

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7634231号
(P7634231)

(45)発行日 令和7年2月21日(2025.2.21)

(24)登録日 令和7年2月13日(2025.2.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
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 13 (全69頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-571517(P2021-571517)	(73)特許権者	592105745
(86)(22)出願日	令和2年5月29日(2020.5.29)		ワシントン ユニバーシティ
(65)公表番号	特表2022-535523(P2022-535523 A)		WASHINGTON UNIVERS ITY
(43)公表日	令和4年8月9日(2022.8.9)		アメリカ合衆国 ミズーリ 6 3 1 3 0 ,
(86)国際出願番号	PCT/US2020/035323		セントルイス, ワン ブルッキングズ ド
(87)国際公開番号	WO2020/243572		ライブ (番地なし)
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)	(73)特許権者	516244914
審査請求日	令和5年5月26日(2023.5.26)		アイカーン スクール オブ メディシン
(31)優先権主張番号	62/855,358		アト マウント サイナイ
(32)優先日	令和1年5月31日(2019.5.31)		アメリカ合衆国 1 0 0 2 9 - 6 5 7 4
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ニューヨーク州 ニューヨーク市 ワン・
			グスタフ・エル・レヴィー・プレイス
			ボックス 1 6 7 5
		(73)特許権者	501244222
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P A N－ノイラミニダーゼ阻害抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体または抗原結合フラグメントは、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに特異的に結合し、前記抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) 配列番号1または13を含むアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号3、10、または14を含むアミノ酸配列を有するCDRH3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

(b) 配列番号4、8、11、または15を含むアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号6、12、または16を含むアミノ酸配列を有するCDRL3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項2】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、

a) 配列番号1を含むアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号3を含むアミノ酸配列を有するCDRH3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

b) 配列番号8を含むアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号6を含むアミノ酸配列を有するCDRL3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項3】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、

a) 配列番号 1 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 7 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 2、および配列番号 10 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

b) 配列番号 11 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 9 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 12 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、

a) 配列番号 13 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 7 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 2、および配列番号 14 を含むアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

b) 配列番号 15 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 9 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 16 を含むアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 40、42、および 44 のいずれか 1 つに対する同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 41、43、および 45 のいずれか 1 つに対する同一性を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 40 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 42 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 43 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 または 3 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 または 4 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、0.0001 μg/ml ～ 30 μg/ml の I C 50 で前記ノイラミニダーゼを阻害する、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

医薬組成物であって、前記組成物は、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメントと、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 12】

インフルエンザを予防または処置するための、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合フラグメント、または請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記インフルエンザ感染はインフルエンザ A ウイルスまたはインフルエンザ B ウイルスによって引き起こされる、請求項 12 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府が後援する研究または開発に関する声明

本発明は、国立衛生研究所（the National Institutes of Health）によって授与されたHHSN272201400008CおよびAI141990の下で政府の支援を受けてなされたものである。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

本発明は、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに対して選択的である抗体または抗原結合フラグメントに関する。注目すべきことに、この抗体または抗原結合フラグメントは、インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスの両方のノイラミニダーゼに対して選択的である。本明細書で提供される抗体または抗原結合フラグメントを使用してインフルエンザを処置する医薬組成物および方法も提供される。

【背景技術】

【0003】

季節性インフルエンザウイルス感染は、世界中で毎年顕著な罹患率および死亡率をもたらす。さらに、パンデミックは不規則な間隔で発生し、数百万の生命を奪い得る。現在の季節性インフルエンザワクチンは、狭い株特異的免疫応答を誘導し、それらが循環株との程度よく適合するかによってその有効性が変動し得る（1）。加えてこれらのワクチンは、新たなパンデミックウイルスを防御しない。したがって、広く防御的またはユニバーサルなインフルエンザウイルスワクチンを開発することが緊急に必要とされている（2）。現在のワクチンは、ウイルスの主要な表面糖タンパク質であるヘマグルチニン（HA：hemagglutinin）に対する抗体応答を誘導するように設計されている（3）。HAに対する抗体、その球状ヘッドドメインに対して特異的な抗体は、ウイルスがそのシアル酸受容体に結合することを遮断できるが、こうした活性はしばしばそのワクチン株に限定されて幅を欠く。HAストークに対する抗体は、インフルエンザAグループ1および2内およびそれらにわたってはるかに大きな幅を有することが示されており、稀にはインフルエンザBウイルスにも及ぶ（4～7）。

【0004】

ウイルスの第2の主要な表面糖タンパク質はノイラミニダーゼ（NA：neuraminidase）であり、これは、N結合グリカンから末端シアル酸を切断する受容体破壊酵素である（8）。この活性は、粘膜表面上の天然防御タンパク質のグリカンによって捕捉された流入ウイルスを放出するため、および感染細胞から出芽した新生ウイルスを放出するために重要である。抗NA抗体は、NAの酵素部位に直接結合することによって、またはNAとその基質との間の相互作用を立体的に妨害することによって、この活性を遮断することができる（9、10）。抗NAモノクローナル抗体（mAb）およびNAワクチン接種は、動物モデルにおいてインフルエンザウイルスの致死性チャレンジに対する防御を行うことが示されている（9～15）。さらに、モルモットにおけるNAワクチン接種はウイルス伝播を防止することができる（16）。最も重要なことに、抗NA抗体力価は、野外研究およびヒトチャレンジ研究において、感染からの防御と独立的に相関することが示されている（17～19）。ヒトインフルエンザウイルスは、免疫圧力、ポリメラーゼのエラー率、およびその球状ヘッドドメインの高い可塑性のために、HA中の優性抗原部位を高比率で突然変異させ得る（20）。一方、NAは、HAと一致しないより遅いドリフトを示すことが示されている（21、22）。したがって、NAに対する抗体応答は、典型的にはより広い交差反応性を示すが、この幅は、それぞれのサブタイプ（インフルエンザAウイルスについてはN1～N9）に限定されると想定されている（8）。

【0005】

インフルエンザに対するより効果的な抗ウイルス療法が緊急に必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、a) 配列番号1、2、3、7、10、13、14、40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；b) 配列番号4、5、6、8、9、11、12、15、16、41、43、および45のいずれか1つに対する少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；あるいは(c) それらの組み合わせを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0007】

加えて本発明は、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、a) 配列番号1もしくは13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号2もしくは7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、配列番号3、10、もしくは14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃、もしくはそれらのいずれかの組み合わせを含む免疫グロブリン重鎖可変領域；(b) 配列番号4、8、11、もしくは15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号5もしくは9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、配列番号6、12、もしくは16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃、もしくはそれらのいずれかの組み合わせを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；または(c) それらの組み合わせを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0008】

加えて、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに結合する抗体または抗原結合フラグメントが提供され、この抗体または抗原結合フラグメントは配列番号40、42、または44の少なくとも約70%を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

【0009】

さらに、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに結合する抗体または抗原結合フラグメントが提供され、この抗体または抗原結合フラグメントは配列番号41、43、または45の少なくとも約70%を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0010】

加えて、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントのいずれかと構造的に類似している抗体または抗原結合フラグメントが提供される。

【0011】

加えて、インフルエンザウイルスのN1ノイラミニダーゼに対する特異的親和性を有する抗体または抗原結合フラグメントが提供され、この抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号46の少なくとも約70%を含み、かつ配列番号46のアミノ酸番号付けに従うR118、E119、L134、D151、R152、R156、W178、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406から選択される少なくとも1つの残基を含有するN1ノイラミニダーゼの活性部位残基に結合する。

【0012】

さらに、本明細書において提供される任意の抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域および／または免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。加えて、その核酸を含む発現ベクター、その発現ベクターを含む宿主細胞、ならびに本明細書における抗体および抗原結合フラグメントを産生する方法が提供される。

【0013】

加えて、(a) 本明細書に記載される抗体もしくは任意の抗原結合フラグメント、および／または(b) ポリペプチドもしくはそのポリペプチドをコードする核酸を含むインフルエンザワクチンが提供され、このポリペプチドは、本明細書に記載される任意の抗体または抗原結合フラグメントによって標的とされるエピトープに対する少なくとも約70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0014】

加えて、本明細書に開示される抗体または抗原結合フラグメントのいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が開示される。

【0015】

加えて、必要とする対象においてインフルエンザを予防または処置する方法が提供され、この方法は、本明細書に記載される任意の抗体もしくは抗原結合フラグメント、本明細書における抗体もしくは抗原結合フラグメントの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含む任意の核酸、本明細書に記載される任意の発現ベクター、本明細書に記載される任意のワクチン、または本明細書に開示される抗体の少なくとも1つを含む任意の組成物を対象に投与することを含む。

【0016】

その他の目的および特徴は、以下で部分的に明らかになり、かつ部分的に指摘されることとなる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】インフルエンザAおよびBウイルスNAの系統樹を示す図である。3つのmAbの反応性の幅が示されている。スケールバーは、アミノ酸の6%の変化を表す。Clustal Omegaにおけるアミノ酸配列を使用してツリーを構築し、FigTreeにおいて可視化した。

【図1B】推定される非変異共通祖先(UCA: unmutated common ancestor)に対する各mAbのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図1C】ELISAにおける組み換えタンパク質への抗体結合のヒートマップを示す図である。最小結合濃度が示されている。

【図1D】ELLA NIAッセイにおける抗体活性のヒートマップを示す図である。IC₅₀が示されている。

【図2A】H3N2株A/Hong Kong/4801/2014に対するELLAアッセイ(大基質、立体障害感受性)におけるNAの代表的な阻害曲線を示す図である。

【図2B】NAスターアッセイ(小基質、立体障害非感受性)におけるA/Hong Kong/4801/2014に対する同じmAbの活性を示す図である。

【図2C】A/Hong Kong/4801/2014に対するELLAアッセイにおけるmAb 1G01のFabの活性を示す図である。

【図2D】3つのmAbの生殖系列(GL: germline)バージョンもH3N2株A/Hong Kong/4801/2014に対して活性であることを示す図である。

【図2E】3つのmAbがH3N2株A/Hong Kong/4801/2014に対するマイクロ中和アッセイにおいて活性であることを示す図である。

【図2F】3つのmAbのADCCレポーターバイオアッセイ活性を示す図である。H3N2に対する既知のADCCレポーター活性を有するMAb CR9114を陽性対照として使用した。

【図3A】3.45 Å分解能でのHunan N9 NAを伴う1G04の結晶構造を示す図である。左上: NA四量体の各プロトマーに結合した1つのFabを有するNA四量体。左下: 1つのFabを有するNAプロトマー。右上: NA上のエピトープ。右下: NA上のFabパラトープ。左パネルについては、1つのNA-Fabプロトマーを、NAを薄灰色で、Fab軽鎖(L鎖)を薄灰色で、Fab重鎖(H鎖)を濃灰色で着色している。右パネルのNAおよびFabは、それぞれ濃灰色および薄灰色である。N結合グリカンは、灰色の炭素原子によるスティック表示で示されている。カルシウムイオンは黒色の球として示されている。エピトープを示す分子表面は黒色/濃灰色で着色されている。

【図3B】2.45 Å分解能でのJapan 57 N2 NAを伴う1E01の結晶構造を示す図である。左上: NA四量体の各プロトマーに結合した1つのFabを有するNA四量体。左下: 1つのFabを有するNAプロトマー。右上: NA上のエピトープ。右下: NA上のFabパラトープ。左パネルについては、1つのNA-Fabプロトマーを、NAを薄灰色で、Fab軽鎖(L鎖)を薄灰色で、Fab重鎖(H鎖)を濃灰色で着色して

10

20

30

40

50

いる。右パネルのNAおよびFabは、それぞれ濃灰色および薄灰色である。N結合グリカンは、灰色の炭素原子によるスティック表示で示されている。カルシウムイオンは黒色の球として示されている。エピトープを示す分子表面は黒色／濃灰色で着色されている。

【図3C】3.27 Å分解能でのCA04 N1 NAを伴う1G01の結晶構造を示す図である。左上：NA四量体の各プロトマーに結合した1つのFabを有するNA四量体。左下：1つのFabを有するNAプロトマー。右上：NA上のエピトープ。右下：NA上のFabパラトープ。左パネルについては、1つのNA-Fabプロトマーを、NAを薄灰色で、Fab軽鎖（L鎖）を薄灰色で、Fab重鎖（H鎖）を濃灰色で着色している。右パネルのNAおよびFabは、それぞれ濃灰色および薄灰色である。N結合グリカンは、灰色の炭素原子によるスティック表示で示されている。カルシウムイオンは黒色の球として示されている。エピトープを示す分子表面は黒色／濃灰色で着色されている。

10

【図4A】グループ2ノイラミニダーゼ（N2）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4B】感染後3日目および6日目に（図4Aについて記載したとおりに）mAbで予防的に処置した動物の肺力価を示す図である。グループ当たり3匹のマウスを使用した。

【図4C】グループ2ノイラミニダーゼ（N2）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

20

【図4D】グループ2ノイラミニダーゼ（N3）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4E】グループ2ノイラミニダーゼ（N6）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

30

【図4F】グループ2ノイラミニダーゼ（N7）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4G】グループ2ノイラミニダーゼ（N9）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

40

【図4H】グループ1ノイラミニダーゼ（N1）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg/kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4I】グループ1ノイラミニダーゼ（N1）を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイ

50

ルスチャレンジの2時間前に5 mg / kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4 J】グループ1ノイラミニダーゼ(N4)を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg / kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4 K】グループ1ノイラミニダーゼ(N5)を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg / kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

10

【図4 L】グループ1ノイラミニダーゼ(N8)を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を、鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前に5 mg / kgのmAbで腹腔内処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4 M】インフルエンザBウイルスノイラミニダーゼを発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を5 mg / kgのmAbで処置した。鼻腔内ウイルスチャレンジの2時間前の腹腔内で、体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントがそれぞれの図の凡例に示されている。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

20

【図4 N】グループ2ノイラミニダーゼ(N2)を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を感染の48時間後に5 mg / kgのmAbで処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

【図4 O】グループ2ノイラミニダーゼ(N2)を発現するウイルスによるチャレンジに対するマウスモデルにおける3つのmAbの有効性を示す図である。動物を感染の72時間後に5 mg / kgのmAbで処置した。グループ当たり5匹の動物を使用した。体重減少パーセントが示されており、生存率パーセントが図の凡例に示されている。

30

【図5】IgG抗体の一般的構造を示す図である。

【図6 A】小基質NA-スターアッセイにおける(A) pH1N1 A / Singapore / GP1908 / 2015に対するmAb 1G04、1E01、および1G01の阻害効果を示す図である。阻害曲線が示されており、点線はNA活性の50%阻害を表す。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。

【図6 B】小基質NA-スターアッセイにおけるH5N1 A / Indonesia / 5 / 2005に対するmAb 1G04、1E01、および1G01の阻害効果を示す図である。阻害曲線が示されており、点線はNA活性の50%阻害を表す。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。

40

【図6 C】小基質NA-スターアッセイにおけるH7N9 A / Shanghai / 2 / 2013に対するmAb 1G04、1E01、および1G01の阻害効果を示す図である。阻害曲線が示されており、点線はNA活性の50%阻害を表す。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。

【図6 D】小基質NA-スターアッセイにおけるB / Malaysia / 2506 / 2004に対するmAb 1G04、1E01、および1G01の阻害効果を示す図である。阻害曲線が示されており、点線はNA活性の50%阻害を表す。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。

【図7 A】阻害曲線として示されるmAb 1G04、1E01、および1G01による

50

野生型ウイルス（E119）の阻害パーセントを示す図である。

【図7B】オセルタミビル耐性H3N2ウイルス（E119V）の阻害を示す図である。技術的重複を行った。

【図8A】H3N2 A/Philippines/2/1982ウイルスに対するmAbの最小中和濃度を示す図である。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。抗体は、技術的重複において実行された。

【図8B】H9N2 A/chicken/Hong Kong/G9/1997ウイルスに対するmAbの最小中和濃度を示す図である。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。抗体は、技術的重複において実行された。

【図8C】H7N2 A/feline/New York/16-040082-1/2016ウイルスに対するmAbの最小中和濃度を示す図である。無関係のヒトIgG1 mAbを陰性対照抗体として使用した。抗体は、技術的重複において実行された。

【図9A】pH1N1 A/Singapore/GP1908/2015ウイルスを試験するADCCアッセイにおいて測定された1G04、1E01、および1G01の曲線下面積値を示す図である。ヒトmAb CR9114を陽性対照として使用し、無関係のヒトIgG mAbを陰性対照抗体として使用した。全てのmAbを技術的重複において実行した。

【図9B】H5N1 A/Indonesia/5/2005ウイルスを試験するADCCアッセイにおいて測定された1G04、1E01、および1G01の曲線下面積値を示す図である。ヒトmAb CR9114を陽性対照として使用し、無関係のヒトIgG mAbを陰性対照抗体として使用した。全てのmAbを技術的重複において実行した。

【図9C】H7N9 A/Shanghai/2/2013ウイルスを試験するADCCアッセイにおいて測定された1G04、1E01、および1G01の曲線下面積値を示す図である。ヒトmAb CR9114を陽性対照として使用し、無関係のヒトIgG mAbを陰性対照抗体として使用した。全てのmAbを技術的重複において実行した。

【図9D】B/Malaysia/2506/2004ウイルスを試験するADCCアッセイにおいて測定された1G04、1E01、および1G01の曲線下面積値を示す図である。ヒトmAb CR9114を陽性対照として使用し、無関係のヒトIgG mAbを陰性対照抗体として使用した。全てのmAbを技術的重複において実行した。

【図10】3.45 Å分解能での結晶構造からの1G04 Fab CDRとHunan N9 NAとの相互作用を示す図である。1G04軽鎖は薄灰色の炭素原子で示されており（CDRL1またはCDRL2と標識された各パネルの左側）、重鎖は灰色の炭素原子で示されている（CDRH1およびCDRH2と標識された各パネルの左側、またはCDRH3と標識されたパネルの中央）。NA側鎖は、濃灰色の炭素原子で示されている（CDRL1、CDRL2、CDRH1、およびCDRH2と標識されたパネルの右側、またはCDRH3と標識されたパネルの周囲方向）。水素結合または塩橋は黒色の点線である。

【図11】2.45 Å分解能での結晶構造からの1E01 Fab CDRとJapan 57 N2 NAとの相互作用を示す図である。1E01軽鎖は薄灰色の炭素原子で示されており（CDRL1またはCDRL2と標識された各パネルの左側）、重鎖は灰色の炭素原子で示されている（CDRH1およびCDRH2と標識された各パネルの左側、またはCDRH3と標識されたパネルの中央）。NA側鎖は、濃灰色の炭素原子で示されている（CDRL1、CDRL2、CDRH1、およびCDRH2と標識されたパネルの右側、またはCDRH3と標識されたパネルの周囲方向）。水素結合または塩橋は黒色の点線である。

【図12】3.27 Å分解能での結晶構造からの1G01 Fab CDRとCA04 N1 NAとの相互作用を示す図である。1G01軽鎖は薄灰色の炭素原子で示されており（CDRL1またはCDRL2と標識された各パネルの左側）、重鎖は灰色の炭素原子で示されている（CDRH1およびCDRH2と標識された各パネルの左側、またはCDRH3と標識されたパネルの中央）。NA側鎖は、濃灰色の炭素原子で示されている（CDRL1、CDRL2、CDRH1、およびCDRH2と標識されたパネルの右側、または

10

20

30

40

50

C D R H 3 と標識されたパネルの周囲方向)。水素結合または塩橋は黒色の点線である。
1 G 0 1 F a b は、隣接する N A プロトマー由来の残基 W 4 5 6 と相互作用する F R L 3 由来の Y 6 7 を除き、1 つの N A プロトマーを認識する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、種々のインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに対して広範な特異性を示す新規の抗体および抗原結合フラグメントに関する。本明細書における抗体および抗原結合フラグメントは、有利なことに任意の公知のノイラミニダーゼに結合することができる（かつタイプによって限定されない）。様々な実施形態では、抗体および抗原結合フラグメントは、a) 配列番号 1、2、3、7、10、13、14、40、42、または 44 に対する少なくとも約 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；b) 配列番号 4、5、6、8、9、11、12、15、16、41、43、および 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；あるいは（c）それらの組み合わせを含む。付加的な実施形態では、抗体および抗原結合フラグメントは、配列番号 1、2、3、7、10、13、および 14 のいずれか 1 つを含むアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域（C D R : c o m p l e m e n t a r y d e t e r m i n i n g r e g i o n）を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 4、5、6、8、9、11、12、15、および 16 のいずれか 1 つを含むアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域（C D R）を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。様々な実施形態では、抗体および抗原結合フラグメントは、配列番号 40、42、または 44 の少なくとも約 70% を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。様々な実施形態では、抗体および抗原結合フラグメントは、配列番号 41、43、または 45 の少なくとも約 70% を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。本発明の抗体の特定の軽鎖および重鎖は、本明細書においてより詳細に説明される。

【0019】

定義

本明細書で使用される「抗原結合フラグメント」という用語は、インタクトな抗体、または改変、遺伝子操作、もしくは化学的にコンジュゲートされた抗原結合フラグメントを含む、抗体の任意の抗原結合フラグメントを意味する。改変または遺伝子操作された抗体の例は、キメラ抗体、ヒト化抗体、および多重特異性抗体（例、二重特異性抗体）である。抗原結合フラグメントとしては、とりわけ F a b、F (a b ')、F (a b ') 2、F v、d A b、F d、相補性決定領域（C D R）フラグメント、単鎖抗体（s c F v）、二価単鎖抗体、単鎖ファージ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、（ポリ）ペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも 1 つのフラグメントを含有する（ポリ）ペプチドなどが挙げられる。構造にかかわらず、抗原結合フラグメントは、インタクトな免疫グロブリンによって認識されるものと同じ抗原に結合する。抗原結合フラグメントは、結合分子のアミノ酸配列の少なくとも 2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、または 250 の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを含み得る。上記のフラグメントは、合成によって生成されてもよいし、インタクトな免疫グロブリンの酵素的または化学的切断によって生成されてもよいし、それらは組み換え DNA 技術によって遺伝子操作されてもよい。生成方法は当技術分野で周知であり、例えば「抗体：実験マニュアル（Antibodies：A Laboratory Manual）」、E. ハーロウ（Harlow）および D. レーン（Lane）編（1988）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、コールド・スプリング・ハーバー（Cold Spring Harbor）、N. Y. などに記載されている。

【0020】

本明細書で使用される「相補性決定領域」（C D R）という用語は、抗原上で認識され

るエピトープに対して形状および電荷分布が相補的である抗原結合部位に通常大部分寄与する抗体の可変領域内の配列を意味する。CDR領域は、天然立体構造のタンパク質上に存在するか、または場合によっては例えばSDSにおける可溶化などによって変性されたタンパク質上に存在するかのいずれかの、タンパク質またはタンパク質フラグメントの線状エピトープ、不連続エピトープ、または立体構造エピトープに対して特異的であり得る。加えて、エピトープはタンパク質の翻訳後修飾からなっているもよい。

【0021】

本明細書で使用される「インフルエンザAウイルス」は、ヘマグルチニン（H）およびノイラミニダーゼ（N）ウイルス表面タンパク質の様々な組み合わせによって特徴付けられる異なる「サブタイプ」にさらに特徴付けることができるインフルエンザウイルスのタイプを指す。インフルエンザAウイルスには、18の異なるヘマグルチニンサブタイプおよび9の異なるノイラミニダーゼサブタイプ（H1～H18およびN1～N9）が存在する。インフルエンザAノイラミニダーゼは、サブタイプ（グループ1およびグループ2）にさらに分けられる。グループ1はN1、N4、N5、およびN8を含み、グループ2はN2、N3、N6、N7、およびN9を含む。本発明によると、インフルエンザAウイルスのサブタイプは、それらのH数によって例えば「H1またはH5サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルス」、または「H1インフルエンザウイルス」、「H5インフルエンザウイルス」などとして示されてもよいし、それらのN数を示すことによって例えば「N1またはN2サブタイプのNAを含むインフルエンザウイルス」などとして示されてもよいし、H数とN数との組み合わせによって例えば「インフルエンザウイルスサブタイプ「H5N1またはH3N2」などとして示されてもよい。インフルエンザウイルス「サブタイプ」という用語は、具体的には、通常は突然変異から生じ、異なる病原性プロファイルを示す、各サブタイプ内の全ての個々のインフルエンザウイルス「株」を含む。こうした株は、ウイルスサブタイプの種々の「単離株」とも呼ばれることがある。したがって、本明細書で使用される「株」および「単離株」という用語は、交換可能に使用されてもよい。ヒトインフルエンザウイルス株または単離株に対する現在の命名法は、最初の単離の地理的位置、株番号、および単離年を含み、通常は括弧内にHAおよびNAの抗原性の記載が与えられ、例えばA/Moscow/10/00（H3N2）などとなる。非ヒト株は、命名法に起源の宿主も含む。

【0022】

本明細書で使用される「インフルエンザBウイルス」は、インフルエンザウイルスの第2のカテゴリー（タイプ）を指す。インフルエンザAとは異なり、インフルエンザBウイルスはサブタイプに分けられないが、系統および株に分解され得る（例、B/YamagataおよびB/Victoria）。しかし、インフルエンザBウイルスは、本明細書においてそれぞれ「B型ヘマグルチニン」および「B型ノイラミニダーゼ」と分類されるヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼタンパク質を含有する。

【0023】

本明細書で使用される「宿主」という用語は、例えばクローニングベクターまたは発現ベクターなどのベクターが導入された生物または細胞を指すことが意図される。生物または細胞は、原核または真核であり得る。好ましくは、宿主は単離された宿主細胞、例えば培養された宿主細胞などである。「宿主細胞」という用語は、その細胞が本発明の抗体の（過剰）発現のために改変されていることのみを意味し、これらの抗体を元々発現しているB細胞であって、不死化、増幅、発現の増強などによって結合分子を過剰発現するように改変されている細胞を含む。

【0024】

アミノ酸配列同一性パーセント（％）は、2つの配列を整列させたときに、参照配列と比較して候補配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸残基と同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージとして理解される。同一性パーセントを決定するために、配列を整列させ、必要であれば、最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入する。同一性パーセントを決定するための配列アラインメント手順は、当業者に周

知である。配列を整列させるために、例えばBLAST、BLAST2、ALIGN2、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアがしばしば使用される。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。配列を整列させるとき、所与の配列Bに対する所与の配列Aの配列同一性パーセント（所与の配列Bに対する特定の配列同一性パーセントを有するかまたは含む所与の配列Aと言い換えることができる）は、配列同一性パーセント = $(X/Y) \times 100$ として算出でき、ここでXは、配列アラインメントプログラムまたはアルゴリズムのAおよびBのアラインメントによって同一マッチとしてスコア付けされた残基の数であり、Yは、Bの残基の総数である。配列Aの長さ
と配列Bの長さとは等しくないとき、AのBに対する配列同一性パーセントは、BのAに
対する配列同一性パーセントと等しくならない。

10

【0025】

「動作可能に連結された」という用語は、通常は物理的に連結され、互いに機能的関係にある2つ以上の核酸配列要素を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現を開始または調節することができるとき、プロモーターはコード配列に動作可能に連結されており、その場合、コード配列はプロモーターの「制御下」にあると理解されるべきである。

【0026】

「薬学的に許容される賦形剤」とは、好ましいかまたは好都合な剤形を調製するために、例えば薬物、薬剤、または抗体などの活性分子と組み合わせられる任意の不活性物質を意味する。「薬学的に許容される賦形剤」は、使用される用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、かつ薬物、薬剤、または結合分子を含む製剤の他の成分と適合性である賦形剤である。薬学的に許容される賦形剤は広く適用されており、当技術分野で公知である。

20

【0027】

抗体と、例えば抗原などのその結合パートナーとの相互作用に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」という用語は、その相互作用が、結合パートナー上の例えば抗原決定基またはエпитープなどの特定の構造の存在に依存することを意味する。言い換えると、たとえ結合パートナーが他の分子または生物の混合物中に存在するときにも、抗体は結合パートナーに優先的に結合するか、またはそれを認識する。結合は、共有もしくは非共有相互作用または両方の組み合わせによって媒介されてもよい。さらに言い換えると、「特異的に結合する」という用語は、抗原決定基またはエпитープに免疫特異的に結合し、他の抗原決定基またはエпитープに免疫特異的に結合しないことを意味する。抗原に免疫特異的に結合する抗体は、例えばラジオイムノアッセイ (RIA: radioimmunoassays)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assays)、BIAcore、または当技術分野において公知の他のアッセイなどによって決定されるときに、より低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドに結合してもよい。抗原に免疫特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、同じエпитープを保有する関連抗原と交差反応性であってもよい。好ましくは、抗原に免疫特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、他の抗原と交差反応しない。

30

40

【0028】

本発明の抗体に関連して本明細書で使用される「中和する」という用語は、中和が達成される機構、または中和活性を測定するために使用されるアッセイにかかわらず、インビトロおよび／またはインビボでインフルエンザウイルスの複製を阻害する抗体を指す。

【0029】

「治療上の有効量」という用語は、インフルエンザAウイルスによる感染から生じる状態を予防、改善、および／または処置するために有効な、本明細書で定義される抗体の量を指す。本明細書で使用される改善とは、インフルエンザ感染の目に見えるかもしくは知

50

覚できる疾患症状、ウイルス血症、または任意のその他の測定可能な徴候の低減を指してもよい。

【0030】

「処置」という用語は、疾患の進行を治癒または停止または少なくとも遅延させるための治療的処置および予防的または防止的方策を指す。処置を必要とする者には、インフルエンザウイルスによる感染から生じる状態を既に患っている者、およびインフルエンザウイルスによる感染を予防されるべき者が含まれる。インフルエンザウイルスによる感染から部分的にまたは完全に回復した対象も処置を必要とし得る。予防とは、インフルエンザウイルスの伝播を阻害もしくは低減すること、またはインフルエンザウイルスによる感染に関連する症状のうちの1つ以上の発症、発生、もしくは進行を阻害もしくは低減することを包含する。

10

【0031】

「ベクター」という用語は、第2の核酸分子を宿主に導入してそこで複製および場合によっては発現させるために、第2の核酸分子を挿入することができる核酸分子を意味する。言い換えると、ベクターは、自身が連結された核酸分子を輸送することができる。本明細書で使用される「ベクター」という用語によって、クローニングベクターおよび発現ベクターが意図される。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体 (BAC: bacterial artificial chromosomes) および酵母人工染色体 (YAC: yeast artificial chromosomes)、ならびにバクテリオファージまたは植物もしくは動物 (ヒトを含む) ウイルスに由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、提案される宿主によって認識される複製起点を含み、かつ発現ベクターの場合には、宿主によって認識されるプロモーターおよびその他の調節領域を含む。第2の核酸分子を含むベクターは、形質転換、トランスフェクション、またはウイルス侵入機構の利用によって、細胞に導入される。特定のベクターは、自身が導入された宿主中で自律複製することができる (例、細菌の複製起点を有するベクターは、細菌中で複製できる)。他のベクターは、宿主への導入時に宿主のゲノムに組み込まれることができ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。

20

【0032】

ポリペプチド (例、抗体またはその抗原結合フラグメント) に関する「構造的に類似する」という用語は、参照ポリペプチドと比較して1つ以上の保存的置換および／または化学修飾を有するが、参照ポリペプチドまたはタンパク質の全体的な二次、三次、および／または四次構造を保持するポリペプチドまたはタンパク質を指す。別のポリペプチドまたはタンパク質と「構造的に類似する」ポリペプチドまたはタンパク質は、参照タンパク質の結合標的に対して類似の結合親和性を有することが予期される。

30

【0033】

一般的に、保存的置換は、必要な活性が保持される限り、任意の位置で行われ得る。置換されるアミノ酸が元のアミノ酸と類似の特性を有する、いわゆる保存的交換が行われてもよく、それは例えばGluのAspによる交換、GlnのAsnによる交換、ValのIleによる交換、LeuのIleによる交換、およびSerのThrによる交換などである。例えば、類似の特性を有するアミノ酸は、脂肪族アミノ酸 (例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン) ; ヒドロキシルもしくは硫黄／セレン含有アミノ酸 (例、セリン、システイン、セレノシステイン、スレオニン、メチオニン) ; 環状アミノ酸 (例、プロリン) ; 芳香族アミノ酸 (例、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン) ; 塩基性アミノ酸 (例、ヒスチジン、リジン、アルギニン) ; または酸性およびそれらのアミド (例、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン) であり得る。欠失は、直接結合によるアミノ酸の置換である。欠失の位置には、ポリペプチドの末端および個々のタンパク質ドメイン間の結合部が含まれる。挿入は、ポリペプチド鎖へのアミノ酸の導入であり、直接結合が形式的に1つ以上のアミノ酸によって置換される。アミノ酸配列は、例えば改善された活性または変更された調節などを有するポリペプチドを生成し得る当技術分野で公知のコンピュータシミュレーションプログラムの助けを借り

40

50

て調節され得る。この人工的に生成されたポリペプチド配列に基づいて、こうした調節されたポリペプチドをコードする対応の核酸分子を、所望の宿主細胞の特異的コドン使用を用いてインビトロで合成できる。

【0034】

ノイラミニダーゼ特異性および抗体特性

本発明は、インフルエンザ A および B ウイルスを阻害できる高活性ヘテロサブタイプ抗 NA 抗体の発見に基づくものである。過去の抗体特徴付けおよびワクチン接種の研究は、サブタイプ内の防御は非常に広範であり得るが、NA に対する免疫はヘテロサブタイプではないことを示唆していた（通常異なるサブタイプにわたって結合する抗 HA ストック抗体と比較したとき）（9～15）。保存された線状ペプチドに対してウサギにおいてヘテロサブタイプ抗 NA mAb を生じさせる試みによって、低い NI 活性およびわずかな防御効果を有する mAb がもたらされた（28、29）。いくらかの交差反応性結合を示すが、インビトロまたはインビボでいかなる抗ウイルス活性も有さない少数のヒト抗 NA mAb が近年報告されている（10）。これに対し、本明細書で報告される本発明のモノクローナル抗体は高活性であり、インビボで強力な防御を媒介する。

【0035】

したがって、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに選択的に結合することができる。本明細書に記載される抗体および抗原結合フラグメントは、インフルエンザ感染の治療的処置および予防的処置の両方のための重要な用途を有し得る。

【0036】

急性感染に対処するための治療的使用

ノイラミニダーゼは検証された薬物標的であり、その活性を阻害するいくつかの小分子はインフルエンザ治療薬である。ここに報告される3つのmAbと同様に、これらの小分子はNAの活性部位を標的とする。したがって、かつこれらのmAbの広範な幅のために、それらはヒトにおける季節性、パンデミック、および人畜共通感染性のインフルエンザウイルス感染の処置のための抗ウイルス剤として使用され得る可能性がある。小分子は確かに利点を有するが、これらの薬物の治療ウィンドウは症状の発症後48時間に制限される。マウスモデルにおいて、本発明者らのmAbは、致死性のインフルエンザウイルスチャレンジの72時間後という遅さで投与されたときにも堅固な防御を示し、それらがより長い治療ウィンドウを有し得ることを示唆した。この効果の基礎は、それらの強力なNI活性が、エフェクター機能およびおそらくは感染に対する免疫応答の調節と組み合わせられたものであり得る（30）。

【0037】

予防的処置のためのワクチン

これらのmAbが治療薬として役立つ可能性に加えて、それらは抗体誘導ワクチン設計にも有用であり得る。不活化および弱毒化生ワクチンを含む、現在認可されているインフルエンザウイルスワクチンは、抗NA免疫の誘導が不十分である（8）。しかし、組み換えNAベースのワクチンおよびNAウイルス様粒子は、致死性のマウスおよびフェレットチャレンジモデルにおける広範な防御が可能な高力価の抗NA抗体を誘導することが示されている（13～15）。さらに、組み換えNAベースのワクチンは、モルモットモデルにおいてインフルエンザウイルス伝播を阻害することが示されている（16）。これらの研究においてはサブタイプ内の広範な防御が観察されたが、ヘテロサブタイプ免疫は、マウスモデルにおいて明確に試験されたにもかかわらず検出されなかった（13）。しかし、異なるサブタイプを含む組み換えNAワクチンによる連続的なプライムブーストレジメンは、1G01様抗体の誘導をもたらし得る。さらに、1G01エピトープを表すスカフォールド／安定化された構築物も、同様のヘテロサブタイプ抗体を誘導できる可能性がある。これらのワクチンの開発に伴う1つの問題は、インフルエンザウイルスワクチンの動物モデルとして使用される多くの種が、報告された3つのmAbの特徴である長いCDRH3領域を有する抗体を有さないことであり得る。したがって、ヒト化免疫グロブリン遺

10

20

30

40

50

伝子座を有するマウスは、これらのワクチンを試験するためのより良好なモデルであり得る。

【0038】

要約すると、酵素活性部位に長いCDRH₃を挿入し、通常シアル酸によって占有される空間を占有することによって、クローン的に関連し、かつインフルエンザウイルスNAに結合する3つのmAbを合成した。3つのmAbは全て広範な結合を示し、1G01は全てのインフルエンザAウイルスNAサブタイプおよびインフルエンザBウイルスNAを阻害し、そのことはこれらのmAbを治療薬開発の有望な候補としている。これらの抗体は、インビトロではNA活性の高活性の阻害剤であり、インビボでは死亡率および罹患率からの広範な防御を提供する。これらのmAbの発見は、適切なワクチン接種レジメンが与えられれば集団において類似の抗体が誘導され得るという希望をもたらす。次いで、これらのmAbの結合様式およびエピトープについての知識は、NAベースのユニバーサルインフルエンザウイルスワクチンの開発を導き得る。

【0039】

抗体構造およびその配列

IgG抗体の一般的構造を図5に示している。簡潔には、2つの主要なサブユニット、すなわちジスルフィド結合を介して接続された重鎖および軽鎖が存在する。各重鎖および軽鎖は、可変領域または定常領域にさらに分けられる。可変領域は、抗原と最も直接的に相互作用し、かつ3つの超可変領域（相補性決定ドメイン、CDR）をさらに含む。よって、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む単一の抗体は、合計12のCDR（各重鎖および各軽鎖に対して3つ）を含む。しかし、各々の可変領域、特にCDRは、抗原に対してある程度の親和性を有し、単一の軽鎖に結合した単一の重鎖は最大の親和性を達成できる。このため、典型的なIgG抗体は二価であると考えられ、おそらくは重鎖および軽鎖の同一性に応じて2つの異なる抗原を同時に標的とすることができる。抗体の可変領域（重鎖および軽鎖の両方）は、集合的にFabフラグメントとして公知であり、定常領域（Fc部分として公知である）から切断されて抗原結合フラグメントを形成することができる。加えて注記したとおり、各々のCDRは抗原に対してある程度の親和性を有し、各々が抗原結合フラグメントとみなされ得る。抗体フラグメントは、標的に対して親抗体と等価の結合親和性を有し得る。二価および一価抗体フラグメントの両方が本発明に含まれる。

【0040】

したがって、様々な実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、重鎖可変領域（またはそのフラグメント）および／または軽鎖可変領域（またはそのフラグメント）を含む。重鎖可変領域は、CDRH₁、CDRH₂、およびCDRH₃として分類される3つの相補性定義領域（CDR）を含む。同様に、軽鎖可変領域は、CDRL₁、CDRL₂、およびCDRL₃として分類される3つの相補性決定領域（CDR）を含む。本発明の抗体および抗体フラグメントに組み込まれ得る好適なCDR配列は、それらの全ておよびそれらが由来する抗体に類似する仮説的な「共通祖先」に対応する配列とともに表1に記載されている。「共通祖先」配列に対する配列中のアミノ酸置換は、太字の下線付きの文字によって識別される。

【0041】

【表 1】

表 1 抗 NA 抗体に対する例示的な CDR 配列

CDR 名	配列番号	配列	起源
CDR _{H1}	配列番号: 1	GFTFDDYGM	共通祖先 mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04)
	配列番号: 13	GFKFDDY <u>AM</u>	mAB 3 (1G01)
CDR _{H2}	配列番号: 2	INWNGGSTG	共通祖先
	配列番号: 7	<u>L</u> NWNG <u>D</u> IT <u>A</u>	mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04) mAB 3 (1G01)
CDR _{H3}	配列番号: 3	TWGEYTTREEPIHSWY	共通祖先 mAB 1 (1G04)
	配列番号: 10	TWGDYTTGEE <u>I</u> NSWY	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 14	<u>S</u> WGDYTRGPEP <u>K</u> ITWY	mAB 3 (1G01)
CDR _{L1}	配列番号: 4	GISSYL	共通祖先
	配列番号: 8	<u>D</u> ISS <u>F</u> L	mAB 1 (1G04)
	配列番号: 11	<u>D</u> ISSYL	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 15	GID <u>G</u> YL	mAB 3 (1G01)
CDR _{L2}	配列番号: 5	STL	共通祖先
	配列番号: 9	<u>S</u> LL	mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04) mAB 3 (1G01)
CDR _{L3}	配列番号: 6	LNSYPLTF	共通祖先 mAB 1 (1G04)
	配列番号: 12	<u>L</u> KSYPLTF	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 16	<u>L</u> DSYPLTF	mAB 3 (1G01)

【0042】

CDRは、軽鎖および重鎖に沿って間隔を空けて配置され、フレームワーク領域（FR：framework regions）として公知である4つの比較的保存された領域に隣接する。すなわち、重鎖可変領域はFR_{H1}、FR_{H2}、FR_{H3}、およびFR_{H4}として分類される4つのフレームワーク領域（FR）を含み、軽鎖可変領域はFR_{L1}、FR_{L2}、FR_{L3}、およびFR_{L4}として分類される4つのフレームワーク領域（FR）を含む。本明細書に記載される抗体におけるフレームワーク領域の代表的な配列を以下の表2に示す。上と同様に、仮説的な「共通祖先」も含まれており、「共通祖先」配列に対するアミノ酸置換は、太字および下線で示されている。

【0043】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 抗 NA 抗体に対する例示的な FR 配列

FR 名	配列番号	配列	起源
FR _{H1}	配列番号: 17	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS	共通祖先
	配列番号: 25	EVQLVESGGG <u>R</u> VVRPGGSLRLSCAAS	mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04)
	配列番号: 34	EVQLVESGGG <u>RAL</u> RPGGSLRLSCAAS	mAB 3 (1G01)
FR _{H2}	配列番号: 18	SWVRQAPGKGLEWVSG	共通祖先
	配列番号: 26	SWVRQAPGKGLE <u>F</u> VSG	mAB 1 (1G04)
	配列番号: 30	SWVRQ <u>P</u> PGKGLE <u>F</u> VSG	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 35	SWVRQ <u>V</u> PGKGLE <u>F</u> VSG	mAB 3 (1G01)
FR _{H3}	配列番号: 19	YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAL YHCARVR	共通祖先
	配列番号: 27	<u>F</u> TDSVKGRFTISRDNAK <u>S</u> SLYLQMNSLRAD <u>D</u> DTA <u>F</u> YYCARVR	mAB 1 (1G04)
	配列番号: 31	<u>F</u> TDSVKGRFTISRDN <u>V</u> K <u>S</u> SLYLQMNSLRAD <u>D</u> DTA <u>F</u> YYCARVR	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 36	Y <u>T</u> DSVKGRFT <u>V</u> SRDNAKNSLYL <u>H</u> IN <u>S</u> PKPEDTA LY <u>C</u> ART <u>S</u>	mAB 3 (1G01)
FR _{H4}	配列番号: 20	FDLWGRGTLTVTSS	共通祖先 mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04) mAB 3 (1G01)
FR _{L1}	配列番号: 21	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQ	共通祖先 mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04)
	配列番号: 37	DIQLTQSPSFLSASVGDRITITCRASQ	mAB 3 (1G01)
FR _{L2}	配列番号: 22	AWYQQKPGKAPKLLIYAA	共通祖先
	配列番号: 28	AWYQQKPGNAPK <u>V</u> LIYAA	mAB 1 (1G04)
	配列番号: 32	AWYQQKPGNAPKLLIYAA	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 38	AWYQQ <u>R</u> PGKAPNLLIYAA	mAB 3 (1G01)
FR _{L3}	配列番号: 23	QSGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQ	共通祖先
	配列番号: 29	QSGVPSRFGSGSGT <u>D</u> FTLTISSLQPEDFATYYC QQ	mAB 1 (1G04)
	配列番号: 33	QSGVPSRFS <u>A</u> FGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY C <u>Q</u> <u>H</u>	mAB 2 (1E04)
	配列番号: 39	QSGVPSRFGSG <u>Y</u> GTEFTLTISSLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>H</u>	mAB 3 (1G01)
FR _{L4}	配列番号: 24	GPGTKVDIK	共通祖先 mAB 1 (1G04) mAB 2 (1E04) mAB 3 (1G01)

【0044】

C D R_H 領域のいずれかを、上述の F R_H 配列の 1 つ以上と組み合わせて、重鎖可変領域を形成してもよい。様々な実施形態では、好適な重鎖可変領域は、配列番号 40、42、または 44 のいずれか 1 つを含み得る。さらに、多くの保存的置換が当業者によって想定され得るため、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、および 44 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含む重鎖可変領域を含み得る。例えば、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、および 44 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少な

くとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9%の配列同一性を含む重鎖可変領域を含み得る。同様に、CDRL領域のいずれかを、上述のFR_L配列の1つ以上と組み合わせて、軽鎖可変領域を形成してもよい。様々な実施形態では、好適な軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45のいずれか1つを含み得る。さらに、抗体の活性に影響を及ぼすことなく多くの保存的置換が当業者によって想定され得るため、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 41、43、および 45のいずれか1つの少なくとも約 70%の配列同一性を含む軽鎖可変領域を含み得る。例えば、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 41、43、および 45のいずれか1つに対する少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9%の配列同一性を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0045】

参照を容易にするために、配列番号 40～45に対する配列を以下の表 3 に記載する。この表では、各鎖内の CDR 配列に下線が引かれており、「共通祖先」に対する点突然変異は太字の斜字体にされている。

【0046】

【表 3】

表 3 抗 NA 抗体に対する例示的な重鎖または軽鎖可変領域

鎖タイプ	配列番号	配列
重鎖可変領域	配列番号: 40	EVQLVESGGG ~~<i>R</i>~~ VVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLE ~~<i>F</i>~~ VSGLNWNG ~~<i>D</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ DSVKGRETISRDNKSSLYLQMNSLRA ~~<i>D</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ICARVRTWGEYTTREEPIHSWY FDLWGRGTLTVSS
	配列番号: 42	EVQLVESGGG ~~<i>R</i>~~ VVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQ ~~<i>P</i>~~ PGKGLE ~~<i>F</i>~~ VSGLNWNG ~~<i>D</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ DSVKGRETISRDN ~~<i>K</i>~~ SSLYLQMNSLRA ~~<i>D</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ICARVRTWG ~~<i>D</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ FDLWGRGTLTVSS
	配列番号: 44	EVQLVESGGG ~~<i>R</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>L</i>~~ RPGGSLRLSCAASG ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>A</i>~~ MSWVRQ ~~<i>P</i>~~ PGKGLE ~~<i>F</i>~~ VSGLNWNG ~~<i>D</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ DSVKGRET ~~<i>V</i>~~ SRDNKNSLYL ~~<i>H</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>N</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ICAR ~~<i>T</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>R</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ FDLWGRGTLTVSS
軽鎖可変領域	配列番号: 41	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>M</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ AAS ~~<i>L</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>V</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>R</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>C</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>N</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>F</i>~~ GPGTKVDIK
	配列番号: 43	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>M</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ AAS ~~<i>L</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>V</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>R</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>C</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>H</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>F</i>~~ GPGTKVDIK
	配列番号: 45	DIQLTQSPSFLSASVGDR ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>C</i>~~ ~~<i>R</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>W</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>K</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>M</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ AAS ~~<i>L</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>V</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>R</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>G</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>I</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>F</i>~~ ~~<i>A</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>C</i>~~ ~~<i>Q</i>~~ ~~<i>H</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>D</i>~~ ~~<i>S</i>~~ ~~<i>Y</i>~~ ~~<i>P</i>~~ ~~<i>L</i>~~ ~~<i>E</i>~~ ~~<i>T</i>~~ ~~<i>F</i>~~ GPGTKVDIK

【0047】

当業者によって想定され得るとおり、種々の CDR 配列および FR 配列が様々なやり方で組み合わされて、新たな抗体が形成されてもよい。表 3 の完全な重鎖または軽鎖可変領域内であるか、またはそれを除いた CDR 配列の特定の組み合わせについて、以下により

詳細に説明する。

【0048】

様々な実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、a) 配列番号1、2、3、7、10、13、14、40、42、または44に対する少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.9%の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；b) 配列番号4、5、6、8、9、11、12、15、16、41、43、および45のいずれか1つに対する少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.9%の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；あるいは(c) それらの組み合わせを含む。

10

【0049】

様々な実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1もしくは13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号2もしくは7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、配列番号3、10、もしくは14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む免疫グロブリン重鎖を含む。

【0050】

さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号4、8、11、もしくは15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号5もしくは9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、配列番号6、12、もしくは16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

20

【0051】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、a) 配列番号1もしくは13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号2もしくは7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、または配列番号3、10、もしくは14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；および(b) 配列番号4、8、11、もしくは15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号5もしくは9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、または配列番号6、12、もしくは16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

30

【0052】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号1または13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号2または7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号3、10、または14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0053】

なおさらなる実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号1または13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁を含み得る。

40

【0054】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号1を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁を含み得る。

【0055】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁を含み得る。

【0056】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号2を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂を含み得る。

50

【0057】

さらなる実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂を含み得る。

【0058】

なおさらなる実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号3、10、または14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0059】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号3を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0060】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号10を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0061】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、配列番号14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0062】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域は、

a) 配列番号1を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号3もしくは配列番号10を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃、または

b) 配列番号13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含み得る。

【0063】

さらなる実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号4、8、11、または15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号5または9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号6、12、または16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0064】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号4、8、11、または15のいずれか1つを含むアミノ酸配列を有するCDRL₁を含み得る。

【0065】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号4を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁を含み得る。

【0066】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号8を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁を含み得る。

【0067】

別の例として、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号11を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁を含み得る。

【0068】

さらなる例として、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁を含み得る。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号5または9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂を含み得る。

【0070】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号

10

20

30

40

50

5を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂を含み得る。

【0071】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂を含み得る。

【0072】

さらなる実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号6、12、または16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0073】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号6を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0074】

例えば、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号12を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0075】

別の例として、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0076】

例えば、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、

a) 配列番号8を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号6を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃、または

b) 配列番号11を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号12を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃、または

c) 配列番号15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含み得る。

【0077】

したがって、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、(a) 配列番号1または13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号2または7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号3、10、または14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに(b) 配列番号4、8、11、または15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号5または9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号6、12、または16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

【0078】

本発明の例示的な抗体は、a) 配列番号1を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号3を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびにb) 配列番号8を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号6を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

【0079】

本発明の第2の例示的な抗体は、a) 配列番号1を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号10を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびにb) 配列番号11を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号12を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

【0080】

本発明の第3の例示的な抗体は、a) 配列番号13を含むアミノ酸配列を有するCDRH₁、配列番号7を含むアミノ酸配列を有するCDRH₂、および配列番号14を含むアミノ酸配列を有するCDRH₃を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびにb) 配列番号15を含むアミノ酸配列を有するCDRL₁、配列番号9を含むアミノ酸配列を有するCDRL₂、および配列番号16を含むアミノ酸配列を有するCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

【0081】

様々な実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1、2、3、7、10、13、14、40、42、または44に対する少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.9%の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。例えば、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.9%の同一性を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含み得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号1、3、7、10、13、または14のうちの少なくとも1つをさらに含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号1、3、または7のうちの少なくとも1つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号1、3、および7を含み得る。

【0084】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号1、7、または10のうちの少なくとも1つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号1、7、および10を含み得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号7、13、または14のうちの少なくとも1つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号7、13、および14を含み得る。

【0086】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号1または13を含むCDRH₁をさらに含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号2または7を含むCDRH₂をさらに含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号40、42、または44に対する少なくとも約70%の同一性を含み、かつ配列番号3、10、または14

を含む C D R_{H3} をさらに含む。

【0089】

様々な実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 4、5、6、8、9、11、12、15、16、41、43、または 45 に対する少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9% の同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の同一性を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。例えば、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 41、43、または 45 の少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9% を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 4、6、8、9、11、12、15、または 16 のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 6、8、または 9 のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 6、8、および 9 を含む。

20

【0092】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 9、11、または 12 のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 9、11、および 12 を含み得る。

【0093】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 9、15、または 16 のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。例えば、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 9、15、および 16 を含み得る。

30

【0094】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 4、8、11、または 15 のいずれか 1 つを含む C D R_{L1} をさらに含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 5 または 9 を含む C D R_{L2} をさらに含む。

40

【0096】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、配列番号 41、43、または 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70% の配列同一性を含み、かつ配列番号 6、12、または 16 のいずれか 1 つを含む C D R_{L3} をさらに含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 40、42、および 44 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、少

50

なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9%の配列同一性を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41、43、および 45 のいずれか 1 つに対する少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 99.5%、または少なくとも約 99.9%の配列同一性を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、および 44 のいずれか 1 つを含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41、43、および 45 のいずれか 1 つを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み得る。

10

【0099】

例えば、いくつかの実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41、43、および 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 42 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41、43、および 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み得る。

【0101】

さらなる実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41、43、および 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み得る。

20

【0102】

他の実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、または 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、または 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 43 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40、42、または 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。

【0105】

本明細書において提供される例示的な抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 40 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 41 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含んでもよい。

【0106】

本明細書において提供される第 2 の例示的な抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 42 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 43 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含んでもよい。

40

【0107】

本明細書において提供される第 3 の例示的な抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 44 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、配列番号 45 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含んでもよい。

【0108】

誘導体および合成的に合成された抗体または結合部分。

本明細書に記載される抗体または抗体結合フラグメントのいずれかに由来するペプチド

50

、ポリペプチド、および／またはタンパク質も提供される。一般的に、本明細書で使用されるとき、本明細書で提供される誘導体は、本明細書に記載される抗体または抗体結合フラグメントと実質的に類似のものである。例えば、誘導体は、自身のアミノ酸配列中に1つ以上の保存的置換を含んでいてもよいし、化学的修飾を含んでいてもよい。誘導体および修飾ペプチド／ポリペプチド／タンパク質は全て「構造的に類似している」と考えられ、これは、それらが親分子の構造を保持しており、親分子と同じやり方で抗原と相互作用すると予想されることを意味する。

【0109】

合成的に誘導された抗体または抗原結合部分のクラスは、親分子の残基を保存的に変異させて、親分子と同じ活性を維持するペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を生成することによって生成され得る。代表的な保存的置換は当技術分野で公知であり、本明細書でも要約されている。

【0110】

一般的に、保存的置換は、必要な活性が保持される限り、任意の位置で行われ得る。置換されるアミノ酸が元のアミノ酸と類似の特性を有する、いわゆる保存的交換が行われてもよく、それは例えばGluのAspによる交換、GlnのAsnによる交換、ValのIleによる交換、LeuのIleによる交換、およびSerのThrによる交換などである。例えば、類似の特性を有するアミノ酸は、脂肪族アミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン）；ヒドロキシルもしくは硫黄／セレン含有アミノ酸（例、セリン、システイン、セレノシステイン、スレオニン、メチオニン）；環状アミノ酸（例、プロリン）；芳香族アミノ酸（例、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）；塩基性アミノ酸（例、ヒスチジン、リジン、アルギニン）；または酸性およびそれらのアミド（例、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン）であり得る。欠失は、直接結合によるアミノ酸の置換である。欠失の位置には、ポリペプチドの末端および個々のタンパク質ドメイン間の結合部が含まれる。挿入は、ポリペプチド鎖へのアミノ酸の導入であり、直接結合が形式的に1つ以上のアミノ酸によって置換される。アミノ酸配列は、例えば改善された活性または変更された調節などを有するポリペプチドを生成し得る当技術分野で公知のコンピュータシミュレーションプログラムの助けを借りて調節され得る。この人工的に生成されたポリペプチド配列に基づいて、こうした調節されたポリペプチドをコードする対応する核酸分子を、所望の宿主細胞の特定のコドン使用を用いてインビトロで合成することができる。

【0111】

本明細書で提供される配列に基づいて機能性ペプチド／ポリペプチドまたはタンパク質を生成する第2のやり方は、コンピュータによる「インシリコ」設計の使用によるものである。例えば、当技術分野の標準的な方法を使用して、コンピュータ設計された抗体または抗原結合フラグメントが設計されてもよい。例えば、各々がその全体にわたって引用により援用される、ストラウチ (Strauch) EMら、(「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat BioTechnol.)」2017年7月; 35 (7): 667-671)、フライシュマン (Fleishman) SJら、(「サイエンス (Science.)」2011年5月13日; 332 (6031): 816-21)、およびコダーイ (Kodaly) MTら (「プロス・パソジェンズ (PLoS Pathog.)」2016年2月4日; 12 (2): e1005409)などを参照されたい。

【0112】

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体のいずれかと構造的に類似している抗体またはその抗体結合フラグメントが提供される。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、単一のCDRループと構造的に類似であり得る。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、例えば配列番号3、10、14、またはそれらの任意の組み合わせを含むループなどのCDRH₃ループと構造的に類似であり得る。

【0113】

配列番号1～45のいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドと構造的に類似

10

20

30

40

50

した三次構造を有するポリペプチドを含む抗体または抗原結合フラグメントも提供される。具体的には、このポリペプチドは、配列番号 3、10、および 14 のいずれか 1 つを含む単一の CDR_{H3} ループと構造的に類似した三次構造を有してもよい。

【0114】

抗体および抗原結合フラグメントの結合および機能

本明細書に記載される抗体およびその抗原結合フラグメントは、インフルエンザウイルスに結合できる。様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに結合できる。様々な実施形態では、ノイラミニダーゼはインフルエンザ A 型ノイラミニダーゼである。様々な実施形態では、ノイラミニダーゼは、N1~N9 型ノイラミニダーゼのいずれか 1 つである。上述のとおり、A 型インフルエンザウイルスは、自身のヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼに基づいて分類される。したがって、様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、H_XN1、H_XN2、H_XN3、H_XN4、H_XN5、H_XN6、H_XN7、H_XN8、または H_XN9 によって発現されるノイラミニダーゼに対する結合親和性を有し、ここで「X」は 1~18 の任意の整数である。様々な実施形態では、ノイラミニダーゼは B 型ノイラミニダーゼである。本発明の利点は、これらの抗体および／または抗原結合フラグメントが全てのノイラミニダーゼに対して全般的な親和性を有することである（すなわち、それらは B 型を除外して A 型ノイラミニダーゼのみに対して選択的なのではない）。様々な実施形態では、ノイラミニダーゼは、インフルエンザウイルスの表面上に発現されてもよい。さらに、本明細書中の抗体および抗原結合フラグメントは、ノイラミニダーゼ上の特異的エピトープに対して特定の親和性を有してもよい。エピトープは、例えば本明細書において配列番号 46 として提供されるものなどの、N1 ノイラミニダーゼの活性部位などを含んでもよい。

【0115】

様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、ノイラミニダーゼの少なくとも 1 つの活性部位残基と相互作用する。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、N1 残基の少なくとも 1 つの活性部位残基と相互作用し得る。N1 ノイラミニダーゼ（CA04N1）の活性部位の代表的なアミノ酸配列（配列番号 46）を以下の表に示す。

【0116】

【表 4】

N1 ノイラミニダーゼ配列 CA04N1 株: <i>A/California/04/2009</i> 配列番号: 46	MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNQIETCN QSVITYENNTWVNQTYVNISNTNFAAGQSVSVKLAGNSSLCPVSGWAIY SKDNSVRIGSKGDFVIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIK DRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDN GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQ ASYKIFRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN RPWVSFNQNLQYQIGYICSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFS FKYGNVWIGRTKSISSRNGFEMIWDPNWGTGTDNNFSIKQDIVGINEWS GYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTIWTSGSSISFCGVNS DTVGWSWPDGAELPFTIDK*
---	---

【0117】

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号 46 のアミノ酸番号付けに従う R118、E119、D151、R152、I222、R224、E276、E277、R371、および Y406 からなる群より選択される 1 つ以上の残基と相互作用し得る。好ましくは、抗体または抗体結合フラグメントがこれらの残基の 1 つ以上と相互作用するとき、それは配列番号 3 を含む CDR_{H3} 領域を含む。

【0118】

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗体結合フラグメントは、配列

番号46のアミノ酸番号付けに従うR118、E119、D151、R152、I222、R224、E277、R371、およびY406からなる群より選択される1つ以上の残基と相互作用し得る。好ましくは、抗体または抗体結合フラグメントがこれらの残基の1つ以上と相互作用するとき、それは配列番号10を含むCDRH3領域を含む。

【0119】

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗体結合フラグメントは、配列番号46のアミノ酸番号付けに従うR118、E119、L134、D151、R152、R156、W178、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406からなる群より選択される1つ以上の残基と相互作用し得る。好ましくは、抗体または抗体結合フラグメントがこれらの残基の1つ以上と相互作用するとき、それは配列番号14のCDRH3領域を含む。

10

【0120】

したがって、インフルエンザウイルスのN1ノイラミニダーゼに対する特異的親和性を有する抗体または抗原結合フラグメントが提供され、この抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号46の少なくとも約70%を含み、かつ配列番号46のアミノ酸番号付けに従うR118、E119、L134、D151、R152、R156、W178、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406から選択される少なくとも1つの残基を含有するN1ノイラミニダーゼの活性部位残基に結合する。

【0121】

抗体または抗原結合フラグメントの結合は、ノイラミニダーゼが、シアル酸受容体を切断して感染細胞からのウイルス粒子の放出を促進するという自身の正常な機能を果たす能力を中和または阻害できる。様々な実施形態では、抗体および／または結合フラグメントは、ノイラミニダーゼが自身の基質を切断する機能を、約0.0001μg/ml～約30μg/mlのIC50で阻害する。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、約0.001μg/ml～約30μg/mlのIC50を有し得る。抗体または抗原結合フラグメントの阻害機能は、例えば、抗体または抗原結合フラグメントの存在下または非存在下でノイラミニダーゼが自身の基質（シアル酸）を切断する能力を測定することなどによって決定され得る。

20

【0122】

ヒト化抗体、モノクローナル抗体、およびIgG抗体

30

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントはヒト化されている。「ヒト化」抗体とは一般的に、ヒト定常および／もしくは（ir）可変領域ドメインまたは特異的变化を有するマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはその他の種由来のキメラまたは突然変異モノクローナル抗体である。いわゆる「ヒト化」抗体を生成するための技術は、当業者に周知である。

【0123】

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントはモノクローナル抗体である。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、抗原の同じエпитープに結合する抗体または抗原結合フラグメントを指す。

【0124】

40

様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントはIgG型抗体である。

【0125】

様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、野生型ヒンジ領域または野生型Fc領域の配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有するヒンジ領域またはFc領域を含む。例えば、いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、野生型Fc領域の配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含有するFc領域を含む。様々な実施形態では、置換、欠失、または挿入は、抗体または抗原結合フラグメントの再利用を防止または低減する。

【0126】

50

様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号40～46のいずれかと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を含むアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0127】

抗体産生

本発明の抗体を産生するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域をコードするDNA分子を化学的に合成できる。合成DNA分子を、例えば定常領域コード配列および発現制御配列などを含む他の適切なヌクレオチド配列に連結して、所望の抗体をコードする従来の遺伝子発現構築物を生成できる。定義された遺伝子構築物の生成は、当技術分野における日常的な技術の範囲内である。

【0128】

所望の抗体をコードする核酸を発現ベクターに組み込む（連結する）ことができ、これを従来のトランスフェクションまたは形質転換技術によって宿主細胞に導入することができる。例示的な宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO: Chinese hamster ovary）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK: baby hamster kidney）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例、Hep G2）、および他様ではIgGタンパク質を産生しない骨髓腫細胞である。形質転換された宿主細胞は、宿主細胞が免疫グロブリン軽鎖および／または重鎖可変領域をコードする遺伝子を発現することを可能にする条件下で増殖され得る。

【0129】

特定の発現および精製条件は、使用される発現系に依存して変化するだろう。例えば、遺伝子が大腸菌（*E. coli*）において発現されるとき、最初に、遺伝子操作された遺伝子を例えばTrpまたはTacなどの好適な細菌プロモーターおよび原核生物シグナル配列の下流に配置することによって、その遺伝子を発現ベクターにクローニングする。発現された分泌タンパク質は、屈折体または封入体中に蓄積し、フレンチプレスまたは超音波処理による細胞破壊後に回収され得る。次いで、屈折体を可溶化し、当技術分野で公知の方法によってタンパク質をリフォールディングおよび切断する。

【0130】

遺伝子操作された遺伝子が、例えばCHO細胞などの真核宿主細胞において発現されるとき、それは最初に発現ベクターに挿入され、この発現ベクターは好適な真核生物プロモーターと、分泌シグナルと、ポリA配列と、終止コドンとを含み、かつ必要に応じてエンハンサーおよび種々のイントロンを含んでもよい。この発現ベクターは、重鎖または軽鎖の全体または一部が発現されることを可能にする定常領域の全体または一部をコードする配列を必要に応じて含む。遺伝子構築物は、従来の技術を用いて真核宿主細胞に導入され得る。宿主細胞は、VLもしくはVHフラグメント、VL-VHヘテロ二量体、VH-VLもしくはVL-VH単鎖ポリペプチド、完全な免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖、またはそれらの一部分を発現し、それらの各々は、別の機能（例、細胞毒性）を有する部分に結合されてもよい。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、重鎖（例、重鎖可変領域）または軽鎖（例、軽鎖可変領域）の全体または一部を発現するポリペプチドを発現する単一ベクターでトランスフェクトされる。他の実施形態では、宿主細胞は、（a）重鎖可変領域を含むポリペプチドおよび軽鎖可変領域を含むポリペプチド、または（b）免疫グロブリン重鎖全体および免疫グロブリン軽鎖全体をコードする単一のベクターでトランスフェクトされる。さらに他の実施形態では、宿主細胞は、2つ以上の発現ベクター（例、重鎖または重鎖可変領域の全体または一部を含むポリペプチドをコードする1つの発現ベクター、および軽鎖または軽鎖可変領域の全体または一部を含むポリペプチドをコードする別の発現ベクター）で同時トランスフェクトされる。

【0131】

免疫グロブリン重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含むポリペプチドは、こうした可変領域をコードする発現ベクターでトランスフェクトした宿主細胞を、ポリペプチドの発現

を可能にする条件下で増殖（培養）させることによって産生され得る。発現の後、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST: glutathione-S-transferase）およびヒスチジントグなどの親和性タグを用いることなどの、当技術分野で公知の技術を用いて、ポリペプチドを回収して精製または単離できる。

【0132】

ノイラミニダーゼタンパク質に結合するモノクローナル抗体、または抗体の抗原結合フラグメントは、（a）完全もしくは部分的な免疫グロブリン重鎖をコードする発現ベクター、および完全もしくは部分的な免疫グロブリン軽鎖をコードする別個の発現ベクター；または（b）両方の鎖（例、完全もしくは部分的な重鎖および軽鎖）をコードする単一の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を、両方の鎖の発現を可能にする条件下で増殖（培養）させることによって産生され得る。インタクトな抗体（または抗体の抗原結合フラグメント）は、例えばプロテインA、プロテインG、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびヒスチジントグなどの親和性タグなどの、当技術分野で公知の技術を用いて、回収および精製または単離され得る。単一の発現ベクターまたは2つの別個の発現ベクターから重鎖および軽鎖を発現させることは、当業者の技術の範囲内である。

【0133】

したがって、様々な実施形態では核酸が提供され、この核酸は、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む。当業者は、これらの核酸分子の機能的変異体も本発明の一部であることが意図されることを理解するであろう。機能的変異体は、標準的な遺伝子コードを用いて直接翻訳されて、親核酸分子から翻訳されたものと同一のアミノ酸配列を提供し得る核酸配列である。

【0134】

核酸は、例えば、以下の表に記載される配列番号47～52のいずれか1つを含むヌクレオチド配列を含み得る。例えば、核酸は、配列番号47～49のいずれか1つを含み得る。例えば、核酸は、配列番号50～52のいずれか1つを含み得る。

【0135】

10

20

30

40

50

【表 5】

名称 (配列番号)	配列
1G01_H ホモ・サピエンス (<i>Homo sapiens</i>) [ク ローン=1G01H] ヒト重鎖クローン 1G01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 47)	gaggtgcagctgggtggagctctgggggacgtgcgctac ggcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctc tggattcaagtttgatgattatgccatgagctgggtc cgccaggttccaggaagggaactggagtttgtctctg gtcttaattggaatggtgacatcacagcttatacaga ctctgtgaagggccgattcactgtctccagagacaac gccaagaactccctgtatctgcacatcaacagtccga agcccgaggacacggccctctattattgtgcgagaac tagctcatggggcgattatacaagaggcctgagcca aagattacctggtacttcgatctctggggccggggca ctctgggtcaccgtctcctcag
1G04_H ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1G04H] ヒト重鎖クローン 1G04 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 48)	gaggtgcagctgggtggagctctgggggacgtgtggtac ggccgggggggatccctgcgactctcctgtgcagcctc tggattcacctttgatgactatggcatgagctgggtc cgccaagctccaggaaggggctggaatttgtctctg gtcttaactggaatggagatatcacagctttcacaga ctctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaac gccaagagctccctgtatctgcaaatgaacagtctga gagccgacgacacggccttctattactgtgcgagagt gcgagctggggcgagtatacaacaagagaggagcca attcacagctggtacttcgatctctggggccgtggca ccctgggtcaccgtctcctcag
1E01_H ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1E01H] ヒト重鎖クローン 1E01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 49)	gaggtgcagctgggtggagctctgggggacgtgtggtac ggccgggggggtccctgagactctcctgtgcgcctc tggattcacgtttgatgattatggcatgagttgggtg cgccaacctccaggaaggggctggagtttgtctctg gtcttaactggaatggagatatcacagcttttacaga ctctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaac gteaagagttccctgtatttgcaaatgaacagtctga gagccgacgacacggccttctattactgtgcgagagt acggacatggggcgactatacaacaggagaggagata atcaacagctggtacttcgatctctggggccgtggca ccctgggtcaccgtctcctcag
1E01_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1E01L] ヒト軽鎖クローン 1E01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 50)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGACATTAGCAGCTATTTAGCCTGGTATCAG CAAAAACCAGGGAATGCCCTAAGCTCCTGATCTATG CTGCATCCCTTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGCCTTTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACA ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATT ACTGTCAACACCTTAAGAGTTACCCCTGTTCACCTT CGGCCCTGGGACCAAGTGATATCAAAC

10

20

30

40

1G01_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [クロー ーン=1G01L] ヒト軽鎖クローン 1G01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 51)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTG CATCTGTTGGAGACAGAATAACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGGCATTGATGGTTATTTAGCCTGGTATCAG CAAAGACCAGGGAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATG CTGCATCCCTTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATATGGGACAGAATTCACCTCTACA ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCAACTTATT ACTGTCAACATCTTGACAGTTACCCCCTGTTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC
1G04_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [クロー ーン=1G04L] ヒト軽鎖クローン 1G04 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 52)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGACATTAGCAGTTTTTTAGCCTGGTATCAG CAAAAACCAGGGAATGCCCTAAGGTCCTGATCTATG CTGCGTCCCTTTTGCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACA ATCAGCAGCCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATT ACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCCCTGTTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC

10

20

【0136】

様々な実施形態では、核酸は、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、核酸は、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントの免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する1つ以上の相補性決定領域(CDR)をコードする。上述のとおり、2つ以上のタンパク質産物(例、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖)をコードする単一の核酸が提供されてもよい。代替的には、抗体および／または抗原結合フラグメントの1つの成分(例、軽鎖または重鎖)を各々がコードする2つ以上の別個の核酸が提供されてもよい。

30

【0137】

様々な実施形態では、本明細書に記載される核酸のうちの1つ以上を含む発現ベクターが提供される。ベクターは、例えばF、F1、RP1、Col、pBR322、TOL、Tiなど；コスミド；ファージ、例えばラムダ、ラムドイド、M13、Mu, P1、P22、Qβ、T偶数系、T奇数系、T2、T4、T7など；または植物ウイルスなどのプラスミドに由来し得る。ベクターは、本発明の結合分子のクローニングおよび／または発現のために使用されてもよく、遺伝子治療の目的のためにも使用され得る。本発明による1つ以上の核酸分子が1つ以上の発現調節核酸分子に動作可能に連結されたものを含むベクターも、本発明によって包含される。ベクターの選択は、その後の組み換え手順および使用される宿主に依存する。宿主細胞へのベクターの導入は、とりわけ、リン酸カルシウムトランスフェクション、ウイルス感染、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクタミントランスフェクション、またはエレクトロポレーションによって行われ得る。ベクターは、自律的に複製してもよいし、自身が組み込まれた染色体と一緒に複製してもよい。好ましくは、ベクターは1つ以上の選択マーカーを含む。マーカーの選択は、選択した宿主細胞に依存してもよい。マーカーとしては、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK: thymidine kinase gene from Herpes simplex virus)、マウス由来のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(dhfr: dihydrofolate reductase)が挙げられるが、これらに限定されない。ヒト結合分子を単離するために使用され得るタンパク質

40

50

またはペプチドをコードする1つ以上の核酸分子に動作可能に連結された上述のヒト結合分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むベクターも、本発明によって包含される。これらのタンパク質またはペプチドとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、金属結合ポリヒスチジン、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、およびベクターガラクトシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトして、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域への核酸の翻訳および発現を誘導してもよい。したがって、本明細書に記載される任意の発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。宿主細胞としては、哺乳動物、植物、昆虫、真菌、または細菌起源の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。細菌細胞としては、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば大腸菌 (*E. coli*) などのエシェリキア (*Escherichia*) 属のいくつかの種、およびシュードモナス (*Pseudomonas*) などに由来する細胞が挙げられるが、これらに限定されない。真菌細胞のグループにおいて、好ましくは酵母細胞が使用される。酵母における発現は、例えば、とりわけピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) などの酵母株を使用することによって達成され得る。さらに、例えばショウジョウバエ (*Drosophila*) および Sf9 由来の細胞などの昆虫細胞が、宿主細胞として使用され得る。それに加えて、宿主細胞は、例えばとりわけ、例えば森林植物などの作物植物由来の細胞、または例えば穀物植物もしくは薬用植物などの食物および原料を提供する植物由来の細胞、または観賞植物由来の細胞、または花球作物由来の細胞などの植物細胞であり得る。形質転換された (トランスジェニック) 植物または植物細胞は、例えばアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介遺伝子移入、葉片の形質転換、ポリエチレングリコール誘導 DNA 移入によるプロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション、超音波処理、マイクロインジェクション、またはボリスティック (*bolistic*) 遺伝子移入などの公知の方法によって産生される。加えて、好適な発現系はバキュロウイルス系であり得る。例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS 細胞、BHK 細胞、NSO 細胞、またはボウズ (Bowes) メラノーマ細胞などの哺乳動物細胞を使用する発現系が、本発明において好ましい。哺乳動物細胞は、哺乳動物起源の天然分子に最も類似した翻訳後修飾を有する発現タンパク質を提供する。本発明はヒトに投与する必要がある分子を取り扱うため、完全なヒト発現系が特に好ましいだろう。したがって、さらに好ましくは、宿主細胞はヒト細胞である。ヒト細胞の例は、とりわけ HeLa、911、AT1080、A549、HEK293、および HEK293T 細胞である。

【0139】

さらに、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに結合する抗体または抗原結合フラグメントを産生するための方法が提供され、この方法は、宿主細胞が免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む1つまたは複数のポリペプチドを発現するような条件下で本明細書に記載される宿主細胞を増殖させることによって抗体または抗原結合フラグメントを産生することと、抗体または抗原結合フラグメントを精製することを含む。

【0140】

医薬組成物

本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントの少なくとも1つと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供される。

【0141】

本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントのうちの1つ以上を含有する医薬組成物は、任意の従来方式で製剤化され得る。適切な製剤は、選択された投与経路に部分的に依存する。投与経路としては、非経口投与 (例、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、直腸投与、皮下投与、筋肉内投与、眼窩内投与、嚢内投与、脊髄内投与、腹腔内投

10

20

30

40

50

与、または胸骨内投与)、局所投与(経鼻投与、経皮投与、眼内投与)、膀胱内投与、髄腔内投与、腸内投与、経肺投与、リンパ内投与、腔内投与、腔内投与、経尿道投与、皮内投与、耳内投与、乳房内投与、頬側投与、同所投与、気管内投与、病変内投与、経皮投与、内視鏡的投与、経粘膜投与、舌下投与、および腸内投与が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、組成物は非経口的に投与されるか、または吸入される(例、鼻腔内)。

【0142】

本発明の組成物における使用のための薬学的に許容される賦形剤は、使用される特定の化合物、ならびにその濃度、安定性、および意図されるバイオアベイラビリティ；対象、その年齢、サイズ、および全身状態；ならびに投与経路を含むいくつかの因子に基づいて選択される。

10

【0143】

加えて医薬組成物は、非経口投与のために製剤化されてもよく、例えば静脈内、動脈内、皮下、直腸、皮下、筋肉内、眼窩内、嚢内、脊髄内、腹腔内、または胸骨内などの経路を介した注入のために製剤化され得る。非経口投与に好適な剤形としては、溶液、懸濁物、分散物、エマルジョン、または非経口投与され得る任意のその他の剤形が挙げられる。

【0144】

薬学的に許容される賦形剤は、例えば「薬品添加物ハンドブック(The Handbook of Pharmaceutical Excipients)」(米国薬剤師会(American Pharmaceutical Association)、ワシントン(Washington), D. C. および英国薬剤師会(The Pharmaceutical Society of Great Britain)、ロンドン(London)、イングランド(England)、1968)などにおいて同定されている。様々な目的のために、本発明の医薬組成物に付加的な賦形剤が含まれ得る。これらの賦形剤は、投与部位における化合物の保持の増強、組成物の安定性の保護、pHの調節、および化合物の医薬組成物への加工の促進などの特性を付与することができる。その他の賦形剤としては、例えば充填剤または希釈剤、界面活性剤、湿潤剤または乳化剤、保存剤、pH調整剤または緩衝剤、増粘剤、着色剤、染料、流動助剤、不揮発性シリコン、接着剤、増量剤、香味料、甘味料、吸着剤、結合剤、崩壊剤、潤滑剤、コーティング剤、および抗酸化剤などが挙げられる。

20

30

【0145】

様々な実施形態では、本発明による医薬組成物は、インフルエンザウイルスを標的とする少なくとも1つの付加的な抗体または抗原結合フラグメントを含み得る。これらの実施形態では、医薬組成物は抗体のカクテルまたは混合物を含む。付加的な抗体は、ヘマグルチニン(HA)タンパク質またはインフルエンザウイルス上に存在する異なる免疫原性構造(M2など)に対して選択的であってもよい。付加的な抗体は、ヘマグルチニンタンパク質のヘッドまたはストークに選択的に結合してもよい。

【0146】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも1つの他の治療剤、予防剤、および／または診断剤をさらに含んでもよい。好ましくは、前記治療剤および／または予防剤は、インフルエンザウイルス感染および／またはこうした感染から生じる状態を予防および／または処置できる薬剤である。治療剤および／または予防剤としては抗ウイルス剤が挙げられるが、これに限定されない。こうした薬剤は、結合分子、小分子、有機または無機化合物、酵素、ポリヌクレオチド配列、抗ウイルスペプチドなどであり得る。治療剤および／または予防剤は、M2阻害剤(例、アマンタジン、リマンタジン)および／またはノイラミニダーゼ阻害剤(例、ザナミビル、オセルタミビル)を含み得る。様々な実施形態では、抗ウイルス剤は、バロキサビル、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

40

【0147】

付加的な抗体または治療剤／予防剤および／もしくは診断剤を、本発明の抗体および抗

50

原結合フラグメントと組み合わせて使用してもよい。本明細書において「組み合わせて」とは、同時に、別個の製剤として、または1つの単一の組み合わされた製剤として、または別個の製剤としての逐次投与レジメントに従って、任意の順序でということ进行を意味する。実験段階にある、インフルエンザウイルスによる感染および／またはこうした感染から生じる状態を予防および／または処置することができる薬剤も、本発明において有用なその他の治療剤および／または予防剤として使用されることがある。

【0148】

医薬組成物は、血液、血漿、または血液もしくは血漿の主要成分（例、血球、フィブリン、ヘモグロビン、アルブミンなど）を伴わずに製剤化され得る。医薬組成物は、血液、血漿、または血液もしくは血漿の主要成分を含まないか、または実質的に含まない（例、1 wt. %未満またはさらに0.1 wt. %未満）ことも可能である。

【0149】

ユニバーサルインフルエンザワクチン

様々な実施形態では、インフルエンザ感染を予防するためのワクチンが提供される。有利なことに、このワクチンは、インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスからの防御を提供し得る。様々な実施形態では、ワクチンは、ノイラミニダーゼに対して選択的な本明細書に開示される抗体または抗原結合フラグメントのいずれかを含む。様々な実施形態では、ワクチンは、例えば本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントが標的とする残基を含むポリペプチドなどのユニバーサルノイラミニダーゼエピトープを含んでもよい。例えば、エピトープは、配列番号46に対して少なくとも約70%の配列同一性を含み、かつR118、E119、L134、D151、R152、R156、W178、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406からなる群より選択される残基の少なくとも1つを含むアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合には、エピトープは、配列番号46に対して少なくとも約70%の同一性を含み、かつ以下の残基、すなわちR118、E119、D151、R152、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406を含む。いくつかの場合には、エピトープは、配列番号46に対して少なくとも約70%の同一性を含み、かつ以下の残基、すなわちR118、E119、D151、R152、I222、R224、E277、R371、およびY406を含む。いくつかの場合には、エピトープは、配列番号46に対して少なくとも約70%の同一性を含み、かつ以下の残基、すなわちR118、E119、L134、D151、R152、R156、W178、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406を含む。本明細書に記載されるエピトープの全てにおいて、残基は、配列番号46のアミノ酸番号付けに従って番号付けされている。いくつかの実施形態では、ワクチンは、上述のエピトープ（例、ポリペプチド）のいずれかをコードする核酸（例、RNAまたはDNA）を含んでもよい。

【0150】

様々な実施形態では、ワクチンは、免疫応答を刺激するアジュバントをさらに含む。好適なアジュバントは当技術分野で公知であり、例えばミョウバン、水酸化アルミニウム、モノホスホリリピドA（MPL: monophosphoryl lipid A）、またはそれらの組み合わせなどを含み得る。さらに、ワクチンは、本明細書で上述した医薬組成物に従う好適な担体および賦形剤を使用して調製されてもよい。

【0151】

様々な実施形態では、ワクチンは、インフルエンザ感染を予防するための免疫学的応答を誘発できる。インフルエンザ感染は、インフルエンザAウイルスまたはインフルエンザBウイルスによって引き起こされ得る。いくつかの実施形態では、インフルエンザ感染は、HXN1、HXN2、H2N3、HXN4、HXN5、HXN6、HXN7、HXN8、HXN9、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるインフルエンザAウイルスによって引き起こされ、ここでXは1～18の任意の整数である。

【0152】

処置の方法

様々な実施形態では、必要とする対象においてインフルエンザを予防または処置する方法が提供される。この方法は、本明細書に記載される任意の抗体もしくは抗原結合フラグメント（抗体もしくは抗原結合フラグメントをコードする任意の核酸もしくは発現ベクターを含む）、任意のワクチン、または任意の組成物を対象に投与することを含み得る。

【0153】

様々な実施形態では、組成物は非経口的に（parentally）（例、全身的に）投与される。他の実施形態では、組成物は経口的に（例、鼻腔内に）吸入される。両方の場合において、組成物は、上述の投与様式に従って（例、賦形剤とともに）製剤化される。

【0154】

様々な実施形態では、組成物は、鼻腔内、筋肉内、静脈内、および／または皮内の経路を介して投与される。いくつかの実施形態では、組成物はエアロゾル（例、経鼻投与用）として提供される。

【0155】

投与レジメントは、最適な所望の応答（例、予防的または治療的応答）を提供するように調整され得る。したがって、本明細書における方法で使用される用量は、意図される使用（例、予防的使用対治療的使用）に応じて変動し得る。それにかかわらず、本明細書に記載される組成物は、約1～約100mg/kg体重、または約1～約70mg/kg体重の用量で投与されてもよい。さらに、単回ボラスが投与されてもよいし、数回に分割した用量が経時的に投与されてもよいし、治療状況の治療の緊急性によって示されるとおりに用量を相対的に減少または増加させてもよい。

【0156】

様々な実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、遺伝子治療技術を使用して送達される。こうした技術は当技術分野で周知であり、一般的に、目的の遺伝子産物をコードする核酸を含むウイルスベクターを、必要とする対象に投与することを含む。したがって、特定の実施形態では、抗体または抗体結合フラグメントをインビボで発現させるために必要な核酸（例えば本明細書で提供される核酸など）のうちの1つ以上を含有するウイルスベクターまたは複数のベクター（例、アデノウイルス）を投与することによって、本明細書に記載される抗体または抗原結合フラグメントがそれを必要とする対象に送達される。同様の送達方法は、他の疾患状況における防御抗体の発現に成功している。例えば、その全開示が本明細書において引用により援用されるソーフェル・ポDESTA（Soffer-Podesta）C.ら、「抗V抗原モノクローナル抗体のアデノウイルス媒介送達は致死性ペスト菌チャレンジに対してマウスを防御する（Adenovirus-mediated delivery of an Anti-V Antigen Monoclonal Antibody Protects Mice against a Lethal Yersinia pestis Challenge）」インフェクション・アンド・イミュニティ（Infection and Immunity）2009年3月、77（4）1561-1568などを参照されたい。

【0157】

様々な実施形態において、処置されるべきインフルエンザは、インフルエンザAウイルスまたはインフルエンザBウイルスである。いくつかの実施形態では、処置されるべきインフルエンザは、H1N1、H1N2、H2N3、H1N4、H1N5、H1N6、H1N7、H1N8、H1N9、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択され、ここでXは1～18の任意の整数である。

【0158】

本発明を詳細に説明してきたが、添付の請求項において定義された本発明の範囲から逸脱することなく修正および変形が可能であることは明らかであろう。

【実施例】

【0159】

以下の非限定的な実施例は、本発明をさらに例示するために提供されるものである。

【0160】

材料および方法

以下の材料および方法を使用して、実施例1～4に記載の実験を行った。

【0161】

患者

ヒト抹消血単核細胞 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) を、バーンズ・ジューイッシュ病院救急部門インフルエンザ (Barnes Jewish Hospital Emergency Department Influenza) (EDFLU) 前向き観察コホート研究に登録された単一の対象1718003から得た。EDFLU研究は、セントルイス・ワシントン大学 (Washington University in Saint Louis) の機関審査委員会 (Institutional Review Board) によって審査および承認された (承認#2017-10-220)。1718003は、2017～2018年のH3N2優勢インフルエンザシーズン中に採用され、バーンズ・ジューイッシュ病院救急部門への治療提示後の症候性疾患の5日目にPBMCが得られた。対象は、疾患の発症前に2017～2018年の季節性インフルエンザワクチンを受けており、過去のインフルエンザシーズンには他の季節性インフルエンザワクチンを受けていた。対象は短期間入院し、合併症は伴わずに入院の1.5日後に退院した。

10

【0162】

PBMC単離

標準的な静脈切開技術を用いて、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid) で抗凝固剤処理したサンプルチューブに血液を採取した。採取から8時間以内に、フィコール (Ficoll) 上での層化および400gにて30分間の遠心分離によって、PBMCを調製した。フィコール界面のPBMC層を回収し、1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline) で洗浄し、ロズウェルパーク記念研究所 (RPMI: Roswell Park Memorial Institute) -1640培地に再懸濁した。細胞カウントが得られ、10%ジメチルスルホキシド (DMSO: dimethyl sulfoxide) および40%ウシ胎児血清 (FBS: fetal bovine serum) を補充したRPMI-1640培地中で細胞を低温保存した。

20

【0163】

細胞選別

2% FBSおよび1mM EDTAを補充したPBS中に再懸濁した凍結保存PBMCを使用して、選別のための染色を行った。細胞を、CD71-FITC (バイオレジェンド (Biolegend)、クローンCY1G4)、CD19-PE (バイオレジェンド、クローンHIB19)、IgD-PerCP-Cy5.5 (バイオレジェンド、クローンIA6-2)、CD38-BV605 (バイオレジェンド、クローンHIT2)、およびZombie Aqua (バイオレジェンド) によって4℃で30分間染色した。次いで細胞を2回洗浄し、FACSARIA IIを使用して、単一のASC (生シングレットCD19+CD4-IgDlo CD38+CD71+) を、1U/μLのRNアーゼ阻害剤 (プロメガ (Promega)) を補充した10μLの10mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス) を含有する96ウェルプレート中に選別し、直ちにドライアイス上で凍結させた。

30

40

【0164】

モノクローナル抗体生成

以前に記載されたとおりに抗体をクローニングした (1)。一般的に、IgA抗体を発現する3つの抗体分泌細胞 (ASC: antibody secreting cells) を上述のとおりに対象から単離した。可変遺伝子 (V_HおよびV_K) を細胞cDNAからIgG1発現ベクターにクローニングして、インビボでIgA抗体の特異性を有する天然に存在しないIgG抗体を発現させた。簡潔には、V_HおよびV_K遺伝子を、(2) に詳述されるプライマーセットを使用して、IgGおよびIgκに特異的なプライマーのカ

50

クテルを使用して、単一に選別された抗体分泌細胞（ASC）からの逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR：reverse transcriptase-polymerase chain reaction）およびネステッドPCR反応によって増幅し、次いで配列決定した。組み換え抗体を生成するために、VH3-20、JH2、VK1-9、およびJK3遺伝子に対するプライマーによるPCRによって制限部位を組み込んだ。増幅されたVHおよびVK遺伝子を、以前に記載されたとおりに、それぞれIgG1およびIgκ発現ベクターにクローニングした（1～3）。抗体を発現させるために使用したヌクレオチド配列を以下の表に示す。重鎖および軽鎖プラスミドを発現のためにExp293F細胞（ジブコ（Gibco））に同時トランスフェクトし、抗体をプロテインAアガロース（インビトロジェン（Invitrogen））で精製した。
【0165】

10

20

30

40

50

【表 6】

名称 (配列番号)	配列
1G01_H ホモ・サピエンス (<i>Homo sapiens</i>) [ク ローン=1G01H] ヒト重鎖クローン 1G01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 47)	gaggtgcagctggtggagtctgggggacgtgcgctac ggccctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctc tggattcaagtttgatgattatgccatgagctgggtc cgccaggttccaggaagggaactggagtttgctctg gtcttaattggaatggtgacatcacagcttatacaga ctctgtgaaggggccgattcactgtctccagagacaac gccaagaactccctgtatctgcacatcaacagtcga agcccagagacacggccctctattattgtgcgagaac tagctcatggggcgattatacaagagggcctgagcca aagattacctggtacttcgatctctggggccggggca ctctggtcaccgtctcctcag
1G04_H ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1G04H] ヒト重鎖クローン 1G04 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 48)	gaggtgcagctggtggagtctgggggacgtgtggtac ggccgggggggtccctgcgactctcctgtgcagcctc tggattcacctttgatgactatggcatgagctgggtc cgccaagctccaggaaggggctggaatttgctctg gtcttaactggaatggagatatcacagctttcacaga ctctgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaac gccaagagctccctgtatctgcaaatgaacagcttga gagccgacgacacggccttctattactgtgcgagagt gcggacgtggggcgagtatacaacaagagaggagcca attcacagctggtacttcgatctctggggccgtggca ccctggtcaccgtctcctcag
1E01_H ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1E01H] ヒト重鎖クローン 1E01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 49)	gaggtgcagctggtggagtctgggggacgtgtggtac ggccgggggggtccctgagactctcctgtgccgcctc tggattcacgtttgatgattatggcatgagttgggta cgccaacctccaggaaggggctggagtttgctctg gtcttaactggaatggagatatcacagcttttacaga ctctgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaac gtcaagagttccctgtatttgcaaatgaacagcttga gagccgacgacacggccttctattactgtgcgagagt acggacatggggcgactatacaacaggagaggagata atcaacagctggtacttcgatctctggggccgtggca ccctggtcaccgtctcctcag
1E01_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [ク ローン=1E01L] ヒト軽鎖クローン 1E01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 50)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGACATTAGCAGCTATTTAGCCTGGTATCAG CAAAAACCCAGGAATGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATG CTGCATCCCTTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGCCTTTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACA ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATT ACTGTCAACACCTTAAGAGTTACCCCTGTTCACCTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAAC

10

20

30

40

1G01_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [クロー ーン=1G01L] ヒト軽鎖クローン 1G01 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 51)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTG CATCTGTTGGAGACAGAATAACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGGCATTGATGGTTATTTAGCCTGGTATCAG CAAAGACCAGGGAAGCCCTAACCTCCTGATCTATG CTGCATCCCTTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATATGGGACAGAATTCACCTCTACA ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCAACTTATT ACTGTCAACATCTTGACAGTTACCCCCTGTTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC
1G04_L ホモ・サピエンス (<i>H. sapiens</i>) [クロー ーン=1G04L] ヒト軽鎖クローン 1G04 免疫グロブリン可 変領域、mRNA、部分 CDS (配列番号: 52)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC CAGTCAGGACATTAGCAGTTTTTTAGCCTGGTATCAG CAAAAACCAGGGAATGCCCCTAAGGTCCTGATCTATG CTGCGTCCCTTTTGCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACCTCTACA ATCAGCAGCCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATT ACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCCCTGTTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC

10

20

【0166】

細胞、ウイルス、およびタンパク質

ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM; ジブコ) にペニシリン・ストレプトマイシン抗生物質混合物 (100 U/mL のペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン; ジブコ) および FBS (10%; コーニング (Corning)) を含ませて完全 DMEM (cDMEM: complete DMEM) とした培地中で、ヒト胎児腎臓細胞 (293T) を増殖させた。メイディン・ダービー・イヌ腎臓 (MDCK: Madin Darby canine kidney) 細胞を cDMEM 中で増殖させて維持した。BTI-TN-5B1-4 (イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*)) 細胞を、抗生物質 (100 U/mL のペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン; ジブコ) を補充した無血清 SFX 培地 (ハイクローン (HyClone)) 中で増殖させた。Sf9 (ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*)) 細胞を、10% FBS および pen-strep 抗生物質混合物の存在下で TNM-FH 培地 (ジェミニ・バイオプロダクツ (Gemini Bio-Products)) 中で維持した。ADCC バイオエフェクター FcγRIIIa 細胞 (プロメガ) の単回使用アリコートを使用前に解凍した。インフルエンザウイルスを、8~10 日齢の発育鶏卵 (チャールズリバーラボラトリーズ (Charles River Laboratories)) において、33°C (インフルエンザ B ウイルス) で 3 日間、または 37°C (インフルエンザ A ウイルス) で 2 日間、それぞれ増殖させた。ウイルスリアソータントを、以前に記載されたとおりのプラスミドベースの逆遺伝学技術によってレスキューした (4)。この研究で使用したウイルスの完全なリストが表 6 に見出され得る。以前に詳細に記載されたとおりのバキュロウイルス発現系において組み換えタンパク質を発現させた (5)。全ての NA を、N 末端血管拡張刺激リントタンパク質四量体化ドメインおよび精製のためのヘキサヒスチジンタグを有する外部ドメインとして発現させた。組み換えノイラミニダーゼの完全なリストが以下の表 4 に見出され得る。

30

40

【0167】

50

【表 7】

表 4 本研究で使用した組み換え NA タンパク質。

サブタイプ	株名	由来サブタイプ
N2	A/chicken/Hong Kong/G9/1997	H9N2
N2	A/Hong Kong/4801/2014	H3N2
N2	A/Texas/50/2012	H3N2
N3	A/swine/Missouri/4296424/2006	H6N3
N7	A/mallard/IA/10BM01929/2010	H10N7
N6	A/caspian seal/Russia/T1/2012	H4N6
N9	A/Anhui/1/2013	H7N9
N9	A/Hong Kong/4801/2014	H7N9
N1	A/Michigan/45/2015	pH1N1
N1	A/Vietnam/1204/2004 (N1)	H5N1
N4	A/mallard/Sweden/24/2002 (N4)	H8N4
N5	A/mallard/Sweden/86/2003 (N5)	H12N5
N8	A/chicken/Netherlands/14015531/2014	H5N8
B NA	B/Malaysia/2506/2004	B (V)
B NA	B/Florida/04/2006	B (Y)

【0168】

酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)。

96ウェルマイクロタイタープレート (サーモフィッシャー (Thermo Fisher)) を、1×コーティング緩衝液 (KPLコーティング溶液; セラケア (SeraCare)) 中の $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の組み換え NA $50\mu\text{L}$ で、 4°C にて一晩コーティングした。220 μL のブロッキング溶液 (PBS (ジブコ) に 0.1% Tween-20 (TPBS; フィッシャーサイエンティフィック (Fisher Scientific))、3% ヤギ血清 (ライフテクノロジーズ (Life Technologies))、および 0.5% 粉乳 (アメリカンバイオ (American-Bio)) を補充したもの) を全てのウェルに加え、プレートを室温で1時間インキュベートした。mAb を $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の出発濃度に希釈し、1:3 で連続希釈し、室温で2時間インキュベートした。プレートを TPBS で3回洗浄し、ブロッキング溶液で1:3000 に希釈した $50\mu\text{L}$ の抗ヒト IgG (Fab 特異的) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 抗体 (HRP、ヤギで産生; シグマ (Sigma)、#A0293) を全てのウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロタイタープレートを4回洗浄し、100 μL の SigmaFast o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (o-phenylenediamine dihydrochloride) (OPD; シグマ) を全てのウェルに加えた。10分後に $50\mu\text{L}$ の3M塩酸 (サーモフィッシャー) で反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダー (バイオテック (Bio-Tek)) によって490 nm の波長でプレートを読み取った。マイクロソフト・エクセル (Microsoft Excel) および GraphPad Prism7 でデータを分析した。カットオフ値は、全てのブランクウェルの平均にブランクウェルの標準偏差の3倍を足したものとして定義した。最小結合濃度は、カットオフ値より高いシグナルを有する最後のウェルとして定義した。

【0169】

酵素結合レクチンアッセイ (ELLA: Enzyme-linked lectin assay)

96ウェルマイクロタイタープレート (サーモフィッシャー) を、1×コーティング緩

衝液（K P Lコーティング溶液；セラケア）中の $25\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のフェチュイン（シグマ） $100\mu\text{L}$ ／ウェルで、 4°C にて一晚コーティングした。翌日、プレートをT-PBSで3回洗浄し、 $200\mu\text{L}$ のブロッキング緩衝液（PBS中の5%ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin）（BSA、バイオメディカルズ（Biomedicals））中で室温にてブロッキングした。別個の96ウェルプレートにおいて、ウイルスをPBSで1：2に連続希釈した。 $75\mu\text{L}$ のPBSを全てのウェルに加え、プレートを振とう機上で室温で1.5時間インキュベートした。ブロッキング後、プレートをT-PBSで3回洗浄し、 $100\mu\text{L}$ の連続希釈ウイルスを、フェチュインでコーティングしたプレートにウェルごとに移し、プレートをウイルスのタイプに応じて 33°C または 37°C で2時間インキュベートした。プレートを4回洗浄し、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のHRPにコンジュゲートしたピーナッツ凝集素（PNA：peanut agglutinin） $100\mu\text{L}$ を全てのウェルに加えた。プレートを暗所で2時間インキュベートし、プレートを4回洗浄し、 $100\mu\text{L}$ のSigmaFast OPDで発色させた。5分後に $50\mu\text{L}$ の3M塩酸（サーモフィッシャー）で反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダー（バイオテック）によって 490nm の波長でプレートを読み取った。マイクロソフト・エクセルおよびGraphPad Prism7でデータを分析し、各ウイルスに対する50%有効濃度（EC50：50% effective concentration）を計算した。

【0170】

ノイラミニダーゼ阻害アッセイを行うために、マイクロタイタープレートを上述のとおりコーティングおよびブロッキングした。フェチュインコーティングプレートのブロッキング中に、mAbを $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の出発濃度に希釈し、別個の96ウェルプレートにおいてPBSで1：2に連続希釈した。 $2\times$ 有効濃度50（EC50）に希釈した $75\mu\text{L}$ のウイルスを連続希釈したmAbのウェルに加え、振とう機上で1.5時間インキュベートした。フェチュインコーティングプレートをT-PBSで3回洗浄し、ウイルス／mAb混合物をプレートに加え、 33°C または 37°C で2時間インキュベートした。残りのアッセイは上述のとおりに行った。マイクロソフト・エクセルおよびGraphPad Prism7でデータを分析し、阻害濃度50（IC50：inhibitory concentration 50）を計算した。

【0171】

NA-スターアッセイ

NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems））を使用して、抗NA mAbによるウイルスNAの小さな可溶性の化学発光基質の切断に対する阻害を測定した。製造者のプロトコルに従ってアッセイを行った。簡潔には、mAbを $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈し、1：2で連続希釈し、 $25\mu\text{L}$ を白色の平底96ウェル細胞培養プレートに移した。決定された $2\times\text{EC}50$ 濃度の $25\mu\text{L}$ のウイルスを各ウェルに加え、プレートを振とうし、 37°C で20分間インキュベートした。NA-スター基質を使用直前に調製し、 $10\mu\text{L}$ ／ウェルの基質を全てのウェルに加えた。プレートを室温で30分間インキュベートし、マイクロタイタープレートリーダー（バイオテック）を使用してプレートを読み取る直前に、 $60\mu\text{L}$ ／ウェルのNA-スター促進剤溶液を全てのウェルに加えた。マイクロソフト・エクセルおよびGraphPad Prism7を用いてデータを分析し、阻害曲線を可視化した。

【0172】

マイクロ中和アッセイ

1.5×10^5 細胞／ mL の濃度の $100\mu\text{L}$ ／ウェルのMDCK細胞を96ウェル細胞培養プレート（シグマ）に播種し、 37°C で一晚インキュベートした。翌日、別個の96ウェル細胞培養プレートにおいて、mAbを $30\mu\text{g}/\text{mL}$ の出発濃度に希釈し、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のトシルフェニルアラニルクロロメチルケトン（TPCK：tosyl

phenylalanyl chloromethyl ketone) 処理トリプシンを補充したUltraMDCK培地(ロンザ(Lonza))(感染培地;シグマ)で1:2に連続希釈した。ウイルスを感染培地で100×TCID₅₀/50μLの濃度に希釈し、60μLのウイルス希釈液を60μLの連続希釈mAbとともにインキュベートし、振とう機上で室温で1時間インキュベートした。次に、MDCK細胞プレートをPBS(ジブコ)で洗浄し、100μLのウイルス/mAb混合物を加えた。プレートを33℃で1時間インキュベートし、インキュベーション時間後にウイルス/mAb混合物を除去し、前の濃度の希釈mAbと交換した。プレートを33℃で48時間インキュベートし、古典的な血球凝集アッセイによって読み出しを行った。簡潔には、ニワトリ赤血球(red blood cells)(RBC;ランパイアバイオロジカルラボラトリーズ(Lampire Biological Laboratories))をPBSで0.5%の濃度に希釈し、v底96ウェルプレート(コーニング)中の50μLの細胞上清に加えた。プレートを4℃で30~45分間インキュベートし、スキャンし、結果をマイクロソフト・エクセルで分析し、GraphPad Prism7で可視化した。

【0173】

ADCCレポーターバイオアッセイ

1. 5×10⁵細胞/mLの濃度の100μL/ウェルのMDCK細胞を白色の平底96ウェル細胞培養プレート(コーニング)に播種し、37℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞をPBSで洗浄し、無血清UltraMDCK培地で1.5×10⁶プラーク形成単位(PFU: plaque forming units)/mL(約5の感染多重度(MOI: multiplicity of infection)に相当する)に希釈したウイルス100μLを各ウェルに加え、プレートを37℃で24時間インキュベートした。別個の96ウェル細胞培養プレートにおいて、mAbを60μg/mLの出発濃度に希釈し、RPMI1640培地(ライフテクノロジーズ)で1:2に連続希釈した。ヒトADCCバイオエフェクターFcγRIIIa細胞(プロメガ)を37℃の水浴中で解凍した。培地をMDCK細胞プレートから除去し、25μLのRPMI1640培地、25μLの連続希釈mAb、および25μLのバイオエフェクター細胞(6.25×10⁴細胞/25μL)を加えた。37℃で6時間インキュベートした後、75μLのBio-Gloルシフェラーゼ(プロメガ)を各ウェルに加えた。プレートを暗所で10分間インキュベートし、ルシフェラーゼ誘導発光をマイクロプレートリーダー(バイオテック)で測定した。マイクロソフト・エクセルおよびGraphPad Prism7で結果を分析し、曲線下面積(AUC: area under the curve)値を決定した。カットオフ値は、ブランクウェルの値の平均にブランクウェルの標準偏差の3倍を足したものとして定義した。

【0174】

結晶構造決定のためのノイラミニダーゼのクローニング、バキュロウイルス発現、および精製。

Hunan N9、Japan57 N2、およびCA04 N1 NAの外部ドメインを、本質的に以前に記載されたとおりにバキュロウイルス系において発現させた(6)。簡潔には、A/Hunan/02650/2016(H7N9)(Hunan N9、GISAIDアクセッション番号EPI961189)由来のN9 NAの外部ドメイン(残基83~470、N2番号付けで82~468)と、A/Japan/305/1957(H2N2)(Japan N2、GenBankアクセッション番号CY045806)由来のN2 NAの外部ドメイン(残基82~469)と、A/California/04/2009(H1N1)(CA04 N1、GenBankアクセッション番号FJ969517)由来のN1 NAの外部ドメイン(残基82~469、N2番号付けで82~470)とを構造解析のためにバキュロウイルス系で発現させた。NA外部ドメインに対応するcDNAを、N末端gp67シグナルペプチド、トロンピン切断部位、およびヘキサヒスチジンタグとともにバキュロウイルストランスファクターpFast bacHT-A(インビトロジェン)に組み込んだ(6)。構築されたプラスミドを使用

10

20

30

40

50

して、部位特異的転位（Tn-7媒介）によってDH10bacコンピテント細菌細胞を形質転換して、ベクターガラクトシダーゼ青白受容体選択を有する組み換えバクミドを形成した。精製した組み換えバクミドを用いて、過剰発現のためにSf9昆虫細胞（サーモフィッシャーサイエンティフィック（Thermo Fisher Scientific））をトランスフェクトした。5～10のMOIの組み換えバキュロウイルスによってSf9細胞の懸濁培養物中でNAタンパク質を産生させ、1分当たり110回転で振とうしながら28℃でインキュベートした。72時間後、Sf9細胞を遠心分離によって除去し、分泌された可溶性NAタンパク質を含有する上清を濃縮し、20mMトリスpH8.0、150mM NaClに緩衝液交換し、次いでNi-ニトリロ三酢酸（NTA：Ni-nitrilotriacetic acid）樹脂（キアゲン（Qiagen））を用いた金属アフィニティークロマトグラフィーによってさらに精製した。結晶化のために、NA外部ドメインをトロンピンで消化してヘキサヒスチジンタグを除去し、20mMトリスpH8.0、150mM NaCl、および0.02%NaN₃中でHiLoad16/90 Superdex 200カラム（GEヘルスケア（GE healthcare））でのサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。精製されたNAを280nmにおける光学吸光度によって測定し、純度および完全性を還元および非還元ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE：sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis）によって分析した。

【0175】

結晶構造決定のための哺乳動物細胞における組み換え抗体Fabの発現。

ヒト抗体1G04、1E01、および1G01の軽鎖および重鎖可変領域を、それぞれ対応するラムダまたはカッパCL領域、およびヘキサヒスチジンタグに付加されたヒトIgG1のCH1領域を含むベクターpHCMVにクローニングした。重鎖および軽鎖を含有する発現ベクターのExpichO細胞（サーモフィッシャーサイエンティフィック）への一過性同時トランスフェクションによって、Fabを発現させた。NTA樹脂（キアゲン）を使用する金属アフィニティークロマトグラフィーを使用し、続いてSuperdex 200カラム（GEヘルスケア）を使用するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、培養上清から組み換えFabを精製した。20mMトリスpH8.0、150mM NaCl、および0.02%NaN₃中の精製Fabを280nmにおける光学吸光度によって測定し、純度および完全性を還元および非還元SDS-PAGEによって分析した。

【0176】

結晶構造決定

結晶化実験は、シットティングドロップ蒸気拡散法を用いて設定した。6.0mg/mlの1G04 FabとHunan N9 NAとの複合体の回折品質結晶を、0.1M 4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（HEPES：4-（2-hydroxyethyl）-1-piperazineethanesulfonic acid）、pH7.5、5%（w/v）ポリエチレングリコール3000、30%（w/v）ポリエチレングリコール400、および10%（v/v）グリセロール中で20℃で成長させた。6.0mg/mlの1E01 FabとJapan 57 N2 NAとの複合体を、20%（v/v）グリセロールおよび24%（w/v）ポリエチレングリコール1500中で20℃で結晶化させた。最後に、3.0mg/mlの1G01 FabとCA04 N1 NAとの複合体を、0.1Mトリス、pH8.5、10%（v/v）グリセロール、20%（w/v）ポリエチレングリコール300、および5%（w/v）ポリエチレングリコール8000中で20℃で結晶化させた。全ての結晶を、付加的な凍結保護物質なしで100Kでフラッシュ冷却した。

【0177】

回折データをシンクロトロンビームラインで収集した（表5）。全ての結晶についてのデータを統合し、HKL2000でスケーリングした（7）。データ収集の統計を表5に概説する。

10

20

30

40

50

【0178】

【表8】

表5 結晶構造のデータ収集および精密化の統計。

データセット	1G04 Fab Hunan N9	1E01 Fab Japan57 N2	1G01 Fab CA04 N1
データ収集			
X線源	APS 23ID-B	SSRL 12-2	APS 23ID-B
空間群	I4	P4 ₂ 2	P2 ₁
単位セル (Å)	$a = b = 180.2,$ $c = 148.1$	$a = b = 160.5,$ $c = 87.2$	$a = 106.6, b =$ $235.0,$ $c = 106.3$
β角 (度)			β = 106.4
分解能 (Å) ^a	47.4-3.45 (3.51-3.45)	47.0-2.45 (2.49-2.45)	43.3-3.27 (3.38-3.27)
独特の反射	30,994	40,758	70,214
冗長度 ^a	4.4 (4.1)	13.8 (10.1)	2.7 (2.2)
平均 I/σ (I) ^a	14.6 (1.0)	22.5 (1.1)	4.5 (1.1)
完全性 ^a	99.1 (99.5)	99.5 (98.2)	91.9 (73.1)
$R_{\text{sym}}^{\text{a,b}}$	0.09 (0.87)	0.12 (0.99)	0.18 (0.57)
$R_{\text{pim}}^{\text{a,b}}$	0.05 (0.48)	0.03 (0.30)	0.12 (0.43)
CC _{1/2} ^a	0.997 (0.844)	0.998 (0.942)	0.952 (0.876)
ASU 当たりの分子数 ^c	2	1	4
精密化			
精密化における反射	30,967	40,669	66,845
精密化した残基	1,664	830	3,314
精密化した水	—	63	—
$R_{\text{cryst}}^{\text{d}}$	0.197	0.217	0.201
$R_{\text{free}}^{\text{e}}$	0.247	0.272	0.244
ツインオペレータ/ツインフラクション	—	—	-l, -k, -h / 0.335
B値 (Å ²) タンパク質 水	136 —	37 57	62 —
ウィルソン (Wilson) B 値 (Å ²)	126	50	53
ラムチャンドラン値 (%)) ^f	93.7, 0.5	93.6, 0.5	94.8, 0.5
r. m. s. d. 結合 (Å)	0.010	0.003	0.009
r. m. s. d. 角 (度)	1.27	0.67	1.35

10

20

30

40

50

PDB コード	AAAA	BBBB	CCCC
^a 括弧は外殻統計量を示す。 ^b $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$ および $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$ 、ここで $I_{hkl,i}$ は反射 h, k, l の i 番目の測定値のスケールリングされた強度であり、 $\langle I_{hkl} \rangle$ はその反射の平均強度であり、 N は冗長度である。 $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} (1/(n-1))^{1/2} \sum_i I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$ 、ここで n は冗長度である ^c 複合体の分子数とは、非対称単位 (ASU: asymmetric unit) 当たりの HA プロトマー足す抗体の数、または抗体については、ASU 当たりの一本鎖構築物の数を指す。 ^d $R_{\text{cryst}} = \sum_{hkl} F_o - F_c / \sum_{hkl} F_o $ 、ここで F_o および F_c は、観察された構造因子および計算された構造因子である。 ^e R_{free} は R_{cryst} に関して計算されたが、精密化前に 5% のデータが除外された。 ^f 値は、MolProbity によって分析された好ましい領域および異常値領域における残基のパールセンテージである (14)			

10

【0179】

全ての結晶構造は、プログラム **Phaser** を用いた分子置換によって決定した (8)。
1E01 Fab と **Japan57 N2 NA** との複合体構造を、**A/R I/5+/1957 (H2N2)** 由来の **N2 NA (PDB 3TIA)** ならびに **Fab** 軽鎖および重鎖 (それぞれ PDB コード **5ITB** および **4FQL**) を入力 MR モデルとして使用して決定した。
1G04 Fab と **Hunan N9 NA** との複合体構造を、**A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (PDB 5L14)** 由来の **N9 NA** および精密化した **1E01 Fab** 構造を入力 MR モデルとして使用して決定した。最後に、**1G01 Fab** と **CA04 N1 NA** との複合体構造を、アポ **CA04 N1 NA** 構造 (PDB コード **3NSS**) および精密化した **1E01 Fab** 構造を入力 MR モデルとして使用して決定した。
Japan57 N2 NA を伴う **1E01 Fab** の構造精密化および **Hunan N9 NA** を伴う **1G04 Fab** の構造精密化のために、**REFMAC5** で初期剛体精密化を行い (9)、**PHENIX** で模擬アニリングおよび拘束精密化 (**TLS** 精密化を含む) を行った (10)。
CA04 N1 NA との複合体における **1G01 Fab** の構造精密化のために、 a が c にほぼ等しい双晶 **P21** 空間群 (表 5) および **C** 中心斜方晶空間群に対応するより高い見かけの対称性によって擬 **メロヘドラル** 双晶が検出された。初期剛体精密化ならびにツインオペレーター $l, -k, -h$ および精密化ツインフラクション **0.335** による拘束ツイン精密化は全て **REFMAC5** で実施した (9)。これら 3 つの構造の精密化ラウンドの間に、プログラム **Coot** によってモデル構築を行った (11)。
これらの構造に対する最終的な統計を表 5 に要約する。**JCSG** 検証スイートを使用して構造の品質を分析した。全ての図は **PyMol** によって生成した。

20

30

【0180】

マウスにおける受動移入実験

mAb の予防的および治療的有効性を試験するための受動移入実験を、以前に記載されたとおりに行った (12)。手短に言えば、予防的設定のために、6~8 週齢の雌 **BALB/c** マウス ($n=5$ マウス/グループ) または 6~8 週齢の雌 **DBA/2J** マウス ($n=5$ マウス/グループ) に、**100 μ L** の **mAb 1G04**、**1E01**、または **1G01** を **5mg/kg** の濃度で腹腔内投与した。陰性対照マウスには、**100 μ L** の無関係な **ヒト IgG** 対照 **mAb** を **5mg/kg** の濃度で与えた。移入の 2 時間後、マウスを **ケタミン-キシラジン-水混合物 (0.15mg ケタミン/kg および 0.03mg/kg 体重のキシラジン; 腹腔内 100 μ L)** で麻酔し、**5 $\times$ LD50** のチャレンジウイルスで鼻腔内チャレンジし、例外として **H7N2 A/feline/New York/16-040082/2016** および **B/Malaysia/2506/2004** チャレンジ実験についてはそれぞれ **2 $\times$ LD50** または **7.5 $\times$ LD50** を与えた。トリ **H4N6** ウイルスは **BALB/c** マウスにおいて体重減少を誘導しないために **DBA/2J** マウスを使用した

40

50

H4N6 A/duck/Czechoslovakia/1956 ウイルスチャレンジを除いて、全てのチャレンジ実験にBALB/cマウスを使用した。チャレンジに使用したウイルスの完全なリストおよび対応するLD₅₀情報は表10（実施例5）に見出され得る。体重減少を14日間毎日モニターし、人道的エンドポイントを最初の0日目の体重の25%の減少と定義した。

【0181】

治療効果を試験するために、マウスを5×LD₅₀のH3N2 A/Philippines/2/1982 ウイルスに感染させた。mAb 1G04、1E01、1G01、およびヒト陰性対照mAbを感染の48または72時間後に5mg/kgの濃度で投与した。体重減少を14日間毎日測定し、0日目の体重の25%以上が減少したマウスを施設ガイドラインに従って安楽死させた。

10

【0182】

肺ウイルス力価の低下を決定するために、マウスに5mg/kgのmAb 1G04、1E01、1G01、および陰性対照ヒトIgGを腹腔内注射により与え、2時間後に0.1×LD₅₀のH3N2 A/Philippines/2/1982 ウイルスを感染させた。感染後3日目（n=3マウス/mAb）および6日目（n=3マウス/mAb）に、肺を採取し、BeadBlaster24（ベンチマーク（Benchmark））を用いてホモジナイズした。肺ウイルス力価を、以前に記載されたとおりの標準的プラークアッセイによって評価した（13）。マイクロソフト・エクセルおよびGraphPad Prism7で結果を分析した。

20

【0183】

NA配列

系統樹を作成するための配列は、インフルエンザ・リソース・データベース（Influenza Resource Database）および鳥インフルエンザデータ共有のグローバル・イニシアチブ（Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data）からダウンロードした。

【0184】

実施例1：季節性インフルエンザの感染後のヒトモノクローナル抗体の単離および同定。

症候性疾患の発症後5日目に末梢血単核細胞（PBMC）から形質芽球を単一細胞選別し、以前に記載されたとおりに対応する免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変（immunoglobulin heavy and light variable）（IGHVおよびIGLV）遺伝子をクローニングして発現させた（23）。次いで、mAbの組み換えH3 HA、N2 NA、核タンパク質、およびマトリックスタンパク質1への結合をスクリーニングした。このスクリーニングからの3つの抗体、mAb 1G04、1E01、および1G01は、季節性インフルエンザウイルス株A/Hong Kong/4801/2014のN2 NA（H3N2）に結合し、これはおそらく感染を引き起こした株に密接に関連する。1G04、1E01、および1G01は、IGHV3-20およびIGKV1-9がそれぞれIGHVおよびIGLV遺伝子をコードする3メンバークローンファミリーを形成する（図1A）。特にIGHV遺伝子における多数の体細胞超変異の蓄積によって証明されたとおり、3つのmAbは、メモリーB細胞に由来する可能性が最も高い。推定される非変異共通祖先（UCA）に対する各mAbのアミノ酸配列のアラインメントは、1G04、1E01、および1G01の重鎖がそれぞれ12、14、および19位でUCAと異なることを示した（図1B）。

30

40

【0185】

実施例2：ELISAを用いた組み換えN2タンパク質への単離mAb結合の特徴付け。

本発明者らは最初に、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を使用して、種々の季節性インフルエンザウイルスおよびトリインフルエンザウイルス由来の組み換えノイラミナーゼ（neuraminases）（NA）に対する3つのmAbの結合親和性および交差反応性を測定した。さらなる特徴付けの際に、本発明者らは、3つの抗体が季節性インフルエンザウイルスおよびトリインフルエンザウイルス由来の組み換えN2 NA（グ

50

ループ2)への広範な結合を示すことを見出した(図1C、表4)。さらに、1G04は、N3およびN6(グループ2)ならびにN1、N5、およびN8(グループ1)に対するいくつかの交差反応性を示し、かつインフルエンザB NAに対する弱い結合を示した(図1C)。1E01は、グループ2のNA N3、N6、N7、およびN9、グループ1のNA N1、N5、およびN8を含むさらに広範な結合パターンを示し、かつB/Victoria/2/87系統由来のインフルエンザB NAへの強い結合およびB/Yamagata/16/88系統のNAへの弱い結合を示した。最後にmAb 1G01は、グループ1のNA(N1、N4、N5、およびN8)およびグループ2のNA(N2、N3、N6、N7、およびN9)の全て、ならびに両方のインフルエンザBウイルス系統由来のNAを包含する最も広い結合活性を示した(図1C)。

【0186】

実施例3：ノイラミニダーゼを阻害するmAbの機能的能力。

本発明者らは次に、ノイラミニダーゼ阻害(NI: neuraminidase inhibition)を測定する酵素結合レクチンアッセイ(ELLA)において、3つのmAbの機能的能力を調べた(図1Dおよび図2A)。評価したウイルス株を以下の表6に列挙する。1G04はN2、N3および特定のN1 NAを阻害したのに対し、1E01はグループ2のNA、N1およびB/Victoria/2/87系統のNAを阻害した。1G01は、全てのA/グループ2およびグループ1 NAならびにB/Victoria/2/87系統NAの活性を顕著に阻害した(図1Dおよび図2A)。NA活性は、酵素活性部位内のエピトープに直接結合する抗体によって阻害され得るか、または抗体が活性部位の近位に結合するときの立体障害によって阻害され得る。しかし、立体障害によるNIは、フェチュインなどの大きな天然基質を使用したときのELLAでのみ観察される。NAースターアッセイのように小分子が基質として使用されるとき、活性部位に直接結合しない抗体は阻害しない(9、10)。NAースターアッセイで試験したとき、3つ全てのmAbがNA活性を強力に阻害し、NA活性部位内の結合フットプリントを示唆した(図2Bおよび図6A~6D)。1G01については、阻害に対する立体障害の寄与の可能性も除去するELLAにおける完全抗体の代わりに抗原結合フラグメント(Fab)を使用することによってこのことをさらに確認した。1G01 Fabは依然として強力な阻害を示し、抗体が活性部位を直接標的とし得ることをさらに示唆した(図2C)。興味深いことに、これら3つのmAbの生殖系列バージョンも、ELLAアッセイにおいてNA活性を強力に阻害した(図2D)。

【0187】

重要なことに、3つの抗体は全て、感受性対照ウイルスと同様の効力でオセルタミビル耐性H3N2ウイルスを阻害した(図7A~7B)。典型的には、抗NA抗体はインビトロ中和アッセイにおいて活性を示さないが(9)、ここでの3つのmAbは全て、様々なN2ウイルスに対するアッセイにおいて強力な阻害活性を示した(図2Eおよび図8A~8C)。この効果は、全てが細胞へのウイルス侵入の阻害によるものではないかもしれないが、そのアッセイにおける陽性読み出しに必要なウイルス放出およびその後のウイルス複製を効率的に遮断するmAbの強いNI活性を反映しているかもしれない。Fabベースの抗ウイルス活性に加えて、抗体依存性細胞毒性(ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity)などのFc-FcR媒介性エフェクター機能は、広範に防御的な抗HA抗体にとって重要であることが示されており、抗NA抗体についても検出されている(9、24)。3つのmAbは全て、それらがより高い濃度でのみ結合したときでさえ(例、インフルエンザB NAへの1G04結合)、ADCCバイオレポーターアッセイにおいて異なるNAのパネルに対する活性を示した(図2Fおよび図9A~9D)。

【0188】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 6 本研究で使したウイルス株。

サブタイプ	HA	NA	骨格
H1N1	A/Singapore/GP1908/2015	A/Singapore/GP1908/2015	A/Texas/1/1977
H1N1	A/New Caledonia/20/1999	A/New Caledonia/20/1999	A/New Caledonia/20/1999
H5N1	A/Indonesia/5/2005 [§]	A/Indonesia/5/2005	A/PR/8/1934
H5N1	A/Vietnam/1204/2004 [§]	A/Vietnam/1204/2004	A/PR/8/1934
cH6/1 N4*	ヘッド: A/mallard/Sweden/81/2002 stalk: A/PR/8/1934	A/mallard/Sweden/24/2002	A/PR/8/1934
H9N4	A/guinea fowl/HK/WF10/99	A/mallard/Sweden/24/2002	A/PR/8/1934
H10N8	A/Jiangxi-Donghu/346/2013	A/Jiangxi-Donghu/346/2013	A/PR/8/1934
H5N8	A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014	A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014	A/PR/8/1934
H4N8	A/duck/Czech/1956	A/mallard/Sweden/50/2002	A/PR/8/1934
H12N5	A/mallard/Interior Alaska/7MP0167/2007	A/mallard/Interior Alaska/7MP0167/2007	A/mallard/Interior Alaska/7MP0167/2007
H15N5	A/mallard duck/Sweden/139579/2012	A/PR/8/1934	A/PR/8/1934
H7N9	A/Shanghai/1/2013	A/Shanghai/1/2013	A/PR/8/1934
H5N6	A/Shenzhen/1/2016 [#]	A/Shenzhen/1/2016	A/PR/8/1934
H4N6	A/duck/Czechoslovakia/1956	A/duck/Czechoslovakia/1956	A/PR/8/1934
H10N7	A/mallard/IA/10BM01929/2010	A/mallard/IA/10BM01929/2010	A/mallard/IA/10BM01929/2010
H1N7	A/PR/8/1934	A/chicken/Netherlands/1/2003	A/PR/8/1934
H3N2	A/Philippines/2/1982	A/Philippines/2/1982	A/PR/8/1934
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	A/Hong Kong/4801/2014	A/PR/8/1934
H3N2 [#]	A/Washington/01/2007	A/Washington/01/2007	A/Washington/01/2007
H3N2 [§]	A/Texas/2/2007	A/Texas/2/2007	A/Texas/2/2007
H9N2	A/chicken/Hong Kong/G9/1997	A/chicken/Hong Kong/G9/1997	A/PR/8/1934
H7N2	A/feline/New York/16-040082-1/2016	A/feline/New York/16-040082-1/2016	A/PR/8/1934

10

20

30

40

50

サブタイプ	HA	NA	骨格
H6N3	A/swine/Missouri/429642/4/2006	A/swine/Missouri/4296424/2006	A/PR/8/1934
B	B/Malaysia/2506/2004	B/Malaysia/2506/2004	B/Malaysia/2506/2004
B	B/Florida/04/2006	B/Florida/04/2006	B/Florida/04/2006
B	B/Yamagata/16/1988	B/Yamagata/16/1988	B/Yamagata/16/1988
*このウイルスは、A/mallard/Sweden/81/2002 ウイルスのヘッドドメインおよび A/PR/8/1934 のストロクドメインからなるキメラ HA を有する。 #オセルタミビル感受性 E119 変異体 &オセルタミビル耐性 E119V 変異体 §多塩基切断部位を除去した。			

10

【0189】

実施例 4：モノクローナル抗体に対する結合エピトープの構造決定。

3つのmAbのエピトープおよびそれらの広範な防御の構造的根拠を解明するために、本発明者らは、3.45 Åでの最近のH7N9流行単離株A/Hunan/02650/2016 (Hunan N9) 由来のN9 NAを伴う1G04と、2.45 Åでの1957H2N2パンデミック単離株A/Japan/305/1957 (Japan 57N2) のN2 NAと複合した1E01と、3.27 Å分解能での2009パンデミックH1N1単離株A/California/04/2009 (CA04 N1) のN1 NAと複合した1G01との結晶構造を決定した(図3、NA株を表4に列挙する)。3つ全てのFab-NA複合体構造において、1つのFabがNA四量体の1つのNAプロトマーに結合した。重要なことに、3つのFabは全て、NA活性部位を完全に遮断するようにNAに結合した(図3)。1G04、1E01、および1G01は、重鎖および軽鎖の両方を用いてそれらのエピトープを認識した。3つの抗体における重鎖、特に相補性決定領域(CDR) H3がそれらのNA相互作用において支配的な役割を果たした。1G04、1E01、および1G01によるNA上の総埋没表面積は、それぞれ1030 Å²、900 Å²、および800 Å²であり、その87%、84%、および77%が重鎖から生じ、67%、66%、および77%が伸長CDR H3ループから生じた。

20

30

【0190】

抗体1G04は、CDR L1、L2、H1、H2、およびH3を使用してHunan N9 NAと相互作用した(図3A、図10、表7)。1G04の長い21残基CDR H3は、10の活性部位残基を含む20のN9 NA残基に対するFab相互作用のほとんどに寄与しており、これらの活性部位残基は、グループ1、グループ2、およびインフルエンザB NAにおいて保存されたR118、E119、D151、R152、I222、R224、E276、E277、R371、およびY406である。CDR L1、L2、H1、およびH2は、いくつかの非保存N9 NA残基と接触した。同様に、1E01は、1G04と同じ5つのCDRループを用いてJapan 57 N2と相互作用した。1E01の21残基CDR H3は、E276を除いて1G04によって認識される保存された活性部位エピトープ残基の全てを含む16N2 NA残基との相互作用を支配した(図3B、図11、表8)。興味深いことに、1G01は、CDR L1、L2、およびH3ならびにフレームワーク領域(FR) L3由来の1つの残基Y67のみを使用してCA04 N1 NAに結合した。1G01の21残基CDR H3は、19のCA04 N1 NA残基と相互作用し、これは13のNA保存活性部位(そのうち10は1G04で保存されている)またはL134、R156、W178を含む第2シェル残基を含む(図3C、図12、表9)。これらの3つの抗体のエピトープは、活性部位から離れたエピトープまたは活性部位の縁上のエピトープに結合する、構造的に特徴付けられたマウスN

40

50

A抗体と比較して独特である（12、25～27）。

【0191】

これらの反応性プロファイルは、これらの抗体が最初にH3N2感染によって誘導され、その後この個体がH1N1およびインフルエンザBウイルスに曝露することによってN1およびインフルエンザBウイルスNA抗原に対する親和性を獲得したことを示唆している。次いで、この個体の最近のH3N2感染が、これらのクローンをリコールした。この個体における実際の血清抗体力価は、防御を媒介するほど十分に高くなかったと考えられ、それによってこの人物が感染した理由が説明されるだろう。したがって、この抗体クローンは個体のメモリーB区画に存在するが、骨髄中の長寿命の形質細胞区画には存在しない可能性がある。

【0192】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 7 NA サブタイプによる 1G04 エピトープの配列保存。

NA 残基 番号	Hunan N9	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9,744) ^a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1,290)	N2 (12,826)	N3 (772)	N6 (1,218)	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3,469)
<u>118</u>	<u>R</u>	R ^b (99.9) ^c	R (99.3)	R (99.6)	R (99.8)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99.8)	R (100)
<u>119</u>	<u>E</u>	E (99.5)	E (99.3)	E (100)	E (99.9)	E (99.7)	E (100)	E (100)	E (100)	E (99.7)	E (99.9)
149	I	V (54.4)	V (98.7)	V (99.6)	V (99.5)	V (65.2)	I (90.3)	I (99.2)	I (97.3)	I (99.5)	R (99.9)
<u>151</u>	<u>D</u>	D (99.2)	D (100)	D (99.6)	D (99.9)	D (93.5)	D (99.1)	D (99.9)	D (100)	D (99.7)	D (99.4)
<u>152</u>	<u>R</u>	R (100)	R (100)	R (99.6)	R (99.8)	R (99.9)	R (99.7)	R (99.8)	R (99.8)	R (99.3)	R (99.9)
198	N	D (99.5)	D (100)	D (99.6)	D (99.9)	D (99.6)	D (99.4)	N (97.8)	N (100)	N (99.5)	D (99.4)
199	N	N (81.7)	A (56.4)	D (98.7)	A (66.0)	K (59.3)	N (97.8)	N (98.1)	D (88.4)	N (99.8)	S (52.7)
220	R	N (85.0)	G (100)	K (98.7)	G (99.7)	K (80.5)	K (74.9)	G (99.1)	G (56.4)	R (98.1)	N (51.9)
221	N	N (72.0)	N (100)	Q (98.7)	D (97.8)	N (50.6)	D (90.2)	N (99.6)	N (98.9)	N (99.8)	N (81.4)
<u>222</u>	<u>I</u>	I (99.2)	I (99.3)	I (99.6)	I (99.7)	I (99.3)	I (99.4)	I (99.3)	I (99.8)	I (100)	I (99.5)
<u>224</u>	<u>R</u>	R (99.9)	R (100)	R (99.2)	R (99.9)	R (99.9)	R (99.2)	R (99.5)	R (100)	R (100)	R (99.8)
245	P	P (99.5)	P (100)	P (99.6)	P (100)	S (89.0)	P (99.4)	P (99.4)	S (96.8)	S (92.7)	S (52.7)
246	A	S (99.2)	S (99.3)	A (99.6)	A (99.5)	A (99.8)	A (99.5)	A (99.5)	A (100)	A (99.5)	A (99.9)
247	T	N (59.7)	D (98.7)	N (92.4)	N (99.0)	S (89.7)	A (89.8)	N (99.0)	S (96.0)	T (99.7)	D (77.5)

10

20

30

40

NA 残基 番号	Hunan N9	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9,744) ^a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1,290)	N2 (12,826)	N3 (772)	N6 (1,218)	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3,469)
<u>276</u>	<u>E</u>	E (99.9)	E (100)	E (99.6)	E (99.9)	E (99.9)	E (99.6)	E (99.6)	E (100)	E (100)	E (100)
<u>277</u>	<u>E</u>	E (100)	E (100)	E (99.6)	E (100)	E (100)	E (99.6)	E (99.6)	E (100)	E (100)	E (100)
295	W	W (99.9)	W (100)	W (99.6)	W (100)	W (99.9)	W (99.6)	W (99.8)	W (100)	W (100)	S (66.3)
296	Q	H (99.9)	R (98.7)	N (99.6)	T (99.7)	K (97.6)	K (99.0)	K (97.9)	Q (99.8)	Q (99.3)	Y (99.9)
345	N	G (100)	G (100)	N (95.8)	G (98.9)	G (99.9)	G (99.6)	P (99.7)	G (98.7)	N (98.1)	S (95.8)
347	N	N (66.2)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	H (73.1)	P (89.5)	P (99.8)	P (99.6)	N (99.3)	G (99.7)
370	S	S (89.7)	S (99.3)	S (99.6)	S (99.9)	S (70.9)	G (89.8)	S (99.6)	S (98.1)	S (100)	K (45.5)
<u>371</u>	<u>R</u>	R (99.9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99.9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99.9)
<u>406</u>	<u>Y</u>	Y (99.9)	Y (100)	Y (99.6)	Y (99.9)	Y (99.9)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (99.9)
432	K	K (76.1)	K (99.3)	E (97.0)	E (99.8)	E (58.1)	N (99.6)	K (98.9)	E (100)	K (99.3)	— ^d

10

20

30

インフルエンザ A N1～N9 およびインフルエンザ B NA において保存されている NA 残基に下線を付す。

^a2018 年 11 月 28 日の米国国立生物工学情報センター (NCBI: National Center for Biotechnology Information) データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>) におけるインフルエンザウイルスリソース (Influenza Virus Resource) からのサブタイプに対する非重複インフルエンザ NA 配列の数。

^bサブタイプの位置における最も一般的な残基。

^c最も一般的な残基の同一性パーセント。

^dN2 NA と整列させたときの配列欠失。

40

【 0 1 9 3 】

【表 1 1】

表 8 NA サブタイプによる 1E01 エピトープの配列保存。

NA 残基番号	Japan57 N2	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9, 744) a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1, 290)	N2 (12, 826)	N3 (772)	N6 (1, 218)	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3, 469)
<u>118</u>	<u>R</u>	R ^b (99.9) ^c	R (99.3)	R (99.6)	R (99.8)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99.8)	R (100)
<u>119</u>	<u>E</u>	E (99.5)	E (99.3)	E (100)	E (99.9)	E (99.7)	E (100)	E (100)	E (100)	E (99.7)	E (99.9)
<u>151</u>	<u>D</u>	D (99.2)	D (100)	D (99.6)	D (99.9)	D (93.5)	D (99.1)	D (99.9)	D (100)	D (99.7)	D (99.4)
<u>152</u>	<u>R</u>	R (100)	R (100)	R (99.6)	R (99.8)	R (99.9)	R (99.7)	R (99.8)	R (99.8)	R (99.3)	R (99.9)
198	D	D (99.5)	D (100)	D (99.6)	D (99.9)	D (99.6)	D (99.4)	N (97.8)	N (100)	N (99.5)	D (99.4)
199	R	N (81.7)	A (56.4)	D (98.7)	A (66.0)	K (59.3)	N (97.8)	N (98.1)	D (88.4)	N (99.8)	S (52.7)
220	Q	N (85.0)	G (100)	K (98.7)	G (99.7)	K (80.5)	K (74.9)	G (99.1)	G (56.4)	R (98.1)	N (51.9)
221	N	N (72.0)	N (100)	Q (98.7)	D (97.8)	N (50.6)	D (90.2)	N (99.6)	N (98.9)	N (99.8)	N (81.4)
<u>222</u>	<u>I</u>	I (99.2)	I (99.3)	I (99.6)	I (99.7)	I (99.3)	I (99.4)	I (99.3)	I (99.8)	I (100)	I (99.5)
<u>224</u>	<u>R</u>	R (99.9)	R (100)	R (99.2)	R (99.9)	R (99.9)	R (99.2)	R (99.5)	R (100)	R (100)	R (99.8)
245	S	P (99.5)	P (100)	P (99.6)	P (100)	S (89.0)	P (99.4)	P (99.4)	S (96.8)	S (92.7)	S (52.7)
246	A	S (99.2)	S (99.3)	A (99.6)	A (99.5)	A (99.8)	A (99.5)	A (99.5)	A (100)	A (99.5)	A (99.9)
249	R	Q (89.5)	Q (100)	Q (99.6)	Q (99.9)	K (73.1)	S (88.2)	R (84.5)	Q (99.6)	P (100)	V (53.8)
<u>277</u>	<u>E</u>	E (100)	E (100)	E (99.6)	E (100)	E (100)	E (99.6)	E (99.6)	E (100)	E (100)	E (100)

10

20

30

40

NA 残基番号	Japan57 N2	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9, 744) _a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1, 290)	N2 (12, 826))	N3 (772)	N6 (1, 218))	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3, 469))
295	W	W (99. 9)	W (100)	W (99. 6))	W (100)	W (99. 9)	W (99. 6))	W (99. 8)	W (100)	W (100)	S (66. 3)
296	K	H (99. 9)	R (98. 7))	N (99. 6))	T (99. 7)	K (97. 6)	K (99. 0))	K (97. 9)	Q (99. 8))	Q (99. 3))	Y (99. 9)
342	N	S (68. 8)	N (100)	G (100)	G (99. 9)	N (97. 9)	N (89. 9))	T (97. 5)	T (99. 6))	P (99. 8))	D (77. 5)
<u>371</u>	<u>R</u>	R (99. 9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99. 9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99. 9)
<u>406</u>	<u>Y</u>	Y (99. 9)	Y (100)	Y (99. 6))	Y (99. 9)	Y (99. 9)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (99. 9)
432	Q	K (76. 1)	K (99. 3))	E (97. 0))	E (99. 8)	E (58. 1)	N (99. 6))	K (98. 9)	E (100)	K (99. 3))	— ^d
インフルエンザ A N1～N9 およびインフルエンザ B NA において保存されている NA 残基に下線を付す。 ^a2018 年 11 月 28 日の米国国立生物工学情報センター (NCBI: National Center for Biotechnology Information) データベース (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/) におけるインフルエンザ ウイルスリソース (Influenza Virus Resource) からのサブタイプに対する非重複インフルエンザ N A 配列の数。 ^bサブタイプの位置における最も一般的な残基。 ^c最も一般的な残基についての同一性パーセント。 ^dN2 NA と整列させたときの配列欠失。											

10

20

【 0 1 9 4 】

30

40

50

【表 1 2】

表 9 NA サブタイプによる 1G01 エピトープの配列保存。

NA 残基 番号	CA04 N1	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9, 744) _a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1, 290)	N2 (12, 826)	N3 (772)	N6 (1, 218)	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3, 469)
<u>118</u>	<u>R</u>	R ^b (99. 9) ^c	R (99. 3)	R (99. 6)	R (99. 8)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99. 8)	R (100)
<u>119</u>	<u>E</u>	E (99. 5)	E (99. 3)	E (100)	E (99. 9)	E (99. 7)	E (100)	E (100)	E (100)	E (99. 7)	E (99. 9)
<u>134</u>	<u>L</u>	L (99. 9)	L (100)	L (99. 6)	L (99. 8)	L (99. 9)	L (99. 9)	L (99. 7)	L (100)	L (99. 8)	L (99. 8)
150	K	K (99. 5)	K (100)	K (99. 2)	K (99. 5)	H (65. 9)	K (98. 4)	H (99. 3)	H (98. 7)	H (100)	E (53. 3)
<u>151</u>	<u>D</u>	D (99. 2)	D (100)	D (99. 6)	D (99. 9)	D (93. 5)	D (99. 1)	D (99. 9)	D (100)	D (99. 7)	D (99. 4)
<u>152</u>	<u>R</u>	R (100)	R (100)	R (99. 6)	R (99. 8)	R (99. 9)	R (99. 7)	R (99. 8)	R (99. 8)	R (99. 3)	R (99. 9)
<u>156</u>	<u>R</u>	R (99. 8)	R (100)	R (99. 6)	R (99. 8)	R (99. 9)	R (99. 9)	R (99. 9)	R (100)	R (99. 1)	R (99. 9)
<u>178</u>	<u>W</u>	W (99. 9)	W (100)	W (99. 6)	W (99. 8)	W (99. 0)	W (99. 9)	W (100)	W (100)	W (100)	W (100)
197	P	P (99. 8)	P (100)	A (99. 2)	P (98. 6)	D (80. 9)	N (97. 0)	P (99. 5)	N (97. 5)	P (100)	P (99. 5)
198	D	D (99. 5)	D (100)	D (99. 6)	D (99. 9)	D (99. 6)	D (99. 4)	N (97. 8)	N (100)	N (99. 5)	D (99. 4)
199	N	N (81. 7)	A (56. 4)	D (98. 7)	A (66. 0)	K (59. 3)	N (97. 8)	N (98. 1)	D (88. 4)	N (99. 8)	S (52. 7)
220	N	N (85. 0)	G (100)	K (98. 7)	G (99. 7)	K (80. 5)	K (74. 9)	G (99. 1)	G (56. 4)	R (98. 1)	N (51. 9)
221	N	N (72. 0)	N (100)	Q (98. 7)	D (97. 8)	N (50. 6)	D (90. 2)	N (99. 6)	N (98. 9)	N (99. 8)	N (81. 4)
<u>222</u>	<u>I</u>	I (99. 2)	I (99. 3)	I (99. 6)	I (99. 7)	I (99. 3)	I (99. 4)	I (99. 3)	I (99. 8)	I (100)	I (99. 5)

10

20

30

40

NA 残基 番号	CA04 N1	Flu A グループ 1				Flu A グループ 2					Flu B
		N1 (9, 744) ^a	N4 (149)	N5 (237)	N8 (1, 290)	N2 (12, 826)	N3 (772)	N6 (1, 218)	N7 (473)	N9 (587)	B NA (3, 469)
<u>224</u>	<u>R</u>	R (99. 9)	R (100)	R (99. 2)	R (99. 9)	R (99. 9)	R (99. 2)	R (99. 5)	R (100)	R (100)	R (99. 8)
245	P	P (99. 5)	P (100)	P (99. 6)	P (100)	S (89. 0)	P (99. 4)	P (99. 4)	S (96. 8)	S (92. 7)	S (52. 7)
246	S	S (99. 2)	S (99. 3)	A (99. 6)	A (99. 5)	A (99. 8)	A (99. 5)	A (99. 5)	A (100)	A (99. 5)	A (99. 9)
247	N	N (59. 7)	D (98. 7)	N (92. 4)	N (99. 0)	S (89. 7)	A (89. 8)	N (99. 0)	S (96. 0)	T (99. 7)	D (77. 5)
<u>276</u>	<u>E</u>	E (99. 9)	E (100)	E (99. 6)	E (99. 9)	E (99. 9)	E (99. 6)	E (99. 6)	E (100)	E (100)	E (100)
<u>277</u>	<u>E</u>	E (100)	E (100)	E (99. 6)	E (100)	E (100)	E (99. 6)	E (99. 6)	E (100)	E (100)	E (100)
347	N	N (66. 2)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	H (73. 1)	P (89. 5)	P (99. 8)	P (99. 6)	N (99. 3)	G (99. 7)
<u>371</u>	<u>R</u>	R (99. 9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99. 9)	R (100)	R (100)	R (100)	R (100)	R (99. 9)
<u>406</u>	<u>Y</u>	Y (99. 9)	Y (100)	Y (99. 6)	Y (99. 9)	Y (99. 9)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (100)	Y (99. 9)
431	P	P (99. 3)	T (99. 3)	P (99. 6)	P (100)	K (69. 3)	P (99. 7)	P (100)	P (100)	P (100)	G (99. 8)
456	W	W (100)	W (100)	W (100)	W (99. 9)	G (99. 9)	G (100)	W (99. 9)	G (100)	W (99. 8)	W (99. 9)

インフルエンザ A N1～N9 およびインフルエンザ B NA において保存されている NA 残基に下線を付す。

^a2018 年 11 月 28 日の米国国立生物工学情報センター (NCBI: National Center for Biotechnology Information) データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>) におけるインフルエンザウイルスリソース (Influenza Virus Resource) からのサブタイプに対する非重複インフルエンザ NA 配列の数。

^bサブタイプの位置における最も一般的な残基。

^c最も一般的な残基についての同一性パーセント。

【 0 1 9 5 】

実施例 5：インフルエンザのマウスモデルにおけるモノクローナル抗体の防御能力。

次に、本発明者らは、マウスモデルにおいてインビボでの 3 つの mAb の防御能力を評価した。本発明者らは、ヒト N2、トリ N2、ブタ N3、ならびにトリ N6、N7、および N9 NA (全てグループ 2)、ヒト N1、トリ N1、ならびにトリ N4、N5、および N8 NA (全てグループ 1)、ならびに B/Victoria/2/88 系統由来のインフルエンザ B ウイルスを発現するウイルスに対する防御効果を試験した (図 4A、図 4C～4M、表 10)。対照抗体を受けた動物において重篤な体重減少のみが観察されたが死亡は観察されなかったトリ N2 および N6 を除くと、全てが致死性チャレンジモデル

であった。感染の2時間前に5 mg / kg のmAbを動物に投与し、次いで罹患率（体重減少）および死亡率を14日間モニターした。mAbは、それらの反応性パターンと一致した方式で体重減少および死亡率の両方からの防御を行い、これは結合が観察された場合にそれらは防御的でもあったことを意味する。特に1G01は、全ての単一チャレンジウイルスに対して致死性からの完全な防御を提供した。いくらかの一過性の体重減少が観察されたN4チャレンジ（図4J）を除いて、1G01は体重減少に対する堅固な防御を提供した。H3N2チャレンジについて、本発明者らは、感染後3日目および6日目のチャレンジを受けた動物の肺におけるウイルス複製もモニターし、複製ウイルスを何ら検出できず、このことは、3つのmAbの強力なインビトロ阻害および中和活性が、少なくともサンプリングした日においてはインビボでの殺菌免疫に変換されたことを示唆するものである（図4B）。mAbが治療薬として与えられた場合に有用であり得るかどうかを決定するために、本発明者らは、マウスに致死量のH3N2ウイルスを感染させ、それらを感染の48時間または72時間後にそれぞれの抗体で処置した（図4Nおよび図4O）。一時的な体重減少が観察されたが、低用量の5 mg / kg mAbで処置したときに全ての動物が回復し、これらの抗NA mAbが治療可能性を有することが示唆された。

【0196】

【表13】

表10 本研究で使用したチャレンジウイルスのLD₅₀

サブタイプ	NA	LD ₅₀
pH1N1	A/Singapore/GP1908/2015	320 PFU
H5N1	A/Vietnam/1204/2004	32 PFU
cH6/1 N4	A/mallard/Sweden/24/2002	5.6x10 ⁴ PFU
H10N8	A/Jiangxi-Donghu/346/2013	56 PFU
H15N5	A/mallard duck/Sweden/139579/2012	3200 PFU
H7N9	A/Shanghai/1/2013	4000 PFU
H4N6	A/duck/Czechoslovakia/1956	1.4x10 ⁴ PFU
H1N7	A/chicken/Netherlands/1/2003	5.6 PFU
H3N2	A/Philippines/2/1982	6 PFU
H7N2	A/feline/New York/16-040082-1/2016	3.16x10 ⁴ TCID ₅₀
H6N3	A/swine/Missouri/4296424/2006	182 PFU
B	B/Malaysia/2506/2004	316 PFU

【0197】

参考文献:

1. F. Krammer, P. Palese, Advances in the development of influenza virus vaccines. Nat Rev Drug Discov 14, 167-182 (2015).
2. E. J. Erbelding et al., A Universal Influenza Vaccine: The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. J Infect Dis 218, 347-354 (2018).
3. F. Krammer, The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. Nat Rev Immunol, (2019).
4. D. C. Ekiert et al., A highly conserved neutralizing epitope on group 2 in influenza A viruses. Science 333, 843-850 (2011).
5. D. C. Ekiert et al., Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. Science 324, 246-251 (2009).
6. C. Dreyfus et al., Highly conserved protective epitopes on influenza B virus

uses. *Science* 337, 1343-1348 (2012).

7. D. Corti et al., A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850-856 (2011).

8. F. Krammer et al., NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *MBio* 9, (2018).

9. T. J. Wohlbold et al., Broadly protective murine monoclonal antibodies against influenza B virus target highly conserved neuraminidase epitopes. *Nat Microbiol* 2, 1415-1424 (2017).

10. Y. Q. Chen et al., Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. *Cell* 173, 417-429.e410 (2018).

11. L. Jiang et al., Comparative Efficacy of Monoclonal Antibodies That Bind to Different Epitopes of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus Neuraminidase. *J Virol* 90, 117-128 (2016).

12. H. Wan et al., Structural characterization of a protective epitope spanning A(H1N1)pdm09 influenza virus neuraminidase monomers. *Nat Commun* 6, 6114 (2015).

13. T. J. Wohlbold et al., Vaccination with Adjuvanted Recombinant Neuraminidase Induces Broad Heterologous, but Not Heterosubtypic, Cross-Protection against Influenza Virus Infection in Mice. *MBio* 6, (2015).

14. G. E. Smith et al., Neuraminidase-based recombinant virus-like particles protect against lethal avian influenza A(H5N1) virus infection in ferrets. *Virology* 509, 90-97 (2017).

15. W. C. Liu, C. Y. Lin, Y. T. Tsou, J. T. Jan, S. C. Wu, Cross-Reactive Neuraminidase-Inhibiting Antibodies Elicited by Immunization with Recombinant Neuraminidase Proteins of H5N1 and Pandemic H1N1 Influenza A Viruses. *J Virol* 89, 7224-7234 (2015).

16. M. McMahon et al. (*mBio*, 2019, in press).

17. A. S. Monto et al., Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J Infect Dis* 212, 1191-1199 (2015).

18. R. B. Couch et al., Antibody correlates and predictors of immunity to naturally occurring influenza in humans and the importance of antibody to the neuraminidase. *J Infect Dis* 207, 974-981 (2013).

19. M. J. Memoli et al., Evaluation of Antihemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model. *MBio* 7, e00417-00416 (2016).

20. N. S. Heaton, D. Sachs, C. J. Chen, R. Hai, P. Palese, Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20248-20253 (2013).

21. M. R. Sandbulte et al., Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20748-20753 (2011).

22. Y. Abed, I. Hardy, Y. Li, G. Boivin, Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. *J Med Virol* 67, 589-595 (2002).

23. J. Wrammert et al., Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453, 667-671 (2008).

24. D. J. Dilillo, G. S. Tan, P. Palese, J. V. Ravetch, Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection

n against influenza virus in vivo. Nat Med 20, 143-151 (2014).

25. W. R. Tulip, J. N. Varghese, W. G. Laver, R. G. Webster, P. M. Colman, Refined crystal structure of the influenza virus N9 neuraminidase-NC41 Fab complex. J Mol Biol 227, 122-148 (1992).

26. R. L. Malby et al., The structure of a complex between the NC10 antibody and influenza virus neuraminidase and comparison with the overlapping binding site of the NC41 antibody. Structure 2, 733-746 (1994).

27. L. Venkatramani et al., An epidemiologically significant epitope of a 1998 human influenza virus neuraminidase forms a highly hydrated interface in the NA-antibody complex. J Mol Biol 356, 651-663 (2006).

28. T. M. Doyle et al., A monoclonal antibody targeting a highly conserved epitope in influenza B neuraminidase provides protection against drug resistant strains. Biochem Biophys Res Commun 441, 226-229 (2013).

29. T. M. Doyle et al., Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. Antiviral Res 100, 567-574 (2013).

30. W. He et al., Alveolar macrophages are critical for broadly-reactive antibody-mediated protection against influenza A virus in mice. Nat Commun 8, 846 (2017).

【0198】

本発明またはその好ましい実施形態（単数または複数）の要素を導入するときの冠詞「a」、「an」、「the」、および「前記(said)」は、1つ以上のその要素が存在することを意味することが意図される。用語「備える(comprising)」、「含んでいる(including)」および「有する(having)」は、包括的であることが意図され、列挙された要素以外の付加的な要素が存在し得ることを意味する。

【0199】

上記を考慮すると、本発明のいくつかの目的が達成され、他の有利な結果が得られることが分かるであろう。

【0200】

本発明の範囲から逸脱することなく、上記の方法、プロセス、および組成物において様々な変更を行うことができるため、上記の説明に含まれ、添付の図面に示される全ての事項は、例示的なものとして解釈されるべきであり、限定的な意味で解釈されるべきではないことが意図される。

10

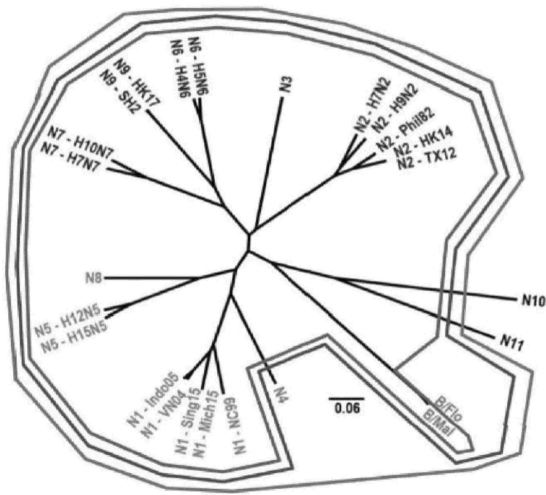
20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】



【図 1 B】

```

                                CDR-H1
                                50
>Inf.UCA EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTTFDDYGMHWVRQAPGKGLNVS
>IG04H .....R.....F.....F.....
>IE01H .....R.....F.....F.....
>IG01H .....RAL.....K.....A.....V.....F.....

                                CDR-H2
                                100
>Inf.UCA INWNGGSGTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRSEDYALYHCAVR
>IG04H L...DI.AFT.....S.....D...F.Y...
>IE01H L...DI.AFT.....V.S.....D...F.Y...
>IG01H L...DI.A.T.....V.....HI...PKP...Y...TS

                                CDR-H3
                                170
>Inf.UCA TWGEYTIREEPIHLSNYFDLWGRGTLVTVSS
>IG04H .....
>IE01H ...D...G...I.N.....
>IG01H S..D...RGP...KIT.....

                                CDR-L1
                                50
>Inf.UCA DIQLTQSPSPFLSASVGRVITICTRAISQGISYLAHWYQKPKAPKLLIYA
>IG04L .....D...F.....N...V...
>IE01L .....D.....N.....
>IG01L .....X.....DQ.....R.....N.....

                                CDR-L2
                                100
>Inf.UCA ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLFTFG
>IG04L .....L.....D.....
>IE01L .....L.....AF.....H.K.....
>IG01L .....L.....Y.....H.D.....

                                CDR-L3
                                100
>Inf.UCA PGTKVDIK
>IG04L .....
>IE01L .....
>IG01L .....
```

10

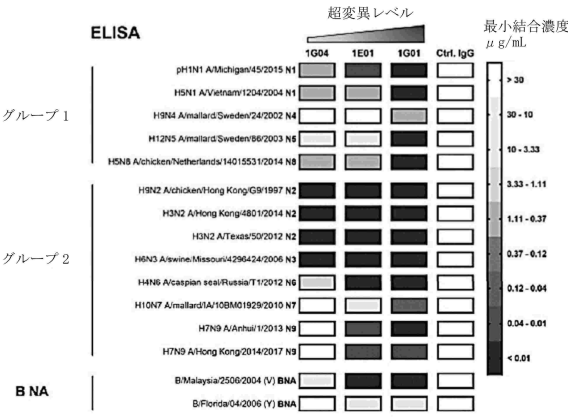
20

30

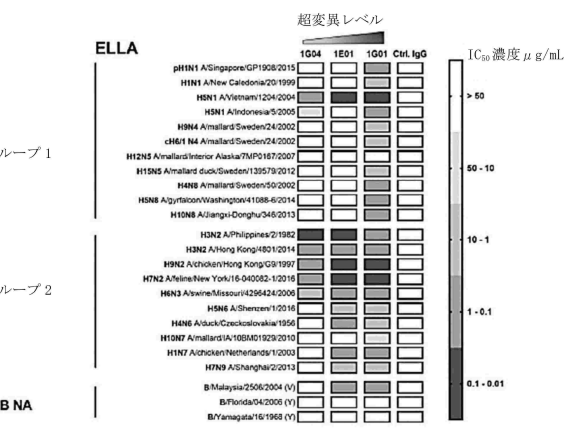
40

50

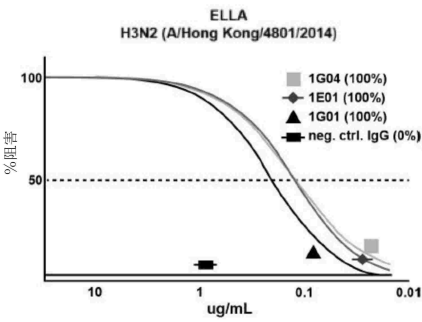
【図 1 C】



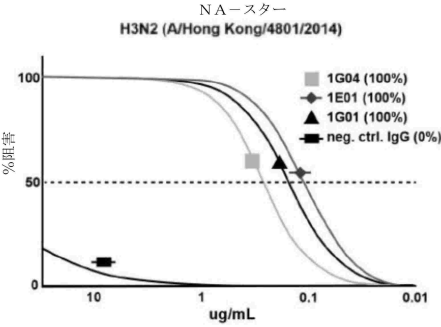
【図 1 D】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

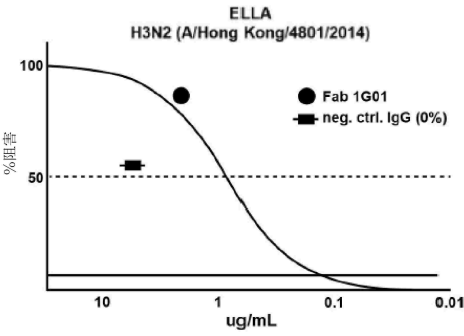
20

30

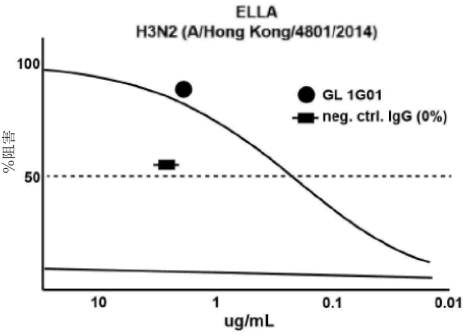
40

50

【図 2 C】

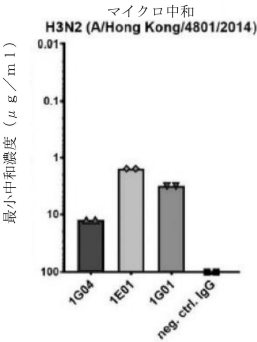


【図 2 D】

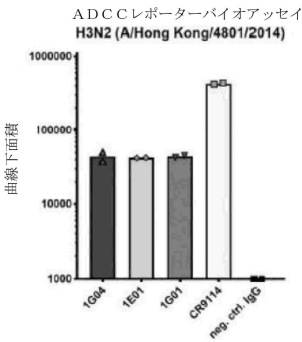


10

【図 2 E】



【図 2 F】



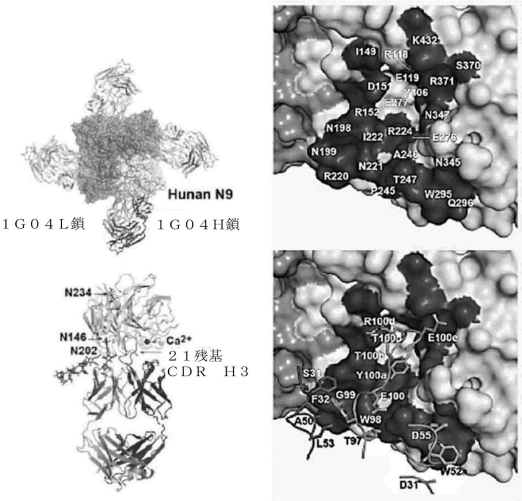
20

30

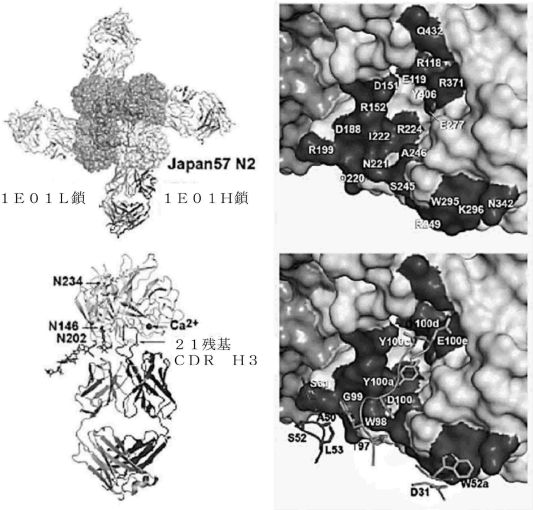
40

50

【図 3 A】



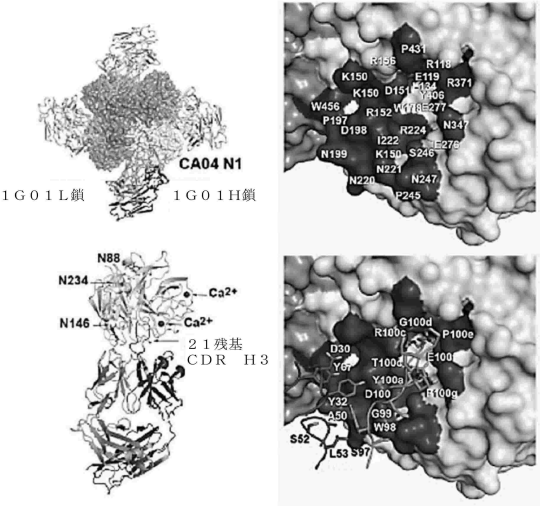
【図 3 B】



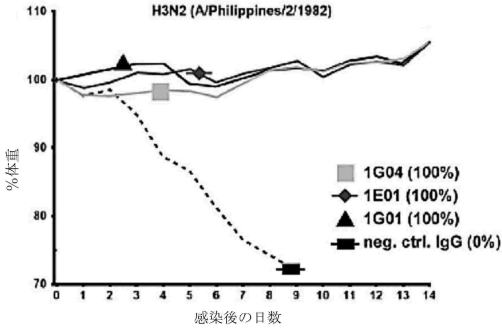
10

20

【図 3 C】



【図 4 A】

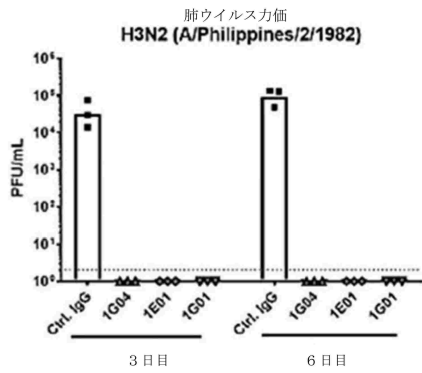


30

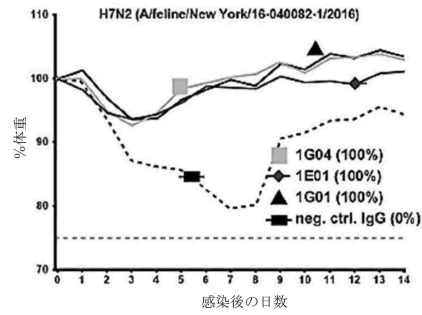
40

50

【図 4 B】

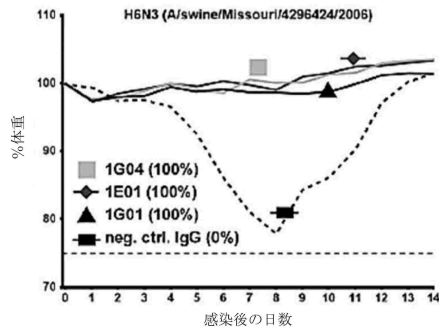


【図 4 C】

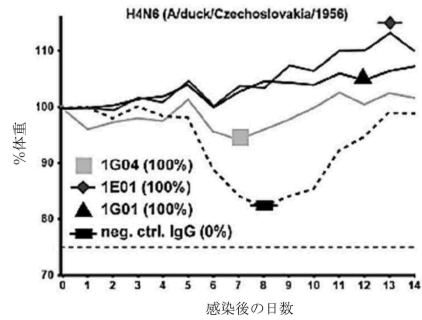


10

【図 4 D】

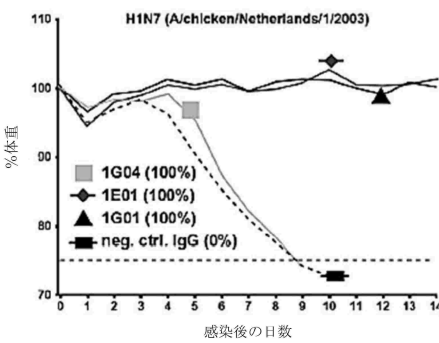


【図 4 E】

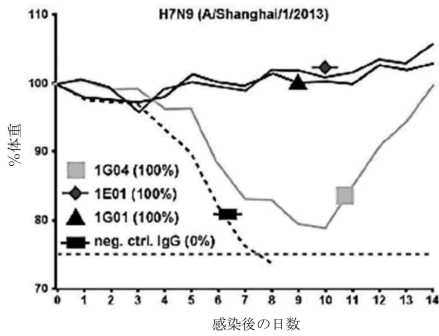


20

【図 4 F】



【図 4 G】

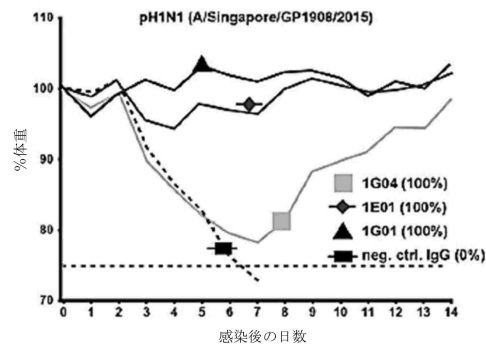


30

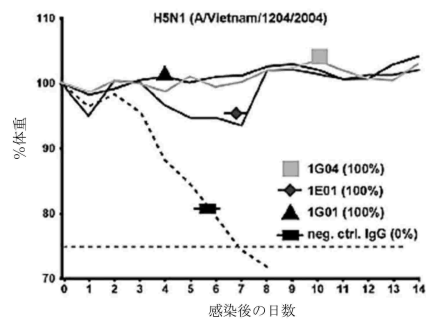
40

50

【図 4 H】

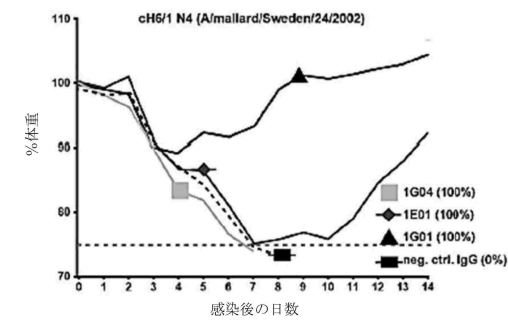


【図 4 I】

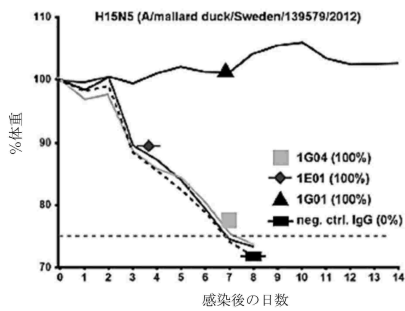


10

【図 4 J】

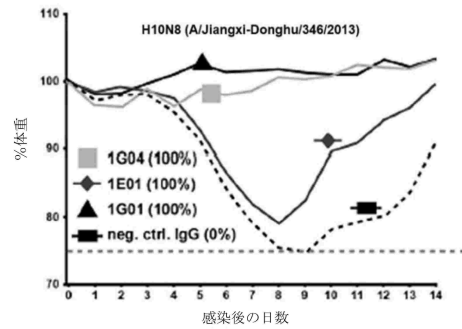


【図 4 K】

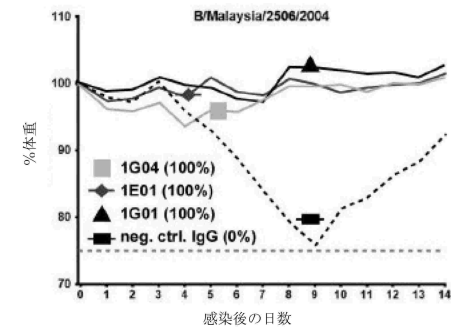


20

【図 4 L】



【図 4 M】

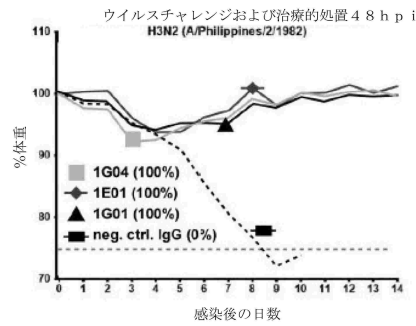


30

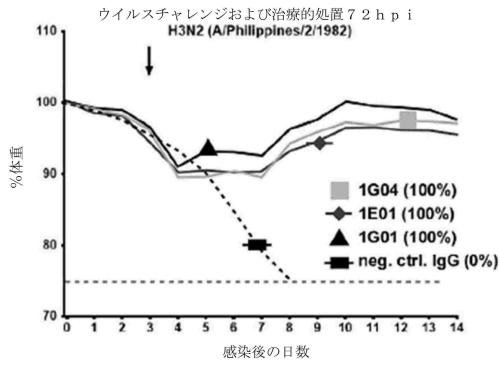
40

50

【図 4 N】

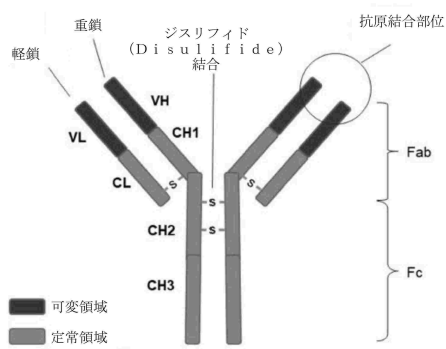


【図 4 O】

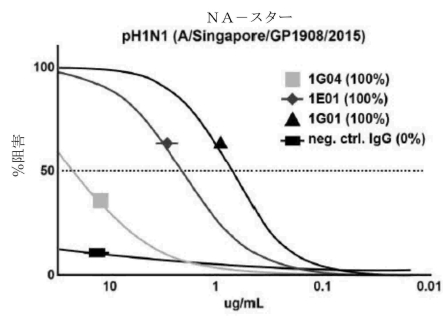


10

【図 5】



【図 6 A】



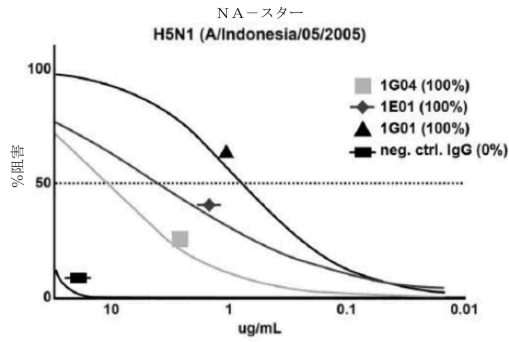
20

30

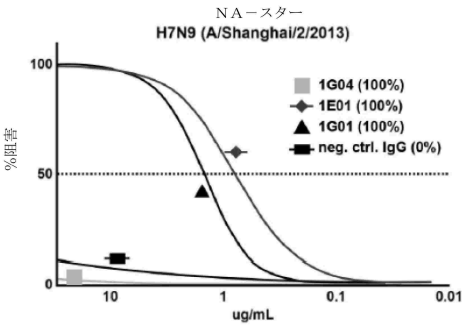
40

50

【図 6 B】

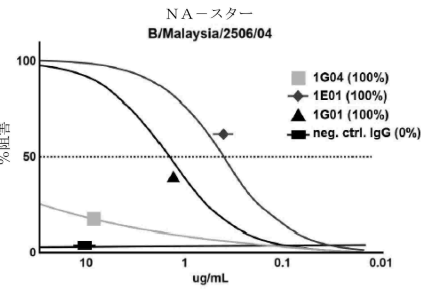


【図 6 C】

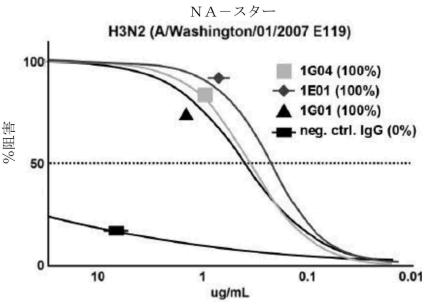


10

【図 6 D】

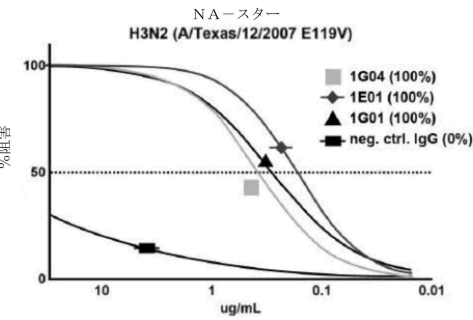


【図 7 A】

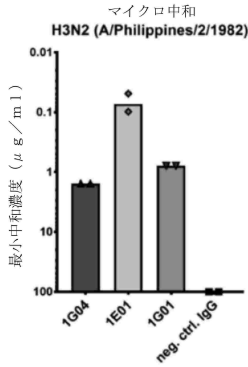


20

【図 7 B】



【図 8 A】

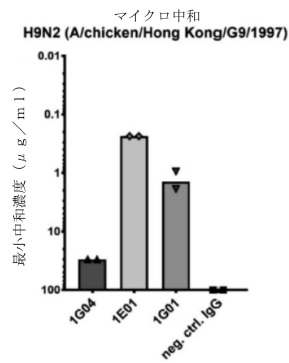


30

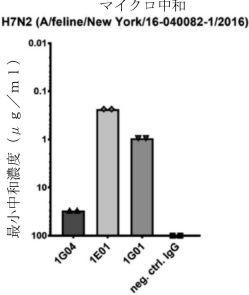
40

50

【図 8 B】

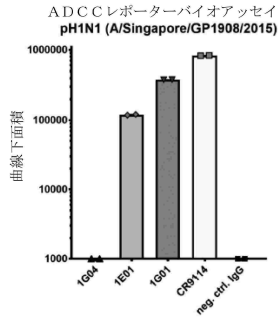


【図 8 C】

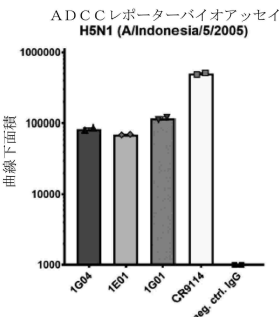


10

【図 9 A】

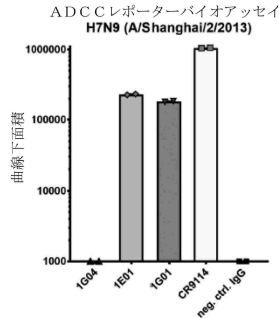


【図 9 B】

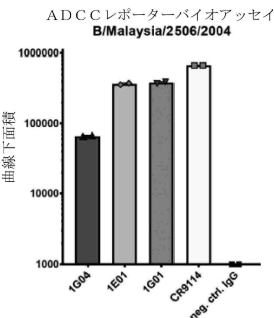


20

【図 9 C】



【図 9 D】

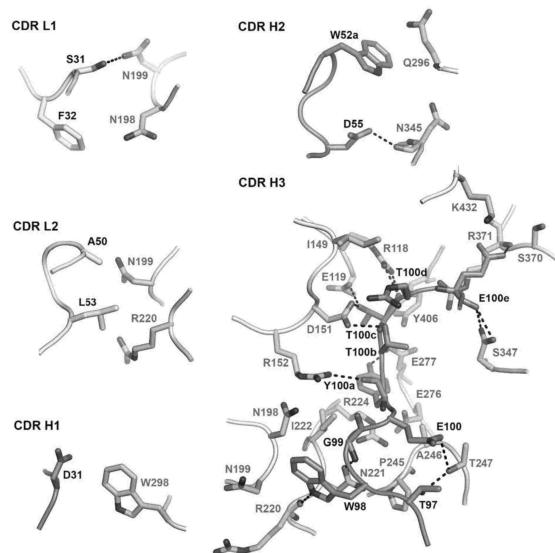


30

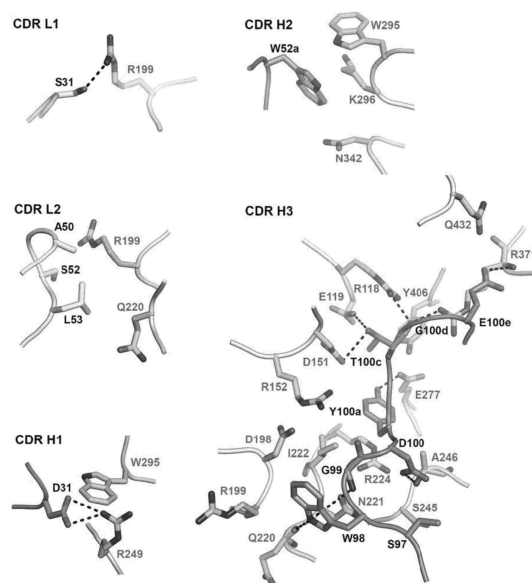
40

50

【図 10】



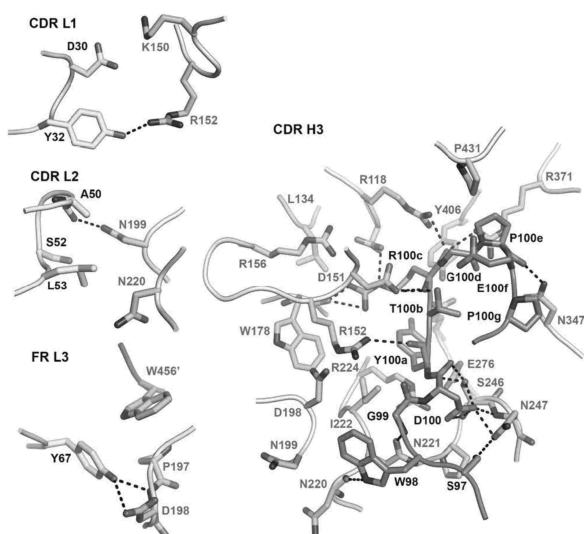
【図 11】



10

20

【図 12】



30

40

【配列表】

0007634231000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	39/145 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/145	
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 P	31/16	
		C 1 2 N	15/13	Z N A

ザ スクリプス リサーチ インスティテュート

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ ・ ホヤ、 ノース ・ トーリー ・ パインズ ・ ロード 1 0
5 5 0

(74)代理人 110002745

弁理士法人河崎特許事務所

(72)発明者 エレベディ, アリ

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州、 セントルイス, ワン ブルッキングス ドライブ

(72)発明者 クラマー, フロリアン

アメリカ合衆国 1 0 0 2 9 ニューヨーク州, ニューヨーク市, ワン グスタフ エル. レヴィ
プレイス, アイカーン スクール オブ メディシン アト マウント サイナイ内

(72)発明者 ウィルソン, イアン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホヤ, ノース トーリー パインズ ロード
1 0 5 5 0, ザ スクリプス リサーチ インスティテュート内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 3 6 6 8 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d