

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年6月26日(26.06.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/097762 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/10 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/080060
- (22) 国際出願日: 2013年10月30日(30.10.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-278228 2012年12月20日(20.12.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3番9号 Kumamoto (JP). 公益財団法人東京都医学総合研究所(TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE) [JP/JP]; 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目1番6号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 阪口薫雄(SAKAGUCHI, Nobuo); 〒8600811 熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 桑原一彦

(KUWAHARA, Kazuhiko); 〒8600811 熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 小原道法(KOHARA, Michinori); 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目1番6号公益財団法人東京都医学総合研究所内 Tokyo (JP). 芝▲崎▼太(SHIBASAKI, Futoshi); 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目1番6号公益財団法人東京都医学総合研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

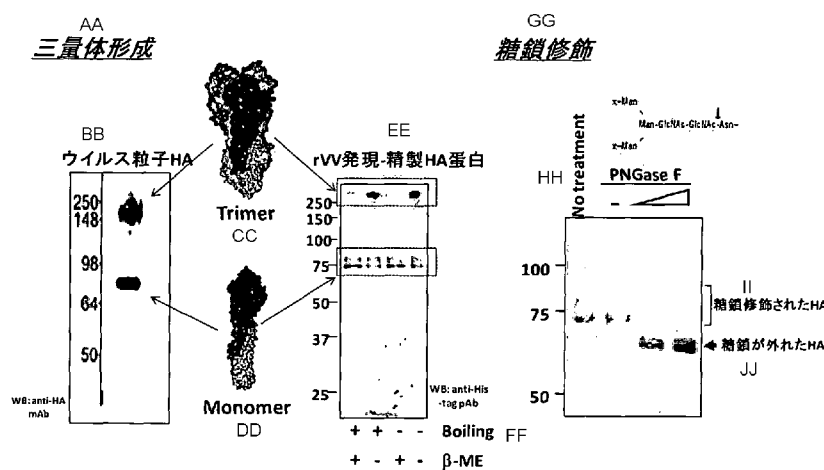
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: ANTIBODY TO HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA

(54) 発明の名称: 高病原性トリインフルエンザに対する抗体

[図2]



(57) Abstract: The invention pertains to an antibody to the HA protein of an influenza virus having a dissociation constant of at least 1×10^{-10} M, a method for producing said antibody, a method for detecting the influenza virus by reacting an antibody and a biological sample, and a pharmaceutical composition for the influenza virus containing said antibody.

(57) 要約: 本発明は、少なくとも 1×10^{-10} Mの解離定数を有する、インフルエンザウイルスのHAタンパク質に対する抗体、該抗体の製造方法、抗体と生体試料とを反応させて、インフルエンザウイルスを検出する方法、前記抗体を含むインフルエンザウイルス用医薬組成物に関する。



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

明 細 書

発明の名称

高病原性トリインフルエンザに対する抗体

5

技術分野

[0001]

本発明は、高病原性トリインフルエンザに対する特異的かつ抗親和性の抗体、特に、少なくとも 1×10^{-10} M の解離定数を有するモノクローナル抗体に関する。

10

背景技術

[0002]

一般に、ヒトは他の動物が感染したインフルエンザに感染することではなく、季節性と呼ばれる A 香港型 (H3N1)、A ソ連型 (H1N1)、B 型インフルエンザなどに感染する。しかし、近年、鳥感染型由来の高病原性の A 型インフルエンザ (H5N1) がヒトに感染し、重篤な肺炎を発症することが問題となっている。ヒトではこれまでに感染歴がないことから、ひとたび高病原性のインフルエンザ感染がおこると、急速に感染が拡大する。従って、高病原性インフルエンザ (H5N1) の流行をいち早く診断し、防疫、予防、ワクチン投与を行うため、治療薬剤などの開発を急ぐことが重要である。また、近年、様々な地域で高病原性インフルエンザウイルス単離が成功し、様々なウイルス株 (クレード) の抗原が明らかになっている。高病原性インフルエンザの流行においても季節性と同じように、パンデミックな流行がおこれば多様な変異株が出現する可能性が高いものと想定されている。そのため、むやみに抗インフルエンザ薬を投与することは極力さけなければならない。従って、高病原性インフルエンザ感染を迅速に、そして特異的に検出することのできる簡易検査試薬を作製しピンポイントの治療を集中的に行うことが喫緊の課題である。

15

20

25

[0003]

これまで、H5N1 インフルエンザを検出するために特異的モノクローナル抗体が作製され、数多くの試みが行われている。例えば、H5N1 インフルエンザ感染経過後の末梢B細胞を不死化して作製したモノクローナル抗体 (Simmons CP et al., PLoS Med 4:e178, 2007 (非特許文献1))、ファージディスプレイ法によるライブラリー技術により作製された抗体 (Kashyap AK et al., PNAS 105:5986, 2008 (非特許文献2))、Lim AP et al., Virol. J. 2008, 5:130 (非特許文献3))、マウスまたはラットに対し H5N1 抗原による免疫を行って細胞融合により作製された抗体 (米国特許 7, 879, 326 号 (特許文献1)) などが挙げられ、その他にも、高病原性トリインフルエンザに対するモノクローナル抗体 (第 4625485 号特許 (特許文献2)) がある。

[0004]

しかしながら、上記抗体は、広汎なウイルス株への反応性と検出感度について課題が残されている。例えば、Simmons らの抗体 (非特許文献1) は、BF-1 から BF-19 まで 11 種類が報告されているが、報告ではウイルス中和活性は述べられているものの、迅速診断検出に必要な高感度を得る為に重要な抗体の親和性は $KD=9.25 \times 10^{-7} \text{ M}$ から $2.07 \times 10^{-7} \text{ M}$ の低レベルである。また Fount らの報告 (特許文献1) の抗体は、H5N1 のペプチド断片を免疫原として用いた抗体であり、この抗体において対象となるエピトープは限定されている。抗体の活性は ELISA で測定した結果として示されているが、6G6 抗体に関しては 1024 倍希釈で $OD=0.604$ 程度であり、7F6 に至っては $OD=0.139$ であり、実際のウイルス粒子を対象とした測定系で親和性が高いとは言い難い。

このような状況から、H5N1 インフルエンザウイルスの各クレード (亜型) に対して同等かつ強力に認識して迅速に診断するために、より強力に抗原と結合することの出来る高親和性のモノクローナル抗体が求められる。

先行技術文献

特許文献

[0005]

[特許文献1] 米国特許 7, 879, 326 号

[特許文献 2] 第 4625485 号特許

[非特許文献]

[0006]

[非特許文献 1] Simmons CP et al., PLoS Med 4:e178, 2007

5 [非特許文献 2] Kashyap AK et al., PNAS 105:5986, 2008

[非特許文献 3] Lim AP et al., Virol. J. 2008, 5:130

発明の概要

発明が解決しようとする課題

10 [0007]

本発明は、高病原性インフルエンザに対する特異的かつ高親和性のモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

15 [0008]

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、組換えワクシニアウイルスを用いて抗原を調製し、これを GANP（登録商標）トランスジェニックマウスに免疫することにより、高病原性トリインフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体を製造し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

20 [0009]

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 少なくとも 1×10^{-10} M の解離定数を有する、インフルエンザウイルスの HA タンパク質に対する抗体。

(2) 解離定数が 1×10^{-10} M ~ 1×10^{-13} M である、(1) に記載の抗体。

25 (3) インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである (1) に記載の抗体。

(4) インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである (3) に記載の抗体。

(5) インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2.2)、インドネシア株 (clade 2.1)、安徽株 (clade 2.3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008: clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種で

5 ある (4) に記載の抗体。

(6) 抗体がモノクローナル抗体である (1) に記載の抗体。

(7) 受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 であるハイブリドーマにより産生される、(6) に記載の抗体。

10

(8) 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体又はヒト化抗体である、(1) に記載の抗体。

(9) (1) に記載の抗体が結合する部位に結合する抗体。

(10) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体の断片。

15 (11) (6) に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(12) 受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 であるハイブリドーマ。

(13) (1) に記載の抗体の製造方法であって、以下の工程：

20 (a) 組換えワクシニアウイルスを用いて発現させたインフルエンザウイルスの HA タンパク質を用いて非ヒト哺乳動物を免疫する工程、及び

(b) 当該非ヒト哺乳動物から抗体を採取する工程を含む、前記方法。

(14) (6) 又は (7) に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、以下の工程：

25 (a) 組換えワクシニアウイルスを用いて発現させたインフルエンザウイルスの HA タンパク質を用いて非ヒト哺乳動物を免疫する工程、

(b) 前記免疫された非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を採取する工程、

(c) 工程 (b) で得られた抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させる工程、及び

(d) 工程 (c) で得られた融合細胞から抗体を採取する工程を含む、前記方法。

(15) 非ヒト哺乳動物が、GANP (登録商標) トランスジェニック非ヒト哺乳動物である (13) 又は (14) に記載の方法。

5 (16) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体又は (10) に記載の断片と生体試料とを接触させて、インフルエンザウイルスを検出することを特徴とする、インフルエンザウイルスの検出方法。

(17) インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである (16) に記載の方法。

10 (18) インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである (17) に記載の方法。

(19) インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2.2)、インドネシア株 (clade 2.1)、安徽株 (clade 2.3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株 (A/whooper

15 swan/Hokkaido/1/2008: clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である (18) に記載の方法。

(20) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体又は (10) に記載の断片を含む、インフルエンザウイルス検出用試薬。

20 (21) インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである (20) に記載の試薬。

(22) インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである (21) に記載の試薬。

25 (23) インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2.2)、インドネシア株 (clade 2.1)、安徽株 (clade 2.3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008: clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である (22) に記載の試薬。

(24) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体又は (10) に記載の断片を含む、抗インフルエンザウイルス用医薬組成物。

(25) インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである(24) に記載の医薬組成物。

(26) インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである(25) に記載の医薬組成物。

- 5 (27) インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2.2)、インドネシア株 (clade 2.1)、安徽株 (clade 2.3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008: clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも1種である(26) に記載の医薬組成物。

10 [0010]

本発明により、高病原性トリインフルエンザウイルスに対する抗体が提供される。本発明の抗体は、高病原性トリインフルエンザウイルスに対し中和活性を示した。従って、本発明の抗体は、高病原性トリインフルエンザウイルスの検出用試薬として、あるいは高病原性トリインフルエンザウイルス感染の防御用医薬組成物として極めて有用である。

15

図面の簡単な説明

[0011]

[図1] HA タンパク質の精製結果を示す図である。

20 [図2] HA タンパク質の三量体形成及び糖鎖修飾を示す図である。

[図3] 本発明の抗体によるインフルエンザウイルス H5N1 Vac-3 に対する中和及び増殖阻害アッセイ結果を示す図である。

[図4] 本発明の抗体による高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 H5N1 A/whooper swan/Mongolia/3/05 に対する中和及び増殖阻害アッセイ結果を示す図である。

25

[図5] 本発明の抗体による高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 に対する中和及び増殖阻害アッセイ結果を示す図である。

〔図 6〕本発明の抗体による高病原性トリインフルエンザウイルス感染に対する治療効果を示す図である。

〔図 7〕本発明の抗体による高病原性トリインフルエンザウイルス感染に対する治療効果を示す図である。

5

発明を実施するための形態

〔0012〕

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願 2012-278228 号明細書（出願日：2012 年 12 月 20 日）の内容を包含する。

10 本発明の範囲はこれらの説明に限定されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

本明細書において引用した全ての刊行物、例えば、先行技術文献、公開公報、特許公報およびその他の特許文献は、その全体が本明細書において参考として組み込まれる。

15 〔0013〕

1. 概要

本発明は、解離定数 (KD) が少なくとも 1×10^{-10} M を有する、高病原性トリインフルエンザに対する高親和性抗体であり、広範なクレード種、例えばインドガン青海湖株、インドネシア株、安徽株、ベトナム株、モンゴル株及び北海道株
20 に対して単一抗体で検出し、あるいは防御することができるものである。

高病原性トリインフルエンザは鶏等を媒介し、ヒトに感染する高度に致死的なインフルエンザとして季節性インフルエンザとは異なる流行をする。現在、国際的な高病原性トリインフルエンザの封じ込めと限定的なワクチン投与によって感染の抑制を行っているところである。この方策の鍵は、いち早く、強毒性インフル
25 ルエンザの感染者を発見及び診断し、有効な治療と感染拡大防御への対策を図ることである。従って、できるだけ速やかに簡便かつ広い範囲の高病原性トリインフルエンザの全てを高感度で的確に診断することができ、普及可能な検査試薬が求められている。

本発明においては、ワクシニアウイルスを用いて発現させたヘマグルチニン (HA) タンパク質を抗原として使用し、GANP (登録商標) トランスジェニックマウスによる高親和性モノクローナル抗体作製技術を用いることにより、高病原性トリインフルエンザウイルスを特異的に、しかも広範なクレード種、すなわちインドガン青海湖株 (A/Bar-Headed goose/Qinghai /1A/05:clade 2. 2)、インドネシア株 (A/Indonesia/05/2005:clade 2. 1)、安徽株 (A/Anhui/1194/2005:clade 2. 3)、ベトナム株 (A/Vietnam/1194/2004:clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2. 2)、北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008:clade 2. 3. 2) を、単一種類の抗体で全て検出することができる高親和性抗体を作製することに成功した。

[0014]

2. 本発明の抗体

本発明の抗体は、重鎖及び軽鎖の可変領域 VH 及び VL を介して HA タンパク質に結合する分子である。本発明の抗体は、IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 等のポリクローナル又はモノクローナル免疫グロブリン分子のいずれか、あるいは、IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 等のサブクラスを表す。また、本発明の抗体には、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、scFv 及び sdFv 等の免疫グロブリン分子の機能性断片又はサブ配列も含まれる。

以下、本発明の抗体の製造方法について説明する。

[0015]

2-1. 抗原の調製

本発明において使用される抗原は、インフルエンザウイルスの HA タンパク質である。このタンパク質は、ワクシニアウイルスを用いて発現させることができる。＜インフルエンザウイルスの HA タンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルスの作製＞

HA タンパク質遺伝子は、GenBank データベースにおいて、所定のアクセッション番号 (Accession No.) により登録されている。

例えば、H5 の亜型、例えば H5N1 の各クレードに属するインフルエンザウイルス由来の HA タンパク質をコードする遺伝子は、GenBank アクセッション番号に以下の通り登録されている。

クレード 1 : __A/Vietnam/1109/2004__EF541402

5 クレード 2.1 : __A/Indonesia/5/2005__EF541394

クレード 2.2 : __A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005__DQ659327

クレード 2.3 : __A/Anhui/1/2005__DQ371928

[0016]

本発明の組換えワクシニアウイルスに含まれる HA タンパク質をコードする遺
10 伝子 (cDNA) としては、上記各遺伝子のほか、その一部やその変異配列も用いる
ことができる。例えば、クレード 1 の HA タンパク質をコードする DNA の一部を欠
損させた DNA、クレード 2.1 の HA タンパク質をコードする DNA の一部を欠損させ
た DNA、クレード 2.2 の HA タンパク質をコードする DNA の一部を欠損させた DNA、
クレード 2.3 の HA タンパク質をコードする DNA の一部を欠損させた DNA を用いる
15 ことができる。

これら HA タンパク質遺伝子は、すでにクローニングされ、プラスミドに挿入さ
れている。

[0017]

また、本発明においては、上記 HA タンパク質遺伝子 (本明細書において、全長
20 塩基配列、又はタンパク質のコード領域の塩基配列を指す。以下、他の HA タンパ
ク質遺伝子についても同様。) のほか、その変異型遺伝子も使用することができる。
例えば、EF541402 に示される塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる配列
とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、クレード 1 の HA タンパ
ク質をコードする DNA、EF541394 に示される塩基配列に対し相補的な塩基配列か
25 らなる配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、クレード 2.1
の HA タンパク質をコードする DNA、DQ659327 に示される塩基配列に対し相補的な
塩基配列からなる配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、
クレード 2.2 の HA タンパク質をコードする DNA、DQ371928 に示される塩基配列に
対し相補的な塩基配列からなる配列とストリンジントな条件下でハイブリダイ

ズし、かつ、クレード 2.3 の HA タンパク質をコードする DNA などを用いることができる。

[0018]

ストリンジェントな条件としては、たとえば、0.1×SSC～10×SSC、0.1%～1.0% SDS 及び 20℃～80℃の条件が挙げられ、より詳細には、37℃～56℃で 30 分以上ブ
5 レハイブリダイゼーションを行った後、0.1×SSC、0.1% SDS 中、室温で 10～20 分の洗浄を 1～3 回行う条件が挙げられる。ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th Edition)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)) 等を参照することができる。

10 [0019]

また、EF541402 に示す塩基配列と 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は 99%以上の相同性を有し、かつ、クレード 1 の HA タンパク質をコードする DNA、EF541394 に示す塩基配列と 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は 99%以上の相同
15 性を有し、かつ、クレード 2.1 の HA タンパク質をコードする DNA、DQ659327 に示す塩基配列と 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は 99%以上の相同性を有し、かつ、クレード 2.2 の HA タンパク質をコードする DNA、DQ371928 に示す塩基配列と 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上又は 99%以上の相同性を有し、かつ、クレ
20 ード 2.3 の HA タンパク質をコードする DNA を用いることができる。

[0020]

変異型遺伝子は、例えば、上記「Molecular cloning: A Laboratory Manual (4th Edition)」等に記載の部位特異的変位誘発法、あるいは部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キットを用いて調製することができる。このような変異
25 導入用キットとしては、例えば、QuickChange™Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、GeneTailor™Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製) 等が好ましく挙げられる。

[0021]

従って、抗原として使用する HA タンパク質は、上記遺伝子情報を基に通常の遺伝子工学的手法により得ることができる。

例えば、本発明においては、上記 HA タンパク質をコードする DNA を、相同組換え用プラスミドに組み込んだ後に動物細胞に導入し、続いて親株であるワクシニアウイルスを当該動物細胞に感染させる。感染後、組換えワクシニアウイルスを培養して HA タンパク質を発現させればよい。HA タンパク質は、ワクシニアウイルス感染前期から後期まで完全な糖修飾を受けた形で大量に発現することができる。

[0022]

- 10 相同組換えプラスミドには、プロモーター、発現対象遺伝子などを含めることができる。また、動物細胞としては、ウサギ腎細胞、サル腎細胞、ヒト繊維芽細胞などが挙げられる。発現させた HA タンパク質は、His タグなどを利用した公知手法により精製することができる。精製手法は限定されるものではなく、アフィニティクロマトグラフィー、HPLC 精製などが採用される。精製された HA タンパク質が目的のものであることの確認は、例えばウエスタンブロッティング、SDS-
- 15 ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により行なうことができる。

組換えワクシニアウイルスにより発現された HA タンパク質の大部分はインフルエンザウイルス粒子上の HA タンパク質と同様に三量体を形成するので、これを抗原として用いる。

20 [0023]

2-2. 免疫

前記のようにして作製したタンパク質をそれ自体で、あるいは担体、希釈剤と共に非ヒト哺乳動物に投与することにより免疫し、抗体価を測定する。

- 免疫する非ヒト哺乳動物の種類は特に限定されるものではなく、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ヤギ等などが挙げられ、マウスが好ましい。
- 25

本発明の好ましい態様において、本発明の抗体を作製するために、免疫する動物として、高特異性抗体産生能を有する「GANP（登録商標）」と呼ばれるトランスジェニック非ヒト哺乳動物（W02004/040971）を用いることもできる。

[0024]

GANP（登録商標）トランスジェニック非ヒト哺乳動物とは、胚中心結合核タンパク質 (Germinal center-associated nuclear protein) をコードする遺伝子が導入された非ヒト哺乳動物であり、当該動物を所定の抗原で免疫することにより、当該抗原に対して高親和性あるいは高特異性抗体を産生することができる動物である（W000/50611 号公報、Sakaguchi N. et al., J Immunol. 2005 Apr 15;174 (8) :4485-94.）。

例えば GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物（例えばマウス）は、上記公報又は Sakaguchi らの文献に記載の方法により作製することが可能である。

[0025]

- 10 抗原の動物 1 匹あたりの投与量は、全体で 10~2000 μ g である。抗原を免疫する際は、アジュバントと抗原溶液を混ぜることが一般的であり、アジュバントの種類としては、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内、筋中、足蹠皮下等に注入することにより行う。また、
- 15 免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 2~4 週間間隔で、1~10 回、好ましくは 2~5 回免疫を行う。

GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫する場合は、吸光度レベルが低下するまで放置する必要がなく、一般的なモノクローナル抗体作製法の免疫間隔に従って、最終免疫まで行えばよい。

20 [0026]

抗体価は、免疫した動物から採取した血液を用いて調べることができる。得られた血清を段階希釈し、酵素免疫測定法 (ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 又は EIA (enzyme immunoassay))、放射性免疫測定法 (RIA (radioimmuno assay)) 等で抗体価を測定する。

- 25 測定の結果、HA タンパク質に対する抗体価の高い動物に最終免疫を施す。但し、抗原の免疫と抗体価の測定に関しては上記測定法に限定するものではない。

その後、最終免疫日から数日後に、好ましくは 2~5 日後に免疫担当細胞（脾臓細胞等）又は所属リンパ節を摘出する。採血の間隔は、免疫して 1~4 週間後、好ましくは 1~2 週間後に行う。

[0027]

2-3. ポリクローナル抗体の製造

本発明において、ポリクローナル抗体を取得する場合は、上記所望の抗体価を示した日に採血して、抗血清を得る。抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより、精製することができる。その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性を ELISA 法などで測定する。

[0028]

2-4. モノクローナル抗体の製造

本発明のモノクローナル抗体を得る方法としては、まず、前記 HA タンパク質を GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫し、免疫動物から抗体産生細胞（例えば B 細胞）を採取し、この抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させ、ハイブリドーマ（融合細胞株）を作製する。そして、このハイブリドーマから産生される抗体を採取することにより、目的のモノクローナル抗体を得ることができる。

[0029]

(1) 抗体産生細胞の調製

抗体産生細胞は、免疫した非ヒト哺乳動物等の動物の脾臓細胞若しくはリンパ節細胞又は脾臓若しくはリンパ節等から調製する。GANP トランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いた場合でも、上記と同様に脾臓細胞若しくはリンパ節細胞又は脾臓若しくはリンパ節等から抗体産生細胞を採取することができる。

リンパ節は、例えば鼠径部リンパ節、縦隔リンパ節などが挙げられる。採取した細胞集団から特に抗体産生細胞の分離操作を行わなくてもよいが、細胞集団の中から抗体産生細胞のみを分離することが望ましい。必要に応じて、組織の残骸や赤血球をできる限り除去しておくことが好ましい。

[0030]

(2) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な細胞株を使用することができる。使用する細胞株としては、HAT 選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む培地）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば P3X63-Ag. 8. U1 (P3U1) や P3/NS 1/1-Ag4-1 (NS1) 等が挙げられる。

細胞融合は、ウシ胎児血清 (FCS) 等を含まない DMEM や RPMI1640 培地などの一般に市販されている培地で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mL の脾臓細胞及び/又はリンパ節細胞と $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個/mL のミエローマ細胞とを混合し（脾臓細胞及び/又はリンパ節細胞とミエローマ細胞との細胞比は 5:1 が好ましい）、細胞融合促進剤存在下で融合を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量 200~20000 ダルトンのポリエチレングリコールを使用することができる。

[0031]

また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて、融合させることもできる。さらに、センダイウイルスを用いて細胞を融合させることもできる。当業者であれば、公知の細胞融合方法を用いて、上記の抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合させることができる。

融合後、例えば 10~20% FCS 含有 RPMI1640 培地などで作製した HAT 培地で細胞を希釈後、96 穴培養プレートの各ウェルに $0.5 \sim 3 \times 10^5$ 個ずつ細胞を播き込み、CO₂ インキュベーターで培養する。

[0032]

(3) ハイブリドーマの樹立

次に、細胞融合処理後の細胞から目的とする抗体を産生するハイブリドーマを選別する。細胞融合から 10~14 日後に、前記したように HAT 培地で選択された細胞がコロニーを形成する。そのコロニー陽性 96 穴培養プレートの各ウェルの培養上清を採取して、HA に対する抗体価を確認する。確認方法としては、酵素免疫測定法 (ELISA) や放射性免疫測定法 (RIA) 等で行う。HA に対する抗体産生陽性ウェルを確認できた後は、24 穴や 12 穴培養プレートに細胞を移す。

[0033]

ここで、培地はアミノプテリンを除いた HT 培地（ヒポキサンチン、チミジン含有培地）に置き換えることが好ましい。HT 培地は、細胞内に残留したアミノプテリンの影響がある間、サルベージ経路にプリンおよびピリミジンの前駆体を供給し続けるハイブリドーマの回復用培地として用いる。HT 培地中でしばらく培養した後、再度培養上清中の抗体価を確認する。ハイブリドーマは融合細胞であるために不安定であり、すぐに抗体産生能が消失する可能性が高いため、2 度目の抗体価の確認を行っておくことが好ましい。

本発明においては SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) スパイク (S) 蛋白とは交差反応せず、HA に対して高い特異性を有するハイブリドーマを取得することが必要であるため、培養上清レベルで他の SARS S 蛋白との交差反応性を ELISA や RIA 等で確認することが好ましい。

[0034]

最終的に選択されたウェル内の細胞について、単一の細胞にするためにクローニングを行う。クローニングは、例えば細胞懸濁液を 10~20%の FCS 含有 RPMI1640 培地などで適当に希釈後、96 穴培養プレートの各ウェルに 0.3~2 個入るように細胞を播き込む。96 穴培養プレートの各ウェルに入れる細胞の数は、1つのウェルに入る細胞が 1 個である確率が高くなるようにするため、好ましくは各ウェルに 1 個入るように細胞を播く。細胞播き込み後、7~10 日後にコロニー陽性ウェルの培養上清を回収する。このとき、3~5 日後にシングルコロニーであることを確認することが好ましい。回収した培養上清は、抗体価を確認する。ここでも HA に対して高い特異性を有し、かつ SARS S 蛋白に対する交差反応性が低いクローンを選択する。さらに選択されたウェルの細胞をある程度増やしてハイブリドーマ株を樹立する。クローニングは必要に応じて数回行っても良い。

[0035]

25 (4) モノクローナル抗体の調製

樹立したハイブリドーマ株から以下の方法で HA 特異的なモノクローナル抗体を精製及び採取する。すなわち、血清の濃度を抑えた培地で培養した培養上清から抗体を調製する方法、市販の無血清培地で培養した培養上清から抗体を調製する方法、動物の腹腔内にハイブリドーマを注入して、腹水を採取し、その腹水か

ら抗体を調製する方法等がある。培養上清は、細胞を $0.1 \sim 4 \times 10^5$ 個/mL で調製し、1～2 週間培養したものから採取する。腹水の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを $0.1 \sim 1 \times 10^7$ 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2 週間後に腹水を採取する。

5 [0036]

培養方法としては、培養フラスコを用いる方法、スピナーフラスコを用いる方法、シェーカーフラスコを用いる方法、バイオリアクターを使用する方法等がある。

10 抗体の精製方法は、HA アフィニティカラムで精製する方法、硫酸塩析分画からゲルろ過クロマトグラフィーで精製する方法、イオン交換クロマトグラフィーで精製する方法等があり、これら公知の方法を適宜選択し、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

[0037]

(5) 微生物の寄託

15 本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞株(ハイブリドーマ)は、「3E10 (rVV c12.2)」及び「7G10 (rVV c12.2)」と称し、いずれも、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8 N I T E バイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター)にブダペスト条約に基づき国際寄託した(原寄託日:2012 年 2 月 1 日)。その受託番号は、「3E10 (rVV c12.2)」については NITE BP-01216 であり、「7G10 (rVV c12.2)」については NITE BP-01217 である。

25 また、本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞株(ハイブリドーマ)は、「8C1 (rVV c12.2)」及び「14A7 (rVV c12.2)」と称し、いずれも、上記特許微生物寄託センターにブダペスト条約に基づき国際寄託した(原寄託日:2013 年 10 月 18 日)。その受領番号は、「8C1 (rVV c12.2)」については NITE ABP-01737 であり、「14A7 (rVV c12.2)」については NITE ABP-01738 である。

[0038]

2-5. 抗体の性質

本発明の抗体は、HA に対して特異的に結合し、高い親和性を示すものである。

「特異的」とは、免疫に使用した HA タンパク質のサブタイプ以外のサブタイプとは交差反応せず、免疫に使用したサブタイプタンパク質とのみ反応（結合・中和）することを意味する。例えば、サブタイプとして H5N1 の HA タンパク質を抗原として用いた場合は、本発明の抗体は H5 亜型のタンパク質又は H5 亜型のウイルスとのみ反応（結合・中和）し、H1N1、H1N2 などの他のサブタイプとの交差反応性がないことをいう。さらに、本発明の抗体は、同一のサブタイプ（例えば H5 亜型）に属する限り、異なるクレード（例えばクレード 1、2.1、2.2、2.3）に対しても特異的に結合することができる。

結合親和性は、結合定数 (KA) 及び解離定数 (KD) により決定することができる。

親和性平衡定数 (K) は KA/KD の比で表される。その結合親和性は、以下のようにして検出することができる。

[0039]

結合親和性は、少なくとも 1×10^{-10} M の解離定数 (KD) を有しており、この解離定数に対し、例えば 2~5 倍、5~10 倍、10~100 倍、100~1000 倍又は 1000~10,000 倍高い親和性を有する。具体的には、本発明の抗体は、HA タンパク質の結合親和性に関する解離定数 (KD) が、 1×10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 1×10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 1×10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 1×10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 1×10^{-14} M、 5×10^{-15} M、あるいは 1×10^{-15} M であり、 1×10^{-10} M ~ 1×10^{-13} M であることがより好ましい。あるいはこれらの KD よりも低い値であり高親和性であってもよい。

[0040]

ここで、親和性の測定対象となる抗体の解離定数 (KD) が、本発明の抗体の KD の約 1~100 倍以内であるときは、当該抗体は、本発明の抗体と実質的に同一であるとして本発明に含まれる。

結合定数 (KA) 及び解離定数 (KD) は、表面プラスモン共鳴 (SPR) を用いて測定することができ、結合率をリアルタイムで検出し、さらにモニタリングする公知の機器及び方法を採用することができる（例えば Biacore（登録商標）T200 (GE Healthcare 社)、ProteON XPR36 (Bio-Rad 社) など）。本明細書で規定される典型的な抗体の KD 値は、固相化された精製 HA タンパク質 (A/Anhui/1/2005) の HA

抗原の結合部位の半分 (50%) を飽和させるのに必要な抗体の濃度として定義される。

また、本発明の抗体は、複数種類のウイルス株に対して特異的に結合することができる。結合するウイルス株としては、A/whooper swan/Monglia/03/2005,

5 A/whooper swan/Hokkaido/1/2008, A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 が挙げられる。

[0041]

2-6. 抗体断片及び遺伝子組換え抗体

本発明においては、上記抗体の断片も提供する。ここで、本発明の抗体断片は、HA に対する抗体であって、上記 KD 値を有するものである。

10 抗体の断片としては、本発明の抗体の一部分の領域を意味し、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、diabody (dibodies)、dsFv (disulfide-stabilized Fv)、scFv (single chain Fv) などが挙げられる。上記抗体断片は、本発明の抗体を目的に応じて各種タンパク質分解酵素で切断することにより得ることができる。

例えば、Fab は、抗体分子をパパイニンで処理することにより、F(ab')₂ は、抗体
15 分子をペプシンで処理することによりそれぞれ得ることができる。また、Fab' は、上記 F(ab')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することで得ることができる。

[0042]

scFv の場合は、抗体の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を取得し、
20 scFv をコードする DNA を構築する。この DNA を発現ベクターに挿入し、当該発現ベクターを宿主生物に導入して発現させることにより、scFv を製造することができる。

diabody の場合は、抗体の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を取得し、ペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように scFv を
25 コードする DNA を構築する。この DNA を発現ベクターに挿入し、当該発現ベクターを宿主生物に導入して発現させることにより、diabody を製造することができる。

dsFv の場合は、抗体の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築する。この DNA を発現ベクターに挿入し、当該発現

ベクターを宿主生物に導入して発現させることにより、dsFv を製造することができる。

[0043]

本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、遺伝子組換え抗体が挙げられる。

- 5 遺伝子組換え抗体としては、限定はされないが、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体及びヒト化抗体等が挙げられる。

当技術分野では、ヒト抗体若しくはそのコンセンサス残基、又は CDR 領域に存在するアミノ酸残基が知られている (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (1987))。したがって、ヒト抗体には、1 以上のアミノ酸残基が他のヒト抗体のいずれかに存在するアミノ酸と置換された抗体が含まれる。

[0044]

- 15 ヒト型化抗体を作製する場合は、いわゆる CDR グラフティング (CDR 移植) と呼ばれる手法を採用することができる。CDR グラフティングとは、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (CDR) をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域 (FR) はヒト由来のもので CDR はマウス由来のものからなる、再構成した可変領域を作製する方法である。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。このようなヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である (例えば Nature, 321, 522-525 (1986) ; J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987) 等を参照)。

[0045]

- 25 ヒト化抗体 (完全ヒト抗体) は、一般に V 領域の抗原結合部位である超可変領域 (Hyper Variable region)、V 領域のその他の部分及び定常領域の構造が、ヒトの抗体と同じ構造を有するものである。但し、超可変部位は他の動物由来であってもよい。ヒト化抗体を作製する技術も公知であり、ヒトに共通の遺伝子配列については遺伝子工学的手法によって作製する方法が確立されている。ヒト化抗体は、例えば、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (Tomizuka, K. et al., Nat. Genet., (1977) 16,

133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucleic Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727 等を参照)、あるいは、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431 等を参照) に
5 10 より取得することができる。

[0046]

また、本発明においては、本発明のハイブリドーマ（例えば受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 であるハイブリドーマ）、又は当該ハイブリドーマから抽出した DNA
15 若しくは RNA などを原料として、上述した周知の方法に準じてキメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト化抗体を作製することができる。

[0047]

2-7. 本発明の抗体が結合する部位

さらに、本発明の抗 HA 抗体としては、例えば、本発明の抗体が結合（認識）する部位（例えばエピトープ）に結合する抗体、好ましくは、受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合する部位（例えばエピトープ）に結合する抗体が挙げられる。
20

本発明の抗 HA 抗体の結合する部位は、抗原である HA の少なくとも一部であればよく限定はされない。
25

[0048]

3. 検出方法

HA は、インフルエンザの臨床マーカーとして利用することができるため、本発明の抗体を生体試料と接触させ、生体試料中の HA を測定することにより、その測定結果を指標としてインフルエンザを検出又は診断することができる。

従って、本発明は、本発明の抗体又はその断片と生体試料とを接触させて、インフルエンザウイルスを検出することを特徴とする、インフルエンザウイルスの検出方法を提供する。

まず、インフルエンザ患者、インフルエンザが疑われる患者、あるいは健康診断受診者等の被験者から被検対象である生体試料を採取し、HA 測定試料を調製する。検出の対象となるインフルエンザウイルスは、インフルエンザ A 型ウイルス又はサブタイプであり、インドガン青海湖株、インドネシア株、安徽株、ベトナム株などが挙げられる。サブタイプとしては、例えば、H1N1、H1N2、H2N1、H2N2、H2N3、H3N2、H3N8、H4N6、H4N8、H5N1、H5N2、H5N3、H5N5、H5N8、H6N1、H6N2、H7N1、H7N2、H7N3、H7N7、H8N4、H9N2、H10N3、H11N1、H11N2、H11N9、H12N5、H13N6、H13N8、H15N8 又は H16N3 が挙げられ、これらの中から 1 種又は 2 種以上が選択される。特にインフルエンザ H5 亜型インフルエンザウイルス（例えば H5N1）であることが好ましい。

[0049]

生体試料としては、血液、痰、唾液、咽頭ぬぐい液、鼻汁鼻かみ液、鼻腔吸引液等が挙げられる。

本発明の検出方法においては、上記抗体と生体試料とを接触させる。「接触」とは、本発明の抗体又はその断片（抗体等ともいう）と被検対象である生体試料とが結合ないし反応し得る状態となるように両者を同一環境下に置くことを意味し、例えば、抗体等が含まれる容器（ウェル）に生体試料を添加すること、生体試料が含まれる容器（ウェル）に抗体等を添加すること、あるいは抗体等と生体試料とを同一容器中で培養することなどを意味する。HA の測定は、一般に行われる ELISA や EIA 等によって行うことができ、特に限定されるものではない。

[0050]

特に、インフルエンザ患者由来の HA には、上記アクセッション番号に示す HA タンパク質のアミノ酸配列が含まれているため、このアミノ酸配列に特異的に結

合する本発明の抗体は、H5N1 インフルエンザウイルスを検出するのに特に好ましい。ELISA による検出の場合、陰性対照と比較してシグナル強度が強いときは、被検試料中にインフルエンザウイルスが含まれる（すなわち陽性である）と判断することができる。

5 [0051]

4. 本発明の抗体を含むキット、試薬

本発明においては、HA に対する抗体をインフルエンザウイルスの検出用試薬又はキットとして使用することができる。

本発明の抗体（例えばモノクローナル抗体）をインフルエンザの検出又は診断
10 薬として用いる場合には、このモノクローナル抗体を他の溶媒や溶質と組み合わせて組成物とすることができる。例えば、蒸留水、pH 緩衝試薬、塩、タンパク質、界面活性剤などを組み合わせることができる。また、モノクローナル抗体を酵素標識することもできる。標識酵素として、HRP（セイヨウワサビペルオキシダーゼ）の他に、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸脱水酵素、 α -グルコシダーゼ、 α -
15 ガラクトシダーゼ、金コロイドなどを用いることができる。

[0052]

本発明をキットに用いる場合には、本発明の抗体の他に、上記の溶媒、溶質、酵素標識試薬、抗原固相化マイクロプレート、抗体希釈溶液、OPD（オルトフェニレンジアミン）錠、基質液、反応停止液、濃縮洗浄液、使用説明書などを含める
20 ことができる。また、反応の至適条件を与える緩衝液、反応生成物質の安定化に有用な緩衝液、反応物質の安定化剤などの反応媒体も本発明のキットに含まれ得る。

本発明においては、HA の mRNA 又は DNA を検出するため、PCR 法を採用することもできる。

25 PCR に使用するプライマーも、本発明の試薬又はキットに含めることができる。プライマーの設計の基礎とする領域は HA タンパク質を検出し得る限り、特に限定されるものではない。

プライマーの長さは、18~24 塩基、好ましくは 20~22 塩基である。プライマーの塩基配列としては以下のものを例示することができる。

ACA TGC CCA AGA CAT ACT GGA AAA GAC ACA CAA CGG (配列番号 1)

ATG TAA GAC CAT TCC GGC ACA TTG ATG A (配列番号 2)

[0053]

5. 医薬組成物

- 5 本発明の医薬組成物は、本発明の抗体を有効成分として含有するものであり、抗インフルエンザウイルス用として使用され、インフルエンザの予防又は治療に有効である。

本発明においてインフルエンザの予防又は治療の対象となるインフルエンザウイルスはインフルエンザ A 型ウイルス又はサブタイプであり、インドガン青海湖株、インドネシア株、安徽株、ベトナム株などが挙げられる。サブタイプは、例えば H1N1、H1N2、H2N1、H2N2、H2N3、H3N2、H3N8、H4N6、H4N8、H5N1、H5N2、H5N3、H5N5、H5N8、H6N1、H6N2、H7N1、H7N2、H7N3、H7N7、H8N4、H9N2、H10N3、H11N1、H11N2、H11N9、H12N5、H13N6、H13N8、H15N8 又は H16N3 から 1 種又は 2 種以上が選択される。中でも H5 亜型インフルエンザウイルス (例えば H5N1) であることが好ましい。

[0054]

本発明の抗体は、1 以上のインフルエンザウイルス (分離株又はサブタイプ) に被験体が感染するのを予防し、又は当該感染に対する被験体の感受性を減少させることができる。また、インフルエンザ感染に付随する 1 以上の症状又は合併症、例えば、倦怠感、悪寒、発熱、体痛、頭痛、咳、咽頭痛、鼻閉、副鼻腔閉、肺炎、気管支炎、耳感染、耳痛等を軽減若しくは解消し、又はこれらの症状の憎悪を防止する。さらに、これらの症状に罹患している期間を短くすることも可能である。

[0055]

25 本発明の抗体は、単独で、あるいは薬学的に許容される担体または希釈剤等と共に医薬組成物として投与することができ、またその投与は 1 回または数回に分けて行うことができる。

[0056]

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、
5 トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口又は非経口的に投与することができる。

[0057]

経口投与の場合、微晶質セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、
10 リン酸ジカリウム、グリシン等の種々の賦形剤を、崩壊剤、結合剤等とともに使用することができる。崩壊剤としては、澱粉、アルギン酸、ある種のケイ酸複塩などが挙げられ、結合剤としては、例えばポリビニルピロリドン、蔗糖、ゼラチン、アラビアゴムなどが挙げられる。また、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、タルク等の滑沢剤は錠剤形成に非常に有効である。経口投与
15 用として水性懸濁液又はエリキシルにする場合は、必要により乳化剤、懸濁化剤を併用し、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等、およびそれらを組み合わせた希釈剤と共に使用することができる。

非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される注射剤などが含まれる。

20 [0058]

注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に $1\mu\text{g/ml}$ ~ 100mg/ml の抗体濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、
被検者（例えばヒトインフルエンザ患者）に対し、1回の投与において $1\mu\text{g/kg}$ ~ 100mg/kg の割合で、好ましくは $100\mu\text{g/kg}$ ~ 15mg/kg の割合で、1日あたり1
25 回〜数回投与することができる。

但し、投与量はこの範囲に限定されるものではなく、患者の体重および症状や個々の投与経路によって変動し得る。治療する患者の薬物に対する感受性の差異、

薬剤の処方仕方、投与期間および投与間隔によっても投与量に変動が生じてくるので、場合によっては前記範囲の下限より低い投与量が適当なこともある。

[0059]

- 投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、エタノール等のアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体又は粉末組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

15 [実施例1]

[0060]

HA タンパク質に対する高親和性抗体の作製

(1) 抗原の作製

- リコンビナントワクシニアウイルス（rVV）によるヒスチジン-タグ（His-Tag）H5N1 抗原の大量精製を行った。相同組み換えベクターに H5N1 インフルエンザ HA 遺伝子を導入したリコンビナントプラスミドをウサギ腎細胞 RK13 に遺伝子導入し、親株ワクシニアウイルスを感染させ、HA を発現する組換えワクシニアウイルス（rVV）を得た。哺乳類細胞に感染させた後、TARON カラムクロマトグラフィーを用いた常法による His-Tag タンパク質精製をおこなった。

25 [0061]

<実験手法>

H5N1 HPAIV の HA タンパク質遺伝子は、すでにクローニングされ、プラスミドに挿入されている。プラスミドに挿入されている H5N1 HPAIV の HA タンパク質遺伝子（GenBank アクセッション番号：EF541402、EF541394、DQ65937、DQ371928）

の HA タンパク質遺伝子を、PCR の鋳型に用いた。すなわち、H5N1 HPAIV の HA タンパク質遺伝子の cDNA を鋳型とし、各遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行うことにより、H5N1 HPAIV の HA タンパク質遺伝子領域を調製した。

5 得られた断片をプラスミド pBMSF7C (Arch. Virol. vol. 138, p. 315-330, 1994 ; 特開平 6-237773 号公報 参照) にクローニングした。

また、本発明の組換えワクシニアウイルスに含まれる発現プロモーターは、ワクシニアウイルスのヘマグルチニン(HA)遺伝子領域内に挿入されるものであり、ボックスウイルス A 型封入体 (ATI) プロモーター及び複数反復するワクシニアウイルス 7.5 kDa タンパク質 (p7.5) 前期発現プロモーターにより構成されるハイブリットプロモーターを使用した。

[0062]

上記プラスミドベクターを、宿主であるワクシニアウイルスに導入することで、組換えワクシニアウイルスを作製した。プラスミドベクターの宿主への導入は、弱毒ワクシニアウイルス LC16m8 株を感染した動物細胞中にプラスミドベクター
15 pBMSF7C-mC11、pBMSF7C-mC12.1、pBMSF7C-mC12.2、pBMSF7C-mC12.3 をそれぞれ導入することにより、ワクシニアウイルスのヘマグルチニン (HA) 遺伝子領域において相同組換えを引き起こし、H5N1 HPAIV の HA タンパク質遺伝子をそれぞれ発現する組換えワクシニアウイルス (RVV-Flu HA (H5-mC11)、RVV-Flu HA (H5-mC12.1)、RVV-Flu HA (H5-mC12.2)、RVV-Flu HA (H5-mC12.3) を作製した。

20 作製した組換えワクシニアウイルスをウサギ腎細胞株である RK-13 細胞に感染させることで HA 蛋白質を発現させた。続いて、TARON カラムクロマトグラフィーを用いた常法による His-Tag を付加した HA タンパク質精製を行なった。

[0063]

<精製結果>

25 HA タンパク質の精製結果 (ウエスタンブロッティング及び CBB 染色) を図 1 に示す。

また、得られた精製 HA タンパク質を「H5mc12.2 抗原」とした。

ウエスタンブロッティング及びネイティブゲル電気泳動解析を行った結果、このタンパク質は、ウイルス粒子ヘマグルチン (HA) と同様に 3 量体を形成し糖鎖

修飾を受けている抗原であることが確認された（図2）。図2において、左側のパネルはインフルエンザウイルス粒子を構成しているHA蛋白質を示す図であり、中央のパネルはrVVにより発現させた精製HAタンパク質を示す図であり、右側のパネルは精製HAタンパク質が糖鎖修飾を受けていることを示す図である。なお、
5 精製蛋白収量は0.5-2mgであった。

[0064]

(2) 抗原の免疫

上記の通り得られた精製HAタンパク質（H5mcl2.2抗原）をBalb/c背景のGANP（登録商標）-トランスジェニックマウス（Tgマウス）に皮下免疫した。免疫方法
10 法は完全フロイントアジュバントに混和し、4週間後に不完全フロイントアジュバントに混和して追加免疫を行った。更に3回ブーストしたのち、最終免疫3日後に脾臓を摘出し、リンパ細胞を骨髓腫P3U1細胞とポリエチレングリコールを用いて融合した。融合後、骨髓腫 1×10^5 細胞/ウェル相当で96穴プレートに播種した。 2×10^5 細胞/ウェルのマウス胸腺細胞をフィーダー細胞とし、このフィー
15 ダー細胞とリコンビナントIL-6（0.25 unit/ml）をウェルに加え培養した。培養時にはHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選別を行った。

[0065]

(3) 抗原特異的高親和性モノクローナル抗体のスクリーニング

ハイブリドーマ上清中の特異的抗体活性を、リコンビナント抗原によって
20 ELISA法を用い測定した。

通常の陰性コントロールおよび上清不添加の際のペルオキシダーゼ反応（基質はOPD）の OD_{485} 測定値を基準として0.1以下を陰性とし、1.0以上を陽性クローンとして測定した。陽性クローンを再検査し、そのクローンを拡大培養し48穴プレートで3日間培養し、その上清を採取し、再度活性が $OD_{485} > 0.5$ であることを
25 確認した後、限界希釈法にて5個/ウェル、2個/ウェルで96穴プレートを用いてクローニングした。

クローニングは常法に従い、96穴にマウス胸腺細胞 4×10^5 個のフィーダー細胞存在下にリコンビナントIL-6 0.25 unit/ml存在下で細胞培養を行った。増殖クローンにオリジナル細胞と同等の活性を有するサブクローンを樹立、保存し、

この後の解析に用いた。上記操作は RPMI-1640、10%-加熱非動化牛胎児血清、HT
(ヒポキサンチン、チミジン) 培地を用いて行った。

得られたクローンを表 1 に示す。

[0 0 6 6]

5 [表 1]

No.	mAb #	rV/c12.2				Indonesia/05/2004				A/Anhui/2005				A/Vietnam/1194/2004				IF	
		1/10	1/100	1/1000		1/10	1/100	1/1000		1/10	1/100	1/1000		1/10	1/100	1/1000		Vac3	HPA(Mong.)
1	1D11	0.175	0.082	0.080		0.071	0.051	0.059		0.056	0.067	0.051						Nega	
2	1E6	0.201	0.087	0.074		0.058	0.071	0.052		0.082	0.062	0.053						Nega	
3	1H11	0.213	0.102	0.068		0.065	0.056	0.052		0.085	0.066	0.052						Nega	
4	2B3	0.161	0.084	0.065		0.060	0.058	0.051		0.061	0.069	0.051						Nega	
5	2D2	0.157	0.081	0.064		0.062	0.057	0.061		0.055	0.080	0.054						Nega	
6	3B9	2.063	0.984	0.218		2.521	1.525	0.377		2.627	1.797	0.477		2.054	1.287	0.338		Posi	Posi
7	3E10	2.636	2.434	1.724		0.270	0.158	0.079		0.073	0.055	0.051		2.026	1.994	1.292		Posi	Posi
8	3H9	0.198	0.088	0.076		0.071	0.061	0.058		0.068	0.056	0.052						Nega	
9	4C3	0.177	0.081	0.079		0.051	0.049	0.050		0.068	0.053	0.056						Nega	
10	4H11	0.270	0.091	0.070		0.054	0.050	0.050		0.060	0.047	0.050						Nega	
11	5A9	0.112	0.071	0.062		0.054	0.050	0.048		0.057	0.049	0.047						Nega	
12	5B4	0.293	0.087	0.061		0.062	0.053	0.047		0.065	0.047	0.051						Nega	
13	5C7	0.113	0.067	0.052		0.052	0.051	0.050		0.050	0.049	0.050						Nega	
14	5F1	0.091	0.066	0.054		0.058	0.052	0.049		0.063	0.052	0.049						Nega	
15	5F7	0.189	0.078	0.067		0.072	0.068	0.051		0.073	0.048	0.054						Nega	
16	5H7	2.568	2.427	1.172		2.560	2.536	1.544		2.472	2.246	0.914		1.958	1.908	0.834		Nega	Posi
17	6A3	0.137	0.106	0.085		0.076	0.059	0.050		0.078	0.052	0.052						Nega	
18	6C2	0.173	0.087	0.064		0.070	0.054	0.052		0.067	0.054	0.063						Nega	
19	6G11	0.192	0.083	0.064		0.062	0.049	0.049		0.065	0.050	0.061						Nega	
20	7B4	0.094	0.067			0.058	0.048	0.051		0.105	0.049	0.058						Nega	
21	7D8	0.118	0.074			0.060	0.050	0.053		0.067	0.055	0.066						Nega	
22	7F2	0.106	0.074			0.061	0.050	0.053		0.062	0.051	0.052						Nega	

[表1の続き]

23	7G10	2.359	1.989	0.768	2.504	2.296	1.046	2.456	1.942	0.708	1.814	1.593	0.553	Nega	Posi
24	8B12	0.120	0.068	0.070	0.068	0.060	0.056	0.074	0.060	0.060		ND		Nega	ND
25	8C1	2.090	0.785	0.177	2.139	1.028	0.245	2.353	1.326	0.311	1.843		0.167		Posi
26	8D2	0.364	0.112	0.071	0.058	0.053	0.055	0.056	0.055	0.055		ND			ND
27	10B9	2.566	2.710	2.192	0.222	0.193	0.099	0.073	0.055	0.053	0.099	0.087	0.400		Posi
28	10E1	0.111	0.089	0.083	0.056	0.050	0.053	0.060	0.052	0.055		ND			ND
29	11F11	0.133	0.101	0.077	0.071	0.059	0.057	0.081	0.050	0.058					ND
30	12B1	2.295	1.941	0.701	2.492	2.432	1.467	2.609	2.565	1.850	2.155	2.079	0.909		Posi
31	12D10	2.810	2.201	0.750	0.211	0.095	0.073	0.066	0.053	0.062	0.055	0.050	0.045		Posi
32	14A7	2.526	2.500	1.864	0.326	0.218	0.127	0.100	0.096	0.087	2.136	1.516	0.484		Posi
33	14B5	2.120	0.907	0.203	2.071	1.132	0.277	2.348	1.485	0.415	1.828	0.785	0.129		Posi
34	14G2	0.206	0.086	0.083	0.069	0.070	0.062	0.066	0.059	0.058					ND
35	15D3	0.379	0.112	0.083	0.069	0.069	0.060	0.063	0.076	0.243					ND
36	#29.18				0.337	0.141	0.077	0.066	0.058	0.059	0.165	0.072	0.047		Posi
37	7A5-1				0.157	0.145	0.108	0.056	0.054	0.059	2.009	2.146	1.582		Posi

表 1 において、「3E10」「7G10」「8C1」「14A7」と表示されたクローンは、それぞれ以下の受託番号又は受領番号を有する寄託クローンを表す。

「3E10」 : NITE BP-01216

「7G10」 : NITE BP-01217

5 「8C1」 : NITE ABP-01737

「14A7」 : NITE ABP-01738

[実施例 2]

[0067]

10 GANP H5 モノクローナル抗体特異性評価

1. 高病原性トリインフルエンザウイルス H5 亜型のイムノクロマト診断開発に向けたモノクローナル抗体評価

<方法>

本実施例では、実施例 1 で作製したモノクローナル抗体の反応性評価を行った。

15 ウイルスに対する評価は、高病原性、低病原性 H5N1 ウイルスの感染細胞に対する蛍光免疫染色を行い、他の株種については HA 組み換えタンパク質を用い ELISA 法にて検討した。

・ 蛍光免疫染色方法 : 細胞にウイルスを感染させ、PFA 固定後、抗体培養上清を反応させ蛍光顕微鏡にて染色像を観察。

20 ・ ELISA 法 : H5 HA 組み換えタンパク質をプレートへ固相化、抗体培養上清を反応させた。二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (SouthernBiotech) を使用し、化学発色後、吸光度を測定した。

[0068]

<評価結果>

25 表 1 に示す 35 クローンのうち、10 クローンにおいて H5 ウイルス Mongolia へ陽性反応を示し、その他はクローンにより異なる反応性が示された。
5H7-11-11-1 のみ H3N2 ウイルス感染細胞での弱い反応性が認められた (表 2)。

[表 2]

			I F						ELISA				
No.	origin	clone	H5N1 subtype			other subtype			H5N1 recombinant HA				isotype
			高病原性		低病原性	H1N1	H3N2	B					
			Mongolia	Hokkaido	Vac3	(WSN)	(Aichi)	Mass	His-HA	Anhui	Vietnam	Indonesia	
1	GANP	8C1-4-20	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	IgG ₁ κ
2		12B1-26-31-13	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	IgG ₁ κ
3		3B9-11-6-9	○	○	○	x	x	x	○	○	○	○	IgG ₁ κ
4		3E10-8-1-11	○	x	○	x	x	x	○	x	○	x	IgG ₁ κ
5		10B9-6-3-31	○	x	○	x	x	x	○	x	○	x	IgG ₁ κ
6		7G10-31-29	○	○	x	x	x	x	○	○	○	○	IgG ₁ κ
7		14B3-23-29	○	○	x	x	x	x	○	○	○	○	IgG ₁ κ
8		5H7-11-11-1	○	○	x	x	○	x	○	○	○	○	IgG _{2a} κ
9		14A7-3-21-1	○	x	○	x	x	x	○	x	○	x	IgG ₁ κ
10		12D10-8-8	○	x	x	x	x	x	○				IgG _{2b} κ

表2において、丸印（○）は陽性であることを、バツ印（×）は陰性であることを意味する。

[0069]

- 5 また、各抗体の解離定数を ProteON XPR36 (Bio-Rad) を用いて測定した。結果を表3に示す。

[表3]

抗体	抗原	KD (M)
8C1-4-20	A/Anhui/1/2005	1.4×10^{-11}
	A/Indonesia/5/2005	1.9×10^{-9}
	A/Vietnam/1194/2004	1.3×10^{-8}
	rVV H5HA cl2.2	5.1×10^{-5}
12B1-26-31-13	A/Anhui/1/2005	$1.6 \times 10^{-11} > *$
	A/Indonesia/5/2005	9.4×10^{-10}
	A/Vietnam/1194/2004	5.7×10^{-10}
	rVV H5HA cl2.2	1.1×10^{-8}
3B9-11-6-9	A/Anhui/1/2005	3.6×10^{-10}
	A/Indonesia/5/2005	5.0×10^{-5}
	A/Vietnam/1194/2004	3.0×10^{-9}
	rVV H5HA cl2.2	1.2×10^{-4}
14A7-3-21-1	A/Anhui/1/2005	結合せず
	A/Indonesia/5/2005	結合せず
	A/Vietnam/1194/2004	2.8×10^{-9}
	rVV H5HA cl2.2	3.4×10^{-8}

*Kd が測定限界以下 (1×10^{-6} /s) であったため、 1×10^{-6} /s 以下と仮定して計算した。

[0070]

2. イムノクロマト上での抗体組み合わせ評価

<方法>

- 5 表2に記載の10クローンのうち9クローン、並びに表1に記載の7A5-1及び29.18クローン(Balb/c由来の対照クローン)の11クローンを用いて、イムノクロマトグラフィーストリップ上での抗体組み合わせ評価を行った。

- 抗原として、高病原性H5N1ウイルスであるMongolia及びHokkaido、並びに低病原性H5N1ウイルスであるVac3を用い、それぞれ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ (pfu/ml)の濃度でアドテック社製ウイルス抽出液に溶解し、添加した。15分後に目視にて陽性
- 10 ラインを評価した。

[0071]

<評価結果>

- 各抗体クローンと各ウイルス株との組み合わせ(90通り)を検討した結果、
- 15 Mongoliaに対する強い陽性反応が認められるとともに弱いながらもHokkaidoへの反応性を示した7キットを、固相化抗体と金コロイド標識抗体との候補抗体ペアとして選択した(表4)。

[表4]

No.	Reactivity	kit No.	固相化抗体	金コロイド標識抗体	Mongolia			Hokkaido			Vac3			H3N2(Aichi)	APR8	B(Mass)
					10^7	10^6	10^5	10^7	10^6	10^5	10^7	10^6	10^5	10^6	10^7	10^7
1	Mong./Vac3	9	7A5-1	5H7	◎	△	x	x	—	—	△	x	x	x	x	x
2	3株反応	17	8C1	5H7	○	△	x	○	x	x	△	x	x	x	x	x
3		23	3E10	5H7	◎	x	x	x	—	—	△	x	x	x	x	x
4		45	7A5-1	14A7	◎	○	x	x	—	—	◎	△	x	x	x	x
5	Mong./Vac3	51	3E10	7G10	◎	○	x	x	—	—	△	x	x	x	x	x
6		54	3E10	14A7	◎	○	x	x	—	—	◎	△	x	x	x	x
7		87	14A7	5H7	◎	○	x	x	—	—	◎	△	x	x	x	x

20

表4において、二重丸(◎)は色見本と比較して、強い反応を表し、丸(○)は同等の反応を表し、三角(△)は弱い反応を表し、バツ印(x)は反応しなかったことを表す。

[0072]

- 25 2-1 リコンビナントHAタンパク質を用いた特異性評価

<方法>

上記選択した7キットのうち、反応性の高い候補4キットを用い、H5亜型とその他の亜型リコンビナントHAタンパク質(Sino Biological Inc.)に対する特異性評価を行った。評価方法は、反応性がない0から8段階とし、数字が大きくなるほど陽性強度が増すものとした。また、色見本と比較して、強い反応を二重丸(◎)、弱い反応を三角(△)、反応しなかったことをバツ印(×)とした。

[0073]

<評価結果>

H5亜型に対して最も広い反応性を示すのは17番(固相8C1-金コロイド標識5H7)であった。

10 候補イムノクロマトキットを用いたH5亜型特異性評価結果を表5に示す。

[表5]

Type	HA type	clade	金コロイド イムノクロマト Kit No.							
			17		45		54		87	
			1μg	0.1μg	1μg	0.1μg	1μg	0.1μg	1μg	0.1μg
H5N1	A/bar-headed goose/Qinghai/14/2008	0	6	4	0	0	0	0	1	0
	A/Hong Kong/483/97	0	8	7	0	0	0	0	1	0
	A/Vietnam/1194/2004	1	◎	3	◎	3	◎		◎	
	A/Cambodia/R0405050/2007	1.1	7	6	5	4	4	3	8	6
	A/duck/Hunan/795/2002	2.1.1	8	7	7	6	5	6	8	7
	A/Indonesia/5/2005	2.1.3	◎	◎	△	×	△	△	×	×
	A/chicken/India/NIV39481/2000	2.2	8	7	7	7	4	5	0	0
	A/Egypt/2321-NAMRLB/2007	2.2.1	7	6	4	5	45	45	8	7
	A/Turkey/1/2005	2.2.1	8	7	75	8	75	8	7	7
	A/Common magpie/Hong Kong/2256/2006	2.3.4	8	7	0	0	0	0	0	0
	A/Anhui/1/2005	2.3.4	◎	◎	×	×	×	×	×	×
	A/goose/Guang/337/2006	4	8	7	0	0	0	0	0	0
H5N2	A/American green-winged teal/California/HKAF609/07	北米	0	0	7	4	7		0	
H5N3	A/duck/Hokkaido/167/2007	nonGD	8	4	3	5	3		65	
H5N8	A/duck/NY/191255-59/2002	北米	0	0	7	4	6		0	

表5において、丸や三角等の記号は前記と同様である。また数字は色見本と比較したときのシグナルレベルを示す。

[0074]

また、候補イムノクロマトキットを用いた交差性評価結果を表6に示す。

[表 6]

Tested recombinant HA protein of influenza virus					
Subtypes	Strain Name	17	45	54	87
H1N1pdm	A/California/7/2009	0	0	0	0
H1N1	A/BrevigMission/1/1918	0	0	0	0
H2N2	A/Japan/305/1957	0	0	0	0
H3N2	A/Brisbane/10/2007	0	0	0	0
	A/Wisconsin/67/X-161/2005	0	0	0	0
H4N6	A/mallard/Ohio/657/2002	0	0	0	0
H6N1	A/northern shoveler/California/HKWF115/2007	0	0	0	0
H8N4	A/pintail duck/Alberta/114/1979	0	0	0	0
H9N2	A/Hong Kong/1073/1999	0	0	0	0
H10N3	A/duck/Hong Kong/786/1979	0	0	0	0
H11N2	A/duck/Yangzhou/906/2002	0	0	0	0
H12N5	A/green-winged teal/ANB/199/1991	0	0	0	0
H13N8	A/black-headed gull/Netherlands/1/2000	0	0	0	0
H15N8	A/duck/Australia/341/1983	0	0	0	0
H16N3	A/black-headed gull/Sweden/5/1999	0	0	0	0
B	B/Florida/04/2006	0	0	0	0

[0075]

2-2 蛍光標識を用いたイムノクロマト法による H5 亜型の認識

5 方法

反応性の特に高い二種類の組み合わせに対して、蛍光ラテックスビーズ（藤倉化成 3602-613）を金コロイドの代わりに標識し、陽性シグナルを蛍光イムノクロマトリーダー（コニカミノルタ）によって判定した。測定対象は H5 亜型の複数の種類のウイルスを用いた。

10 [0076]

標識法

0.3mg の抗体を 0.4% の蛍光ビーズ懸濁液 1.3ml と混ぜ合わせ、室温で 1 時間反応させた。遠心分離によって上清を破棄後、1%BSA 溶液を加え、1 時間ブロッキングした。遠心分離によって上清を破棄後、pH7.7 の 0.1%Trion X-100 溶液で洗浄し、
 15 pH7.7 の 1%BSA 溶液に懸濁し、37℃で 48 時間インキュベートした。これによってできた蛍光ビーズ標識済み抗体を金コロイドの標識抗体の代わりに用いた。

[0077]

イムノクロマト法

100 μ l の H5 亜型ウイルス懸濁液 (105pfu/反応) をストリップに滴下し、イムノクロマトリーダーにセットした。陽性反応はイムノクロマトリーダーによって 15
5 分と 20 分に測定される。シグナルとバックグラウンドの比 (S/B 値) が 1 を超した場合を陽性反応として測定した。

[0078]

結果

No. 17 はユーラシアタイプの H5 亜型を網羅して反応したが、北米タイプの H5 亜
10 型は認識できなかった (表 7)。一方、No. 45 はユーラシアタイプの H5 亜型の一部は認識できなかったが、北米型は認識可能であった (表 7)。

[表 7]

Tested influenza A virus			FLIC type	
Subtypes	Strain Name	Genotype (clade)	No.17	No.45
H5N1	A/Hong Kong/483/1997	Eurasian (clade 0)	+	-
	A/Muscovy duck/Vietnam/ OIE-559/2011	Eurasian (clade 1.1)	+	+
	A/whooper swan/ Mongolia/3/2005	Eurasian (clade 2.2)	+	+
	A/whooper swan/ Hokkaido/1/2008	Eurasian (Clade 2.3.2.1)	+	-
	A/whooper swan/ Hokkaido/4/2011	Eurasian (Clade 2.3.2.1)	+	-
	A/peregrine falcon/ Hong Kong/810/2009	Eurasian (Clade 2.3.4)	+	-
	A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007	Eurasian (outlier)	+	+
	A/chicken/Taiwan/1209/2003	North American	-	+
	A/duck/Pennsylvania/ 10218/1984	North American	-	+

+は陽性、-は陰性を示す。

[0 0 7 9]

5 2-3 蛍光イムノクロマトを用いた H5 亜型最小検出感度試験

方法

前述の蛍光イムノクロマト法でウイルスの最小検出量を測定した。

10 イムノクロマト法

多段階希釈した 100 μ l の H5 亜型ウイルス懸濁液をストリップに滴下し、イムノクロマトリーダーにセットした。陽性反応はイムノクロマトリーダーによって 15

分と 20 分に測定される。シグナルとバックグラウンドの比 (S/B 値) が 1 を超した場合を陽性反応として測定した。

測定限界

- 多段階希釈状態のウイルス量に対しての S/B 値をプロットし近似線を引いた。これがカットオフ値である S/B 値 = 1 との交点を計算し、それを測定限界とした。

[0 0 8 0]

結果

それぞれのキットの検出限界は表 8 の通りとなった。この感度は金コロイド法と比較して数十倍の感度上昇が見られた。

10

[表 8]

Tested H5N1 influenza virus		FLIC type	
enotype (clade)	Strain Name	No.17	No.45
Eurasian (calde2.2)	A/whooper swan/Mongolia/3/2005	8.54×10^3 pfu	6.28×10^3 pfu
Eurasian (Clade 2.3.2.1)	A/whooper swan/Hokkaido/1/2008	5.77×10^4 pfu	No signal
Eurasian (outlier)	A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007	7.43×10^4 pfu	2.63×10^3 pfu

表中の数字は、ヒト反応に必要な最少感染価 (pfu) を表す。

[0 0 8 1]

- 15 2-4 蛍光イムノクロマトを用いた非 H5 亜型ウイルスに対しての交差反応性試験

方法

前述の蛍光イムノクロマト法で非 H5 亜型ウイルスに対しての交差性を検討した。

20

イムノクロマト法

多段階希釈した 100 μ l の非 H5 亜型ウイルス懸濁液 (107pfu/反応) をストリップに滴下し、イムノクロマトリーダーにセットした。陽性反応はイムノクロマトリーダーによって15分と20分に測定される。シグナルとバックグラウンドの比(S/B値) が1を超した場合を陽性反応として測定した。

5 [0082]

結果

非 H5 亜型のウイルスを H1 から H16 亜型まで検討したが、交差性は見られなかった。本方法の特異性の高さが示された (表 9)。

[表 9]

Tested influenza A virus		FLIC type	
Subtypes	Strain Name	No.17	No.45
H1N1	A/WSN/1933	-	-
	A/PR/8/1934	-	-
	A/duck/Tottori/723/1980	-	-
H2N2	A/Adachi/2/1957	-	-
H3N2	A/Aichi/2/1968	-	-
H3N8	A/duck/Mongolia/4/2003	-	-
H4N6	A/duck/Czech/1956	-	-
H6N2	A/Turkey/Massachusetts/3740/1965	-	-
H7N7 HPAIV	A/chicken/Netherlands/2586/2003	-	-
H7N7	A/seal/Massachusetts/1/1980	-	-
H8N4	A/turkey/Ontario/1968	-	-
H9N2	A/turkey/Wisconsin/1966	-	-
H10N7	A/chicken/Germany/N/1949	-	-
H11N6	A/duck/England/1/1956	-	-
H12N5	A/duck/Alberta/60/1976	-	-
H13N6	A/duck/Siberia/272PF/1998	-	-
H14N5	A/mallard/Astrakhan/263/1982	-	-
H15N8	A/duck/Australia/341/1983	-	-
H16N3	A/black-headed gull/Sweden/5/1999	-	-

10

+は陽性、-は陰性を示す。

[0083]

2-5 蛍光イムノクロマトを用いた非 H5 亜型 HA タンパクに対しての交差反応性試験

方法

- 5 前述の蛍光イムノクロマト法で非 H5 亜型ウイルス精製 HA タンパクに対しての交差性を検討した。

イムノクロマト法

- 10 多段階希釈した 100 μ l の非 H5 亜型ウイルス懸濁液 (107pfu/反応) をストリップに滴下し、イムノクロマトリーダーにセットした。陽性反応はイムノクロマトリーダーによって15分と20分に測定される。シグナルとバックグラウンドの比(S/B値)が1を超した場合を陽性反応として測定した。

[0084]

結果

- 15 非 H5 亜型のウイルスの HA タンパクを複数検討したが、交差性は見られなかった。本方法の特異性の高さが示された (表 10)。

[表 10]

Tested recombinant HA protein of influenza virus		FLIC type	
ubtypes	Strain Name	No.17	No.45
IN1pdm	A/California/7/2009	-	-
H1N1	A/BrevigMission/1/1918	-	-
H2N2	A/Japan/305/1957	-	-
H3N2	A/Brisbane/10/2007	-	-
	A/Wisconsin/67/X-161/2005	-	-
H4N6	A/mallard/Ohio/657/2002	-	-
H6N1	A/northern shoveler/California/HKWF115/2007	-	-
H8N4	A/pintail duck/Alberta/114/1979	-	-
H9N2	A/Hong Kong/1073/1999	-	-
H10N3	A/duck/Hong Kong/786/1979	-	-
H11N2	A/duck/Yangzhou/906/2002	-	-
H12N5	A/green-winged teal/ANB/199/1991	-	-
H13N8	A/black-headed gull/Netherlands/1/2000	-	-
H15N8	A/duck/Australia/341/1983	-	-
H16N3	A/black-headed gull/Sweden/5/1999	-	-

以上のことから、本発明の抗体は、組み合わせ如何によってすべての H5 亜型を診断し得ることが示された。

[実施例 3]

[0085]

- 5 H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対する GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマクローンの中和・阻害活性の評価 (1)

本実施例では、GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマ培養上清の低病原性インフルエンザウイルス H5N1-Vac3 株に対する中和・阻害活性の評価を行った。

<方法>

- 10 インフルエンザウイルス H5N1-Vac3 株に対する阻害試験を以下の手順で行った。
- 1) アッセイ 3 日前に MDCK 細胞を 6well プレートへ 2×10^5 cells/well で播いた。
 - 2) 1%BSA を含有する MEM 培地で希釈したインフルエンザウイルス H5N1 (1×10^3 PFU/ml) ウイルス液 0.1ml と、100 倍、1000 倍、10000 倍に希釈したハイブリドーマ培養上清 0.1ml とを混和し、37°C で 1 時間中和反応を行った。
 - 15 3) インフルエンザウイルス液とハイブリドーマ培養上清の混液 0.1ml を各 well に加え、全体に行き渡らせた。
 - 4) 37°C, 1 時間吸着した。15 分おきにプレートを揺らした。
 - 5) ウイルス液を取り除き、BSA (-) /MEM で 1 回洗浄した。
 - 6) ハイブリドーマ培養上清 1/100、1/1000、1/10000 量添加、10 μ g/ml アセチル
 - 20 トリプシン、0.8%アガロース加 1%BSA/MEM 2ml を各 well に加えた。
 - 7) アガロース凝固後、プレートの上下を反転させ、CO₂ インキュベーターへ入れた。
 - 8) 37°C, 2 日培養した。
 - 9) 10%ホルマリンを加えた。室温, 1 時間固定した。
 - 25 10) ホルマリンとアガロース培地を取り除き、水洗した。
 - 11) 1%クリスタルバイオレットで 1 時間染色した。
 - 12) 水洗、乾燥後にプラーク数を判定した。

[0086]

<結果>

図3に培養後のプレートの写真を示す。陰性コントロール（無添加）と比較して、3E10, 10B9, 14A7 及び 3B9 では、プラークの大きさ及び数に明らかに差が見られた。なお、使用したウイルスの量を、Back-titration（無添加）を行って確認したが、所定のウイルス量であった。

5 [実施例4]

[0087]

H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対する GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマクローンの中和・阻害活性の評価（2）

本実施例では、抗体作製時に使用した抗原と同じ H5N1 クレード (clade 2.2) の
10 高病原性トリインフルエンザウイルスを用いて、中和・阻害活性の評価を行った。
実施例2又は3で中和活性を示したかあるいは免疫蛍光染色 (IF), ELISA で強い
結合性を示した9種類（表2中、12B1-26-31-13を除く9種類）の GANP-Tg マウ
ス由来ハイブリドーマ培養上清の、高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1
A/whooper swan/Mongolia/3/05) 株に対する中和・阻害活性について、in vitro
15 での評価を行った。

[0088]

<方法>

実験は P3 施設内で行った。ウイルス感染価はプラーク形成能によって決定した。

インフルエンザウイルス H5N1 A/whooper swan/Mongolia/3/05 株に対する阻害
20 試験を以下の手順で行った。

- 1) アッセイ3日前に MDCK 細胞を 6well プレートへ 2×10^5 cells/well で播いた。
- 2) 1%BSA を含有する MEM 培地で希釈したインフルエンザウイルス H5N1
(1×10^3 PFU/ml) ウイルス液 0.1ml と、100 倍、1000 倍又は 10000 倍に希釈したハ
イブリドーマ培養上清 0.1ml とを混和し、37℃で1時間中和反応を行った。
- 25 3) インフルエンザウイルス液とハイブリドーマ培養上清の混液 0.1ml を各 well
に加え、全体に行き渡らせた。
- 4) 37℃, 1時間吸着した。15分おきにプレートを揺らした。
- 5) ウイルス液を取り除き、BSA (-)/MEM で1回洗浄した。

6) ハイブリドーマ培養上清 1/100、1/1000、1/10000 量添加、10 μ g/ml アセチルトリプシン、0.8%アガロース加 1%BSA/MEM 2ml を各 well に加えた。

7) アガロース凝固後、プレートの上下を反転させ、CO₂ インキュベーターへ入れた。

5 8) 37°C, 3 日培養した。

9) 10%ホルマリンを加えた。室温, 1 時間固定した。

10) ホルマリンとアガロース培地を取り除き、水洗した。

11) 1%クリスタルバイオレットで 1 時間染色した。

12) 水洗、乾燥後にプラーク数を判定した。

10 H5N1 のプラーク形成価を測定し、1 プレート当り 50~60 プラークを形成する希釈条件を決定した後、その条件でハイブリドーマ培養上清 100 μ l をプレートに添加し、ウイルス感染を阻止する活性を中和活性として測定した。

[0089]

<結果>

15 結果を図 4 に示す。

図 4 において、各プレートの左上に記載の数字は、ハイブリドーマ培養上清 (1 ~ 4 番) の 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 希釈添加時のプラーク数を示している。コントロール群は Back titration (Back) とし、中和価測定に使用したウイルス液を原液 (1 倍) 及び 10 倍希釈で添加した。

20 また抗ウイルス効果のコントロールとしてリレンザ (グラクソ・スミスクライン) を 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M の濃度で添加し、プラークの出現が出来ることを確認した。

図 4 に示したように、3B9-11-6-9, 3E10-8-1-11, 10B9-6-3-31, 14A7-3-21-1 の 4 種類のクローンが高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 A/whooper swan/Mongolia/3/05) 株に対する中和・増殖阻害活性を示した。

25

[実施例 5]

[0090]

H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対する GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマクローンの中和・阻害活性の評価 (3)

本実施例では、抗体作製時に使用した抗原と異なった H5N1 クレード (clade 2.3.2) の高病原性トリインフルエンザウイルスを用いて実施した。実施例 4 で中和活性を示した 3B9-11-6-9, 3E10-8-1-11, 10B9-6-3-31, 14A7-3-21-1 の 4 種類の GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマ腹水の高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08) 株に対する中和・阻害活性の評価を行った。

[0091]

<方法>

インフルエンザウイルス H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 株に対する阻害試験を以下の手順で行った。

- 1) アッセイ 3 日前に MDCK 細胞を 6well プレートへ 2×10^5 cells/well で播いた。
- 2) 1%BSA を含有する MEM 培地で希釈したインフルエンザウイルス H5N1 (1×10^3 PFU/ml) ウイルス液 0.1ml と、1000 倍、10000 倍、100000 倍に希釈したハイブリドーマ培養上清 0.1ml とを混和し、37°C で 1 時間中和反応を行った。
- 3) インフルエンザウイルス液とハイブリドーマ培養上清の混液 0.1ml を各 well に加え、全体に行き渡らせた。
- 4) 37°C, 1 時間吸着した。15 分おきにプレートを揺らした。
- 5) ウイルス液を取り除き、BSA (-) /MEM で 1 回洗浄した。
- 6) ハイブリドーマ培養上清 1/1000、1/10000、1/100000 量添加, 10 μ g/ml アセチルトリプシン, 0.8%アガロース加 1%BSA/MEM 2ml を各 well に加えた。
- 7) アガロース凝固後、プレートの上下を反転させ、CO₂ インキュベーターへ入れた。
- 8) 37°C, 3 日培養した。
- 9) 10%ホルマリンを加えた。室温, 1 時間固定した。
- 10) ホルマリンとアガロース培地を取り除き、水洗した。
- 11) 1%クリスタルバイオレットで 1 時間染色した。
- 12) 水洗、乾燥後にプラーク数を判定した。

[0092]

<結果>

図5に示したように3B9-11-6-9クローンが高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08)株に対する中和・増殖阻害活性を示した。

[実施例6]

5 [0093]

HA 蛋白 / GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマ IgG のマウスへの高病原性トリインフルエンザウイルス感染に対する防御効果

10 *in vitro* 試験(実施例5)において、3B9-11-6-9クローンに、H5N1 A/whooper swan/Mongolia/3/05 (clade2. 2) 株及び H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 株 (clade2. 3. 2) の高病原性トリインフルエンザウイルスに対する中和・増殖阻害活性が認められたので、本実施例では、高病原性トリインフルエンザウイルス感染マウスに対する治療効果 (*in vivo* における試験) を検討した。

[0094]

<方法>

15 ハイブリドーマの投与7日前に Crlj:CD1-Fxn1 nu/nu (7週令) マウスをプリスタンで処理し、7日後にマウス各4匹に 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞 (3B9-11-6-9) を腹腔内注入した。2週間後に腹水 35 ml~50 ml を得て、IgG 抗体精製を行った。HiTrap Protein G HP カラムを用いて腹水から 12~30 mg の IgG 抗体を精製した。

20 攻撃感染ウイルスとして H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 (200 PFU/mouse ; 3.3MLD₅₀) を用い、動物として Balb/c マウス (8~10週令、♀) を用いた。実験群としてコントロールの Vehicle 処理群は抗体精製時に用いた試薬を使用し (93.5 mM Glycine-HCl, 65.4 mM Tris-HCl : PBS (-) = 0.836:1.164)、被検抗体は各群 8 匹を用いた。なお、感染3日後に4匹/群ずつ剖検し、実験終了
25 時に4匹/群ずつ剖検した。

非感染(希釈液)接種群(一群4匹)は体重変化のモニタリングに用いた。抗体量は 15mg/kg /マウスとし、Day0 (ウイルス感染直前) と Day2 に眼窩静脈巣より投与した。図6パネルAに方法を示した。

[0095]

<結果>

結果を図6に示す。

図6パネルBには、インフルエンザウイルスによる攻撃感染後の体重の変化を示した。14A7-3-21-1 クローンを投与した感染マウス群 (●) 及び Vehicle (▲) を投与した感染マウス群では、感染6日以降に顕著な体重減少が認められた。これに対し、3B9-11-6-9 クローンを投与した感染マウス群 (■) 及び非感染マウス群 (◆) では体重の低下は認められなかった。

図6パネルCには、攻撃感染後の生存率の変化を示した。感染11日において、14A7-3-21-1 クローンを投与した感染マウス群 (●) では25%の生存率、及び Vehicle を投与した感染マウス群 (▲) では50%の生存率となった。これに対し、3B9-11-6-9 クローンを投与した感染マウス群 (■) 及び非感染マウス群 (◆) では生存率の低下は認められなかった。

以上の結果から、H5N1 高病原性トリインフルエンザウイルスに対して幅広い結合性を有する3B9-11-6-9 クローンは、高病原性トリインフルエンザウイルス感染に対しても顕著な治療効果を示した。

[実施例7]

[0096]

HA 蛋白 / GANP-Tg マウス由来ハイブリドーマ IgG のマウスへの高病原性トリインフルエンザウイルス感染に対する防御効果

in vitro 試験 (実施例6) において、3B9-11-6-9 クローンに H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 株 (clade2. 3. 2) の高病原性トリインフルエンザウイルスに対する治療効果を示したことが認められたので、本実施例では、高病原性トリインフルエンザウイルス感染後、4, 6, 8 日後に抗体を投与してマウスに対する治療効果 (in vivo における試験) を検討した。

[0097]

<方法>

ハイブリドーマの投与7日前に Crlj:CD1-Fxn1 nu/nu (7週令) マウスをプリスタンで処理し、7日後にマウス各4匹に 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞

(3B9-11-6-9) を腹腔内注入した。2 週間後に腹水 35 ml~50 ml を得て、IgG 抗体精製を行った。HiTrap Protein G HP カラムを用いて腹水から 12~30 mg の IgG 抗体を精製した。

- 攻撃感染ウイルスとして H5N1 A/whooper swan/Hokkaido/1/08 (200
5 PFU/mouse ; 3.3MLD₅₀) を用い、動物として Balb/c マウス (9 週令、♀) を用いた。実験群としてコントロールの Vehicle 処理群は抗体精製時に用いた試薬を使用し (93.5 mM Glycine-HCl, 65.4 mM Tris-HCl : PBS (-) =0.836:1.164)、被検抗体は各群 5 匹を用いた。実験終了時に生存個体は剖検した。

- 非感染 (希釈液) 接種群 (一群 4 匹) は体重変化のモニタリングに用いた。抗
10 体量は 15mg/kg /マウスとし、Day0、Day4、Day6、Day8 に眼窩静脈巣より投与した。

[0 0 9 8]

<結果>

結果を図 7 に示す。

- 15 図 7 は、抗 HA モノクローナル抗体投与による治療効果の検討結果を示す図である (BALB/c mice (Female, 9-week-old)、H5N1 HPAIV 300 PFU、15mg/kg 3B9 投与群)。

- 図 7 パネル A には、インフルエンザウイルスによる攻撃感染後の体重の変化を示した。3B9-11-6-9 クローンを Day8 に投与した感染マウス群 (●) 及び非投与を感染マウス群 (□) では、感染 6 日以降に顕著な体重減少が認められた。これに対し、3B9-11-6-9 クローンを Day0 に投与した感染マウス群 (△) 及び非感染マウス群 (◆) では体重の低下は認められなかった。3B9-11-6-9 クローンを Day4 (▲) 及びに Day6 (○) に投与した感染マウス群では一時的な体重の低下は認め
25 られなかった。

図 7 パネル B には、攻撃感染後の生存率の変化を示した。感染 14 日において、3B9-11-6-9 クローンを投与した感染マウス群 Day0 (△)、Day4 (▲)、Day6 (○) 及び Day8 に投与した感染マウス群 (●) を示した。Day4 (▲) 75%、Day6 (○) 50%及び Day8 (●) 0%の生存率であった。これに対し、3B9-11-6-9 クローンを

Day0 (△) に投与した感染マウス群 (■) 及び非感染マウス群 (◆) では生存率の低下は認められなかった。

以上の結果から、H5N1 高病原性トリインフルエンザウイルスに対して幅広い結合性を有する 3B9-11-6-9 クローンは、高病原性トリインフルエンザウイルス感染後の投与に対しても顕著な治療効果を示した。

産業上の利用可能性

[0099]

本発明により、強毒性インフルエンザであるインドネシア株、安徽株、ベトナム株の全てを認識することのできる高親和性モノクローナル抗体 ($KD = 1 \times 10^{-10}$ M レベル) が提供される。本発明の抗体により、超高感度の診断キットを作製することが可能となる。また、様々なクレードのウイルスの検出のみならず、ウイルスの増殖阻害にも有効であることから、医療及び臨床検査に極めて有用である。

受託番号

[0100]

ハイブリドーマ「3E10 (rVV c12.2)」及び「7G10 (rVV c12.2)」は、いずれも、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 NITE バイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター) にブダペスト条約に基づき国際寄託した (原寄託日: 2012 年 2 月 1 日)。

受託番号は、「3E10 (rVV c12.2)」については NITE BP-01216 であり、「7G10 (rVV c12.2)」については NITE BP-01217 である。

ハイブリドーマ「8C1 (rVV c12.2)」及び「14A7 (rVV c12.2)」は、いずれも、上記特許微生物寄託センターにブダペスト条約に基づき国際寄託した (原寄託日: 2013 年 10 月 18 日)。

受領番号は、「8C1 (rVV c12.2)」については NITE ABP-01737 であり、「14A7 (rVV c12.2)」については NITE ABP-01738 である。

配列表フリーテキスト

[0 1 0 1]

配列番号 1 : 合成 DNA

5 配列番号 2 : 合成 DNA

請求の範囲

[請求項 1]

- 5 少なくとも 1×10^{-10} M の解離定数を有する、インフルエンザウイルスの HA タンパク質に対する抗体。

[請求項 2]

解離定数が 1×10^{-10} M ~ 1×10^{-13} M である、請求項 1 に記載の抗体。

[請求項 3]

- 10 インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである請求項 1 に記載の抗体。

[請求項 4]

インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである請求項 3 に記載の抗体。

[請求項 5]

- 15 インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2.2)、インドネシア株 (clade 2.1)、安徽株 (clade 2.3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008: clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 4 に記載の抗体。

- 20 [請求項 6]

抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体。

[請求項 7]

- 25 受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 であるにより産生される、請求項 6 に記載の抗体。

[請求項 8]

抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体又はヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

[請求項 9]

請求項 1 に記載の抗体が結合する部位に結合する抗体。

[請求項 1 0]

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体の断片。

[請求項 1 1]

- 5 請求項 6 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

[請求項 1 2]

受託番号が NITE BP-01216 若しくは NITE BP-01217、又は受領番号が NITE ABP-01737 若しくは NITE ABP-01738 であるハイブリドーマ。

[請求項 1 3]

- 10 請求項 1 に記載の抗体の製造方法であって、以下の工程：

(a) 組換えワクシニアウイルスを用いて発現させたインフルエンザウイルスの HA タンパク質を用いて非ヒト哺乳動物を免疫する工程、及び

(b) 当該非ヒト哺乳動物から抗体を採取する工程
を含む、前記方法。

- 15 [請求項 1 4]

請求項 6 又は 7 に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、以下の工程：

(a) 組換えワクシニアウイルスを用いて発現させたインフルエンザウイルスの HA タンパク質を用いて非ヒト哺乳動物を免疫する工程、

(b) 前記免疫された非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を採取する工程、

- 20 (c) 工程 (b) で得られた抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させる工程、及び

(d) 工程 (c) で得られた融合細胞から抗体を採取する工程
を含む、前記方法。

[請求項 1 5]

- 25 非ヒト哺乳動物が、GANP（登録商標）トランスジェニック非ヒト哺乳動物である請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

[請求項 1 6]

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又は請求項 1 0 に記載の断片と生体試料とを接触させて、インフルエンザウイルスを検出することを特徴とする、インフルエンザウイルスの検出方法。

[請求項 1 7]

- 5 インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである請求項 1 6 に記載の方法。

[請求項 1 8]

インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである請求項 1 7 に記載の方法。

- 10 [請求項 1 9]

インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2. 2)、インドネシア株 (clade 2. 1)、安徽株 (clade 2. 3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2. 2) 及び北海道株 (A/whooper swan/Hokkaido/1/2008: clade 2. 3. 2) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1 8 に記載の方法。

15

[請求項 2 0]

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又は請求項 1 0 に記載の断片を含む、インフルエンザウイルス検出用試薬。

[請求項 2 1]

- 20 インフルエンザウイルスがインフルエンザ H5 亜型ウイルスである請求項 2 0 に記載の試薬。

[請求項 2 2]

インフルエンザ H5 亜型ウイルスがインフルエンザ H5N1 ウイルスである請求項 2 1 に記載の試薬。

- 25 [請求項 2 3]

インフルエンザ H5N1 ウイルスが、インドガン青海湖株 (clade 2. 2)、インドネシア株 (clade 2. 1)、安徽株 (clade 2. 3)、ベトナム株 (clade 1)、モンゴル株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2. 2) 及び北海道株 (A/whooper

swan/Hokkaido/1/2008:clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項22に記載の試薬。

[請求項24]

- 請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又は請求項10に記載の断片を含む、
5 抗インフルエンザウイルス用医薬組成物。

[請求項25]

インフルエンザウイルスがインフルエンザH5亜型ウイルスである請求項24に記載の医薬組成物。

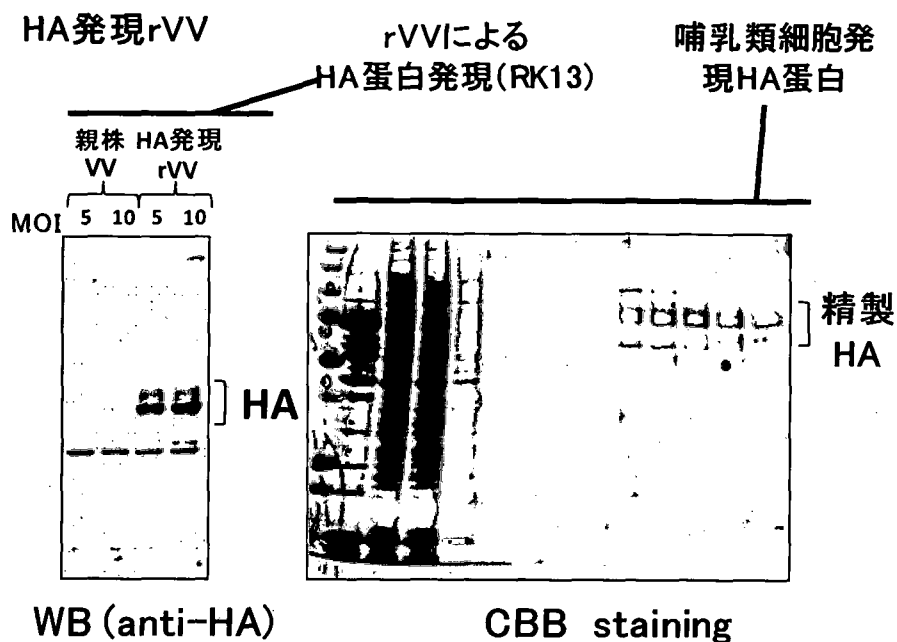
[請求項26]

- 10 インフルエンザH5亜型ウイルスがインフルエンザH5N1ウイルスである請求項25に記載の医薬組成物。

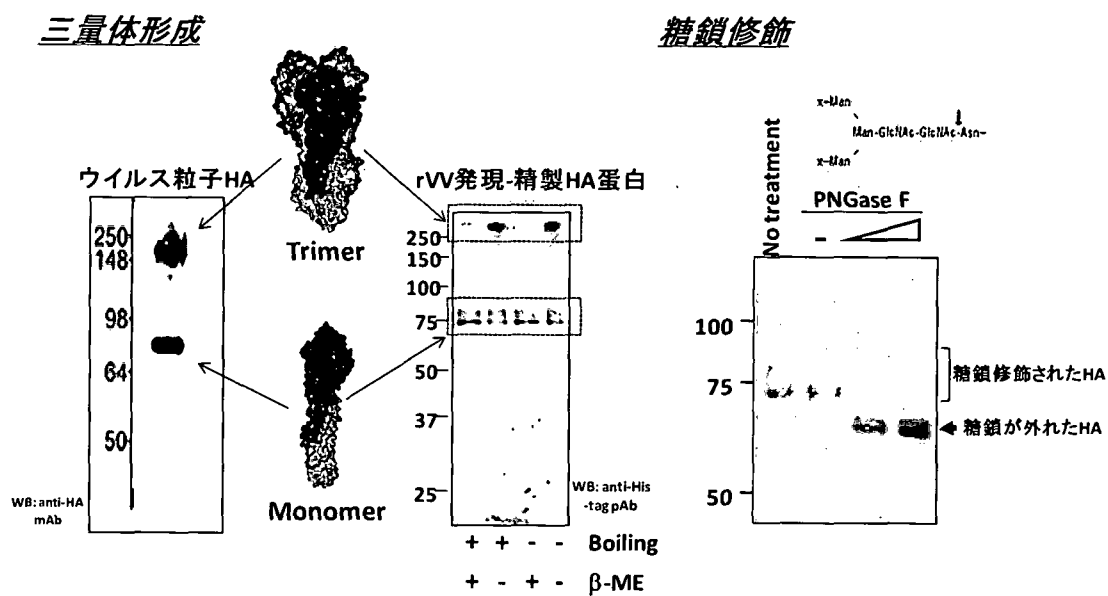
[請求項27]

- インフルエンザH5N1ウイルスが、インドガン青海湖株(clade 2.2)、インドネシア株(clade 2.1)、安徽株(clade 2.3)、ベトナム株(clade 1)、モンゴル株
15 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005: clade 2.2) 及び北海道株(A/whooper swan/Hokkaido/1/2008:clade 2.3.2) からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項26に記載の医薬組成物。

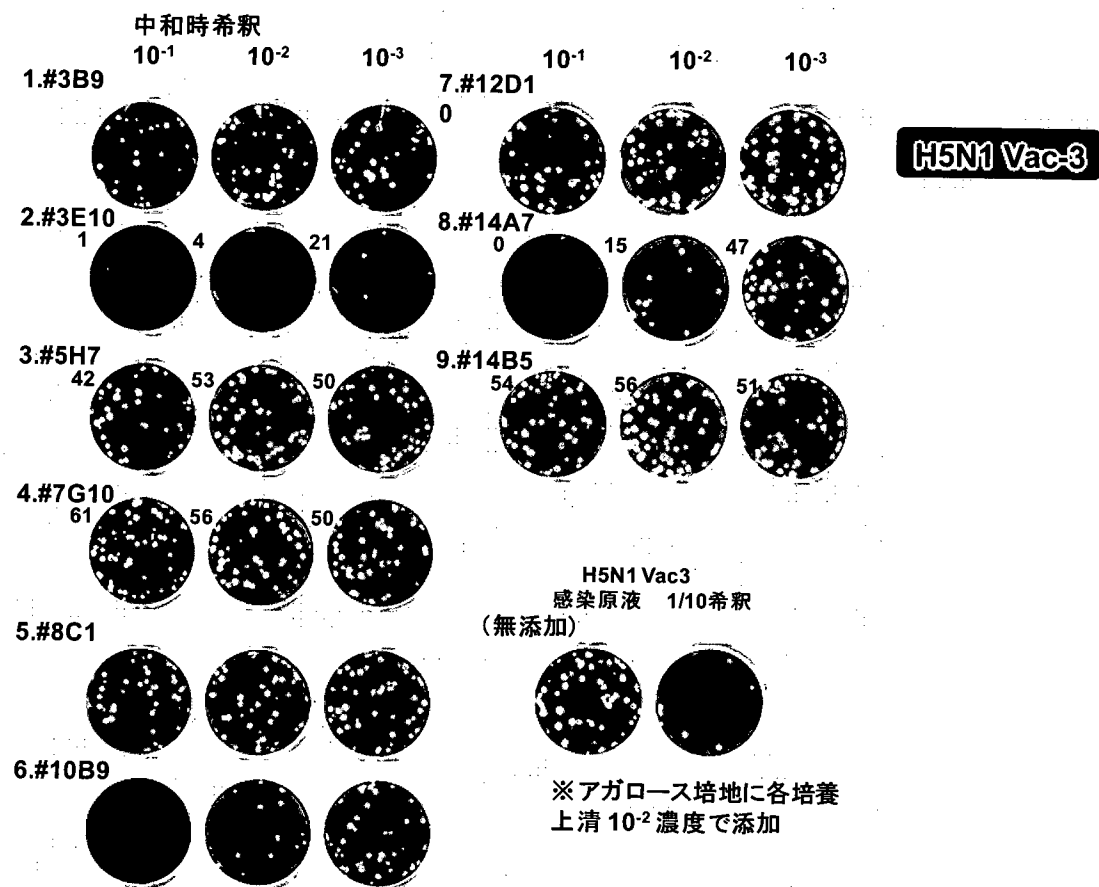
[図 1]



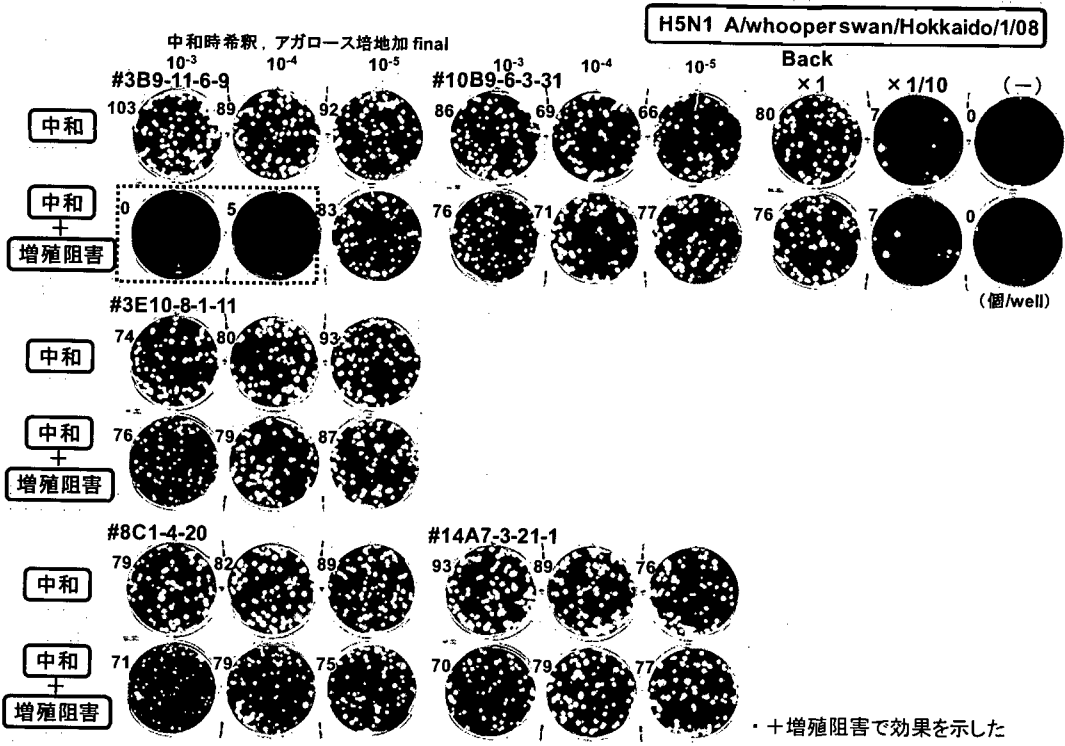
[図 2]



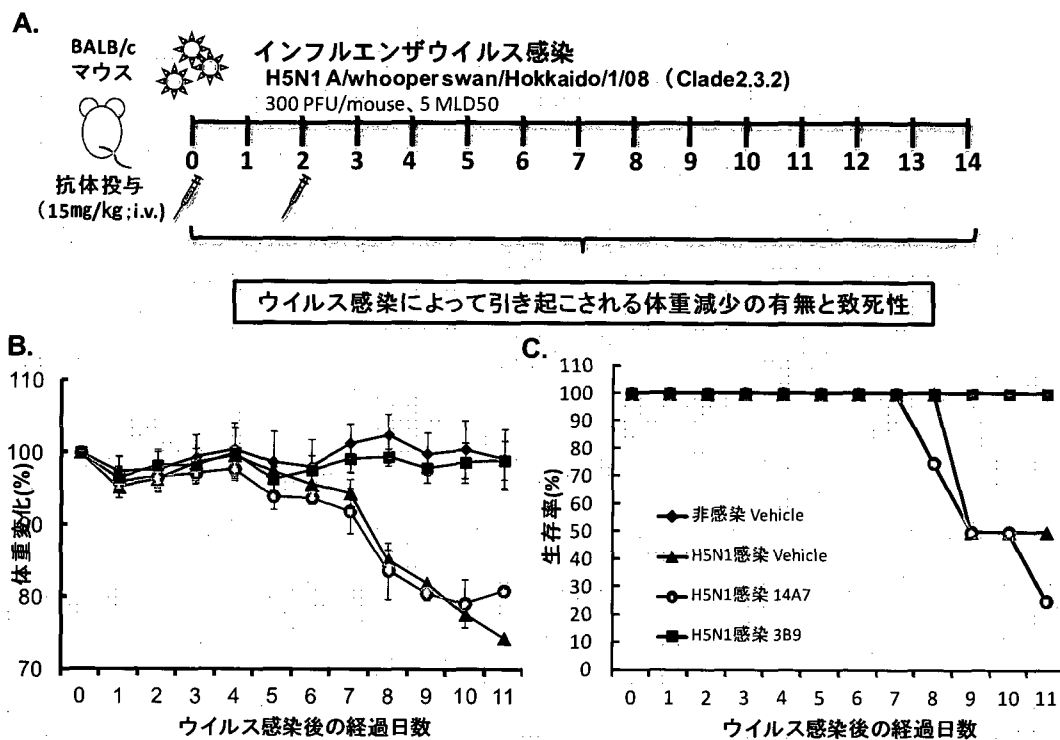
[図 3]



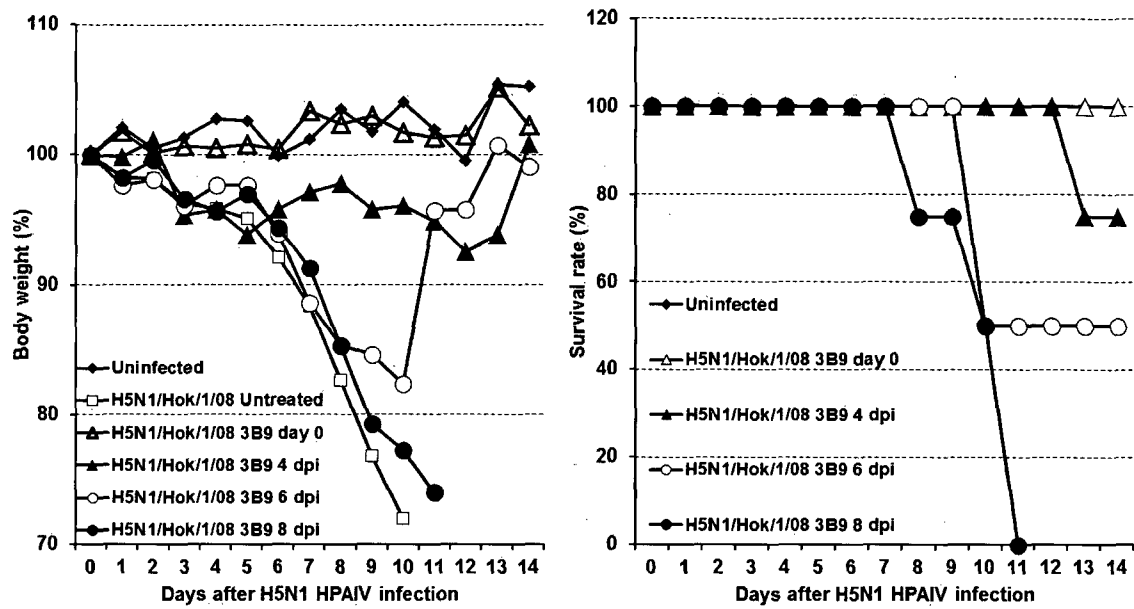
[図 5]



[図 6]



[図 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/10(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/10, A61K39/395, C07K16/46, C12P21/08, G01N33/569

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/068143 A1 (Japan Science and Technology Agency), 09 June 2011 (09.06.2011), claims; paragraphs [0057], [0081]; table 1 (Family: none)	1-27
Y	DU Anariwa, et al., Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.378, 2009, p.197-202	1-27

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 February, 2014 (03.02.14)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2014 (10.02.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080060

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 63-245670 A (Applied Biotechnology, Inc.), 12 October 1988 (12.10.1988), claims; page 6, lower right column; page 11, upper right column & US 5242829 A & EP 261940 A2 & CA 1312837 A	1-27
Y	JP 2006-115845 A (Genelabs Technologies, Inc.), 11 May 2006 (11.05.2006), paragraph [0096] & US 5766840 A & EP 763114 A2 & WO 1995/032291 A2 & CA 2190860 A & CN 1153529 A	1-27

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/10(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/10, A61K39/395, C07K16/46, C12P21/08, G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/068143 A1（独立行政法人科学技術振興機構）2011.06.09, 【特許請求の範囲】【0057】【0081】【表1】 （ファミリーなし）	1-27
Y	DU Anariwa, et al., Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.378, 2009, p.197-202	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

0 3 . 0 2 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 2 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

島居 敬司

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

4 B

5 2 7 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 63-245670 A (アプライド バイオテクノロジー, インコーポレーテッド) 1988.10.12, 特許請求の範囲、6 頁右下欄、1 1 頁右上欄 & US 5242829 A & EP 261940 A2 & CA 1312837 A	1-27
Y	JP 2006-115845 A (ジェネラブス テクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2006.05.11, 【0096】 & US 5766840 A & EP 763114 A2 & WO 1995/032291 A2 & CA 2190860 A & CN 1153529 A	1-27