルス複製、又はインフルエンザウイルスタンパク量の増加を防止することを含む方法である。

【0030】

1以上のインフルエンザ株又は分離株による被験体への感染を防止する、又は感染に対する被験体の感受性を減少させる方法、すなわち予防法がさらに提供される。1実施態様は、被験体に対しインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体を有効量投与し、1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプによる被験体への感染を防止する又は感染に対する被験体の感受性を減少させることを含む方法である。1態様において、「防止（又は予防）」にはインフルエンザ感染又はインフルエンザ感染に付随する1以上の症状若しくは合併症（例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛、又は死亡）を緩和又は減少させることが含まれる。

【0031】

本発明方法は、番号Z3G1（ATCC寄託番号PTA-5967；American Type Culture Collection，Manassas，VA，USAに2004年3月13日に寄託された）及び番号Z3G3（Z3.16.25.1）（ATCC寄託番号PTA-5968；American Type Culture Collection，Manassas，VA，USAに2004年3月13日に寄託された）で表示される細胞株（例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株）により産生された抗体の結合特異性又は結合親和性を有する抗体を用いて、実施することができる。被験者への投与前に、抗体を製薬上許容される担体又は賦形剤に含ませることができる。被験体への投与を含む方法には、全身投与、特定部位への投与、又は局所投与が含まれる。

【0032】

治療／予防、診断／検出及び精製／単離することを含む本発明方法は、任意のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプ、株／分離株の組み合わせ、又はサブタイプに適用される。様々な態様において、インフルエンザはインフルエンザA型であり、インフルエンザA型株はH1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2

若しくはH5N3等の、A/PR/8/34 (H1N1)又はA/HK/1/68 (H3N2)株／分離株又はその他のサブタイプから選択される。

【0033】

ヒトM2抗体の生産方法が提供される。1実施態様は、ヒト免疫グロブリンを発現することができる動物（例えば、非ヒト動物）にM2又はその免疫原性サブ配列/断片を投与するステップ；該動物をヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップ；ヒトM2抗体を産生する動物を選別するステップ；ヒトM2抗体を産生する動物から抗体を単離するステップ；及びヒトM2抗体がM2に結合するかどうか確認するステップを含む方法である。別の実施態様は、M2又はその免疫原性サブ配列/断片を、ヒト免疫グロブリンを発現することができる動物（例えば、非ヒト動物）に投与するステップ；該動物をヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップ；ヒトM2抗体を産生する動物を選別するステップ；ヒトM2抗体を産生する動物から脾臓細胞を単離するステップ；該脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマを産生するステップ；及びハイブリドーマをヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップを含む方法である。様々な態様において、M2又はその免疫原性サブ配列/断片は、M2細胞外／外部ドメイン（M2e）を含む又は該ドメインからなる。さらなる態様において、M2eはLLTEVETPIR（配列番号:1）と同一又は実質的に同一のヒトM2抗体の最小結合配列を含む。

【0034】

さらに別の実施態様は、ヒトM2抗体を産生する動物（例えば、非ヒト動物）又は細胞を準備するステップ；及び該動物又は細胞から抗体を単離するステップを含む方法である。そのうえ別の実施態様は、ヒトM2抗体を産生する動物（例えば、非ヒト動物）を準備するステップ；ヒトM2抗体を産生する動物から脾臓細胞を単離するステップ；該脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマを産生するステップ；及びハイブリドーマをヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップを含む方法である。様々な態様において、該動物又は細胞は、番号Z3G1（ATCC寄託番号PTA-5967；American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された）及び番号Z3G3（Z3.16.25.1）（ATCC寄託番号PTA-5968；American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された）で表示される細胞株（例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株）により産生された抗体と同一又は実質的に同一の結合特異性、結合親和性又は抗インフルエンザウイルス活性を有する抗体を発現する。さらなる態様において、該動物又は細胞は、LLTEVETPIR（配列番号:1）と同一又は実質的に同一の最小結合配列を有するM2細胞外ドメインへの結合特異性を有する抗体を発現する。さらなる態様において、該動物又は細胞は、LLTEVETPIR（配列番号:1）を最小結合配列として有するM2細胞外ドメインへの結合特異性を有する抗体を発現する。さらに追加される態様において、該動物又は細胞は、次のいずれか：SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD（配列番号:2）、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD（配列番号:3）、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD（配列番号:4）、SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD（配列番号:5）、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD（配列番号:6）、SLLTEVDTLTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:7）、SLLTEVETPIRK EWGCNCSDSSD（配列番号:8）、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:9）、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:10）、SLLTEVETPIRSEWGCRCYNDSSD（配列番号:11）、SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD（配列番号:12）、SLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD（配列番号:13）、SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD（配列番号:14）、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:15）、SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD（配列番号:16）、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:17）、SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD（配列番号:18）、SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD（配列番号:19）、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD（配列番号:20）、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD（配列番号:21）、SLLTEVETPTRNGWECCRCNDSSD（配列番号:22）、SLLTEVETPIRKWGCNCSDSSD（配列番号:23）、SLLTEVETPTRNEWGCRCSDSSD（配列番号:24）、SLLTGVEHTRNGWCKCSDSSD（配列番号:25）、及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD（配列番号:26）の最小結合配列と結合する抗体を発現する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

発明の詳細な説明

本発明は、少なくとも一部は、ヒト、ヒト化及びキメラ抗M2モノクローナル抗体に基づく。本発明の抗体のいくつかは、インフルエンザA型ウイルス株が異なるために多様化したM2細胞外ドメイン配列に対し、広い反応性を有する。本発明のヒト抗M2モノクローナル抗体の受動投与あるいは移入により、致死量のインフルエンザA/HK/1/68攻撃から、予防(ウイルス感染前)及び治療(ウイルス感染後)マウスインフルエンザモデルの両方において動物が保護された。したがって、本発明の抗体は多岐にわたるインフルエンザ株又は分離株を治療するのに有用である。さらに、本発明のヒト抗体は、反復投与により過感受性を誘発する可能性が低く、被験体(例えば、ヒト)の体内に長時間留まる可能性が高い。

【0036】

したがって、本発明により、インフルエンザM2タンパク質に特異的に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体が提供される。1態様において、インフルエンザタンパク質M2細胞外/外部ドメイン(M2e)に特異的に結合するヒト、ヒト化及びキメラ抗体が提供される。特別な態様において、M2eはアミノ酸配列 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:2)、その配列の一部、又は例えばSLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:3)のような、そのアミノ酸変異株(例えば、アミノ酸置換、挿入、欠失又は付加)を含む。特別な態様において、M2eは以下:SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:3)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:4)、SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCRCSDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD (配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPTRNGWECKSDSSD (配列番号:12)、SLLTEVETHTRNGWECKSDSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKSDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKSDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKNDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKSDSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECKNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVETHTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:26)から選択されるアミノ酸置換を有する。

【0037】

「抗体」という用語は、それぞれ重鎖及び軽鎖の可変領域 V_H 及び V_L を介して他の分子(抗原)に結合するタンパク質を表す。「抗体」は、IgG、IgA、IgM、IgE、IgD等のポリクローナル又はモノクローナル免疫グロブリン分子のいずれか、及びIgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄等のそのサブクラスのいずれかを表す。「抗体」という用語は、別途明確に定義しない限り、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、scFv及びsdFv等の免疫グロブリン分子の機能性断片又はサブ配列も意味する。

【0038】

「M2抗体」又は「抗M2抗体」という用語は、M2細胞外/外部ドメイン等のインフルエンザM2タンパク質に特異的に結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体を意味する。特異的結合は、M2タンパク質に存在するエピトープにより選択される。すなわち、M2以外のタンパク質と結合したとしても、該タンパク質がM2抗体によって認識されるよう、M2タンパク質内のエピトープ又は最小結合配列と類似又は同一のエピトープ若しくは配列を有さない限り、該結合のせいでM2を認識するのが著しく阻害されることはない。選択的結合は、当技術分野で知られるアッセイにより、非選択的結合と区別することができる。

【0039】

「単離された」という用語は、本発明の組成物(例えば、抗体、改変体、サブ配列、同じものをコードする核酸など)の修飾語句として使用される場合、該組成物がin vivo環境で自然発生したものから少なくとも一部分離されるか、又は、人工的に製造されることを意味する。一般的に、単離された組成物は、自然では通常ならば会合する1以上の物質、例えば1以上のタンパク質、核酸、脂質、糖質、細胞膜を実質的に含まない。「単離された」という用語は、ポリペプチド多量体、翻訳後修飾(例えば、リン酸化反応、グリコシ

10

20

30

40

50

ル化)又は誘導体化形態等の別の物理的形態を排除しない。

【0040】

抗体等の「単離された」組成物はまた、自然では通常ならば会合する物質の大部分又は全てを含まない場合、「実質上純粋」でありうる。したがって、実質上純粋でもある単離抗体には、他に何百万もの配列が存在する場合のポリペプチド又はヌクレオチド、例えば、抗体ライブラリーにおける抗体又はゲノムライブラリー若しくはcDNAライブラリーにおける核酸は含まれない。「実質上純粋」な分子は、1以上の他の分子と組み合わせることができるので、「実質上純粋」といった場合、組成物の組合せを排除しない。

【0041】

典型的な本発明のM2抗体は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)である。典型的な重鎖配列及び軽鎖配列は、実施例1に記載のアミノ酸配列(例えば、配列番号:34、35及び37)である。

【0042】

本明細書において、「モノクローナル」という用語は、抗体に関して使用する場合、真核クローン、原核クローン、又はファージクローンを含む単一クローンに基づく抗体、又は該クローンから入手若しくは派生した抗体を意味する。したがって、本明細書において、モノクローナル抗体は構造で定義され、その生産方法では定義されない。本明細書で使用する場合、番号Z3G1、N547、L66及びC40G1等の抗体を産生するハイブリドーマ又は他の細胞株(例えば、CHO)を示す種名、数表示又は他の表示は、抗体を示す場合にも使用され得る。

【0043】

「ヒト」という用語は、抗体に関して使用する場合、抗体のアミノ酸配列が完全にヒトのものであることを意味する。したがって、「ヒトM2抗体」又は「ヒト抗M2抗体」はヒト免疫グロブリンアミノ酸配列、すなわちM2に特異的に結合するヒト重鎖及び軽鎖の可変領域及び定常領域を有する抗体を意味する。つまり、抗体アミノ酸の全てが、ヒト抗体であるか又はヒト抗体内に存在する。したがって、例えば非ヒト抗体は、非ヒトアミノ酸残基をヒト抗体内に存在するアミノ酸残基に置換することにより、完全ヒト抗体にされ得る。当技術分野では、ヒト抗体、CDR領域マップ及びヒト抗体コンセンサス残基に存在するアミノ酸残基が知られている(例えば、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (1987)、及びChothia and Lesk, J.Mol. Biol. 186:651 (1987)を参照されたい)。既知のヒトV_HIII配列22個の調査に基づいたヒトV_HサブグループIIIのコンセンサス配列、及び既知のヒトκI配列30個の調査に基づいたヒトV_Lκ鎖サブグループIのコンセンサス配列が、Padlan Mol. Immunol. 31:169 (1994)、及びPadlan Mol. Immunol. 28:489 (1991)に記載されている。したがって、ヒト抗体には、1以上のアミノ酸残基が他のヒト抗体のいずれかに存在するアミノ酸と置換された抗体が含まれる。

【0044】

抗体に関して使用する場合、「ヒト化」という用語は、抗体のアミノ酸配列が、受容体であるヒト免疫グロブリン分子において所望の抗原(例えば、M2)に特異的に結合する1以上の決定領域(CDR)中に非ヒトアミノ酸残基(例えば、マウス、ラット、ヤギ、ウサギなど)を有すること、及びFvフレームワーク領域(FR)内に1以上のヒトアミノ酸残基(CDRの側面に位置するアミノ酸残基)を有することを意味する。免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域残基は、対応する非ヒト残基で置換され得る。したがって、ヒトフレームワーク領域内の残基を、非ヒトCDRを有するドナー抗体から得た対応する残基で置換し、例えば抗原親和性又は特異性を改変(通常、改良)することができる。さらに、ヒト化抗体には、ヒト抗体でも、ドナーCDR又はフレームワーク配列でも見られない残基を含めることができる。例えば、ヒト抗体又は非ヒトのドナー抗体では見られない特定部位でフレームワーク置換すると、該部位でのヒト抗体の結合親和性又は特異性は改良されると予測される。

分子モデリングに基づく抗体フレームワーク及びCDR置換が当技術分野ではよく知られており、例えば、CDR及びフレームワーク残基の相互関係をモデリングして抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を特定し、配列比較により特定部位において認めないフレームワーク残基を同定する(例えば、U.S. Patent No. 5,585,089、Riechmannら、Nature 332:323 (1988)を参照されたい)。当技術分野において、抗体に関する「霊長類の」は、任意のヒト残基にくわえ、受容体であるヒト免疫グロブリン分子及びフレームワーク領域のアミノ酸残基が、任意の霊長類のアミノ酸残基(例えば、猿人類、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オラウータン、マカク)である場合を除いた、本明細書で使用される「ヒト化」の意味の範囲内にある。

【0045】

本明細書において、「キメラ」という用語及びその文法的に変形した用語は、抗体に関して使用される場合、2以上の異なる種から派生、入手若しくは単離されたタンパク質、又は該種に基づくタンパク質を1以上含む抗体のアミノ酸配列を意味する。すなわち、例えば、抗体の一部がヒト(例えば、定常領域)で、抗体の他の部分が非ヒト(例えば、マウスの重鎖又は軽鎖可変領域)である場合がある。したがって、キメラ抗体は、抗体の様々な部分が異なる種を起源とする分子である。ヒト化抗体と異なり、キメラ抗体は抗体の任意の領域において、異なる種の配列を有し得る。

【0046】

本明細書で使用される場合、「M2」、「M2タンパク質」、「M2配列」及び「M2ドメイン」という用語は、天然の又は人工的に生産された任意のインフルエンザウイルス株又は分離株から単離され、該配列で表される又は該配列内のM2タンパク質配列(例えば、該細胞外ドメインのようなサブ配列)の全て又は一部を意味する。したがって、「M2」等の用語は、遺伝子組換えして又は合成して産生させたM2配列だけでなく、ウイルスライフサイクルで発生した突然変異により産生された又は選択圧(例えば、薬剤療法、宿主細胞の指向性又は感染性の拡大等)に反応して産生された天然由来のM2配列変異株を含む。M2eは、M2配列の細胞外部分又は「細胞外ドメイン」を意味して使用される。

【0047】

「M2ペプチド」という用語は、完全長のM2タンパク質の細胞外アミノ酸配列又は外部ドメイン M2eを意味する。典型的なM2eは、配列SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD(配列番号:2)からなる。さらに典型的なM2e配列は、以下：SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD (配列番号:4)、SLPTE VETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVDTL TRNGWGCRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRNG WGCRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD (配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWGC RYNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPTRNGWECKCDSSD (配列番号:12)、SLLTEVETHTRNGWECKC SDSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKCDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGCRCSD SSD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKCDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSS D (配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKCDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKCDSSD (配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVETHTRNGWGCKCDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:26)からなる。

【0048】

本発明のM2抗体は、κ又はλ軽鎖配列(本明細書で記載される場合、天然由来の完全長抗体、その混合物(すなわち、κ及びλ鎖配列の融合物)、及びそのサブ配列/断片のいずれか)を有する抗体を含む。天然由来の抗体分子は、2つのκ軽鎖及び2つのλ軽鎖を含む。κ軽鎖とλ軽鎖の主な違いは、定常領域の配列にある。

【0049】

本発明のM2抗体は、任意の抗体クラス又はサブクラスに属する。典型的なIgGのサブクラスは、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄である。本発明の抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性及び補体依存性細胞障害(CDC)活性のいずれか又は両方を有する抗体を含み

10

20

30

40

50

、該抗体はA型インフルエンザの治療又は予防に効果があること(すなわち、インフルエンザA型感染細胞又はインフルエンザウイルスA型を殺傷すること)が期待される。IgGサブクラスIgG₁の典型的なM2抗体(Z3G1, ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)は、ADCC及びCDC活性の両方を呈する(例えば、実施例5を参照されたい)。

【0050】

本発明のM2抗体には、本明細書で例に挙げたM2抗体の結合特異性を有する抗体、例えば番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される抗体の結合特異性を有する抗体が含まれる。一態様において、M2抗体は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及びZ3G3(Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で規定の任意の重(H)鎖若しくは軽(L)鎖配列、又はそのサブ配列を含み、ただし、該重鎖若しくは軽鎖配列又は該抗体のサブ配列は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)の結合特異性を有する。

【0051】

「結合特異性」という用語は、抗体に関して使用される場合、比較抗体(コントロール抗体)と同じ抗原エピトープの全体又は一部に、特異的に結合する抗体を意味する。したがって、番号Z3G1と表記される抗体と同じ結合特異性を有するM2抗体は、番号Z3G1と表記される該抗体と同じエピトープの全体又は一部に特異的に結合する。したがって、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と同一のエピトープ又は同一のエピトープの一部に結合する抗体が、提供される。

【0052】

抗原エピトープの「一部」とは、該エピトープのサブ配列又は該エピトープの一部であることを示す。したがって、例えばエピトープが8連続アミノ酸からなるサブ配列を含む場合、エピトープの一部とは、該8アミノ酸のうちの7個以下のアミノ酸のことを示す。さらに、エピトープが不連続アミノ酸配列を有する場合、例えば互いに不連続だが、タンパク質を折り畳んでエピトープやサブ配列を形成する5アミノ酸配列及び8アミノ酸配列を有する場合には、エピトープの一部とは、該5アミノ酸配列又は8アミノ酸配列のみのことを示す。

【0053】

本明細書で例に挙げたM2抗体と同一又は実質的に同一の結合特異性を有する抗体は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)、American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)及び番号Z3G3(Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)と競合して、抗原に結合する。本明細書で例に挙げたM2抗体と同一の結合特異性を有する本発明の抗体は、当技術分野で知られる任意の方法、例えば本明細書で開示されるイムノアッセイにより競合的結合を定量して、特性付けることができる。そのような抗体の結合親和性は、典型的な抗体とは異なるので(すなわち、親和性がより高いか低いので)、該抗体がM2に競合的に結合する能力も異なるであろう。親和性がより高いか低い該抗体は、典型的な抗体と同一又は実質的に同一の結合特異性を有する場合がある。特別な実施態様において、該抗体は、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65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、又は少なくとも30%、又はそれ未満、競合して結合を阻害する。

【0054】

特別な実施態様において、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と同一の結合特異性を有する抗体は、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列の少なくとも1つに結合する。さらに特別な実施態様において、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と実質的に同一の結合特異性を有する抗体は、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列であって、少なくとも5~10、10~15、15~20、20~25、又はそれより多い該M2変異体配列に結合するか弱く結合する。さらに特別な実施態様において、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と実質的に同一の結合特異性を有する抗体は、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株 (例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体が結合するM2変異体配列であって、少なくとも10~15、15~20、20~25、又はそれより多い該M2変異体配列に結合するか弱く結合するが、抗M2抗体L66、N547、C40G1又は14C2抗体が結合するM2配列には結合しないか極弱くしか結合しない。

【0055】

エピトープは通常、短いアミノ酸配列、例えば長さが約5~15個のアミノ酸からなる。エピトープは、実施例3に記載のとおり同定することができる。エピトープを同定する系統的技術も当技術分野ではよく知られており、例えばU.S. Patent No. 4,708,871に記載されている。簡単にいうと、M2抗原 (例えば、M2e) を誘導して重複オリゴペプチドのセットを合成させ、固有のオリゴペプチドが各ピンで固定された固相アレイに、ピンで結合させることができる。ピンで固定されたアレイには、96-ウェル マイクロタイタープレートが含まれ、1プレートで96個のオリゴペプチド全てを同時にアッセイすることができ、例えば、抗M2モノクローナル抗体への結合を定量することができる。別の手段として、ファージディスプレイライブラリーキット(New England BioLabs)を購入することができる。該方法により、連続アミノ酸サブセットの候補となるもの全てについて結合親和性を測定して、特定の抗体が結合するエピトープを同定することができる。エピトープは、エピトープの長さのペプチド配列で、該ペプチド配列に結合する抗体を産生する動物を免疫して、推測して同定することもできる。連続エピトープは、当技術分野で公知のBEPITOPE等

のコンピュータープログラムを用いて、予測することもできる (Odoricoら, J. Mol. Recognit. 16:20 (2003))。

【0056】

Z3G1のM2eの典型的なエピトープは、アミノ酸配列 LLTEVETPIR (配列番号:1)内からなる。番号Z3G1の典型的なエピトープは、次のアミノ酸配列:

SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSD (配列番号:3)、SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD (配列番号:4)、SLPT
EVETPIRNEWGCRCNDSSD (配列番号:5)、SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:6)、SLLTEVDT
LTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:7)、SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD (配列番号:8)、SLLTEVETLIRN
GWGCRCSDSSD (配列番号:9)、SLLTEVETLTKNWGCRCSDSSD (配列番号:10)、SLLTEVETPIRSEWG
CRYNDSSD (配列番号:11)、SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD (配列番号:12)、SLLTEVETHTRNGWECK
CSDSSD (配列番号:13)、SLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD (配列番号:14)、SLLTEVETLTRNGWGCRC
DSSD (配列番号:15)、SLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD (配列番号:16)、SLLTEVETPTRNGWGCRCSDS
SD (配列番号:17)、SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD (配列番号:18)、SLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD
(配列番号:19)、SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD (配列番号:20)、SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (配列番号:21)、SLLTEVETPTRNGWEKRCNDSSD (配列番号:22)、SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD (配列番号:23)、SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (配列番号:24)、SLLTGVEHTRNGWGCKCSDSSD (配列番号:25)及びSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD (配列番号:26)内からもなる。

【0057】

本明細書において、「最小結合配列」という用語は、M2ペプチドに関して使用される場合、抗M2抗体がM2ペプチドに結合するのに最低限必要なM2ペプチドの連続アミノ酸(例えば、配列番号:1)を意味する。最小結合配列は、N末端を切断したM2ペプチド及びC末端を切断したM2ペプチドからなる様々なペプチドを作成し、実施例3に記載の方法により該ペプチドに結合する抗体を測定して、同定する。したがって、最小結合配列は、該ペプチドに抗体を結合させるのに最低限必要なM2ペプチド内の配列のN末端及びC末端ボーダーを表す。実施例3に開示したとおり、Z3G1の典型的な最小結合配列は、LLTEVETPIR (配列番号:1)を含む。

【0058】

最小結合配列 (MBS)は、M2抗体のパラトープが結合するエピトープの全体又は一部を含み、これにより、抗M2抗体を十分に結合することができる。エピトープは、抗体結合を仲介する最小結合配列として、連続又は不連続の3~4以上のアミノ酸配列を含む。

【0059】

「同一の最小結合配列」という用語は、抗体の最小結合配列が比較抗体の最小結合配列と同一であることを意味する。したがってZ3G1と表記される抗体と同一の最小結合配列を有するM2抗体は、Z3G1と表記されるM2抗体と同一の最小結合配列に特異的に結合する。「実質的に同一の最小結合配列」という用語及びその文法的に変形した用語は、比較抗体の最小結合配列と比べ、N末端及び／又はC末端で単一のアミノ酸が付加又は欠失された抗体の最小結合配列を意味する。したがって、Z3G1と表記される抗体と実質的に同一の最小結合配列を有するM2抗体は、Z3G1と表記されるM2抗体と実質的に同一の最小結合配列において、N末端及び／又はC末端で単一のアミノ酸が付加又は欠失された最小結合配列に特異的に結合する。

【0060】

同一又は実質的に同一の最小結合配列に結合する抗体は例示されたものに限定されないが、Z3G1の最小結合配列はLLTEVETPIR (配列番号:1)である。したがってZ3G1と同一の最小結合配列を有する抗体は、最小結合配列としてLLTEVETPIR (配列番号:1)を有するであろう。Z3G1の最小結合配列と実質的に同一の最小結合配列は、例えばLTEVETPI (配列番号:27)、LLTEVETPI (配列番号:28)、SLLTEVETPIR (配列番号:29)、LLTEVETPIRN (配列番号:30)、LTEVETPIR (配列番号:31)等である。したがって、Z3G1と実質的に同一の最小結合配列に結合する抗体は、例えばLTEVETPI (配列番号:27)、LLTEVETPI (配列番号:28)、SLLTEVETPIR (配列番号:29)、LLTEVETPIRN (配列番号:30)、LTEVETPIR (配列番号:31)等のいずれかに結合し得る。したがって、本発明は、本明細書で例に挙げた抗M2抗体Z3G1と同一又

は実質的に同一の最小結合配列を有する抗体を提供する。

【0061】

抗M2抗体と同一又は実質的に同一の最小結合配列を有する別の抗M2抗体を入手するためには、標準的な競合的結合アッセイを用いて、M2ペプチドに対し該抗体と競合して結合する抗体をスクリーニングする。比較抗体と同一又はほぼ同じ結合配列を有するスクリーニングされた抗体は、実施例3に記載の方法により、選択される。Z3G1に関する実施例に限定されないが、第1ステップでは、競合的結合アッセイを用いて、M2ペプチドに対しZ3G1と競合的に結合する抗体を抗M2抗体の中からスクリーニングする。第2ステップでは、Z3G1と同一又は実質的に同一の最小結合配列、すなわち最小結合配列としてLLTEVETPIR (配列番号:1)、又は最小結合配列とほぼ同じ配列として、例えばLTEVETPI (配列番号:27)、L 10
LTEVETPI (配列番号:28)、SLLTEVETPIR (配列番号:29)、LLTEVETPIRN (配列番号:30)、LT
EVETPIR (配列番号:31)等に対し結合する能力を利用して、M2に対しZ3G1と競合的に結合
する抗体を選別する。

【0062】

本発明のM2抗体は、本明細書で例に挙げたM2抗体と同一の結合親和性及び実質的に同一の結合親和性を有するヒト、ヒト化及びキメラ抗体も含む。例えば、本発明のM2抗体は、比較抗体と比べ2～5、5～10、10～100、100～1000又は1000～10,000倍高い若しくは低い親和性、又はそのような範囲内の数値、範囲若しくは値を有する場合がある。したがって、さらなる実施態様において、本発明は番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type 20
Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)と同じ結合特異性を有する重鎖又は軽鎖配列、又はそのサブ配列を提供することにより、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株(例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株)により産生された抗体と同一の結合親和性及び実質的に同一の結合親和性を有するM2抗体を提供する。

【0063】

結合親和性は、結合定数(K_a)及び解離定数(K_d)により決定することができる。親和性平衡定数(K)は K_a/K_d の比で表される。本明細書において、抗体結合親和性に関して「同一の」という用語は、解離定数(K_d)が比較抗体の約1～100倍以内である(比較抗体と比べ、親和性が1～100倍高い又は1～100倍低い、又はそのような範囲内の数値、範囲若しくは値である)ことを意味する。抗体結合親和性に関して使用する場合、「実質的に同一の」という用語は、解離定数(K_d)が比較抗体の約5～5000倍以内である(比較抗体と比べ、親和性が5～5000倍高い又は5～5000倍低い)ことを意味する。本明細書において、抗体結合親和性に関して「同一の」という用語は、結合定数(K_a)が比較抗体の約1～100倍以内である(比較抗体と比べ、親和性が1～100倍高い又は1～100倍低い、又はそのような範囲内の数値、範囲若しくは値である)ことを意味する。抗体結合親和性に関して使用する場合「実 40
質的に同一の」という用語は、結合定数(K_a)が比較抗体の約5～5000倍以内である(比較抗体と比べ、親和性が5～5000倍高い又は5～5000倍低い)ことを意味する。

【0064】

抗体の親和性が低い場合、結合親和性の少なくとも一部は、例えば、1～3倍、1～5倍、2～5倍、5～10倍、5～15倍、10～15倍、15～20倍、20～25倍、25～30倍、30～50倍、50～100倍、100～500倍、500～1000倍、1000～5000倍、又はそれより低い(例えば、 K_d)、又はそのような範囲内の数値若しくは値の範囲であり得る。抗体の親和性が高い場合、結合親和性の少なくとも一部は、例えば、1～3倍、1～5倍、2～5倍、5～10倍、5～15倍、10～15倍、15～20倍、20～25倍、25～30倍、30～50倍、50～100倍、100～500倍、500～1000倍、1000～5000倍、又はそれより高い(例えば、 K_d)、又はそのような範囲内の数値若しくは値の範囲であり得る。 50

【0065】

結合定数(K_a)及び解離定数(K_d)は、表面プラスモン共鳴(SPR)を用いて測定することができる(Rich及びMyszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54 (2000)、Englebienne, Analyst. 123:1599 (1998))。結合率をリアルタイムで検出し、さらにモニタリングする器具及び方法が知られており、購入することができる(BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Sweden、及びMalmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335 (1999))。本明細書で規定される典型的な抗体の K_d 値は、A/PR/8/34又はA/HK/1/68が感染したMDCK細胞表面上のM2抗原の結合部位の半分(50%)を飽和させるのに必要な抗体の濃度と定義される。

【0066】

本発明に含まれる更なる抗体は、番号Z3G1 (ATCC 寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される抗体と同じ結合特異性を有し、M2の結合親和性に関する解離定数(K_d)が、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、及び 10^{-15} Mより低い。本発明にさらに含まれる抗体は、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される抗体が結合するエピトープに結合する。そのうえ、更なる抗体は、細胞ベースのELISAアッセイで測定すると、MDCK細胞に対するインフルエンザA型ウイルスの阻害に関して、EC50が2.0~3.0、1.0 ~2.0、0.5~1.0、0.1~0.5、又は0.1 µg/ml (例えば、0.05~0.1 µg/ml)より低い。

【0067】

本発明のヒトM2抗体は、本明細書における典型的なM2抗体と同じ1以上の抗インフルエンザ活性(例えば、in vitro又はin vivoで細胞へのインフルエンザ感染を阻害する、インフルエンザウイルスの増殖又は複製を阻害させる、インフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症を減少させる、インフルエンザウイルス感染をし難くする、インフルエンザウイルス感染からの回復を促進するなど)を少なくとも一部有する抗体を含む。したがって、本発明のさらなる実施態様において、本発明は番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される抗体と同じ1以上の抗インフルエンザ活性を少なくとも一部有するM2抗体を提供する。

【0068】

「活性」という用語は、比較抗体と比べて抗体を用いる場合、抗体が比較抗体と同じ活性、例えば結合親和性(例えば、 K_d)、結合特異性又は抗インフルエンザ活性のうち少なくとも一部を有することを意味する。したがって、Z3G1と表記されるM2抗体の活性を有する抗体は、Z3G1と表記される抗体の1以上の活性を少なくとも一部有している。「少なくとも一部」という用語は、抗体の活性はより低い、少なくとも測定可能又は検出可能な量の比較M2抗体の活性(例えばM2に対し少なくとも一部の結合親和性、少なくとも一部の抗インフルエンザ活性等)を保持することを意味する。本明細書で例に挙げたM2抗体と同じ1以上の抗インフルエンザ活性の少なくとも一部を有する本発明のヒトM2抗体は、本明細書で例に挙げたM2抗体等の比較抗体よりも高い活性も有し得る。

【0069】

典型的なヒトM2抗体の活性を有する抗体は、本明細書に開示された又は当技術分野で知られる様々な方法により、同定することができる。例えば、被覆抗原とM2タンパク質をプレートに結合させる結合アッセイ(ELISA)、ウイルス感染したMDCK細胞上のM2タンパク質に結合させる結合アッセイ(細胞ベースのELISA)、及びM2ペプチド(M2e)によりウイルス

感染したMDCK細胞上のM2に抗体が結合するのを特異的に阻害することを利用することができる。アッセイには、実施例1、3、及び4に規定したin vivo動物試験のほか、in vitroでのインフルエンザウイルスによる細胞感染性試験(Zebedeeら, J. Virology 62:2762(1988))がさらに含まれる。

【0070】

ヒトポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の生産方法は、本明細書に開示されており、当技術分野において知られている。例えば、本明細書で開示したタンパク質の混合物(KLH又はBSAにコンジュゲートされたM2ペプチド及びM2SGペプチド)を、ヒト染色体を組換えたKMマウス(商標)(WO 02/43478)又はHACマウス(WO 02/092812)を免疫するのに使用した。KMマウス(商標)又はHACマウスはヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する。M2抗原に高い反応を示す免疫マウスから脾臓細胞を単離し、標準的なハイブリドーマ技術により、該脾臓細胞を骨髓腫細胞に融合させた。番号Z3G1と表記される入手したモノクローナル抗体は、M2ペプチド及び／又はM2-BSAコンジュゲートと反応したが、BSA又はKLH担体には結合しなかった。ヒト抗体の生産技術に関する概説は、Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol. 13:65 (1995))に記載されている。内生免疫グロブリンを発現しない1以上のヒト免疫グロブリン遺伝子(κ 又は λ)を有する遺伝子組換え動物が、例えばU.S. Patent No. 5,939,598に記載されている。ヒトポリクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体の生産方法もさらに開示されている(例えば、Kuroiwaら, Nat. Biotechnol. 20:889 (2002)、WO 98/24893、WO 92/01047、WO 96/34096、WO 96/33735、U.S. Patent Nos. 5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016; 5,545,806、5,814,318、5,885,793、5,916,771、及び5,939,598を参照されたい)。

【0071】

M2モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、遺伝子組換え、及びファージディスプレイ技術、又はそれらの組合せを含むその他の技術を用いても、容易に生成することができる(U.S. Patent Nos. 4,902,614、4,543,439及び4,411,993を参照されたい。また、モノクローナル抗体、ハイブリドーマに関してはA New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980, and Harlowらを参照されたい。抗体に関しては、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988を参照されたい)。本発明方法では、M2親和性の精製、非変性ゲルによる精製、HPLC又はRP-HPLC精製、Aタンパク質による精製、又はこれらの技術の組合せを含めた好ましい技術をさらに適用することができる。抗体のアイソタイプはELISAアッセイにより同定することができ、例えばヒトIgはマウスのIg-吸収抗ヒトIgを用いて同定することができる。

【0072】

抗体は当技術分野で知られる様々な技術、例えばCDR-グラフィティング(EP 239,400、WO 91/09967; U.S. Patent Nos. 5,225,539、5,530,101、及び5,585,089)、ベニアリング又はリサーフエリング(EP 592,106、EP 519,596、Padlan, Molecular Immunol. 28:489 (1991)、Studnickaら, Protein Engineering 7:805 (1994)、Roguskaら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:969 (1994))、及び鎖をシャッフリング(U.S. Patent No. 5,565,332)させてヒト化することができる。ヒトコンセンサス配列(Padlan, Mol. Immunol. 31:169 (1994)、及びPadlan, Mol. Immunol. 28:489 (1991))が、以前より抗体をヒト化させるのに使用されてきた(Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)、及びPrestaら, J. Immunol. 151:2623 (1993))。

【0073】

当技術分野では、キメラ抗体の生産方法が知られている(例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985)、Oiら, BioTechniques 4:214 (1986)、Gilliesら, J. Immunol. Methods 125:191 (1989)、及びU.S. Patent Nos. 5,807,715、4,816,567、及び4,816,397)。1つの種の抗体から得た可変ドメインで別の種の可変ドメインを置換したキメラ抗体が、例えばMunro, Nature 312:597 (1984)、Neubergerら, Nature 312:604 (1984)、Sharonら, Nature 309:364 (1984); Morrisonら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)、Bou

lianneら, Nature 312:643 (1984)、Caponら, Nature 337:525 (1989)、及びTrauneckerら, Nature 339:68 (1989))に記載されている。

【0074】

抗体を生産するのに好ましいM2タンパク質を、当技術分野で知られる様々な種類の標準的なタンパク質精製技術又は遺伝子組換え発現技術のいずれかを用いて製造することができる。M2は例えば、固相合成法のような一般的なペプチド合成技術により産生することができる。タンパク質の一部にT7タグ又はポリヒスチジン配列等のアミノ酸配列を含ませることにより、発現又は合成したM2の精製を促進することができる。M2を細胞内で発現させ、該細胞により産生されたタンパク質を精製することができ得る。M2タンパク質は遺伝子組換え法を用いて、より大きなタンパク質の一部として発現させることができる。

10

【0075】

免疫応答を働かせるのに適したM2の形態は、M2e等の完全長のM2のペプチドサブ配列(例えば、一般に長さが4~5個以上のアミノ酸)を含む。M2のさらなる形態としては、M2を発現する細胞若しくはウイルス、又は細胞若しくはウイルスを発現するその調製物だけでなく、M2の一部が精製されたM2を含有する調製物又は抽出物がある。

【0076】

免疫され得る動物には、マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、雌牛又は去勢牛、又はテンジクネズミが含まれ、そのような動物にはヒトIgG遺伝子の遺伝子座を含むように遺伝子組換えされた動物が含まれる。したがって、そのような動物を用いて本発明方法によりヒト抗体を生産させることができる。さらに、オボアルブミン又はキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、サイログロブリン及び破傷風トキソイド、又は完全フロイドアジュバント若しくは不完全フロイドアジュバント等のアジュバントとの混合物のように、別のタンパク質とM2とを連結させて、免疫応答を高めることができる。初回の予防接種及び後続の任意の予防接種は、腹腔内投与、筋肉内投与、眼球内投与、又は皮下投与を投与経路として行うことができる。後続の予防接種は、M2抗原調製物と同一又は異なる濃度のものを使用することができ、定期的又は不定期に行うことができる。

20

【0077】

したがって、別の実施態様において、本発明はインフルエンザウイルスの感染、複製、増殖、若しくは力価を阻害し、又はウイルス複製、増殖若しくは力価の増加を抑制し、又はインフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、罹患期間若しくは罹患可能性、若しくは感染し易さを低減させ、又は様々なインフルエンザウイルス株又は分離株に対し広い感受性を有する等、1以上の抗インフルエンザ活性を有するヒトM2抗体の生産方法を提供する。1実施態様は、M2又はその免疫原性断片を、ヒト免疫グロブリンを発現することができる動物(例えば、マウス、雌牛又は去勢牛)に投与するステップ;該動物をヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップ;ヒトM2抗体を生産する動物を選別するステップ;ヒトM2抗体を生産する動物から抗体を単離するステップ;及びヒトM2抗体がM2に結合するかどうか確認するステップを含む方法である。別の実施態様は、ヒト免疫グロブリンを発現することができる動物(例えば、マウス、雌牛又は去勢牛)にM2又はその免疫原性断片を投与するステップ;ヒトM2抗体を生産するマウスから脾臓細胞を単離するステップ;該脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマを生産するステップ;及びハイブリドーマを、抗インフルエンザ活性を有するヒトM2抗体の発現についてスクリーニングするステップを含む方法である。

30

40

【0078】

本発明は、改変されたヒトM2抗体をさらに提供する。「改変」には、例えば抗体の1以上のアミノ酸置換、付加又は欠失が含まれ、非改変のM2抗体の活性、例えば、結合親和性、特異性、又は抗インフルエンザ活性等の全て又は少なくとも一部を改変抗体に付与することが含まれる。

【0079】

特別な改変の例は、本発明の抗体を改変して、例えば重鎖定常領域の置換により異なるアイソタイプ又はサブクラスをもたらす改変である(例えば、実施例2を参照されたい)。M

50

2抗体Z3のIgサブクラスをIgG3からIgG1に改変すると、抗インフルエンザ活性が改善される。したがって、改変には、抗体からアミノ酸配列の小領域及び大領域を欠失させて、その欠失した領域よりも長さが長い短い別のアミノ酸配列で欠失した領域を置換することが含まれる。

【0080】

本発明に含まれるM2抗体のさらなる改変体は、抗体の誘導体、すなわち任意の分子タイプを抗体に共有結合させたものである。特別な抗体の誘導体としては、例えば保護基／封鎖基及び数多くの化学修飾のうちの任意の修飾によりグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、ホルミル化、ユビキチン化、並びに誘導体化された抗体が含まれる。

【0081】

アミノ酸は、天然のL-アミノ酸がD-アミノ酸に置換される場合を除き、同じアミノ酸で置換することができる。したがって、改変体には1以上のL-アミノ酸に代わり置換されたD-アミノ酸、又はL-アミノ酸に代わり置換されたD-アミノ酸の混合物が含まれる。改変体には、構造及び機能類縁体、例えば合成又は非天然アミノ酸又はアミノ酸類縁体及び誘導体を含むペプチド模倣薬が、さらに含まれる。

【0082】

改変体には、分子のアミノ末端とカルボキシ末端の間の末端間アミド結合、又は分子内外のジスルフィド結合等の環状構造が含まれる。ポリペプチドをin vitro又はin vivoで改変（例えば、翻訳後に改変）させ、例えば糖残基、リン酸基、ユビキチン、脂肪酸、脂質等を含ませることができる。

【0083】

改変体は比較組成物の活性又は機能（例えば、M2への特異的結合）を含む。結合親和性の向上等、特性が改変された改変抗体は、当技術分野で知られる方法により産生することができる。例えば、親和性を成熟させる技術により、抗体結合親和性を改善することができる（US 2004/0162413 A1、U.S. Patent Nos. 6,656,467、6,531,580、6,590,079及び5,955,358、Fiedlerら、Protein Eng. 15:931 (2002)、Pancookら、Hybrid. Hybridomics 20:383 (2001)、Daughertyら、Protein Eng. 11:825 (1998)、Wuら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6037 (1998)、及びOsbournら、Immunotechnology 2:181 (1996)）。

【0084】

タンパク質を改変させ、（例えば、1～3、3～5、5～10又はそれより多い残基の）アミノ酸を置換、付加又は欠失させることができる。特別な場合、これに限定はされないが、置換は保存アミノ酸の置換である。

【0085】

アミノ酸置換は、保存的置換又は非保存的置換で行うことができ、抗体の定常又は可変領域において行われる場合がある。定常又は可変領域では、1又は2～3の保存アミノ酸が置換されやすい。超可変領域では、複数のアミノ酸の非同類置換により結合活性、特異性、又は抗体機能若しくは活性が影響を受けやすい。

【0086】

領域別変異解析により、CDR及びFRドメインにおいて特定の置換がされた場合の効果を予測することができる（Shapiroら、J Immunol. 163:259 (1999)）。簡潔にいうと、配列の比較によりIg イントロンDNA内に存在するジヌクレオチド配列とトリヌクレオチド配列との間の変異が階層的に示され、変異し易い若しくはし難い配列が予測される。定量的構造活性相関(QSAR)により、抗体認識部位の性質、及びリガンド結合に関与するアミノ酸を同定することができる。言い換えれば、QSARに基づいた予測モデルにより、変異の効果を予測することができる。

【0087】

例えば、抗体－抗原相互作用の結合及び解離速度に及ぼす変異効果が、速度定数の両方(K_a 及び K_d)の定量的予測モデルを構築するために、利用されてきた。そして、言い換えれば、抗体における他の変異の効果を予測することができる（De Genstら、J Biol. Chem. 277:29897 (2002)）。

【0088】

置換による効果を分析することにより、非置換の抗体の結合活性、特異性又は抗体の機能若しくは活性の少なくとも一部を保持する抗体を同定することができる。例えば、超可変領域におけるアミノ酸置換に関して、結合活性又は特異性、又は抗インフルエンザ活性を分析することができ得る。アミノ酸が置換された抗体は、置換抗体とすることによって、比較抗体(例えば、非改変ヒトM2抗体)の結合親和性、結合特異性、又は抗インフルエンザ活性の少なくとも一部以上を有するよう維持することができる。

【0089】

「保存的置換」とは1個のアミノ酸を生物学的、化学的又は構造的に類似する残基で置換することを意味する。生物学的に類似するとは、置換により生物学的活性の互換性が得られ、例えばM2に特異的に結合することを意味する。構造的に類似するとは、アミノ酸が同じ長さのアラニン、グリシン及びセリン等の側鎖、又はより小さいサイズの側鎖を有することを意味する。化学的に類似するとは、残基が同じ電荷を有するか、いずれも親水性若しくは疎水性であることを意味する。特別な例は、これに限定されないが、他のアミノ酸に代えイソロイシン、バリン、ロイシン、若しくはメチオニン等の疎水性残基のうちの1つへ置換すること、又はリジンに代えアルギニン、アスパラギン酸に代えグルタミン酸、アスパラギンに代えグルタミン、スレオニンに代えセリンに置換する等、他のアミノ酸に代え極性残基のうちの1つへ置換することなどを含む。

【0090】

改変された抗体は、番号Z3G1と表記されるモノクローナル抗体の配列と50～100%、又は50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。同一性とはタンパク質の一定範囲(領域又はドメイン)を占め得る。

【0091】

「同一性」という用語及びその文法的に変形した用語は、2以上の比較対象が同一であることを意味する。したがって、2つの抗体の配列に「同一性」がある場合、それらは同じアミノ酸配列である。「同一の範囲、領域又はドメイン」とは、2以上の比較対象の一部が同一であることを意味する。したがって、2つの抗体の配列が1以上の配列領域において同一性がある場合、それらはこれらの領域において、同一性を共有していることを意味する。「実質的な同一性」という用語は、構造的又は機能的に顕著に同一性が認められることを意味する。すなわち、同一性があるとは、例えば分子が異なっている、分子が構造的に同一であるとか、少なくとも1つの同じ機能(例えば、M2への特異的結合)を有するといったことを意味する。

【0092】

構造及び機能的に関連があるタンパク質間で、保持される配列量はそれぞれ異なるので、実質的な同一性を有するために必要な同一の配列量は、タンパク質、領域及びその領域の任意の機能によって決まるであろう。タンパク質に関して実質的な同一性があるといった場合、わずか30%しか配列同一性を有さない可能性が考えられるが、一般的には比較配列との同一性はもっとあり、例えば50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%同一性がある。核酸配列において50%以上の配列同一性がある場合、通常、実質的なホモロジーを構成するが、もしあるとすれば比較領域及びその機能によって、再び変化する可能性がある。

【0093】

2つの配列間の同一性の程度は、当技術分野で知られるコンピュータープログラム及び数学アルゴリズムにより解明することができる。配列同一性(ホモロジー)の割合を計算するようなアルゴリズムは、一般的に対照領域との配列ギャップ及びミスマッチを明らかにする。例えば、BLAST(例えば、BLAST 2.0)検索アルゴリズムは、典型的にはミスマッチ -2; gap open 5; gap extension 2のような典型的な検索パラメータを有する。ポリペプチド配列の比較において、BLASTPアルゴリズムは通常、PAM100、PAM250、BLOSUM62又はBLOSUM50等のスコア評価マトリックスと組み合わせて使用される。FASTA(例えば、FASTA2及

びFASTA3)及びSSEARCH配列比較プログラムも、同一性の程度を定量するために用いられる(Pearsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)、Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000)、及びSmithら, J. Mol. Biol. 147:195 (1981))。Delaunay-based位相マッピングを用いたタンパク質構造類似性を定量するプログラムも開発されてきた(Bostickら, Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003))。

【0094】

本発明のヒトモノクローナルM2抗体は、本明細書で規定されるサブ配列(例えば、断片)及び改変形態(例えば、配列変異株)を含む。特別な実施態様において、ヒトM2抗体サブ配列は、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fvs(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合したFvs(sdFv)及びVL又はVHドメイン断片を含む。特別な態様において、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fvs(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合したFvs(sdFv)及びV_L又はV_Hドメインサブ配列は、比較M2抗体(例えば、完全長又は非改変のM2抗体)と同一の結合親和性、実質的に同一の結合親和性、同一の結合特異性、又は1以上の抗インフルエンザ活性、例えば、in vitro又はin vivoで細胞へのインフルエンザ感染を阻害する効果を有する。それぞれM2-結合抗体のサブ配列を結合させることもできる。例えば、V_L又はV_Hサブ配列の組合せをリンカー配列により結合させ、それによりV_L-V_Hのキメラ体を形成することができる。一本鎖Fvs(scFv)サブ配列の組合せをリンカー配列により結合させ、それによりscFv - scFvキメラ体を形成することができる。一本鎖抗体を含むM2-結合抗体のサブ配列は、単独の可変領域、又はヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインから選択される1以上の他のサブ配列の全部若しくは一部と組み合わせた可変領域を有する。抗体が結合するサブ配列にも、ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインと可変領域の任意の組合せが含まれる。

【0095】

本発明のM2抗体のサブ配列(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、sdFv及びVL又はVH)は、抗体のタンパク質加水分解、例えば抗体全体をペプシン又はパパインで消化により、調製することができる。「機能性サブ配列」及び「機能的断片」という用語は、本発明の抗体に関して使用される場合、無傷の比較抗体と同一の1以上の機能又は活性を少なくとも一部保持する抗体の一部分を意味する。

【0096】

ペプシンで酵素的切断をして産生された抗体断片は、F(ab')₂と表記される5S断片をもたらす。チオール還元剤を用いてこの断片をさらに切断して、3.5S Fab'の1価の断片を産生することができる。別の方法では、ペプシンにより酵素的切断をして、2つの1価Fab'断片及びそのFc断片を直接的に産生させる(例えば、U.S. Patent Nos. 4,036,945及び4,331,647、及びEdelmanら, Methods Enzymol. 1:422 (1967)を参照されたい)。抗体を切断する別の方法としては、例えば、重鎖を分離させ1価の軽鎖-重鎖断片を形成させたり、さらに断片を切断したり、又は他の酵素又は化学物質を用いることもできる。遺伝子組換え技術には、M2抗体遺伝子の全部又は一部をCos細胞又はE.coliのような宿主細胞に組み込み、発現させることが含まれる。組換え宿主細胞は、無傷の抗体鎖又はscFvのような一本の抗体鎖を合成する(例えば、Whitlowら, A Comparison to Methods in Enzymology 2:97 (1991)におけるMethod、Birdら, Science 242:423 (1988)、及びU.S. Patent No. 4,946,778を参照されたい)。一本鎖Fvs及び抗体は、U.S. Patent Nos. 4,946,778及び5,258,498、Hustonら, Methods Enzymol. 203:46 (1991)、Shuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995 (1993)、及びSkerraら, Science 240:1038 (1988)に記載の通り、産生させることができる。

【0097】

本発明に含まれるM2抗体のさらなる改変体は、付加/挿入した抗体である。例えば、付加により任意のタイプの分子を抗体へ共有又は非共有結合させることができる。抗体の付加の特別な例には、保護基/封鎖基及び数多くの化学修飾のうちの任意の修飾によるグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、ホルミル化、ユビキチン化、並びに誘導体化が含まれる。

【0098】

付加した配列としては、融合（キメラ）ポリペプチド配列がさらに挙げられ、該配列は天然（野生型）の比較配列には通常存在しない1以上の分子を含むアミノ酸配列が共有結合した配列である。特別な例は、多特異性抗体を産生させる別の抗体のアミノ酸配列である。

【0099】

アミノ酸が付加された改変M2抗体のもう1つの特別な例は、異なる又は相補的な機能を抗体に付与する第2の異種配列、すなわち異種の機能性ドメインが連結された抗体である。例えば、T7又はポリヒスチジンのようなアミノ酸タグをM2抗体へ連結させ、M2又はインフルエンザウイルスの精製又は検出を容易にすることができる。さらに別の例は、M2抗体に連結された抗ウイルス剤であって、該抗ウイルス剤はインフルエンザ感染細胞を標的として、ウイルスの殺傷、増殖阻害、複製阻害などを行う。したがって、他の実施態様において、本発明はM2抗体、及び抗体上の異種ドメイン、すなわち異種の機能性ドメイン、を提供する。

【0100】

異種の機能性ドメインはアミノ酸残基に限定されない。したがって、異種の機能性ドメインは任意の様々な異なる種類の小さな又は大きな機能性部分から構成することができる。そのような部分には、核酸、ペプチド、糖質、脂質、薬剤(例えば、抗ウイルス剤)のような小さな有機化合物、金属(金、銀)等が含まれる。

【0101】

リンカー配列は、抗体の配列と異種機能性ドメインとの間に挿入されるので、この2つの構成要素は、少なくとも一部において、異なる機能又は活性を維持することができる。リンカー配列は、フレキシブルな構造、規則正しい二次構造を形成できない性質、又はいずれかのドメインを促進又は相互に作用することができる疎水性又は荷電した性質を含めた特性を1以上有する。フレキシブルなタンパク質領域において通常見られるアミノ酸には、Gly、Asn及びSerが挙げられる。Thr及びAla等の他のほぼ中性のアミノ酸もまた、リンカー配列の一部として使用され得る。リンカー配列の長さが変化しても、融合タンパク質の機能又は活性には著しくは影響しない(例えば、U.S. Patent No. 6,087,329を参照されたい)。リンカーには、スルホン酸サクシンイミジル誘導体(sulfo-SMCC, sulfo-SMPB)、スベリン酸ジサクシンイミジル(DSS)、グルタル酸ジサクシンイミジル(DSG)及び酒石酸サクシンイミジル(DST)のような化学分子又はコンジュゲート剤がさらに含まれる。

【0102】

さらに、異種の機能性ドメインは例えば検出標識として使用される。したがって、別の実施態様において、本発明は検出可能なように標識されたヒトM2抗体を提供する。

【0103】

検出標識の具体例としては、蛍光プローブ、発色団、放射性同位元素(例えば、S35、P32、I125)、電子密度の高い試薬、酵素、リガンド及び受容体が挙げられる。酵素は通常、その活性により検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは通常、3,3'-、5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)のような基質を定量可能な青色の色素に変化させる能力を利用して検出される。リガンドには他の分子を結合させることができ、例えばビオチンにはアビジン又はストレプトアビジンを結合させることができ、IgGにはAタンパク質を結合させることができる。

【0104】

M2抗体には、2以上の変異体、改変体又は標識体が存在するものと理解できる。例えば、モノクローナル抗体は、検出シグナルをもたらすI125で標識する以外にも、ビオチンと連結させてアビジンでその存在を検出することができる。他の置換体又はとりうる形態は、当業者にとって容易に想到でき、本発明の範囲に包含されるものとみなす。

【0105】

本発明は、本発明のヒトM2抗体をコードする核酸（その改変体、サブ配列／断片、キメラ等を含む）をさらに提供する。特別な実施態様において、核酸は、番号Z3G1（ATCC寄託

10

20

30

40

50

番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表記される無傷の又は一本鎖のM2抗体をコードする。さらなる実施態様において、核酸は、実施例1(配列番号:34、35及び37)で規定される無傷か一本の鎖をコードする。

【0106】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)を含めた核酸の全形態とほとんど同じ意味で使用される。核酸は二本鎖、一本鎖、又は三重らせん、線状又は環状をとり得る。核酸にはゲノムDNA、cDNA、及びアンチセンスが含まれる。RNA核酸はスプライシングした又はスプライシングしてないmRNA、rRNA、tRNA又はアンチセンスであり得る。本発明の核酸には、ヌクレオチド類似体及び誘導体だけでなく、天然や合成の核酸が含まれる。そのような変換又は改変ポリヌクレオチドには、例えばヌクレアーゼ耐性をもたらず類似体が含まれる。

10

【0107】

核酸は任意の長さを取り得る。例えば、番号Z3G1 (ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)の任意のサブ配列は、1以上の抗インフルエンザ活性を有するタンパク質をコードする。特定の態様において、核酸は実施例1で規定される重鎖配列及び軽鎖配列(配列番号:32、33及び36)を含む。別の特定の態様において、核酸は実施例1で規定される重鎖配列及び軽鎖配列(配列番号:34、35及び37)を含む。

20

【0108】

遺伝情報を縮重した結果として、核酸には、番号Z3G1 (ATCC 寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)をコードする配列、そのサブ配列及び本明細書で規定の改変形態に関する縮重配列が含まれる。

【0109】

核酸は、任意の様々な周知の標準的クローニング方法及び化学合成方法により製造することができ、当業者に知られる部位特異的突然変異誘発法又は他の組換え技術により意図的に改変することができる。ポリヌクレオチドの純度は配列決定、ゲル電気泳動等により定量することができる。

30

【0110】

本発明の核酸は、核酸発現に作用する核酸構築物へ挿入されるか、又は本明細書において「発現カセット」を意味する「発現制御エレメント」により調整され得る。「発現制御エレメント」という用語は、核酸配列の発現を調整するか発現に影響する1以上の核酸配列エレメントを意味し、該エレメントは作用できるように該配列に連結される。発現制御エレメントでは、適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、遺伝子サイレンサー、タンパク質をコードする遺伝子の前に開始コドン(例えば、ATG)等が含まれ得る。

40

【0111】

核酸配列に作用できるように連結された発現制御エレメントは、核酸配列の転写、必要に応じて翻訳を調整する。「作用できるように連結された」という用語は、意図したように機能する関係をもつよう並べたことを意味する。通常、発現制御エレメントは遺伝子の5'又は3'末端に並列されるが、イントロンであってもよい。

【0112】

発現制御エレメントには、構造的に転写を活性化するエレメントが含まれ、該エレメントは誘導性を有し(すなわち、活性化するのに外部からのシグナルを必要とし)、又は抑制性をもたない(すなわち、転写を止めるためにはシグナルを必要とする;したがって、シグナルがもはや存在しなくなった場合には、転写が活性化されるか「抑制されなくなる」

50

)。本発明の発現カセットには、特異的な細胞型又は組織において遺伝子発現を制御するのに十分な制御エレメント(すなわち、組織特異的制御エレメント)も含まれる。通常、そのようなエレメントはコードする配列の上流又は下流(すなわち、5'末端及び3'末端)に配置される。プロモーターは通常、コードする配列の5'末端に位置する。組換えDNA又は合成技術により産生されたプロモーターを、本発明のポリヌクレオチドの転写に用いることができる。「プロモーター」は、直接転写するのに十分な最小配列エレメントを意味する。

【0113】

本発明の核酸は、増殖のためにプラスミドに挿入され、必要であれば次の遺伝子操作で宿主細胞へ挿入され得る。プラスミドは、宿主細胞において安定して増殖可能な核酸であり；プラスミドは必要に応じて、宿主細胞でM2抗体をコードする核酸の発現を誘発する発現制御エレメントを含む場合がある。本明細書において、ベクターはプラスミドと同義で用いられ、宿主細胞で発現させる場合は発現制御エレメントも含み得る。プラスミド及びベクターは通常、細胞内で増殖するために少なくとも複製起点、及びプロモーターを有する。したがって、プラスミド及びベクターは、例えば細胞又は生物内で抗体をコードする核酸を遺伝子操作、M2抗体又はアンチセンスを産生、及びM2抗体を発現させるのに有用である。

10

【0114】

抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする又は完全長抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、ハイブリドーマから単離することができる。単離された核酸を、好ましい発現ベクターに挿入し、好ましい宿主細胞(酵母又はCHO細胞等)へ導入し、さらに培養して組換えM2抗体を産生させることができる。

20

【0115】

細菌系プロモーターには、T7及びバクテリオファージλのpL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac ハイブリッドプロモーター)等の誘導性プロモーター、及びテトラサイクリン応答性プロモーターが含まれる。昆虫細胞系プロモーターには構造又は誘導性プロモーター(例えば、エクジソン)が含まれる。哺乳類細胞用の構造プロモーターには、SV40、RSV、ウシ・パピローマウイルス(BPV)及び他のウイルスプロモーター、又は哺乳類細胞の遺伝子(例えば、メタロチオネインIIAプロモーター;熱ショックプロモーター)若しくは哺乳類ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;誘導性マウス乳癌ウイルスの長い末端反復)から誘導された誘導性プロモーターが含まれる。他に、レトロウイルスゲノムを遺伝子組換えし、適当な宿主細胞においてM2抗体の発現を導入および誘発することができる。

30

【0116】

発現系には、in vivoで使用するために設計されたベクターがさらに含まれる。特別な実施例はこれに限定されないが、アデノウイルスベクター(米国特許番号5,700,470及び5,731,172)、アデノ随伴ベクター(米国特許番号5,604,090)、単純ヘルペスウイルスベクター(米国特許番号5,501,979)、レトロウイルスベクター(米国特許番号5,624,820、5,693,508及び5,674,703)、BPVベクター(米国特許番号5,719,054)及びCMVベクター(米国特許番号5,561,063)を含む。

40

【0117】

酵母ベクターには、構造及び誘導性プロモーターが含まれる(例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988、Grantら、Methods in Enzymology, 153:516 (1987), eds. Wu & Grossman、Bitter Methods in Enzymology, 152:673 (1987), eds. Berger & Kimm el, Acad. Press, N.Y.、及びStrathernら、The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I及びIIを参照されたい)。酵母用としては、ADH又はLEU2のような構造プロモーター、又はGALのような誘導性プロモーターを使用することができる(R. Rothstein In: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol.11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986)。例えば、相同的組換え

50

えにより酵母染色体へ外来核酸配列を融合させるベクターが、当技術分野では知られている。挿入するポリヌクレオチドが、通常のベクターには大きすぎる(例えば、約12 kbより長い)場合、酵母人工染色体(YAC)が通常使用される。

【0118】

ヒトM2抗体をコードする核酸を含む宿主細胞もまた提供される。1実施態様において、該宿主細胞は原核細胞である。別の実施態様において、宿主細胞は真核細胞である。様々な態様において、真核細胞は酵母又は哺乳類(例えば、ヒト、霊長類等)の細胞である。

【0119】

本明細書で使用する場合、「宿主細胞」とは核酸を導入して、増殖、転写、又はコードするM2抗体を発現させることができる細胞である。該用語には、宿主細胞の子孫又はサブクローンも任意で含まれる。複製及び増殖する過程で突然変異が起こりうるため、子孫細胞及びサブクローンは、親細胞と全く同じである必要はない。いずれにせよ、そのような細胞は本発明の宿主細胞とみなされる。

【0120】

宿主細胞にはこれに限定されないが、細菌又は酵母のような微生物が含まれ、また植物、昆虫及び哺乳類の細胞が含まれる。例えば、組換えバクテリオファージ核酸、プラスミド核酸又はコスミド核酸発現ベクターで形質転換させた細菌;組換え酵母発現ベクターで形質転換させた酵母;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)やタバコ・モザイク・ウイルス(TMV))に感染させた又は組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換させた植物細胞系;組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロ・ウイルス)に感染させた昆虫細胞系;及び組換えウイルス発現ベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニア・ウイルス)に感染させた動物細胞系、又は安定した発現のために改変し形質転換させた動物細胞系が提供される。

【0121】

発現ベクターに、選択圧又は同定マーカー(例えば、 β -ガラクトシダーゼ)への抵抗性を比較できる選択可能なマーカーを含めることもでき、それにより該ベクターを有する細胞を選択的に成長及び増大させることができる。他に、1つの本発明のポリヌクレオチドを含む第1のベクターが存在する宿主細胞に、選択可能なマーカーをもつ第2のベクターを組み入れ、共トランスフェクトさせることができる。

【0122】

多数の選択系を利用することができるが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wiglerら, Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Szybalskaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962))、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら, Cell 22:817 (1980))遺伝子をそれぞれ、tk-、hgp^{rt}-又はap^{rt}-細胞に使用することができる。また、代謝拮抗物質耐性を、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr(0'Hareら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981));ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt遺伝子(Mulliganら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981));アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するネオマイシン遺伝子(Colberre-Garapinら, J. Mol. Biol. 150:1(1981));ピューロマイシン;及びハイグロマイシンに対する耐性を付与するハイグロマイシン遺伝子(Sant erreら, Gene 30:147 (1984))の選択の基礎として利用することができる。さらに選択可能な遺伝子には、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にするtrpB;細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にするhisD(Hartmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988));及びオルニチン脱炭酸酵素阻害剤である2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン, DFMO (McConlogue (1987) In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory)に対する耐性を付与するODC(オルニチン脱炭酸酵素)などが挙げられる。

【0123】

インフルエンザウイルス感染の治療法には、被験体に対し、被験体のインフルエンザ感

10

20

30

40

50

染に治療有効量のインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を投与することが含まれる。該抗体は、感染前すなわち予防的に、感染と実質的に同時に、又は被験体への感染後すなわち治療処置として投与することができる。

【0124】

本発明の方法は、例えば、インフルエンザ感染に付随する1以上の症状若しくは合併症の増悪、重症度、罹患期間若しくは罹患可能性を緩和若しくは減少させること、又は1以上のインフルエンザ株若しくは分離株のウイルス力価、ウイルス複製、ウイルス増殖、又はウイルスタンパク量を緩和若しくは減少させること、或いは該症状を安定させること（すなわち、インフルエンザウイルス感染に付随する症状若しくは合併症の悪化、又は感染の悪化を抑制又は阻害すること）などの治療効果をもたらす。インフルエンザウイルス感染に付随する症状又は合併症のうち、該感染の増悪、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性を緩和又は減少させることができるものとしては、例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、又は耳痛が挙げられる。治療効果には、被験体がインフルエンザウイルスに感染し難くすること、又は被験体がインフルエンザウイルス感染から回復するのを早めるか又は促進することも含まれ得る。

【0125】

1実施態様は、被験体へのインフルエンザ感染を阻害するか、又は1以上のインフルエンザウイルス株／分離株又はサブタイプによるインフルエンザ感染に対する被験体の感受性を減少させるのに有効な量のインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を被験体に対し投与することを含む方法である。様々な実施態様において、該抗体は被験者への感染前（予防的）、感染と同時、又は感染後（治療的）に投与される。該抗体は治療効果として、例えばインフルエンザウイルス感染の1以上の症状又は合併症（例えば、悪寒、発熱、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、鼻の感染症、副鼻腔感染症、体痛、頭痛、倦怠感、肺炎、気管支炎、耳感染、又は耳痛）の増悪、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性、1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプのウイルス力価又はウイルスタンパク量、或いは1以上のインフルエンザウイルス株／分離株／サブタイプによる被験体への感染のし易さを緩和若しくは減少させること等もたらすことができる。

【0126】

治療効果ひいてはインフルエンザウイルス力価、ウイルス複製、ウイルス増幅又は被験体内のインフルエンザウイルスタンパク量の増加を抑制又は阻害する方法がさらに提供される。1実施態様は、被験体内の1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプのインフルエンザウイルス力価、ウイルス複製又はインフルエンザウイルスタンパク量の増加を抑制するのに有効な量のインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を被験体に対し投与することを含む方法である。

【0127】

感染から被験体を防御する方法、感染に対する被験体の感受性を減少させる方法、及び感染から被験者の回復を早める又は促進する方法であって、該感染は1以上のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプによるものである、方法がさらに提供される。1実施態様は、1以上のインフルエンザウイルス株／分離株又はサブタイプによる感染から被験体を防御するのに有効で、かつ、感染に対する被験体の感受性を減少させる又はウイルス感染からの被験者の回復を早める若しくは促進するのに有効な量のインフルエンザM2に特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体を被験体に対し投与することを含む方法である。

【0128】

本発明方法は、Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及びZ3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される細胞株（例えば、ハイブリドーマ又はCHO細胞株）により産生される抗体の結合特異性又は同一又は実質的に同一の結合親和性を有する任意の抗体により実施することができる。本発明方法は、番号Z3G1(ATCC寄託番号PTA-5967; American Type Cultu

re Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)及び番号Z3G3 (Z3.16.25.1)(ATCC寄託番号PTA-5968; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAに2004年3月13日に寄託された)で表示される抗体が結合するのと同じのエピトープ、又は同一若しくは実質的に同一の最小結合配列を認識する任意の抗体により実施することができる。

【0129】

治療、診断及び精製／単離する方法を含む本発明方法は、任意のインフルエンザ株／分離株又はサブタイプ、株／分離株の組み合わせ、又はサブタイプに適用される。特に限定されないが、インフルエンザ株は例えば、H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H9N2、H2N1、H4N6、H6N2、H7N2、H7N3、H4N8、H5N2、H2N3、H11N9、H3N8、H1N2、H11N2、H11N9、H7N7、H2N3、H6N1、H13N6、H7N1、H11N1、H7N2若しくはH5N3等の、A/PR/8/34 (H1N1)又はA/HK/1/68 (H3N2)株／分離株又はその他のサブタイプである。

10

【0130】

本発明のヒト、ヒト化及びキメラM2抗体は、単独で使用するか、又は抗インフルエンザ活性を有する（例えば、インフルエンザウイルスの感染、複製、増幅を阻害する、又はインフルエンザウイルス感染に付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性を低減させる）治療薬と併用して使用され得る。該併用例としては、異なる結合特異性、結合親和性、又は細胞へのインフルエンザウイルス感染をin vitro若しくはin vivoで阻害する効果を有するプール化したモノクローナル抗体又はプール化したポリクローナル抗体が含まれる。さらに、本発明方法によるそのような併用法だけでなく、M2抗体を含んでなる併用組成物が提供される。

20

【0131】

本発明方法には、インフルエンザ、又はインフルエンザウイルス感染に付随する障害や合併症を治療することにより、被験体の症状改善、インフルエンザ感染に付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性の低減、又は症状改善に関係する被験体のリスク又は感染性（例えば、インフルエンザウイルス感染のし易さ）の低減といった結果をもたらすことが含まれる。したがって、改善にはウイルス増殖、複製、又は力価、或いはインフルエンザウイルス感染に付随する症状若しくは合併症のうち1以上を減少又は低減させることが含まれる。改善には、インフルエンザウイルス感染した若しくは感染のおそれのある被験体、又はインフルエンザウイルス感染に付随する症状若しくは合併症を有する被験体を治療する抗ウイルス剤若しくは他の薬剤の必要性、投与頻度又は投与量を減らすか無くすることも含まれる。

30

【0132】

改善では、インフルエンザウイルス感染に付随する任意又は全ての症状又は合併症を完全に消失をさせる必要はない。むしろ治療は、客観的若しくは主観的に測定可能若しくは検出可能な抗インフルエンザウイルス効果又は改善であればよい。したがって、短期間又は長期間(時間、日、週、月等)にわたり、被験体の状態若しくは関連症状若しくは合併症が漸進的に改善又は一部低減され、或いは状態の悪化又は進行が阻害(1以上の症状又は合併症が安定化)される場合、臨床エンドポイントが十分に達成できたといえる。

【0133】

本発明方法において、改善として所望の結果が得られる場合、被験体に対する予防若しくは治療的処置により本明細書で規定のインフルエンザウイルスに対して客観的若しくは主観的効果が得られる場合、抗体は十分量又は有効量が投与され得る。本明細書で使用される用語「十分量」又は「有効量」とは、単回若しくは複数回、単独若しくは1以上の他の治療、治療レジメン若しくは薬剤（例えば、医薬）との併用において、長期若しくは短期間にわたり検出可能な作用、投与を受けた被験体において任意の測定可能か検出可能な程度の所望の結果や有用な効果又は任意の期間(例えば、分、時、日、月、年、又治療に要した期間)で所望の結果や有用な効果をもたらす量を意味する。

40

【0134】

十分量又は有効量を、単回投与で投与できる場合はあるが必ずしもその必要は無く、単

50

剤又は他の化合物、薬剤、治療若しくは治療レジメンとの併用により投与できる場合もあるが必ずしもその必要もない。さらに、投与された被験体において有効又は十分であるためには追加用量、そのような用量以外の量又は投与期間、又は追加医薬、薬剤、治療又は治療レジメンが含まれる場合があるので、第2の化合物、薬剤、治療又は治療レジメンを伴わず単回投与又は複数回投与される場合には十分量又は有効量は必ずしも十分又は有効である必要はない。さらに、十分量又は有効量は、各被験体又は全被験体において予防又は治療的処置として有効である必要はなく、投与群又は集団内の治療を受けた被験体の大部分に有効である必要もない。十分量又は有効量とは、特定の被験体に対し十分又は有効であることを意味し、投与群又は一般集団に対し十分又は有効であることを意味しない。そういった治療法では、治療法に対する反応が被験体により増減するのが通常である。

10

【0135】

治療に感受性がある被験体には、インフルエンザウイルス感染している又は感染のおそれがある被験体が含まれる。対象被験体には、インフルエンザに付随する症状又は合併症が進行する恐れがある被験体も含まれる。したがって、本発明方法はインフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス感染に付随する合併症の恐れがある被験体を治療するために適用される。したがって、予防法も含まれる。

【0136】

「予防法」及びその文法的に変形した用語は、インフルエンザ感染（又は随伴症状）の徴候又は発現を認める前に被験体に接触、投与又はin vivo送達する本発明方法であって、それによりインフルエンザ感染の症状が進行する可能性又し易さを排除、防止、阻害、減少又は低減させることができる方法を意味する。予防法の対象となる患者は、本明細書で規定の又は当技術分野で知られるインフルエンザ感染のおそれが高い（罹患可能性がある又は感染し易い）被験体であり得る。

20

【0137】

治療感受性があるリスク被験体には、インフルエンザウイルスを有する他の被験体と接触した被検体、或いはインフルエンザウイルス感染のリスクが、ウイルス感染性又は細胞指向性の変化、免疫学的感受性(例えば、免疫不全被験体)、又は環境因子により増加した被験体が含まれる。したがって、治療感受性があるリスク被験体には、鳥がインフルエンザ感染した又はキャリアの可能性のある野生又は農業環境(例えば、養鶏場)の鳥と接触した又は接触するおそれのある被験体が含まれる。

30

【0138】

M2抗体を、本発明方法により単回又は反復(例えば、日、週、月、年又は約1~10週、又は適当な期間に1回以上)投与して、例えばインフルエンザウイルス感染に付随する1以上の症状又は合併症の増悪、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性を低減させることができる。用量は、処置が予防又は治療目的か、治療する障害又は合併症の進行度、重症度、頻度、罹患期間若しくは罹患可能性、治療が直接標的とするインフルエンザ分離株/株又はサブタイプの種類、所望の臨床エンドポイント、治療歴又は併用療法、被験体の全体的な健康さ、年齢、性別又は人種及び当業者によって理解されるその他の因子によって、変更することができる。当業者ならば、用量に影響する因子、及び予防又は治療効果をもたらすのに十分な量を提供すべき時期を理解するであろう。

40

【0139】

通常、M2抗体は治療処置として、被験体がインフルエンザに暴露又は接触してから24~72時間以内、又はウイルス感染に付随する1以上の症状を発症後24~48時間以内に投与されるであろう。予防療法として、M2抗体はインフルエンザに暴露又は接触してから0~4週以内、例えば2~3週以内に投与され得る。用量は試験により決定、すなわち動物疾患モデル、場合によってはヒトの臨床試験で決定することができる。初回試験用量は本明細書では動物試験に基づいて決定され、体重が約30グラムのマウスでは投与量は約10~1000 µg/動物の範囲である。用量は被験体の大きさにより調整され、例えば約10~50 µg/kg、50~100 µg/kg、100~500 µg/kg、500~1,000 µg/kg、1~5 mg/kg、5~10 mg/kg、10~20 mg/kg、20~50 mg/kg又はそれより高用量、1時間、日、週、月又は年につき2、3、4倍以

50

上の量が投与される。

【0140】

用量についての投与量、投与頻度又は投与期間は、感染状態又は治療若しくは療法の任意の副作用にあわせて、比例的に増減され得る。十分かつ有効とみなされ、したがって有益といえる投与量、投与頻度又は投与期間とすることで、別の治療又は治療レジメン又はプロトコルの使用を減らすことができる。

【0141】

「被験体」という用語は、動物、典型的には非ヒト霊長類(人類、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オラウータン、マカク)、家庭用動物(犬及び猫)、家畜(鶏及びアヒルのような家禽、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ)、実験動物(マウス、ラット、ウサギ、

10

【0142】

本発明のM2ポリクローナル及びモノクローナル抗体(その改変体、変異株及びサブ配列／断片を含む)、並びにM2抗体をコードする核酸を医薬組成物に組み込むことができる。該医薬組成物はin vivo又はex vivoで被験体に投与するのに有用である。

【0143】

抗体は、被験体への投与前に製薬上許容できる担体又は賦形剤に含ませることができる。本明細書において、「製薬上許容できる」及び「生理学的に許容できる」という用語は、投与、in vivo送達又は接触の1以上の経路に適し、かつ生物学的に許容できる製剤、

20

【0144】

医薬組成物は、特定の投与経路に対応するよう製剤化することができる。したがって、医薬組成物には、様々な投与経路に適した担体、希釈剤、又は賦形剤が含まれる。組成物が任意で製剤化されうる接触又はin vivo送達の典型的な投与経路には、呼吸器系(鼻腔内、吸入、呼吸、挿管、肺内、点滴)、経口、口腔、肺内、直腸、骨髄内、皮内、局所、皮膚、非経口、舌下、皮下、血管内、くも膜下、関節内、腔内、経皮、イオン導入、眼内、点眼、光学的、静脈内、筋肉内、腺内、臓器内、リンパ管内投与が含まれる。

30

【0145】

鼻腔内及び点滴投与製剤は通常、任意の1以上の防腐剤又は等張剤とともに活性成分(化合物又は薬剤)の水溶液を含有する。該製剤は通常、鼻粘膜に適合するようpH及び等張状態に調整される。溶媒は水のみを含むか、又は水と1以上の他の成分(例えば、エタノール)の混合物でありうる。通常、エタノール濃度は最大でも約70~75容量%が上限である。残りの容積は、水及び1以上の他の溶媒を様々な割合を含んで構成され得る。

40

【0146】

非経口投与に適した製剤は、活性化合物の水性及び非水性溶液、懸濁液又は乳液を含んでおり、該調製物は通常滅菌されており、対象レシピエントの血液と等張であり得る。実施例に限定されないが、水、生理食塩水、デキストロース、フルクトース、エタノール、動物性、植物性又は合成油が含まれる。

【0147】

経粘膜又は経皮投与(例えば、局所における接触)では、浸透剤が医薬組成物に含まれる場合がある。浸透剤は当技術分野で知られており、例えば経粘膜投与では浄化剤、胆汁

50

塩及びフシジン酸誘導体が含まれる。経皮投与する場合、当技術分野で通常知られるとおり、活性成分がエアロゾル、スプレー、軟膏、サルブ、ゲル、又はクリームに製剤化され得る。皮膚と接触させる場合、医薬組成物には通常、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ジェル、スプレー、エアロゾル、又は油が含まれる。使用され得る担体には、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、経皮促進剤、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0148】

共溶媒及びアジュバントが製剤に添加される場合がある。共溶媒の例としてはこれに限定されないが、ヒドロキシル基又はその他の極性基、例えばイソプロピルアルコールのようなアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリ
10
コール、グリコールエステルのようなグリコール；グリセロール；ポリオキシエチレンアルコール及びポリオキシエチレン脂肪酸エステルが含まれる。アジュバントとしては、例えば大豆レシチン及びオレイン酸のような界面活性剤；三オレイン酸ソルビタンのようなソルビタンエステル；及びポリビニルピロリドンが含まれる。

【0149】

補助活性化化合物(例えば、防腐剤、抗酸化剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤及び抗真菌剤のような殺生物剤及び抗生剤を含んでなる抗菌剤)も、該組成物に含まれ得る。医薬組成物はしたがって、防腐剤、抗酸化剤及び抗菌剤を含む場合がある。

【0150】

防腐剤を使用して、微生物の増殖を阻害し、又は活性成分の安定性を高めることにより
20
医薬組成物の有効期間を長くすることができる。適した防腐剤が当技術分野では知られており、例えば、EDTA、EGTA、塩化ベンザルコニウム又は安息香酸又は安息香酸ナトリウムのような安息香酸塩が含まれる。抗酸化剤には、例えば、アスコルビン酸、ビタミンA、ビタミンE、トコフェロール、及び類似のビタミン又はプロビタミンが含まれる。

【0151】

抗菌剤又は化合物は、直接又は間接的に病原性又は非病原性微生物による汚染又は増大、感染、複製、増殖、再生を阻害、遅延、中止、除去、拘束、抑制又は防止させる。抗菌剤の分類としては、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び抗寄生虫性剤が挙げられる。抗細菌剤には、微生物による汚染又は増大、感染、複製、増殖、再生を殺生又は破壊（-
30
cidal）又は阻害（-static）する薬剤又は化合物が含まれる。

【0152】

典型的な抗細菌剤（抗生物質）としては、ペニシリン系(例えば、ペニシリンG、アンピシリン、メチシリン、オキサシリン、及びアモキシシリン)、セファロスポリン系(例えば、セファドロキシル、セフォラニド、セフォタキシム、及びセフトリアキソン)、テトラサイクリン系(例えば、ドキシサイクリン、クロルテトラサイクリン、ミノマイシン、及び
40
テトラサイクリン)、アミノグリコシド系(例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン、ネチルミシン、パロマイシン及びトブラマイシン)、マクロライド系(例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、及びエリスロマイシン)、フルオロキノロン系(例えば、シプロフロキサシン、ロメフロキサシン及びノルフロキサシン)、及びクロラムフェニコール、クリンダマイシン、シクロセリン、イソニアジド、リファンピシン、バンコマイシン、アストレオナム、クラブラン酸、イミペネム、ポリミキシン、バシトラシン、アムフォテリシン及びナイスタチンを含む他の抗生物質が挙げられる。

【0153】

抗ウイルス剤の分類としては、特にこれに限定されないが、逆転写酵素阻害剤；プロテアーゼ阻害剤；チミジンキナーゼ阻害剤；糖又は糖タンパク合成阻害剤；構造タンパク質合成阻害剤；ヌクレオシド類似体；及びウイルス成熟阻害剤が挙げられる。抗ウイルス剤は、特にこれに限定されないが、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンツ、サキナビル、リトナビル、インディナビルネルフィナビル、アンブレナビル、ジドブジン(AZT)、スタブジン(d4T)、ラミブジン(3TC)、ディダノシン(DDI)、ザルシタビン(ddC)、アバカビ
50

ル、アシクロビル、ペンシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、1,-D-リボフラノシル-1,2,4-トリアゾール-3カルボキサミド、9->2-ヒドロキシ-エトキシメチルグアニン、アダマンタナミン、5-イド-2'-デオキシウリジン、トリフルオロチミジン、インターフェロン及びアデニン・アラビノシドが挙げられる。

【0154】

本発明の組成物及び方法に適した医薬組成物及び薬物送達システムが当技術分野では知られている（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 第20版, Mack Publishing Co., Easton, PA、Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 第18版, Mack Publishing Co., Easton, PA、The Merck Index (1996) 第12版, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ、Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.、Ansel及びStoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001)第11版, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD、及びPoznanskyら, Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano著, Oxford, N.Y., pp. 253-315を参照されたい)。

【0155】

抗体とその医薬組成物は、投与しやすくかつ用量を均一にするために、剤形単位(カプセル、トローチ、カシエット、ドロップ、又は錠剤)にパッケージングすることができる。本明細書において「剤形単位」とは、治療する被験体に対して適した単位用量でかつ物質的に分離された単位であって、所定量の活性成分を含有し、また任意で医薬担体(賦形剤、希釈剤、ビヒクル又は充填剤)を含み、1以上の用量が投与された場合に、所望の効果(例えば、予防又は治療効果)が生じるように計算されている各単位を意味する。剤形単位としては、例えば凍結乾燥した(又は凍結乾燥状態の)組成物を含むアンプルやバイアルもあり、投与又はin vivo送達の前に例えば滅菌液体担体を添加することができる。剤形単位には、例えば、その中に液体組成物が入れられたアンプルやバイアルが含まれる。剤形単位には、経皮投与される組成物がさらに含まれ、「パッチ剤」は対象レシピエントの表皮と長時間又は短時間接触させた状態に保つために適用される。それぞれの剤形単位は、複数用量キット又は容器内に保存することができる。医薬組成物は、投与しやすくかつ用量を均一にするために、単回又は複数の剤形単位にパッケージングすることができる。

【0156】

本発明は、適した包装材料に梱包されたM2抗体、M2抗体をコードする核酸及びそれらの医薬組成物を含んでなるキットを提供する。キットには、通常該キットに含まれる成分の説明書及び該成分をin vitro、in vivo、若しくはex vivoで使用する場合は使用説明書が記載されたラベル又は添付文書が含まれる。キットには、2以上のヒトM2抗体単独又は抗ウイルス剤又は薬剤との組み合わせ等、そのような成分の集合体が含まれる場合がある。

【0157】

「包装材料」という用語は、キットに含まれる成分を保護する物理的構造を意味する。包装材料は、成分を無菌状態に維持することができ、該目的のために一般的に使用される材料(例えば、紙、段ボール、ガラス、プラスチック、ホイル、アンプル、バイアル、チューブ等)から構成されうる。

【0158】

本発明のキットにはラベル又は添付文書が含まれ得る。ラベル又は添付文書としては紙又はボール紙等の「印刷物」があり、例えば成分、キット若しくは包装材料(例えば、箱)とは分離して存在しているか、又はこれらに貼付されており、又はキットの成分が入っているアンプル、チューブ若しくはバイアルに貼付されている。ラベル又は添付文書には、コンピュータで判読可能な媒体、例えばディスク(フロッピーディスク、ハードディスク、ZIPディスク等)、CD-又はDVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁気テープ等の光ディスク、又はRAM又はROM等の電子的記録媒体、又はこれらのハイブリッド(磁気/光記録媒体であるFLASHメディア又はメモリータイプカード等)がさらに含まれ得る。

【0159】

ラベル又は添付文書には、その中に含まれる成分、投与量、作用機序、薬物動態及び薬力学を含めた活性成分の臨床薬理に関する識別情報が含まれている場合がある。ラベル又は添付文書には、製造業者の情報、ロット番号、製造業者の所在地及び製造日を同定できる情報が含まれている場合がある。

【0160】

ラベル又は添付文書には、キットに含まれる成分の使用対象となる状態、障害又は疾患に関する情報が記載される場合がある。ラベル又は添付文書には、キットに含まれる成分を1以上使用する臨床医又は被験体を対象とした、使用方法又は治療プロトコル又は治療レジメンに関する使用説明書が含まれ得る。使用説明書には、投与量、投与頻度又は投与期間、及び本明細書に記載された任意の使用方法、治療プロトコル又は治療レジメンを実施するための説明書が含まれ得る。典型的な使用説明書には、本明細書で規定した又は当技術分野で知られる方法に則り、インフルエンザ感染を治療する使用説明書が含まれる。本発明のキットにはしたがって、治療、検出、モニタリング又は診断方法を含む本明細書に記載された任意の本発明方法を実施するためのラベル又は使用説明書がさらに含まれ得る。したがって、キットには例えば、本明細書で規定する1以上の抗インフルエンザ活性を有するヒトM2抗体が、本発明の治療法により抗体を投与する使用説明書とともに含まれる場合がある。

10

【0161】

ラベル又は添付文書には、予防又は治療効果等の成分がもたらす任意の効果に関する情報が含まれる場合がある。ラベル又は添付文書には、生じうる副作用に関する情報、例えば被験体又は臨床医に対し、特定成分を使用するのに不適な条件の警告が含まれる場合がある。副作用は、被験体が該成分と相性が悪い1以上の別の医薬を過去に使用した、使用する予定がある、又は現在併用している場合にも起こり得、被験体が該組成物と相性が悪い別の治療プロトコル又は治療レジメンを過去に受けた、受ける可能性がある、又は現在受けている場合にも起こり得るので、使用説明書にはそのような相性の悪さに関する（併用に不適な）情報が含まれ得る。

20

【0162】

本発明キットは、ヒト、ヒト化又はキメラM2抗体を含んでなる医薬製剤中に(例えば、M2抗体を産生する細胞株用の)成長培地、緩衝剤、又は防腐剤又は安定化剤をさらにふくむ場合がある。該キットの各成分はそれぞれの容器に封入され、該各種の容器はすべて1つの包装内に含まれ得る。本発明のキットは凍結保存用に設計できる。本発明のキットは、ハイブリドーマ又は他の宿主細胞(例えば、CHO細胞)を産生させるヒト、ヒト化又はキメラM2抗体含むようさらに設計することができる。該キット内の細胞は、細胞を使用する準備ができるまで適した保存条件下で維持することができる。例えば、1以上のハイブリドーマ又は他の細胞を含むキットは、適した細胞保存培地(例えば、10~20% DMSOを添加したDMEM、 α -MEM等の組織培養成長培地など)を含む場合があり、これにより該細胞を解凍し成長させることができる。

30

【0163】

本発明のヒト、ヒト化及びキメラM2抗体はM2ポリペプチドを単離、検出又は精製するのに有用である。該方法には、M2の含有が疑われるサンプル(溶液、固相、in vitro若しくはin vivo、又は無傷細胞若しくは生物中のサンプル)を結合可能な条件下でM2抗体と接触させM2の所在を検出するか、又は結合M2タンパク質を精製することが含まれる。

40

【0164】

本発明はしたがって、試験サンプル中のM2又はインフルエンザウイルスを検出する方法も提供する。1実施態様は、M2又はインフルエンザウイルスを有する又は有することが疑われるサンプルとヒトM2抗体を、サンプル中のM2を検出可能な条件下で接触させて、試験サンプル中にM2が存在するかどうかを検出することを含む方法である。M2又はインフルエンザウイルスは、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、免疫組織学的染色又はフローサイトメトリー及びEILSA等の慣用方法により検出することができる。

【0165】

50

M2及びインフルエンザウイルスの検出方法は、M2及びインフルエンザウイルスを検出する診断プロトコールにおいて有用である。例えば、インフルエンザ感染の発症、増悪、退行と関連してインフルエンザウイルスのレベルが増減する場合、本発明抗体を使用してM2又はインフルエンザウイルスの増減を検出することができる。さらに、M2又はインフルエンザウイルスのレベルを低下させる治療処置をした後に、M2又はインフルエンザウイルスのレベルをモニターしたい場合、本発明抗体を使用して治療前、治療中又は治療後の長期間又は短期間のM2又はインフルエンザウイルスレベルの増減を検出することができる。

【0166】

本発明はしたがって、(体液、細胞、又は生検組織のような組織若しくは臓器サンプルを含む)被験体の試験サンプル中に含まれるM2又はインフルエンザウイルスの所在を検出する方法も提供する。1実施態様は、M2又はインフルエンザウイルスを有する又は有することが疑われる被験体から得たサンプルとヒトM2又はインフルエンザウイルス抗体を、M2又はインフルエンザウイルスを検出可能な条件下で接触させて、被験体から得た試験サンプル中にM2又はインフルエンザウイルスが存在するかどうかを検出することを含む方法である。

10

【0167】

ヒト、ヒト化及びキメラM2抗体は、M2若しくはインフルエンザウイルスの所在をモニターして被験体の診断又は次の治療を決定したり、被験体内のM2のin vivoレベルを測定したりするのににも有用であり得る。例えば、M2又はインフルエンザウイルスを含む疑いがある痰を上記のとおり、結合可能な条件下でM2抗体とインキュベートして、M2又はインフル

20

【0168】

別途定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び科学用語は、この発明が属する技術分野において、当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似するか同じ方法及び材料を本発明の実施又は試験で用いることができるが、適した方法及び材料は本明細書に記載されている。

【0169】

本明細書に含まれるすべての出願、刊行物、特許及びそのほかの参考文献、本明細書で引用されるGenBank及びATCCは、参照により本明細書全体に引用されているものとする。不一致がある場合には、定義を含め明細書が優先されるであろう。

30

【0170】

本明細書において、単数形「a」、「and」及び「the」はその内容が別途明確に定義されていない限り、複数形を含む。したがって、例えば「M2抗体」といった場合には複数のそういった抗体を含み、「抗インフルエンザ活性又は機能」といった場合には1以上の活性又は機能、及びその他色々を表すものが含まれる場合がある。

【0171】

本明細書で使用する場合、別途明確に定義されていない限り、すべての数値又は数値域には、そのような範囲内の整数、及び範囲内の値又は整数の一部が含まれる。したがって、例えば90~100%の範囲といった場合には、91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%等が含まれ、また91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%等、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%等及びその他様々な値が含まれる。

40

【0172】

本発明は肯定的表現により本明細書で一般に開示され、多数の実施態様を記載する。本発明は、全体又は一部において特定の対象、例えば物質又は原料、方法の段階及び条件、プロトコール、手段、分析又は解析が除かれている実施態様も含む。したがって、本発明にはどのような発明が含まれないかについて、本明細書で一般に記載されていない場合であっても、本発明に表現として含まれていない実施態様は、それでもなお本明細書に含まれているものとする。

【0173】

本発明の実施態様が数多く記載されている。それでもなお、本発明の精神と範囲から逸

50

脱することなく、数多くの変更ができるものと理解されるであろう。したがって、次の実施例は特許請求の範囲に記載された発明の範囲を説明するものであるが、これには限定されない。

【実施例】

【0174】

実施例 1

この実施例は、様々な材料及び方法について説明する。

【0175】

ペプチド合成及びペプチド-BSAコンジュゲートの生成：M2（配列番号：2、表4）及びM2SG（配列番号：3、表4）ペプチドをA & A Labs LLC（サンディエゴ，CA）により合成した。各ペプチドの純度はHPLCにより95%を超えていることを確認した。配列番号：2に記載の配列（M2）は、多くのインフルエンザA型ウイルス株で見られるインフルエンザウイルスマトリックスM2タンパク質の細胞外の23個のアミノ酸ペプチドの代表的な配列を示す。これら2つのペプチドを、EDCコンジュゲートキット（PIERCE Biotechnology, Inc., Rockford, IL）を用いて製造業者の使用説明書に従い、ウシ血清アルブミン（BSA, Sigma, St. Louis, MO）にコンジュゲートさせた。BSAがコンジュゲートされたM2及びM2SGペプチドを用いてマウスを免疫した。

【0176】

エピトープ決定及びヒト抗M2抗体の結合特性に関する試験において使用されるペプチドのアミノ酸配列は、表4及び7に列挙されている。結合特異性の解析に使用するM2変異ペプチド類縁体は、GenBankデータベースに含まれるインフルエンザA型ウイルス変異株により同定されたM2変異タンパク質の配列情報をもとに設計した。M2類縁体ペプチド及び切断M2ペプチドは、A & A Labs LLC（サンディエゴ，CA）により合成した。

【0177】

マウス：ヒト免疫グロブリン領域を含むヒト染色体断片を含むヒトトランス-染色体マウス（WO 02/43478、WO 02/092812、Ishida及びLonberg, IBCの11番目の抗体 Engineering Meeting, Abstract (2000)、及びKataoka, S. IBCの13番目の抗体 Engineering Meeting, Abstract (2002))はKirin Brewery Co. Ltd. (Japan)より入手した。C57BL/6JマウスはJackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した。

【0178】

免疫：M2-BSA及びM2SG-BSA（PBS（リン酸緩衝生理食塩水，GIBCO BRL, Rockville, MD）1:1溶液）を等容積の完全フロインドアジュバント（CFA）（Sigma, St. Louis, MO）と混合して、エマルジョンを調製した。マウスはCFAを含む混合物20 µgを皮下投与し、さらに不完全フロインドアジュバント（IFA）（Sigma, St. Louis, MO）を含むM2-BSAとM2SG-BSAの等量混合物を21日目に皮下投与し、続いて3回目の投与として、42日目にRIBI（Corixa, Hamilton, MT）を腹腔内投与し免疫した。M2ペプチド10 µgを含みアジュバントを含まない最後の腹腔内及び静脈内投与は融合の3日前に行った。

【0179】

ELISA：抗体力価及び抗体特異性は、ハイブリドーマによる抗体産生と同様ELISAにより定量した。簡潔にいうと、50 µlのM2-BSA又はM2ペプチドを96-ウェル平板プレート（Nunc, Denmark）上に塗布し、1 µg/ml濃度の炭酸緩衝液（pH 9.6）で、4℃で一晩又は37℃で1時間インキュベートした。PBS/0.1% Tween 20で2回洗浄した後、プレートはPBS/1% BSA（Sigma, St. Louis, MO）を用いて37℃で30分間固定し、該抗体又は血清をウェル及びプレートに添加し、37℃で1時間インキュベートした。4回洗浄した後、HRPをコンジュゲートさせたヤギ抗ヒト免疫グロブリンγ鎖特異抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA）の希釈液をウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。4回洗浄した後、TMB基質溶液（DAKO, CA）を加え室温で30分間インキュベートした。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0180】

アイソタイプELISA：ハイブリドーマにより産生された抗体のアイソタイプをELISAによ

10

20

30

40

50

り同定した。簡潔にいうと、50 μ l のM2-BSA又はM2ペプチドを96-ウェル平板プレート(Nunc, Denmark)上に塗布し、1 μ g/ml濃度の炭酸緩衝液(pH 9.6)で、4°Cで一晩又は37°Cで1時間インキュベートした。PBS/0.1% Tween 20で2回洗浄した後、プレートはPBS/1% BSA (Sigma, St. Louis, MO)を用いて室温で1時間固定し、該抗体をウェルに添加し該プレートを室温で1時間インキュベートした。3回洗浄した後、HRPをコンジュゲートさせたマウス抗ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4重鎖検出抗体(Zymed, San Francisco, CA)のいずれかの希釈液をウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。3回洗浄した後、TMB基質溶液(DAKO, CA)を加え、室温で30分間インキュベートした。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0181】

インフルエンザA型ウイルス感染細胞ベースのELISA：MDCK細胞 (Madin-Darbyイヌ腎臓上皮由来細胞；ATCC, Rockville, MD)を、96-ウェル平板プレート(Falcon (登録商標))に 1.5×10^5 細胞/mLで播種し、1%非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 μ g/ml硫酸ストレプトマイシン、1 mMピルビン酸ナトリウム(cMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA)を添加したMEM培地を1ウェル当たり150 μ l使用して、7%CO₂下で48時間培養した。48時間後、プレートはPBSで2回洗浄して、TCID₅₀インフルエンザA型ウイルス(A/PR/8/34又はA/HK/1/68；ATCC, Rockville, MD)の10倍希釈液30 μ lを用いて定期的に回転させながら、室温で30分間感染させた。感染後、該プレートはPBSで1回洗浄し、1 μ g/mlトリプシン(TPCK処理済, Worthington, Biochem. Corp.)を150 μ l添加した最小必須培地(Invitrogen Corp, CA)を加え、プレートを27時間インキュベートした。感染後、細胞単層をPBS/1%FCS (GIBCO BRL, Rockville, MD)で3回洗浄し、PBS/1%BSA/5%FCSを用いて室温で30分間固定した。抗体を希釈し、それぞれのウェルに50 μ lずつ加え、室温で45分間インキュベートした。4回洗浄した後、HRPをコンジュゲートさせたウサギ抗ヒト免疫グロブリン γ 鎖抗体(DAKO, Denmark)を1:3000に希釈し、それぞれのウェルに50 μ lずつ加え、プレートを室温で30分間インキュベートした。5回洗浄した後、1mMレバミゾール溶液(Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA)を添加したTMB基質(DAKO, Denmark) 100 μ lを加え、プレートを室温で15分間インキュベートした。上清液50 μ lを停止液(1N H₂SO₄) 100 μ lを含む新しい96-ウェルプレート(Nunc, Denmark)に移し、450nmにおける吸光度(OD)をマイクロプレートリーダーにより測定した。それぞれの抗体のEC₅₀は既報(Setteら, Nature 328:395 (1987))に従い、計算した。解離定数(K_d)は、A/PR/8/34又はA/HK/1/68のいずれかに感染したMDCK細胞表面上のM2抗原の結合部位の半分(50%)を飽和させるのに必要な抗体濃度と定義した。

【0182】

インフルエンザA型ウイルス感染細胞ベースのELISAにおけるペプチド競合：ウイルス感染したMDCK細胞を上記のとおり準備した。M2ペプチドと抗M2抗体を混合させ、室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、ペプチドと抗体の混合物50 μ lを細胞へ加え、室温で30分間インキュベートした。4回洗浄した後、HRPをコンジュゲートさせたウサギ抗ヒト免疫グロブリン γ 鎖抗体(DAKO, Denmark)を1:3000に希釈し、それぞれのウェルに50 μ lずつ加え、プレートを室温で30分間インキュベートした。5回洗浄した後、1mMレバミゾール溶液(Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA)を添加したTMB基質(DAKO, Denmark) 100 μ lを加え、プレートを室温で15分間インキュベートした。上清液50 μ lを停止液(1N H₂SO₄) 100 μ lを含む新しい96-ウェルプレート(Nunc, Denmark)に移し、450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0183】

ハイブリドーマ産生：モノクローナル抗体を産生させるために、高い抗体力価を有するマウスを選別した。その脾臓を入手し、単個細胞浮遊液と骨髓腫細胞株(SP2/O-Ag14) (ATCC, Rockville, MD)を3:1の割合で、50%PEG(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を用いて融合させた。融合液を96-ウェルプレートに最適密度で播種し、完全RPMI-1培地(10%FCS、1%非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、50 μ M 2-ME、100 U/mlペニシリン及び100 μ g/ml硫酸ストレプトマイシンを添加したRPMI1640)で5% CO₂下37°Cでインキュベーター

を用いて培養した。それぞれの融合につき、約2000個のハイブリドーマ成長ウェルをELISAでスクリーニングした。M2ペプチドへの結合が陽性の細胞を24ウェルプレートに移し、4回限界希釈してモノクローナル抗体を得た。抗M2モノクローナル抗体は、インフルエンザA型ウイルス感染細胞ベースのELISAでさらに確認した。

【0184】

抗体の精製：抗体を精製するために、ハイブリドーマをIntegra system (INTEG RA Bioscience, Inc. Ijamsville, MD)でハイブリドーマ-SFM (GIBCO BRL, Rockville, MD)と共に培養した。ヒトモノクローナル抗体をProtein A-Sepharose Fast Flowゲル(Amersham Pharmacia Cat#17-0618-02, Uppsala, Sweden)を用いて培地から精製した。簡潔にいうと、カラム容量に適量の抗体を含んだ調整培地を0.22 μ mのディスクフィルター(Minisartoplus, Sartorius Cat#17822, Gettingen, Germany)で濾過した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で平衡化した2.0 mlのProtein A-Sepharose Fast Flowカラムにローディングした。該カラムは40 mlより多量のPBSで洗浄し、該抗体は0.1 M Gly-HCl (pH3.6、0.15 M NaCl)で溶出させた。最初に溶出液1.0 mlを通過させた後、3つの分別溶離液の画分を5.0 ml/チューブで回収して、1 M Tris-HCl (pH8.0) 250 μ lで中和させた。この精製方法をすべての調整培地が処理されるまで繰り返した。抗体濃度をヒトIgG特異的ELISA法により定量し、抗体を含むすべての画分をためて、遠心濃縮器(Vivaspin 20, 30,000MWC0: Sartorius Cat#VS2022, Gettingen, ドイツ)を用いて濃縮させた。

【0185】

発熱物質を除去するため、濃縮サンプルは緩衝液を20 mMのリン酸ナトリウム (pH6.6)に交換して、同じ緩衝液で平衡化した0.5 ml SP-セファロースHPカラム(Amersham Pharmacia, Cat#17-1087-01, Uppsala, Sweden)にローディングした。発熱物質は、SP-セファロースHPカラムに連結された2 ml Q-Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Pharmacia, Cat#17-0510-01, Uppsala, Sweden)にサンプルを1回通過させて除去した。使用後、Q-Sepharose Fast Flowカラムは外し、抗体は0~0.5 M範囲の塩化ナトリウムで線形勾配溶離させた。該抗体は280 nmで検出し抗体を含む画分をためた。サンプルは遠心濃縮器で濃縮し、NAP25脱塩カラム(Amersham Pharmacia, Cat#17-0852-02, Uppsala, Sweden)を用いて緩衝液をPBSに交換した。抗体濃度は、ヒトIgG特異的ELISAにより定量した。Limulus Amebocyte Lysate (LAL) アッセイ(Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA)により、サンプル中の発熱物質のレベルが、0.13 EU /mgタンパク質より低いことを確認した。

【0186】

ヒト抗M2抗体(Z3)遺伝子の単離：Z3抗体(アイソタイプ:IgG3)を産生する培養ハイブリドーマ細胞(113Z-3)を遠心分離して回収した。RNeasyキット(QIAGEN Inc., Valencia, CA)を製造業者の使用説明書に従い用いて、これらの細胞から全RNA(140 μ g)を単離した。SMART RACE cDNA複製キット(Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA)を用いて、ハイブリドーマ細胞の全RNAから得た免疫グロブリン遺伝子の可変領域を原料に、cDNAをクローニングした。簡潔にいうと、2 μ gのRNAから逆転写酵素を用いて、cDNAの第1鎖を生成させた。このcDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の鋳型として使用して、リーダー配列を含む重鎖及び軽鎖(それぞれ、 H_V 及び L_V)の可変領域及び定常領域の一部を増幅させた。該反応物は次のとおりである：2.5 U KODを加えたDNAポリメラーゼ(TOYOBO, Tokyo, Japan);片側につき0.2 μ Mのプライマー(重鎖にはIgG1p、軽鎖にはLCR276、表2を参照されたい);もう一方の側につき、1倍量のUniversal Primer Mix A (SMART RACEキットに付属するUMPプライマー混合物);それぞれdNTP混合物200 μ M;1 mM $MgSO_4$; KODを加えた緩衝液(最終濃度は1倍液);及びcDNAの鋳型。

【0187】

熱サイクルは、94°Cで5分間変性させた後、94°Cで5秒間、68°Cで10秒間、72°Cで3分間伸長させるサイクルを30サイクル行うよう設定した。増幅したDNA断片はエタノール沈殿させた後、続けてアガロースゲル電気泳動をして回収し、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen Co., Ltd., Germany)を用いて精製した。HV及びLVの精製したDNA断片を、Zero Blunt TOPO PCRクローニングキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、PCR用の4 Blunt-TOPO

10

20

30

40

50

ベクターに挿入し、それぞれのプラスミド構築物をE. coliに形質転換させ、クローン化した。

【0188】

プラスミド構築物上のそれぞれの挿入部位(HV及びLV)のヌクレオチド配列は、特異的プライマー(HV:M13F、M13R及びhh-4、LV:M13F、M13R及びLCR88、表2を参照されたい)を用いて解析した。8個の独立クローン由来のHV及びLVの両方のヌクレオチド配列は、それぞれ完全に同一であった。LV由来の配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプライマーZ3LP5BGL及びZ3LP3ERI(表2)を設計した。可変及び定常領域の両方を含む完全長ORF(LVC)をコードする軽鎖のcDNA配列は、鋳型として第1鎖cDNA、プライマーとしてZ3LP5BGL及びZ3LP3ERI、及びKOD plus DNAポリメラーゼを用いたPCRにより入手した。HV及びLVのヌクレオチド及びアミノ酸配列を下記に示す。

Z3重鎖可変領域(HV)のcDNAのヌクレオチド配列(開始コドンから(ATG)可変領域の末端まで)を示す。

```
ATGGACTGGA CCTGGAGCAT CCTTTTCTTG GTGGCAGCAG CAACAGGTGC CCACTCCCAG 60
GTTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGCCTCAGT GAAGGTCTCC 120
TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC TATGGTATCA GCTGGGTGCG ACAGGCCCT 180
GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGGATGGATC AGCGCTTACA ATGGTAACAC AACTATGCA 240
CAGAAGCTCC AGGGCAGAGT CACCATGACC ACAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG 300
GAGCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG GGCAGCAGCT 360
GGCGGATACT TCCAGCACTG GGGCCAGGGC ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A 411 (配列番号:32)
```

Z3軽鎖可変及び定常領域のcDNAのヌクレオチド配列(LVC)(開始コドン(ATG)から定常領域の末端(下線部)まで)を示す。

```
ATGGCCAGCT TCCCTCTCCT CTCACCTC CTCCTCACT GTGCAGGGTC CTGGGCCAG 60
TCTGTGCTGA CTCAGCCACC CTCAGCGTCT GGGACCCCG GGCAGAGGGT CACCATCTCT 120
TGTTCTGGAA GCAACTCCAA CATCGGAAGT AAAACTGTAA ACTGGTACCA GCAGTCCCA 180
GGAACGGCCC CCAAACCTCT CATCTCTAGT AATAATCAGC GGCCCTCAGG GGTCCCTGAC 240
CGATTCTCTG GCTCCAAGTC TGGCACCTCA GCCTCCCTGG CCATCAGTGG GCTCCAGTCT 300
GAGGATGAGG CTGATTATTA CTGTGCAGCA TGGGATGACA GCCTGAATGG TGTGGTATTC 360
GGCGGAGGGA CCAAGCTGAC CGTCCTAGGT CAGCCCAAGG CTGCCCCCTC GGTCCTCTG 420
TTCCACCCCT CCTCTGAGGA GCTTCAAGCC AACAAGGCCA CACTGGTGTG TCTCATAAGT 480
GACTTCTACC CGGGAGCCGT GACAGTGGCC TGGAAGGCAG ATGACAGCCC CGTCAAGGCG 540
GGAGTGGAGA CCACCACACC CTCCAAACAA AGCAACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC 600
CTGAGCCTGA CGCCTGAGCA GTGAAGTCC CACAAAAGCT ACAGCTGCCA GGTACGCAT 660
GAAGGGAGCA CCGTGGAGAA GACAGTGGCC CCTACAGAAT GTTCATAG 708 (配列番号:33)
```

Z3重鎖可変領域(HV)のcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(小文字)及び可変領域)を示す。

```
mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS YGISWVRQAP 60
GQGLEWMGWI SAYNGNTNYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCARAAA 120
GGYFQHWGQG TLVTVSS 137 (配列番号:34)
```

Z3軽鎖可変及び定常領域(LVC)(リーダー配列(小文字)、可変領域、及び定常領域(下線部))のcDNAのアミノ酸配列を示す。

```
masfpllltl lthcagswaQ SVLTQPPSAS GTPGQRVTIS CSGSNSNIGS KTVNWWYQQLP 60
GTAPKLLISS NNQRPSGVPD RFSGSKSGTS ASLAISGLQS EDEADYYCAA WDDSLNGVVF 120
GGGTKLTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAFTVA WKADSSPVKA 180
GVETTPPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HKSYSCQVTH 例えはSTVEKTVA PTECS 235 (配列番号:35)
```

【0189】

アイソタイプを変更したヒト抗M2抗体の発現ベクターの作成(Z3-IgG1型):IgG1アイソタイプを変更したZ3抗体(もとのアイソタイプはIgG3であった)の発現ベクターを構築した。簡潔にいうと、オリゴヌクレオチドプライマーZ3LP5BGL及びZ3LP3ERI(表2)(それぞれ、

突出末端となっている制限酵素切断部位5'-BglII及び3'-EcoRIをもつ)を設計して、完全長の軽鎖(LVC)をPCRで増幅させた。鋳型として第1鎖cDNA、プライマーとしてZ3LP5BGL及びZ3LP3ERI、KOD-Plus-DNAポリメラーゼを用いてPCRを実施した。BglII及びEcoRIでPCR産物を消化させた後、前消化された発現ベクター(8.6キロベースのDNA断片)(IDEC Pharmaceuticals, サンディエゴ, CA, N5KG1-Val Lark (N5KG1の改変ベクター, U.S. Patent No. 6,001,358))に、718 bpの断片をサブクローニングした。単離された構築物(N5L3G1-Z3LF)の挿入部位のヌクレオチド配列を解析して、軽鎖(LVC)の完全長ORFの所在を確認した。挿入部位(LVC)のDNA配列は、Z3 (LV)の軽鎖可変領域の配列及びヒトλ免疫グロブリン軽鎖定常領域IGLC3 (GenBank Accession NG 000002:22番目の染色体上のホモサピエンス免疫グロブリンλ遺伝子座)と同一であった。

10

【0190】

第2段階として、次のとおりHVをN5L3G1-Z3 LF DNAベクターに挿入した:該DNAベクターは2つの制限酵素NheI及びSalIで消化し、次に脱リン酸化した。そして、9.2キロベースのDNA断片(断片A)を単離した。軽鎖構築物と同様、HVのPCR用プライマーセットを、該制限酵素に感受性がある領域をHVの両側にもつよう設計した。プライマーはZ3HP5SAL及びZ3HP3NHE (表2)であり、HVのプラスミド構築物を鋳型として使用した。HVの精製したPCR増幅産物をpGEM-T Easy Vector System (商標)にサブクローニングした。サブクローン化した構築物の挿入部位のヌクレオチド配列を確認した。プラスミドDNAは2種類の制限酵素NheI及びSalIで消化し、0.44キロベースメントのDNA挿入部位(断片B)を精製し、アガロースゲル電気泳動後に精製した。

20

【0191】

2つのDNA断片AとBをT4 DNAリガーゼでつなぎ、つないだ構築物(N5LG1 M2 Z3)をエレクトロポレーションによりE. coli H5株に導入し、形質転換物を生じさせた。E. coli形質転換に陽性のものを選別した。この発現ベクターを精製し、LVC及びHV領域の両方のヌクレオチド配列を特異的プライマー(配列番号:46~49、表2)で確認した。該過程において、突然変異は誘発されなかった。

【0192】

Z3G1の重鎖の完全長ORFのヌクレオチド及びアミノ酸配列は下記のとおり示される。Z3G1の軽鎖の完全長ORFのヌクレオチド及びアミノ酸配列は、上述のZ3のLVCのものと同一である。

30

【0193】

可変及び定常領域のZ3G1重鎖のcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から定常領域の末端(下線部)を示す。

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGCAGCAGCTGGCGGATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGGACACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGCTGCACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGCACCAGAGCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTACAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA

40

50

ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号:36)

【0194】

可変及び定常領域のZ3G1重鎖のcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(小文字)、可変領域、及び定常領域(下線部))を示す。

mdwtwsilflvaaatgahsQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRLSRDDTAVYYCARAAAGGYFQHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:37)

【0195】

【表1】

表1: 合成DNAプライマー(配列番号:38~51)

番号	名称	配列 5'→3'	長さ
(配列番号:38)	IgG1p	TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31-mer
(配列番号:39)	LCR276	GGGGCCACTGTCTCTCCACGGTGCTC	27-mer
(配列番号:40)	hh-4	GGTGCCAGGGGAAGACCGATGG	23-mer
(配列番号:41)	LCR88	CACGGCTCCCGGTAGAAGTCACT	24-mer
(配列番号:42)	M13F	GTAAAACGACGGCCAGTG	18-mer
(配列番号:43)	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-mer
(配列番号:44)	Z3HP5SAL	ACAGAGAGAGGTCGACCCAC CATGGACTGG ACCTGGAGCA TC CTTTT	47-mer
(配列番号:45)	Z3HP3NHE	GAGAGAGAGG CTAGCTGAGG AGACGGTGAC CAGGGTG	37-mer
(配列番号:46)	Z3LP5BGL	AGAGAGAGAG ATCTACCAT GGCCAGCTTC CCTCTCTCC T	41-mer
(配列番号:47)	Z3LP3ERI	AGAGAGAGAGGAATTCTATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGTC	44-mer
(配列番号:48)	SEQU1783	GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA	27-mer
(配列番号:49)	SEQU4618	TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC	27-mer
(配列番号:50)	IgG2pG134	TGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCCTGAGTTCC	31-mer
(配列番号:51)	LC3F81	TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC	27-mer

【0196】

CHO細胞由来の組換えヒト抗M2抗体の産生：組換え抗体を生産するために、抗M2抗体を含有するN5LG1 M2 Z3ベクターをチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞, ATCC #CRL-9096)の宿主細胞dhfr-欠損株にエレクトロポレーションにより導入し、組換え抗体をトランスフェクト細胞の上清液から単離した。簡潔にいうと、精製したDNA発現ベクターN5LG1 M2 Z3 10 µgを、DNA制限酵素AscIを用いて線状にし、該DNAをBio Radエレクトロポレーター(350V, 500 µF)を用いてCHO細胞4×10⁶個の細胞にトランスフェクトさせた。トランスフェクト細胞を96-ウェル培養プレートにまき、Geneticin (Gibco-BRL)を添加した培地で培養し、DNAベクターを含むCHO細胞を選別した。幾つかの安定なトランスフェクト細胞株を選別した後、ELISAでヒトIgGを多量に産生する細胞株をスクリーニングして、組換え抗体の生産に利用した。

【0197】

組換え抗体タンパク質の単離及び精製：組換え抗体を発現するCHO細胞を、2 mMグルタミン、100ユニット/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、及びヒポキサンチンとチミジン(HT)(1:100)の補助剤(Invitrogen)を添加した無血清Ex-Cell 325-PE培地(JRH Bioscience, Co., Ltd.)を用いて5%CO₂下で培養し、培養上清液20リットルを37℃インキュベーターにより次のとおり、抗体タンパク質を精製した：該上清液をMabSelect Protein Aカラム(Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.)にアプライした。抗体のAタンパク質への吸着をよくするために、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を使用した後、20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液及び50 mM塩化ナトリウム(pH 2.7)により溶出させた。溶出分画のpHはリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)50 mMを添加してpH 5.5に調整した。ロードする物質のコンダクティビティを1.5容量のMilli-Q等級の水(Millipore, Bedford, MA)を添加して4m

s/cm未満に調整した後、サンプルを0.5 ml SP-セファロースHP カラムシリーズ(Amersham Pharmacia, Cat#17-1087-01, Uppsala, Sweden)に連結させた2 ml Q-Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Pharmacia, Cat#17-0510-01, Uppsala, Sweden)内に初めに通過させた。このステップの後、Q-Sepharose Fast Flowカラムを外して、抗体をPBSで溶出させた。

【0198】

精製した抗体は、Super Cup 100カプセル滅菌フィルター(細孔サイズの直径が0.22 μ m)で濾過滅菌した。精製した抗体の濃度は280 nmで吸光光度分析により測定した結果、タンパク質1mg/mlあたり、280 nmで1.4 ODであった。組換えZ3G1抗体(41 mg)をCHO細胞の培養上清液20リットルから精製した。Limulus Amebocyte Lysate (LAL) アッセイ, Pyrocell Single Test (SEIKAGAKU Corp., Tokyo, Japan)により、サンプル中の発熱物質のレベルが、0.1EU /mgのタンパク質より低いことを確認した。

10

【0199】

ウイルス単離及び力価測定:ウイルスを単離するために、感染したマウスの肺を感染後の幾つかの日の時点で取り出し、液体窒素で凍結させた後、事前に重量を測定しておいたチューブをつかって重量を測定した。実際の肺の重量はチューブの重量を差し引いて算出し、PBSを1:10の割合(重量(グラム):容積(mL))で添加した後、Fisher Tissue Miser (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)を用いてホモジナイズさせた。サンプルはCentra GP8R遠心分離機(International Equipment Company, Needham Heights, MA)を用いて5分間、3000 rpmで遠心分離させて細胞の残骸を除去した。ビリオンを含有する上清液を分割して、液体窒素で凍結させた。そして、該ウイルスは-80℃で保存した。

20

【0200】

ウイルス力価はプラーク測定法により測定した。簡潔にいうと、集密状態のMDCK細胞単層6-ウェル平底プレートを定期的に回転させながら、PBSで溶解させた総容積が100 μ lの10倍ウイルス希釈液で30分間感染させた。単層はPBSで1回洗浄した後、1%非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 μ g/ml硫酸ストレプトマイシン、1 mM ビルピン酸ナトリウム(GIBCO BRL, Rockville, MD)及び1 μ g/mlのトリプシン(TPCK-処理した, Worthington, Biochem. Corp., Lakewood, NJ)を添加したMEM上で、46℃で事前に温めておいた0.9%ウルトラピュアアガロース層(Invitrogen, Carlsbad, CA)を重ねた。細胞は37℃ 5%CO₂下、インキュベーターでインキュベートした。感染後3日以内にプラークが観察され、10%ホルムアルデヒド溶液で溶解させた0.1%クリスタルバイオレットで染色した。プラーク数をカウントした。

30

【0201】

実施例 2

この実施例は、ヒト及びキメラM2モノクローナル抗体の特性を説明する。この実施例は、抗M2ヒトモノクローナル抗体Z3G1が広範囲のM2結合スペクトルを有しており、高親和性結合できることを示すデータも記載する。

組換え技術を用いて、Z3のアイソタイプをZ3、Fab組換えIgG1型Z3 (Z3G1)のCHO発現システムと共にIgG1に変換した。Z3G1抗体を産生させるのに用いた方法は実施例1に記載されている。

40

Z3G1はM2ペプチド及びM2-BSAコンジュゲートに特異的に結合するが、BSA、KLH(免疫に用いる担体)又はmGAD(マウス・グルタミン酸脱炭酸酵素により誘導された無関係の合成ペプチド; アミノ酸数246~266)と、もとのZ3と同じように結合することはない。

【0202】

【表 2】

表2: Z3G1はM2に特異的である

mAbs	M2ペプチド*	感染細胞上のM2 **	BSA	OVA	KLH	mGAD***
C40G1	+	+	-	-	-	-
L66	+	+	-	-	-	-
N547	+	+	-	-	-	-
Z3G1	+	+	-	-	-	-

*: 最も一般的なM2タンパク質の細胞外部分; 配列はSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD (配列番号: 1) である。

** : A/PR/8/34及びA/HK/1/68が感染したMDCK細胞上でM2が発現している。

***: マウスGADにより誘導された合成ペプチドの246~266位の部分。

+ : 陽性は、比較抗体又は非抗体よりも2倍以上OD_{450nm}が高いものと定義付けた。

10

【0203】

Z3G1の結合特異性に関して、細胞ベースのELISA法でさらに確認した。Z3G1は、インフルエンザウイルスに感染したMDCK上に発現するM2タンパク質(M2e)の細胞外/外部ドメインを認識する(表2)。しかも、ウイルス感染細胞に結合したZ3G1抗体は、M2ペプチドが増加した場合、特異的に阻害される(図1)。したがって、Z3G1はM2ペプチドに特異的で、かつインフルエンザA型ウイルスに感染したMDCK細胞表面上に発現するM2タンパク質に特異的である。細胞に基づくEILSAで測定した結果、Z3G1の結合親和性は他の3種類のヒトモノクローナル抗M2抗体(C40G1、N547及びL66)よりもわずかに高く、そのことはKd値が相対的に低いことに反映されている(表3)。

20

【0204】

【表 3】

表3: ヒト抗M2 抗体の親和性の比較

抗体	サブクラス	軽鎖の種類	K _d (×10 ⁻⁹ M)* PR8感染	K _d (×10 ⁻⁹ M)* HK1感染
Z3G1	IgG1	λ	0.497±0.030	0.488±0.070
C40G1	IgG1	κ	0.519±0.033	0.542±0.063
N547	IgG1	λ	1.047±0.165	1.219±0.061
L66	IgG1	λ	0.563±0.099	0.531±0.048

【0205】

表3で示す2つのウイルス株のM2配列の細胞外/外部ドメイン、すなわちA/PR/8/34及びA/PR/1/68はアミノ酸が1個異なっている: A/PR/8/34株では、M2の細胞外部分の20位のアスパラギン酸がグリシンに置換されている。A/HK/1/68由来の配列はM2eとして参照され、ほとんどのインフルエンザ株で共有されている(Neirynckら, Nature Med. 5:1157 (1999))。

30

【0206】

Z3G1抗体はどちらのウイルス株に感染したMDCK細胞上のM2eタンパク質も認識する(表3)。この結果は、表5で例証されるペプチドのELISAデータにより支持される(+は、M2及びM2GへのZ3G1抗体の結合を表す。M2及びM2Gの配列に関しては、表4を参照されたい)。これらの結果は、Z3が異なる2種類のウイルス株に感染したMDCK細胞上に発現したM2及びM2Gタンパク質を両方とも認識することを示す。

40

【0207】

番号Z3G1、N547、L66、C40G1の抗体の反応性は、Z3G1と比べ結合親和性(Kd)がわずかに高いことからわかる(表3)。予想どおり、無関係のヒト抗HSA抗体(抗ヒト血清アルブミン)と適合するアイソタイプは、いかなる反応も示さなかった(図1)。

【0208】

【表 4】

表 4 M2変異株/変異ペプチドの配列

M2ペプチド	配列	配列番号
M2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	(配列番号:2)
M2SG	SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD	(配列番号:3)
M2EG	SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	(配列番号:4)
M2P	SLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	(配列番号:5)
M2G	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	(配列番号:6)
M2DLTGS	SLLTEVDLIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:7)
M2KNS	SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD	(配列番号:8)
M2LGS	SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:9)
M2LTKGS	SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:10)
M2SY	SLLTEVETPIRSEWGCRCYNDSSD	(配列番号:11)
M2TGEKS	SLLTEVETPIRNGWECKSDSSD	(配列番号:12)
M2HTGEKS	SLLTEVETHIRNGWECKSDSSD	(配列番号:13)
M2KTGEKS	SLLTEVKIPTRNGWECKSDSSD	(配列番号:14)
M2LTGS	SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:15)
M2TDGEKS	SLLTEVETPIRNGWECKSDSSD	(配列番号:16)
M2TGS	SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:17)
M2TGEK	SLLTEVETPIRNGWECKNDSSD	(配列番号:18)
M2LTGEKS	SLLTEVETLIRNGWECKSDSSD	(配列番号:19)
M2K	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	(配列番号:20)
M2FG	SFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	(配列番号:21)
M2TGE	SLLTEVETPIRNGWECCNDSSD	(配列番号:22)
M2KGENS	SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD	(配列番号:23)
M2TES	SLLTEVETPIRNEWECRCSDSSD	(配列番号:24)
M2GHTGKS	SLLTGVEETHIRNGWGCKSDSSD	(配列番号:25)
M2PHTGS	SLLPEVETHIRNGWGCRCSDSSD	(配列番号:26)

10

20

【0209】

太字下線で示したものは、配列番号:2のM2配列と比べ変異している領域である。

抗M2抗体の変異M2ペプチドへの結合活性を、インフルエンザA型ウイルス株として報告されている25個の異なるM2ペプチド(配列番号:2~26、表4)を用いたELISAアッセイで解析した。番号Z3G1、C40G1、L66、N547のヒト抗M2抗体及びマウス14C2抗体(Affinity Bioreagents, Golden, CO)を本試験では使用した。

【0210】

30

表5の結果は、Z3G1が野生型のM2ペプチドに結合するだけでなく、ほとんど全てのM2変異株(M2GHTGKS及びM2PHTGSを除く)に結合することを示している。このことは、野生型のM2ペプチドと6個のアミノ酸が異なるM2LTGEKSのケースでさえ当てはまる。L66及びN547はM2変異株のM2P、M2LGS及びM2FGへの結合が相対的に低いのに対し、Z3G1はそれぞれM2P、M2LGS及びM2FGに結合することを示している。しかも、C40G1及び14C2はM2LGS、M2LTKGS、M2HTGEKS、M2KTGEKS、M2LTGS、M2TGEK、M2LTGEKS及びM2TGEへ結合しないか又は低い結合活性を示すが、Z3G1はこれらの変異株/変異M2ペプチドの全てに結合する。これらの結果は、Z3G1が様々なM2変異ペプチドに高い親和性をもって結合することを実証しており、このことはZ3G1がL66、N547及びC40G1よりもM2e配列に対しより広い範囲の結合性をもつことを示している。Z3G1抗体はしたがって、異なるM2配列を有するインフルエンザA型ウイルスの様々な株/分離株及びサブタイプを治療するのに有用であり得る。

40

【0211】

【表 5】

表5 抗M2抗体のM2ペプチドへの交叉反応性*

M2類縁体	Z3G1	L66	N547	C40G1	14C2**
M2	+	+	+	+	+
M2SG	+	+	+	+	+
M2EG	+	+	+	+	+
M2P	+	-	-	+	+
M2G	+	+	+	+	+
M2DLTGS	+	W	+	+	W
M2KNS	+	+	+	+	+
M2LGS	+	W	W	W	--
M2LTKGS	+	+	+	-	-
M2SY	+	+	+	+	+
M2TGEKS	+	+	+	+	-
M2HTGEKS	+	+	+	-	-
M2TGEKS	+	+	+	-	-
M2LTGS	+	+	+	-	--
M2TDGEKS	+	+	+	+	-
M2TGS	+	+	+	W	+
M2TGEK	+	+	+	W	--
M2LTGEKS	+	+	+	W	--
M2K	+	+	+	+	+
M2FG	+	W	W	+	+
M2TGE	+	+	+	W	--
M2KGENS	+	+	+	-	+
M2TES	+	+	+	+	W
M2GHTGKS	-	+	+	-	-
M2PHITGS	W	+	+	-	-

*：野生型のM2ペプチド(配列番号:1)への結合と比較した割合：

10%未満：-

10～50%:W(弱い)

50%を超える：+

**：14C2は、M2ペプチドに対する購入可能なマウスモノクローナル抗体である。

【0 2 1 2】

【表 6】

表6 最近、大発生した鳥インフルエンザのM2ペプチド変異株に対する抗M2抗体の結合性

鳥インフル エンザ	年	サブタ イプ	M2 変異株	Z3G1	L66	N547	C40G1	14C2
香港	1997	H5N1	M2DLTGS	+	W	+	+	W
			M2LTKGS	+	+	+	-	-
			M2LTGS	+	+	+	-	-
香港	1999	H9N2	M2LTGEKS	+	+	+	W	-
東南アジア	2004/2005	H5N1	M2TES	+	+	+	+	W

【0 2 1 3】

最近大発生した鳥インフルエンザA型株のM2e配列は、The Center for Disease Control (CDC)のインフルエンザA型データベース<http://www.flu.lanl.gov/>から表4及び6で示す
とおり誘導した。M2DLTGS、M2LTKGS及びM2LTGS配列は、1997年に人類を世界的な脅威にさ
らした鳥H5N1インフルエンザA型ウイルスから誘導し、M2LTGEKS及びM2TESは1999～2004年
にそれぞれ大発生した鳥インフルエンザA型ウイルスから誘導した。これら3種類の株は全
て病原性が高く、ヒトに対し高い致死性がある(Suzuki, Biol. Pharm. Bull. 28:399 (20
05)、Katz, Avian Dis. 47(3 suppl):914 (2003))。流行する可能性があるこれらの感染
症を治療できるヒト抗体を同定するために、番号Z3G1、L66、N547及びC40G1のヒト抗M2抗
体につき、これらの5種類のM2e変異株ペプチドに対する結合性について調べた(表6)。

【0 2 1 4】

表6に示すとおり、Z3G1及びN547は野生型のM2ペプチドに対してだけでなく、5種類全
てのM2e変異株ペプチドに結合した。L66はM2DLTGSを除いたほとんど全ての変異株によく結
合した。しかしながら、C40G1はM2LTKGS及びM2LTGSに結合せず、M2LTGEKSに対してのみ弱
く結合した。対照として、マウスモノクローナル抗M2抗体 14C2はM2DLTGS及びM2TESにの

10

20

30

40

50

み弱く結合し、M2LTGS、M2LTGS及びM2LTGEKSには結合しなかった。

【0215】

これらの結果は、L66及びN547と同様、Z3G1はH5N1及びH9N2が大流行した場合の脅威や他に大流行する可能性がある鳥インフルエンザを処理する強力な方策をもたらしていることを示している。これらの結果は、L66及びN547と同様、Z3G1がインフルエンザA型株においてみられる広範囲のM2eペプチドに対し結合できることも示している。CDCインフルエンザA型データベースをさらに解析した結果、ヒトと鳥インフルエンザの間で、あるM2e配列が優位であることを示された。ヒトインフルエンザA型株では、野生型M2(配列番号:2)が優位に発現していたのに対し、鳥インフルエンザ株ではM2TESが共通して発現していた。Z3G1、L66、N547及びC40G1はM2TESに結合することができたので、これらのヒト抗M2抗体は、ほとんどの鳥インフルエンザ株／分離株及びサブタイプに対する治療薬となりうる可能性がある。

10

【0216】

実施例3

この実施例には、Z3G1によって認識される抗原結合基がヒト抗M2モノクローナル抗体L66、N547及びC40G1によって認識される抗原結合基と異なることを示すデータが含まれる。抗体の最小結合配列は、M2のN末端とC末端に切断部位を有する様々なペプチドを用いて染色体上で位置づけられる(表7及び8)。それぞれの抗体のエピトープは、最小結合配列のなかに含まれる。

【0217】

該データが、N547の抗原結合基(すわなち、エピトープ)がアミノ酸配列LLTEVETPIRNEWGC(配列番号:52)内に含まれ;L66により認識されるエピトープがアミノ酸配列SLLTEVETPIRNEWGC(配列番号:53)内に含まれ;さらに、C40G1によって認識されるエピトープがアミノ酸配列TPIRNE(配列番号:54)内に含まれることを表している。

20

【0218】

N末端の12個のアミノ酸ペプチド(NM12, 配列番号:69)は、C40G1、L66及びN547と結合しないか又は結合性に乏しいことがELISAにより観察された(表7)。対照的に、Z3G1はNM12によく結合した。M16(16-mer)への結合は陽性だが、さらに末端を切断した場合は陰性となるN-末端ペプチド系に関してさらに研究した結果、Z3G1はN末端から1個目のアミノ酸の欠失(すわなち、第1位のセリン)は容認することが示された。

30

【0219】

Z3G1はNM11に対し顕著な結合を示したのに対し、該抗体はNM10に対しては検出可能以上の結合をしなかった。これらを考慮すると、Z3G1抗体の最小結合配列はLLTEVETPIR(配列番号:1)に決定された。そして、Z3G1により認識されるエピトープはLLTEVETPIR(配列番号:1)内に含まれることがわかる。該データは、抗体Z3G1が認識するエピトープは、N547、L66及びC40G1抗体が認識するエピトープと異なることも示す。

【0220】

【表 7】

表 7 M2切断ペプチドに結合する抗M2モノクローナル抗体の結合活性

M2ペプチド	アミノ酸配列	ELISA (OD ₄₅₀)*				配列番号
		Z3G1	L66	N547	C40G1	
M2	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	2.45	1.04	1.26	2.38	1
M16	LLTEVETPIRNEWGCR	1.73	0.27	1.68	1.75	55
M15	LTEVETPIRNEWGCR	0.05	0.20	0.18	1.93	56
M12	VETPIRNEWGCR	0.05	0.19	0.14	1.95	57
CM17	ETPIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.14	0.14	3.01	58
CM16	TPIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.13	1.41	59
CM15	PIRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.15	0.10	60
CM14	IRNEWGCRCNDSSD	0.05	0.13	0.13	0.10	61
CM13	RNEWGCRCNDSSD	0.06	0.15	0.16	0.11	62
CM12	NEWGCRCNDSSD	0.05	0.16	0.14	0.11	63
NM17	SLLTEVETPIRNEWGCR	2.48	1.92	2.22	2.18	64
NM16	SLLTEVETPIRNEWGC	2.38	2.52	2.78	2.17	65
NM15	SLLTEVETPIRNEWG	1.75	0.28	0.33	2.67	66
NM14	SLLTEVETPIRNEW	2.00	0.16	0.16	1.93	67
NM13	SLLTEVETPIRNE	0.13	0.17	0.16	1.82	68
NM12	SLLTEVETPIRN	1.32	0.12	0.16	0.16	69
NM11	SLLTEVETPIR	0.69	0.17	0.15	0.15	29
NM10	SLLTEVETPI	0.09	0.16	0.14	0.11	70
NM9	SLLTEVETP	0.06	0.16	0.13	0.13	71
NM8	SLLTEVET	0.06	0.18	0.15	0.10	72
NM7	SLLTEVE	0.05	0.18	0.14	0.09	73

*:全ての抗体は10 μg/mlで使用した。

【0 2 2 1】

【表 8】

表 8 抗M2抗体の最小結合配列

抗体	最小結合配列	配列番号
L66	SLLTEVETPIRNEWG	74
C40G1	TPIRNE	54
N547	LLTEVETPIRNEWG	75
Z3G1	LLTEVETPIR	1

【0 2 2 2】

実施例 4

この実施例は、本発明のM2モノクローナル抗体をインフルエンザウイルスに感染する前に投与した場合、後続のウイルスによる致死攻撃から動物を保護することを示す幾つかの動物試験を記載する。

【0 2 2 3】

インフルエンザA型ウイルス感染マウスモデルに対する、予防的治療としての(ウイルス感染前の)抗M2モノクローナル抗体のin vivoでの効果:動物における抗M2ヒトモノクローナル抗体の効果を評価するため、番号Z3G1をC57BL/6Jの雌のマウス(6~8週令)に対し、100、30及び10 μg/マウスの用量で腹腔内投与した。抗体を投与した翌日に、15 μg/gのAvertin (2,2,2トリブromoエタノール:tert-amyl-OHが1:1 (w/v) の溶液)) Sigma, St. Louis, MO)でマウスを麻酔し、致死量のインフルエンザA/HK/1/68 (CDC, Atlanta, GA) 30 μl (MLD50の3.2倍希釈液)を鼻腔内投与して感染させた。比較群として、KMマウスTMから産生されたヒトモノクローナル抗HSA IgG1抗体に適合させたアイソタイプ(Kirin Brewery Co., Ltd., Japan)を100 μg/マウス投与した。マウスは、生存について23日間毎日観察した。生き残ったマウスはその期間経過後に殺し、その肺を組織学的分析のために取り出した。

【0 2 2 4】

抗M2抗体 番号Z3G1で処理したマウスは明らかに保護され、投与量が10 μg/マウスの場合でさえ保護された(表2)。10匹のマウス中10匹(100%)が、観察期の23日を過ぎてもなお生存していた。対照的に、比較群では10匹のマウス中9匹(90%)が感染後22日以内に死亡し

10

20

30

40

50

た(図2)。

【0225】

プラークアッセイで測定した、インフルエンザA型ウイルス感染マウスモデルにおけるZ3G1によるin vivoでのウイルス複製阻害

麻酔したC57BL/6Jの雌のマウス(6~8週令)に対し、致死未満量のインフルエンザA/HK/1/68 (CDC, Atlanta, GA) 30 μ lを鼻腔内投与して感染させた。麻酔は既報のとおりAvertinを用いて行った。感染したマウスの肺を、2、5、7、9、11日目に取り出し、プラークアッセイによりウイルス力価を定量した。インフルエンザウイルスに対する予防的治療としての抗M2モノクローナル抗体の効果を定量するため、ウイルス感染の前日にZ3G1 30 μ gを投与した。アイソタイプ適合抗HAS IgG1抗体を対照として使用した。

10

【0226】

図3の結果は、ウイルス感染から2日目に、Z3G1で処理したマウスではウイルスが全く検出されなかったことを示している。対照的に、アイソタイプコントロールのHASで処理したマウスでは、感染から2日目に肺で 3.95×10^4 pfu/gのウイルスが観察された。感染から5日後には、Z3G1で処理したマウスの肺で212 pfu/gのウイルスが存在した。対照的に、比較群のHASで処理したマウスでは、感染から5日後には、ウイルス力価が肺で 45×10^4 pfu/gにまで達していた。したがって、Z3G1による治療は、約1,000~10,000倍ウイルス力価を低下させた。感染から7日後にはウイルス力価は低下し、感染から11日後にはウイルスはおそらく宿主適合性の免疫に基づいたウイルスの排除により、実質的に消えた。該データは、抗M2抗体 Z3G1が効果的にインフルエンザウイルス複製をin vivoで阻害することを

20

【0227】

実施例 5

この実施例は、本発明のM2モノクローナル抗体が補体依存性細胞障害及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を示す試験について記載する。

【0228】

抗M2抗体の補体依存性細胞障害(CDC)活性：M2タンパク質は感染細胞表面上に高発現しているので、抗M2抗体が宿主細胞をインフルエンザA型感染から保護するメカニズムの1つは、補体を活性化して、オプソニン作用を強化し、感染細胞を溶解させることによりウイルスを殺生してin vivoでのウイルス増殖を防止することである。したがって、抗M2抗体

30

【0229】

MDCK細胞を96-ウェル平板プレート(Falcon (登録商標))に 2.5×10^5 細胞/mLで播種し、20 mM L-グルタミン、10 mMピルビン酸ナトリウム、1000ユニット/mLのPen-Strep、MEMビタミン溶液、MEMイーグル非必須アミノ酸(Invitrogen, Carlsbad, CA)、及び補助剤として10%ウシ胎児血清(FBS)を添加した完全最小必須培地(cMEM)を1ウェル当たり150 μ l使用して、7%CO₂下37°Cで24時間培養した。24時間後、プレートはPBSで2回洗浄して、TCID₅₀インフルエンザA型ウイルス(A/PR/8/34; ATCC, Rockville, MD)の10倍希釈液30 μ l/ウェルを用いて定期的に回転させながら、室温で30分間感染させた。感染後、該プレートはPBSで1回洗浄し、1 μ g/mLトリプシン(TPCK処理済, Worthington, Biochem. Corp.)を150 μ l添加したcMEMを加え、プレートを7%CO₂下、37°Cで26時間インキュベートした。細胞単層はその後、最小必須培地(MEM)で3回洗浄した。抗体を固定緩衝液(細胞ベースのELISAで使用すると同じ緩衝液)で所望の濃度に希釈し、それぞれのウェルに50 μ lずつ加え、室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルはMEMで1回洗浄した。100 μ Lの低毒性ウサギ補体(Cedarlane Lab Limited - Accurate, Hornby, Ontario, CA NADA)を1 mL MEMで再構成さえ、さらに1:10に希釈して細胞に加えた。37°Cで1時間インキュベートした後、該細胞単層はMEMで3回洗浄し、製造業者の使用説明書に従いCellTiter 96(商標) AQueous 1溶液細胞増殖アッセイ(Promega, Madison, WI)を用いて、生存細胞の数を確認した。生存細胞の数が多ければ多いほど、495 nmにおける吸光度は高くなる。

40

50

【0230】

図4に示すとおり、界面活性剤(Triton X-100)によって溶解された場合、吸光度は0.2未満であった。これにより、ポジティブコントロールが最大の殺傷作用を示したとみなした。アイソタイプコントロールのヒト抗体(HSA)は、いずれの濃度においても、インフルエンザA型ウイルスに感染したMDCK細胞を溶解させることができなかった。対照的に、本実験で使用したすべてのヒト抗M2抗体(Z3G1、L66、N547及びC40G1)は、ウイルス感染したMDCK細胞を用量依存的に溶解した。すべての抗体は、1 µg/mLで細胞を溶解し、そして該溶解作用は、投与量が10 µg/mLに近いときに最大の殺傷作用が観察された。

【0231】

抗M2抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性:

10

抗M2抗体が結合したインフルエンザA型ウイルス感染細胞は、特異的非T、非Bリンパ細胞、いわゆるナチュラルキラー細胞(NK細胞)によって殺傷され得る。ナチュラルキラー細胞による抗体が結合した標的細胞の破壊は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)と呼ばれ、抗M2抗体が宿主細胞をインフルエンザA型ウイルス感染から保護することができる別のメカニズムである。

【0232】

MDCK細胞を96-ウェル平板プレート(Falcon (登録商標))に 0.25×10^5 細胞/mLで播種し、10%FBSを添加したcMEMを1ウェル当たり150 µl使用して、7%CO₂下37°Cで24時間培養した。24時間後、プレートはPBSで2回洗浄して、TCID50インフルエンザA型ウイルス(A/PR/8/34; ATCC, Rockville, MD)の10倍希釈液30 µl/ウェルを用いて定期的に回転させながら、室温で30分間感染させた。感染後、該プレートはPBSで1回洗浄し、1 µg/mLトリプシン(TPK処理済, Worthington, Biochem. Corp.)を150 µl添加したcMEMを加え、プレートを7%CO₂下、37°Cで22時間インキュベートした。細胞単層はその後、固定緩衝液で3回洗浄した。固定緩衝液で5 µg/mLに希釈した抗体を50 µL/ウェル加え、室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルは固定緩衝液で洗浄し、通常ヒト末梢血から採取したNK細胞を製造業者の使用説明書に従いMACS精製システム(Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA)を使用して精製した。RPMI 1640 (フェノールレッドでない) (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含有する10%低濃度Ig FCSに溶解させたヒトIL-2 200 ng/mLで前培養したNK細胞をそれぞれ異なる細胞数ずつウェルに加えた。細胞の溶解については、製造業者の使用説明書に従い、CytoTox 96 (商標) 非放射性細胞毒性分析システム(Promega, Madison, WI)を用いて確認した。

20

30

【0233】

本実験で使用したすべてのヒト抗M2抗体Z3G1、L66、N547及びC40G1は、 0.5×10^5 個のNK細胞存在下でウイルス感染したMDCK細胞を約50%溶解させることができた。対照的に、IgG1アイソタイプコントロール抗体(HSA)では、わずか25%の溶解しか観察されなかった。活性NK細胞は、ウイルス感染細胞及びMDCK細胞のような非自己細胞を溶解することができるので、比較群において抗体で被覆しない標的細胞でも、溶解が25%観察されたことには注目されたい。とはいうものの、標的細胞が抗M2抗体と結合すれば、溶解を50%まで増加させることができる。したがって、4種類のヒト抗M2抗体はADCC活性を有していたといえる。

40

【0234】

実施例 6

この実施例には、抗M2ヒトモノクローナル抗体 Z3G1の予防及び治療的活性を実証する試験が含まれる。この実施例には、サルにおいて抗M2ヒトモノクローナル抗体 Z3G1がほとんど毒性を有さないことを示す試験も含まれる。

【0235】

NK細胞が減少した(免疫不全の)動物のインフルエンザA型ウイルス感染に対する、抗M2ヒトモノクローナル抗体 Z3G1のin vivo予防効果

NK細胞の減少: NK細胞を減少させるため、C57BL/6JマウスをPK136 (ATCC, Manassas, VA; NK細胞に特異的に発現することが知られているNK1.1抗原に対するマウスモノクローナ

50

ルIgG2a抗体)100 µgで処置した。アイソタイプ適合性抗体(クローンC44, ATCC)を対照として使用した。該抗体は、感染前2、5日目及び感染後1、4日目に投与した。抗NK1.1 抗体又は比較抗体を3回注射した後、各群から1匹のマウスを殺傷して、リンパ節、脾臓及び末梢血を回収した。赤血球溶解緩衝液(Sigma, St Louis, MO)により赤血球を溶血させた後、単細胞浮遊液を調製し、DX5 FITC及びCD3 PE(eBioscience, サンディエゴ, CA)で染色するか、又は抗Fc受容体抗体(eBioscienceから購入したクローン2.4G2)で20分間ブロッキングした後、適当なアイソタイプコントロールを氷上で45分間冷却した。2% FCS、10 mM EDTA、0.05% NaN₃を含むPBSで2回洗浄した後、PBSで1回洗浄し、細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、その後フローサイトメトリーで分析した。DX5はマウスにおけるNK細胞のマーカである。各組織に存在するNK細胞の割合は、該浮遊液に占める細胞の総数中のDX5陽性細胞の数に基づいて算出した。

10

【0236】

NK細胞が減少したマウスにおけるインフルエンザA型感染に対する抗M2抗体による治療：抗M2抗体 Z3G1を100 µg/マウスの用量で、ウイルス感染した翌日に腹腔内投与した。比較群として、アイソタイプ適合性ヒトモノクローナル抗ヒト血清アルブミン(HSA) IgG1抗体を100 µg/マウス投与した。ウイルス感染させるために、マウスは15 µgのAvertin (2,2,2トリブromoエタノール：tert-amyl-OHが1:1 (w/v) の溶液)) Sigma, St. Louis, MO)で麻酔し、致死量のインフルエンザA/HK/1/68 (CDC, Atlanta, GA) 30 µl (MLD50の3.2倍希釈液)を鼻腔内投与して感染させた。マウスは、生存について23日間毎日観察した。

【0237】

20

下記の表9に示すとおり、NK細胞の割合はアイソタイプコントロール抗体で処理したマウスと比べ、抗NK1.1抗体で処理したマウスでは、分析対象の3つの全ての組織において減少した。NK細胞を提示するDX5陽性細胞は、リンパ節では0.93%から0.02%、脾臓では1.74%から0.52%、末梢血では3.45%から0.75%に減少した。これらの結果は、抗NK1.1抗体による処置により、NK細胞が有効に減少することを示した。

【0238】

【表9】

表9：抗NK1.1抗体で処理したマウス及びアイソタイプコントロール抗体で処理したマウスにおけるDX5+細胞の割合

	リンパ節(%)	脾臓(%)	末梢血(%)
アイソタイプコントロール抗体で処理したマウス	0.93	1.74	3.45
抗NK1.1抗体で処理したマウス	0.02	0.52	0.75

30

【0239】

NK細胞が減少したマウスでの抗M2抗体 Z3G1のインフルエンザA型感染の防御効果

抗M2抗体 Z3G1を100 µg/マウス投与した場合、NK細胞が減少した(Z3G1/NK-)又は減少していない(Z3G1/NK+)条件のいずれでもA/HK/1/68による感染からマウスを防御する。一方、アイソタイプコントロール抗HSA抗体は、NK細胞が減少しているかどうかに関わらずウイルス感染からマウスを防御しなかった(図6; HSA/NK-及びHSA/NK+)。Z3G1/NK-及びZ3G1/NK+群では、それぞれ7匹中6匹、8匹中6匹のマウスが観察期間の23日を過ぎて生存していた。この2つの群では、統計学的な差は認めなかった($p>0.05$, Kaplan Meier生存解析に基づく)。対照的に、HSA/NK-及びHSA/NK+群ではそれぞれ、8匹中1匹、8匹中0匹が生き残った。Z3G1で処理した群と抗HASで処理した群との間の、感染したマウスの生存に関する経時変化は、NKが減少した条件および減少していない条件の両方で、統計学的に有意差が認められた($p<0.001$)。

40

【0240】

HBc (B型肝炎のコア粒子)に連結したM2細胞外部分、すなわちM2 HBcからなるワクチンの効果に関する報告がなされている(Jegerlehnerら, J. Immunol. 172:5598 (2004))。これらの著者は、NK細胞が減少した条件下で感染した場合、ワクチンの効果が減少すると報告している。しかも、これらの著者は、NK細胞が減少している場合、M2-HBcを予防接種し

50

たマウスから得た血清を受動投与しても、インフルエンザA型による致死の攻撃からマウスを防御できなかったと報告している。これらの結果は、M2-HBcワクチンのインフルエンザA型感染に対する防御効果は、主にNK細胞により介在されていることを示している。対照的に、抗M2抗体Z3G1は、NK細胞が減少した条件下でもインフルエンザA型の致死の攻撃からマウスを効果的に防御した。これらの結果は、抗M2ヒトモノクローナル抗体Z3G1が、NK細胞の機能が減弱化した癌患者のような免疫不全の被験体においても、効果があるかもしれないことを示している。これらの結果は、抗M2抗体Z3G1による受動免疫療法がワクチンとくらべ、インフルエンザA型感染に対しより優れた防御をもらす可能性があることも示している。

【0241】

10

インフルエンザA型感染したマウスにおける抗M2抗体Z3G1の治療効果

麻酔したマウス（15 μ gのAvertin（2,2,2トリブロモエタノール：tert-amyl-OHが1:1（w/v）の溶液）（Sigma, St. Louis, MOで麻酔）に、致死量のインフルエンザA/HK/1/68（CDC, Atlanta, GA）30 μ l（MLD50の3.2倍希釈液）を鼻腔内投与して感染させた。Z3G1を投与量200、100及び30 μ g/マウスで、C57BL/6Jの雌のマウス（6～8週令）にウイルス感染の翌日に腹腔内投与した。比較群として、アイソタイプ適合性ヒトモノクローナル抗HSA IgG1抗体を投与量200 μ g/マウスで投与した。マウスは、生存について23日間毎日観察した。

【0242】

20

図7にデータを示す。比較群の抗HSA IgG1群では、感染後11日目までに8匹中7匹が死亡した。対照的に、Z3G1の200 μ g/マウス投与群では感染後11日目まで8匹中7匹が生存し、23日目の時点では8匹中7匹が生存した。比較群とZ3G1 200 μ g/マウスで処理した群とでは、生存率の経時変化に関して、統計学的に有意差が認められた（ $p < 0.02$ 、Kaplan Meyer生存解析に基づく）。投与量100 μ g/マウスでは8匹中7匹、8匹中3匹がそれぞれ11日目、23日目の時点で生存したが、この差は比較群とくらべ統計学的に有意ではなかった（ $p = 0.068$ ）。投与量30 μ g/マウスでは、8匹中3匹、8匹中1匹のマウスがそれぞれ11日目、23日目の時点で生存し、比較群と比べ処理群でも防御は認めなかった。これらの結果は、抗M2抗体Z3G1はインフルエンザ感染後に抗体で処理した場合でさえ、インフルエンザA型感染に治療効果を有することを示している。

【0243】

30

カニクイザルにおけるZ3G1の単回投与毒性試験：

Z3G1の毒性を評価するため、2頭のカニクイザルに対し、抗体30 mg/kgを約45分間かけて静脈内注射で単回投与した。動物を解剖した後、3週間試験を行った。比較群として、ビヒクルのPBSを2頭のサルに投与した。30 mg/kgのZ3G1で処理した群は比較群とくらべ、食物摂取や体重等の臨床的に意義のある所見の変化は認めなかった。抗体は、血液学的パラメータや血液生化学検査において特別な変化はもたらさず、同様に臨床病理学的にも意味のある変化は認めなかった。これらを考慮すると、カニクイザルに対しZ3G1を30 mg/kg静脈内に単回投与しても、血液生化学検査、血液学検査、食物摂取、体重、巨視的病理又は組織病理など調べたパラメータにおいて明らかな毒性は示さなかったといえる。これにより、Z3G1が良好な寛容性を示すことが明らかとなった。

40

【図面の簡単な説明】

【0244】

【図1】A/PR/8/34感染細胞表面上のM2への番号Z3G1抗体の結合は、可溶性M2ペプチドにより特異的に阻害されるが、無関係のタンパク質（BSA）によっては阻害されないことがわかる。MDCK細胞に感染したA/PR/8/34に結合した抗体を、ELISAで測定した。

【図2】M2抗体Z3G1（100 μ g、30 μ g又は10 μ g/マウス）又はアイソタイプコントロール抗体HSA（100 μ g/マウス）の投与により、インフルエンザ感染による死亡から動物が予防的に保護されることを示す。Z3G1又はHSAは、致死量のA/HK/1/68で感染させる日の前日に投与した。生存率は感染後1～23日目について調べた。

【図3】M2抗体Z3G1の投与により、感染動物の肺内でウイルス複製を阻害する予防効果を

50

示す。Z3G1又はHSA(アイソタイプコントロール)30 μ g/マウスを、致死未満量のA/HK1/68を投与する日の前日に投与した。肺ウイルス力価は表示の時点で、プラークアッセイにより測定した。

【図4】抗M2抗体Z3G1、L66、N547及びC40G1の補体依存性細胞障害(CDC)活性を、コントロール抗体(HSA)と比較して示す。

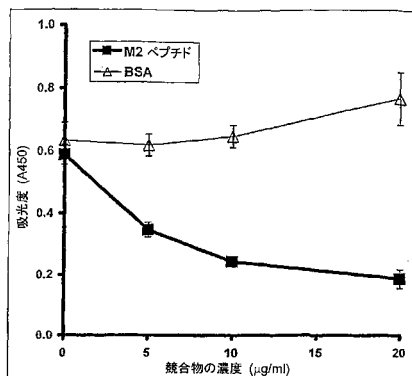
【図5】抗M2抗体Z3G1、L66、N547及びC40G1の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性を、コントロール抗体(HSA)と比較して示す。

【図6】M2抗体Z3G1は、致死量のA/HK1/68攻撃(challenge)からNK細胞を除去したマウスを保護することを示す。NK細胞を除去したマウス(NK-)又は除去していないマウス(NK+)に対し、致死量のA/HK1/68で感染させる日の前日に、抗M2抗体Z3G1又はアイソタイプコントロール抗体(HSA) 100 μ g/マウスを投与した。生存率は感染後1～23日目について観察した。

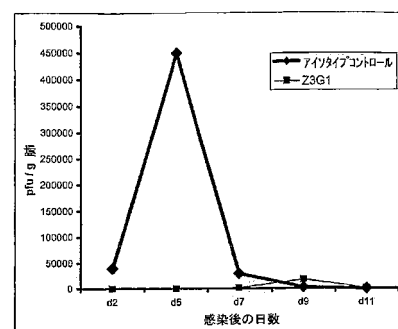
【図7】M2抗体Z3G1の治療レジメン(治療計画)は、致死量のA/HK1/68攻撃からマウスを保護することを示す。致死量のA/HK1/68で感染させた日の翌日に、マウスに対し、抗M2抗体Z3G1 200 μ g、100 μ g又は30 μ g/マウス、又はアイソタイプコントロール抗体(HSA)200 μ g/マウスを投与した。生存率は感染後1～23日目について観察した。

10

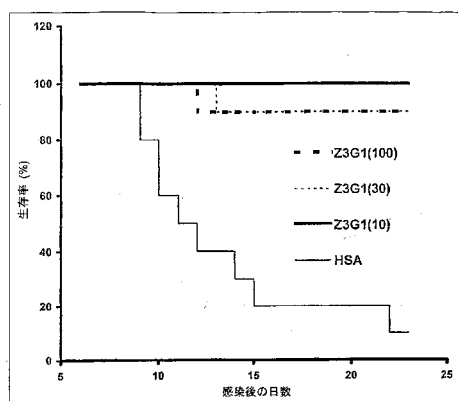
【図1】



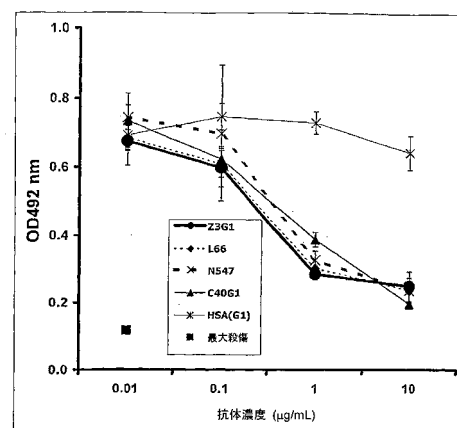
【図3】



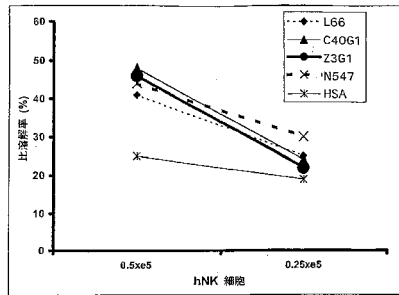
【図2】



【図4】

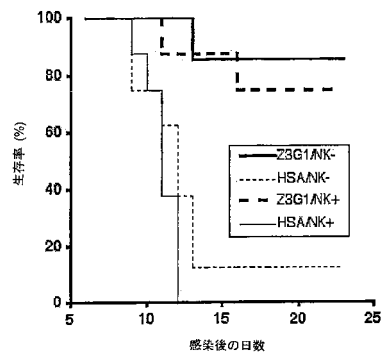


【図 5】



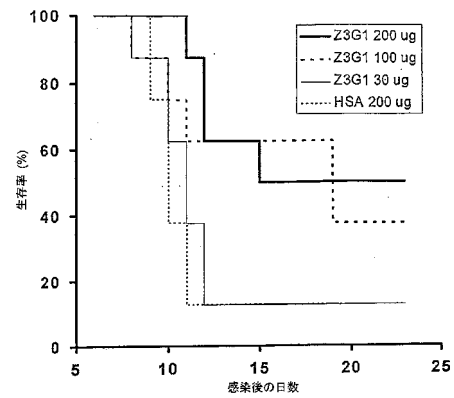
【図 6】

Z3G1 抗体は NK 細胞が減少した条件下で、致死量の A/HK/1/68 攻撃からマウスを保護する



【図 7】

Z3G1 抗体は治療レジメンにおいて、致死量の A/HK/1/68 攻撃からマウスを保護する



【配列表】

0004881874000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/10
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/46</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/46
<i>A 0 1 K</i>	<i>67/027</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 0 1 K</i> 67/027
<i>A 0 1 H</i>	<i>5/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 0 1 H</i> 5/00 A
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 39/395 S
<i>A 6 1 K</i>	<i>45/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 39/395 M
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/16</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 39/395 L
			<i>A 6 1 K</i> 45/00
			<i>A 6 1 P</i> 31/16

微生物の受託番号 ATCC PTA-5968

(72)発明者 ワン ロンファン
 アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, カーメル カントリー ロ
 ード 1 2 6 2 0 # 7 4

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 3 / 0 7 8 6 0 0 (WO, A 1)
 Immunol. Lett., 2004.05, Vol.93, p.131-136

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 C07K 16/00-16/46
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 UniProt/GeneSeq
 WPI