

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6960856号
(P6960856)

(45) 発行日 令和3年11月5日 (2021.11.5)

(24) 登録日 令和3年10月14日 (2021.10.14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

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

請求項の数 20 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-553107 (P2017-553107)
 (86) (22) 出願日 平成28年4月8日 (2016.4.8)
 (65) 公表番号 特表2018-518940 (P2018-518940A)
 (43) 公表日 平成30年7月19日 (2018.7.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/026800
 (87) 国際公開番号 W02016/164835
 (87) 国際公開日 平成28年10月13日 (2016.10.13)
 審査請求日 平成31年4月4日 (2019.4.4)
 (31) 優先権主張番号 62/144,729
 (32) 優先日 平成27年4月8日 (2015.4.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 399052796
 ダイナ ファーバー キャンサー インス
 ティテュート、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 2 1 5, ポストン, ブルックライン ア
 ベニュー 4 5 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化インフルエンザモノクローナル抗体およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むCDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖；ならびに

b. SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むCDR1、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCDR2、およびSEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖を含む、インフルエンザウイルスを中和する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

SEQ ID NO:2のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:6のV_Lアミノ酸配列

を含む、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 3】

インフルエンザウイルスのHAのステム領域に結合する、請求項1または2記載の抗体。

【請求項 4】

インフルエンザウイルスが、インフルエンザA型ウイルスである、請求項1～3のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 5】

インフルエンザA型ウイルスグループIおよびグループIIを中和する、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 6】

単鎖Fv抗体、F_{ab}フラグメント、F_{ab}'フラグメントまたはF_{(ab')₂}フラグメントである、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7】

治療剤に連結されている、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 8】

治療剤が、毒素、放射性標識、siRNA、低分子またはサイトカインである、請求項7記載の抗体。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を産生する、細胞。

【請求項 10】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体および担体を含む、組成物。

【請求項 11】

SEQ ID NO:1の核酸配列を含む核酸分子とSEQ ID NO:3の核酸配列を含む核酸分子とを含む組み合わせ。

【請求項 12】

SEQ ID NO:1の核酸配列を含む核酸分子とSEQ ID NO:5の核酸配列を含む核酸分子とを含む組み合わせ。

【請求項 13】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子とSEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子とを含む組み合わせ。

【請求項 14】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子とSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子とを含む組み合わせ。

【請求項 15】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドとSEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む組み合わせ。

【請求項 16】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドとSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む組み合わせ。

【請求項 17】

請求項11～14のいずれか一項記載の組み合わせを含む、ベクター。

【請求項 18】

請求項17記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 19】

インフルエンザウイルスにより引き起こされる疾患または障害を予防または処置するための、請求項10記載の組成物。

【請求項 20】

抗ウイルス剤と併用される、請求項19記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2016年4月8日に出願された米国仮出願番号62/144,729からの優先権および恩典を主張し、その内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本発明は、概して、インフルエンザ中和性抗体およびその使用方法に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

政府の利益

本発明は、[] によって授与された [] の下で政府の支援を受けてなされたものである。米国政府は本発明において一定の権利を有している。

【 0 0 0 4 】

発明の背景

インフルエンザの流行は、人類の健康に対する最大の急性感染性の脅威の一つである。ワクチン接種は今も、季節性および流行性インフルエンザならびにその合併症を予防する主な手段である。インフルエンザウイルスの複数のサブタイプに対する広範囲の免疫を誘導する「ユニバーサル」インフルエンザワクチンが、医学研究において長い間求められている目標である。HAのステム上の高度に保存された疎水性ポケットに結合するヒト広域中和性「ヘテロサブタイプ」抗体 (sBnAb) に関する最近の発見は、そのようなワクチンを開発する取り組みを再燃させた。しかし、季節性インフルエンザもしくはH5N1ワクチンの血清中または市販の静脈内免疫グロブリン (IVIG) 製剤中では、ごく低濃度のsBnAbしか検出されない。

10

【 0 0 0 5 】

インフルエンザウイルスに対する免疫療法のためのモノクローナル抗体 (mAb) および薬物を製造するために、継続的な取り組みがなされている。具体的には、取り組みは、様々なインフルエンザ株のすべてを中和する治療化合物の開発に向けられている。現在、この目標を達成することができるmAbは少数しか報告されていない。これらのmAbは、ファージディスプレイライブラリのパニングによっておよびワクチン接種したボランティア由来のB細胞のスクリーニングによって単離された。しかし、中和性インフルエンザ抗体の広範囲パネルの発見および製造のためのより合理的な設計アプローチに特定の構造決定基を組み込むために、広域中和性インフルエンザ抗体の特徴の理解を深めることが有用であり得る。

20

【 0 0 0 6 】

したがって、インフルエンザウイルスを幅広く中和することができるさらなるモノクローナル抗体および合理的設計アプローチを通じてそのような抗体の親和性または効果を向上させるための方法が強く求められている。

【 発明の概要 】

30

【 0 0 0 7 】

本発明は、以下の特徴：IGHV3-30生殖系列遺伝子によりコードされる重鎖可変領域；ヘマグルチニン (HA) タンパク質のステム領域内のエピトープに結合する；およびグループ1およびグループ2インフルエンザA型ウイルスを中和する、を有する、単離された組み換え生産されたモノクローナル抗体を特徴とする。

【 0 0 0 8 】

1つの局面において、モノクローナル抗体は、以下の特徴：IGLV1-44生殖系列遺伝子によりコードされる軽鎖可変領域；SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；未切断HA0に結合する；HA0の切断を防ぐ；および/またはSEQ ID NO:18にしたがう番号で、HA2ポリペプチドのアミノ酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、45、49および53により定義される立体構造エピトープに結合する、のうち1つまたは複数を含む。

40

【 0 0 0 9 】

本発明は、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCDR2およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖；ならびにSEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCDR2およびSEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖を含む、インフルエンザウイルスを中和する、単離されたモノクローナル抗体を特徴とする。

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、SEQ ID NO:2のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:6のV_Lアミノ酸配列；SEQ ID NO:2のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:24のV_Lアミノ酸配列

50

；またはSEQ ID NO:22のVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:4もしくは6のVLアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体を特徴とする。

【0011】

この抗体は、HA2ポリペプチドのアミノ酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、45、49および53により定義される立体構造エピトープに結合する。

【0012】

1つの局面において、この抗体は、単鎖Fv抗体、F_{ab}フラグメント、F_{ab}フラグメントまたはF_{(ab')₂}フラグメントである。別の局面において、この抗体は、治療剤に連結されている。例えば、治療剤は、毒素、放射性標識、siRNA、低分子またはサイトカインである。

10

【0013】

本発明はまた、本明細書に開示される抗体のいずれかおよび担体を含む組成物を特徴とする。

【0014】

本発明は、SEQ ID NO:1、3および5から選択される核酸配列を含む核酸配列を提供する。別の態様において、SEQ ID NO:2、4および6から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列。1つの局面において、SEQ ID NO:2、4および6から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【0015】

本発明は、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5および6から選択される核酸配列を含むベクターを提供する。1つの局面において、本発明は、核酸配列1、2、3、4または6を含むベクターを含む細胞を提供する。

20

【0016】

本発明はさらに、本明細書に開示される抗体のいずれかを産生する細胞を提供する。

【0017】

本発明はさらに、インフルエンザウイルスにより引き起こされる疾患または障害を処置する方法であって、その疾患または障害に罹患する危険がある人に、治療有効量の本明細書に開示されるモノクローナル抗体のいずれかを投与する段階を含む方法を提供する。任意で、この方法はさらに、抗ウイルス剤を投与する段階を含む。

30

【0018】

[本発明1001]

以下の特徴：

- a. IGHV3-30生殖系列遺伝子によりコードされる重鎖可変領域；
- b. ヘマグルチニン（HA）タンパク質のステム領域内のエピトープに結合する；および
- c. グループ1およびグループ2インフルエンザA型ウイルスを中和する
を有する、単離された組み換え生産されたモノクローナル抗体。

[本発明1002]

以下の特徴：

- d. IGLV1-44生殖系列遺伝子によりコードされる軽鎖可変領域；
- e. SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；
- f. 未切断HA0に結合する；
- g. HA0の切断を防ぐ；および/または
- h. SEQ ID NO:18にしたがう番号で、HA2ポリペプチドのアミノ酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、45、49および53により定義される立体構造エピトープに結合する
のうち1つまたは複数を有する、本発明1001のモノクローナル抗体。

40

[本発明1003]

- a. SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むCDR2およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖；ならびに
- b. SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むCDR2およびSEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むCDR3を含

50

む軽鎖

を含む、インフルエンザウイルスを中和する、単離されたモノクローナル抗体。

[本発明1004]

a. SEQ ID NO:2のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:4もしくはSEQ ID NO:6のV_Lアミノ酸配列；

b. SEQ ID NO:2のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:24のV_Lアミノ酸配列；または

c. SEQ ID NO:22のV_Hアミノ酸配列およびSEQ ID NO:4もしくは6のV_Lアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体。

[本発明1005]

インフルエンザウイルスのHAのステム領域に結合する、本発明1003または1004の抗体。

10

[本発明1006]

インフルエンザウイルスが、インフルエンザA型ウイルスである、本発明1003～1005のいずれかの抗体。

[本発明1007]

インフルエンザA型ウイルスグループIおよびグループIIを中和する、本発明1003～1006のいずれかの抗体。

[本発明1008]

HA2ポリペプチドのアミノ酸18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、45、49および53により定義される立体構造エピトープに結合する、本発明1003～1007のいずれかの抗体。

20

[本発明1009]

単鎖Fv抗体、F_{ab}フラグメント、F_{ab}'フラグメントまたはF_{(ab')₂}フラグメントである、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1010]

治療剤に連結されている、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1011]

治療剤が、毒素、放射性標識、siRNA、低分子またはサイトカインである、本発明1007の抗体。

[本発明1012]

本発明1001～1011のいずれかの抗体を産生する、細胞。

30

[本発明1013]

本発明1001～1011のいずれかの抗体および担体を含む、組成物。

[本発明1014]

SEQ ID NO:1、3および5から選択される核酸配列を含む、核酸配列。

[本発明1015]

SEQ ID NO:2、4および6から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸配列。

[本発明1016]

SEQ ID NO:2、4および6から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

[本発明1017]

本発明1014または1015の核酸を含む、ベクター。

40

[本発明1018]

本発明1017のベクターを含む、細胞。

[本発明1019]

インフルエンザウイルスにより引き起こされる疾患または障害を予防または処置する方法であって、その疾患または障害に罹患する危険がある人に、治療有効量の本発明1013の組成物を投与する段階を含む、方法。

[本発明1020]

抗ウイルス剤を投与する段階をさらに含む、本発明1019の方法。

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかと

50

なり、かつそれらは以下の詳細な説明および特許請求の範囲に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】ヒト記憶B細胞レパトリーからの、インフルエンザウイルスに対する広域中和性Abの単離を示す図である。代表的な蛍光標識細胞選別（FACS）データも示されている。このFACSデータは、総PBMCから単離されたH3反応性記憶B細胞の出現率を示している。

【図1B】アミノ酸配列に基づくインフルエンザA型ウイルスの18種のHAサブタイプの系統樹を示している。グループ1サブタイプおよびグループ2サブタイプがこの図に示されている。アミノ酸距離スケールバーは、距離0.1を示している。

【図2-1】図2は、広範囲のグループ1およびグループ2 HAに対する3I14の結合を示すFACSグラフ集である。293T細胞に、異なるHA発現プラスミドにより一過的にトランスフェクトし、その後に、精製されたscFvFc抗体およびAPC標識マウス抗ヒトFc抗体により染色した。3I14（赤色の線）、F10（グループ1特異的、緑色の線）、CR8020（グループ2特異的、青色の線）、F16v3（グループ1および2特異的、紫色の線）、CR9114（グループ1および2特異的、オレンジ色の線）および無関係のmAb Fm-6（抗SARSウイルス、灰色で塗りつぶされたヒストグラム）の結合を、フローサイトメトリーにより分析した。

【図2-2】図2-1の続きを示す図である。

【図2-3】図2-2の続きを示す図である。

【図3】グループ1（赤色）またはグループ2（青色）サブタイプを代表する組み換えHAに対する3I14 IgG1（A）結合（ K_d 値）またはscFvFc Ab（B）結合（ K_d 値）を示すグラフ集である。

【図4】グループ1（赤色）またはグループ2（青色）サブタイプの感染性ウイルスの3I14 IgG1中和（A）（ IC_{50} 値）または3I14 scFvFc Ab中和（ IC_{50} 値）を示すグラフ集である。3I14は四角によって表されており、抗グループ1 mAb F10は三角によって表されている。IC50値について使用されたグラフは、2～3回の独立した実験の中和価を平均することによって決定されたものである。

【図5】グループ1またはグループ2サブタイプを代表する偽型ウイルスの3I14 IgG1中和（A）（ IC_{50} 値）または3I14 scFvFc Ab中和（B）（ IC_{50} 値）を示すグラフである。これらのデータは、2～3回の独立した実験の平均中和価を表わしている。図5Bでは、抗グループ1 mAb F10 scFvFcを参照として使用した。

【図6A-1】インフルエンザウイルスに曝露され、以下の濃度、5、20または25 mgのひとつで精製されたIgGを腹腔内投与されたマウスの生存率（A）を示すグラフ集である。これらのアッセイにおいて、5匹のマウスのグループを、H7N7-NL219、H7N9-AH13、H3N2-BR07またはH5N1-VN04インフルエンザウイルス（約10 LD50）のi.n.接種による致死チャレンジの24時間前に20/25または5 mg/kg用量の精製されたIgGを腹腔内投与することによって処置した。bnAb 3I14（赤色）およびグループ1対照mAb F10（黒色）で処置されたマウスの（a）生存（％）。

【図6A-2】図6A-1の続きを示す図である。

【図6A-3】図6A-2の続きを示す図である。

【図6B-1】インフルエンザウイルスに曝露され、示されている指定の抗体濃度を投与されたマウスにおける体重組成の変化を示すグラフ集である。これらのアッセイにおいて、5匹のマウスのグループを、H7N7-NL219、H7N9-AH13、H3N2-BR07またはH5N1-VN04インフルエンザウイルス（約10 LD50）のi.n.接種による致死チャレンジの24時間前に20/25または5 mg/kg用量の精製されたIgGを腹腔内投与することによって処置した。bnAb 3I14（赤色）およびグループ1対照mAb F10（黒色）で処置されたマウスの（b）体重変化（％）。

【図6B-2】図6B-1の続きを示す図である。

【図7】抗体なし、3I14またはFm-6（IgG1対照）を使用したトリプシン切断阻害アッセイからの結果を示すゲルである。このアッセイにおいて、0.4 μ gの組み換えH3-ヒスチジン（H3-BR07）を、100 μ g/mLのTrypsin-ultra（New England Biolabs, USA）を含むpH8.0のTris-HCl緩衝液中、37 で、2.5 μ gの3I14もしくはFm-6 IgG1の存在下または抗体の非存

10

20

30

40

50

在下でインキュベートした。トリプシン消化を、様々な時点で、1%BSAの添加によって阻害した。サンプルを、12%還元型SDS-PAGE上を泳動させ、HisProbe-HRP Abを用いてプロットした。

【図8】3I14 IgG1が、表面に発現されたH3-A268およびH3-BR07の低pHにより誘導される立体構造再構成を防いだことを示す図およびグラフ集である。表面発現H3の立体構造再構成は、3I14（塗りつぶしのバー）およびヘッド結合対照mAb E730（白抜きのバー）のFACS染色によって検出した。結合は、未処置HA（HA0）に対する結合の比率として表されている。この抗体阻害アッセイにおいて、切断されたHAをpH4.9に曝露する前に、H3を、mAbなしで、3I14を用いてまたは対照Ab、Fm-6 IgG1を用いて前処置した。データは、3回の独立した実験の平均 + SDを表わしている。

10

【図9A】3I14が、抗体依存的細胞傷害性（ADCC）を媒介することを示している。図9Aは、ADCCベースのアッセイの結果を示すグラフである。3I14および他の抗ステムbnAb、FI6v3、CR9114、39.29、F10およびCR8020は、H3およびH5発現293T細胞においてADCCを誘導した。これらのアッセイにおいて、アッセイ前に 1×10^4 /ウェルのH3またはH5発現293T細胞をプレートに付着させ、次いで培地を低IgG血清アッセイ緩衝液（0.5%低IgG FBSを含むRPMI 1640）に交換した。異なるbnAbを各ウェルに5、1、0.2および0.04 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度で添加した。1時間後、低IgG血清アッセイ緩衝液中 6.0×10^4 細胞/ウェルのJurkatエフェクター細胞をアッセイプレートに添加し、6時間インキュベートした。その上清を回収し、Bio-Glo（商標）Luciferase Assayキット（Promega）を用いて蛍光活性を測定した。

【図9B】3I14が、抗体依存的細胞傷害性（ADCC）を媒介することを示している。図9Bは、3I14および他の抗ステムbnAb、FI6v3、CR9114、39.29、F10およびCR8020がH3およびH5発現293T細胞においてADCCを誘導したことを示すグラフ集である。アッセイ前に 2×10^4 /ウェルのH3またはH5発現293T細胞をプレートに付着させ、次いで培地を低IgG血清アッセイ緩衝液（0.5%低IgG FBSを含むRPMI 1640）に交換した。異なるbnAbを各ウェルに10、5、2.5および1.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度で添加した。1時間後、低IgG血清アッセイ緩衝液中 1.2×10^5 細胞/ウェルのPBMCをアッセイプレートに添加し、6時間インキュベートした。その上清を回収し、LDH Cytotoxicity Assay Kit（Pierce）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。データは、平均 \pm S.E.M.を表わしている。実験は3回行い、類似の結果が得られた。データは、グループあたり3回の複製物を用いる1回の独立実験を代表するものである。

20

【図10】3I14が、H3またはH5に対する他の抗ステムbnAb、FI6v3、CR9114、39.29、F10およびCR8020の結合と交差競合することを示すグラフ集である。これらのアッセイにおいて、5 $\mu\text{g/ml}$ のH3-BR07またはH5-VN04タンパク質をELISAプレート上に固定し、80 nM ~ 0.3 nMの濃度の範囲の3I14 Fabの2倍連続希釈物と共にインキュベートし；これらをさらに、5 nMの他のscFvFc Abと混合した。scFvFc Abの結合を、HRP結合抗ヒトCH2抗体を用いて検出した。

30

【図11A】3I14と他の生殖系列重鎖領域（A）のアミノ酸アラインメントを示している。対応するV、D、およびJ配列を、IMGTデータベースを用いて決定し、これらが比較のために示されている。

【図11B】3I14と他の生殖系列軽鎖領域（B）のアミノ酸アラインメントを示している。対応するV、D、およびJ配列を、IMGTデータベースを用いて決定し、これらが比較のために示されている。

40

【図11C】3I14と他の生殖系列重鎖領域（C）のアミノ酸アラインメントを示している。対応するV、D、およびJ配列を、IMGTデータベースを用いて決定し、これらが比較のために示されている。

【図11D】3I14と他の生殖系列軽鎖領域（D）のアミノ酸アラインメントを示している。対応するV、D、およびJ配列を、IMGTデータベースを用いて決定し、これらが比較のために示されている。

【図12A】図12Aおよび12Bは、3I14モデルと3つのVH3-30 BnAb、39.29（4KVN由来）、FI6（3ZTJ由来）およびMab3.1（4PY8）の重ね合わせを示す図集である。その重鎖および軽鎖の相対的な位置ならびに3I14抗体の重鎖CDRを示すタンパク質モデル図が示されている

50

。重鎖は緑色で示され、軽鎖は灰色で示されている。図12において重鎖CDRは、以下のよう
に色付けされている：3I14 HCDRは青色、他のBnAbのHCDR1は赤色、HCDR2はマジェンダ
色およびHCDR3はシアン色。

【図12B】図12Aおよび12Bは、3I14モデルと3つのVH3-30 BnAb、39.29（4KVN由来）、F
I6（3ZTJ由来）およびMab3.1（4PY8）の重ね合わせを示す図集である。その重鎖および軽
鎖の相対的な位置ならびに3I14抗体の重鎖CDRを示すタンパク質モデル図が示されている
。bnAbは、リボン表示で示されている。図12Bにおいて、重鎖は青色、軽鎖はシアン色で
ある。HCDR3は、3I14では赤色、FI6v3ではマジェンダ色、39.29では黄色、Mab 3.1では緑
色で強調表示されている。

【図13A】3I14のモデリングおよびH3/H5とのドッキングを示す図集である。H3三量体
モデルのストーク内の3I14エピトープ構造が図13Aに示されている。

【図13B】3I14のモデリングおよびH3/H5とのドッキングを示す図集である。図13Bは、
IGHV3-30由来bnAbとHAの複合体構造を示している。HA内のエピトープ残基が表面に示され
、bnAbのCDRループがリボンとして示されている。HA単量体のHA1は白色、HA2はサーモン
色、エピトープ残基は赤色で標識されている。鍵となる残基L38およびK39は、黄色で示さ
れている。bnAbの重鎖CDRは青色、軽鎖CDRはシアン色で示されている。BioLuminateの抗
体モデリングモジュールを用いて3I14をホモロジーモデリングし、このモデルを、Rosett
aDockによるドッキングの前にH3/FI6v3複合体構造と重ね合わせた。他の3つのIGHV3-30 b
nAb、FI6v3、39.29およびMab 3.1は、Protein Data Bankからダウンロードした。

【図13C】3I14のモデリングおよびH3/H5とのドッキングを示す図集である。図13Cは、
3I14内のD94とH3/H5の相互作用を示している。H3はシアン色で示され、K39はスティック
として示され；H5は緑色で示され、E39はスティックとして示され；3I14は、H3/3I14モ
デルにおいてはオレンジ色、H5/3I14モデルにおいては黄色で示され、D94はスティックとし
て示されている。

【図13D】3I14のモデリングおよびH3/H5とのドッキングを示す図集である。図13Dは、
H3/3I14複合体モデルにおける3I14軽鎖のG31とH3の相互作用を示している。H3のHA2ドメ
インのヘリックスAは、シアン色のリボンとして示され；3I14の軽鎖は、オレンジ色のリ
ボンとして示され；G31の主鎖原子はスティックとして示され、H3 HA2のQ42およびD46の
側鎖原子はスティックとして示され；G31とH3の間の距離は、緑色の点線で示され、黒色
で標識されている（The PyMOL Molecular Graphics System, Version 0.99 rc6 Schrodin
ger, LLC）。

【図14】H3/3I14とH5/3I14モデルの配列アラインメント（A）および構造の重ね合わせ（
B）を示している。

【図15A】組み換えH5-VN04（A）に対する3I14 WTおよびVLD94N IgG1変種の結合の K_d 結
合値を示すグラフおよび表である。緑色または青色の曲線は、バイオレイヤー干渉法から
得られた実験トレースであり、赤色の曲線は、 K_d 値を計算するために使用したデータに対
する最良のグローバルフィットである。結合曲線用の親和性測定（ K_d 値）が、表4に報告
されている。3I14 WTは、1.15 nMの K_d 値で精製されたH5-VN04に結合し、3I14 VLD94N変異
体は、0.19 nMという10倍高い親和性でH5-VN04に結合した。

【図15B】組み換えH3-PE09（B）に対する3I14 WTおよびVLD94N IgG1変種の結合の K_d 結
合値を示すグラフおよび表である。緑色または青色の曲線は、バイオレイヤー干渉法から
得られた実験トレースであり、赤色の曲線は、 K_d 値を計算するために使用したデータに対
する最良のグローバルフィットである。結合曲線用の親和性測定（ K_d 値）が、表4に報告
されている。

【図15C】3I14 scFvFcが組み換えHaに結合することを示すグラフ集である。

【図15D】3I14 scFvFcが組み換えHaに結合することを示すグラフ集である。

【図15E】3I14 scFvFcが組み換えHaに結合することを示すグラフ集である。

【図15F】3I14 scFvFcが組み換えHaに結合することを示すグラフ集である。

【図16A】偽型ウイルスH5N1-VN04とのインキュベート後の3I14 WTおよびVLD94N変異Ig
G1の中和価を示すグラフ集である。

10

20

30

40

50

【図 1 6 B】感染性ウイルスH3N2-BR07とのインキュベート後の3I14 WTおよびVLD94N変異IgG1の中和価を示すグラフ集である。

【図 1 6 C】偽型ウイルスH5N1-VN047とのインキュベート後の3I14 WTおよびVLD94N変異IgG1の中和価を示すグラフ集である。図16Cに示されているように、3I14（黒色）およびVLD94N変種（赤色）は、偽型ウイルスH5N1-VN04（C）を中和した。このデータは、2～3回の独立した実験の平均中和価を表わしている。

【図 1 6 D】感染性ウイルスH3N2-BR07とのインキュベート後の3I14 WTおよびVLD94N変異IgG1の中和価を示すグラフ集である。図16Dに示されているように、3I14（黒色）およびVLD94N変種（赤色）は、偽型ウイルスH3N2-BR07ウイルス（D）を中和した。このデータは、2～3回の独立した実験の平均中和価を表わしている。

【図 1 7 - 1】図17は、3I14 scFvFc Abがインフルエンザウイルス感染およびHA偽型リシフェラーゼレポーターウイルスを中和したことを示すグラフ集である。MAb 3I14（黒色）および抗グループ1 mAb F10（赤色）は、感染性ウイルスおよび偽型ウイルスの異なる株を中和した。このデータは、2～3回の独立した実験の平均中和価を表わしている。

【図 1 7 - 2】図17-1の続きを示す図である。

【図 1 8】H5に対する改変3I14酵母CDRライブラリの結合との比較で3I14-WT酵母の結合を示すフローサイトメトリーグラフ集である。3I14酵母CDRライブラリを、H5への結合を向上させる変種に関して酵母ディスプレイを用いて改変した。

【図 1 9】組み換えH3-PE09の全長またはHA1に対する3I14 scFvFc Ab結合を示すグラフである。

【図 2 0 - 1】組み換えH1に対する3I14 IgG1変種の結合を示すグラフ集である。青色の曲線は、バイオレイヤー干渉実験から得られた実験トレースであり、赤色の曲線は、表7に示される K_D 値を計算するために使用したデータに対する最良のグローバルフィットである。

【図 2 0 - 2】組み換えH3に対する3I14 IgG1変種の結合を示すグラフ集である。青色の曲線は、バイオレイヤー干渉実験から得られた実験トレースであり、赤色の曲線は、表7に示される K_D 値を計算するために使用したデータに対する最良のグローバルフィットである。

【図 2 0 - 3】組み換えH5に対する3I14 IgG1変種の結合を示すグラフ集である。青色の曲線は、バイオレイヤー干渉実験から得られた実験トレースであり、赤色の曲線は、表7に示される K_D 値を計算するために使用したデータに対する最良のグローバルフィットである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

インフルエンザA型は、10種のタンパク質をコードする8つのセグメントゲノムを含む、マイナス一本鎖のRNAウイルスである。それは、ヌクレオカプシドおよびマトリクスタンパク質の抗原性によって定義されるインフルエンザウイルスA型、B型およびC型の属を含むオルトミクソウイルス（Orthomyxoviridae）科に属する。一般に、インフルエンザA型ウイルスは、ヒトにおけるより重度の疾患に関連する。インフルエンザA型ウイルスはさらに、細胞侵入のためにビリオンを宿主細胞に付着させるヘマグルチニン（HA）および子孫ウイルスまたは細胞表面に付着した宿主シアル酸を切断することによって子孫ウイルスの伝播を促進するノイラミニダーゼ（NA）という2つの表面タンパク質によって細分類される。

【0021】

16種のHAサブタイプおよび9種のNAサブタイプが存在し、これらがHAおよびNAの様々な組み合わせによってインフルエンザA型ウイルスのすべてのサブタイプを形成している。16種のHAおよび9種のNAウイルスサブタイプのすべての組み合わせが、水鳥で見出されている。数百種の鳥インフルエンザA型ウイルス株の中で、H5N1、H7N3、H7N7およびH9N2の4株のみがヒトへの感染を引き起こすことが知られている。一般に、これらのウイルスによる

ヒト感染は、軽度の症状およびごく稀に重度の疾病を引き起こし、致死的な例は、H7N7によって引き起こされる肺炎の一つのみである。しかし、その例外は、高病原性H5N1ウイルスであり、ヒトにはこれに対する自然免疫がない。RNAポリメラーゼの不誠実性および宿主免疫の選択圧は、これらのタンパク質の表面抗原性の変異および変化を蓄積させ得る。この抗原性の変化は、抗原ドリフトと呼ばれる。加えて、そのセグメント化されたゲノムの結果として、インフルエンザA型ウイルスの2つの異なるサブタイプが同じ細胞に感染したとき、遺伝子セグメントのシャッフルが起こり得る。例えば、ヒトH3N2ウイルスと鳥H5N1ウイルスがヒトまたは哺乳動物種の他のメンバーに同時感染したとき、そのような現象が新しいH5N2を誕生させ得る。この新しいウイルスはその後、その遺伝子セグメントのすべてまたはほとんどがヒトウイルス起源であるため、ヒトからヒトへと効果的に伝染し得る。そのような遺伝子の混ぜ合わせは、大きな抗原変化、いわゆる抗原シフトを引き起こし得、これは地球上の集団のほとんどがその混ぜ合わされたウイルスに対する中和性抗体を有していないであろうことを意味し得る。そのような状況は、インフルエンザH5N1肺炎の高い死亡率と合わさり、公衆衛生の分野における最も恐れられているシナリオの一つである。

【 0 0 2 2 】

インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）は、インフルエンザウイルスの最も変化に富む抗原であり、ウイルスの細胞侵入を担っている。それは三量体前駆ポリペプチドHA0として合成され、これは単一のジスルフィド結合によって連結されている2つのポリペプチドHA1およびHA2に翻訳後切断される。HAのHA1鎖は、ウイルスの細胞表面接着を担っている。HA2は、エンドソームにおけるウイルスと細胞膜の融合を媒介し、リボヌクレオタンパク質複合体を細胞質に放出させる。HA1と対照的に、HA2分子は、HAの比較的保存された部分である。第2の免疫原性インフルエンザタンパク質は、ノイラミニダーゼ（NA）である。この四量体糖タンパク質は、プロデューサー細胞上の表面シアル酸からのビリオンの放出を担っており、かつ気道において標的細胞へのアクセスを促進する役割も有し得る。NAに対する中和性抗体は、動物および人間において保護的であるが、それらの作用機構に関するデータは不足している。N1ノイラミニダーゼの結晶構造に関する最近の報告は、抗体を含む新規の抗インフルエンザ薬を開発するために調査され得るその活性部位に隣接する空洞の存在を示している。この知見は特に、H5N1ウイルスにおけるオセルタミビル（タミフル）およびザナミビル（リレンザ）に対する薬物耐性の発生の報告から見て重要である。

【 0 0 2 3 】

20年以上前に、抗原ドリフト変種およびエスケープ変異体のHAを配列決定することによってH3サブタイプのHA分子が特徴付けられ、その抗原性エピトープがこの分子の三次元構造上で位置決めされた。その後、鳥病原性ウイルスのH1、H2およびH5上の抗原性部位が、H3の三次元構造上で位置決めされた。1997年の香港でのヒトへのH5N1感染の大発生および1999年のヒト症例からのH9N2ウイルスの単離の後、両タンパク質のX線構造が解析された。しかし、その構造を解析するのに使用された1997ブタ単離体（A/アヒル/シンガポール/3/97）とより最近単離された高病原性株の抗原ドリフトは大きい。実際、ブタ単離体（A/アヒル/シンガポール/3/97）とHPAI H5N1株（A/ベトナム1203/04）の間には、28の小変化および2つの潜在的な大変化が存在する。

【 0 0 2 4 】

2004～2005年大発生由来のH5 HA遺伝子の系統発生分析は、クレード1およびクレード2と称されるHA遺伝子の2つの異なる系統を示した。HPAI H5N1株（A/ベトナム1203/04）は、クレード1のメンバーである。これらのクレードの各々のウイルスは、アジアの重複しない地理的領域に分布している。インドシナ由来のH5N1ウイルスはクレード1内で密集しているが、いくつかの周辺国から単離されたH5N1はクレード1単離体と異なり、より散発的にクレード2に属している。クレード1ウイルスは、ベトナム、タイおよびカンボジアにおいて人間および鳥から単離されたが、ラオスおよびマレーシアでは鳥からのみであった。クレード2ウイルスは、中国、インドネシア、日本および韓国において専ら鳥から単離

されたウイルスにおいて見出された。最も最近の疫学研究は、ウイルスの侵入、流行および進化に関連する疑問に取り組むために、インドネシアおよびベトナム全土で家禽から単離された82のH5N1ウイルスならびに南ベトナム由来の11のヒト単離体を、公的データベースにおいて利用可能な配列データと共に分析した³⁶。系統発生分析は、インドネシア由来のすべてのウイルスがH5N1遺伝子型Zウイルスの異なる亜系を形成することを示し、このことはこの大発生が、過去2年の間のこの国全体への拡散を通じて1回の侵入から発生した可能性が高いことを示唆している。インドネシアにおける継続的なウイルス活動は、鳥の移動による繰り返しの侵入ではなく、この国の中での家禽の移動を通じた伝染によるものであった。インドネシアおよびベトナムにおいて、H5N1ウイルスは時間と共に各国内で地理的に異なるグループに進化した。

【0025】

最近、A/ベトナム1203/4由来のHAの構造が解析された。そのアミノ酸配列と、クレード1および2ウイルスのHPAI 2004および2005単離体由来のHA遺伝子の比較により、13ヶ所の抗原性変動位置が同定され、これらは主として受容体結合ドメイン周囲に集中しており、残りは退化したエステラーゼドメイン内に存在する。抗原性変動領域は、H1およびH3血清型で同定された。H1では、これらの部位はSa、Sb、CaおよびCbで指定され、H3では、部位はA、B、CおよびDで指定されている。H5 HAのエスケープ変異は、3つのエピソードにまとめることができる；第1部位：H3の抗原性部位AおよびH²のCa2と重複する露出したループ（HA1 140～145）；第2部位：H3血清型の抗原性部位Bに対応するHA1残基156および157；ならびに3）H1 HAおよびH9血清型のSa部位に限定される、HA1 129～133。Smithによる最近の研究において、アミノ酸レベルでの正選択の検出は、HAタンパク質内の8つの残基が正選択下にあることを示した。これらの残基は、抗原性部位AおよびE内の5つ（83、86、138、140および141位）；受容体結合に関与する2つ（129および175位）；ならびに受容体結合部位付近の潜在的なN結合グリコシル化部位である156位、を含む。この結果はさらに、HA内の3つの残基（Val 86、Ser 129およびThr 156）がニワトリまたはアヒル単離体よりもヒト単離体において高頻度で観察されたことを明らかにし、これは、ヒトへのH5N1遺伝子型Zの早期の適合を表わしていると考えられた。これらの研究からの別の重要な発見は、インドネシアとベトナムの亜系の間の系統発生的な違いが、これらの2つのウイルスグループ間の抗原交差反応性の大きな違いにも反映されていることである。詳細に、インドネシア由来のウイルスはA/ベトナム1203/04に対するフェレット抗血清に反応せず、ベトナム由来の代表的ウイルスは、インドネシアウイルスIDN/5/06およびDk/IDN/MS/04に対するフェレット抗血清に反応しなかった。これらの発見は、免疫ヒト血清ならびにヒト1997および2003 H5N1ウイルスを用いた、これらの株が系統発生的にだけでなく抗原的に異なっていたとする初期研究と一致するものである。したがって、自然の変動およびエスケープ変異は、ウイルスの継続的な進化が、どの株が受動および能動免疫に使用されるべきかに関する決定に影響を及ぼすはずであることを示唆している。

【0026】

scFvおよびモノクローナル抗体の同定および特徴付け

高親和性、サブタイプ横断的な広域中和性ヒト抗HA mAbを同定した。四量体化H3（A/ブリスベン/10/2007）ヘマグルチニン（HA）三量体を用いてヒトPBMCから抗原特異的記憶B細胞を単離した。H3反応性の単一の記憶B細胞をプレートに選別し、インビトロで刺激した。14日後に、40%超の選別されたB細胞が、その上清に、平均200 ng/mlのIgGを産生した。増殖させたB細胞由来の上清を、MSDまたは高感度中和アッセイによって、それらのヘテロサブタイプ結合特異性および中和活性について測定した。厳選されたクローン由来の抗体遺伝子を、単一細胞RT-PCRによって回収した。

【0027】

7体の個体由来の2688個の記憶Bクローンのスクリーニングを通じて、11%のクローン性記憶B細胞が、H3ヘマグルチニンに対して反応性であった。それらの中で、H3/H7、H3/H7/H1およびH3/H7/H1/インフルエンザB型ヘテロサブタイプ結合集団は、それぞれ、16%、6.9%および0.35%であった。新規の広域中和性Abである3I14を同定した。3I14の特徴付け

を行い、グループ1およびグループ2の両方のインフルエンザA型ウイルスに対する交差反応結合性および中和活性を有することが示された。これは、グループ1またはグループ2のいずれかのインフルエンザA型ウイルスを中和する他の公知の抗インフルエンザ抗体、例えばF10、CR6261、MAb 3.1およびCR8020と対照的である。抗インフルエンザ抗体FI6v3、CR9114、39.39、MAb 1.12およびCT149のみが、グループ1およびグループ2の両方由来のヒトインフルエンザA型ウイルスを中和することができる。ヒト形質細胞、形質芽球およびCD138⁺ HA特異的抗体分泌細胞の培養物から単離されたFI6v3、CR9114、39.39、MAb 1.12およびCT149と異なり、本発明の抗体、例えば3I14は、記憶B細胞から単離された。ウイルスの再感染および接種に応じて、長寿命形質細胞は、当初のウイルスを細部まで思い起こす中和抗体を産生するのに対して、記憶B細胞は、胚中心に再突入することによって変種ウイルスに特異的な高親和性中和抗体を産生することによって寄与する。さらに、記憶B細胞の体細胞変異は、老齢個体において、抗体の多様化および選択のサイクルの繰り返しを通じて蓄積され得る。したがって記憶B細胞は、長寿命形質細胞よりも幅広い抗原特異性のレパートリーを有する。長寿命の広範囲で効果的なワクチンにとって、安定な記憶B細胞集団を構築し、強力なbnAb応答を誘発することは必須であると考えられている。したがって、本発明の抗体は、他の公知の抗インフルエンザ抗体よりも大きな治療有用性を有するであろう。

【0028】

本発明の抗体は、グループ2 (H3、H4、H7、H14およびH15)ならびにグループ1 (H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12およびH16) の両方の血清型のインフルエンザA型で表面発現されるHAに結合する。詳細に、本発明の抗体の結合親和性 (K_d) は、約1 pM ~ 1 μM、約1 pM ~ 1 nMまたは約1 nM ~ 1 μMである。例えば、この抗体は、約1 pM ~ 1 μMのグループ1 (H1、H5およびH9) ならびにグループ2 (H3、H4、H7およびH17) に対する結合親和性を有する。好ましくは、グループ1 (H1、H5およびH9) ならびにグループ2 (H3、H4、H7およびH17) に対する結合親和性K_dは、約0.01 nM ~ 10 nMである。いくつかの態様において、この抗体は、グループ2インフルエンザA型ウイルスにおいて、約1 pM ~ 1 μMのグループ2 HA (H3、H4、H7およびH14) に対する結合親和性を有する。好ましくは、グループ2 HA (H3、H4、H7およびH14) に対する結合親和性K_dは、< 1 nMである。

【0029】

詳細に、3I14は、グループ2 (H3、H4、H7およびH14) ならびにグループ1 (H1、H5およびH9) に属する異なるサブタイプの精製されたHAタンパク質に、0.01 nM ~ 10 nMの範囲の解離定数 (K_d) で、かつすべての試験されたグループ2 HA (H3、H4、H7およびH14) に高い親和性 (平均K_d < 0.1 nM) で結合した。加えて、3I14は、グループ1 H1サブタイプ (H1-CA09、H1-SI06およびH1-PR8) に高い親和性で結合し、他のグループ1サブタイプ (H5-VN04、H5-IN05およびH9-HK99) に対するその親和性はそれよりも低かった (それぞれ、平均K_d = 1.02、1.05および5.23 nM)。このH5インフルエンザウイルスサブタイプに対するより低い結合親和性は、以前に報告された他の広域中和性抗体、例えばFI6v3および39.29と異なっている。

【0030】

本発明の抗体は、インフルエンザA型ウイルスを中和する。「中和する」または「中和」は、抗体がウイルス粒子に結合し、それによってウイルスによりコードされる転写または合成より先行するウイルスの複製サイクルの工程を阻止することにより、ウイルスの感染性を低下させることを意味する。抗体は、様々な機構によってウイルスを中和し得、例えば、抗体は、受容体へのピリオンの結合と干渉することによってウイルスを中和し得、細胞への取り込みを阻止し得、エンドソームにおけるそのゲノムの脱殻を防ぎ得、またはウイルス粒子を凝集させ得、または溶解させ得る。

【0031】

本発明の抗体は、グループ2およびグループ1の両方のインフルエンザA型ウイルスの血清型を中和する。本発明の抗体は、約0.001 ~ 5 μg/mL⁻¹、約0.001 ~ 4 μg/mL⁻¹または約0.001 ~ 3 μg/mL⁻¹の最大半量阻害濃度 (IC₅₀) を有する。好ましくは、抗体は、約0.03 ~ 2

10

20

30

40

50

$\mu\text{g/mL}$ 、約 $0.03 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ のIC50を有する。さらにより好ましくは、抗体は、約 $0.001 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ 、約 $0.001 \sim 0.05 \mu\text{g/mL}^{-1}$ または約 $0.001 \sim 0.03 \mu\text{g/mL}^{-1}$ のIC50を有する。さらにより好ましくは、抗体は、約 $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ 、約 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ および約 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ のIC50を有する。好ましくは、抗体は、約 $0.05 \sim 0.008 \mu\text{g/mL}^{-1}$ および約 $0.04 \sim 0.008 \mu\text{g/mL}^{-1}$ のIC50を有する。最も好ましくは、抗体は、約 $0.03 \sim 1.08 \mu\text{g/mL}^{-1}$ 、約 $0.007 \sim 0.027 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、約 $0.225 \sim 0.413 \mu\text{g mL}^{-1}$ または約 $0.040 \sim 0.008 \mu\text{g mL}^{-1}$ のIC50を有する。

【0032】

詳細に、本発明の抗体は、グループ2ウイルス（例えば、H3、H7、A/ウィスコンシン/67/05(HA,NA) x A/プエルトリコ/8/34およびA/愛知/2/68(HA,NA) x A/プエルトリコ/8/34、ならびにH7N9-AH13）を中和する。本発明の抗体はまた、偽型ウイルスH7N1-FPNおよびH7N1-NL219株を中和する。加えて、本発明の抗体は、グループ1 H1株（H1-CA09およびH1-PR8）ならびに偽型ウイルスH5-VN04およびH5-HK97を中和する。

【0033】

本発明の抗体は、インビボでグループ1およびグループ2の両方のインフルエンザA型ウイルスに対して予防効果を有する。本発明の抗体は、ウイルス感染に対して50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%の予防的保護を提供する。詳細に、本発明の抗体は、H7N7-NL219またはH7N9-AH13チャレンジから完全に保護し、H3N2-BR07チャレンジに対して80%保護し、H5N1-VN04チャレンジに対して60%保護する。

【0034】

本発明の抗体は、未成熟HA0の切断を防ぐ。HA0タンパク質が切断されずHA1およびHA2が形成されない場合、ウイルス・宿主膜融合が起こり得ない。したがって未切断HAを有するインフルエンザウイルスは感染性でない。したがって本発明の抗体は、インフルエンザ感染を阻止するのに有用であり、したがって他の抗ウイルス剤、例えばタミフルと組み合わせて使用され得る。

【0035】

重要なことは、本発明の抗体は、未切断HA前駆体（HA0）タンパク質ならびにその2つの成熟形態HA1タンパク質およびHA2タンパク質に結合することである。

【0036】

加えて、本発明の抗体は、低pHにより誘導されるHAの立体構造再構成を防ぐ。

【0037】

この抗体は、Fc依存的ウイルスクリアランスを媒介する。いくつかの態様において、この抗体は、抗体依存的細胞傷害性（ADCC）を増強する。あるいは、この抗体は、インビボ保護のFc依存的免疫媒介機構に関与する。

【0038】

本発明の抗体の可変重鎖は、IGHV3-30生殖系列遺伝子によってコードされる。この抗体の可変軽鎖は、IGLV1-44生殖系列遺伝子によってコードされる。IGHV3-30抗体は、HA結合に寄与する疎水性コアを形成するようHCDR3を使用する。この抗体は、長鎖相補性決定領域3（HCDR3）を形成するよう再構成された重鎖を有する。長鎖HCDR3の長さは、約12~30アミノ酸（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30）であり得る。好ましい態様において、長鎖HCDR3は、約23アミノ酸長である。いくつかの態様において、長鎖HCDR3は、VHおよびIGHJ4*02接合部の両方で大きなN付加が隣接するIGHD3-22*01 DHセグメントを使用する。

【0039】

この抗体は、可変重鎖および/または可変軽鎖内に体細胞変異を有する。可変重鎖内の体細胞変異の数は、約2~30（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30）であり得る。いくつかの態様において、可変重鎖内の体細胞変異の数は、約15である。可変軽鎖内の体細胞変異の数は、約2~15（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15）であり得る。いくつかの態様において、体細胞変異の数は、約7である。

【 0 0 4 0 】

エピトープマッピングおよび競合アッセイは、HAステム内に位置する高度に保存されたエピトープを明らかにした。例えば、本発明の抗体は、SEQ ID NO:18にしたがう番号で、HA2のアミノ酸残基18、19、20、21、36、38、39、41、42、45、46、49および53により定義される立体構造エピトープに結合する。あるいは、本発明の抗体は、SEQ ID NO:18にしたがう番号で、HA2のアミノ酸残基18、19、20、21、38、39、41、42、45、46、47、48、49および50により定義される立体構造エピトープに結合する。任意で、この抗体はHA1に結合する。

【 0 0 4 1 】

保存されたエピトープ残基の配列は、ペプチド残基によって定義される。

10

【 0 0 4 2 】

構造ベースの抗体エンジニアリングを使用して、そうでなければ小さいサブタイプHA株に対するその効力を改善するよう3I14を最適化した。3I14のこの高親和性変種は、本明細書で3I14V_LD94Nと称され、3I14 VH内のアミノ酸9位におけるアスパラギン酸 (D) からアスパラギン (N) へのアミノ酸置換によって作製された。

【 0 0 4 3 】

VLD94L置換は、H5に対する抗体の結合を可能にするまたはそれを向上させる。H5に対する結合親和性の向上は、野生型3I14との比較で約5～15倍である。H5-VN04に対する3I14V_LD94NのKdは、約0.2 nM未満である。

【 0 0 4 4 】

さらなる構造ベースのエンジニアリングにより、H5に対する結合親和性を向上させることができる。詳細に、H5に対する結合親和性の向上は、LCDR1内の残基31のグリシン (G) を別のアミノ酸で置換することによって達成される。例えば、残基31のグリシン (G) は、セリン (S) で置換され得る。

20

【 0 0 4 5 】

本発明にしたがう中和性インフルエンザ抗体の核酸およびアミノ酸配列を、以下に提供する。

【 0 0 4 6 】

(表1A) 抗体3I14の可変領域の核酸配列

3I14のV_H鎖 (SEQ ID NO:1)
CAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATTGTGATGGAAGTAAAAATATTATGCAAACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGGGACCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGTGCGAAACTGCCCTCCCCGTATTACTTTGATAGTCGGTTCGTGTGGTTCGCCGCCAGCGCATTTCACTTCTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTCTCTTCA
3I14のV_L鎖 (SEQ ID NO:3)
AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGCCTCTGGAAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTACACTGGTTCCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATACTAATAGTCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTTCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA

30

40

【 0 0 4 7 】

(表1B) 抗体3I14の可変領域のアミノ酸配列

3I14のV_H鎖 (SEQ ID NO: 2)
QVQLLES GGGV QPG RS LRLSCAAS GFTFS NYGMHWVRQAPGKGLEWVAI ISFDGSKKYY ANSVKGRSTISRDN SKNTLS LQMN SLGP EDTALYY CAKLPS PYY FDSR FVWVAAS AFHFW GQGILVTVSS
3I14のV_L鎖 (SEQ ID NO:4)
NFMLTQPPSASGTPGQ RV TI SCSGSS SNIG NTVHWFQQLPGTAPKLLI YTNS LRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY CAAWDDSL NGQVFGGGTKLTVL

【 0 0 4 8 】

(表 1 C) 抗体3I14V_LD94Nの可変領域の核酸配列

10

3I14V_LD94NのV_L鎖 (SEQ ID NO:5)
AATTTTATGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGC TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTACTGTTCCAGCAGCTCCCAGGAACGGCC CCCAAACCTCATCTATACTAATAGTCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC AAGTCTGGCACCCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC TGTGCAGCATGGGATACAGCCTAAATGGTCAGGTGTTTCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA

【 0 0 4 9 】

(表 1 C) 抗体3I14V_LD94Nの可変領域のアミノ酸配列

3I14V_LD94NのV_L鎖 (SEQ ID NO:6)
NFMLTQPPSASGTPGQ RV TI SCSGSS SNIG NTVHWFQQLPGTAPKLLI YTNS LRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY CAAWDDSL NGQVFGGGTKLTVL

20

【 0 0 5 0 】

(表 8) IGHV3-03*18およびIGLV1-44*01の核酸配列

IGHV3-30*18—核酸配列—SEQ ID NO: 21
CATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGATTCATGGAGAAATAGAGA GACTGAGTGTGAGTGAACATGAGTGAGAAAACTGGATTTGTGTGGCATTCTCTGATAACGGTGTCTT CTGTTTGCAGGTGTCCAGTGTCAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGACACAGTGAGGGGAAGTCATTGTGCGCCC AGACACAAACCTCCCTGCAGGAACGCTGGCGGGAATCAGCGGCAGGGGGCGCTCAGGAGCCACTGATC AGAGTCAGCCCTAGAGGCAGGTGCAGATGGAGGCTGTTTCTGTGAGGATGTGGGACTTTGTCTTCTTC TGACAGTTCCCCAAGGAACCTCTTAAATTTAGAAAACCTGTGCCTAACAATGTCTTCTCTATGCATATGA GGACCTTTTCTCCCTAGCACAAAATGCAGATTGACGCTGACACGGATGAAAATTCCTCAACCATG
IGHV3-30*18—アミノ酸配列—SEQ ID NO: 22
VISYDGSNKYYADSVKGR LTISR DNSKNTLYLQMN SLRA EDTAVYYCAKDFGPKRPTGDYFDYWQ
IGLV1-44*01—核酸配列—SEQ ID NO: 23
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCT GGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAA CTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC ACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGG GATGACAGCCTGAATGGTCC
IGLV1-44*01—核酸配列—SEQ ID NO: 24
QSVLTQPPSASGTPGQ RV TI SCSGSS SNIG SNTVNWYQQLPGTAPKLLI YSNN QRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYY CAAWDDSL NG

30

【 0 0 5 1 】

3I14および3I14V_LD94N中和性インフルエンザ抗体の重鎖および軽鎖相補性決定領域のアミノ酸配列を、以下の表2に示す。

40

【 0 0 5 2 】

(表 2)

HCDR1	GFTFSNYG	(SEQ ID NO:7)
HCDR2	ISFDGSKK	(SEQ ID NO:8)
HCDR3	CAKLPSYYFDSRFVWVA ASAFHFW	(SEQ ID NO:9)
LCDR1	SSNIGGNT	(SEQ ID NO:10)
LCDR2	TNS	(SEQ ID NO:11)
LCDR3	CAAWDDSLNGQVF	(SEQ ID NO:12)
3I14V _L D94N LCDR3	CAAWD _N SLNGQVF	(SEQ ID NO:13)
3I14 G31X LCDR1	SSNIGX ¹ NT	(SEQ ID NO:14)

¹Xはグリシン以外の任意のアミノ酸であり得る。好ましくは、Xはセリンである。

【 0 0 5 3 】

(表9) ヘマグルチニンの核酸およびアミノ酸配列

A/日本/305/1957(H2N2)—HA1 アミノ酸配列—SEQ ID NO: 15	
DQICIGYHANNSTEKVDNLTNRNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELG DCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEELKHLLS SVKHFEKVKILPKDRWTQHTTTGGSRAVSGNPSFFRNMVWLTKEGSDYP VAKGSYNNTSGEQMLIHWGVHHPIDETEQRPLYQNVGTYVSVGTSTLNKRST PEIATRPKVNQGGRMESWTLDMWDNINFTSTGNLIAPEYGFKISKRGSSGI MKTEGTLNCECTKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGL RNPVQIES	
A/日本/305/1957(H2N2)—HA1 核酸配列—SEQ ID NO: 16	
GACCAGATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGATGGTCTGA CACAATTCTAGAGCGGAACGTCCTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTG AGAAGACCCATAACGGAAAGTTATGCAAACAAACGGAATCCCTCCACTT GAACTAGGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAATCCAGAATG TGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGTCCTATATAATGGAGAAAGAAA ACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAA TTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTGAGAAAGTAAAGATTCT GCCCCAAGATAGATGGACACAGCATAACAACAACTGGAGGTTACGGGCCT GCGCGGTGTCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAA AGAAAGGATCAGATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGC GGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCACCATCCCAATGATGAGAC AGAACAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCA CATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGAAATAGCAACAAGGCTTAA AGTGAATGGACAAGGAGGTAGAATGGAATTCTCTTGGACCTCTTGGATA TGTGGGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGAG TATGGATTCAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGA AGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAA TAAATACAACATTGCCTTTTCACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGT GCCCCAATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGG AATGTTCCCCAGATTGAATCAAG	
A/日本/305/1957(H2N2)—HA2 アミノ酸配列—SEQ ID NO: 17	
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITN KVNSVIEKMNTQFEAVGKEFGNLERLENLNKRMEDGFLDVWWTYNAELLVL MENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEYHKCDDECMNS VKNPTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAGSLSLAIMM AGISFWMCSNGLQCRICI	

10

20

30

40

A/日本/305/1957(H2N2)—HA2 核酸配列—SEQ ID NO: 18	
GATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATG GTTGATGGTTGGTATGGATAACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTA TGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCATTTGATGGAATCACCAACA AGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCTGTTGGG AAAGAATTCAGTAACTTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAACAAAAAGA TGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTC TGATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAAT CTGTATGATAAAGTCAGAATGCAGTTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGG AAATGGATGTTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGATGAATGCATGAATAG TGTGAAAACCGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAAAC TAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAAATTGAGCAGCATGGGGGTTTAT CAAATCCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATC ATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGC AGGATCTGCATATGA	10
A/日本/305/1957(H2N2)—全長HAアミノ酸配列—SEQ ID NO: 19	
MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEMVDTILERNVTVTHAKDILEKTHNG KLCKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYP GSFNDYEELKHLLSSVKHFKEVKILPKDRWTQHNTTGGSRACAVSGNPSFFR NMVWLTKKGSDDPVAKGSYNNTSGEQMLIHWGVHHPNDETEQRTLYQNVG TYVSVGTSTLNKRSTPEIATRLKVNGQGGRMEFSWTLDDMWDTINFESTGNLI APEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGEC PKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHS NDQGSFYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLEN LNKKMEDGFLDVWTYNAELLVL MENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDN VKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKGTGYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSS MGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCNSGSLQCRICI	20
A/日本/305/1957(H2N2)—全長HA核酸配列—SEQ ID NO: 20	
ATGGCCATCATTATCTCATTCTCCTGTTACAGCAGTGAGAGGGGACCAG ATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGATGGTCGACACAAT TCTAGAGCGGAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGA CCCATAACGGAAAGTTATGCAAACATAAACGGGAATCCCTCCACTTGAAC TA GGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAATCCAGAATGTGATAG GCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGTCCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGA GAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAA CATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTGAGAGAAAGTAAAGATTCTGCCCAA AGATAGATGGACACAGCATACAACA ACTGGAGGTTACGGGGCCTGCGCG GTGTCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAA AGGATCAGATTATCCGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAG AACAAATGCTAATAATTTGGGGGGGTGCACCATCCCAATGATGAGACAGAA CAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACATC AACATTGAACAAAAGGTCAACCCCCAGAAATAGCAACAAGGCTTAAAGTG AATGGACAAGGAGGTAGAATGGAATTCTCTTGGACCCTCTTGGATATGTG GGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGAGTATG GATTCAAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGG	30
	40

```

AACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAATAA
ATACAACATTGCCTTTTCACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCC
CCAAATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAAT
GTTCCCCAGATTGAATCAAGAGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATA
GAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAG
CAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAAG
GCATTTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAA
CACCCAATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAATTCAGTAACTTAGAGAGAAGAC
TGGAGAACTTGAACAAAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACA
TACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTT
CATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGCAGTTGAG
AGACAACGTCAAAGAAGTAAAGTAAATGGATGTTTTGAATTTTATCACAAT
GTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAAAACCGGGACGTATGATTATCCC
AAGTATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAA
AATTGAGCAGCATGGGGGTTTATCAAATCCTTGCCATTTATGCTACAGTAG
CAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGT
GCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGA

```

10

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン (Ig) 分子の免疫学的に活性な一部分、すなわち、抗原に特異的に結合する (抗原と免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子を表す。「～に特異的に結合する」または「～と免疫反応する」は、その抗体が所望の抗原の1つまたは複数の抗原性決定基と反応し他のポリペプチドと反応しないことを意味する。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、dAb (ドメイン抗体)、単鎖、 F_{ab} 、 F_{ab}' および $F_{(ab)'}_2$ フラグメント、scFv および F_{ab} 発現ライブラリを含むがこれらに限定されない。

20

【 0 0 5 5 】

単鎖Fv (「scFv」) ポリペプチド分子は、ペプチドをコードするリンカーによって連結された V_H および V_L をコードする遺伝子を含む遺伝子融合体から発現され得る、共有結合により連結された $V_H::V_L$ ヘテロ2量体である (Huston et al. (1988) Proc Nat Acad Sci US A 85(16):5879-5883を参照のこと)。自然界では一体となっているが化学的には別々の、抗体V領域由来の軽および重ポリペプチド鎖をscFv分子に変換し、これを抗原結合部位の構造に実質的に類似する3次元構造に折りたたむための化学構造を識別する多くの方法が記載されている。例えば、米国特許第5,091,513号; 同第5,132,405号; および同第4,946,778号を参照のこと。

30

【 0 0 5 6 】

多くの標的分子に対する再構成された抗体遺伝子の大きな供給源を提供するために、非常に大きなナイーブヒトscFvライブラリが作製されておりかつ作製され得る。よりも小さなライブラリは、疾患特異的な抗体を単離するために、感染疾患を有する個体から構築され得る (Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43(1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)を参照のこと)。

【 0 0 5 7 】

一般に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDのクラスのいずれかに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によって相互に異なる。特定のクラスは、サブクラス、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄等も有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、カッパ鎖またはラムダ鎖であり得る。好ましくは、抗体は、IgG₁またはIgG₄である。

40

【 0 0 5 8 】

抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体は、成熟抗体重鎖と生殖系列軽鎖 (mHgL) を対にすることによってまたは生殖系列重鎖と成熟軽鎖 (gHmL) を対にすることによって生成される。キメラ抗体は、野生型 (WT) 抗体と比較して高い結合親和性 (Kd) を有する。例えば、特定のウイルス (例えば、H1-CA09) に対するmHgLおよびgHmLキメラ変種の結合親和性は、約0.001 nM未満の結合親和性を有し得る。あるいは、mHgLおよびgHmLキメラ変種

50

の結合親和性 (K_d) は、WT抗体で見出されるものよりも低い (例えば、ウイルスH5-VN04 およびH3-PE09の場合)。任意で、mHgLおよびgHmLキメラ変種の結合親和性は、WT抗体の結合親和性とほぼ同じである。

【0059】

「抗原結合部位」または「結合部分」という用語は、抗原結合に關与する免疫グロブリン分子の一部分を表す。抗原結合部位は、重 (「H」) および軽 (「L」) 鎖のN末端可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と称される、重および軽鎖のV領域内の3つの高多様性ストレッチが、「フレームワーク領域」または「FR」として公知のより保存されている隣接ストレッチの間に介在している。したがって、「FR」という用語は、自然界において、免疫グロブリンの超可変領域の間にまたは超可変領域に隣接して見られるアミノ酸配列を表す。抗体分子においては、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域が抗原結合表面を形成するよう3次元空間で相互に配置される。この抗原結合表面は、結合する抗原の3次元表面と相補的であり、重および軽鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と称される。

【0060】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン、scFvまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、通常、化学的に活性な表面分子群、例えばアミノ酸または糖側鎖からなり、そして通常、特定の3次元構造的な特徴および特定の電荷的特徴を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドのN末端またはC末端ペプチドに対して惹起され得る。

【0061】

本明細書で使用される場合、「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子とその免疫グロブリンが特異的な抗原との間で起こるタイプの非共有結合的相互作用を表す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、その相互作用の解離定数 (K_d) の観点で表され得、より小さな K_d はより大きな親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野で周知の方法を用いて定量され得る。1つのそのような方法は、抗原結合部位 / 抗原複合体の形成および解離の速度 (rate) の測定を必要とするものであり、これらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性および両方向の速度に等しく影響する幾何学的パラメータに依存する。このようにして、「オンレート定数」 (K_{on}) および「オフレート定数」 (K_{off}) の両方が、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定され得る (Nature 361:186-87 (1993) を参照のこと)。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に關連しないすべてのパラメータの消去を可能にし、そしてそれは解離定数 K_d に等しい (概要について、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473 を参照のこと)。本発明の抗体は、アッセイ、例えば放射性リガンド結合アッセイまたは当業者に公知の同様のアッセイによって測定される平衡結合定数 (K_d) が $1\mu\text{M}$ 、好ましくは 100nM 、より好ましくは 10nM 、最も好ましくは 100pM ~ 約 1pM の場合にインフルエンザエピトープに特異的に結合すると言われる。

【0062】

本発明のインフルエンザタンパク質 (例えば、HAまたはニューラミニダーゼ) またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の作製において免疫原として使用され得る。

【0063】

当業者は、過度の実験を要することなく、ヒトモノクローナル抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体と同じ特異性を有するかどうかを、前者が後者のインフルエンザウイルスのHAタンパク質結合を妨げるかどうかを評価することによって決定することができることを理解しているであろう。試験されるヒトモノクローナル抗体が、本発明のヒトモノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように本発明のヒトモノクローナル抗体と競合する場合、その2つのモノクローナル抗体は同じまたは関係の近いエピトープに結合することが考えられる。

【0064】

10

20

30

40

50

ヒトモノクローナル抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体の特異性を有するかどうかを決定する別の方法は、本発明のヒトモノクローナル抗体を通常それと反応するインフルエンザHAタンパク質と共にプレインキュベートし、次いで試験されるヒトモノクローナル抗体を添加して、試験されるヒトモノクローナル抗体がHAタンパク質結合能力に関して阻害されるかどうかを決定することである。試験されるヒトモノクローナル抗体が阻害される場合、それはほぼ確実に本発明のモノクローナル抗体と同じまたは機能的に等価なエピトープ特異性を有する。本発明のヒトモノクローナル抗体のスクリーニングはまた、インフルエンザウイルスを使用し、試験モノクローナル抗体がインフルエンザウイルスを中和することができるかどうかを決定することによって実施され得る。

【0065】

10

当技術分野で公知の様々な手順が、本発明のタンパク質に対するまたはその誘導体、フラグメント、アナログホモログもしくはオルソログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の製造に使用され得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）。

【0066】

抗体は、周知技術、例えば、主として免疫血清のIgGフラクションを提供するプロテインAまたはプロテインGを用いる親和性クロマトグラフィーによって精製され得る。その後にはまたはその代わりに、探索対象の免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはそのエピトープが、免疫親和性クロマトグラフィーによって免疫特異的な抗体を精製するためにカラムに固定され得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D.Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No.8 (April 17, 2000), pp.25-28) によって議論されている。

20

【0067】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」または「MAb」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、特有の軽鎖遺伝子産物および特有の重鎖遺伝子産物からなる単一分子種である抗体分子を含む抗体分子の集団を表す。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、その集団の分子のすべてで同一である。mAbは、それに対する特有の結合親和性によって特徴づけられる抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を含む。

30

【0068】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、例えばKohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)に記載される方法を用いて調製され得る。ハイブリドーマ法においては、典型的に、マウス、ハムスターまたはその他の適切な宿主動物を免疫剤で免疫し、その免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するまたは産生することができるリンパ球が生成される。あるいは、リンパ球が、インビトロで免疫され得る。

【0069】

免疫剤は、典型的には、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質を含む。通常、ヒト起源の細胞が望まれる場合に末梢血リンパ球が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合に脾細胞もしくはリンパ節が使用されるかのいずれかである。リンパ球は、次いで、適当な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いて不死化細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞が形成される(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp.59-103)。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。通常、ラットまたはマウス骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは未融合の不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含む適当な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む(「HAT培地」)。

40

50

【 0 0 7 0 】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル発現を支援し、そして培地、例えばHAT培地に対する感受性を有するものである。より好ましい不死化細胞株は、例えばSalk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから入手できるマウス骨髄腫株である。ヒトモノクローナル抗体の産生に関しては、ヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も記載されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) pp.51-63を参照のこと)。

【 0 0 7 1 】

ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地は、その後、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性が、免疫沈降によってまたはインビトロ結合アッセイ、例えば放射免疫アッセイ (RIA) もしくは酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) によって決定される。そのような技術およびアッセイは、当技術分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析によって決定され得る。さらに、モノクローナル抗体の治療適用においては、標的抗原に対する高い程度の特異性および高い結合親和性を有する抗体を同定することが重要である。

【 0 0 7 2 】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、そのクローンが限外希釈手順によってサブクロニングされ、そして標準的な方法によって生育され得る (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp.59-103を参照のこと)。この目的に適した培養培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびRPMI-1640培地を含む。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物の腹水としてインビボで生育され得る。

【 0 0 7 3 】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーによって培養培地または腹水液から単離または精製され得る。

【 0 0 7 4 】

モノクローナル抗体はまた、組み換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載される方法によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて (例えば、マウス抗体の重および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって) 容易に単離および配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源となる。単離後、DNAは発現ベクターに入れられ、次いでこれがそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞または骨髄腫細胞にトランスフェクトされ、その組み換え宿主細胞においてモノクローナル抗体が合成される。DNAはまた、例えば、ヒト重および軽鎖定常ドメインのコード配列をそれと相同なマウス配列と置換することによって (米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)を参照のこと) または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部を共有結合により接続することによって、修飾され得る。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインと置換され得、またはキメラ2価抗体を作製するために本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換され得る。

【 0 0 7 5 】

完全ヒト抗体は、CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全配列がヒト遺伝子から得られたものである抗体分子である。そのような抗体は、本明細書で、「ヒト抗体」または「完全

10

20

30

40

50

ヒト抗体」と称される。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72を参照のこと）；およびヒトモノクローナル抗体を製造するEBVハイブリドーマ技術（Cote, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96を参照のこと）を使用して調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトハイブリドーマを用いることによって（Cole, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030を参照のこと）またはインビトロでヒトB細胞をエプスタインバーウイルスで形質転換することによって（Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96を参照のこと）使用され得、製造され得る。

【0076】

加えて、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリを含むさらなる技術を用いて製造され得る（Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)を参照のこと）。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって作製され得る。チャレンジの後、遺伝子の再構成、構築および抗体レパートリーを含むすべての点でヒトにおいて見られるものと非常に類似するヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号およびMarks et al., Bio/Technology, 10, 779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996)；およびLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

【0077】

ヒト抗体は、加えて、抗原によるチャレンジに応じてその動物の内因性抗体ではなく完全ヒト抗体を産生するよう修飾されたトランスジェニック非ヒト動物を用いて製造され得る（PCT公開W094/02602を参照のこと）。非ヒト宿主の重および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は無力化され、ヒト重および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座が宿主のゲノムに挿入される。ヒト遺伝子は、例えば、必要なヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を用いて組み込まれる。その後、望まれる修飾のすべてを提供する動物が、修飾の補完性が完全でない中間トランスジェニック動物を交雑することにより子孫として取得される。そのような非ヒト動物の好ましい態様はマウスであり、PCT公開WO 96/33735およびWO 96/34096に開示されるようにXenomouse（商標）と呼ばれる。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。抗体は、関心対象の免疫原を用いた免疫後に動物から直接的に、例えばポリクローナル抗体調製物として、あるいはその動物由来の不死化B細胞、例えばモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、入手され得る。加えて、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子が、抗体を直接入手するために回収および発現され得、または抗体のアナログ、例えば単鎖Fv（scFv）分子を入手するためにさらに修飾され得る。

【0078】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠失している、マウスとして例示される、非ヒト宿主を作製する方法の例は、米国特許第5,939,598号に開示されている。それは、胚性幹細胞の少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座からJセグメント遺伝子を除去してその遺伝子座の再構成を防止するおよび再構成された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防止する方法、選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的指向ベクターにより欠失を行う方法；ならびにその体細胞および生殖細胞が選択マーカーをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスを胚性幹細胞から作製する方法、を含む方法によって入手され得る。

【0079】

関心対象の抗体、例えばヒト抗体を作製する1つの方法は、米国特許第5,916,771号に開

10

20

30

40

50

示されている。この方法は、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを培養下の1つの哺乳動物宿主細胞に導入し、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを別の哺乳動物宿主細胞に導入し、そして2つの細胞を融合させてハイブリッド細胞を形成することを含む。このハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【0080】

この手順のさらなる改善として、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定する方法および該関連エピトープに高親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択する関連法が、PCT公開WO 99/53049に開示されている。

【0081】

抗体は、上記の単鎖抗体をコードするDNAセグメントを含むベクターによって発現され得る。

【0082】

これらは、ベクター、リボソーム、ネイキッドDNA、アジュバントアシストDNA、遺伝子銃、カテーテル等を含み得る。ベクターは、化学コンジュゲート体、例えば標的指向部分（例えば、細胞表面受容体に対するリガンド）および核酸結合部分（例えば、ポリリジン）を有するWO 93/64701に記載されるもの、ウイルスベクター（例えば、DNAまたはRNAウイルスベクター）、融合タンパク質、例えば標的部分（例えば、標的細胞に特異的な抗体）および核酸結合部分（例えば、プロタミン）を含む融合タンパク質であるPCT/US 95/02140（WO 95/22618）に記載されるもの、プラスミド、ファージ等を含む。ベクターは、染色体、非染色体または合成であり得る。

【0083】

好ましいベクターは、ウイルスベクター、融合タンパク質および化学コンジュゲート体を含む。レトロウイルスベクターは、モロニー Maus 白血病ウイルスを含む。DNAウイルスベクターが好ましい。これらのベクターは、ボックスベクター、例えばオルソボックスまたは鳥ボックスベクター、ヘルペスウイルスベクター、例えば単純ヘルペスIウイルス（HSV）ベクター（Geller, A.I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed (Oxford Univ. Press, Oxford England)(1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A.I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990)を参照のこと）、アデノウイルスベクター（LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995)を参照のこと）およびアデノ随伴ウイルスベクター（Kaplitt, M.G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)を参照のこと）を含む。

【0084】

ボックスウイルスベクターは、遺伝子を細胞の細胞質に導入する。鳥ボックスウイルスベクターは、核酸の短期間の発現のみをもたらす。アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよび単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターは、神経細胞への核酸の導入に好ましい。アデノウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（約4ヶ月）よりも短期間の発現（約2ヶ月）をもたらす、これはHSVベクターよりも短い。選択される個々のベクターは、標的細胞および処置される状態に依存すると考えられる。導入は、標準的技術、例えば感染、トランスフェクション、形質導入または形質転換によるものであり得る。遺伝子移入の様式の例は、例えば、ネイキッドDNA、CaPO₄沈降、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、細胞マイクロインジェクションおよびウイルスベクターを含む。

【0085】

ベクターは、本質的に任意の所望の標的細胞を標的とするために使用され得る。例えば、定位注射が、ベクター（例えば、アデノウイルス、HSV）を所望の場所に送るために使用され得る。加えて、粒子は、ミニポンプ注入システム、例えばSynchroMed Infusion Systemを用いる脳室内（icv）注入によって送達され得る。対流と呼ばれるバルクフローに

10

20

30

40

50

基づく方法も、大型の分子を脳の広い領域に送達するのに効果的であることが証明されており、ベクターを標的細胞に送達するのに有用であり得る (Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)を参照のこと)。使用することができる他の方法は、カテーテル、静脈内、非経口、腹腔内および皮下注射、ならびに経口またはその他の公知の投与経路を含む。

【0086】

これらのベクターは、様々な目的で、例えばサンプルにおけるインフルエンザウイルスの存在を検出するために使用され得る抗体を多量に発現させるために使用され得る。抗体はまた、インフルエンザウイルスと細胞膜融合物に結合しこれを破壊する試みを行うために使用され得る。

10

【0087】

技術は、本発明の抗原性タンパク質に特異的な単鎖抗体の製造のために適合させることができる (例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。加えて、方法は、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの高速かつ効率的な同定を可能にする F_{ab} 発現ライブラリの構築のために適合させることができる (例えば、Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281を参照のこと)。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、(i) 抗体分子のペプシン消化によって作製される $F_{(ab')_2}$ フラグメント; (ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成される F_{ab} フラグメント; (iii) パパインおよび還元剤による抗体分子の処置によって生成される F_{ab} フラグメント; ならびに (iv) F_v フラグメントを含むがこれらに限定されない当技術分野で公知の技術によって作製され得る。

20

【0088】

ヘテロコンジュゲート抗体も、本発明の範囲に包含される。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合により接続された抗体から構成される。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に標的指向させるため (米国特許第4,676,980号を参照のこと) およびHIV感染の処置のため (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089を参照のこと) に提案されている。抗体が、架橋剤を利用するものを含む合成タンパク質化学において公知の方法を用いてインビトロで調製され得ることも想定されている。例えば、免疫毒素が、ジスルフィド交換反応を用いてまたはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的に適した試薬の例は、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートならびに例えば米国特許第4,676,980号に開示されるものを含む。

30

【0089】

本発明の抗体を、例えば癌の処置における該抗体の効果を増強するために、エフェクター機能に関して修飾することが望ましいことがある。例えば、システイン残基がFc領域に導入され、それによってこの領域に鎖間ジスルフィド結合が形成され得る。そのようにして作製されるホモ2量体抗体は、改善されたインターナライゼーション能力ならびに/または増大した補体媒介細胞殺傷性および抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を有し得る (Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992)およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照のこと)。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するよう、そしてそれによって増強された補体溶解およびADCC能力を有し得るよう改造され得る (Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)を参照のこと)。

40

【0090】

本発明はまた、細胞傷害剤、例えば毒素 (例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素活性を有する毒素またはそのフラグメント) または放射性同位体 (すなわち、放射性コンジュゲート体) にコンジュゲートされた抗体を含む免疫コンジュゲート体に関する。

【0091】

使用することができる酵素活性を有する毒素およびそのフラグメントは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖 (緑膿菌 (Pseudomonas aer

50

uginosa) 由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ツルレイシ (momordica charantia) 阻害物質、クルシン、クロチン、サボンソウ (sapaonaria officinalis) 阻害物質、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンを含む。様々な放射性核種が、放射性コンジュゲート抗体の作製に利用可能である。例は、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re を含む。

【0092】

抗体および細胞傷害剤のコンジュゲート体は、様々な2官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの2官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジブイミデートHCL)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート (tolylene 2,6-diisocyanate))、および二活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)に記載されるようにして調製され得る。炭素14標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションにおける例示的なキレート剤である (WO 94/11026を参照のこと)。

【0093】

当業者は、本発明の得られる抗体または他の分子に非常に多様な候補部分をカップリングさせることができることを理解しているであろう (例えば、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989) を参照のこと)。

【0094】

カップリングは、抗体および他の部分がそれら各々の活性を保持する限り、2つの分子を結合させる任意の化学反応によって達成され得る。この連結は、多くの化学メカニズム、例えば共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合および錯体化を含み得る。しかし、好ましい結合は共有結合である。共有結合は、既存の側鎖の直接的縮合によってまたは外部架橋分子の組み込みによってのいずれかによって達成され得る。多くの2価または多価連結剤が、タンパク質分子、例えば本発明の抗体、の他の分子へのカップリングに有用である。例えば、代表的なカップリング剤は、有機化合物、例えばチオエステル、カルボジイミド、スクシンイミドエステル、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼンおよびヘキサメチレンジアミンを含み得る。このリストは、当技術分野で公知の様々なクラスのカップリング剤を網羅することを意図したものではなく、より一般的なカップリング剤の例示にすぎない (Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); およびVitetta et al., Science 238:1098 (1987)を参照のこと)。

【0095】

好ましいリンカーは、文献に記載されている (例えば、MBS (M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) の使用について記載するRamakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)を参照のこと)。オリゴペプチドリinkerによって抗体にカップリングされたハロゲン化アセチルヒドラジド誘導体の使用について記載する米国特許第5,030,719号も参照のこと。特に好ましいリンカーは: (i) EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミドヒドロクロリド); (ii) SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- β -(2-ピリジル (pridyl) -ジチオ)-トルエン) (Pierce Chem. Co., Cat.(21558G)); (iii) SPDP (スクシンイミジル-6[3-(2-ピリジル

ジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート) (Pierce Chem. Co., Cat #21651G) ; (iv) スルホ-LC-SPDP (スルホスクシンイミジル 6 [3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート) (Pierce Chem. Co., Cat. #2165-G) ; および (v) EDCにコンジュゲートされたスルホ-NHS (N-ヒドロキシスルホ-スクシンイミド : Pierce Chem. Co., Cat. #24510) を含む。

【 0 0 9 6 】

上記のリンカーは、異なる特質を有する要素を含み、それによって生化学的特性が異なるコンジュゲートが生成される。例えば、アルキルカルボン酸のスルホ-NHSエステルは、芳香族カルボン酸のスルホ-NHSエステルよりも安定である。NHS-エステル含有リンカーは、スルホ-NHSエステルよりも溶解性が低い。さらに、リンカー-SMPTは、立体的に妨げられたジスルフィド結合を含み、高い安定性のコンジュゲートを形成することができる。ジスルフィド連結は、一般に、インビトロで切断されるため他の連結よりも安定性が低く、コンジュゲートの利用性を低下させるものである。スルホ-NHSは、特に、カルボジイミドカップリングの安定性を増強し得る。カルボジイミドカップリング (例えば、EDC) は、スルホ-NHSと組み合わせて使用される場合、カルボジイミドカップリング反応単独よりも加水分解に対する抵抗性が高いエステルを形成する。

【 0 0 9 7 】

本明細書に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。該抗体を含むリポソームは、当技術分野で公知の方法、例えばEsptein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985) ; Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980) ; ならびに米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載される方法、によって調製される。循環時間が増強されたリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【 0 0 9 8 】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって生成され得る。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを生成するように定義された孔サイズのフィルターを通じて押出される。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)に記載されるようにジスルフィド交換反応を通じてリポソームにコンジュゲートされ得る。

【 0 0 9 9 】

インフルエンザウイルスに対する抗体の使用

所望の特異性を有する抗体のスクリーニングのための方法には、酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) および当技術分野で公知の他の免疫学的媒介技術が含まれるが、これに限定されない。

【 0 1 0 0 】

インフルエンザウイルスタンパク質、例えばHA、(またはそのフラグメント) に対する抗体は、インフルエンザウイルスタンパク質の局在化および/または定量に関して当技術分野で公知の方法において使用され得る (例えば、適当な生理学的サンプル中のインフルエンザウイルスタンパク質のレベルの測定において使用するために、診断法において使用するために、タンパク質の画像化において使用するために等)。所定の態様において、抗体由来抗原結合ドメインを含む、インフルエンザウイルスタンパク質に特異的な抗体またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログは、薬学的に活性な化合物 (本明細書の以降で「治療剤」と称される) として使用される。

【 0 1 0 1 】

本発明のインフルエンザウイルスタンパク質に特異的な抗体は、標準的技術、例えば免疫親和性、クロマトグラフィーまたは免疫沈降によりインフルエンザウイルスポリペプチドを単離するために使用され得る。インフルエンザウイルスタンパク質 (またはそのフラグメント) に対する抗体は、臨床試験手順の一部として、例えば所定の処置計画の効果を決定するため、組織内のタンパク質レベルをモニターするために診断的に使用され得る。

検出は、該抗体を検出可能物質にカップリング（すなわち、物理的に連結）することによって行われ得る。検出可能物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質を含む。適当な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを含み；適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含み；適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含み；発光物質の例は、ルミノールを含み；生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを含み、そして適当な放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H を含む。

10

【0102】

ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化および完全ヒト抗体を含む本発明の抗体は、治療剤として使用され得る。そのような薬剤は一般に、対象におけるインフルエンザウイルス関連疾患または病理（例えば、鳥インフルエンザ）を処置または予防するために使用され得る。抗体製剤、好ましくはその標的抗原に対して高い特異性および高い親和性を有するものが対象に投与され、通常、標的に対するその結合により効果を示すであろう。抗体の投与は、細胞へのウイルスのインターナライゼーションを無効にし得るまたはそれを阻害し得るまたはそれと干渉し得る。この例において、抗体は標的に結合し、天然に存在するリガンドの結合部位を覆い、それによって細胞膜へのウイルスの融合を阻止し、ウイルスのインターナライゼーションを阻害する。

20

【0103】

本発明の抗体の治療有効量は、通常、治療目的を達成するために必要とされる量に関連する。上記のように、これは、抗体とその標的抗原との間の、特定の例では標的の機能を妨害する結合相互作用であり得る。投与に必要とされる量はさらに、その特異的抗原に対する抗体の結合親和性に依存するであろうし、また投与された抗体がそれを投与された対象の自由空間（free volume）から消失する速度にも依存するであろう。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療有効投与量の一般的範囲は、非限定的な例であるが、約0.1 mg/kg体重～約50 mg/kg体重であり得る。一般的投与頻度は、例えば、1日に2回～1週間に1回の範囲であり得る。

【0104】

本発明のインフルエンザウイルスタンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体、ならびに、本明細書に開示されるスクリーニング法によって特定される他の分子は、薬学的組成物の形態でインフルエンザウイルス関連疾患の処置のために投与され得る。そのような組成物の調製に関する原理および考察ならびに成分の選択の手引は、例えば、Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; およびPeptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol.4), 1991, M. Dekker, New Yorkに提供されている。

30

【0105】

抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害性フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域の配列に基づき、標的タンパク質配列に結合する能力を保持しているペプチド分子が設計され得る。そのようなペプチドは、化学的に合成および/または組み換えDNA技術により作製され得る（例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照のこと）。製剤はまた、処置される特定の兆候に必要な場合、1つより多い活性化合物、好ましくは互いに対して悪影響を及ぼさない補完的活性を有するもの、を含み得る。あるいはまたは加えて、組成物は、その機能を増強する剤、例えば、細胞傷害剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖阻害剤を含み得る。そのような分子は、意図されている目的に有効な量で適当に組み合わせられる。

40

50

【0106】

活性成分はまた、例えば液滴技術によってまたは界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えば、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおける、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルの中に捕捉され得る。

【0107】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌性でなければならない。これは、滅菌ろ過膜を通じたる過によって容易に達成され得る。

【0108】

持続放出調製物が、調製され得る。持続放出調製物の適当な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、このマトリクスは、成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形式である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸-グルコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸リユープロリドから構成される注射可能なマイクロスフィア）ならびにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。ポリマー、例えばエチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸は100日を超える分子の放出を実現するのに対して、特定のヒドロゲルは、それより短い期間でタンパク質を放出する。

【0109】

本発明にしたがう抗体は、サンプル中のインフルエンザウイルス（またはタンパク質もしくはそのタンパク質フラグメント）の存在を検出するための剤として使用され得る。好ましくは、抗体は、検出可能な標識を含む。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくはモノクローナルであり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、F_a_b、scFvまたはF_(ab)₂）が使用され得る。プローブまたは抗体に関する「標識」という用語は、プローブまたは抗体への検出可能物質のカップリング（すなわち、物理的連結）によるプローブまたは抗体の直接的標識および直接的に標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含することが意図されている。間接的標識の例は、蛍光標識された2次抗体を用いる1次抗体の検出および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るビオチンによるDNAプローブの末端標識を含む。「生物学的サンプル」という用語は、対象から単離された組織、細胞および生物学的流体ならびに対象内に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図されている。したがって、血液ならびに血清、血漿またはリンパ液を含む血液のフラクションまたは成分が、「生物学的サンプル」という用語の用法に含まれる。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中の分析物であるmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、分析物mRNAの検出のためのインビトロ技術は、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションを含む。分析物タンパク質の検出のためのインビトロ技術は、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光を含む。分析物ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術は、サザンハイブリダイゼーションを含む。免疫アッセイを実施する手順は、例えば、"ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; および "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985に記載されている。さらに、分析物タンパク質の検出のためのインビボ技術は、標識された抗分析物タンパク質抗体の対象への投入を含む。例えば、抗体は、標準的な画像化技術によって対象内でのその存在および場所が検出できる放射性マーカーで標識され得る。

10

20

30

40

50

【0110】

薬学的組成物

本発明の抗体または剤（本明細書で「活性化合物」とも称される）およびそれらの誘導体、フラグメント、アナログおよびホモログは、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。そのような組成物は、典型的に、該抗体または剤および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与に適合する任意かつすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤等を含むことが意図されている。適当な担体は、参照により本明細書に組み入れられる、この分野の標準的参考文献であるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。そのような担体または希釈剤の好ましい例は、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液および5%ヒト血清アルブミンを含むがこれらに限定されない。リボソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油も使用され得る。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来的な媒体または剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、該組成物におけるその使用が想定されている。補助的な活性化合物も組成物に組み込まれ得る。

10

【0111】

本発明の薬学的組成物は、意図されている投与経路に適合するよう処方される。投与経路の例は、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜および直腸投与を含む。非経口、皮内または皮下適用で使用される溶液または懸濁物は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗細菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化物質、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝液、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩、および浸透圧調節剤、塩化ナトリウムまたはデキストロース。pHは、酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調節され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多用量バイアルに収納され得る。

20

【0112】

注射用途に適した薬学的組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散物および滅菌注射溶液または分散物を即時準備するための滅菌粉末を含む。静脈内投与に適した担体は、生理学的食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。すべての場合において、組成物は無菌でなければならず、注射容易性（easy syringeability）が存在する程度に流体であるべきである。それは、製造および保管の条件下で安定でなければならず、微生物、例えば細菌および真菌の混入行動に対して保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）ならびにそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。適当な流動性は、例えば、コーティング、例えばレシチンの使用によって、分散物の場合は必要な粒子サイズの維持によっておよび表面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の行動の防止は、様々な抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合において、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射可能な組成物の長時間吸収は、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによってもたらされ得る。

30

40

【0113】

注射可能な滅菌溶液は、上記の成分の1つまたは組み合わせを含む適当な溶媒に必要量の活性化合物を添加し、必要な場合、その後に濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、基本分散媒および上記のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルに活性化合物を添加することによって調製される。注射可能な滅菌溶液の調製のため

50

の滅菌粉末の場合、調製方法は、活性成分および任意の追加の所望の成分の粉末を事前に滅菌濾過されたその溶液から生成する真空乾燥および凍結乾燥である。

【0114】

経口組成物は、通常、不活性希釈剤または食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに収容されるかまたは錠剤に圧縮され得る。経口治療投与の目的で、活性化合物は賦形剤と共に添加され、そして錠剤、トローチまたはカプセルの形式で使用され得る。経口組成物はまた、口内洗浄液として使用するために流体担体を用いて調製され得、この場合、流体担体中の化合物が経口的に適用され、そしてうがいされ吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合する結合剤および/またはアジュバント物質が、組成物の一部分として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、以下の成分のいずれかまたは類似の性質を有する化合物を含み得る：結合剤、例えば微結晶セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン；賦形剤、例えばデンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogelもしくはトウモロコシデンプン；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸塩（Sterotes）；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えばスクロースもしくはサッカリン；またはフレーバー剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバー。

10

【0115】

吸入による投与の場合、化合物は、適当な推進剤、例えばガス、例えば二酸化炭素を含む加圧容器もしくはディスペンサーまたはネブライザーからのエアゾール噴霧の形式で送達される。

20

【0116】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によるものであり得る。経粘膜または経皮投与の場合、透過したい障壁に適した浸透剤が製剤で使用される。そのような浸透剤は、一般に当技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐薬の使用を通じて達成され得る。経皮投与の場合、活性化合物は、一般に当技術分野で公知のように軟膏、サルヴェ（salve）、ゲルまたはクリームにより処方され得る。

【0117】

化合物はまた、直腸送達のために（例えば、従来の坐薬基剤、例えばココアバターおよびその他のグリセリドを含む）坐薬または停留浣腸剤の形式で調製され得る。

30

【0118】

1つの態様において、活性化合物は、体内からの迅速な排除から該化合物を保護する担体、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル送達システムを含む制御放出製剤、を用いて調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸が使用され得る。そのような製剤を調製する方法は、当業者に明らかであろう。これらの物質は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体によって感染細胞に標的指向化されたりリポソームを含む）もまた、薬学的に活性な担体として使用され得る。これらは、当業者に公知の方法にしたがい、例えば米国特許第4,522,811号に記載されるようにして調製され得る。

40

【0119】

投与の容易さおよび用量の均一さのために経口または非経口組成物を単位剤形で処方することが特に有益である。本明細書で使用される単位剤形は、処置される対象に対する単回の投薬に適した物理的に隔離されている単位であって；各単位が、必要とされる薬学的担体と共に所望の治療効果を生ずるよう計算された既定量の活性化合物を含むものを表す。本発明の単位剤形の仕様は、活性化合物の固有の特徴および達成したい特定の治療効果ならびに個体の処置のためのそのような活性化合物の配合の分野に特有の制約により決定づけられ、かつそれらに直接的に依存する。

【0120】

50

薬学的組成物は、投与のための指示書と共に、容器、袋またはディスペンサーに含まれる。

【0121】

スクリーニング方法

本発明は、インフルエンザウイルスと細胞膜の融合物を調節するかまたはそれ以外の方法でこれと干渉するモジュレーター、すなわち、候補または試験化合物または作用物質（例えば、ペプチド、ペプチド模倣体、低分子または他の薬物）を同定する方法（本明細書で「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。インフルエンザ感染の処置に有用な化合物を同定する方法も提供される。本発明はまた、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイを用いて同定される化合物を包含する。

10

【0122】

例えば、本発明は、インフルエンザウイルスと細胞膜との相互作用を調節する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリ；空間指定可能（spatially addressable）な並列固相または液相ライブラリ；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリ法；「1ビーズ1化合物」ライブラリ法；および親和性クロマトグラフィー選別を用いる合成ライブラリ法を含む、当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリ法における多くのアプローチのいずれかを用いて入手することができる。生物学的ライブラリアプローチはペプチドライブラリに限定され、他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリに適用可能である（例えば、Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145を参照のこと）。

20

【0123】

本明細書で使用される「低分子」は、約5 kD未満、最も好ましくは約4 kD未満の分子量を有する組成物を表す意味を有する。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、炭水化物、脂質またはその他の有機もしくは無機分子であり得る。化学的および/または生物学的混合物、例えば真菌、細菌または藻類抽出物のライブラリが、当技術分野で公知であり、本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

【0124】

分子ライブラリの合成方法の例は、当技術分野において、例えばDeWitt, et al., 1993 . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; およびGallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233において見出され得る。

30

【0125】

化合物のライブラリは、溶液中（例えば、Houghten, 1992. Biotechniques 13:412-421を参照のこと）、またはビーズ上（Lam, 1991. Nature 354: 82-84を参照のこと）、チップ上（Fodor, 1993. Nature 364: 555-556を参照のこと）、細菌（米国特許第5,223,409号を参照のこと）、孢子（米国特許第5,233,409号を参照のこと）、プラスミド（Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869を参照のこと）もしくはファージ上（Scott and Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; および米国特許第5,233,409号を参照のこと）に提示され得る。

40

【0126】

1つの態様において、候補化合物は、抗体・抗原複合体に投入され、そして候補化合物が抗体・抗原複合体を崩壊させるかどうか決定され、この複合体の崩壊が、候補化合物がインフルエンザウイルスと細胞膜との相互作用を調節することを示す。

【0127】

50

別の態様において、少なくとも1つのHAタンパク質が提供され、これが少なくとも1つの中和性モノクローナル抗体に曝露される。抗体・抗原複合体の形成が検出され、そして1つまたは複数の候補化合物が該複合体に投入される。1つまたは複数の候補化合物の投入後に抗体・抗原複合体が崩壊する場合、その候補化合物は、インフルエンザウイルス関連疾患もしくは障害、例えばトリインフルエンザを処置するのに有用である。例えば、少なくとも1種のインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス分子として提供される。

【0128】

抗体・抗原複合体と干渉するまたはこれを崩壊させる試験化合物の能力の決定は、例えば、試験化合物に放射性同位体または酵素標識を連結し、抗原またはその生物学的に活性な部分への試験化合物の結合が複合体内の標識化合物の検出によって決定できるようにすることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、直接的または間接的のいずれかで ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^3H により標識され得、この放射性同位体が、放射線放射の直接計測またはシンチレーション計測によって検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼで酵素標識され得、そしてこの酵素標識が、適当な基質から生産物への変換の決定によって検出され得る。

【0129】

1つの態様において、アッセイは、抗体・抗原複合体と試験化合物を接触させること、および抗原と相互作用するまたはそれ以外の方法で既存の抗体・抗原複合体を崩壊させる試験化合物の能力を決定することを含む。この態様において、抗原と相互作用するおよび/または抗体・抗原複合体を崩壊させる試験化合物の能力の決定は、該抗体と比較して該抗原またはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

【0130】

別の態様において、アッセイは、抗体・抗原複合体と試験化合物を接触させることおよび抗体・抗原複合体を調節する試験化合物の能力を決定することを含む。抗体・抗原複合体を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、試験化合物の存在下で、抗体と結合または相互作用する抗原の能力を決定することによって、達成され得る。

【0131】

当業者は、本明細書に開示される任意のスクリーニング方法において、抗体がインフルエンザウイルス中和性抗体であり得ることを認識するであろう。加えて、抗原は、HAタンパク質またはその一部であり得る。本明細書に記載される任意のアッセイにおいて、本発明のモノクローナル抗体とHAタンパク質の間の結合と干渉する候補化合物の能力は、その候補化合物が、インフルエンザウイルスと細胞膜の融合と干渉するまたはそれを調節することができることを示す。さらに、細胞に対するHAタンパク質の結合は、インフルエンザウイルスの細胞への侵入を担っているので、そのような候補化合物はまた、インフルエンザウイルス関連疾患または障害、例えば鳥インフルエンザの処置において有用であり得る。

【0132】

本明細書に開示されるスクリーニング方法は、細胞ベースのアッセイとしてまたは無細胞アッセイとして実施され得る。本発明の無細胞アッセイは、HAタンパク質およびその断片の可溶型または膜結合型の両方の使用を対象とする。膜結合型のHAタンパク質を含む無細胞アッセイの場合、この膜結合型のタンパク質が溶液中で維持されるよう可溶化剤を利用することが望ましい場合がある。そのような可溶化剤の例は、非イオン性界面活性剤、例えばn-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-114、Thesit（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）_n（Isotridecypoly(ethylene glycol ether)_n）、N-ドデシル--N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモ

10

20

30

40

50

ニオ-1-プロパンスルホネート (3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-1-propane sulfonate) (CHAPS) または3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート (3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate) (CHAPSO) を含む。

【0133】

複数の態様において、候補化合物の投入後に複合体化形態を一方または両方の非複合体化形態から分離するのを容易にするため、およびアッセイの自動化に適応させるために抗体または抗原のいずれかを固定化することが望ましい場合がある。候補化合物の存在下および非存在下での抗体・抗原複合体の観察は、反応物質を収容するのに適した任意の容器において達成され得る。そのような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管および微小遠心管を含む。1つの態様において、タンパク質の一方または両方をマトリクスに結合できるようにするドメインを付加した融合タンパク質が提供され得る。例えば、GST・抗体融合タンパク質またはGST・抗原融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させることができ、次いでこれが試験化合物と組み合わせられ、そしてこの混合物が複合体形成を実現する条件 (例えば、生理学的な塩およびpHの条件) 下でインキュベートされる。インキュベートの後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルは、任意の未結合成分を除去するために洗浄され、ビーズの場合はマトリクスに固定化された、複合体が、直接的または間接的のいずれかで決定される。あるいは、複合体がマトリクスから分離され得、そして抗体・抗原複合体形成のレベルが標準的技術を用いて決定され得る。

【0134】

タンパク質をマトリクス上に固定化する他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、抗体または抗原 (例えば) のいずれかが、ビオチンおよびストレプトアビジンのコンジュゲートを用いて固定化され得る。ビオチニル化抗体または抗原分子は、当技術分野で周知の技術 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から調製され、そしてストレプトアビジンコートされた96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定化され得る。あるいは、関心対象の抗体または抗原と反応性であるが関心対象の抗体・抗原複合体の形成と干渉しない他の抗体が、プレートのウェルに誘導体化され、そして未結合の抗体または抗原が、抗体とのコンジュゲートによってウェルに捕捉され得る。そのような複合体を検出する方法は、GST固定化複合体に関して上記したものに加えて、抗体または抗原と反応性のそのような他の抗体を用いる複合体の免疫検出を含む。

【0135】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイのいずれかによって同定される新規の作用物質および本明細書に記載される処置におけるその使用に関する。

【0136】

診断アッセイ

本発明の抗体は、適当なアッセイ、例えば、従来型の免疫アッセイによって検出され得る。例えば、インフルエンザタンパク質 (例えば、HA1、HA2、またはニューロミニダーゼ) またはそのフラグメントを固相に固定するアッセイが行われ得る。インキュベートは、サンプル中の抗体が固相上に固定化されたポリペプチドに結合できる十分な期間続けられる。この第1のインキュベートの後、固相はサンプルから分離される。固相は、未結合物質および干渉物質、例えば同時にサンプル中に存在し得る非特異的タンパク質を除去するために洗浄される。固定化されたポリペプチドに結合した関心対象の抗体を含む固相は、その後、第2の、標識された抗体またはカップリング剤、例えばビオチンまたはアビジンに結合された抗体と共にインキュベートされる。この第2の抗体は、別の抗インフルエンザ抗体または別の抗体であり得る。抗体の標識は当技術分野で周知であり、放射性核種、酵素 (マレイン酸デヒドロゲナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダ

ーゼ、カタラーゼ)、蛍光(フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコシアニン、フルオレスカミン(fluorescarmine))、ビオチン等を含む。標識抗体は固相と共にインキュベートされ、そして固相に結合した標識が測定される。当業者はこれらおよび他の免疫アッセイを容易に実施することができる。

【0137】

生物学的サンプルにおけるインフルエンザウイルスの存在または非存在を検出する例示的な方法は、試験対象から生物学的サンプルを取得することおよびインフルエンザウイルスの存在が生物学的サンプルにおいて検出されるよう、生物学的サンプルと本発明にしたがう標識されたモノクローナルまたはscFv抗体を接触させることを含む。

【0138】

本明細書で使用される場合、プローブまたは抗体に関する「標識」という用語は、プローブまたは抗体への検出可能物質のカップリング(すなわち、物理的連結)によるプローブまたは抗体の直接的標識および直接的に標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含することが意図されている。間接的標識の例は、蛍光標識された2次抗体を用いる1次抗体の検出および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るビオチンによるDNAプローブの末端標識を含む。「生物学的サンプル」という用語は、対象から単離された組織、細胞および生物学的流体ならびに対象内に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図されている。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中のインフルエンザウイルスを検出するために使用され得る。例えば、インフルエンザウイルスの検出のためのインビトロ技術は、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光を含む。さらに、インフルエンザウイルスの検出のためのインビボ技術は、対象への標識抗インフルエンザウイルス抗体の投入を含む。例えば、抗体は、標準的な画像化技術によって対象内でのその存在および場所が検出できる放射性マーカーで標識され得る。

【0139】

1つの態様において、生物学的サンプルは、試験対象由来のタンパク質分子を含む。1つの好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって対象から単離された末梢血白血球サンプルである。

【0140】

本発明はまた、生物学的サンプル中のインフルエンザウイルスの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、キットは、生物学的サンプル中のインフルエンザウイルスを検出することができる標識された化合物または薬剤(例えば、抗インフルエンザscFvまたはモノクローナル抗体)、サンプル中のインフルエンザウイルスの量を決定するための手段、およびサンプル中のインフルエンザウイルスの量を標準と比較するための手段を含み得る。化合物または薬剤は、適切な容器に収容され得る。キットはさらに、キットを使用してサンプル中のインフルエンザウイルスを検出するための説明書を含み得る。

【0141】

受動免疫

受動免疫は、ウイルス疾患を予防および処置する上で効果的かつ安全な戦略であることが証明されている(各々参照により本明細書に組み入れられる、Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13: 602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20: 114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5: 204-10 (1999); およびIgarashi et al., Nat. Med. 5: 211-16 (1999)を参照のこと)。中和性ヒトモノクローナル抗体を用いた受動免疫は、代替のおよびより時間を要するワクチンおよび新薬開発が進行している間の、インフルエンザ、例えば鳥インフルエンザの緊急予防および処置のための緊急処置戦略を提供し得る。

【0142】

サブユニットワクチンは、従来の免疫原を超える大きな利益を提供する可能性がある。それらは、従来の殺傷または弱毒化された全病原体ワクチンの製造、流通および送達に内在する安全上の問題を回避する。さらに、それらは、確認された保護的エピトープのみを含むよう合理的に設計され得、それによって抑制性Tエピトープ(Steward et al., J.

10

20

30

40

50

Virol. 69: 7668 (1995)を参照のこと)または役に立たない非保護的応答を誘導することによって免疫系を妨害する免疫優勢Bエピトープ(例えば、「デコイ」エピトープ)(Garrity et al., J. Immunol. 159: 279 (1997)を参照のこと)を回避することができる。

【0143】

さらに、当業者は、多くの異なるウイルス、チャレンジ経路および動物モデルにおいて、インビトロでの抗体中和活性とインビボでのその保護の間に良い相関性が存在することを理解するであろう(Burton, Natl. Rev. Immunol. 2: 706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol. 77: 195-262 (2001)を参照のこと)。本明細書に示されているデータは、インフルエンザの緊急予防および処置のための強力なウイルス侵入阻害剤としてのその臨床的有用性を決定する目的で、D7、D8、F10、G17、H40、A66、D80、E88、E90およびH98 ヒトモノクローナル抗体がインビボ動物研究においてさらに開発および試験され得ることを示している。

【0144】

ワクチン接種における抗原-Igキメラ

最初の抗体が免疫系に対する抗原性決定基の効果的な提示のためのスキャホールドとして使用されてから十年以上が経つ(Zanetti, Nature 355: 476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 631-35 (1995)を参照のこと)。ペプチドがIgG分子の不可欠の部分として含まれる場合(例えば、本明細書に記載される11Aまたは256 IgG1モノクローナル抗体)、そのペプチドエピトープの抗原性および免疫原性は、遊離ペプチドと比較して大きく増強される。そのような増強は、抗原-Igキメラのより長い半減期、より良い提示性およびそれらのネイティブ構造を模倣する拘束された立体構造に起因すると考えられる。

【0145】

さらに、抗原-Igキメラを使用する付加的な利点は、抗原-Igキメラの可変またはFc領域のいずれもがプロフェッショナルな抗原提示細胞(APC)を標的化するために使用され得ることである。今日までに、重鎖可変遺伝子(V_H)の相補性決定領域(CDR)がBまたはT細胞によって認識される様々な抗原性ペプチドで置き換えられた組み換えIgが作製されている。そのような抗原-Igキメラは、液性および細胞性の両方の免疫応答を誘導するために使用されている(Bona et al., Immunol. Today 19: 126-33 (1998)を参照のこと)。

【0146】

特定のエピトープがCDR3ループに移植されたキメラ体が、HIV-1 gp120 V3-ループまたはヒトCD4受容体の第1細胞外ドメイン(D1)のいずれかに対する液性応答を誘導するために使用されている(Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11683-87 (1993); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 631-35 (1995)を参照のこと)。免疫血清は、HIV-1MN(抗gp120 V3C)によるCD4 SupT1細胞の感染を抑制するまたは合胞体形成(抗CD4-D1)を阻害することができた。CDR2およびCDR3は、同時にペプチドエピトープと置き換えられ得、挿入されるペプチドの長さは、最大19アミノ酸長であり得る。

【0147】

あるいは、1つのグループが、ペプチド抗原がIg定常(C)領域のループ内に提示され、キメラの可変領域がB細胞表面上のIgDまたはB細胞、樹状細胞(DC)およびマクロファージを含むプロフェッショナルなAPC上のMHCクラスII分子を標的化するために使用され得る「トロイボディ」戦略を開発した(Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30: 500-6 (2002)を参照のこと)。

【0148】

抗原-Igキメラはまた、抗原とIgG分子のFc部分を直接融合することによって作製され得る。You et al., Cancer Res. 61: 3704-11 (2001)は、この方法を用いて、B型肝炎ウイルスコア抗原に対する非常に高レベルの抗体を含む特定の免疫応答のすべてのアームを取得することができた。

【0149】

DNAワクチン接種

10

20

30

40

50

DNAワクチンは、安定であり、抗原が自然のプロセッシングを受ける機会を提供し得、かつより長く持続する応答を誘導することができる。DNAワクチンは、非常に魅力的な免疫戦略であるが、しばしば、非常に限られた免疫応答誘導能力しか有さない。プロフェッショナルなAPC、例えば樹状細胞（DC）による注入されたDNAの乏しい取り込みが、そのような制約の主たる原因であり得る。抗原-Igキメラワクチンと合わせて、DCの表面上のFc受容体（Fc R）の存在を利用するAPC抗原提示の増強に基づく見込みのある新規のDNAワクチン戦略が報告されている（Casares, et al., *Viral Immunol.* 10: 129-36 (1997); Gerlioni et al., *Nat. Biotech.* 15: 876-81 (1997); Gerlioni et al., *DNA Cell Biol.* 16: 611-25 (1997); You et al., *Cancer Res.* 61: 3704-11 (2001)を参照のこと）。

【0150】

抗原（Ag）-IgキメラをコードするDNAワクチンを作製することができる。免疫刺激されると、Ag-Ig融合タンパク質が、このDNA分子を取り込んだ細胞によって発現および分泌されるであろう。分泌されたAg-Ig融合タンパク質は、B細胞応答を誘導しながら、そのFcフラグメントとDC表面上のFc Rの相互作用により捕捉およびインターナライズされ得、これにより効果的な抗原提示が促進され、抗原特異的な免疫応答が大きく増強されるであろう。同じ原理を適用して、機能的な抗MHC II特異的のscFv領域遺伝子を保有する抗原-IgキメラをコードするDNAもまた、その免疫原をAPCの3つすべてのタイプに向けることができる。免疫応答は、必要に応じて、インビトロで作製された同じタンパク質抗原の使用によってさらに促進（すなわち、刺激および加速）され得る。この戦略を用いて、DNAワクチンの筋肉（i.m.）注射を通じてインフルエンザウイルスの感染に対する特異的な細胞性および液性免疫応答が達成された（Casares et al., *Viral Immunol.* 10: 129-36 (1997)を参照のこと）。

【0151】

ワクチン組成物

通常1つまたは複数のモノクローナル抗体またはScFvの混合物およびその組み合わせを含む、治療または予防組成物が、本明細書に提供される。予防ワクチンは、インフルエンザウイルス感染を予防するために使用され得、治療ワクチンは、インフルエンザウイルス感染後の個体を処置するために使用され得る。予防的使用は、ワクチン接種対象におけるインフルエンザウイルスに対する抗体価の増加の提供を含む。この方法で、インフルエンザにかかる危険が高い対象に、インフルエンザウイルスに対する受動免疫が提供され得る。

【0152】

これらのワクチン組成物は、補助的な免疫調節剤と組み合わせて投与され得る。例えば、IL-2、改変IL-2（Cys125 Ser125）、GM-CSF、IL-12、 γ -インターフェロン、IP-10、MIP1 およびRANTESを含むがこれらに限定されない、サイトカイン、リンホカインおよびケモカイン。

【0153】

免疫刺激法

本発明のワクチンは、他の抗ウイルスワクチンよりも優れた免疫保護性および免疫治療性を有する。

【0154】

本発明は、対象の免疫刺激、例えば免疫応答を誘導する方法を提供する。対象は、病原性エンベロープウイルスの膜融合タンパク質を含む組成物をその対象に投与することによって免疫刺激される。融合タンパク質は、生物学的に適合するマトリクスにコーティングされるまたはその中に埋め込まれる。

【0155】

融合タンパク質は、グリコシル化される、例えば炭水化物部分を含む。炭水化物部分は、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖またはそれらの誘導体の形態（例えば、スルホもしくはホスホ置換されたもの）であり得る。炭水化物は、直鎖状または分枝鎖状である。炭水化物部分は、ポリペプチドにN結合またはO結合される。N結合型グリコシル化は、アスパラギ

10

20

30

40

50

ン側鎖のアミド窒素に対するものであり、O結合型グリコシル化は、セリンおよびスレオニン側鎖のヒドロキシ酸素に対するものである。

【0156】

炭水化物部分は、ワクチン接種される対象にとって内因性のものである。あるいは、炭水化物部分は、ワクチン接種される対象にとって外因性のものである。炭水化物部分は、典型的にはワクチン接種される対象のポリペプチド上で見られない炭水化物部分である。例えば、炭水化物部分は、植物特異的な炭水化物である。植物特異的な炭水化物部分は、例えば、コア結合 1,3フコースまたはコア結合 1,2キシロースを有するN結合型グリカンを含む。あるいは、炭水化物部分は、ワクチン接種される対象のポリペプチドまたは脂質上で見られる炭水化物部分である。例えば、多くの宿主細胞が、ヒト様糖付加物を有するヒトタンパク質を産生するよう遺伝子操作されている。

10

【0157】

例えば、融合タンパク質は、三量体ヘマグルチニンタンパク質である。任意で、ヘマグルチニンタンパク質は、非哺乳動物細胞、例えば植物細胞において産生される。

【0158】

対象は、ウイルス感染を発症するまたはウイルス感染に罹患する危険を有する者である。エンベロープウイルスは、例えば、エプスタン・バーウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型および2型ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス、8型、水痘帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプス・ウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、狂犬病ウイルスおよび風疹ウイルスを含む。

20

【0159】

本明細書に記載される方法は、ウイルス感染の重篤度の軽減またはその1つもしくは複数の症状の緩和をもたらす。感染は、典型的に標準的な方法を用いて医師によって診断およびまたは監視される。免疫刺激を必要とする対象は、当技術分野で公知の方法によって特定される。例えば、対象は、CDC's General Recommendation on Immunization (51(RR02)pp1-36)に概説されているようにして免疫刺激される。癌は、例えば身体検査、生検、血液検査またはx線によって診断される。

【0160】

対象は、例えば任意の動物、例えばヒト、霊長類、マウス、ラット、犬、猫、牛、馬、豚、魚または鳥である。処置は、感染の診断前に行われる。あるいは、処置は、診断後に行われる。

30

【0161】

処置の効果は、特定の障害または感染を診断または処置する任意の公知の方法によって決定される。障害の1つまたは複数の症状の緩和は、その化合物が臨床的利益を提供することを示している。

【0162】

ワクチン効果に関する抗原性タンパク質フラグメント (APF) の評価

液性免疫を標的とするワクチン候補は、少なくとも3つの成功基準を満たさなければならない：強い抗体応答を誘発しなければならないこと（「免疫原性」）；誘発する抗体の相当数が病原体と交差反応しなければならないこと（「免疫原適性」）；および誘発する抗体が保護的でなければならないこと。免疫原性は、多くの場合、アジュバントまたは担体を用いて増強され得、免疫原適性および（中和によって示される）保護を誘導する能力は、抗原に固有の特性であり、究極的にはワクチン成分としてのその抗原の成功を決定するであろう。

40

【0163】

免疫原適性の評価

「免疫原適性」は、病原体と交差反応する抗原により誘導された抗体の割合と定義される。（Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002)を参照のこと）。それは、病原体と交差反応しない抗体を含む、抗原によって誘導されたすべての抗体の力価によって測定

50

される免疫原性とは異なるものである。不十分な免疫原適性がおそらく、今日までのペプチドワクチンの期待外れの結果の原因であると考えられる。高い親和性で抗体に結合し、高い抗体価を示すペプチドは、しばしば、十分な免疫原適性を欠いており、したがって、それらは潜在的ワクチン成分として失格である。したがって、インフルエンザワクチン候補を選択するための基準の一つとして免疫原適性を含めることが重要である。

【0164】

乏しい免疫原適性の共通の説明は、最も短いペプチドの立体構造上の柔軟性である。詳細に、柔軟なペプチドは、患者由来の抗体によく結合し得、かつナイーブな対象において相当な抗体価を生じ得る。しかし、そのペプチドが立体構造のレパートリーを多く有する場合、ナイーブな対象においてそれが誘導する抗体の多くは、インタクトな病原体上の対応するネイティブエピトープと交差反応しない可能性がある。

10

【0165】

短いペプチドと同様、いくつかのAPFは、高い柔軟性を有し得、したがってワクチン成分として失格であり得る。最も免疫学的に適するAPFは、タンパク質全体の外側で本質的に拘束される自己フォールディングタンパク質サブドメインからなると考えられる。

【0166】

免疫原適性は主としてAPF自身の特性であり、応答する免疫系の特性ではないので、免疫原適性は、最終的にはそのAPFがヒトにおいて実施される必要があるものの、動物モデルにおいて（例えばマウスにおいて）評価することができる。

【0167】

20

APFによって達成される免疫原適性は、Matthews et al., J. Immunol. 169: 837 (2002) に記載されるのと同様の手順の下での、精製されたスパイクまたは膜タンパク質を用いた抗APF血清の免疫吸着によって評価される。IgGは、免疫刺激されたマウスから回収された血清から精製される。（適当な場合、マウスを免疫刺激した特定のAPFに依存する）精製されたビオチニル化タンパク質がマウスIgGと混合され、インキュベートされる。次いで、ストレプトアビジンコーティングされたセファロースビーズが、任意の結合したIgGと共にすべてのビオチニル化タンパク質を捕捉するのに十分な量で添加される。ストレプトアビジンコーティングされたビーズは、微小遠心分離によって13,000rpmで遠心分離することによって取り出され、そのタンパク質に対する抗体が除去されたIgGが残される。ビオチニル化BSAをモック吸着剤としてインフルエンザタンパク質と置き換えることを除いて同じ方法で、モック免疫吸着が並行して行われる。

30

【0168】

APFの免疫原適性を測定するために、吸着した抗体およびモック吸着抗体を、免疫刺激APFに対するELISAにおいて比較滴定する。ファージディスプレイNPLから選択されたAPFの親和性の場合、これらのELISAのための抗原は、APF-GST融合タンパク質から精製されるであろう。哺乳動物細胞ディスプレイNPL由来の潜在的にグリコシル化されたAPFの場合、これらのELISAのための抗原は、哺乳動物細胞によって分泌され、プロテインAを用いて精製されたAPF-Fc融合タンパク質であろう。モック吸着抗体との比較での吸着抗体の抗APF価の減少率は、APFの免疫原適性の尺度を提供する。

【0169】

40

処置方法

本発明は、インフルエンザウイルス関連疾患または障害の危険がある（またはそれに罹患し易い）対象を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。そのような疾患または障害は、例えば、鳥インフルエンザを含むがこれに限定されない。

【0170】

予防方法

1つの局面において、本発明は、対象に本発明のモノクローナル抗体もしくはscFv抗体または本発明の方法にしたがい同定された薬剤を投与することによる、対象においてインフルエンザウイルス関連疾患または障害を予防する方法を提供する。例えば、scFvおよび/またはモノクローナル抗体は、治療有効量で投与され得る。任意で、2つまたはそれ以

50

上の抗インフルエンザ抗体が同時投与される。

【0171】

インフルエンザウイルス関連疾患または障害の危険がある対象は、感染者と接触した患者または何らかの他の方法でインフルエンザウイルスに曝露された患者を含む。予防剤の投与は、疾患または障害を予防するか、あるいはその進行が遅延するように、インフルエンザウイルス関連疾患または障害に特徴的な症状の発現の前に行われ得る。

【0172】

適切な薬剤は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイに基づき決定され得る。あるいはまたは加えて、投与される薬剤は、本発明の方法にしたがい同定されたインフルエンザウイルスを中和するscFvまたはモノクローナル抗体である。

10

【0173】

治療方法

本発明の別の局面は、患者においてインフルエンザウイルス関連疾患または障害を処置する方法に関する。1つの態様において、この方法は、疾患または障害に罹患している患者に、インフルエンザを中和する薬剤（例えば、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイによって同定された薬剤および/または本発明の方法にしたがい同定されたscFv抗体もしくはモノクローナル抗体）または薬剤の組み合わせを投与する段階を含む。例えば、本発明の抗体は、他の抗ウイルス剤、例えばタミフルと組み合わせて使用され得る。

【0174】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明されているが、これらは特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

20

【実施例】

【0175】

実施例1：単一の記憶B細胞の培養物からのインフルエンザウイルスに対するBnAbの単離

広域中和性抗体（BnAb）の単離手順の概要が図1に示されている。ヒト記憶B細胞レパトリーからインフルエンザウイルスに対するbnAbを単離するため、我々は、インビトロでヒト記憶B細胞の活性化および分化を行うことができる高速かつ高信頼性の培養法を構築した。抗原特異的ヒト記憶B細胞（CD19+CD27+）を、7名の健常ドナーの末梢血単核細胞（PBMC）から四量体化H3（A/ブリスベン/10/07）三量体を用いて単離したところ；記憶B細胞の0.19%～1.08%のみがH3と反応性であった（表3）。これらのB細胞を、ウェルあたり1つの細胞密度で384ウェルプレートに選別し、照射したCD40Lトランスフェクト細胞の存在下で培養した。14日後、7名のドナー由来の1051個（2688個の培養物のうち39.1%）の培養上清が、IgGまたはIgMを分泌することが見出され、これらをH3（A/ブリスベン/10/07）、H7（A/カナダ/RV444/04）、H1（A/カリフォルニア/04/09）およびインフルエンザB型のHA（B/マレーシア/2506/04）との反応性について順次試験した。このスクリーンを通じて、237個（22.55%）の増殖させた記憶B細胞が、H3と結合するIgを分泌することが見出された（表3）。このインビトロ増殖工程により、H3反応性B細胞回収率は、選別およびRT-PCRのみによる0.61%の回収率と比較して37倍増加した（データ示さず）。グループ2株H3/H7における平均交差反応性クローン率は、18.14%であった。注目すべきは、H3結合性クローンの13.08%および8.44%が、それぞれ、グループ1 H1株およびH7/H1株に対してヘテロサブタイプ結合を示したことである。H3反応性（H3+）クローンの3.38%のみが、インフルエンザB型にも結合することが見出された。次に、ヘテロサブタイプ結合を示した記憶B細胞クローンの上清を、H3N2（A/ブリスベン/10/07）に対するマイクロ中和について試験した。H3/H7/H1交差反応性および中和を示したドナー3由来の1つのbnAb、3I14をさらに特徴づけた。

30

40

【0176】

（表3）7名の健常ドナーにおける増殖させた記憶B細胞（mB）

ドナー#	mBのH3 ⁺ 集団 (CD19 ⁺ /CD27 ⁺)	クローンH3 ⁺ mB	H7 ⁺ 交差性の クローンH3 ⁺ mB	H1 ⁺ 交差性の クローンH3 ⁺ mB	H1 ⁺ /H7 ⁺ 交差性の クローンH3 ⁺ mB	B ⁺ 交差性の クローンH3 ⁺ mB
1	0.94%	39	0	3	0	3
2	0.30%	32	6	1	0	0
3	0.32%	29	8	10	6	0
4	0.19%	28	4	2	3	0
5	0.99%	31	2	0	0	2
6	0.53%	66	20	14	11	5
7	1.08%	22	3	3	2	0
合計	-	237	43	31	23	8
平均比率 (%)	0.61	22.55*	18.14**	13.08**	8.44**	3.38**

*クローンmB率は、1051個のIg陽性培養物からのものである。 **クローンmB率は、237個のH3陽性培養物からのものである。

【0177】

3I14は高度に変異したIGHV3-30によりコードされる抗体である

親和性成熟に対する体細胞変異の寄与を評価するため、我々は、3I14 VHおよびVL生殖系列版(3I14-GL)ならびに生殖系列(g)軽鎖と対を形成した成熟(m)3I14重鎖により形成されるキメラ抗体(3I14-mHgL)およびその逆(3I14-gHmL)を作製した(図11)。3I14変種抗体を、ヒトIgG1として発現させ、H1、H5およびH3に対するそれらの結合親和性を評価した(表4および図20)。注目すべきは、3I14-GL変種は依然としてnMおよびnM以下の範囲でH3およびH1に結合しつつ、それぞれ、H3に対する結合親和性の>15倍減少およびH1に対する結合親和性の4.7倍増加を示したことである(表4)。H3およびH1に対する3I14-GLの結合親和性のこれらの変化は主として、それぞれ K_{off} の13.9倍または7.5倍の増加および減少によるものである。興味深いことに、3I14-GLは、これらのアッセイ条件下でH5に結合しなかった。

【0178】

(表4) 3I14生殖系列変種の結合親和性

3I14 変種	H5-VN04 K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	H3-PE09 K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	H1-CA09 K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})
GL	n*	n*	n*	4.02 (-Δ15.3)	1.39E+05	5.56E-04 (-Δ13.9)	0.0597 (Δ4.7)	1.09E+05	6.50E-06 (Δ7.5)
mHgL	7.71 (-Δ7.5)	2.58E+05	1.99E-03 (-Δ5.2)	0.658 (-Δ2.5)	1.92E+05	1.26E-04 (-Δ3.2)	<0.001**	1.38E+05	<1.0E-07**
gHmL	1.95 (-Δ1.9)	4.34E+05	8.44E-04 (-Δ2.2)	0.733 (-Δ2.7)	1.71E+05	1.25E-04 (-Δ3.1)	<0.001**	1.55E+05	<1.0E-07**
3I14 WT	1.02	3.75E+05	3.83E-04	0.263	1.52E+05	3.99E-05	0.279	1.74E+05	4.87E-05

()はWTに対する~倍増加を示し、(-)は~倍減少を示す。

*nは結合が検出されなかったことを示す。 **は検出可能な解離がなかったことを示す。

【0179】

この2つのキメラ形態を野生型(WT)3I14と比較すると、3I14のVHおよびVLの両方に存在する体細胞変異は、H3結合に対して同等の貢献をなすようである(K_d : 0.658 nM 対 0.733 nM)。加えて、重鎖および軽鎖キメラは両方とも、 $K_{off} < 1.0E-7s^{-1}$ でH1に本質的に不可逆的に結合した。しかし、H5の場合、VL変異はVH変異よりも、それぞれ K_{off} の5.2倍および2.2倍減少により、親和性の増加に対してより高い貢献をしている(7.5倍 対 1.9倍)。これらの研究から、我々は、3I14-GLが3I14-WTと比較してH1に対するより高い親和性結合およびH3に対する低い親和性を示し、主として K_{off} の変化がその速度論の差を担っていると結論付ける。H5結合の場合、3I14内の体細胞変異は結合に絶対的に必要とされ、VL変異がVH変化よりも結合に対して高い貢献を提供する。H1、H3およびH5に対する結合親和性のすべての変化は、主として解離速度(K_{off})定数の変化の結果である。

【0180】

重鎖(VH)および軽鎖(VH)の可変領域の配列を、RT-PCRを用いて、増殖した単一細胞培養物から回収した。3I14は、IGHV3-30*18およびIGLV1-44*01生殖系列遺伝子によってコードされる。再構成された重鎖は、長鎖相補性決定領域3(HCDR3)(23アミノ酸)を有し、VHおよびIGHJ4*02接合部の両方で大きなN付加が隣接するIGHD3-22*01 DHセグメントを使用する(図11Cおよび11D)。3I14 mAbは、フレームワークおよびCDRの両方で観察されるプライマー隣接領域を除いて15個の可変重鎖および7個の可変軽鎖の体細胞変異を有す

る。

【 0 1 8 1 】

実施例2：3I14は、グループ1およびグループ2の両方のインフルエンザウイルスに結合しこれを中和する

3I14は、フローサイトメトリーにより、グループ2（H3、H4、H7、H14およびH15）ならびにグループ1（H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12およびH16）の両方のインフルエンザA型ウイルスの血清型において細胞表面発現されたHAに結合した（図2）。3I14はまた、0.01 nM ~ 10 nMの範囲の解離定数（Kd）でグループ2（H3、H4、H7およびH14）ならびにグループ1（H1、H5およびH9）に属する異なるサブタイプの精製されたHAタンパク質に結合した（図3および図15C）。3I14は、高い親和性（平均Kd < 0.1 nM）ですべての試験されたグループ2 HA（H3、H4、H7およびH14）に結合した。加えて、3I14は、高い親和性でグループ1 H1サブタイプ（H1-CA09、H1-SI06およびH1-PR8）に結合し、他のグループ1サブタイプ（H5-VN04、H5-IN05およびH9-HK99）に対するその親和性はそれよりも低かった（それぞれ、平均Kd = 1.02、1.05および5.23 nM）。

【 0 1 8 2 】

3I14は、0.032 ~ 1.074 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲の、最大の半量を阻害する濃度（IC50）値で、2つの再集合体ウイルス株（A/ウィスコンシン/67/05（HA,NA）x A/プエルトリコ/8/34およびA/愛知/2/68（HA,NA）x A/プエルトリコ/8/34）ならびに新規のH7N9-AH13株を含む多数のグループ2（H3およびH7）ウイルスを強く中和した（図4および図17）。それはまた、0.007 ~ 0.027 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲のIC50値で偽型ウイルスH7N1-FPNおよびH7N1-NL219株を中和した（図5Bおよび図17）。加えて、3I14は、それぞれ、0.225および0.413 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のIC50値でグループ1 H1株（H1-CA09およびH1-PR8）を（図5Bおよび図10）ならびに0.040および0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のIC50値で偽型ウイルスH5-VN04およびH5-HK97（図5Bおよび図17）を中和した。

【 0 1 8 3 】

実施例3：3I14 IgG1の結合（Kd値）

組み換えHA三量体に結合するbnAbの速度論分析を、25 °CでOctet（登録商標）RED96機器（ForteBio, Inc）を用いてバイオレイヤー干渉法により実施した。5 nMのbnAb IgG1を、Pierce Protein-freeブロッキング緩衝液（Tween-20を含むPBS）中で180秒間、抗ヒトIgG Fcバイオセンサに捕捉させた。組み換え全長HAを、6.25 ~ 100 nMの範囲の濃度で充填した。全ての実験に、HAと抗ヒトIgG Fcの間の潜在的な非特異的相互作用を試験する追加の抗ヒトIgG Fc抗体バイオセンサを含めた。konの測定のために、センサを最大20のHA濃度に曝露することによって、3I14 IgG1の結合を600秒間測定した。koffの測定のために、3I14 IgG1の解離を900秒間測定した。親和性定数（Kd）を、ForteBio Data Analysis 7.0ソフトウェアを用いて計算した。

【 0 1 8 4 】

3I14は、0.01 nM ~ 10 nMの範囲のKd値でグループ1（H1およびH5）ならびにグループ2（H3、H4、H7およびH14）に属する異なるサブタイプの精製されたHAタンパク質に結合した（図3）。3I14は、大部分のグループ2 HA（H3、H4、H7およびH14）に高い親和性（平均Kd < 0.1 nM）で結合した。対照的に、3I14は、高い親和性でH1サブタイプ（H1-CA09、H1-SI06およびH1-PR8）に結合し、他のグループ1サブタイプ（H5-VN04およびH5-IN05）に対するその親和性は、ずっと低かった（平均Kd > 1 nM）。

【 0 1 8 5 】

H1サブタイプA/カリフォルニア/04/09（H1-CA409）、A/ソロモン諸島/3/06（H1-SI06）およびA/プエルトリコ/8/34（H1-PR8）；H3サブタイプA/パース/16/09（H3-PE09）、A/ウルグアイ/716/07（H3-UY07）、A/ウィスコンシン/67/05（H3-WI05）、A/ブリスベン/10/07（H3-BR07）、A/ニューヨーク/55/04（H3-NY04）およびA/ピクトリア/341/11（H3-VIC11）；H5 A/ベトナム/1203/04（H5-VN04）、A/香港/213/03（H5-HK03）およびA/インドネシア/05/05（H5-ID05）；H7 A/オランダ/219/03（H7-NL219）、A/カナダ/RV444/04（H7-CA44）およびA/安徽/1/13（H7-AH13）の組み換え全長HAタンパク質（rHA）を、NIH BEIR R

10

20

30

40

50

epository (NIAID, NIH) から入手した。組み換え全長H3 A/ウィスコンシン/12/2010 (H3-WI10) を、Influenza Reagent Resources (IRR, Manassas, USA) を通じて入手した。サブタイプH3 A/愛知/2/68 (H3-A268)、H4 A/マガモ/オランダ/2/05 (H4-NL05) およびH14 A/マガモ/アストラハン/263/82 (H14-AS82) の組換え全長HAは、R.C. Liddington博士 (Burnham Institute for Medical Research, CA, USA) からの好意により授受した。

【0186】

実施例4. 3I14 IgG1の中和 (IC50値)

IC50グラフは、2~3回の独立した実験の平均中和価を示している。3I14は四角で示されており、抗グループ1 mAb F10 IgG1 (三角で示されている) を対照として使用した (図4および5)。

10

【0187】

MDCK細胞 (ウェルあたり 1.5×10^4 個の細胞) を96ウェル組織培養プレートに播種し、PBSで2回洗浄し、その後2 μ g/mLトリプシンおよび0.5%BSAを補充したDMEM中でインキュベートした。96ウェルプレートにおいて、100 TCID50 (50%組織培養物感染量) のウイルスを、Abまたは抗体含有上清の2倍連続希釈物と等量となるよう混合し、37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、Ab・ウイルス混合物を、2連のコンフルエントなMDCK単層に移し、その後37℃で21時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、アセトンで固定し、ウイルス抗原を、インフルエンザA型ウイルスヌクレオタンパク質 (NP) に対するmAb (クローンA3, BE1) を用いた間接的ELISAにより検出した。最大の半量を阻害する濃度 (IC50) は、その効果が、バックグラウンドを差し引いた後にウイルス対照を含むウェルと比較して50%に低下するAb濃度である。

20

【0188】

3I14は、インビトロでグループ1 (H1) ならびにグループ2 (H3およびH7) ウイルスを中和した。3I14は、0.032~1.336 μ g/mLの範囲のIC50で異なるH1、H3およびH7ウイルスを強力に中和した (図4および5)。

【0189】

実施例5. グループ1およびグループ2サブタイプを代表する偽型ウイルスの3I14 IgG1中和 (IC50値)

IC50グラフは、2~3回の独立した実験の平均中和価を示している。3I14は四角で示されており、抗グループ1 mAb F10 IgG1 (三角で示されている) を対照として使用した。

30

【0190】

3I14は、両方ともグループ2偽型ウイルスであるH7N1-FPNおよびH7N1-NL219を、0.032~1.336 μ g/mLの範囲のIC50値で強力に中和した。それはまた、グループ1偽型ウイルスH5-VN04およびH5-HK97を、それぞれ2.137~4.601 μ g/mLの範囲のIC50値で中和した。 (図5)

【0191】

実施例6. マウスにおけるグループ2およびグループ1インフルエンザウイルスに対する3I14の予防効果

我々は、BALB/cマウスモデルにおいてH5N1、H3N2、H7N7およびH7N9感染に対する保護効果を評価するため、3I14を全長ヒトIgG1に変換した (図6)。抗グループ1 Ab、F1012を、染色特異的対照として使用した。マウスを、致死用量のH7N7-NL219、H7N9-AH13、H3N2-BR07-maおよびH5N1-VN04ウイルスによるチャレンジの1日前に、様々な用量の3I14およびF10 IgG1で処置した。5 mg/kgの3I14 IgG1を用いた予防は、14~18日で最小限の体重減少を伴いマウスをH7N7-NL219またはH7N9-AH13チャレンジ後の死から完全に保護した (図6A)。25 mg/kgの用量で、3I14 IgG1は、H3N2-BR07に対する80%保護およびH5N1-VN04に対する60%保護を示した。すべての生存マウスは、観察期間の終了までに体重減少の回復を示した (図6b)。5匹のマウスのグループを、H3N2 BR07、H5N1 VN04、H7N9 AU13またはH7N7 NL219インフルエンザウイルスのi.n.接種による致死チャレンジの24時間前に、25または5 mg/kgの精製されたIgGで腹腔内処置した。(A)bnAb 3I14 (赤色)、グループ1対照mAb F10 (黒色) およびグループ2対照mAb A533 (青色) で処置したマウスの生存率 (%) および (B) 体重変化 (%)。

40

50

【 0 1 9 2 】

実験の1日前に、5匹のメス8～10週齢BLAB/cマウスのグループに、腹腔内（i.p.）経路により、5 mg/kgの低濃度および20または25 mg/kgの高濃度の、それぞれ、3I14、F10およびA533-IgG1を0.5 mL量注射した。6つのマウスグループを、10 LD50のマウス適合型A/ベトナム/1203/04（H5N1）、A/ブリスベン/10/07（H3N2）、A/オランダ/219/03（H7N7）またはA/安徽/1/13（H7N9）のいずれかで経鼻感染させた。マウスを、ウイルスチャレンジの日に体重測定し、次いで14日間または18日間毎日生存について観察し、体重測定した。動物研究は、承認を受けたInstitutional Animal Care and Use Committeeのプロトコルにしたがい実施した。

【 0 1 9 3 】

マウスを、致死用量のH5N1-VN04、H3N2-BR07、H7N7-NL219およびH7N9-AU13ウイルスを用いたチャレンジの1日前に、様々な用量の3I14、F10（グループ1対照Ab）およびA533（グループ2対照Ab）IgG1で処置した。5 mg/kgの3I14 IgG1を用いた予防は、観察期間中最小限の体重減少を伴いマウスをH7N7-NL219またはH7N9-AU13チャレンジ後の死から完全に保護した。これらの結果は、3I14 IgG1が、致死用量のH3N2-BR07を用いてチャレンジしたときにマウスを効果的に（60～80%）保護し、致死用量のH5N1-VN04に対してマウスを部分的に（20～60%）保護したことを示している（図6A）。5 mg/kgの3I14 IgG1の用量は、H3N2およびH5N1によって引き起こされる疾病の予防に関して部分的な保護にとどまったが、すべての生存したマウスは、5または25 mg/kgの用量で観察期間の終わりに体重減少の回復を示した（図6B）。

【 0 1 9 4 】

実施例7：3I14はトリプシン媒介HA変異およびpH依存的立体構造変化を阻止する

ステム指向性bnAbは、pH依存的立体構造変化およびHAの膜融合と干渉することが知られている^{12, 14, 16}。前駆体HA0の切断は、その後に酸性エンドソーム環境下で膜融合を活性化するようにHAを刺激する。未成熟HA0は通常、呼吸上皮細胞上の表面プロテアーゼによってHA1およびHA2にプロセッシングされ^{28, 29}、これはHA0のトリプシン処理によって実験的に模倣される³⁰。3I14はHA0切断部位およびHA2 NA末端融合ペプチドを含むHAのステムドメインを標的化するので、我々は、3I14がまたHA0のトリプシン切断の活性化を阻止し得るまたはHA媒介ウイルス宿主膜融合と干渉し得るかどうかを試験した。図7は、3I14 IgG1が未成熟HA0の切断を防ぎ、対照抗SARS IgG1（Fm-6）ではそうならなかったことを示している。我々はまた、表面発現H3-A2/68およびH3-BR07を用いて、低pH誘導立体構造再構成の3I14による防止を分析した。図8（上）は、3I14が、未切断HA前駆体（HA0）（左）およびトリプシン活性化のみ（中央左）の後またはその後に低pH誘導を行った場合（中央右）のいずれかの2つの成熟形態（HA）の両方に結合することを示している。対照的に、それは、DTT還元により媒介される解離したHA2に結合しなかった（右）。3I14を、低pH誘導前に成熟HAに事前結合させたとき、この抗体は、DTT処理後も結合を維持し（図8、第4パネル）、これにより3I14がpH依存的なHA再構成を阻害することが示された（図8、下）。加えて、E730 Ab（抗HA1）の結合がDTT処理後に維持されたことから（図8、下）、3I14の事前結合はHA1-HA2の解離を防止した。これらのデータから、我々は、HAステムエピトープに結合する3I14がHA0切断およびpH依存的立体構造変化を阻害すると結論付ける。

【 0 1 9 5 】

実施例8：3I14 IgG1は表面発現されたH3-A268およびH3-BR07における低pHにより誘導される立体構造再構成を防止する

表面発現H3の立体構造再構成を、3I14（塗りつぶしバー）およびヘッド結合対照mAb E730（白抜きバー）のFACS染色によって検出した（図8）。様々な立体構造が、対応するグラフの上に示されており、これらは以下の通りである：未切断前駆体（HA0）；トリプシン活性化、切断（HA）；低pH誘導、切断（pH4.9）；およびDTT還元、三量体HA2（tHA2）。結合は、未処理HA（HA0）への結合に対する比率で表されている。抗体阻害アッセイにおいて、H3を、切断されたHAをpH4.9に曝露する前に、mAbなしで、3I14で、または対照Ab、Fm-6で前処理した。データは、3回の独立した実験の平均±SDを表わしている。

【0196】

図8に示されるように、3I14は、トリプシン活性化および低pH誘導の後に未切断HA前駆体（HA0）および成熟形態（HA）の両方に結合したが、DTT還元によって媒介される解離したHA2には結合しなかった。3I14を低pH誘導前に成熟HAに事前結合させた場合、この抗体は、DTT処理後も結合状態を維持し、これにより3I14がpH依存的なHA再構成およびその後の膜融合を阻害することが示された。加えて、DTT処理後もE730 Ab（抗HA1）の結合が維持されたことから、3I14の事前結合は、HA2からのHA1の解離を防いだ。

【0197】

MDCK細胞に、全長組み換えインフルエンザA型pcDNA3.1-H3-A268およびH3-BR07プラスミドをトランスフェクトした。約30時間のトランスフェクトの後、0.2% EDTA/PBSを用いて細胞をプラスチック支持材から剥離した。異なるHA構造形態および立体構造に対するmAbの結合を測定するために、細胞サンプルを分け、各処理工程の後に3I14またはE730 IgG1（抗H3ヘッド）で染色した。その後、剥離した細胞を、室温で5分間、トリプシン（TrypLE（商標） Select Enzyme, Gibco）で処理し、1% BSA/PBSで洗浄し、そしてクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液pH 4.9中で15分間インキュベートし、洗浄し、次いでPBS中50 mMジチオトレイトール（DTT）と共に室温で20分間インキュベートした。あるいは、低pH工程の前に、5 μgの3I14またはFm-6 IgG1を添加した。その後の処理を行ったサンプルを、APC結合抗ヒトFc（BioLegend, Inc.）で染色した。染色した細胞を、BD FACSAria（商標）IIおよびFACS Divaソフトウェアを用いて分析した（Becton Dickinson）。

【0198】

実施例9：3I14はFc依存的なウイルスクリアランスを媒介する

抗ステムbnAbは、mAb媒介抗ウイルスクリアランスの主要機構であると考えられる、インフルエンザウイルス感染細胞のFc R依存的細胞傷害性を効果的に媒介することが報告されている³¹。3I14および他の抗ステムbnAbによる抗体依存的細胞傷害性（ADCC）の特性を調査するため、我々は、標的としてのHA発現293T細胞と共にヒトFc IIIaおよび活性化T細胞核因子（NFAT）誘導ルシフェラーゼを安定的に発現する改変Jurkatエフェクター細胞³²を用いてインビトロで代理レポーターベースのADCCアッセイを行った。H3発現293T標的細胞とのインキュベート後、3I14は、Jurkatレポーター細胞において用量依存的な様式かつFI6v3、CR9114、39.29およびグループ2 mAb CR8020を含む他の抗ステムbnAbに匹敵するレベルで有意なルシフェラーゼ反応を誘導した（図9）。このアッセイの特異性は、抗グループ1 mAb、F10からの応答の欠如によって実証された。3I14はまた、H5発現293T細胞に対するルシフェラーゼ反応を特異的に誘導したが、それはFI6v3、CR9114、39.29およびF10よりも低レベルであった。我々は、H5発現293T標的細胞に対するCR8020の低い反応性を観察した（図9）。これらのデータは、3I14がインビボ保護のためのFc依存的免疫媒介機構にも関与する可能性を示している。

【0199】

実施例10. 3I14はH3またはH5への結合に関して他の抗ストークbnAb、FI6、CR9114、39.29、F10およびCR8020と交差競合する

ELISAプレートに固定化された5 μg/mlのH3-BR07またはH5-VN04タンパク質を、80 nM ~ 0.3 nMの範囲の3I14 Fabの2倍連続希釈物と共にインキュベートし、5 nMの他のscFvFc Abと混合した。1時間の共インキュベートの後、scFvFc Abの結合を、HRP結合抗ヒトCH2抗体を用いて検出した。3I14 Fabは、H3-BR07への結合に関して、CR8020、CR9114、FI6および39.29を含む他の抗ストークAbと交差競合したが、抗HA1抗体であるE730とは競合しなかった（図10A~D）。3I14はまた、H5-VN04に対する39.29およびF10の結合を阻害したが、抗ヘッド抗体、2Aの結合は阻害しなかった（図10E~F）。これらの結果は、3I14が、他の抗ストークbnAbの公知のエピトープと重複するまたはそれに非常に近いHAステム領域内のエピトープを標的化することを示唆している。

【0200】

実施例11. インビトロでの構造ベースの親和性成熟

H3およびH5に対する不均衡な結合強度の分子的基础を特徴づけるためおよびH5N1株に対

10

20

30

40

50

して改善された親和性を有するよう3I14を改変するため、我々は、最初に、3I14構造のインシリコシミュレーションのために抗体構造予測プログラムBioLuminate³³を使用した。3I14モデルと他の3つのIGHV3-30 bnAb、FI6v3、39.29およびMAb 3.1の重ね合わせが、図12Bに示されている。これらの抗体間の主要な相違点が、HAと接触するループ構造を形成するFI6v3の長鎖LCDR1を除いて、HCDR3の立体構造であることが明らかである。

【0201】

次に、この3I14モデルを、RosettaDockサーバを用いてH3三量体構造とドッキングさせた³⁴。3I14は、H3およびH5への結合に関してFI6v3および39.29と競合し、MAb 3.1は、FI6v3および39.29と同じ保存されたエピトープを占有するので¹⁸、我々は、3I14が、FI6v3、39.29およびMAb 3.1と類似のH3/H5と相互作用する結合スキームを採用しているという仮説をたてた。これらの3つのAb-HA共結晶構造において、HCDR3は、融合ペプチドおよびヘリックスAと共に疎水性コアの形成に重要な役割を果たしている^{15,17,18}。HAとの有意な相互作用を行うのではなく、HCDR1およびHCDR2は、結合を促進するようHCDR3ループを安定化するのである。親水性軽鎖CDR残基もまたHAと相互作用し疎水性コアを取り囲むが、軽鎖の配向は保存されておらず、結合に関与する残基でもない。これらの観察は、軽鎖が主としてHCDR3をエピトープと相互作用するのに最適な位置に向けることによって結合に寄与していることを示唆している。

【0202】

これらの解析された共結晶構造に基づき、我々は、1000個のデコイから3I14/H3（図13B）および3I14/H5複合体（示さず）の最も類似する結合モデルを選択する。なぜ3I14がH5よりも強くH3/H1に結合するのかを理解するため、2つの複合体の境界面の徹底的な分析を行った（表5）。エネルギー計算³⁵は、塩架橋を形成し得る3I14軽鎖のD94とH3モデルのK39の間の非常に好ましい結合への貢献を示し、一方E39は、H5/3I14モデルにおいては電気的反発によりD94から回転して離れ、H5への結合に関しては好ましくないかもしれない（図13C）。H5に加えて、E39アミノ酸変化もまた、グループ1 H2、H6、H11およびH13株において見出される（表6）。別の決定的な変化は、H3のL38位であり、そこでこの残基はいくつかのグループ1株においてK/R38に変化している（表6）。しかし、結合への貢献は、L/K38が両モデルにおいてHCDR3残基Y104、F105およびF109と接触し、好ましい～非常に好ましい結合をする（好ましい自由エネルギー全体の約70%）ことを示しており、したがって我々はこれらの残基を両方のHAへの結合に関して正の効果をもつとみなした。

【0203】

（表5）H3/3I14およびH5/3I14境界面における接触残基

3I14	HCDR3					LCDR1		LCDR2			LCDR3
	Y10	Y10	F105	D10	F109	G31	N32	T33	N52	S53*	D94
	3	4	*	6	*	*					
H3	H18	W21	D19	D19	L38	Q42	Q42	Q42	N49		K39
		L38	L38			D46					
	I45										
H5	D19	D19	D19	D19	K38	Q42	Q42		T49	N53	E39
	I45	K38	K38		E39	D46					
		T41									
	I45										

<4 の原子間距離によって定義される接触残基、ただし、<5 および<7 の距離によって定義される、それぞれ、H3およびH5複合体の残基D94を除く

カラースキームは、結合エネルギーに対する貢献を示している：非常に好ましい（赤色）、好ましい（オレンジ色）、どちらでもない（青色）および好ましくない（黒色）

* 残基は、生殖系列によりコードされる残基の体細胞変異を示している

【 0 2 0 4 】

（表 6）16種のHAサブタイプ間での3I14エピトープの配列比較

グループ	菌株	K _d [*] (nM)	CR9114に対する 相対K _d ^{**}	融合ペプチド							ヘリックスA									
				18	19	20	21	36	38	39	41	42	45	46	49	53				
グループ1	H1-GA09	0.28	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	T	N				
	H1-S108	0.03	-	V	D	G	W	A	G	K	T	Q	I	N	T	N				
	H1-PR8	0.08	-	I	D	G	W	A	Q	K	T	Q	I	N	T	N				
	H2-IP57	-	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	F	D	T	N				
	H5-VN04	1.02	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N				
	H5-IN05	1.05	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N				
	H6-NY98	-	-	V	D	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N				
	H11-MEM74	-	-	I	N	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N				
	H13-MD77	-	-	I	N	G	W	A	K	E	T	Q	I	D	T	N				
	H16-SE06	-	> 20 nM	I	N	G	W	A	K	A	T	Q	I	D	T	N				
	H8-ON88	-	-	I	D	G	W	A	Q	K	T	Q	I	D	T	N				
	H9-HK99	5.23	-	V	A	G	W	A	R	D	T	Q	I	D	T	N				
	H12-AS76	-	> 2.9 nM	V	A	G	W	A	R	D	T	Q	I	D	T	N				
グループ2	H3-PE09	0.26	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N				
	H3-UY07	0.18	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N				
	H3-VIC11	0.33	-	V	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N				
	H4-NL05	0.29	-	I	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N				
	H14-AS82	0.29	-	I	D	G	W	A	L	K	T	Q	I	D	N	N				
	H7-NL219	0.03	-	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N				
	H7-AH13	0.67	-	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N				
	H10-SE02	-	-	V	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N				
	H15-WA79	-	< 10 nM	I	D	G	W	A	Y	K	T	Q	I	D	T	N				

* 表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサによって決定されたK_d（図1B） ** フローサイトメトリー（図2）および参考文献16によって決定された相対K_d

正に荷電した側鎖を有する残基はオレンジ色で示され、負に荷電した側鎖の残基は青色で示されている

【 0 2 0 5 】

実施例12：H3三量体モデルのストークにおける3I14エピトープの構造

図13は、H3のストーク上の3I14エピトープの概略図である。この図において、3I14の重鎖は青色で示され、軽鎖はマゼンダ色で示されている。H3三量体のストークは、サーモン色、緑色およびシアン色で着色されている。残基の番号は、全体にわたってH3またはAb配列に基づいている。

【 0 2 0 6 】

3I14/H3のドッキング

RosettaDockを我々のLinux機にインストールされたスタンドアローンソフトウェアとして用いて、3I14モデルをH3三量体構造とドッキングさせた。RosettaDockは、局所的な高解像度のドッキングを扱うならびに追加の回転異性体およびループ再構成を可能にするその能力から選択した。3I14モデルを、ドッキングの前に、H3/39.29複合体構造内の39.29に重ね合わせた。追加の側鎖回転異性体を加え、高解像度のみプロトコルを実行した。1000個のデコイを生成し、最高スコアのクラスター化モデルを、PyMolを用いて完全に分析した。3I14はH3への結合に関してFI6と競合するので、我々は、3I14が、39.29、FI6およびMab3.1と同じ、H3と相互作用するスキームを採用しているという仮説をたてた。したがって、最終モデルを選択する際に、以下の基準を適用した：HCDR3とH3のHA2の融合ペプチドおよびヘリックスA上の疎水性残基が境界面で疎水性コアを形成するよう近接していなければならない；HCDR2とHCDR1残基が他の複合体としてHCDR3と同様の相互作用を行う；軽鎖CDRは主としてH3と親水性相互作用を行う。1000個のデコイ中の上位10個のモデルの中で、6つのモデルが、これらの基準に合致し、それらは相互に非常に類似している。したがって、この6つの中の最高スコアを有するものをさらなる分析のために選択した。

【 0 2 0 7 】

実施例13：H3/3I14およびH5/3I14モデルの配列アラインメントおよび構造重ね合わせ

図14Aは、H3、H5およびインフルエンザB型のステムエピトープの配列アラインメントを示している。図14Bは、残基38および39におけるH3/3I14およびH5/3I14モデルの構造重ね

合わせを示している。H3はシアン色で示され、H5は黄色で示され；H3/3I14モデル由来の3I14は青色（重鎖）および黄色（軽鎖）で示され、H5/3I14モデル由来の3I14はオレンジ色で示されている。H3残基Leu38およびLys39が標識されている。重鎖由来の残基F100Fおよび軽鎖由来のD93は、それぞれ38および39と相互作用し、これらも標識されている。

【0208】

3I14/H5のドッキング

H5/3I14およびインフルエンザB型/3I14複合体を、3I14/H3複合体と同じ方法でモデル化した。3I14モデルおよびH5三量体またはH3三量体の両方をH3/39.29複合体構造に重ね合わせ、この2つの構造ファイルを合成して、ドッキングのための初期モデルとして1つの3I14/H5複合体または3I14/インフルエンザB型複合体にした。興味深いことに、H3/3I14複合体モデルで選択されたのと類似のモデルが、H5/3I14およびインフルエンザB型/3I14複合体の両方における最良のモデルの中に含まれている。したがって、これらの類似モデルを、さらなる分析のための最終モデルとして選択した。

【0209】

より良いH5結合のための3I14の改変

なぜ3I14がH5よりも強くH3に結合するのかを理解するため、H3/3I14およびH5/3I14境界面の完全な分析を行った。すべてのエピトープ残基の配列アラインメントは、最も決定的な変化が、H3のL38-K39がH5ではK38-39Eになっていることであることを示した（図14A）。L38は、H3/3I14モデルにおける疎水性コアの一部であり、それは3I14のHCDR3由来のF100Fと相互作用する（図14B）。驚くべきことに、H5/3I14モデルにおけるK38は、荷電アミン基を溶媒の方に向け、脂肪族鎖をF100Fに面した状態で維持することによって、同じ接触点を形成することができる。このモデルによれば、この変異は、結合親和性に影響を及ぼすことができるように見えない。対照的に、K39は、H3/3I14モデルにおいて3I14の軽鎖由来のD94と接触し、E39はH5/3I14モデルにおいて電気的反発によりD94から回転して離れている。（図14B）。明らかに、K39E変異は、H5結合に好ましくなく、おそらくこれは、3I14がH3に対するよりもH5に対してより弱い結合性を有している理由である。この仮説を試験するため、異なるサブタイプ由来のHAの38～39位の残基を、3I14に結合するそれらの能力と比較して試験した。L38およびK39を有するHAは3I14に強く結合し、K38およびE39を有するHAはより弱く結合するという強い相関を明らかにすることができる。まとめると、我々は、3I14の軽鎖におけるD94K変異がH5に対する3I14の結合指向性を反転させ、H3に対する結合親和性を低下させるという仮説を提案する。加えて、我々は、D94N 3I14変種がH3およびH5の両方に同等に結合するという仮説を提案する。我々は、その相互作用における主要な推進力がHCDR3からの疎水性相互作用であるので、D94N変異がH3結合を弱めるとは考えていない。この位置での相互作用が反発的なものでない限り、それは親和性に有意に影響しないはずである。

【0210】

実施例14：組み換えH5-VN04（A）およびH3-PE09（B）に対する3I14 WTおよびVLD94N変異IgG1の結合（Kd値）

3I14 VLD94N変種はH5に対する結合および中和活性を改善する

E39およびD94の提唱された反発効果を除くため、我々は、この部位において負の電荷を喪失させる単一のAspからAsnへの（DからNへの）変異がH3およびH5の両方に対して等しく結合させるであろうという仮説をたてた。この構造ベースの改変を試験するため、我々は最初に、WT 3I14およびVLD94N変種IgG1の両方の結合親和性を評価した。表3に示されるように、VLD94N変種は、H5に対する結合親和性を10倍近く増加させたが、H3に対する結合についてはいかなる変化ももたらさなかった。興味深いことに、H5に対するより高い親和性はまた、結合速度は等しいが解離速度が低下したことに起因するものであった（表7および図15）。

【0211】

（表7）3I14 VLD94N変種の結合親和性

3I14	H5-VN04			H3-PE09		
変種	K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_d (nM)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})
3I14 WT	1.02	$3.27E+05$	$3.87E-04$	0.263	$1.52E+05$	$3.99E-05$
3I14 VLD94N	0.187	$3.83E+05$	$7.74E-05$	0.308	$1.77E+05$	$5.44E-05$

【 0 2 1 2 】

我々はまた、H5偽型またはH3感染性ウイルスに対する3I14 VLD94N変種の活性を評価するため、中和アッセイを行った（図16Cおよび16D）。3I14と比較して、VLD94N変種は、10倍高い効力でH5-VN04偽型ウイルスを中和した（ IC_{50} : 8.65 ng ml^{-1} 対 81.58 ng ml^{-1} ）（図16C）。その際、VLD94N変種のH3-BR07に対する中和活性は、インタクトなままであった（ IC_{50} : 336.6 ng ml^{-1} 対 305.4 ng ml^{-1} ）（図16D）。これらの結果は、最適化された3I14 VLD94N変種が、H3に対するその効果を維持しつつH5に対する結合および中和能力を増加させることを示している。

【 0 2 1 3 】

さらなる実験は、3I14が1.96 nMの K_d 値でH3-PE09に結合し、H3-PE09に対する3I14 VLD94N変異体の親和性は同様である（平均 K_d = 2.34 nM）を示した。D94N変異は、H3結合を弱めず、H5に対する結合親和性を増加させる（図15Aおよび15B）。

【 0 2 1 4 】

実施例15：3I14 WTおよびVLD94N変異IgG1は、偽型ウイルスH5N1-VN04および感染性ウイルスH3N2-BR07を中和する

図16は、H5N1-VN04およびH3N2-BR07感染性ウイルスの中和を示すグラフ集である。3I14 WT（黒色）およびVLD94N変異体（赤色）は、偽型ウイルスH5N1-VN04（A）およびH3N2 BR07ウイルス（B）を中和した。抗グループ1 mAb F10（青色）を対照として使用した。これらのデータは、2～3回の独立した実験の平均中和価を表している。

【 0 2 1 5 】

3I14 VLD94N変異IgG1は、3I14 WTより高い IC_{50} 値で偽型ウイルスH5N1-VN04を中和し、それはまた同様の IC_{50} 値でH3N2ウイルスを中和した。

【 0 2 1 6 】

実施例16：H5に対する結合性が増加した3I14変種の単離のための改変酵母ディスプレイ

7つの酵母ディスプレイライブラリを、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3およびLCDR4の残基を無作為化することによって作製した。これらの酵母ディスプレイライブラリを使用して、選択され酵母ディスプレイベクターpCTCON2にクローン化される単鎖3I14変種のプールを生成した。単離されたコンストラクトは、提示のマーカーとして機能するよう抗体のC末端にc-Mycタグを有するであろう。抗体発現および表面ディスプレイは、このライブラリを20で24～48時間、SGCAA培地中で成長させることによって誘導され得る。3I14変種の提示の成功は、抗c-Myc FITC標識によって検出され得る。H5 HAが、蛍光標識で標識され、染色のために1時間添加され得る。未結合の試薬は、洗い流され得、標識されたライブラリが、H5 HA陽性クローンについて選別され得る。

【 0 2 1 7 】

図18に示されるように、3I14 WT酵母およびCDRライブラリの両方が、FACS分析によって示されるよう、C-mycおよびH5について陽性であった。二重陽性H5およびc-myc陽性集団は、3I14-WT酵母ライブラリとの比較で、3I14酵母CDRライブラリにおいて0.039%～0.090%に増加した。

【 0 2 1 8 】

さらなる研究において、陽性クローンは、陽性集団を濃縮するために成長させ、さらに3回選別され得る。陽性クローンは、FACS分析によって検証され、配列決定によって同定され得る。FACS選別と組み合わせた酵母ディスプレイは、抗体エンジニアリングにおける成功が実証されており、インフルエンザB型 HAに結合することができる3I14変種クローンを単離するために使用され得る。インフルエンザB型 HAに対する最初の結合体が同定された後、その後のスクリーニング周回は、複数色選別を用いて実施され得る、すなわち、H3、H5およびインフルエンザB型 HAが、異なる蛍光標識で標識され得、三重陽性3I14変種が

選別され得る。

【 0 2 1 9 】

実施例17：エピトープマッピングおよび結合の競合

3I14認識におけるHAのエピトープを調査するため、我々は、Octet（登録商標）RED96機器においてHAまたはHA1サブユニットのいずれかの全長に対するその結合活性を評価した。3I14は、三量体全長H3株、A/パース/16/09（PE-09）に結合したが、そのHA1サブユニットには結合しなかった（図19）。我々はさらに、3I14と他のステム指向性bnAb：F16v3、CR9114、39.29、F10およびCR8020の間で結合競合アッセイを実施した（図2）。3I14 Fabは、H3-BR07に対する他の抗ステムAb CR9114、F16v3および39.29の結合を強く阻害するが、ヘッド指向性抗H3 mAb E730（未公開の抗体配列）は阻害しない（図10）。3I14はまた、より膜に近接するエピトープに対するCR8020と競合する14。3I14は、H5-VN04に対する39.29およびF10の結合を部分的に阻害するが、抗H5ヘッド抗体2A12の結合は阻害しない（図2e、f）。これらの結果は、3I14が、他のbnAbの既知のステムエピトープと重複するまたはそれに非常に近いことを実証している。加えて、3I14は、H3の強力な阻害剤であり、H5の穏やかな阻害剤である。これらの結果は、H3およびH5に対する3I14の結合の親和性測定と一致する。

10

【 0 2 2 0 】

実施例18：材料および方法

細胞

最近の季節性インフルエンザワクチン接種を受けていないことが報告された7名の健康な成人の新鮮なPBMCを、IRBによって承認されたヒトプロトコルの下で、2012年12月にDFCI Kraft Family Blood Donor Centerにおいて白血球アフェレーシスの間に回収された廃棄「カラー」を用いて入手した。メイディン・ダービー・イヌ腎臓（MDCK）細胞、293Tおよび293F細胞を、American Type Culture collection（Manassas, VA, USA）から入手した。

20

【 0 2 2 1 】

組み換えヘマグルチニンの調製

H3（A/ブリスベン/10/2007）の細胞外ドメイン、残基17～531を、Avitag（アミノ酸配列：GGGLNDIIEAQKIEWHE）、トロンピン切断部位、三量体化T4フィブリチン折り畳みドメインおよび6つのヒスチジン残基を含むC末端ペプチドを含む融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質H3-ATTHを、293F細胞から発現させ、Ni-NTA親和性クロマトグラフィーによって上清から精製した。精製された組み換えHAタンパク質を、製造元の指示にしたがい、トロンピン酵素（Novagen, Darmstadt, Germany）によって切断し、次いでBirA酵素（Avidity, Aurora, CO）を用いてピオチニル化した。

30

【 0 2 2 2 】

A/ニューヨーク/18/09（H1-NY09）、A/テキサス/05/09（H1-TX09）、A/日本/305/57（H2-JP57）、A/愛知/2/68（H3-A2/68）、A/ブリスベン/10/07（H3-BR07）、A/オランダ/2/2005（H4-NL05）、A/ベトナム/1203/04（H5-VN04）、A/香港/1073/99（H5-HK99）、A/ニワトリ/ニューヨーク/14677-13/98（H6-NY98）、A/オランダ/219/03（H7-NL219）、A/シチメンチョウ/オンタリオ/6118/68（H8-ON68）、A/香港/1073/99（H9-HK99）、A/アヒル/メソフィス/546/74（H11-MEM74）、A/アヒル/アルバータ/60/76（H12-AB76）、A/マガモ/アストラハン/263/1982（H14-AS82）、A/ミズナギドリ/西オーストラリア/2576/79（H15-WA79）およびA/ユリカモメ/スウェーデン/2/99（H16-SE06）の全長HA遺伝子を、pcDNA3.1ベクターにクローン化し、293T/17細胞にトランスフェクトし、HAを表面発現する細胞を製作した。

40

【 0 2 2 3 】

H1サブタイプA/カリフォルニア/04/09（H1-CA09）、A/ソロモン諸島/3/06（H1-SI06）およびA/プエルトリコ/8/34（H1-PR8）；H3 A/パース/16/09（H3-PE09）、A/ウルグアイ/716/07（H3-UY07）およびA/ビクトリア/341/11（H3-VIC11）；H5 A/ベトナム/1203/04（H5-VN04）およびA/インドネシア/05/05（H5-ID05）；H7 A/オランダ/219/03（H7-NL219）

50

、A/カナダ/RV444/04 (H7-CA444) およびA/安徽/1/13 (H7-AH13) ; H9 A/香港/1073/99 (H9-HK99) の組み換え全長HAタンパク質を、NIH BEIR Repository (NIH, Manassas, VA) から入手した。サブタイプH4 A/マガモ/オランダ/2/05 (H4-NL05) およびH14 A/マガモ/アストラハン/263/82 (H14-AS82) の組み換え全長HAを、R.C.Liddington博士 (Burnham Institute for Medical Research, CA, USA) からの好意により授受した。

【 0 2 2 4 】

インフルエンザウイルスおよびHA偽型ウイルスの調製

野生型インフルエンザウイルスA/カリフォルニア/4/09 (H1N1-CA09)、A/プエルトリコ/8/34 (H1N1-PR8)、A/パース/16/09 (H3N2-PE09)、A/愛知/2/68 (H3N2-A2/68)、A/香港/8/68 (H3N2-HK68)、A/シドニー/5/97 (H3N2-SY97)、A/ブリスベン/10/07 (H3N2-BR07)、A/ウィスコンシン/67/05 (HA,NA) x A/プエルトリコ/8/34 (H3N2)、A/愛知/2/68 (HA,NA) x A/プエルトリコ/8/34 (H3N2) およびA/南昌/993/95 (H3N2-NC95) を、NIH BEIR Repository (NIH, Manassas, VA) から入手し、標準的なウイルス培養技術によりメイディン・ダービー・イヌ腎臓 (MDCK) 細胞中で成長させた。動物チャレンジ研究で使

10

用したA/ブリスベン/10/2007-ma (H3N2) は、PR8再集合体ウイルスx-171由来のマウス適合ウイルスである⁴⁶。

【 0 2 2 5 】

A/ベトナム/1203/04 (H5-VN04)、A/香港/156/97 (H5-HK97)、A/オランダ/219/07 (H7-NL219)、A/FPV/ロストック/1934 (H7-FPV) の全長HA遺伝子およびH5-VN04のノイラミニダーゼ遺伝子N1 (GenbankアクセッションAAW80723) を、個別にpcDNA3.1プラスミドにクローン化した。Env偽型ルシフェラーゼレポーターウイルスを、以前に記載されたようにして293T/17細胞において産生させた¹²。簡潔に説明すると、pcDNA3.1-H5-VN04、H5-HK97、H7-NL219またはH7-FPVプラスミドを個別に、N1発現プラスミドpcDNA3.1-N1-VN04、HIVパッケージングベクターpCMVR8.2およびレポーターベクターpHIV-Lucを用いて293T/17細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後にウイルス上清を収集した。ウイルス価を、POLARstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) を用いてルシフェラーゼ活性を測定することによって評価した。

20

【 0 2 2 6 】

H3結合記憶細胞のFACS選別

新鮮なPBMcを、Ficoll-Paque勾配 (GE HealthCare) の使用によって回収した血液から単離した。CD19⁺/CD27⁺ B細胞を、ビオチニル化H3-ATTHおよびアロフィコシアニン (APC) 標識ストレプトアビジンを用いて染色した。単一のH3反応性記憶B細胞を、384ウェルプレートに選別した。14日間増殖させた後、その上清を、組み換えH1 (H1-CA09)、H3 (H3-BR07) およびH7 (H7-CA444) HAタンパク質に対する反応性について試験し、Meso Scale Discovery multiplex (MSD, Rockville, Maryland) によって分析した。その後、反応性の上清を、H3N2-BR07に対するインビトロ中和活性について測定した。すべてのH3N2中和抗体を、以前に記載されたプライマーを用いる単一細胞RT-PCRによって回復させた⁴⁷。

30

【 0 2 2 7 】

3I14 scFvおよびIgG抗体の発現および精製

我々は、高速一工程クローニング手順を使用して、最初に3I14 Abを、ヒトIgG1のヒンジ、CH₂およびCH₃ドメインとの融合産物としてscFvを生成するpcDNA3.1-Hinge scFvFcミニボディ発現ベクターに移動させた¹²。精製された3I14 scFvFcを使用して、複数のHAおよび異なるサブタイプのウイルスに対する結合および中和活性を評価した (図1A~Bおよび図2)。総ヒトIgG1のために、scFvの遺伝子フラグメントを個別にヒトIgG1発現ベクターTCAE6にサブクローン化した⁴⁸。scFvFcまたはIgG1を、一過的トランスフェクションによって293F細胞において発現させ、プロテインAセファロース親和性クロマトグラフィーによって精製した。

40

【 0 2 2 8 】

速度論およびK_dの決定

我々は、高速一工程クローニング手順を使用して、最初に3I14 Abを、ヒトIgG1のヒン

50

ジ、CH₂およびCH₃ドメインとの融合産物としてscFvを生成するpcDNA3.1-Hinge scFvFcミニボディ発現ベクターに移動させた¹²。精製された3I14 scFvFcを使用して、複数のHAおよび異なるサブタイプのウイルスに対する結合および中和活性を評価した（図1A～Bおよび図2）。総ヒトIgG1のために、scFvの遺伝子フラグメントを個別にヒトIgG1発現ベクターTCAE6にサブクローン化した⁴⁸。scFvFcまたはIgG1を、一過的トランスフェクションによって293F細胞において発現させ、プロテインAセファロース親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【0229】

マイクロ中和アッセイ

実験の前に、MDCK細胞（ウェルあたり 1.5×10^4 個の細胞）を96ウェル組織培養プレートに播種し、PBSで2回洗浄し、その後に2 μ g/mLトリプシンおよび0.5%BSAを補充したDME M培地中でインキュベートした。96ウェルプレートにおいて、100 TCID₅₀（50%組織培養物感染量）のウイルスを、Abまたは抗体含有上清の2倍連続希釈物と等量となるよう混合し、37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、Ab・ウイルス混合物を、2連のコンフルエントなMDCK単層に移し、その後に37℃で21時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、80%アセトンで固定し、ウイルス抗原を、インフルエンザA型ウイルスヌcleoタンパク質（NP）に対するmAb（クローンA3, BE1）を用いた間接的ELISAにより検出した。

【0230】

マウスにおける予防研究

ウイルスチャレンジの24時間前に、5匹のメス8～10週齢BLAB/cマウスの接種グループに、腹腔内（i.p.）経路により、低用量（5 mg/kg⁻¹）および高用量（20または25 mg/kg⁻¹）の、それぞれ、3I14およびF10 IgG1を0.5 mL量注射した。すべてのマウスグループ（n=6）に、10 LD₅₀（半数致死量）のA/ベトナム/1203/04（H5N1）、A/ブリスベン/10/07-ma（H3N2）、A/オランダ/219/03（H7N7）またはA/安徽/1/13（H7N9）を経鼻感染させた。マウスを、ウイルスチャレンジの日に体重測定し、次いで14日間または18日間毎日、臨床的症狀について観察し、体重を記録した。初期体重に対する25%の体重減少または臨床症狀（非応答性もしくは重度の神経学的兆候、例えば後肢まひ、運動失調）指標のスコア4を、生存エンドポイントとして使用した。動物研究は、承認を受けたInstitutional Animal Care and Use Committeeのプロトコルにしたがい実施した。

【0231】

抗体結合の競合

ELISAプレート上に固定した5 μ g/mLのH3-BR07またはH5-VN04タンパク質を、80 nM～0.3 nMの範囲の3I14 Fabの2倍連続希釈物と共にインキュベートし、5 nMの他のscFvFc Abと混合した。1時間の共インキュベートの後、scFvFc Abの結合を、HRP結合抗ヒトCH₂抗体（Life Technologies, Grand Island, NY）を用いて検出し、POLARstar Omega Microplate Reader（BMG LABTECH, Ortenberg, Germany）においてSuper AquaBlue ELISA基質（ebioscience, San Diego, CA）を用いて測定した。

【0232】

トリプシン切断阻害アッセイ

0.4 μ gの組み換えH3-ヒスチジン（H3-ATTH）タンパク質を、100 μ g mL⁻¹ Trypsin-ultra（New England Biolabs, Ipswich, MA）を含むpH8.0のTris-HCl緩衝液中、2.5 μ gの3I14もしくは抗SARS Fm-6 IgG1の存在下、または抗体の非存在下、37℃でインキュベートした。トリプシン消化を、1% BSAの添加によって様々な時点で阻害した。サンプルを、還元条件下で、12%還元型SDS-PAGEゲル上を泳動させ、HisProbe-HRPおよびSuperSignal West HisProbe Kit（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を用いてプロットした。

【0233】

立体構造変化FACSアッセイ

全長組み換えインフルエンザA型pcDNA3.1-H3-A2/68およびH3-BR07プラスミドを用いて293T/17細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト後約30時間で、0.2%エチレンジ

10

20

30

40

50

アミン四酢酸 (EDTA) を用いて細胞を培養容器から剥離した。異なるHA立体構造に対する mAb の結合を測定するために、細胞サンプルを異なる処理に供し、分け、3I14 または E730 scFvFc Ab で染色した。剥離した細胞を、室温で5分間、トリプシン (Gibco, Grand Island, NY) で連続的に処理し、1% BSA/PBS で洗浄し、そしてクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.9 中で15分間インキュベートし、洗浄し、次いでPBS中50 mMジチオトレイトール (DTT) と共に室温で20分間インキュベートした。あるいは、低pH工程の前に、5 μ g の3I14 または抗SARS Ab Fm-6 IgG1 を添加した。連続処理したサンプルを、APC結合抗ヒトFc (BioLegend, San Diego, CA.) で染色した。染色した細胞を、BD FACSAria (商標) II および FACS Diva ソフトウェア (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY) を用いて分析した。

【0234】

抗体依存的細胞傷害性アッセイ

ADCC レポーターバイオアッセイは、エフェクター細胞としてFc RIIIa 受容体、V158 (高親和性) 変種およびホタルルシフェラーゼの発現を誘導するNFAT 応答エレメントを安定的に発現する改変されたJurkat 細胞を使用する (Promega)。ADCC における抗体の生物学的活性は、NFAT 経路活性化の結果として産生されるルシフェラーゼを通じて定量され；エフェクター細胞中のルシフェラーゼ活性は、蛍光の読み取りによって定量される。標的細胞として、 1×10^4 / ウェルのH3 またはH5 発現293T 細胞を、アッセイ前に平底96 ウェルプレートに付着させ、次いで培地をLow IgG Serum アッセイ緩衝液 (0.5% 低IgG FBS を含むRPMI 1640) に交換した。各ウェルに終濃度1、0.2 および0.04 μ g ml⁻¹ のscFvFc 抗体を添加した。1時間後、Low IgG Serum アッセイ緩衝液中6.0 $\times 10^4$ / ウェルのJurkat エフェクター細胞をアッセイプレートに添加し、6時間インキュベートした。上清を、300 x g での遠心分離によって回収し、Bio-Glo (商標) Luciferase Assay キット (Promega, Madison, WI) を用いてPOLARstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) により490 nm で測定した。

【0235】

図9BのさらなるADCC法についてここで説明する。このADCCアッセイは、健常なヒトドナー由来の新鮮なPBMCを用いてHA発現293T細胞上で行った。ADCC活性を、ラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) によって決定した。エフェクター細胞としての新鮮なPBMCを、Ficoll-Paque 勾配 (GE Healthcare) の使用によって回収された血液から単離した。標的細胞として、 2×10^4 / ウェルのH3 またはH5 発現293T 細胞を、アッセイ前に硬質丸底96ウェルプレートに付着させ、次いで培地をLow IgG Serum アッセイ緩衝液 (0.5% 低IgG FBS を含むRPMI 1640) と交換した。各ウェルに終濃度10、5、2.5 および1.25 μ g ml⁻¹ のscFvFc 抗体を添加した。1時間後、Low IgG Serum アッセイ緩衝液中1.2 $\times 10^5$ / ウェルのPBMCをアッセイプレートに添加し、6時間インキュベートした。上清を、300 x g での遠心分離によって回収し、LDH Cytotoxicity Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を用いてBenchmark Plus Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) により490 nm および680 nm で測定した。LDH活性を、490 nm の吸光度読み取り値から680 nm の吸光度値 (バックグラウンド) を差し引くことによって決定した。パーセント細胞傷害性を以下のように算出した：

$$\text{細胞傷害性 (\%)} = 100 \times (E - SE - ST) / (M - ST) ;$$

E、抗体を含むE/T培養物から放出されたLDH；SE、エフェクターからの自然放出LDH；ST、標的からの自然放出LDH；M、溶解させた標的からの最大放出LDH。データは、3回の独立した実験からの代表的実験を表しており、すべての試験を3連で実施した。データは、3回の独立した実験からの代表的実験を表しており、すべての試験を3連で実施した。

【0236】

配列分析

全長インフルエンザA型 HA配列を、National Center for Biotechnology データベースのInformation (NCBI) Influenza Virus Resource からダウンロードした。系統発生 (RHYML) ツリーは、Geneious ソフトウェアを用いたそれらのアミノ酸配列比較に基づくものである。新規のbnAb、3I14を、IMGT データベース (<http://imgt.cines.fr>) を用いて、生殖

10

20

30

40

50

系列遺伝子の使用、体細胞変異、Nヌクレオチド挿入ならびに同族可変重（VH）および軽（VL）鎖遺伝子対について分析した。単一または複数の生殖系列変異をその生殖系列に戻した抗体変種を合成により作製し（Genewiz, South Plainfield, NJ）、配列決定により確認した。F10、F16v3、CR9114、CR8020および39.29のVHおよびVK配列を、Protein Data Bank（PDBアクセッションコード）を通じて入手し、対応する遺伝子を合成し、一過的トランスフェクションによって発現させた。

【0237】

インシリコ構造モデリング

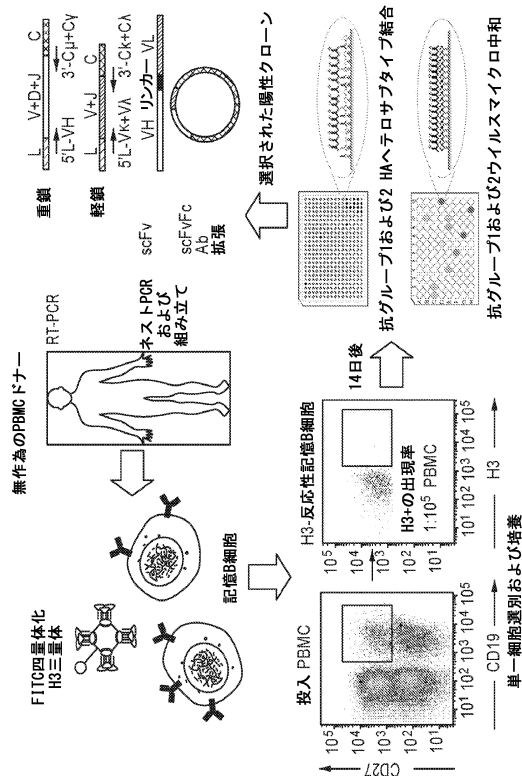
3I14を、BioLuminateの抗体モデリングモジュールを用いてホモロジーモデリングした。このモデルを、RosettaDockを用いたドッキングの前に、H3/F16複合体構造と重ね合わせた。側鎖およびループの再構成を許容する高解像度ドッキングのみを行った。各ドッキングにつき1000個のデコイを生成し、RMSD値に基づきクラスター化した。最終モデルを、クラスターのサイズおよび結果の節に記載される基準に基づき選択した。

【0238】

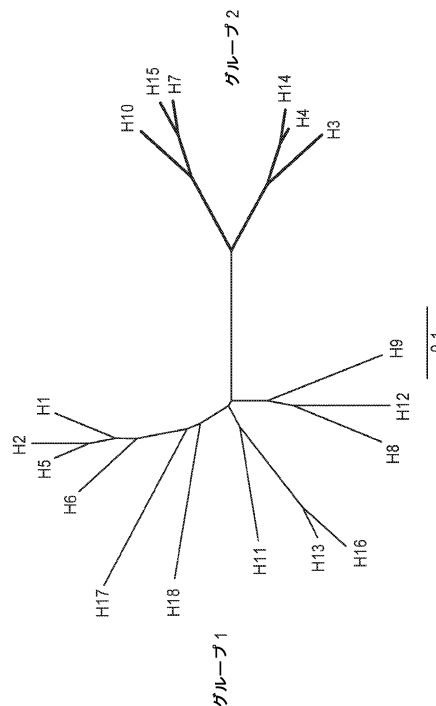
他の態様

本発明はその詳細な説明に関連して説明されてきたが、上記の説明は例示を意図したものであり、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって定義される。他の局面、利点および改変も、添付の特許請求の範囲に包含される。

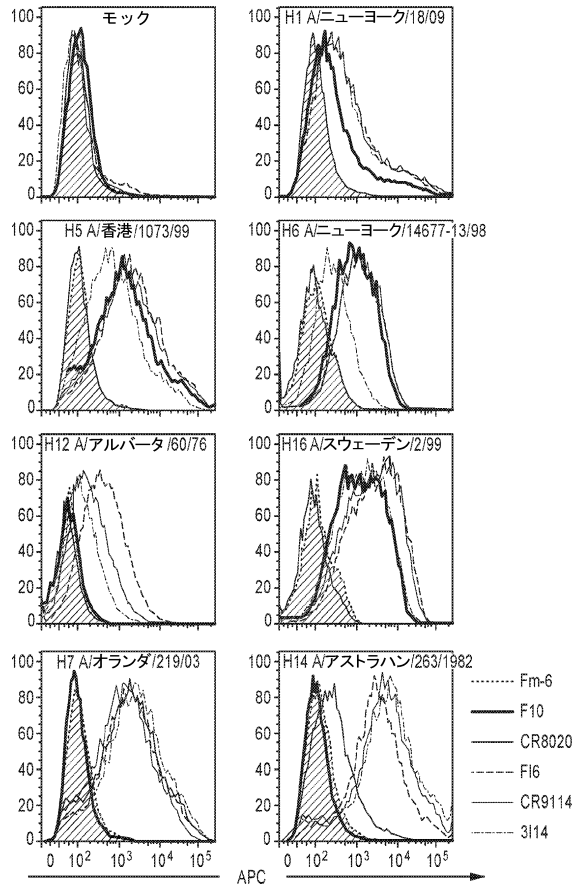
【図1A】



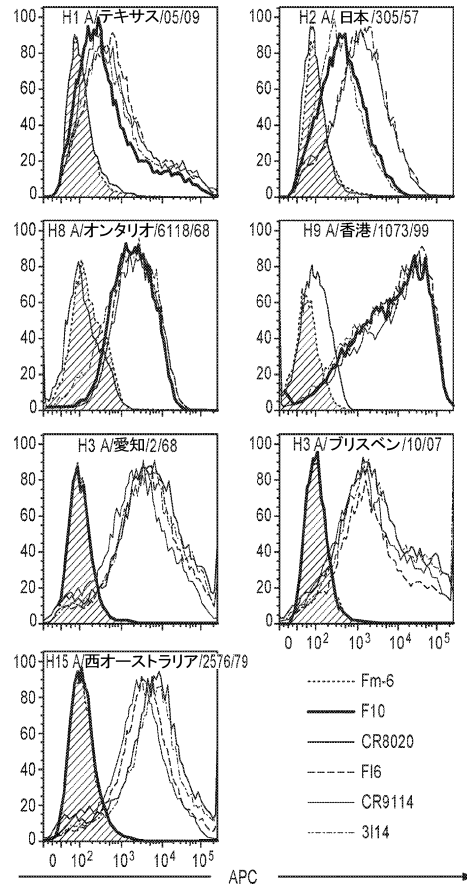
【図1B】



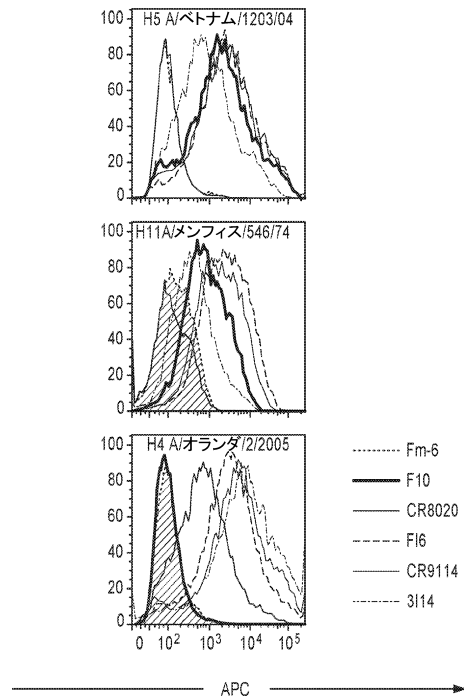
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

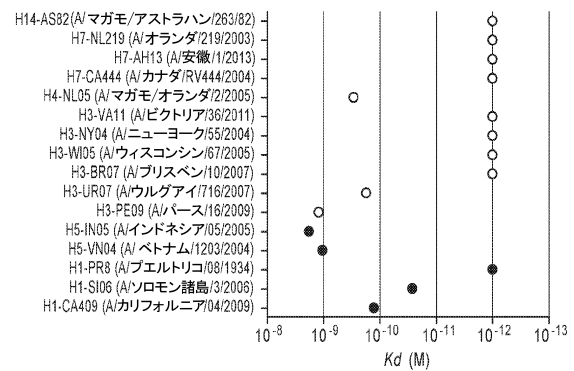


【図 2 - 3】

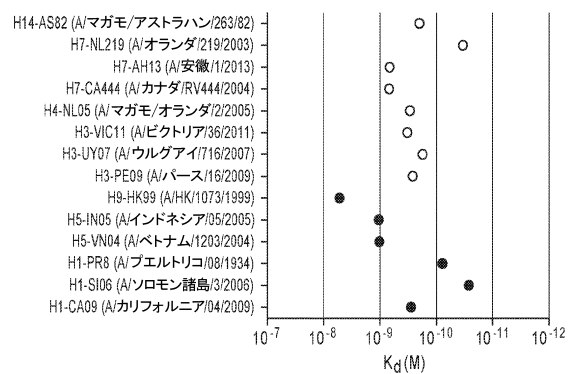


【図 3】

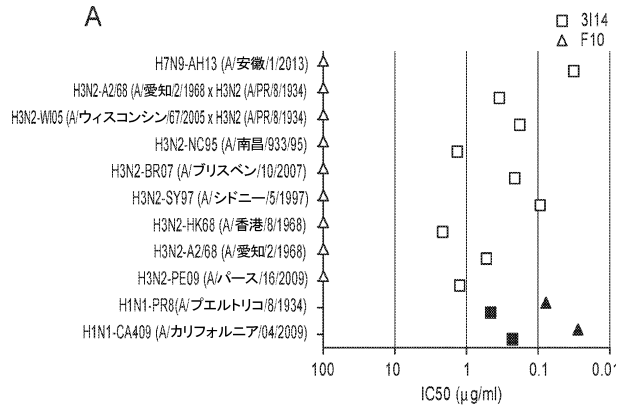
A



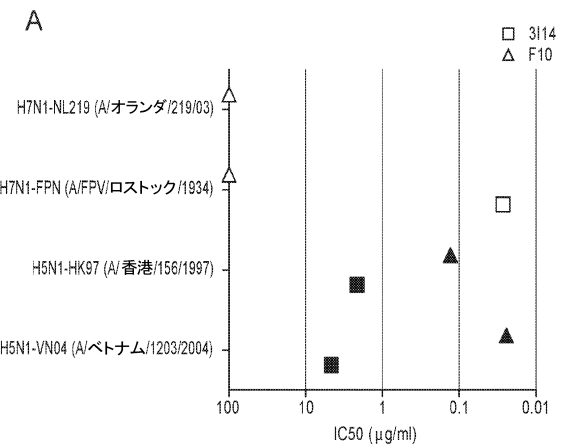
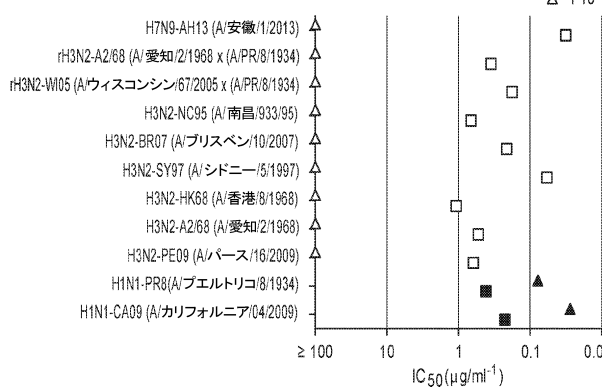
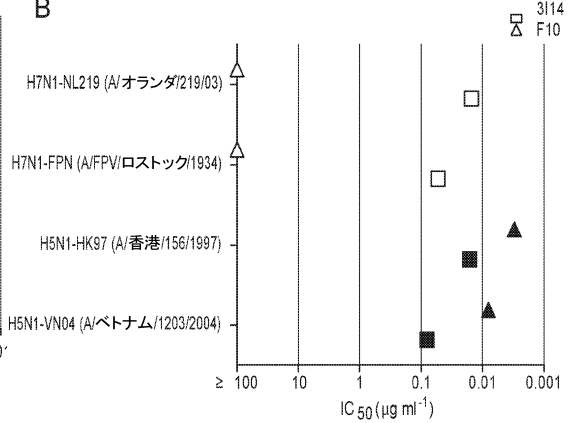
B



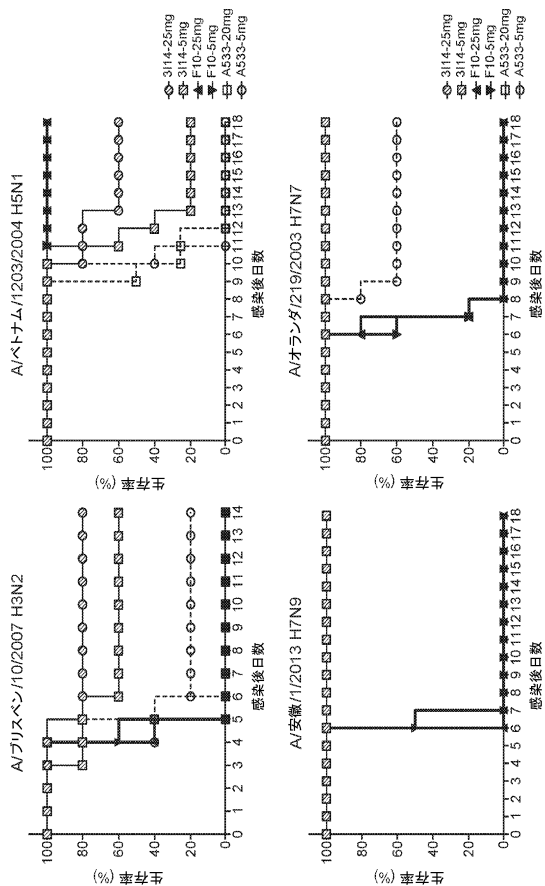
【図 4】



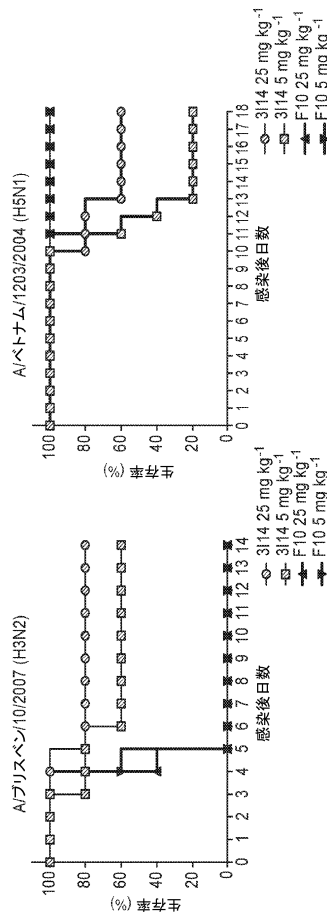
【図 5】

**B****B**

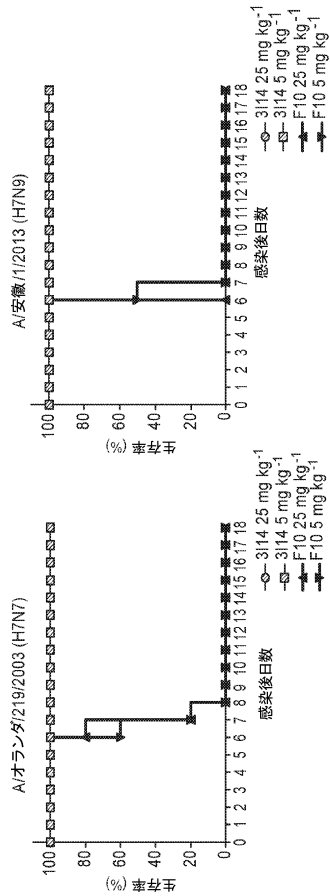
【図 6 A - 1】



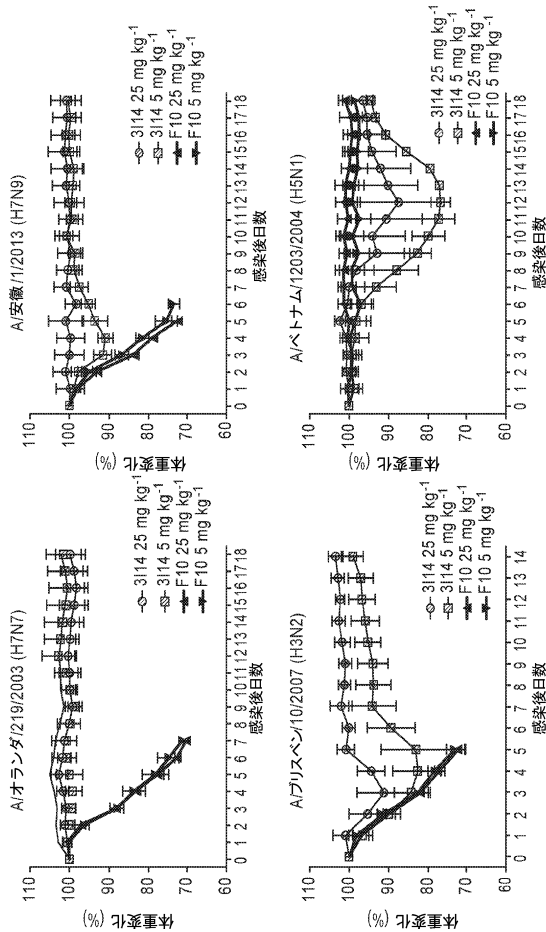
【図 6 A - 2】



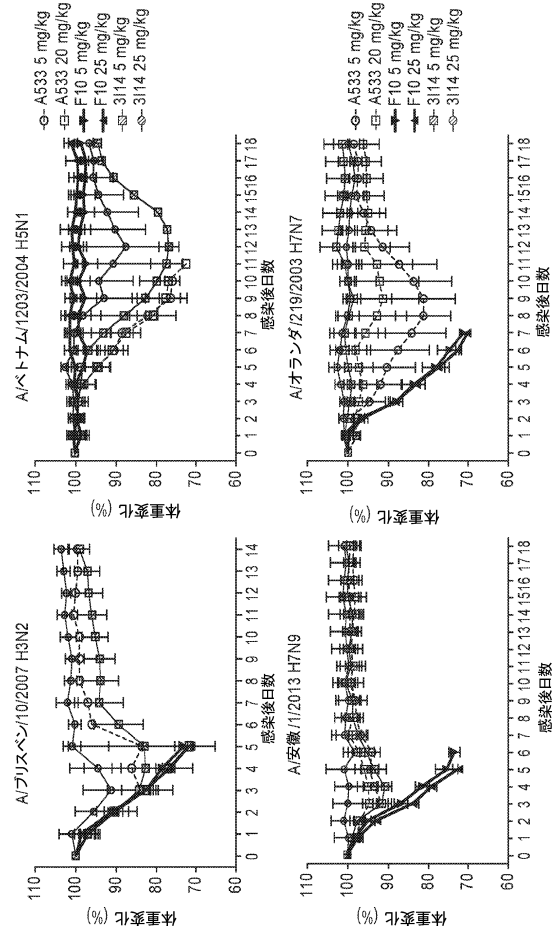
【図 6 A - 3】



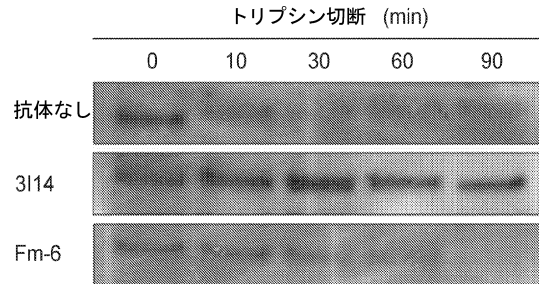
【図 6 B - 2】



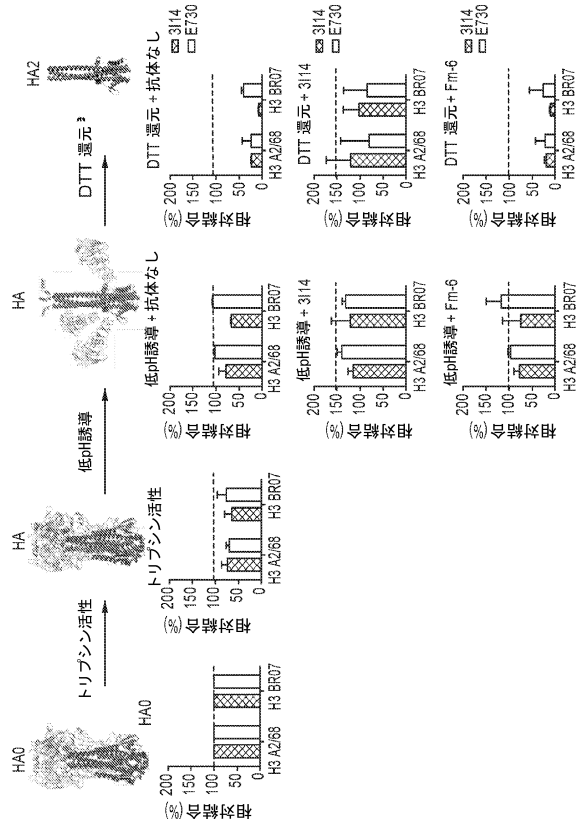
【図 6 B - 1】



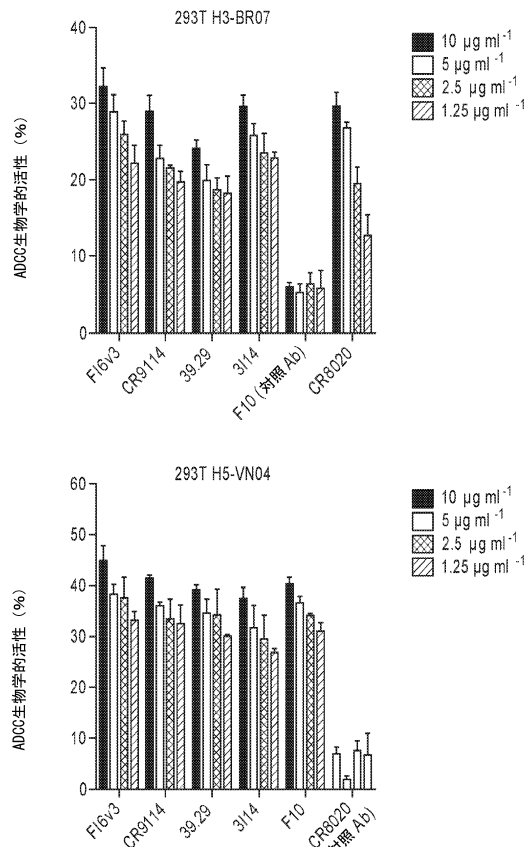
【図 7】



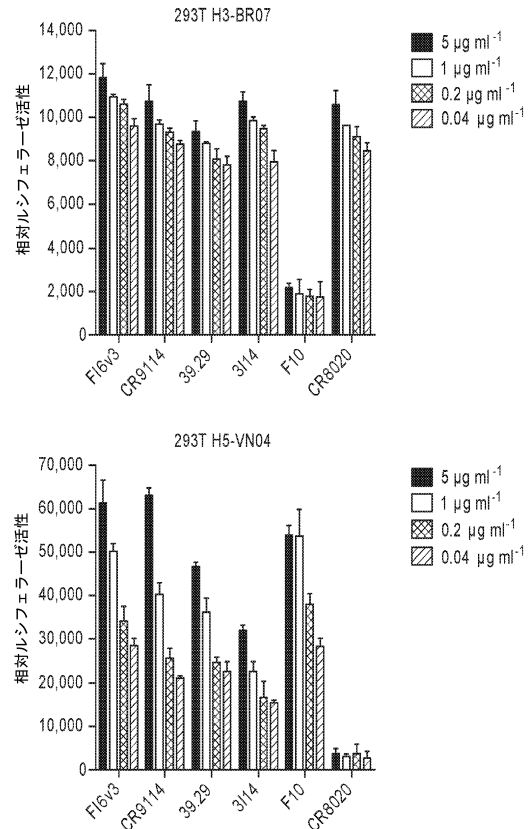
【図 8】



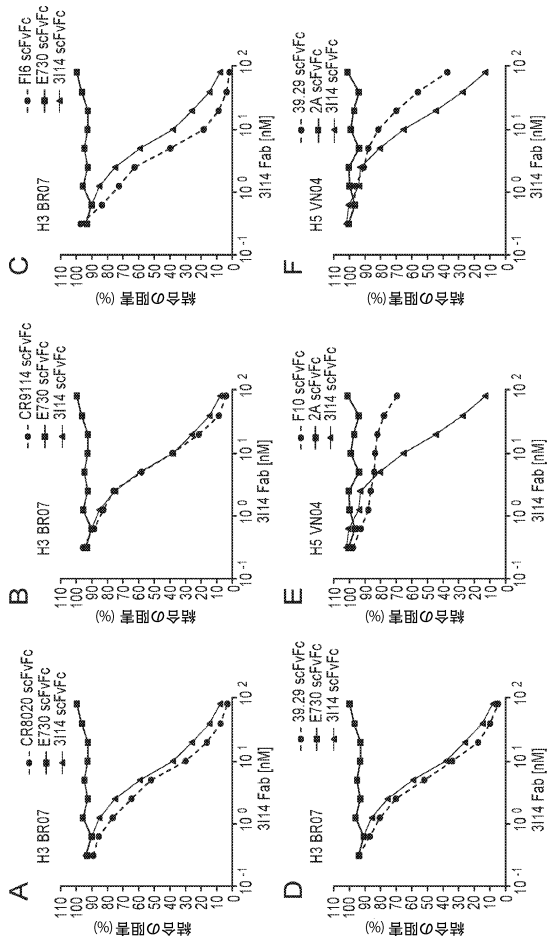
【図 9 B】



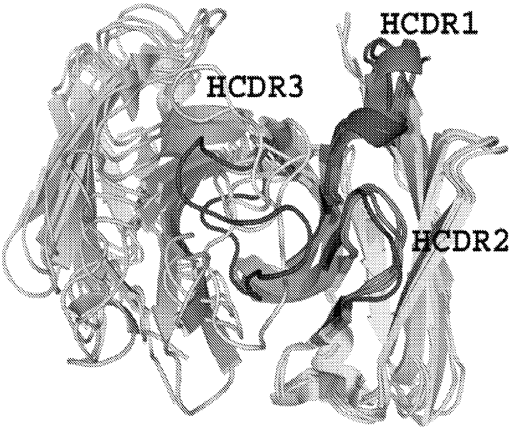
【図 9 A】



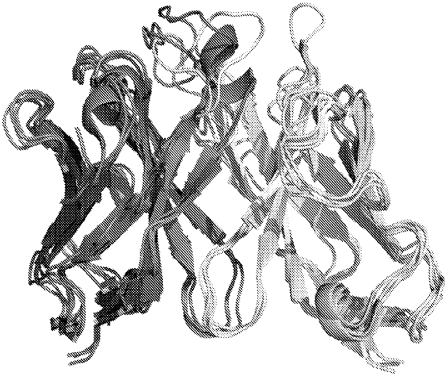
【図 10】



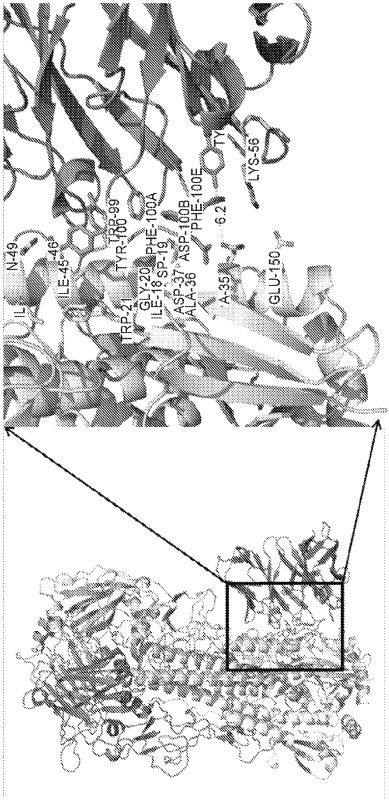
【図 12 A】



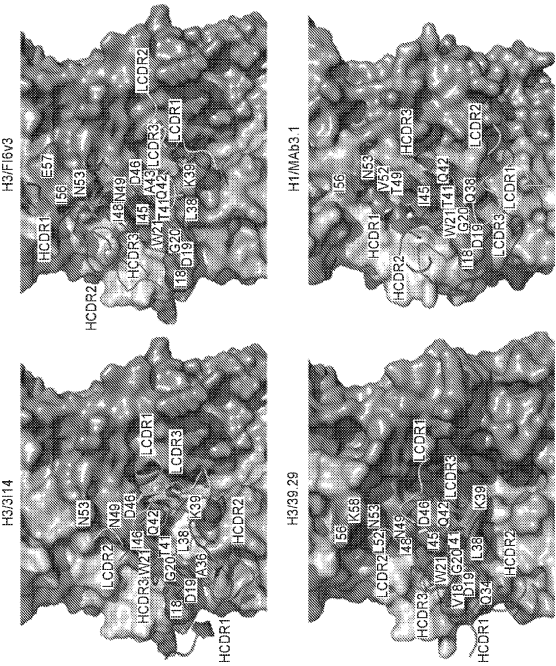
【図 12 B】



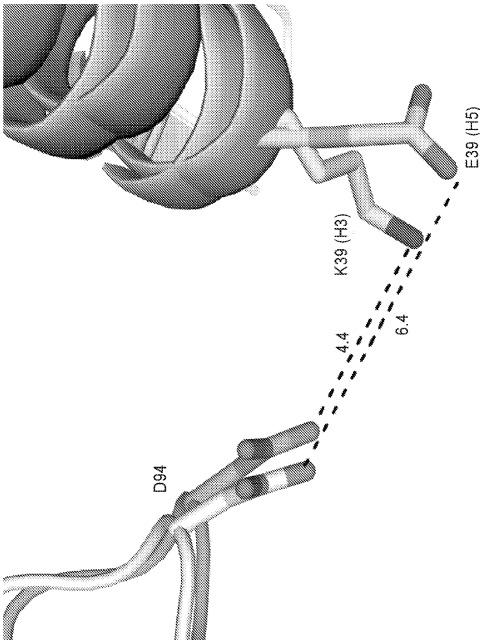
【図 13 A】



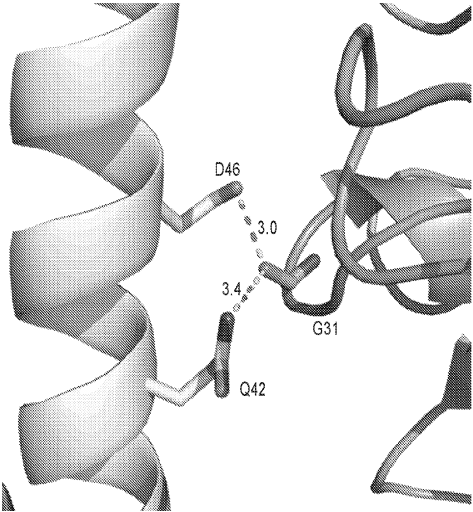
【図 13 B】



【図 13 C】



【図 13 D】

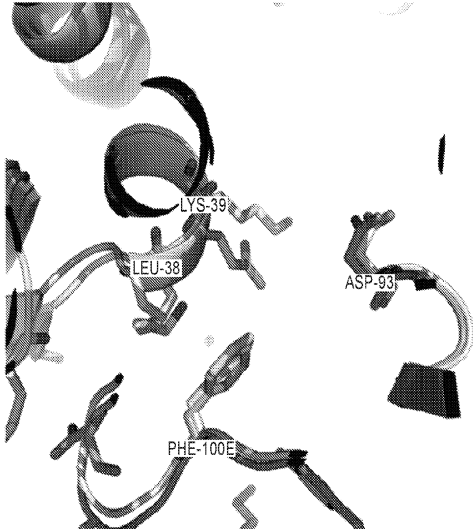


【図 14】

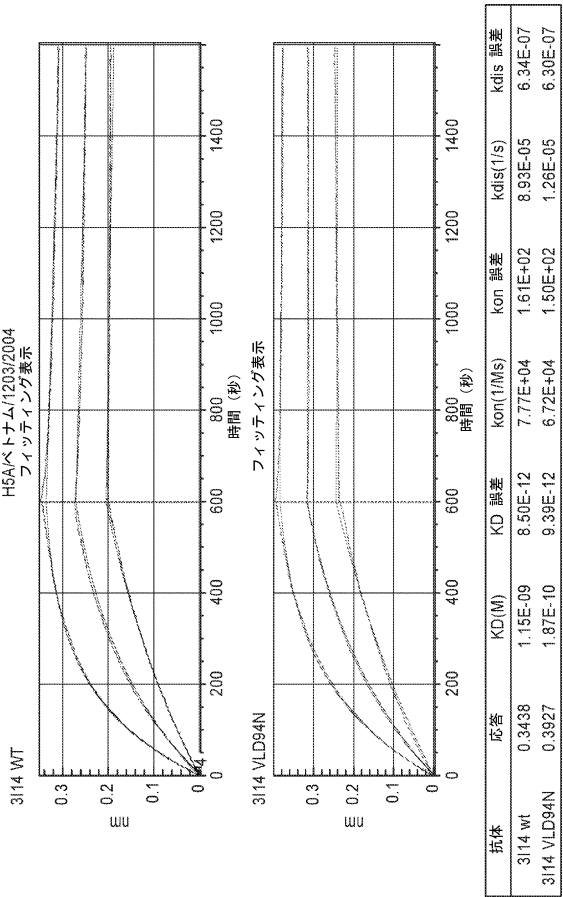
A

	1	1	2	2	3	3	4	4		4	4	4	4	5
	8	9	0	1	8	9	1	2		5	6	7	8	0
H3	I	D	G	W	L	K	T	Q		I	D	Q	I	N
H5	V	D	G	Q	K	E	T	Q		I	D	G	V	T
B	I	A	G	W	L	K	T	Q		I	N	K	I	T

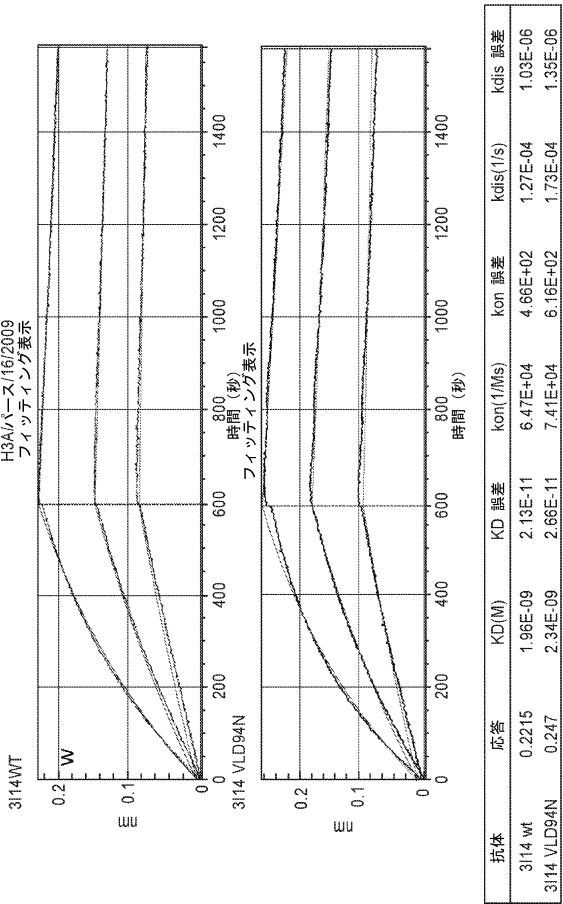
B



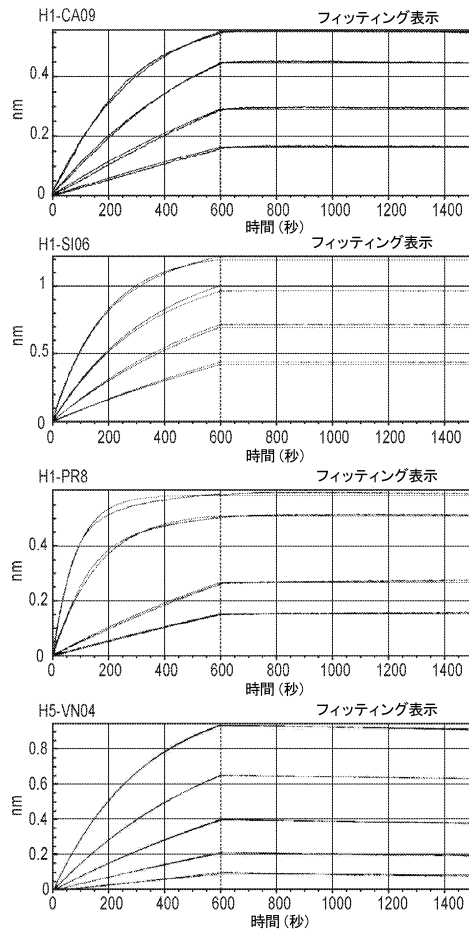
【図 15 A】



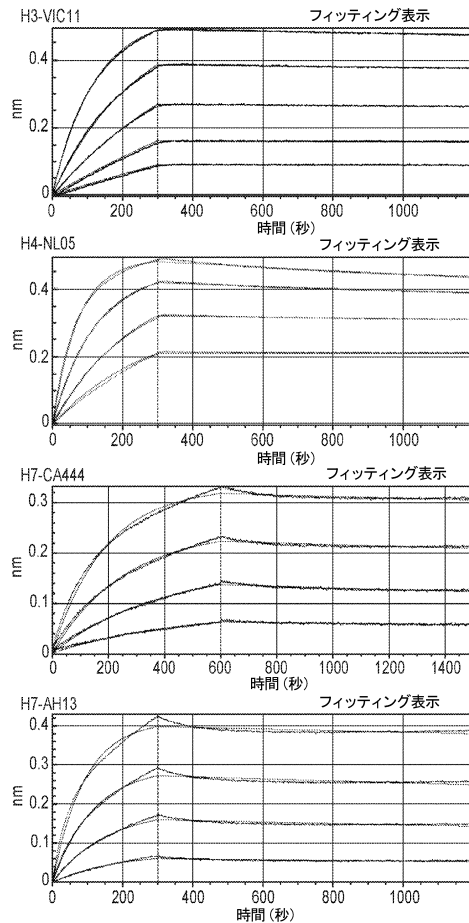
【図 15 B】



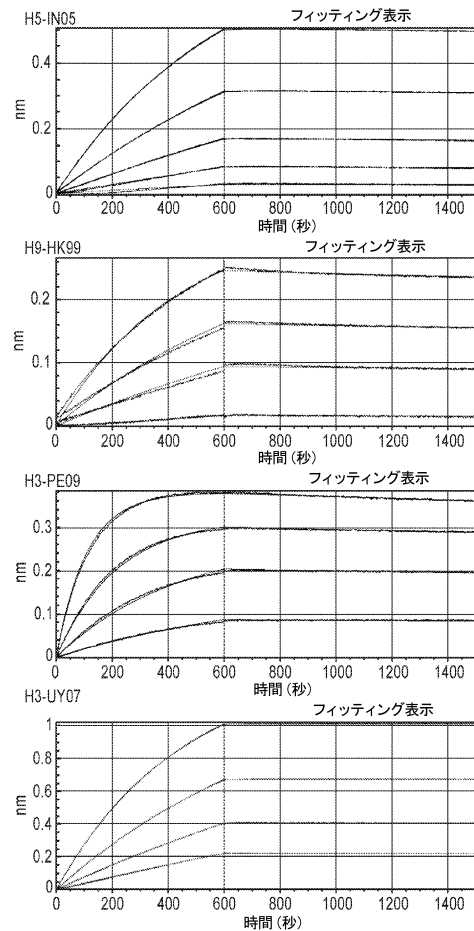
【図 15 C】



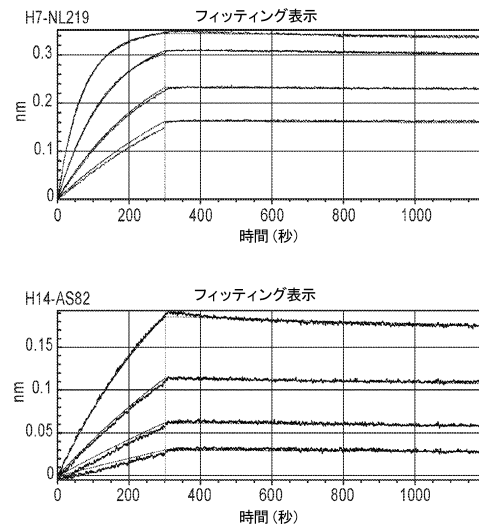
【図 15 E】



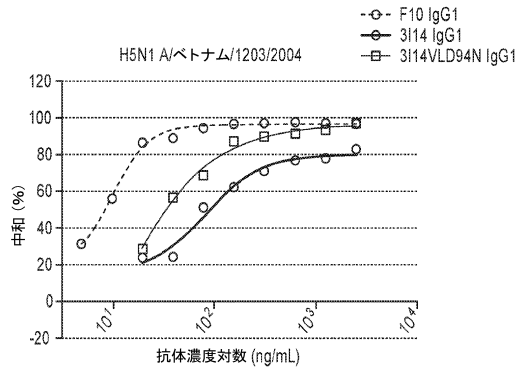
【図 15 D】



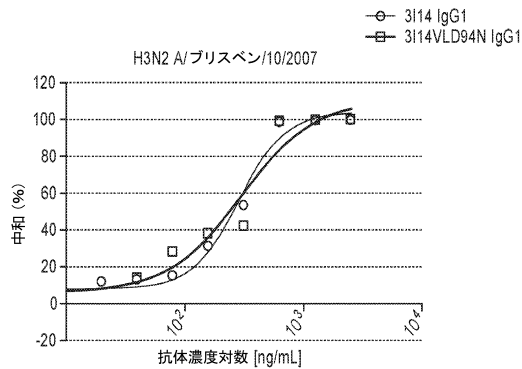
【図 15 F】



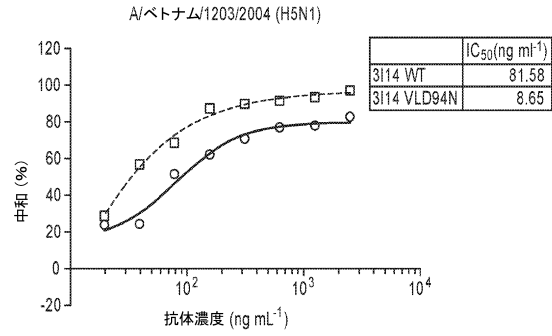
【図 16 A】



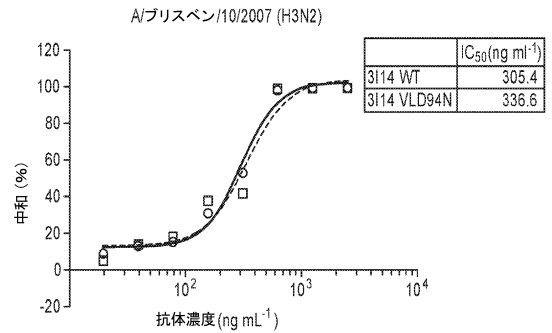
【図 16 B】



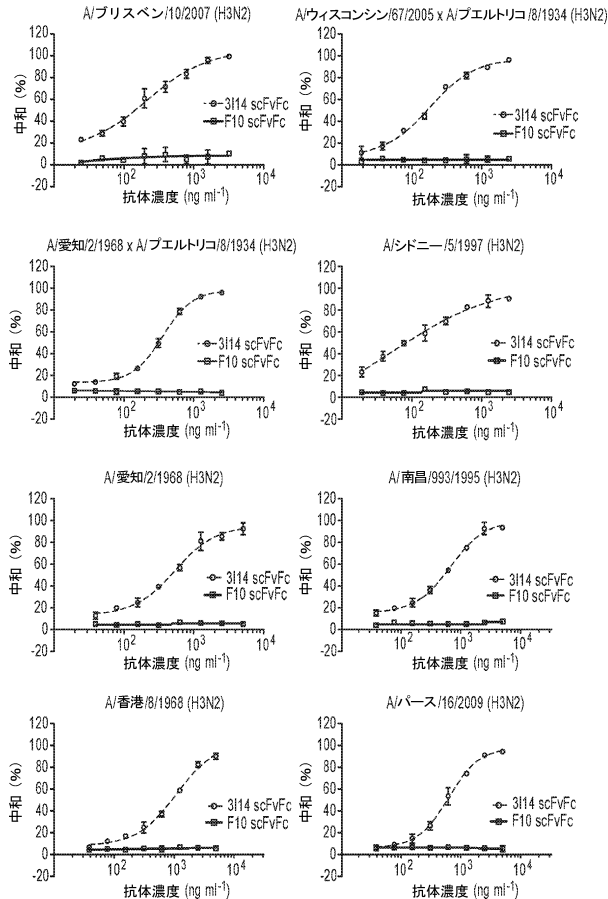
【図 16 C】



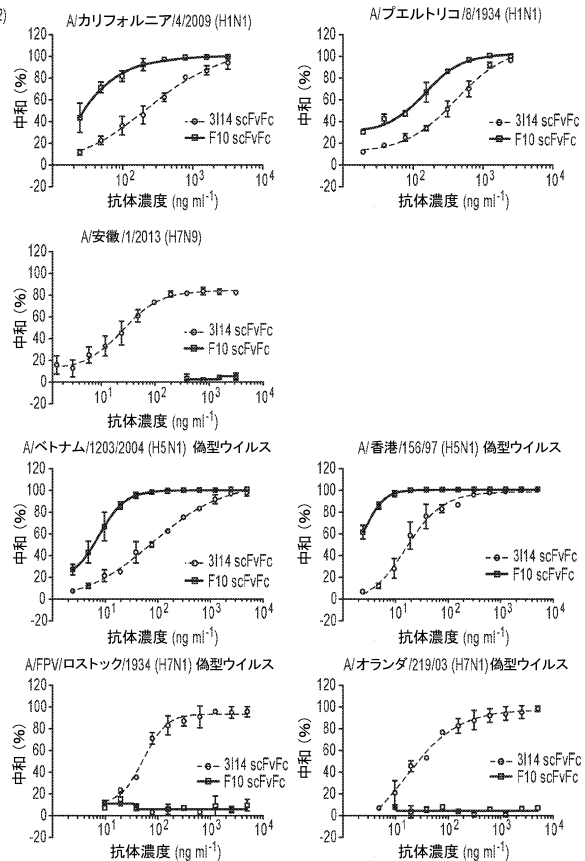
【図 16 D】



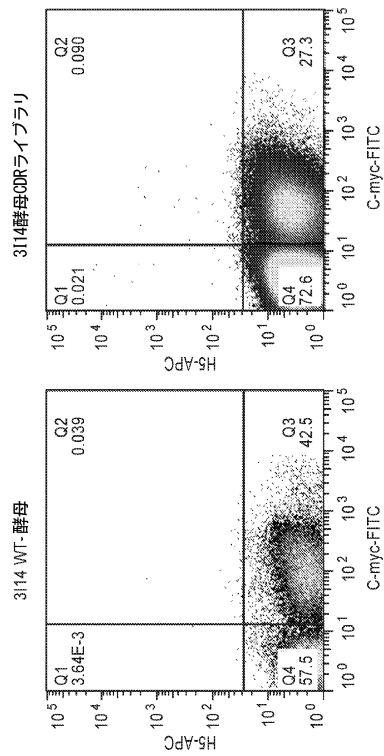
【図 17 - 1】



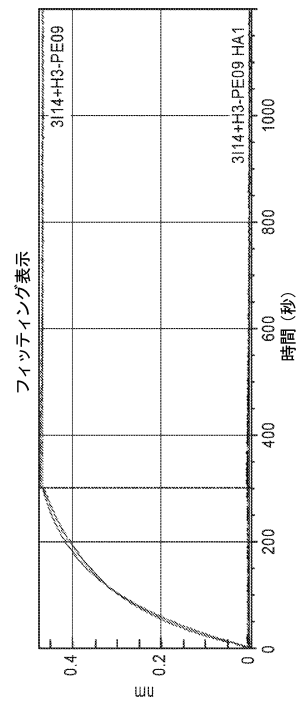
【図 17 - 2】



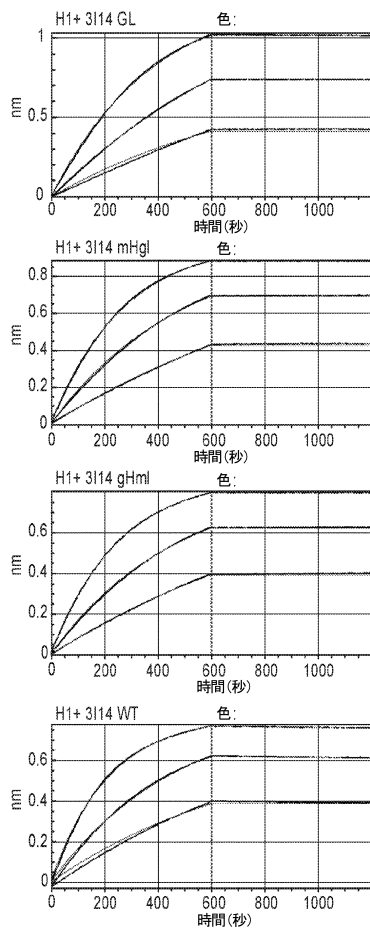
【図 18】



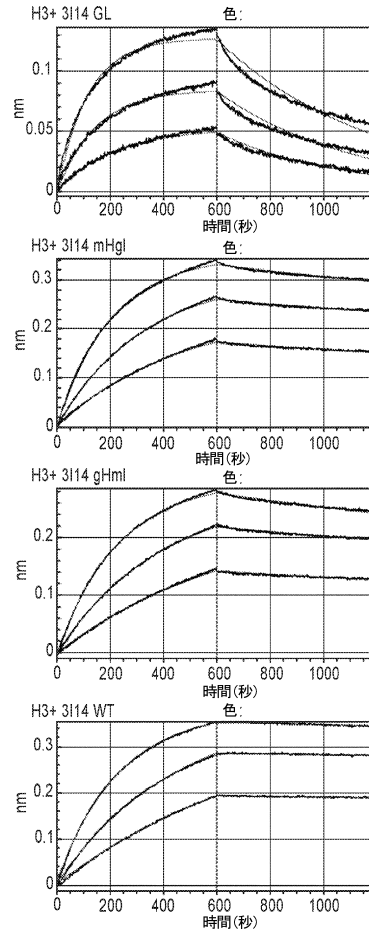
【図 19】



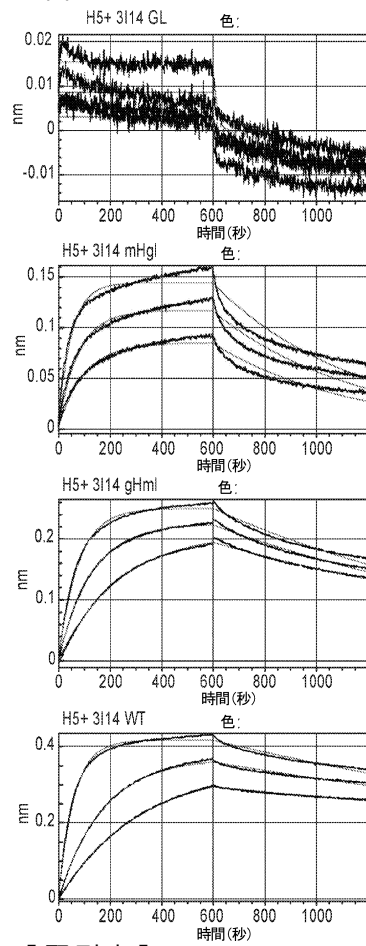
【図 20 - 1】



【図 20 - 2】



【図 20 - 3】



【配列表】

0006960856000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マラスコ ウェイン エイ .
アメリカ合衆国 0 2 4 8 1 マサチューセッツ州 ウェルズリー ライス ストリート 4 3

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 2 3 2 5 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 7 8 2 6 8 (W O , A 2)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q