

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-512471

(P2017-512471A)

(43) 公表日 平成29年5月25日 (2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-559331 (P2016-559331)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月26日 (2015.3.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月24日 (2016.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/022758
 (87) 国際公開番号 W02015/148806
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015.10.1)
 (31) 優先権主張番号 61/971, 123
 (32) 優先日 平成26年3月27日 (2014.3.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 スウェム, リー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 37, モンタラ, ピー. オー. ボッ
 クス 370046

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体及び使用方法

(57) 【要約】

本発明は、抗B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体、抗B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体を含む組成物及びそれらの使用方法を提供する。

【選択図】 図 1 A - 1 B

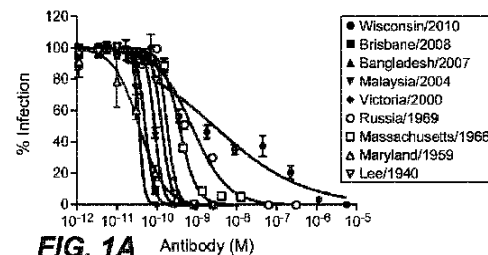


FIG. 1A Antibody (M)

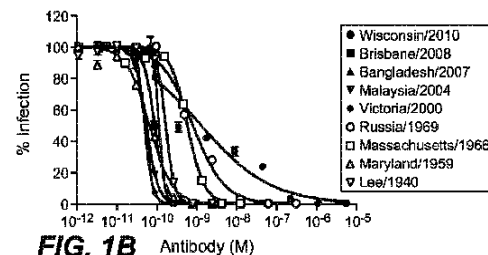


FIG. 1B Antibody (M)

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3）、ならびに3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3）を含み、ここで、

（a）HVR-H1が、配列番号63のアミノ酸配列を含み、

（b）HVR-H2が、配列番号67、68、69、70、71、72、73及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

（c）HVR-H3が、配列番号77のアミノ酸配列を含み、

（d）HVR-L1が、配列番号56のアミノ酸配列を含み、

（e）HVR-L2が、配列番号58のアミノ酸配列を含み、及び

（f）HVR-L3が、配列番号60のアミノ酸配列を含む、

B型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と特異的に結合する、単離抗赤血球凝集素モノクローナル抗体。

【請求項 2】

抗体が、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 3】

抗体が、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 4】

抗体が、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、該軽鎖可変領域が、配列番号91のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 5】

抗体が、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 6】

抗体が、配列番号94、96、98、100、102、104、106及び108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 7】

抗体が、軽鎖及び重鎖を含み、該軽鎖が、配列番号93のアミノ酸配列を含み、該重鎖が、配列番号94、96、98、100、102、104、106及び108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 8】

3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3）、ならびに3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3）を含み、ここで、

（a）HVR-H1が、配列番号61のアミノ酸配列を含み、

（b）HVR-H2が、配列番号64及び65からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

（c）HVR-H3が、配列番号75のアミノ酸配列を含み、

（d）HVR-L1が、配列番号55のアミノ酸配列を含み、

（e）HVR-L2が、配列番号57のアミノ酸配列を含み、及び

（f）HVR-L3が、配列番号59のアミノ酸配列を含む、

B型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と特異的に結合する、単離抗赤血球凝集素モノクローナル抗体。

【請求項 9】

抗体が、配列番号78、82及び86からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽

10

20

30

40

50

鎖可変領域を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 10】

抗体が、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 11】

抗体が、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、該軽鎖可変領域が、配列番号 78、82 及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 12】

抗体が、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 13】

抗体が、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 14】

抗体が、軽鎖及び重鎖を含み、該軽鎖が、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、該重鎖が、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 15】

3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2 及び HVR-H3）、ならびに3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2 及び HVR-L3）を含み、ここで、

（a）HVR-H1 が、配列番号 62 のアミノ酸配列を含み、

（b）HVR-H2 が、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。

（c）HVR-H3 が、配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、

（d）HVR-L1 が、配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、

（e）HVR-L2 が、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、及び

（f）HVR-L3 が、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む、

B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と特異的に結合する、単離抗赤血球凝集素モノクローナル抗体。

【請求項 16】

抗体が、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 17】

抗体が、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 18】

抗体が、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、該軽鎖可変領域が、配列番号 78 のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 19】

抗体が、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 20】

抗体が、配列番号 90 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 21】

抗体が、軽鎖及び重鎖を含み、該軽鎖が、配列番号 80 のアミノ酸配列を含み、該重鎖が、配列番号 90 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の単離抗赤血球凝集素抗体。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

B 型インフルエンザウイルス感染を治療、阻害または予防する必要性のある個体においてそれを治療、阻害または予防する方法であって、請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む組成物の有効量を該個体に投与し、それによって B 型インフルエンザウイルス感染を治療、阻害または予防することを含む、方法。

【請求項 2 3】

方法が、追加の治療剤を個体に投与することを更に含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

追加の治療剤が、ノイラミニダーゼ阻害剤、抗赤血球凝集素抗体または抗 M 2 抗体である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、組成物。

10

【請求項 2 6】

請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 2 9】

抗体の産生方法であって、該抗体が産生されるように、請求項 2 8 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

20

【請求項 3 0】

医薬の製造における、請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 3 1】

医薬が、B 型インフルエンザウイルス感染の治療、阻害または予防のためのものである、請求項 3 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

30

本出願は、2 0 1 4 年 3 月 2 7 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 9 7 1 , 1 2 3 号の利益を主張し、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提供され、その全体が参照として本明細書に組み込まれる、配列表を含有する。前記 A S C I I のコピーは、2 0 1 4 年 3 月 1 8 日に作成され、P 0 5 7 9 4 R 1 - W O _ _ S L . t x t と呼ばれ、9 6 , 6 1 2 バイトのサイズである。

【0 0 0 3】

本発明は、抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体、抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体を含む組成物及びそれらの使用方法を提供する。

40

【背景技術】

【0 0 0 4】

インフルエンザウイルス感染は、世界中で毎年 3 ~ 5 百万件の重篤な疾病及び 2 5 0 , 0 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 人の死亡を引き起こしている。米国単独でも、人口の 5 % ~ 2 0 % が毎年インフルエンザウイルスに感染しており、これらの感染の大部分は、A 型インフルエンザウイルスにより引き起こされている。(例えば、D u s h o f f e t a l . , (2 0 0 6) A m J E p i d e m i o l o g y 1 6 3 : 1 8 1 - 1 8 7 ; T h o m p s o n e t a l . , (2 0 0 4) J A M A 2 9 2 : 1 3 3 3 - 1 3 4 0 ; T h o m p s o n e t a l . , (2 0 0 3) J A M A 2 8 9 : 1 7 9 - 1 8 6 を参照す

50

ること。)しかし、B型インフルエンザウイルス感染は、米国単独でも毎年およそ10,000~100,000件のインフルエンザの入院症例を占め、毎年高い変動を示している(インフルエンザウイルスの全ての入院症例の1%~40%は、B型インフルエンザウイルス感染であり、平均17%である)。(Zhou et al(2012) Clin Inf Dis 54:1427-1436を参照すること。)インフルエンザウイルス感染に関連する医療費用への負担及び生産性の損失は、膨大である。入院及び死亡は、高齢者、小児及び慢性疾病などの主に高危険度群において生じる。

【0005】

ノイラミニダーゼ阻害剤は、A型及びB型インフルエンザウイルス感染の外来患者の治療及び予防に承認されている。オセルタミビル(Tamiflu(登録商標))は、広く使用されている予防薬であり、A型及びB型インフルエンザウイルス感染の早期治療処置の選択肢である。(例えば、Kandel and Hartshorn(2001) BioDrugs: Clinical Immunotherapy, Biopharmaceuticals and Gene Therapy 15:303-323; Nicholson et al., (2000) Lancet 355:1845-1850; Treanor et al., (2000) JAMA 283:1016-1024; 及び Welliver et al., (2001) JAMA 285:748-754を参照すること。)しかし、オセルタミビル治療は、有意な臨床利益を提供するために、症状の発症から48時間以内に開始しなければならない。(例えば、Aoki et al(2003) J Antimicrobial Chemotherapy 51:123-129を参照すること。)この負担は、治療を求めている時点で最適な48時間治療範囲を概して超えている、重篤の疾病患者を治療するオセルタミビルの能力を損なう。加えてオセルタミビルは、恐らく、A型インフルエンザノイラミニダーゼと比較してB型インフルエンザノイラミニダーゼに対して10倍高いIC50値があることに部分的に起因して、A型インフルエンザウイルス感染の治療と比較してB型インフルエンザウイルス感染の治療に有効性が低い。したがって最近では、B型インフルエンザウイルス感染の入院患者を治療するB型インフルエンザウイルス治療薬を特定することに、相当な注目が集まっている。

【0006】

1988年から1989年にかけて、B型インフルエンザウイルスの2つの極めて特有の抗原変種が、祖先B型インフルエンザウイルス系列から出現した。これらのウイルスは、B型インフルエンザウイルスB/ビクトリア/2/87またはB/ヤマガタ/16/88のいずれかと抗原的に関連した。(例えば、Rota et al., (1990) Virology 175:59-68を参照すること。)したがって、祖先、ビクトリア及びヤマガタ系列のB型インフルエンザウイルスに対して有効である、B型インフルエンザウイルス感染療法を開発することが望ましい。

【0007】

最近の報告は、赤血球凝集素と結合し、B型インフルエンザウイルスを中和するモノクローナル抗体(mAb)を記載している。(例えば、Kubota-Koketsu et al., (2009) Biochem Biophys Res Comm 387:180-185; Yasugi et al., (2013) PLOS Pathogens 9:e1003150, 1-12; Dreyfus et al., (2012) Science Express 337:1343-1348; 国際出願公開第2013/007770号、同第2013/132007号、同第2013/114885号、同第2010/073647号、ならびに米国特許出願公開第2009/0092620号、同第2011/0319600号及び同第2011/0319660号を参照すること。)

【0008】

これらの報告にもかかわらず、祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列のB型インフルエンザウイルス感染の治療または予防に有効なB型インフルエンザウイルス療法を含む、広範

10

20

30

40

50

囲の B 型インフルエンザウイルス株に対して有効な新規の B 型インフルエンザウイルス療法の必要性が、当該技術において依然として存在する。本発明は、この必要性を満たし、B 型インフルエンザウイルス感染の治療及び予防に他の利益を提供する。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体（すなわち、抗赤血球凝集素抗体、抗 B 型インフルエンザウイルス抗体）、抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体を含む組成物及びそれらの使用方法を提供する。

【0010】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3）、ならびに3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3）を含み、ここで、

- (a) HVR-H1は、配列番号61のアミノ酸配列を含み、
- (b) HVR-H2は、配列番号64及び65からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
- (c) HVR-H3は、配列番号75のアミノ酸配列を含み、
- (d) HVR-L1は、配列番号55のアミノ酸配列を含み、
- (e) HVR-L2は、配列番号57のアミノ酸配列を含み、
- (f) HVR-L3は、配列番号59のアミノ酸配列を含む。

10

【0011】

幾つかの実施形態において、少なくとも1、2、3、4、5及び/または6つの超可変領域（HVR）配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

- (a) HVR-H1は、配列番号61のアミノ酸配列を含み、
- (b) HVR-H2は、配列番号64及び65からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
- (c) HVR-H3は、配列番号75のアミノ酸配列を含み、
- (d) HVR-L1は、配列番号55のアミノ酸配列を含み、
- (e) HVR-L2は、配列番号57のアミノ酸配列を含み、
- (f) HVR-L3は、配列番号59のアミノ酸配列を含む。

20

【0012】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3）を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

- (a) HVR-L1は、配列番号55のアミノ酸配列を含み、
- (b) HVR-L2は、配列番号57のアミノ酸配列を含み、
- (c) HVR-L3は、配列番号59のアミノ酸配列を含む。

30

【0013】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3）を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

- (a) HVR-H1は、配列番号61のアミノ酸配列を含み、
- (b) HVR-H2は、配列番号64及び65からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
- (c) HVR-H3は、配列番号75のアミノ酸配列を含む。

40

【0014】

幾つかの実施形態において、少なくとも1、2及び/または3つの軽鎖超可変領域（HVR）配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

- (a) HVR-L1は、配列番号55のアミノ酸配列を含み、
- (b) HVR-L2は、配列番号57のアミノ酸配列を含み、
- (c) HVR-L3は、配列番号59のアミノ酸配列を含む。

【0015】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2及び/または3つの重鎖超可

50

変領域 (HVR) 配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR - H1 は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR - H2 は、配列番号 64 及び 65 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) HVR - H3 は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含む。

【0016】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号 78、82 及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 78、82 及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0018】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0019】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0020】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0021】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0022】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、3つの重鎖超可変領域 (HVR - H1、HVR - H2 及び HVR - H3)、ならびに3つの軽鎖超可変領域 (HVR - L1、HVR - L2 及び HVR - L3) を含み、ここで、

30

(a) HVR - H1 は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR - H2 は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。

(c) HVR - H3 は、配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、

(d) HVR - L1 は、配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、

(e) HVR - L2 は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、

(f) HVR - L3 は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む。

【0023】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2、3、4、5及び/または6つの超可変領域 (HVR) 配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR - H1 は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含み、

40

(b) HVR - H2 は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む。

(c) HVR - H3 は、配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、

(d) HVR - L1 は、配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、

(e) HVR - L2 は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、

(f) HVR - L3 は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む。

【0024】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの軽鎖超可変領域 (HVR - L1、HVR - L2 及び HVR - L3) を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR - L1 は、配列番号 55 のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR - L2 は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、

50

(c) H V R - L 3 は、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む。

【0025】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの重鎖超可変領域(H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3)を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) H V R - H 1 は、配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含み、

(b) H V R - H 2 は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含み、

(c) H V R - H 3 は、配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む。

【0026】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2及び/または3つの軽鎖超可変領域(H V R)配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) H V R - L 1 は、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含み、

(b) H V R - L 2 は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含み、

(c) H V R - L 3 は、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む。

【0027】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2及び/または3つの重鎖超可変領域(H V R)配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) H V R - H 1 は、配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含み、

(b) H V R - H 2 は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含み、

(c) H V R - H 3 は、配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む。

【0028】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。

【0029】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0030】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0031】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む。

【0032】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0033】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0034】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、3つの重鎖超可変領域(H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3)、ならびに3つの軽鎖超可変領域(H V R - L 1、H V R - L 2 及び H V R - L 3)を含み、ここで、

(a) H V R - H 1 は、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含み、

(b) H V R - H 2 は、配列番号 6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3 及び 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) H V R - H 3 は、配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含み、

(d) H V R - L 1 は、配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含み、

(e) H V R - L 2 は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含み、

(f) H V R - L 3 は、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む。

【0035】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2、3、4、5及び/または6つの超可変領域(HVR)配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR-H1は、配列番号63のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR-H2は、配列番号67、68、69、70、71、72、73及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) HVR-H3は、配列番号77のアミノ酸配列を含み、

(d) HVR-L1は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、

(e) HVR-L2は、配列番号58のアミノ酸配列を含み、

(f) HVR-L3は、配列番号60のアミノ酸配列を含む。

10

【0036】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3)を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR-L1は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR-L2は、配列番号58のアミノ酸配列を含み、

(c) HVR-L3は、配列番号60のアミノ酸配列を含む。

【0037】

幾つかの実施形態において、本発明は、3つの重鎖超可変領域(HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3)を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR-H1は、配列番号63のアミノ酸配列を含み、

20

(b) HVR-H2は、配列番号67、68、69、70、71、72、73及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) HVR-H3は、配列番号77のアミノ酸配列を含む。

【0038】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2及び/または3つの軽鎖超可変領域(HVR)配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR-L1は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR-L2は、配列番号58のアミノ酸配列を含み、

(c) HVR-L3は、配列番号60のアミノ酸配列を含む。

30

【0039】

幾つかの実施形態において、本発明は、少なくとも1、2及び/または3つの重鎖超可変領域(HVR)配列を含む単離抗赤血球凝集素抗体を提供し、ここで、

(a) HVR-H1は、配列番号63のアミノ酸配列を含み、

(b) HVR-H2は、配列番号67、68、69、70、71、72、73及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) HVR-H3は、配列番号77のアミノ酸配列を含む。

【0040】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号91のアミノ酸配列を含む。

40

【0041】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0042】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0043】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、重鎖及び軽鎖を含み

50

、重鎖は、配列番号 94、96、98、100、102、104、106 及び 108 のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号 93 のアミノ酸配列を含む。

【0044】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 93 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0045】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、配列番号 94、96、98、100、102、104、106 及び 108 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0046】

幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、モノクローナル抗体である。幾つかの実施形態において、本発明の単離抗赤血球凝集素抗体は、B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素と特異的に結合する。幾つかの実施形態において、単離抗赤血球凝集素抗体は、B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素と特異的に結合する単離抗赤血球凝集素モノクローナル抗体である。

【0047】

本発明は、本発明の抗赤血球凝集素抗体をコードする単離核酸も提供する。本発明は、本発明の抗赤血球凝集素抗体をコードする核酸を含むベクターも提供する。本発明は、本発明の核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。ベクターは、任意の種類、例えば、発現ベクターなどの組み換えベクターでありうる。様々な宿主細胞のいずれかを使用することができる。1 つの実施形態において、宿主細胞は原核細胞、例えば *E. coli* である。別の実施形態において、宿主細胞は真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などの哺乳類細胞である。

【0048】

本発明は、本発明の抗赤血球凝集素抗体を産生する方法を更に提供する。例えば、本発明は、抗赤血球凝集素抗体（本明細書において定義されるように、完全長抗体及びそのフラグメントを含む）を作製する方法であって、適した宿主細胞において、抗赤血球凝集素抗体またはそのフラグメントをコードする本発明の組み換えベクターを、抗体またはそのフラグメントが産生されるように発現させることを含む方法を提供する。幾つかの実施形態において、方法は、本発明の抗赤血球凝集素抗体（またはそのフラグメント）をコードする核酸を含む宿主細胞を、核酸が発現するように培養することを含む。方法は、宿主細胞培養物または宿主細胞培養培地から、抗赤血球凝集素抗体またはそのフラグメントを回収することを更に含んでも良い。

【0049】

本発明は、本発明の抗赤血球凝集素抗体及び薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤も提供する。薬学的製剤は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗 M2 抗体などの別の抗体等）を更に含んでも良い。

【0050】

本発明は、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む組成物も提供する。組成物は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗 M2 抗体などの別の抗体等）を更に含んでも良い。

【0051】

本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染の予防に使用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む組成物も提供する。幾つかの実施形態において、本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染の予防に使用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む薬学的組成物を提供する。本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染の治療に使用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む組成物を更に提供する。幾つかの実施形態において、本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染の治療に使用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む薬学的組成物を提供する。本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染の阻害に使

10

20

30

40

50

用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む組成物を更に提供する。幾つかの実施形態において、本発明は、B型インフルエンザウイルス感染の阻害に使用される、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0052】

また本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む組成物を、医薬の製造に使用しても良い。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等）を更に含んでも良い。

【0053】

本発明は、B型インフルエンザウイルス感染を阻害する方法であって、その必要性のある対象に、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む有効量の組成物を投与し、それによって、B型インフルエンザウイルス感染を阻害することを含む方法も提供する。本発明は、B型インフルエンザウイルス感染を治療する方法であって、その必要性のある対象に、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む有効量の組成物を投与し、それによって、B型インフルエンザウイルス感染を治療することを含む方法も提供する。本発明は、B型インフルエンザウイルス感染を予防する方法であって、その必要性のある対象に、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む有効量の組成物を投与し、それによって、B型インフルエンザウイルス感染を予防することを含む方法も提供する。

【0054】

本発明は、B型インフルエンザウイルス感染を阻害、治療または予防する方法であって、その必要性のある患者に、本発明の抗赤血球凝集素抗体を含む有効量の組成物を投与し、患者に有効量の追加の治療剤を投与し、それによって、B型インフルエンザウイルス感染を阻害、治療または予防することを含む方法も提供する。幾つかの実施形態において、追加の治療剤は、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤である。他の実施形態において、追加の治療剤は別の抗赤血球凝集素抗体である。なお他の実施形態において、追加の治療剤は抗M2抗体である。そのような併用治療の様々な態様において、治療剤は、ほぼ同じ時に投与される、一緒に投与される、または順次的若しくは連続的に投与される。特定の実施形態において、抗ノイラミニダーゼ阻害剤は、本発明の抗赤血球凝集素抗体の投与の前に投与される。幾つかの実施形態において、本発明の抗B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体は、祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列を含む異なる系列のB型インフルエンザウイルス株によるB型インフルエンザウイルス感染を中和する、阻害する、治療する、または予防するのに有効である。

【0055】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明の抗赤血球凝集素抗体の使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等）を更に含んでも良い。

【0056】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明の核酸の使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等）を更に含んでも良い。

【0057】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明の発現ベクターの使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤（例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体

10

20

30

40

50

などの別の抗体等)を更に含んでも良い。

【0058】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明の宿主細胞の使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤(例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等)を更に含んでも良い。

【0059】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明の製品の使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤(例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等)を更に含んでも良い。

10

【0060】

別の態様において、本発明は、医薬の製造における本発明のキットの使用を提供する。医薬を、B型インフルエンザウイルス感染の阻害、治療または予防に使用しても良い。ある特定の実施形態において、医薬は、追加の治療剤(例えば、オセルタミビルまたはザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤、別の抗赤血球凝集素抗体または抗M2抗体などの別の抗体等)を更に含んでも良い。

【0061】

様々な態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、B型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する。他の態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、赤血球凝集素と結合し、B型インフルエンザウイルスを中和する。幾つかの実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、B型インフルエンザウイルスをインビトロ、インビボ、またはインビトロ及びインビボにおいて中和する。

20

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1A】モノクローナル抗体34B5A及びモノクローナル抗体33F8それぞれによる、様々なB型インフルエンザウイルス単離菌のインビトロ中和を示すデータを記載する。

30

【図1B】モノクローナル抗体34B5A及びモノクローナル抗体33F8それぞれによる、様々なB型インフルエンザウイルス単離菌のインビトロ中和を示すデータを記載する。

【図2】モノクローナル抗体46B8Aによる、様々なB型インフルエンザウイルス単離菌のインビトロ中和を示すデータを記載する。

【図3】赤血球凝集阻害に対するモノクローナル抗体34B5C及びモノクローナル抗体46B8Cの効果を示すデータを記載する。

【図4】インビトロブランク阻害アッセイによるモノクローナル抗体46B8Cによる様々なB型インフルエンザウイルス単離菌の中和を示すデータを記載する。

【図5】赤血球凝集素媒介細胞間融合に対するモノクローナル抗体34B5C及びモノクローナル抗体46B8Cの効果を示すデータを記載する。

40

【図6A】B型インフルエンザウイルスB/ビクトリア/2000に感染し、様々な量のモノクローナル抗体34B5Aが投与されたマウスの生存率(%) (図6A)と、オセルタミビル(Tamiflu)が投与されたマウスの生存率(%) (図6B)との比較を示すデータを記載する。

【図6B】B型インフルエンザウイルスB/ビクトリア/2000に感染し、様々な量のモノクローナル抗体34B5Aが投与されたマウスの生存率(%) (図6A)と、オセルタミビル(Tamiflu)が投与されたマウスの生存率(%) (図6B)との比較を示すデータを記載する。

【図7A】B型インフルエンザウイルスB/ウイスコンシン/2000に感染し、様々な

50

量のモノクローナル抗体 3 4 B 5 C が、感染の 4 8 時間後または感染の 7 2 時間後にそれぞれ投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 7 B】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 0 0 に感染し、様々な量のモノクローナル抗体 3 4 B 5 C が、感染の 4 8 時間後または感染の 7 2 時間後にそれぞれ投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 8 A】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0、B / ビクトリア / 2 0 0 0、B / ロシア / 1 9 6 9 及び B / マサチューセッツ / 1 9 6 6 のそれぞれに感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 2 4、4 8 または 7 2 時間後に投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 8 B】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0、B / ビクトリア / 2 0 0 0、B / ロシア / 1 9 6 9 及び B / マサチューセッツ / 1 9 6 6 のそれぞれに感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 2 4、4 8 または 7 2 時間後に投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 8 C】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0、B / ビクトリア / 2 0 0 0、B / ロシア / 1 9 6 9 及び B / マサチューセッツ / 1 9 6 6 のそれぞれに感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 2 4、4 8 または 7 2 時間後に投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 8 D】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0、B / ビクトリア / 2 0 0 0、B / ロシア / 1 9 6 9 及び B / マサチューセッツ / 1 9 6 6 のそれぞれに感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 2 4、4 8 または 7 2 時間後に投与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 9 A】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0 及び B / ビクトリア / 2 0 0 0 のそれぞれに感染し、様々な量のモノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 7 2 時間後に与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 9 B】B 型インフルエンザウイルス B / ウィスコンシン / 2 0 1 0 及び B / ビクトリア / 2 0 0 0 のそれぞれに感染し、様々な量のモノクローナル抗体 4 6 B 8 C が感染の 7 2 時間後に与されたマウスの生存率 (%) を示すデータを記載する。

【図 1 0 A】B 型インフルエンザウイルス B / ビクトリア / 2 0 0 0 に感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C またはオセルタミビル (T a m i f l u) のいずれかが投与されたマウスの生存率 (%) 及び体重 (B W) 変化 (%) をそれぞれ示すデータを記載する。

【図 1 0 B】B 型インフルエンザウイルス B / ビクトリア / 2 0 0 0 に感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C またはオセルタミビル (T a m i f l u) のいずれかが投与されたマウスの生存率 (%) 及び体重 (B W) 変化 (%) をそれぞれ示すデータを記載する。

【図 1 1 A】マウスにおける生存率 (%) 及び肺ウイルス力価それぞれに対するモノクローナル抗体 4 6 B 8 C 及びオセルタミビル (T a m i f l u) の単独での、または組み合わせでの投与の効果を示すデータを記載する。

【図 1 1 B】マウスにおける生存率 (%) 及び肺ウイルス力価それぞれに対するモノクローナル抗体 4 6 B 8 C 及びオセルタミビル (T a m i f l u) の単独での、または組み合わせでの投与の効果を示すデータを記載する。

【図 1 2 A】モノクローナル抗体 4 6 B 8 C 及びオセルタミビル (T a m i f l u) の共投与の効果を示すデータを記載する。

【図 1 2 B】モノクローナル抗体 4 6 B 8 C 及びオセルタミビル (T a m i f l u) の共投与の効果を示すデータを記載する。

【図 1 3】本発明の抗 B 型インフルエンザウイルス抗体の軽鎖及び重鎖超可変領域のアミノ酸配列を記載する。

【図 1 4】m A b 3 4 B 5 A の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 1 5】m A b 3 4 B 5 B の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 1 6】m A b 3 4 B 5 C の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を記載する。

【図 1 7】m A b 3 3 F 8 の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 1 8】m A b 4 6 B 8 A の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 1 9】m A b 4 6 B 8 B の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 0】m A b 4 6 B 8 C の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 1】m A b 4 6 B 8 D の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。 10

【図 2 2】m A b 4 6 B 8 E の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 3】m A b 4 6 B 8 F の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 4】m A b 4 6 B 8 G の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 5】m A b 4 6 B 8 H の軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を記載する。

【図 2 6 A】B 型インフルエンザウイルス B / プリスペン / 2 0 0 8 に感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が投与されたマウスの生存率 (%) 及び体重 (B W) 変化 (%) をそれぞれ示すデータを記載する。 20

【図 2 6 B】B 型インフルエンザウイルス B / プリスペン / 2 0 0 8 に感染し、モノクローナル抗体 4 6 B 8 C が投与されたマウスの生存率 (%) 及び体重 (B W) 変化 (%) をそれぞれ示すデータを記載する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 3 】

I . 定義

本明細書の目的において「ヒト受容体フレームワーク」は、下記に定義されているヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークから誘導される軽鎖可変ドメイン (V L) フレームワークまたは重鎖可変ドメイン (V H) フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークから「誘導される」ヒト受容体フレームワークは、同じアミノ酸配列を含んでも良い、またはアミノ酸配列の変化を含有しても良い。幾つかの実施形態において、アミノ酸変化の数は、1 0 個以下、9 個以下、8 個以下、7 個以下、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下または 2 個以下である。幾つかの実施形態において、V L ヒト受容体フレームワークは、V L ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。 30

【 0 0 6 4 】

「親和性」は、分子 (例えば、抗体) の単一結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) との非共有相互作用の合計の強度を指す。特に示されない限り、本明細書に使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー (例えば、抗体と抗原) の 1 : 1 の相互作用を反映する固有結合親和性を指す。分子 X とそのパートナー Y との親和性は、一般に、解離定数 (K d) により表すことができる。親和性は、本明細書に記載されているものを含む、当該技術に既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定する特定の実例的及び例示的な実施形態を、以下に記載する。 40

【 0 0 6 5 】

「親和性成熟」抗体は、変更を有さない親抗体と比較して、1 個以上の超可変領域 (H V R) に 1 個以上の変更を有する抗体を指し、そのような変更は、抗原への抗体の親和性の改善をもたらす。 50

【 0 0 6 6 】

「抗赤血球凝集素抗体」及び「赤血球凝集素に結合する抗体」という用語は、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素を標的にすることを含む、赤血球凝集素を標的にすることにおいて診断及び／または治療剤として抗体が有用であるように、十分な親和性を持って赤血球凝集素と結合する抗体を指す。1つの実施形態において、無関係の非赤血球凝集素タンパク質への抗赤血球凝集素抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）により測定して、赤血球凝集素への抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、赤血球凝集素に結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM または 0.001nM （例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態において、抗赤血球凝集素抗体は、祖先、ビクトリアまたはヤマガタ系列のB型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素のエピトープなどの、B型インフルエンザウイルスの異なる菌株、サブタイプ及び単離菌の赤血球凝集素に保存されている、B型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素のエピトープに結合する。

10

【 0 0 6 7 】

「抗体」という用語は、本明細書において、最も広義の意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体フラグメントが望ましい抗原結合活性を示す限り含まれるが、これらに限定されない様々な抗体構造を包含する。

20

【 0 0 6 8 】

「抗体フラグメント」は、無傷の抗体が結合する抗原と結合する無傷の抗体の一部を含む、無傷の抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントは、赤血球凝集素と結合し、A型インフルエンザウイルスを中和する無傷の抗体の一部を含む、無傷の抗体以外の分子も指す。抗体フラグメントの例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、二特異性抗体（diabody）、直線状抗体（linear antibody）、単鎖抗体分子（例えば、scFv）及び抗体フラグメントから形成される多特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 9 】

基準抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて基準抗体がその抗原に結合するのを50%以上遮断する抗体を指し、逆に、基準抗体は、競合アッセイにおいて抗体がその抗原に結合するのを50%以上遮断する。例示的な競合アッセイは、本明細書に提供されている。

30

【 0 0 7 0 】

「キメラ」抗体という用語は、重及び／または軽鎖の一部が特定の源または種から誘導され、重及び／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種から誘導される抗体を指す。

【 0 0 7 1 】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。5つの主な抗体のクラスがあり、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMであり、これらのうちの幾つかを、サブクラス（アイソタイプ）に更に分けることができ、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ とそれぞれ呼ばれる。

40

【 0 0 7 2 】

「細胞傷害剤」という用語は、本明細書に使用されるとき、細胞機能を阻害若しくは防止する、及び／または細胞死若しくは破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害剤には、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体）；化学療法剤または薬（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド（ピン

50

クリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤);増殖阻害剤;核酸分解酵素などの酵素及びそのフラグメント;抗生物質;細菌、真菌、植物または動物由来の、小分子毒素または酵素活性毒素などの毒素(そのフラグメント及び/または変種を含む);ならびに以下に開示されている様々な抗腫瘍または抗癌剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0073】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞媒介細胞傷害(ADCC);食作用;細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方調節;ならびにB細胞活性化が含まれる。

10

【0074】

作用物質、例えば薬学的製剤の「有効量」は、望ましい治療または予防の結果を、必要な投与量及び期間で達成するのに有効な量を指す。

【0075】

「Fc領域」という用語は、本明細書において、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。用語には、未変性配列Fc領域及び変種Fc領域が含まれる。1つの実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで伸びている。しかしFc領域のC末端リシン(Lys447)は、存在していても、いなくても良い。本明細書において特定されない限り、Fc領域または定常領域のアミノ酸の番号付けは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EU指標とも呼ばれるEU番号付け系に従っている。

20

【0076】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVF)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に4つのFRドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般にVH(またはVL)に以下の順序:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で表れる。

30

【0077】

「完全長抗体」、「無傷の抗体」及び「全抗体」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、未変性抗体構造と実質的に類似した構造を有する、または本明細書に定義されているFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

【0078】

「宿主細胞」、「宿主細胞系」及び「宿主細胞培養物」という用語は、交換可能に使用され、外来性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の後代も含まれる。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これらには、一次形質転換細胞及び継代数に関わりなくそれから誘導される後代が含まれる。後代は、親細胞と核酸含有量が完全に同一ではない場合もあるが、突然変異を含有する場合もある。元の形質転換細胞で選別または選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異後代が、本明細書において含まれる。

40

【0079】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞により産生された抗体、またはヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源から誘導された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する、抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特定の除外する。

50

【0080】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV_LまたはV_Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表す、フレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV_LまたはV_H配列の選択は、可変ドメイン配列の部分群からである。一般に、配列の部分群は、Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるような部分群である。1つの実施形態において、V_Lでは、部分群は上記のKabatらにあるようにカップIである。1つの実施形態において、V_Hでは、部分群は上記のKabatらにあるように部分群IIIである。

10

【0081】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRのアミノ酸残基及びヒトFRのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全て含み、全て、または実質的に全てのHVR（例えば、CDR）は、非ヒト抗体のものに対応し、全て、または実質的に全てのFRは、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、ヒト抗体から誘導される抗体定常領域の少なくとも一部分を場合により含んでも良い。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けている抗体を指す。

20

【0082】

「超可変領域」または「HVR」という用語は、本明細書に記載されるとき、順序が超可変性（「相補性決定領域」若しくは「CDR」）である、及び/または構造的に確定されたループ（「超可変ループ」）を形成する、及び/または抗原接触残基（「抗原接触」）を含有する、抗体可変ドメインの各領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、V_Hに3つ（H1、H2、H3）及びV_Lに3つ（L1、L2、L3）である。本明細書において例示的なHVRには、

30

(a) アミノ酸残基26~32（L1）、50~52（L2）、91~96（L3）、26~32（H1）、53~55（H2）及び96~101（H3）に生じる超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）；

(b) アミノ酸残基24~34（L1）、50~56（L2）、89~97（L3）、31~35b（H1）、50~65（H2）及び95~102（H3）に生じるCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）；

(c) アミノ酸残基27c~36（L1）、46~55（L2）、89~96（L3）、30~35b（H1）、47~58（H2）及び93~101（H3）に生じるアミノ酸接触（MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)）；ならびに

40

(d) HVRアミノ酸残基46~56（L2）、47~56（L2）、48~56（L2）、49~56（L2）、26~35（H1）、26~35b（H1）、49~65（H2）、93~102（H3）及び94~102（H3）を含む、(a)、(b)及び/または(c)の組み合わせが含まれる。

【0083】

特に示されない限り、可変ドメインのHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において上記のKabatらに従って番号付けされる。

【0084】

「免疫複合体」は、細胞傷害剤が含まれるが、これに限定されない1つ以上の異種分子

50

に複合した抗体である。

【0085】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）が、限定されることなく含まれる。ある特定の実施形態において、個体または対象はヒトである。

【0086】

「単離」抗体は、その天然環境の構成成分から分離されたものである。幾つかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、細管電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換若しくは逆相HPLC）により決定されるように、95%または99%を超えた純度に精製される。抗体純度の評価方法についての総説には、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照すること。

【0087】

「単離」核酸は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有するが、核酸分子が染色体外に存在する、または天然の染色体の位置と異なる染色体の位置に存在する細胞に含有されている、核酸分子が含まれる。

【0088】

「抗赤血球凝集素抗体をコードする単離核酸」は、抗体重及び軽鎖（またはそのフラグメント）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一ベクターまたは別個のベクターにおけるそのような核酸分子（複数可）及び宿主細胞の1つ以上の位置に存在するそのような核酸分子（複数可）が含まれる。

【0089】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書に使用されるとき、実質的に同種の抗体の個体群から得られる抗体を指し、すなわち、個体群に含まれる個別の抗体は、例えば、天然に生じる突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調合剤の産生の際に生じる変種抗体の可能性を除いて、同一である及び/または同じエピトープと結合する。そのような変種は、一般に少量で存在する。異なる決定因子（エピトープ）に向けられている異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調合剤と対照的に、モノクローナル抗体調合剤の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定因子に向けられている。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の性質が抗体の実質的に同種の個体群から得たものであることを示しており、任意の特定の方法により抗体を産生することを必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージ提示法及びヒト免疫グロブリン座の全て、または一部を含有する遺伝子導入動物を利用する方法が含まれるが、これらに限定されない様々な技術により作製されても良く、そのような方法及びモノクローナル抗体を作製する他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

【0090】

「裸抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識と複合していない抗体を指す。裸抗体は、薬学的製剤に存在しても良い。

【0091】

「未変性抗体」は、様々な構造の天然に生じる免疫グロブリン分子を指す。例えば、未変性IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。NからC末端において、各重鎖は、可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、その後3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）が続く。同様に、NからC末端において、各軽鎖は、可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、その後1つの定常軽（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つの種類のうちの1つに指定しても良い。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

「添付文書」という用語は、市販の治療製品の包装に慣用的に含まれる使用説明書を指すために使用され、適応症、用法、投与量、投与、併用療法、禁忌についての情報及び/またはそのような治療製品の使用に関する警告を含む。

【 0 0 9 3 】

基準ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性の率(%)」は、配列を整列し、必要であれば配列同一性の最大率を達成するため、ギャップを導入した後の、基準ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の百分率と定義され、保存的置換を配列同一性の一部として全く考慮しない。アミノ酸配列同一性の率を決定する目的の整列は、当該技術の技能の範囲内の様々な方法により、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公開されているコンピューターソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の完全長に対して最大限の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列するのに適切なパラメーターを決定することができる。しかし本明細書の目的において、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用して生成する。ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムは、Genentech, Inc.により作成され、ソースコードは米国著作権局(U.S. Copyright Office)、Washington D.C.、20559にユーザーマニュアルと共に出願されており、米国著作権登録番号(U.S. Copyright Registration No.) TXU510087により登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、South San Francisco、Californiaにより公開されている、またはソースコードからコンパイルしても良い。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムにおける使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムにより設定され、変更はない。

10

20

【 0 0 9 4 】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる場合、所定のアミノ酸配列Aと所定のアミノ酸配列Bとのアミノ酸配列同一性%(これを、所定のアミノ酸配列Bとある特定の%のアミノ酸配列同一性を有する、または含む所定のアミノ酸配列A、と言い換えることができる)は、以下のように計算される。

30

$$100 \times X / Y$$

ここで、Xは、配列整列プログラムALIGN-2により、A及びBのプログラム整列において完全一致したとスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBへのアミノ酸配列同一性の%は、BのAへのアミノ酸配列同一性の%とは等しくないことが理解される。特定の記述されない限り、本明細書に使用される全てのアミノ酸配列同一性%の値は、直前の段落に記載されたように、ALIGN-2コンピュータープログラムを使用して得られる。

40

【 0 0 9 5 】

「薬学的製剤」という用語は、含有された活性成分の生物学的活性が有効であることを許容するような形態である及び製剤が投与される対象に許容されない毒性がある追加の構成成分を含有しない、調合剤を指す。

【 0 0 9 6 】

「薬学的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である、薬学的製剤における活性成分以外の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 7 】

「赤血球凝集素」という用語は、本明細書に使用されるとき、特に示されない限り、任意のインフルエンザウイルス源からの任意の未変性赤血球凝集素を指す。この用語は、「

50

完全長」の未処理赤血球凝集素、ならびにインフルエンザウイルスまたはインフルエンザウイルス感染細胞における処理によってもたらされる任意の形態の赤血球凝集素を包含する。この用語は、赤血球凝集素の天然に生じる変種、例えばスプライス変種または対立遺伝子変種も包含する。様々な B 型インフルエンザウイルス株または系列からの例示的な赤血球凝集素タンパク質のアミノ酸配列は、当該技術において容易に入手可能である。

【0098】

本明細書に使用されるとき、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」などの文法的変形）は、治療される個体の自然の経過の変更を試みる臨床介入を指し、予防的に、または臨床病理の過程において、実施することができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防（例えば、B 型インフルエンザウイルス感染の発生または再発の予防）、症状の低減（例えば、減力）または軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、疾患進行速度の減少、疾患状態の寛解または緩和、及び寛解または改善された予後が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、本発明の抗体は、疾患の発生を遅延するため、または疾患の進行を緩徐するために使用される。

10

【0099】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合させることに関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。未変性抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VH 及び VL）は、一般に類似した構造を有し、各ドメインは、4 つの保存フレームワーク領域（FR）及び 3 つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照すること。）単一の VH または VL ドメインが、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。更に特定の抗原と結合する抗体を、抗原と結合する抗体の VH または VL ドメインを使用して単離して、相補的な VL または VH ドメインそれぞれのライブラリーを選別することができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150: 880 - 887 (1993); Clarkson et al., Nature 352: 624 - 628 (1991) を参照すること。

20

【0100】

「ベクター」という用語は、本明細書に使用されるとき、それが連結される別の核酸を伝播することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造のベクター、ならびに導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動可能に連結される核酸の発現を方向付けることが可能である。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

30

【0101】

II. 組成物及び方法

1 つの態様において、本発明は、抗赤血球凝集素抗体及びその使用に、部分的に基づいている。ある特定の実施形態において、赤血球凝集素に結合する抗体が提供される。本発明の抗体は、例えば、A 型インフルエンザウイルス感染の診断、治療または予防に有用である。

40

【0102】

A. 例示的な抗赤血球凝集素抗体

1 つの態様において、本発明は、赤血球凝集素に結合する単離抗体を提供する。ある特定の実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、赤血球凝集素と結合する、B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する、ヤマガタ系列の B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する、ピクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する、祖先系列の B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する、またはヤマガタ系列、ピクトリア系列及び祖先系列の B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と結合する。他の実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、B 型インフルエンザウイルスをインビトロにおいて中和する。他の実施形態において、本発明

50

の抗赤血球凝集素抗体は、B型インフルエンザウイルスをインビボにおいて中和する。なお他の実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、B型インフルエンザウイルス感染を低減する、B型インフルエンザウイルス感染を予防する、B型インフルエンザウイルス感染を阻害する、またはB型インフルエンザウイルス感染を治療する。幾つかの実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、インフルエンザウイルス膜と感染細胞エンドソーム膜との赤血球凝集素媒介融合を予防、阻害または低減する（したがって、感染細胞の細胞質へのウイルスRNA侵入を予防、阻害または低減し、したがって、インフルエンザウイルス感染の更なる伝播を予防、阻害または低減する）。

【0103】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

10

【0104】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

20

【0105】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0106】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

30

【0107】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(c)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。

【0108】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号59から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

40

【0109】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号59から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0110】

50

別の態様において、本発明は、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

【0111】

別の態様において、本発明は、配列番号 78、82 及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

【0112】

別の態様において、本発明は、配列番号 79 及び 83 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 78、82 及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0113】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 79 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0114】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 83 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 82 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0115】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 83 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 86 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0116】

別の態様において、本発明は、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体を提供する。

【0117】

別の態様において、本発明は、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体を提供する。

【0118】

別の態様において、本発明は、配列番号 81、85 及び 88 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 80、84 及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0119】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 81 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0120】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 85 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 84 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0121】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号 88 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0122】

1つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (f) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの HVR を含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

【0123】

1つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 及び (c) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VH HVR 配列を含む抗体を提供する。

【0124】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (c) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。

【0125】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (f) 配列番号 59 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - L3、を含む抗体を提供する。

10

【0126】

別の態様において、本発明は、配列番号 89 の酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

【0127】

別の態様において、本発明は、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

【0128】

1 つの実施形態において、本発明は、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

20

【0129】

1 つの実施形態において、本発明は、配列番号 90 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0130】

1 つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 67、68、69、70、71、72、73 及び 74 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、ならびに (f) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの HVR を含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

30

【0131】

1 つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 67 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (f) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの HVR を含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

【0132】

1 つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 68 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (f) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの HVR を含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

40

【0133】

1 つの態様において、本発明は、(a) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 及び (f) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 つの H

50

V Rを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

【0134】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

【0135】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

10

【0136】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

20

【0137】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

【0138】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5または6つのHVRを含む抗赤血球凝集素抗体を提供する。

30

【0139】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

40

【0140】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0141】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または

50

3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0142】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0143】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

10

【0144】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0145】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

20

【0146】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2及び(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。

【0147】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(c)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。

30

【0148】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0149】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

40

【0150】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0151】

50

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0152】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

10

【0153】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0154】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

20

【0155】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び(f)配列番号60から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗体を提供する。

【0156】

別の態様において、本発明は、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

30

【0157】

別の態様において、本発明は、配列番号91の酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

【0158】

別の態様において、本発明は、配列番号92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

40

【0159】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号92のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0160】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0161】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号97のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0162】

50

1つの実施形態において、本発明は、配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0163】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0164】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0165】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号105のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。 10

【0166】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号107のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号91のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体を提供する。

【0167】

別の態様において、本発明は、配列番号94、96、98、100、102、104、106及び108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体を提供する。

【0168】

別の態様において、本発明は、配列番号93の酸配列を含む軽鎖を含む抗体を提供する。 20

【0169】

別の態様において、本発明は、配列番号94、96、98、100、102、104、106及び108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0170】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号94のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0171】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号96のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。 30

【0172】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号98のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0173】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0174】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。 40

【0175】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号104のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0176】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号106のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0177】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号108のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体を提供する。

【0178】

上記の実施形態のいずれかにおいて、本発明の抗赤血球凝集素抗体はヒト化される。1つの実施形態において、抗赤血球凝集素抗体は、上記の実施形態のいずれかのようにHVRを含み、ヒト受容体フレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを更に含む。

【0179】

別の態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、配列番号79、83、89、92、95、97、99、101、103、105及び107からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVH配列は、基準配列と比べて置換(例えば、保存的置換)、挿入または欠失を含有するが、その配列を含む抗赤血球凝集素抗体は、赤血球凝集素に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸が、配列番号79、83、89、92、95、97、99、101、103、105または107において置換、挿入及び/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入または欠失は、HVRの外側(すなわち、FR内)の領域で生じる。場合により、抗赤血球凝集素抗体は、配列番号79、83、89、92、95、97、99、101、103、105または107にVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾も含まれる。

10

【0180】

別の態様において、抗赤血球凝集素抗体が提供され、ここで抗体は、配列番号78、82、86及び91からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)配列を含む。ある特定の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVL配列は、基準配列と比べて置換(例えば、保存的置換)、挿入または欠失を含有するが、その配列を含む抗赤血球凝集素抗体は、赤血球凝集素に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸が、配列番号78、82、86または91において置換、挿入及び/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入または欠失は、HVRの外側(すなわち、FR内)の領域で生じる。場合により、抗赤血球凝集素抗体は、配列番号78、82、86または91にVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾も含まれる。

20

30

【0181】

別の態様において、抗赤血球凝集素抗体が提供され、ここで抗体は、上記に提供された実施形態のいずれかのようなVH及び上記に提供された実施形態のいずれかのようなVLを含む。1つの実施形態において、抗体は、配列番号79、83、89、92、95、97、99、101、103、105または107及び配列番号78、82、86または91それぞれにVH及びVL配列を含み、これらの配列の翻訳後修飾も含まれる。

【0182】

更なる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号79のVH配列及び配列番号78のVL配列；配列番号83のVH配列及び配列番号82のVL配列；配列番号83のVH配列及び配列番号86のVL配列；配列番号89のVH配列及び配列番号78のVL配列；配列番号92のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号95のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号97のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号99のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号101のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号103のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号105のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号107のVH配列及び配列番号91のVL配列を含む抗赤血球凝集素抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

40

50

【0183】

本発明の更なる態様において、上記の実施形態のいずれかの抗赤血球凝集素抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。1つの実施形態において、抗赤血球凝集素抗体は、抗体フラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、二特異性抗体またはF(ab')₂フラグメントである。別の実施形態において、抗体は、完全長抗体、例えば無傷の、例えばIgG1抗体、または本明細書に定義されている他のクラス若しくはアイソタイプの抗体である。

【0184】

更なる態様において、上記の実施形態のいずれかにおける抗赤血球凝集素抗体は、下記のセクション1～7に記載されている特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込むことができる。

10

【0185】

1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nMまたは0.001 nM（例えば、10⁻⁸ M以下、例えば、10⁻⁸ M～10⁻¹³ M、例えば10⁻⁹ M～10⁻¹³ M）の解離定数（Kd）を有する。

【0186】

1つの実施形態において、Kdは、放射標識抗原結合アッセイ（RIA）により測定される。1つの実施形態において、RIAは、目的の抗体のFab型及びその抗原を用いて実施される。例えば、抗原へのFabの溶液結合親和性は、Fabを、最小濃度の（¹²⁵I）標識抗原と、非標識抗原の一連の滴定の存在下で平衡化し、次に抗Fab抗体被覆プレートにより、結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照すること）。アッセイの条件を確立するため、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、50 mMの炭酸ナトリウム中の捕捉抗Fab抗体（Cappel Labs）（pH 9.6）の5 μg/mlにより一晩被覆し、続いてPBS中の2%（w/v）ウシ血清アルブミンにより室温（およそ23）で2～5時間にわたって遮断する。非吸着プレート（Nunc #269620）において、100 pMまたは26 pMの[¹²⁵I]抗原を、目的のFabの段階希釈液と混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致している）。次に目的のFabを一晩インキュベートするが、インキュベーションは、より長時間（例えば、約65時間）にわたって続けて、平衡が達成されることを確実にしても良い。その後、混合物を、室温でのインキュベーション（例えば、1時間）のために捕捉プレートに移す。次に溶液を除去し、プレートを、PBS中0.1%のポリソルベート20（Tween-20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥すると、150 μl/ウェルのシンチラント（scintillant）（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を加え、プレートをTOPCOUNT（商標）ガンマ計数器（Packard）により10分間数える。20%以下の最大結合を与える濃度のFabが、それぞれ、競合結合アッセイにおける使用のために選択される。

20

30

40

【0187】

別の実施形態によると、Kdは、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000（Biacore, Inc., Piscataway, NJ）を使用するアッセイは、約10応答単位（RU）の固定化抗原CM5チップにより25で実施される。1つの実施形態において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）により、供給会社の使用説明書に従って活性化される。抗原は、5 μ

50

1 / 分の流速で注入される前に、共役タンパク質のおよそ 10 応答単位 (RU) を達成するため、10 mM の酢酸エチル、pH 4.8 により $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (約 $0.2 \mu\text{M}$) に希釈される。抗原を注入した後、1 M のエタノールアミンを注入して、未反応基を遮断する。動態測定のため、Fab の 2 倍段階希釈液 ($0.78 \text{ nM} \sim 500 \text{ nM}$) を、0.05 % ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤 (PBST) を有する PBS に、およそ $25 \mu\text{l} / \text{分}$ の流速により 25 で注入する。会合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) は、簡単な 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIAcore (登録商標)、Evaluation Software バージョン 3.2) を使用して、会合及び解離センサーグラムを同時に当てはめることにより計算される。平衡解離定数 (K_d) は、 K_{off} / k_{on} の比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照すること。上記の表面プラズモン共鳴アッセイにより、 k_{on} の速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える場合、 k_{on} の速度は、ストップフローを備えた分光光度計 (Aviv Instruments) または攪拌キュベットを有する 8000 シリーズの SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) などの分光計により測定して、増加濃度の抗原の存在下で PBS、pH 7.2 中における 20 nM の抗抗原抗体 (Fab 形態) の 25 での蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、帯域 16 nm) の増加または減少を測定する、蛍光消光技術を使用して決定することができる。

【0188】

2. 抗体フラグメント

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体フラグメントである。抗体フラグメントには、Fab、Fab'、Fab'-SH、 $F(ab')_2$ 、Fv 及び scFv フラグメント、ならびに下記に記載されている他のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体フラグメントについての総説は、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) を参照すること。scFv フラグメントについての総説は、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315 (1994) を参照すること。また、WO 93/16185、ならびに米国特許第 5,571,894 号及び同第 5,587,458 号を参照すること。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加したインビボ半減期を有する Fab 及び $F(ab')_2$ フラグメントの考察は、米国特許第 5,869,046 号を参照すること。

【0189】

二特異性抗体は、二価または二重特異性であり得る 2 つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えば、EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003); 及び Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448 (1993) を参照すること。三特異性抗体 (triabody) 及び四特異性抗体 (tetrabody) も、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) に記載されている。

【0190】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部分または軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部分を含む抗体フラグメントである。ある特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば米国特許第 6,248,516 B1 号を参照すること)。

【0191】

抗体フラグメントは、本明細書に記載されているように、無傷の抗体のタンパク質分解性消化、ならびに組み換え宿主細胞 (例えば、E. coli またはファージ) による産生が含まれるが、これらに限定されない様々な技術により作製することができる。

【0192】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号及びMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。1つの例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類から誘導される可変領域）及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスと変わっている「クラス切り替え」抗体である。キメラ抗体には、その抗体結合フラグメントが含まれる。

10

【0193】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体はヒト化されて、ヒトに対する免疫原性が低下するが、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持している。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（または、その一部分）が、非ヒト抗体から誘導され、FR（または、その一部分）がヒト抗体配列から誘導される、1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または改善するため、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が誘導される抗体）の対応する残基で置換される。

20

【0194】

ヒト化抗体及びそれらの作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に総説されており、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号及び同第7,087,409号; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)（特異性決定領域(SDR)移植について記載している）; Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)（「表面再建(resurfacing)」について記載している）; Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)（「FRシャフリング(shuffling)」について記載している）; ならびにOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005)及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)（FRシャフリングの「誘導選択(guided selection)」について記載している）に更に記載されている。

30

【0195】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「最良適合(best-fit)」法を使用して選択されるフレームワーク（例えば、Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)を参照すること）; ヒト抗体の特定の部分群の軽または重鎖可変領域のコンセンサス配列から誘導されるフレームワーク領域（例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)及びPresta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照すること）; ヒト成熟（体細胞性突然変異）フレームワーク領域またはヒト生殖系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照すること）; ならびにFRライブラリーを選別することにより誘導されるフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)及びRosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)を参照すること）が含まれるが、これらに限定されない。

40

50

【0196】

4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術に既知の様々な技術を使用して、または本明細書に記載されている技術を使用して、産生することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368 - 74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20: 450 - 459 (2008) に記載されている。

【0197】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答して無傷のヒト抗体またはヒト可変領域を有する無傷の抗体を産生するように修飾された遺伝子導入動物に投与することによって、調製され得る。そのような動物は、典型的にはヒト免疫グロブリン座の全て、または一部分を含有し、ヒト免疫グロブリン座は内在性免疫グロブリン座を交換する、または染色体外に存在する若しくは動物の染色体に無作為に組み込まれる。そのような遺伝子導入マウスにおいて、内在性免疫グロブリン座は、一般に不活性化されている。遺伝子導入動物からヒト抗体を得る方法についての総説は、Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117 - 1125 (2005) を参照すること。例えば、XENOMOUSE (商標) 技術を記載する米国特許第 6,075,181 号及び同第 6,150,584 号; HUMAB (登録商標) 技術を記載する米国特許第 5,770,429 号; K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載する米国特許第 7,041,870 号、ならびに VELOCIMOUSE (登録商標) 技術を記載する米国特許出願公開第 2007/0061900 号も参照すること。そのような動物により生成された無傷の抗体のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、更に修飾され得る。

【0198】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づいた方法によっても作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫 (heteromyeloma) 細胞系が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) を参照すること。) ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術により生成されたヒト抗体も、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557 - 3562 (2006) に記載されている。追加的な方法には、例えば、米国特許第 7,189,826 号 (ハイブリドーマ細胞系からのモノクローナルヒト IgM 抗体の産生について記載している) 及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265 - 268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマについて記載している) に記載されているものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術 (トリオーマ (trioma) 技術) も、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3): 927 - 937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3): 185 - 91 (2005) に記載されている。

【0199】

ヒト抗体は、ヒト誘導ファージ提示ライブラリーから選択される Fv クローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。次にそのような可変ドメイン配列を、所望のヒト定常ドメインと組み合わせても良い。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択する技術は、下記に記載される。

【0200】

5. ライブラリー誘導抗体

本発明の抗体は、所望の活性（複数可）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーを選別することによって単離され得る。例えば、ファージ提示ライブラリーを生成する及びそのようなライブラリーを、所望の結合性を有する抗体について選別する様々な方法が、当該技術において知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboomらにより、Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) において総説されており、例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, Methods in Molecular Biology 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); 及び Lee et al., J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004) において更に記載されている。

10

20

30

40

【0201】

ある特定のファージ提示方法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により別々にクローンし、ファージライブラリーにおいて無作為に組み合わせ、次にこれらを、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994) に記載されているように、抗原結合ファージについて選別することができる。ファージは、典型的には抗体フラグメントを、単鎖Fv (scFv) フラグメントまたはFabフラグメントのいずれかとして提示する。免疫化された供給源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対して高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993) に記載されているように、未変性のレパートリーをクローンして（例えば、ヒトから）、任意の免疫化を行うことなく、広範囲の非自己、また自己抗原に対して抗体の単一供給源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992) に記載されているように、幹細胞の非再編成V遺伝子セグメントをクローンし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して、高度に可変性のCDR3領域をコードし、インピットロで再編成を達成することによって、ナイーブラライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公報には、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号及び同第2009/0002360号が含まれる。

【0202】

ヒト抗体ライブラリーから単離される抗体または抗体フラグメントは、本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体フラグメントと考慮される。

【0203】

6. 多特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、結合特異性の一方は、赤血球凝集素に対してであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施

50

形態において、二重特異性抗体は、赤血球凝集素の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体は、また、赤血球凝集素を発現する細胞に細胞傷害剤を局在させるために使用しても良い。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体フラグメントとして調製することができる。

【0204】

多特異性抗体を作製する技術には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖軽鎖対の組み換え同時発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、WO93/08829及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照すること)、ならびに「ノブ・イン・ホール (knob-in-hole)」技術 (例えば、米国特許第5,731,168号を参照すること)が含まれるが、これらに限定されない。多特異性抗体は、静電的操縦効果を操作して抗体Fcヘテロ二量体分子を作製する (WO2009/089004A1)、2つ以上の抗体またはフラグメントを架橋する (例えば、米国特許第4,676,980号及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照すること)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生する (例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992)を参照すること)、「二特異性抗体」技術を使用して二重特異性抗体フラグメントを作製する (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)を参照すること)、単鎖Fv (sFv) 二量体を使用する (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)を参照すること)、ならびに例えばTutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように三重特異性 (trispesific) 抗体を調製することによっても作製され得る。

【0205】

「タコ型抗体 (Octopus antibody)」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する改変抗体も、本明細書に含まれる (例えば、US2006/0025576A1を参照すること)。

【0206】

本明細書の抗体またはフラグメントには、赤血球凝集素のみならず、別の異なる抗原にも結合する抗原結合部位を含む「二重作用Fab」または「DAF」も含まれる (例えば、US2008/0069820を参照すること)。

【0207】

7. 抗体変種

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変種が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変種は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列に導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内からの欠失、及び/またはアミノ酸配列内への挿入、及び/またはアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせを実施して、最終構築物を得ることができるが、但し、最終構築物が所望の特徴、例えば抗原結合を有することが条件である。

【0208】

a) 置換、挿入及び欠失変種

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変種が提供される。置換突然変異誘発の目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換が、「好ましい置換」の見出しで表1に示されている。より実質的な変化が、「例示的置換」の見出しで表1に提示されており、アミノ酸側鎖クラスを参照しながら下記に更に記載される。アミノ酸置換が、目的の抗体に導入され、生成物が、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、またはADCC若しくはCDCの改善について選別され得

る。

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【0209】

アミノ酸は、共通の側鎖特性によって分類され得る。

- (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性: Asp、Glu;
- (4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

40

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必然的に伴う。

【0210】

1つの種類の置換変種は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、更なる研究のための選択によって得られた変種（

50

複数可)は、親抗体と比べて特定の生物学的特性に修飾(例えば改善)(例えば、親和性の増加、免疫原性の低減)を有する、及び/または親抗体のある特定の生物学的特性を保持する。例示的な置換変種は親和性成熟抗体であり、これは、例えば本明細書に記載されているものなどのファージ提示に基づいた親和性成熟技術を使用して、都合良く生成され得る。簡潔には、1つ以上のHVR残基が突然変異され、変種抗体がファージに提示され、特定の生物学的活性(例えば、結合親和性)について選別される。

【0211】

変更(例えば、置換)を、例えば、抗体親和性を改善するためにHVRに行っても良い。そのような変更を、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程において高い頻度で突然変異を受けるコドンによりコードされる残基(例えば、Chowdhury、Methods Mol. Biol. 207:179-196(2008)を参照すること)及び/または抗原に接触する残基において行っても良く、得られる変種VHまたはVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリーから構築及び再選択される親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ(2001))に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施形態において、多様性が、様々な方法(例えば、エラープローン(error-prone)PCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発)のいずれかによって、成熟について選択された様々な遺伝子に導入される。次に二次ライブラリーが作り出される。次にライブラリーは、所望の親和性を有する任意の抗体変種を特定するために選別される。多様性を導入する別の方法は、幾つかのHVR残基(例えば、一度に4~6個の残基)が無作為化されるHVR指定手法を伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング(scanning)突然変異誘発またはモデル化を使用して、特異的に特定しても良い。特にCDR-H3及びCDR-L3は、多くの場合に標的になる。

【0212】

ある特定の実施形態において、置換、挿入または欠失は、そのような変更が、抗原と結合する抗体の能力を実質的に低減しない限り、1つ以上のHVR内に生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的変更(例えば、本明細書に提供されている保存的置換)を、HVRに行っても良い。そのような変更は、例えば、HVRの残基と接触している抗原の外側であっても良い。上記に提供された変種VH及びVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、変更されていない、または1、2若しくは3個以下のアミノ酸置換を含有する。

【0213】

突然変異誘発の標的になり得る抗体の残基または領域を特定する有用な方法は、Cunningham and Wells(1989)Science, 244:1081-1085により記載されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または一群の標的残基(例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基)を特定し、中性または陰性荷電アミノ酸(例えば、アラニンまたはポリアラニン)に代えて、抗体と抗原の相互作用に影響を与えるかを決定する。最初の置換に機能的な感受性を示すアミノ酸位置に、更なる置換を導入しても良い。代替的または追加的には、抗体と抗原の接触点を特定する、抗原抗体複合物の結晶構造。そのような接触残基及び隣接残基を、置換の候補として標的にしても、または排除しても良い。変種を選別して、所望の特性を含有しているかを決定しても良い。

【0214】

アミノ酸配列挿入物には、1個の残基の長さから百個以上の残基を含有するポリペプチドの長さの範囲のアミノ及び/またはカルボキシル末端融合物、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が含まれる。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変種には、抗体のN若しくはC末端を酵素に融合したもの(例えば、ADEPT)、または抗体の血清半減期を増加するポリペプチ

ドが含まれる。

【0215】

b) グリコシル化変種

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少するように変更される。抗体のグリコシル化部位の付加または欠失は、アミノ酸配列を、1個以上のグリコシル化部位が作り出される、または除去されるようにアミノ酸配列を変更することによって都合良く達成され得る。

【0216】

抗体がFc領域を含む場合、結合している炭水化物が変更され得る。哺乳類細胞により産生される未変性抗体は、一般にはFc領域のCH2ドメインのAsn297にN連結により結合している、典型的には、分岐した二分岐鎖オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照すること。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース及びシアル酸、ならびに二分岐鎖オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合しているフコースが含まれ得る。幾つかの実施形態において、本発明の抗体のオリゴ糖における修飾は、ある特定の改善された特性を有する抗体変種を作り出すために行う場合がある。

【0217】

1つの実施形態において、Fc領域に(直接的または間接的に)結合したフコースを欠いている炭水化物構造を有する抗体変種が、提供される。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えばWO2008/077546に記載されているように、MALDI-TOF質量分析により測定して、Asn297に結合した全ての糖構造(glycostructure)(例えば、複合物、ハイブリッド及び高マンノース構造)の合計に対する、Asn297の糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域のおよそ297位(Fc領域残基のEU番号付け)に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297は、297位から上流または下流に約±3個のアミノ酸、すなわち抗体における僅かな配列差異に起因して294~300位の間に位置する場合もある。そのようなフコシル化変種は、改善されたADCC機能を有する場合がある。例えば、米国特許公開第2003/0157108号(Presta, L.)、同第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)を参照すること。「脱フコシル化」または「フコース欠乏」抗体変種に関する公報の例には、US2003/0157108; WO2000/61739; WO2001/29246; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamané - Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)が含まれる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞系の例には、タンパク質フコシル化が欠けているLec13 CHO細胞(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)); 米国特許出願第2003/0157108A1号、Presta, L.; 及びWO2004/056312A1、Adamsら、とりわけ実施例11)、ならびにアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞系(例えば、Yamané - Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)); 及びWO2003/085107を参照すること)が含まれる。

10

20

30

40

50

【0218】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐鎖オリゴ糖がGlcNAcにより二分されている、二分されたオリゴ糖を有する抗体変種が更に提供される。そのような抗体変種は、低減したフコシル化及び/または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体変種の例は、例えば、WO2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら) 及びUS2005/0123546 (Umanaら) に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖に少なくとも1個のガラクトース残基を有する抗体変種も、提供される。そのような抗体変種は、改善されたCDC機能を有する場合がある。そのような抗体変種は、例えば、WO1997/30087 (Patelら)、WO1998/58964 (Raju, S.) 及びWO1999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

10

【0219】

c) Fc領域変種

ある特定の実施形態において、1個以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによってFc領域変種を生成し得る。Fc領域変種は、1個以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域) を含み得る。

【0220】

ある特定の実施形態において、本発明は、エフェクター機能の、全てではないが幾つかを有する抗体変種を企図し、これは、抗体のインビボでの半減期が重要であるが、ある特定のエフェクター機能 (例えば、補体及びADCC) が不必要である、または有害である用途に、抗体変種を望ましい候補にする。インビトロ及び/またはインビボ細胞傷害アッセイを実施して、CDC及び/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを実施して、抗体はFcγR結合を欠いている (したがって、恐らくADCC活性を欠いている) が、FcRn結合能を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介する一次細胞のNK細胞は、FcγRIIIのみを発現し、一方、単球は、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991) の464頁の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986) を参照すること) 及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985); 同第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987) を参照すること) に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いても良い (例えば、フローサイトメリーのACTI (商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA.) 及びCytotox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照すること)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代替的または追加的に、目的の分子のADCC活性をインビボにおいて、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998) に開示されているような動物モデルにおいて評価しても良い。またC1q結合アッセイを実施して、抗体がC1qと結合できないこと、したがってCDC活性を欠いていることを確認しても良い。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402のC1q及びC3c結合ELISAを参照すること。補体活性化を評価するため、CDCアッセイを実施しても良い (例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-10

20

30

40

50

52 (2003) ; 及び Cragg , M . S . and M . J . Glennie , Blood 103 : 2738 - 2743 (2004) を参照すること)。FcRn 結合及びインビボクリアランス / 半減期の決定も、当該技術に既知の方法を使用して決定することもできる (例えば、Petkova , S . B . et al . , Int ' l . Immunol . 18 (12) : 1759 - 1769 (2006) を参照すること)。

【0221】

低減されたエフェクター機能を有する抗体には、Fc 領域残基 238、265、269、270、297、327 及び 329 の 1 個以上の置換を有するものが含まれる (米国特許第 6 , 737 , 056 号)。そのような Fc 突然変異体には、残基 265 及び 297 がアラニンに置換されている、いわゆる「DANA」Fc 突然変異体 (米国特許第 7 , 332 , 581 号) を含む、アミノ酸位置 265、269、270、297 及び 327 の 2 個以上に置換を有する Fc 突然変異体が含まれる。

10

【0222】

FcR への改善または縮小された結合を有する、ある特定の抗体変種が記載されている。(例えば、米国特許第 6 , 737 , 056 号、WO2004 / 056312 及び Shields et al . , J . Biol . Chem . 9 (2) : 6591 - 6604 (2001) を参照すること。)

【0223】

ある特定の実施形態において、抗体変種は、ADCC を改善する 1 個以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の位置 298、333 及び / または 334 (残基の EU 番号付け) に置換を有する Fc 領域を含む。

20

【0224】

幾つかの実施形態において、例えば、米国特許第 6 , 194 , 551 号、WO99 / 51642 及び Idusogie et al . J . Immunol . 164 : 4178 - 4184 (2000) に記載されているように、変更された (すなわち、改善若しくは縮小された) C1q 結合及び / または補体依存性胞傷害 (CDC) をもたらす変更が、Fc 領域において行われる。

【0225】

増加した半減期及び新生児 Fc 受容体 (FcRn) への改善された結合を有する抗体は、母系 IgG の胎児への移行に關与し (Guyer et al . , J . Immunol . 117 : 587 (1976) 及び Kim et al . , J . Immunol . 24 : 249 (1994))、US2005 / 0014934 A1 (Hinton ら) に記載されている。これらの抗体は、FcRn への Fc 領域の結合を改善する 1 個以上の置換を有する Fc 領域を含む。そのような Fc 変種には、Fc 領域残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 または 434 の 1 個以上に置換を有するもの、例えば、Fc 領域残基 434 の置換を有するもの (米国特許第 7 , 371 , 826 号) が含まれる。

30

【0226】

Fc 領域変種の他の例については、Duncan & Winter , Nature 322 : 738 - 40 (1988) ; 米国特許第 5 , 648 , 260 号 ; 米国特許第 5 , 624 , 821 号 ; 及び WO94 / 29351 も参照すること。

40

【0227】

d) システイン改変抗体変種

ある特定の実施形態において、抗体の 1 個以上の残基がシステイン残基に置換されているシステイン改変抗体、例えば「チオMAb」を作り出すことが、望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換残基は、抗体の利用可能な部位において生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、抗体の利用可能な部位に位置付けられ、抗体を薬物部分またはリンカー薬物部分などの他の部分に複合して、本明細書に更に記載されている免疫複合体を作り出すために使用され得る。ある特定の実施

50

形態において、以下の 1 個以上の残基をシステインにより置換しても良い。Fc 領域の軽鎖の V205 (Kabata 番号付け)、重鎖の A118 (EU 番号付け) 及び重鎖の S400 (EU 番号付け)。システイン改変抗体は、米国特許第 7,521,541 号に記載されているように生成しても良い。

【0228】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体を、当該技術において既知であり、容易に利用可能な追加の非タンパク質性部分を含むように更に修飾しても良い。抗体の誘導体化に適した部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定例には、ポリエチレングリコール (PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、デキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中安定性のため製造に有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量であっても良く、分岐鎖または非分岐鎖であっても良い。抗体に結合しているポリマーの数は変わっても良く、1つを超えるポリマーが結合している場合、これらは同一または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、抗体誘導体が、確定された条件下で治療に使用される等に関わらず、改善される抗体の特定の特性または機能が含まれるが、これらに限定されない考慮に基づいて決定することができる。

【0229】

別の実施形態において、抗体と、放射線への曝露により選択的に加熱され得る非タンパク質性部分との複合体が、提供される。1つの実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長であっても良く、通常の細胞は傷つけないが、非タンパク質性部分を、抗体非タンパク質性部分の近位の細胞を死滅させる温度まで加熱する波長が含まれるが、これに限定されない。

【0230】

B. 組み換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第 4,816,567 号に記載されているように、組み換え方法及び組成物を使用して産生され得る。1つの実施形態において、本明細書に記載されている抗赤血球凝集素抗体をコードする単離核酸が、提供される。そのような核酸は、抗体の VL を含むアミノ酸配列及び/または VH を含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽及び/または重鎖) をコードし得る。更なる実施形態において、そのような核酸を含む 1 個以上のベクター (例えば、発現ベクター) が提供される。更なる実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのそのような実施形態において、宿主細胞は、(1) 抗体の VL を含むアミノ酸配列及び抗体の VH を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または (2) 抗体の VL を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 1 のベクター及び抗体の VH を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 2 のベクター、を含む (例えば、によって形質転換されている)。1つの実施形態において、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはリンパ球系細胞 (例えば、Y0、NS0、Sp20 細胞) である。1つの実施形態において、抗赤血球凝集素抗体を作製する方法であって、上記に提供された、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養し、場合により、抗体を宿主細胞 (または、宿主細胞培養培地) から回収することを含む方法が、提供される。

【0231】

抗赤血球凝集素抗体の組み換え産生では、例えば上記に記載された、抗体をコードする核酸を単離し、宿主細胞における更なるクローニング及び／または発現のために、1個以上のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）容易に単離及び配列決定され得る。

【0232】

抗体コードベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載されている原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合に、細菌において産生され得る。細菌における抗体フラグメント及びポリペプチドの発現は、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号及び同第5,840,523号を参照すること。（*E. coli*における抗体フラグメントの発現を記載している、Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照すること。）発現した後、抗体を細菌細胞ペーストから可溶性画分に単離しても良く、更に精製することができる。

10

【0233】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母菌などの真核微生物が、抗体コードベクターのクローニングまたは発現宿主に適しており、グリコシル化経路が「ヒト化」されて、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす真菌及び酵母菌株が含まれる。Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004) 及び Li et al., *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006) を参照すること。

20

【0234】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫の細胞が含まれる。特に *Spodoptera frugiperda* 細胞の形質移入のため、昆虫細胞と一緒に使用され得る多数のパキウウイルス株が特定されている。

30

【0235】

植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号及び同第6,417,429号（遺伝子導入植物における抗体産生のPLANTIBODIES（商標）技術を記載する）を参照すること。

【0236】

脊椎動物細胞も、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中に増殖するように適合された哺乳類細胞系は、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞系の他の例は、SV40 (COS-7) により形質転換されたサル腎臓CV1系；ヒト胎児肝臓系（例えば、Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977) に記載されている293または293細胞）；子ハムスター腎細胞 (BHK)；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980) に記載されているTM4細胞）；サル腎細胞 (CV1)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)；イヌ腎細胞 (MDCK)；バッファロー (buffalo) ラット腎細胞 (BRL 3A)；ヒト肺細胞 (W138)；ヒト腎細胞 (Hep G2)；マウス乳房腫瘍 (MMT 060562)；例えば、Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982) に記載されているTRI細胞；MRC 5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳類細胞系には、DHFR⁻ CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)) ならびにY0、NS0及びSp2/0などの骨髓腫細胞

40

50

系が含まれる。抗体産生に適した、ある特定の哺乳類宿主細胞系の総説には、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255 - 268 (2003) を参照すること。

【0237】

C. アッセイ

本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体は、当該技術に既知の様々なアッセイにより物理的 / 化学的特性及び / または生物学的活性について特定、選別または特徴決定され得る。

【0238】

10

1. 結合アッセイ及び他のアッセイ

1つの態様において、本発明の抗体は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット等などの既知の方法により、抗原結合活性について試験される。

【0239】

別の態様において、競合アッセイを使用して、赤血球凝集素の結合について本明細書に記載されている任意の抗赤血球凝集素抗体と競合する抗体を特定しても良い。ある特定の実施形態において、そのような競合抗体は、本明細書に記載されている抗赤血球凝集素抗体（例えば、配列番号79のVH配列及び配列番号78のVL配列；配列番号83のVH配列及び配列番号82のVL配列；配列番号83のVH配列及び配列番号86のVL配列；配列番号89のVH配列及び配列番号78のVL配列；配列番号92のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号95のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号97のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号99のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号101のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号103のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号105のVH配列及び配列番号91のVL配列；配列番号107のVH配列及び配列番号91のVL配列を含む抗赤血球凝集素抗体）が結合している同じエピトープ（例えば、直線状または立体構造エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングする例示的な詳細な方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。

20

30

【0240】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化赤血球凝集素は、赤血球凝集素に結合する第1の標識抗体及び赤血球凝集素への結合を第1の抗体と競合する能力が試験される第2の非標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上澄みに中に存在しても良い。対照として、固定化赤血球凝集素は、第1の抗体を含むが、第2の抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。赤血球凝集素への第1の抗体の結合に許容的な条件下でインキュベートした後、過剰な非結合抗体を除去し、固定化赤血球凝集素と会合した標識の量を測定する。固定化赤血球凝集素と会合した標識の量が、対照試料と比べて試験試料において実質的に低減している場合、このことは、第2の抗体が赤血球凝集素への結合を第1の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照すること。

40

【0241】

2. 活性アッセイ

1つの態様において、生物学的活性を有する抗赤血球凝集素抗体及びそのフラグメントを特定するアッセイが、提供される。生物学的活性には、例えば、B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素への特異的結合、B型インフルエンザウイルスの中和等が含まれ得る。抗体、ならびにそのような生物学的活性をインビボ及び / 若しくはインビトロで有する抗体またはそのフラグメントを含む組成物も、提供される。

50

【0242】

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、そのような生物学的活性について試験される。そのようなアッセイの例示的な記載について、実施例3～16を参照すること。

【0243】

D. 免疫複合体

本発明は、化学療法剤若しくは薬、増殖阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物若しくは動物由来の酵素活性毒素、またはこれらのフラグメント）、あるいは放射性同位体などの、1つ以上の細胞傷害剤と複合している、本明細書の抗赤血球凝集素抗体を含む免疫複合体も、提供する。

【0244】

1つの実施形態において、免疫複合体は、抗体が、マイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号及び欧州特許第0425235B1号を参照すること）；モノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDF（MMAE及びMMAF）などのアウリスタチン（米国特許第5,635,483号、同第5,780,588号及び同第7,498,298号を参照すること）；ドラスタチン；カリチアマイシンまたはその誘導体（米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号及び同第5,877,296号；Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)；及びLode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)を参照すること）；ダウノマイシンまたはドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)；King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)；及び米国特許第6,630,579号を参照すること）；メトトレキセート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル（larotaxel）、テセタキセル（tesetaxel）及びオルタタキセル（ortataxel）などのタキサン；トリコテシン；ならびにCC1065が含まれるが、これらに限定されない1つ以上の薬物と複合している、抗体薬物複合体（ADC）である。

【0245】

別の実施形態において、免疫複合体は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、菌体外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*のもの）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシン（modeccin）A鎖、アルファ-サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPI I及びPAP-S）、*Momordica charantia*阻害剤、クルシン（curcin）、クロチン（crotin）、*Saponaria officinalis*阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restriktocin）、フェノマイシン（phenomycin）、ネオマイシン、ならびにトリコテシンが含まれるが、これらに限定されない酵素活性毒素またはそのフラグメントに複合した、本明細書に記載されている抗体を含む。

【0246】

別の実施形態において、免疫複合体は、放射性原子に複合して放射性複合体（radioconjugate）を形成する、本明細書に記載されている抗体を含む。様々な放射性同位体が、放射性複合体の産生に利用可能である。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I

10

20

30

40

50

¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、²¹¹Pb及び¹⁷⁷Luの放射性同位体が含まれる。放射性複合体が検出に使用されるとき、シンチグラフィ検査に放射性原子、例えば、核磁気共鳴(NMR)画像化(磁気共鳴画像化、MRIとしても知られている)に¹²⁵I若しくは¹²³I、または、ここでもヨウ素-¹²³I、ヨウ素-¹³¹I、インジウム-¹¹¹I、フッ素-¹⁹F、炭素-¹³C、窒素-¹⁵N、酸素-¹⁷O、ガドリニウム、マンガン若しくは鉄などのスピン標識を含む場合がある。

【0247】

抗体と細胞傷害剤との複合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、アジブイミド酸ジメチルHCL)、活性エステル(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して、作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体への放射性ヌクレオチド(radionucleotide)の複合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照すること。リンカーは、細胞中の細胞傷害薬の放出を推進する「切断可能リンカー」であり得る。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 米国特許第5,208,020号)を使用しても良い。

【0248】

本明細書の免疫複合体またはADCは、(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.Aから)市販されているBMP S、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC及びスルホ-SMPB、ならびにSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)が含まれるが、これらに限定されない架橋試薬により調製される複合体を明確に企図するが、そのような複合体に限定されない。

【0249】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される任意の抗赤血球凝集素抗体は、生物学的試料中の赤血球凝集素またはB型インフルエンザウイルスの存在を検出するのに有用である。「検出すること」という用語は、本明細書に使用されるとき、定量的または定性的検出を包含する。ある特定の実施形態において、生物学的試料は、例えば、肺、上気道、鼻腔、血液、痰などの細胞若しくは組織を含む、または鼻若しくは咽頭の拭き取りにより得られた生物学的試料を含む。

【0250】

1つの実施形態において、診断または検出の方法に使用される抗赤血球凝集素抗体が提供される。更なる態様において、生物学的試料中の赤血球凝集素またはB型インフルエンザウイルスの存在を検出する方法が、提供される。ある特定の実施形態において、方法は、生物学的試料を、本明細書に記載されている抗赤血球凝集素抗体と、赤血球凝集素への抗赤血球凝集素抗体の結合を許容する条件下で接触させること、ならびに複合物が抗赤血球凝集素抗体及び赤血球凝集素により形成されるかを検出することを含む。そのような方

法は、インビトロ、またはインビボ方法であり得る。1つの実施形態において、抗赤血球凝集素抗体は、例えば、赤血球凝集素が患者の選択バイオマーカーである、抗赤血球凝集素抗体による療法に適格な患者を選択するために使用される。

【0251】

本発明の抗体を使用して診断され得る障害の例には、小児、幼児、成人及び高齢者におけるB型インフルエンザウイルス感染を含む、A型インフルエンザウイルス感染が含まれる。

【0252】

ある特定の実施形態において、標識された抗赤血球凝集素抗体が提供される。標識には、直接的に検出される標識または部分（例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光及び放射性標識）、ならびに間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用を介して検出される、酵素またはリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、放射性アイソトープ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I、希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどの蛍光団、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラー及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ホースラデッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼ、HRP、ラクトペルオキシダーゼまたはマイクロペルオキシダーゼ（microperoxidase）などの色素前駆体を酸化する過酸化水素を用いる酵素と共役したものの、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定したフリーラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。

【0253】

F. 薬学的製剤

本明細書に記載されている抗赤血球凝集素抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するそのような抗体を、任意の1つ以上の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合して、凍結乾燥製剤または水性液剤の形態に調製される。薬学的に許容される担体は、用いられる投与量及び濃度で受容者に対して一般に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物；ヘキサメトニウム塩化物；ベンザルコニウム塩化物；ベンゼトニウム塩化物；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10個未満の残基）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；単糖、二糖及びグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合物（例えば、Znタンパク質複合物）；ならびに/あるいはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体には、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）などの間質薬物分散剤、例えばrHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質が、更に含まれる。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なSHASEGP及び使用法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。1つの態様において、SHASE

G P は、コンドロイチナーゼなどの 1 つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0254】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6,267,958 号に記載されている。水性抗体製剤には、米国特許第 6,171,586 号及び WO 2006/044908 に記載されているものが含まれ、後者の製剤は、ヒスチジン酢酸塩緩衝液を含む。

【0255】

本明細書の製剤は、また、治療される特定の適応症のために必要であれば 1 つを超える活性成分を、好ましくは互いに有害な影響を与えない相補的活性を有するものを、含有しても良い。例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤、抗赤血球凝集素抗体、抗 M2 抗体等を更に提供することが望ましい場合がある。そのような活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせられて、適切に存在する。

【0256】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されたマイクロカプセルに、例えば、コロイド薬物送達系（例えば、リボソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおいて、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルにそれぞれ閉じ込められていても良い。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0257】

持続放出調合剤が調製され得る。持続放出調合剤の適切な例には、抗体を含有する疎水性固体ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは造形物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

【0258】

インビボ投与に使用される製剤は、一般に滅菌されている。滅菌は、例えば、滅菌濾過膜を介する濾過によって、容易に達成され得る。

【0259】

G. 治療方法及び組成物

本明細書に提供される任意の抗赤血球凝集素抗体は、治療方法に使用され得る。

【0260】

1 つの態様において、医薬として使用される抗赤血球凝集素抗体が提供される。更なる態様において、B 型インフルエンザウイルス感染の治療、予防または阻害に使用される抗赤血球凝集素抗体が提供される。ある特定の実施形態において、治療の方法に使用される抗赤血球凝集素抗体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、有効量の抗赤血球凝集素抗体を個体に投与することを含む、B 型インフルエンザウイルス感染を有する個体を治療する方法に使用される抗赤血球凝集素抗体を提供する。1 つのそのような実施形態において、方法は、例えば下記に記載される、少なくとも 1 つの追加の治療剤の有効量を、個体に投与することを更に含む。更なる実施形態において、本発明は、B 型インフルエンザウイルス膜と感染細胞エンドソーム膜との赤血球凝集素媒介融合を予防、阻害または低減し、したがって、感染細胞細胞質へのウイルス RNA の侵入を予防し、感染の更なる伝播を予防するための、抗赤血球凝集素抗体の使用を提供する。ある特定の実施形態において、本発明は、B 型インフルエンザウイルス感染を予防、阻害または治療する有効量の抗赤血球凝集素抗体を個体に投与することを含む、B 型インフルエンザウイルス感染を個体において予防、阻害または治療する方法に使用される抗赤血球凝集素抗体を提供する。上記のいずれかの実施形態における「個体」は、好ましくは、ヒトである。

【0261】

更なる態様において、本発明は、医薬の製造または調製における抗赤血球凝集素抗体の使用を提供する。1 つの実施形態において、医薬は B 型インフルエンザウイルス感染の治療用である。更なる実施形態において、医薬は、有効量の医薬を、B 型インフルエンザウ

イルス感染を有する個体に投与することを含む、B型インフルエンザウイルス感染を治療する方法に使用される。1つのそのような実施形態において、方法は、例えば下記に記載される、少なくとも1つの追加の治療剤の有効量を、個体に投与することを更に含む。更なる実施形態において、医薬は、B型インフルエンザウイルス膜と感染細胞エンドソーム膜との赤血球凝集素媒介融合を予防、阻害または低減し、したがって、感染細胞細胞質へのウイルスRNAの侵入を予防し、感染の更なる伝播を予防する。更なる実施形態において、医薬は、B型インフルエンザウイルス感染を予防、阻害または低減する有効量の医薬を個体に投与することを含む、B型インフルエンザウイルス感染を個体において予防、阻害または治療する方法に使用される。上記のいずれかの実施形態における「個体」は、ヒトであり得る。

10

【0262】

更なる態様において、本発明は、B型インフルエンザウイルス感染を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、方法は、そのようなB型インフルエンザウイルス感染を有する個体に、有効量の抗赤血球凝集素抗体を投与することを含む。1つのそのような実施形態において、方法は、本明細書に記載される、少なくとも1つの追加の治療剤の有効量を、個体に投与することを更に含む。上記のいずれかの実施形態における「個体」は、ヒトであり得る。

【0263】

本発明は、個体（例えば、対象または患者）においてB型インフルエンザウイルス感染を阻害、予防または治療するのに有効な抗赤血球凝集素抗体を提供する。幾つかの態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、個体のB型インフルエンザウイルス感染を予防するため、個体を予防的に治療することに有効である。

20

【0264】

幾つかの態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による治療に適した個体は、B型インフルエンザウイルス感染を有する、または有すると疑われた個体である。幾つかの実施形態において、そのような個体には、幼児、小児、成人及び高齢者が含まれる。幾つかの実施形態において、個体はB型インフルエンザウイルス感染により入院している。他の実施形態において、B型インフルエンザウイルス感染を有する個体は、例えば、免疫不全、妊娠、肺疾患、心臓疾患、腎臓疾患または同時感染（例えば、細菌性若しくはウイルス性肺炎などの細菌感染若しくはウイルス感染）などの1つ以上の共存症を有する。

30

【0265】

幾つかの態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による個体の治療は、B型インフルエンザウイルス感染の重篤度を低減する、B型インフルエンザウイルス感染の長さを低減する、またはB型インフルエンザウイルスの感染力を低減する。他の態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体によるB型インフルエンザウイルス感染の治療は、入院期間の低減、集中治療室（ICU）を使用する必要性の低減または予防、補助または機械換気の必要性の低減または予防、酸素補給を使用する必要性の低減または予防、及び死亡率の低減を含む、追加的な利益を提供する。幾つかの実施形態において、入院期間の低減は、1日、2日、3日、4日、5日または5日以上である。幾つかの実施形態において、集中治療室を使用する必要性の低減は、1日、2日、3日、4日、5日または5日以上である。幾つかの実施形態において、補助または機械換気の必要性の低減は、1日、2日、3日、4日、5日または5日以上である。幾つかの実施形態において、酸素補給の必要性の低減は、1日、2日、3日、4日、5日または5日以上である。幾つかの態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による個体の治療は、例えば、発熱、鼻感冒、悪寒、咽頭炎、筋肉痛、身体痛、頭痛、咳、鼻閉、脱力感または疲労感、眼刺激または涙目及び全身の不快感などの、B型インフルエンザウイルス感染の疾患症状を低減する。

40

【0266】

幾つかの実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による個体の治療は、呼吸数が正常化するまでの時間の低減または酸素飽和度が正常化するまでの時間の低減などの、呼吸機能が正常化するまでの時間を低減する。幾つかの態様において、本発明の抗赤血球

50

凝集素抗体による個体の治療は、正常な酸素飽和度に、例えば、酸素補給投与を行うことなく24時間にわたって測定して、約92%以上の酸素飽和度に戻るまでの時間を低減する。他の態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による個体の治療は、心拍数、血圧、呼吸数及び体温などの生命徴候が正常化するまでの時間を低減する。

【0267】

幾つかの態様において、本発明の抗赤血球凝集素抗体による個体の治療は、例えばインフルエンザウイルス力価などのウイルス学的終点を改善する。ウイルス力価は、例えばqPCRまたは組織培養感染量(TCID₅₀)で測定した、例えばウイルス曲線下面積(AUC)などの、当業者に既知の様々な方法によって測定することができる。幾つかの態様において、治療は、qPCRまたはTCID₅₀により測定して、ウイルスAUCに50%以上の低減をもたらす。

10

【0268】

本発明の様々な態様において、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体は、症状の発症(例えば、疾病の発症)の約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間、約72時間、約84時間及び約96時間後に投与されたとき、B型インフルエンザウイルス感染を治療するのに有効である。他の態様において、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体は、症状の発症後の約24時間~48時間に投与されたとき(例えば、個体が24~48時間にわたって症状を示しているとき)、症状の発症後の約48時間~72時間に投与されたとき、または症状の発症後の約72時間~96時間に投与されたとき、B型インフルエンザウイルス感染を治療するのに有効である。本発明のある特定の実施形態において、本発明の抗赤血球凝集素抗体は、B型インフルエンザウイルス感染の治療または低減に有効であり、現在の標準治療(例えば、オセルタミビル)の治療範囲を、症状の発症後の48時間を超えて延長する。

20

【0269】

更なる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体のいずれかを含む薬学的製剤を、例えば、上記の治療方法のいずれかに使用するために提供する。1つの実施形態において、薬学的製剤は、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体のいずれか及び薬学的に許容される担体を含む。別の実施形態において、薬学的製剤は、本明細書に提供される抗赤血球凝集素抗体のいずれか及び少なくとも1つの追加の治療剤、例えば下記に記載されるものを含む。

30

【0270】

本発明の抗体を、療法において単独で、または他の作用物質と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体を、少なくとも1つの追加の治療剤と共投与しても良い。ある特定の実施形態において、追加の治療剤は、ノイラミニダーゼ阻害剤(例えば、ザナミビル、オセルタミビルリン酸塩、アマンタジン、リマンタジン)、抗M2抗体、抗赤血球凝集素抗体等である。幾つかの態様において、ノイラミニダーゼ阻害剤と共投与される本発明の抗赤血球凝集素抗体による、B型インフルエンザウイルス感染を有する患者の治療は、いずれかの作用物質単独による治療と比較して、相乗的治療効果を提供する。

【0271】

上記に示されたそのような併用療法は、組み合わせ投与(2つ以上の治療剤が同じ、または別々の製剤に含まれる)及び別個の投与を包含し、別個の投与の場合には、本発明の抗体の投与は、追加の治療剤の投与の前、投与と同時、及び/または投与の後に発生することができる。1つの実施形態において、抗赤血球凝集素抗体の投与及び追加の治療剤の投与は、互いに、約1か月以内、または約1、2若しくは3週間以内、約1、2、3、4、5若しくは6日以内、または約1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、20若しくは24時間以内に発生する。

40

【0272】

本発明の抗体(及び任意の追加の治療剤)を、非経口、肺内及び鼻腔内、局所治療が望ましい場合には病巣内投与を含む、任意の適切な方法によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内または皮下投与が含まれる。投与は、部

50

分的には投与が短時間または慢性的であるかに応じて任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射によって行うことができる。様々な時点における単回または多回投与、ボーラス投与及びパルス注入が含まれるが、これらに限定されない様々な投与スケジュールが、本明細書において企図される。

【0273】

本発明の抗体は、良好な医療行為と一致する様式で処方、服用及び投与される。この文脈において考慮される要因には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個別の患者の臨床状態、障害の原因、作用物質の送達部位、投与方法、投与スケジュール及び医師に既知の他の要因が含まれる。抗体は、必ずしも必要ではないが、場合により、当該の障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の作用物質と共に処方される。そのような他の作用物質の有効量は、製剤に存在する抗体の量、障害または治療の種類及び上記に考察された他の要因によって左右される。これらは、一般に、本明細書に記載されているものと同じ投与量及び投与経路により、または本明細書に記載されている投与量の約1～99%により、または適切であると経験的/臨床的に決定される任意の投与量及び任意の経路により使用される。

10

【0274】

疾患の予防または治療では、本発明の抗体（単独で使用したとき、または1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせたとき）の適切な投与量は、治療される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重篤度及び経過、抗体が予防または治療の目的で投与されたか、以前の療法、患者の臨床病歴及び抗体への応答、ならびに担当医の判断によって左右される。抗体は、一度に、または一連の治療にわたって患者に適切に投与される。疾患の種類及び重篤度に応じて、約1 µg/kg～約45 mg/kg（例えば、約1.0 mg/kg～約15 mg/kg）の抗体が、例えば、1回以上の別々の投与によるもの、または連続注入によるものであるかに関わらず、患者への投与の初回投与量候補であり得る。1つの典型手な1日投与量は、上記に記述された要因に応じて、約1 µg/kg～100 mg/kgの範囲であり得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与では、状態に応じて、治療は、一般に疾患症状の望ましい抑制が生じるまで持続される。抗体の例示的な投与量は、約1.0 mg/kg～約45 mg/kg、約1.0 mg/kg～約30 mg/kg、約1.0 mg/kg～約15 mg/kg、約1.0 mg/kg～約10 mg/kg、または約1.0 mg/kg～約5 mg/kgの範囲である。したがって、約1.0 mg、2.5 mg/kg、5.0 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、30 mg/kg若しくは45 mg/kg（またはこれらの任意の組み合わせ）の1つ以上の用量を、患者に投与しても良い。そのような用量を断続的に、例えば、毎日、2日に1回、3日に1回等で投与しても良い。高い初回負荷用量の後に、1つ以上の低い用量を投与しても良い。投与は、また、例えば、200 mg、400 mg、600 mg、800 mg、1000 mg、1200 mg、1400 mg、1500 mg、1600 mg、1800 mg、2000 mg、2200 mg、2400 mg、2500 mg、2600 mg、2800 mg、3000 mg、3200 mg、3400 mg、3600 mg等などの固定用量であり得る。この療法の進行は、従来の技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

20

30

【0275】

上記の製剤または治療方法のいずれかを、抗赤血球凝集素抗体の代わりに、または抗赤血球凝集素抗体に加えて、本発明の免疫複合体を使用して実施しても良いことが、理解される。

40

【0276】

H. 製品

本発明の別の態様において、上記に記載された障害の治療、予防及び/または診断に有用な材料を含有する製品が提供される。製品は、容器及び容器上の、または容器に付随したラベルまたは添付文書を含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、組成物を、それ自体で、または状態を治療、予防及び/または

50

診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保持し、滅菌利用口を有しても良い（例えば、容器の例は、静脈注射用溶液バッグ、または皮下注射用針が突き刺し可能な共栓を有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選択された状態の治療のために使用されることを示す。更に、製品は、（a）含有された組成物が本発明の抗体を含む第1の容器と、（b）含有された組成物が更なる細胞傷害剤、そうでなければ治療剤を含む第2の容器とを含んでも良い。本発明のこの実施形態の製品は、組成物を特定の状態の治療のために使用できることを示す添付文書を更に含んでも良い。代替的または追加的に、製品は、注射用静菌水（B W F I）、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2（または第3）の容器を更に含んでも良い。他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業的な、または使用者の観点から望ましい他の材料を、更に含んでも良い。

10

【0277】

上記の製品のいずれかは、抗赤血球凝集素抗体の代わりに、または抗赤血球凝集素抗体に加えて、本発明の免疫複合体を含み得ることが理解される。

【実施例】

【0278】

III. 実施例

以下は本発明の方法及び組成物の例である。上記に提供された一般的な記載を考慮すると、様々な他の態様を実施しても良いことが理解される。

20

【0279】

実施例1：形質芽球の濃縮及び増殖

B型インフルエンザ赤血球凝集素に対する希な抗体を発見及び特定するため、以下の形質芽球濃縮及び増殖技術を開発した。（両方とも2013年11月12日に出願された、同時係属特許出願の米国特許出願第14/077,414号及び国際特許出願第PCT/US2013/69567号、ならびにNakamura et al. (2013) Cell Host & Microbe, 14:93-103を参照すること。これらは、それぞれその全体が参照として本明細書に組み込まれる。）

【0280】

季節性インフルエンザFluvirin（登録商標）ワクチン（Novartis Lot #111796P1）を献血の7日前に受けた正常なヒトドナーからのロイコパック（leukopak）は、Blood Centers of the Pacific（San Francisco, CA）から得た。末梢血単核球（PBMC）を、標準的な方法論を使用してロイコパックから単離した。6～8週齢の雌SCID/ベージュマウスをCharles River Laboratories（Hollister, CA）から購入し、米国実験動物協会（American Association of Laboratory Animal Care）指針に従って、Genentechにおいて収容及び維持した。全ての実験研究は、実験動物のケア及び使用のガイド（The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）、ならびに適用法令に従い、AAALACi公認施設において、Genentech Lab Animal Researchの実験動物委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）の承認の下で実施した。健康なヒトドナーからのロイコパックまたは血液は、書面によるインフォームドコンセントが承認され、倫理審査による承認が西部治験審査委員会（Western Institutional Review Board）から与えられた後に、得た。

30

40

【0281】

インビボ抗原誘導形質芽球濃縮及び増殖は、以下のように、PBMCの脾臓内移植を使用して実施した。単離PBMCを、赤血球凝集素抗原（下記を参照すること）（B細胞百万個毎に0.1～2 µgの抗原）に再懸濁し、37℃で30分間インキュベートした（P

50

B M C / 抗原プレミックス)。このインキュベーションの後、P B M C を洗浄して、非結合抗原を除去した。B 型インフルエンザウイルスに特異的な交差反応性赤血球凝集素抗体を産生する形質芽球を濃縮するため、P B M C / 抗原プレミックス及び単一細胞選別に使用した赤血球凝集素抗原変種を、特定の選択して、インフルエンザ F l u v i r i n (登録商標) ワクチン内に含有された赤血球凝集素抗原変種と区別した。したがって、この研究に使用した赤血球凝集素抗原は、B 型インフルエンザウイルス単離菌：B / ホンコン / 1973 (抗原プレミックス及び F A C S に使用)、B / メリーランド / 1 / 1959 及び B / ウィスコンシン / 2010 (E L I S A 選別に使用)、ならびに B / プリスベン / 2008 (ワクチン中にあり、E L I S A 選別に使用) からの赤血球凝集素を含んだ。赤血球凝集素抗原は、標準的な分子生物学の技術を使用して G e n e n t e c h において

10

【0282】

6 ~ 8 週齢の雌 S C I D / ベージュマウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s , H o l l i s t e r , C A) を、セシウム - 137 源を使用して 350 ラドで垂致死的に照射した。ポリミキシン B (110 mg / L) 及びネオマイシン (1 . 1 g / L) を、照射後の 7 日間にわたって飲料水に加えた。照射の 4 時間後、各マウスの左側腹部を剃り、B e t a d i n e (登録商標) (P u r d u e P h a r m a , S t a m f o r d , C T) 及び 70 % アルコールで準備処置を施した。外科的処置は、無菌の外科的処置を使用して麻酔下で実施した。1 cm の皮膚切開を、各マウスの肋骨辺縁の真下に行い、続いて腹壁及び腹膜を切開した。各マウスの脾臓を注意深く露出させ、30 µ L の P B S に再懸濁した 50×10^6 個のヒト P B M C を注射した。切開を筋肉層により、ならびに 5 - O V i c r y l (登録商標) 縫合糸 (E t h i c o n , S o m e r v i l l e , N J) 及び外科用ステープルをそれぞれ使用して皮膚により閉鎖した。抗原特異的細胞選別実験では、マウスを移植の 8 日後に殺処分し、脾臓を採取した。

20

【0283】

マウスから得た脾臓細胞の単一細胞懸濁液を、ヒト I g G + 形質芽球を C D 3 8 ^{h i g h} / I g G + 発現として確定する、抗ヒトモノクローナル抗体 C D 3 8 P E C y 7 (B D B i o s c i e n c e s , S a n J o s e , C A) 及び I g G D y l i g h t (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , I n c . , W e s t G r o v e , P A) のカクテルで染色した。単離脾臓細胞の懸濁液中において B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素交差反応性形質芽球を特定するため、細胞を、L i g h t n i n g - L i n k (登録商標) 標識キット (I n n o v a B i o s c i e n c e s , C a m b r i d g e , U K) を使用して、F I T C または P E のそれぞれと予め複合させた B 型インフルエンザウイルス株 B / ホンコン / 1973 の赤血球凝集素で染色した。

30

【0284】

上記に記載された方法を使用して特定された、およそ 2 , 0 1 8 個の抗原特異性形質芽球のうち、7 個の m A b は、少なくとも 1 つの B 型インフルエンザウイルス株に対してウイルス中和を示し、3 つの m A b は、祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスを含む、試験した全ての B 型インフルエンザウイルス株に対して、ウイルス中和を示した。

40

【0285】

実施例 2 . 単一形質芽球からの I g G クローニング

B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素交差反応性ヒト形質芽球 (上記に記載された) を、単一細胞選別し、およそ 2 , 0 1 8 個の抗原特異性形質芽球をもたらした。単一形質芽球を、5 % 低 I g G ウシ胎児血清を含有する 50 µ l の R P M I を含有する U 底 96 ウェルマイクロウェルプレートから、直接選別した。プレートを 600 × g (B e c k m a n C o u l t e r , B r e a , C A) により 5 分間遠心分離し、培地を吸引により注意深く除去した。細胞を再懸濁し、90 µ l の P B S により同じ手順に従って 2 回洗浄した。

50

【0286】

可変重鎖及び軽鎖をコードするcDNAを生成するため、各細胞を、2単位のRNase out (Invitrogen、Grand Island、NY)、0.5mMの4dNTP (Perkin Elmer、Waltham、MA)、1.5mMのMgCl₂、37.5mMのKCl、10mMのDTT (ジチオトレイトール)、0.25%のNonidet P40 (US Biological、Marblehead、MA)、0.1mg/mlのウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich)、25mMのTris pH8.3、0.25pmolのIgG₁₋₄定常、カッパ鎖定常及びラムダ鎖定常領域特異的オリゴヌクレオチド (以下に示す)、ならびに40UのSuperscript III (Invitrogen、Grand Island、NY)を含有する6μlの逆転写酵素(RT)反応混合物に再懸濁した。

IgG₁₋₄定常部：GAAGTAGTCCTTGACCAAGGCAG (配列番号1)

カッパ定常部：CTCAGCGTCAGGGGTGYTGCTGAG (配列番号2)

ラムダ定常部：GGGTKTGGTSGTCTCCAC (配列番号3)

【0287】

反応を3×30分の間隔を置いて、それぞれ45、50及び55でインキュベートした。インキュベートした後、反応混合物を、TE緩衝液(10mMのTris HCl、1mMのEDTA)により15μlに希釈した。初回ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、2μlの希釈した上記のRTカクテル及びAdvantage-GC2 Polymerase Mix (Clontech、Mountain View、CA)の使用により、製造会社により提供されたプロトコールに従って実施して、IgG重鎖、カッパ鎖及びラムダ鎖を増幅した。PCR増幅は、下記に示されている可変重鎖及び軽鎖生殖系及び定常領域配列に基づいた変性オリゴヌクレオチドを使用して、実施した。

IGVH1a CAGGTGCAAGCTGGGTGCAAGTCTGGGGC (配列番号4)

IGVH1b CAGGTCCAGCTGGGTGCAAGTCTGGGGC (配列番号5)

IGVH2 CAGGTCAACCTTGAAAGGAGTCTGGGTCC (配列番号6)

IGVH3 GAGGTGCAAGCTGGGTGGAGTCTGGGGG (配列番号7)

IGVH4 CAGGTGCAAGCTGCAAGGAGTCTGGGGCCC (配列番号8)

IGVH5 GAGGTGCAAGCTGGGTGCAAGTCTGG (配列番号9)

IGVH6 CAGGTACAGCTGCAAGCAGTCAAGGTCC (配列番号10)

IGVH7 CAGGTGCAAGCTGGGTGCAATCTGG (配列番号11)

IGKV1 GHCAATCCRGWTGACCCAGTCTC (配列番号12)

IGKV2 GATRITTGTGATGACYCAGWCTC (配列番号13)

IGKV3 GAAATWGTTRWTGACRCAAGTCTC (配列番号14)

IGKV4 GACATC GTGATGACCCAGTCTCC (配列番号15)

IGKV5 GAAACGACACTCACGCAGTCTC (配列番号16)

IGKV6 GAWRTTGTGMTGACWCAGTCTC (配列番号17)

IGLV1 CAGTCTGTGYTGACKCAGCCRCCTC (配列番号18)

IGLV2 CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT (配列番号19)

IGLV3 TCCTATGAGCTGACWCAGSHVCCCKC (配列番号20)

IGLV4 CAGCCTGTGCTGACTCARTCVCCCTC (配列番号21)

IGLV5 CAGCCTGTGCTGACTCAGCCAACTTC (配列番号22)

IGLV6 AATTTTATGCTGACTCAGCCCCAC (配列番号23)

I G L V 7 C A G G C T G T G G T G A C T C A G G A G C C C (配列番号 2 4)
I G L V 8 C A G A C T G T G G T G A C C C A G G A G C C (配列番号 2 5)
I G L V 9 C A G C C T G T G C T G A C T C A G C C A C C (配列番号 2 6)
H C 3 0 1 . 5 定常部 G C A G C C C A G G G C S G C T G T G C (配列番号 2 7)
カップ 1 0 2 定常部 G C A C A C A A C A G A G G C A G T T C C A G (配列番号 2 8)

ラムダ 2 0 2 定常部 C T T G R A G C T C C T C A G A G G A G (配列番号 2 9)

【 0 2 8 8 】

重鎖及び軽鎖の P C R 増幅反応を、以下のようにそれぞれ 2 つの反応に分けた。重鎖ファミリー V H . 1、2、3 (プライマー I G V H 1 a、I G V H 1 b、I G V H 2、I G V H 3) 及び V H . 4、5、6、7 (プライマー I G V H 4、I G V H 5、I G V H 6、及び I G V H 7) ; カップ鎖ファミリー V K . 1、2、3 (プライマー I G K V 1、I G K V 2、及び I G K V 3) 及び V K . 4、5、6 (プライマー I G V K 4、I G V K 5、及び I G V K 6) ; ならびにラムダ鎖ファミリー V L . 1、2、3、4、5 (I G L V 1、I G L V 2、I G L V 3、I G L V 4、及び I G L V 5) 及び V L . 6、7、8、9 (プライマー I G L V 6、I G L V 7、I G L V 8、及び I G L V 9) 。タッチダウン (t o u c h d o w n) P C R 増幅プロトコルを温度サイクルに使用した。

【 0 2 8 9 】

反応の後、P C R 増幅産物をエキソヌクレアーゼ 1 (E x o) 及びエピアルカリホスファターゼ (S A P) で処理して、それぞれの P C R 増幅反応において過剰量のヌクレオチド及びプライマーを除去した (U . S . B i o l o g i c a l s、M a r b l e h e a d、M A) 。初回 P C R 増幅産物を、サンガー配列決定の使用により直接配列決定して、重鎖及び軽鎖の両方の可変配列を決定した。第 2 のネステッド (n e s t e d) P C R 増幅を、以下のオリゴヌクレオチドプライマーの使用により哺乳類シグナル及び定常領域クローニング配列を挿入するため、生殖系適合重鎖及び軽鎖可変オリゴヌクレオチドを使用して実施した。

s V H 1 a :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G G T G C A G C T G G T G C A G
T C T G G G G C T G A G G T G A A G (配列番号 3 0)

s V H 2 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G A T C A C C T T T G A A G G A G
T C T G G T C C T A C G C T G G T G (配列番号 3 1)

s V H 3 v v :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G G T G C A G C T G G T G G A G
T C T G G G G G A G G C G T G G T C (配列番号 3 2)

s V H 3 g l :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A G A G G T G C A G C T G G T G G A G
T C T G G G G G A G G C T T G (配列番号 3 3)

s V H 4 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G G T G C A G C T G C A G G A G
T C G G G C C C A G G A C T G G (配列番号 3 4)

s V H 5 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A G A G G T G C A G C T G G T G C A G
T C T G G A G C A G A G G T G A A A A A G (配列番号 3 5)

s V H 6 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCACAGGTACAGCTGCAGCAG
TCAGGTCCAGGACT (配列番号 36)

s V H 7 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCACAGGTGCAGCTGGTGCAAT
TCTGGGTCTGAGTTTG (配列番号 37)

s V K 1 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGACATCCAGATGACCCAG
TCTCCATCCTCCCTG (配列番号 38)

10

s V K 2 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGATATTGTGTGATGACTCAG
TCTCACTCTCCCTGCTG (配列番号 39)

s V K 3 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGAAATTGTGTGTGACACAG
TCTCCAGCCACCCTGTCTTTTG (配列番号 40)

20

s V K 4 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGACATCGTGTGATGACCCAG
TCTCCAGACTCCCTGGCTGTG (配列番号 41)

s V K 5 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGAAACGACACTCACGCAG
TCTCCAGC (配列番号 42)

s V K 6 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCAGAAATTGTGCTGACTCAG
TCTCCAGACTTTTCG (配列番号 43)

30

s V L 1 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCACAGTCTGTGYTGACKCAG
CCRCCCTC (配列番号 44)

s V L 2 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCACAGTCTGCCCTGACTCAG
CCT (配列番号 45)

40

s V L 3 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCATCCTATGAGCTGACWCAG
SHVCCCKC (配列番号 46)

s V L 4 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC
AACTGCAAACTGGAGTACATTTCACAGCCTGTGCTGACTCAR
TCVCCCTC (配列番号 47)

s V L 5 :

CCACCATGGGATGGTTCATGTATCATCCTTTTTTCTAGTAGC

50

A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G C C T G T G C T G A C T C A G
C C A A C T T C (配列番号 4 8)

s V L 6 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A A A T T T T A T G C T G A C T C A G
C C C C A C (配列番号 4 9)

s V L 7 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G G C T G T G G T G A C T C A G
G A G C C C (配列番号 5 0)

s V L 8 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G A C T G T G G T G A C C C A G
G A G C C (配列番号 5 1)

w V L 9 :

C C A C C A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T T C T A G T A G C
A A C T G C A A C T G G A G T A C A T T C A C A G C C T G T G C T G A C T C A G
C C A C C (配列番号 5 2)

重定常部 : G C C A G G G G G A A G A C C G A T G (配列番号 5 3)

カップ定常部 :

C T G G G A T A G A A G T T A T T C A G C A G G C A C A C A A C A G A A G C A G
T T C C A G A T T T C A A C T G C T C (配列番号 5 4)

ラムダ定常部 : C T T G R A G C T C C T C A G A G G A G (配列番号 2 9)

【 0 2 9 0 】

P C R 増幅反応は、G C を有する P r i m e S t a r H S D N A ポリメラーゼ (T
a k a r a B i o 、 S h i g a 、 J a p a n) を製造会社の推奨に従って使用して設定
した。P C R 増幅反応の後、増幅産物を、E x o / S A P により上記に記載されたように
処理した。P C R 増幅産物をコードする重可変鎖及び軽可変鎖を、制限エンドヌクレア
ーゼ無含有手順の使用により、哺乳類発現ベクターに挿入した。2 0 μ l の P C R 増幅産物
を、K u n k e l 突然変異誘発プロトコルの使用により、I g G₁、カップ及びラムダ
鎖の単鎖 D N A ヒトテンプレートにアニールした。(K u n k e l (1 9 8 5) P N A S
8 2 : 4 8 8 - 4 9 2 を参照すること。) 正確に挿入された構築物を、D N A 配列決定
により確認した。重鎖及び軽鎖をコードするプラスミド含有核酸を、一時的発現のために
F u g e n e 形質移入試薬 (R o c h e D i a g n o s t i c 、 I n d i a n a p o l i s 、 I N) を使用して、2 9 3 T ヒト胎児腎細胞に同時形質移入し、発現及び結合につ
いて下記に記載されるように分析した。

【 0 2 9 1 】

実施例 3 . 赤血球凝集素の E L I S A スクリーニングアッセイ

異なる B 型インフルエンザウイルス単離菌の様々な赤血球凝集素サブタイプと結合する
、上記に記載されたようにして得られるモノクローナル抗赤血球凝集素抗体 (すなわち、
抗 B 型インフルエンザウイルス抗体) のそれぞれの能力を、E L I S A により以下のよう
に検査した。様々な赤血球凝集素発現プラスミドを 2 9 3 T 細胞に形質移入し、これらは
、B 型インフルエンザウイルス株の B / メリーランド / 1 / 1 9 5 9 、B / ビクトリア /
2 0 0 0 及び B / ブリスベン / 2 0 0 8 の赤血球凝集素を含んだ。2 日後、細胞を、5 0
m M の T r i s 、p H 8 、5 m M の E D T A 、1 5 0 m M の N a C l 、1 % の T r i t o n
X - 1 0 0 + プロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e) に溶解した。核を遠心分離
により取り除き、得られた溶解産物を - 8 0 ° で貯蔵した。

【 0 2 9 2 】

E L I S A スクリーニングのために、3 8 4 ウェルプレート (N u n c M a x i S o
r p) を、5 μ g / m l の、P B S 中の G a l a n t h u s n i v a l i s レクチン (

10

20

30

40

50

S i g m a) で被覆した。プレートを洗浄し、次に、様々に発現した赤血球凝集素を含有する細胞溶解産物の希釈液で被覆した。プレートを洗浄し、抗赤血球凝集素抗体の様々な希釈液と共に、続いてヤギ抗 H R P 二次抗体 (J a c k s o n) と共にインキュベートした。プレートを洗浄し、T M B (3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン) 基質検出のために処理した。

【 0 2 9 3 】

およそ 2 , 0 1 8 個の形質芽球を、上記の実施例 2 に記載された単一細胞選別から得た。これらのうち、2 9 3 T 細胞に一時的に発現し、E L I S A により選別された 9 8 個のモノクローナル抗体は、B 型インフルエンザウイルス株の B / メリーランド / 1 / 1 9 5 9、B / ビクトリア / 2 0 0 0 及び B / プリスベン / 2 0 0 8 の赤血球凝集素への結合を示した。

10

【 0 2 9 4 】

実施例 4 . インビトロにおける B 型インフルエンザウイルスの中和

本発明の抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体の B 型インフルエンザウイルス単離菌のパネルのインビトロにおける広範囲の赤血球凝集素サブタイプ結合及び中和を誘発する能力を、以下のように検査した。M D C K 細胞を、9 6 ウェル黒壁透明底画像化プレート (C o s t a r 3 9 0 4) において、1 0 % の F B S を補充した D M E M 培地に 2 5 % 集密単層として増殖させた。各 B 型インフルエンザウイルスサブタイプを、インフルエンザ培地 (D M E M、G i b c o カタログ番号 1 5 2 6 0 の 0 . 2 % B S A、1 0 m M の H E P E S、G i b c o カタログ番号 1 0 3 7 8 のペニシリン / ストレプトマイシン / グルタミン、S i g m a カタログ番号 T 1 4 2 6 の 2 u g / m L の T P C K 処理トリプシン) において 1 の M O I に希釈し、0 . 0 2 ~ 1 , 6 0 0 n M の範囲の様々な濃度の m A b 3 4 B 5 A 及び m A b 3 3 F 8 と共に 3 7 で 1 時間インキュベートした。次にそれぞれの抗体 / インフルエンザウイルスのスカクテルを、M D C K 細胞に、細胞を冷 1 0 0 % エタノールで固定する前に、5 % C O ₂ インキュベーターにおいて 3 7 で 1 6 時間感染させた。次に固定細胞を H o e c h s t 3 3 3 4 2 (I n v i t r o g e n カタログ番号 H 3 5 7 0) で染色して、細胞核を可視化し、総細胞数を決定した。また細胞を、B 型インフルエンザウイルス核タンパク質 (N P) に特異的な広域反応性のモノクローナル抗体 (M i l l i p o r e カタログ番号 M A B 8 2 5 8) 及び A l e x a F l u o r 4 8 8 複合ヤギ抗マウス二次抗体 (I n v i t r o g e n カタログ番号 A 1 1 0 2 9) により順次染色して、感染細胞の数を決定した。細胞を、I m a g e E x p r e s s M i c r o 機器 (M o l e c u l a r D e v i c e s) の使用により画像化し、画像データを M e t a X p r e s s 3 . 1 ソフトウェアの使用により分析した。

20

30

【 0 2 9 5 】

感染細胞の百分率を決定し、X 軸の抗体濃度 (対数 ₁₀) に対して Y 軸にプロットした。全ての中和アッセイを、三重に完了し、データを 9 5 % 信頼区間 (9 5 % C I) の I C 5 0 値 (n M) として報告する。データを、非線形回帰用量応答曲線に当てはめて、I C 5 0 及び 9 5 % C I を生成した。

【 0 2 9 6 】

インビトロ中和用量応答曲線は、広範囲の B 型インフルエンザウイルス株のパネルに対して、様々な濃度の本明細書に記載されているモノクローナル抗体を使用して生成した。図 1 A 及び 1 B は、B 型インフルエンザウイルス株のパネルに対する m A b 3 4 B 5 A 及び m A b 3 3 F 8 それぞれの中和曲線を示す。図 1 A 及び 1 B に示されているように、m A b 3 4 B 5 A 及び m A b 3 3 F 8 は、祖先 B 型インフルエンザウイルス系列、ならびにヤマガタ及びビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスに対するインビトロ中和活性を含む、広範囲の B 型インフルエンザウイルス株のパネルのインビトロ中和に有効である。

40

【 0 2 9 7 】

下記の表 2 は、m A b 3 4 B 5 A について上記に記載された実験のインビトロ中和活性の計算を示す。

50

表 2

B 型 インフルエンザウイルス株	系列	IC50 (nM)	95% CI (nM)
B / ウィスコンシン / 1 / 2010	ヤマガタ	2.9	1.3-6.4
B / ブリスベン / 2008	ビクトリア	0.054	0.047-0.063
B / バングラデシュ / 2007	ビクトリア	0.19	0.17-0.21
B / マレーシア / 2004	ビクトリア	0.038	0.024-0.059
B / ビクトリア / 504 / 2000	ヤマガタ	0.092	0.088-0.096
B / ロシア / 1969	祖先	0.79	0.61-1.0
B / マサチューセッツ / 3 / 1966	祖先	0.38	0.33-0.44
B / メリーランド / 1 / 1959	祖先	0.038	0.029-0.050
B / リー / 10 / 1940	祖先	0.14	0.13-0.15

10

20

30

40

50

【 0 2 9 8 】

図 2 は、B 型インフルエンザウイルス株パネルに対する mAb 46B8A のインビトロ中和曲線を示す。加えて、図 2 に示されているように、mAb 46B8A は、祖先 B 型インフルエンザウイルス系列、ならびにヤマガタ及びビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスに対するインビトロ中和活性を含む、広範囲の B 型インフルエンザウイルス株のパネルのインビトロ中和に有効である。

【 0 2 9 9 】

これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が、様々な B 型インフルエンザウイルス単離菌 / 株をインビトロで用量依存的に中和できたことを示した。加えて、これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が、祖先 B 型インフルエンザウイルス単離菌、ならびに、B 型インフルエンザウイルス株のウィスコンシン / 2010、ブリスベン / 2008、バングラデシュ / 2007、マレーシア / 2004、ビクトリア / 2000、ロシア / 1969、マサチューセッツ / 1966、メリーランド / 1959 及びリー / 1940 の中和を含む、ヤマガタ及びビクトリア系列の分岐後の B 型インフルエンザウイルス単離菌を中和できたことを示した。

【 0 3 0 0 】

これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が、B 型インフルエンザウイルス感染、ならびに祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルス株の治療及び予防に有効であることを示した。

【 0 3 0 1 】

実施例 5 . B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集阻害アッセイ

mAb 46B8C 及び mAb 34B5C による中和機構を検査するため、赤血球凝集阻害 (HI) アッセイを、2 つの B 型インフルエンザウイルスの B / ビクトリア / 504 / 2000 及び B / ウィスコンシン / 1 / 2010 の使用により実施した。それぞれの B 型インフルエンザウイルスでは、5 倍工程の 8 つの段階希釈液を、リン酸塩緩衝食塩水 (PBS) により、1 : 5 から出発して二重に作製した。50 µl の各希釈液を V 底 96

ウェルプレート (Costar 3894) に移した。シチメンチョウ赤血球 (TRBC、Lampire Biological Laboratories カタログ番号 7249408) を、PBS で 0.5% に希釈し、50 μ l を、ウイルスを含有する各ウェルに加えた。プレートを室温で 1 時間インキュベートした。TRBC 凝集を防止した最後のウイルス希釈液 (最低ウイルス濃度に相当する) を、直接的な可視化により決定し、赤血球凝集阻害 (HI) アッセイに使用した。

【0302】

HI アッセイを、広範囲の B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素サブタイプ結合を有する 2 つのヒトモノクローナル抗体 (huMab) である mAb 46B8C 及び mAb 34B5C、ならびに単純ヘルペスウイルス (HSV) の糖タンパク質 D に特異的な対照の huMab gD5237 により実施した。0.0032 ~ 250 μ g/ml の範囲の 5 倍工程での各抗体の 8 つの段階希釈液 (三重) を、PBS 中の予め決定された量の B/ビクトリア/504/2000 または B/ウイスコンシン/1/2010 ウイルスと混合し、上記に記載されたように 37 で 1 時間インキュベートした。50 μ l のウイルス抗体混合物を、V 底 96 ウェルプレートに移した。TRBC を、PBS で 0.5% に希釈し、50 μ l を、50 μ l のウイルス抗体混合物を含有する各ウェルに加えた。各プレートを、室温で 1 時間インキュベ - トし、HI 力価 (すなわち、赤血球凝集の阻害に有効な最低抗体濃度) を、直接的な可視化によりそれぞれの抗体において決定した。

【0303】

図 3 に示されているように、mAb 34B5C は、B/ビクトリア/504/2000 及び B/ウイスコンシン/1/2000 の B 型インフルエンザウイルスの両方によるシチメンチョウ赤血球 (TRBC) の赤血球凝集の阻害に有効であった。対照的に、mAb 46B8C または対照の gD5237 抗体は、いずれも、試験した最高抗体濃度であっても、どちらの B 型インフルエンザウイルスによる赤血球凝集に対しても阻害を示さなかった。これらの結果は、mAb 34B5C が B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素の頭部基の受容体結合ドメインに結合し、したがって TRBC のシアル酸受容体へのウイルスの結合を防止することを示唆した。これらの結果は、mAb 46B8C が、受容体結合ドメインの外側 (例えば、柄 (または、幹) 領域) にある B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素の区域に結合することも示唆した。

【0304】

実施例 6 . ブラック阻害アッセイによるインビトロにおける B 型インフルエンザウイルスの中和

本発明の抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体の様々な B 型インフルエンザウイルス単離菌を中和する能力を、以下のように更に分析した。B 型インフルエンザウイルス力価は、ブラックアッセイによって、以下のように決定した。MDC K 細胞を、6 ウェル組織培養プレート (Costar 3516) において、10% の FBS を補充した DMEM 培地に集密単層として増殖させた。これらの研究に使用した全ての B 型インフルエンザウイルス株は、Vira Pur (San Diego, CA) から購入した。ウイルス力価の決定では、各貯蔵ウイルスを、インフルエンザ培地 (DMEM、Gibco カタログ番号 15260 の 0.2% BSA、10 mM の HEPES、Gibco カタログ番号 10378 のペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン、Sigma カタログ番号 T1426 の 2 μ g/ml の TPCK 処理トリプシン) において希釈した。1:10² ~ 1:10⁷ の 10 倍工程の 6 つの段階希釈液を、各ウイルスにおいて作製し、それぞれ 1 ml を使用して、6 ウェルプレート中の MDC K 細胞を感染させた。感染の 2 時間後、ウイルスを除去し、細胞を、2 ml の 2 × インフルエンザ培地: 2% アガロースの 1:1 混合物で覆った。プレートを室温で 30 分間保持し、次に 5% CO₂ インキュベーターにより 37 でインキュベートした。3 日後、ブラックを不透明光下で直接的な可視化により数え、各ウイルスの力価をブラック形成単位 (PFU) / ml で決定した。

【0305】

ブラック阻害アッセイによる B 型インフルエンザウイルス中和に対する本発明のモノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体の効果を、次に以下のように検査した。M D C K細胞を、6 ウェル組織培養プレート (C o s t a r 3 5 1 6) において、1 0 %のF B Sを補充したD M E M培地に集密単層として増殖させた。それぞれのB型インフルエンザウイルスにおいて、6 ウェルプレートのウェル1つあたり2 0 ~ 2 0 0個のプラークをもたらすウイルスの量(上記に記載されたよう決定した)を、プラーク阻害アッセイに使用した。0 . 1 6 ~ 3 8 . 4 n Mの範囲の3倍工程によるm A b 4 6 B 8 Cの6つの段階希釈液を、インフルエンザ培地中の各ウイルスと混合し、3 7 °Cで1時間インキュベートした。1 m lのウイルス抗体混合物を使用して、6 ウェルプレートのM D C K細胞を感染させ、それぞれの感染は、プレートに3重に行った。m A b 4 6 B 8 Cの同じ段階希釈液を2 ×インフルエンザ培地において作製し、2 %アガロースと1 : 1で混合した。感染の2時間後、ウイルス抗体混合物を除去し、細胞を、2 m lの抗体アガロース混合物で覆った。プレートを室温で3 0分間保持し、次に5 %C O₂ インキュベーターにより3 7 °Cでインキュベートした。5 ~ 6日後、プラークを不透明光下での直接的な観察により数えた。感染の百分率は、最高プラーク数(最低抗体濃度における)に正規化し、X軸の対数1 0抗体濃度に対してY軸にプロットすることによって決定した。データを、非線形回帰用量応答曲線に当てはめて、I C 5 0 (5 0 %の阻害を与える濃度)値及び9 5 %信頼区間(9 5 %C I)を生成した。

【0306】

図4に示されているように、m A b 4 6 B 8 Cは、試験した全てのB型インフルエンザウイルス株に対して、インビトロプラーク形成を用量依存的に遮断した。上記に記載されたm A b 4 6 B 8 Cによるプラーク形成アッセイにおいて生成されたデータから計算されたI C 5 0値を、下記の表3に示す。表3から分かるように、m A b 4 6 B 8 Cは、1 n M未満のI C 5 0値を示す非常に低い濃度でプラーク形成を遮断した。

【0307】

表 3

インフルエンザ株	系列	IC50(nM)	95% CI(nM)
B / ウィスコンシン / 1 / 2010	ヤマガタ	0.64	0.53-0.76
B / ブリスベン / 2008	ビクトリア	0.86	0.72-1.0
B / バングラデシュ / 2007	ビクトリア	0.75	0.62-0.92
B / マレーシア / 2004	ビクトリア	0.58	0.36-0.91
B / ビクトリア / 504 / 2000	ヤマガタ	0.67	0.62-0.73
B / ロシア / 1969	祖先	0.73	0.61-0.86
B / マサチューセッツ / 3 / 1966	祖先	0.80	0.65-0.98
B / メリーランド / 1 / 1959	祖先	0.95	0.71-1.3
B / リー / 10 / 1940	祖先	0.68	0.55-0.85

まとめると、これらのデータは、プラーク中和アッセイを使用して、本発明のモノクローナル抗体が、祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列のB型インフルエンザウイルス単離株を含む、B型インフルエンザウイルスのインビトロプラーク形成の阻害及び中和に有効であることを示した。加えて、これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が、B型インフルエンザウイルスのインビトロプラーク形成を1 n M未満のI C 5 0値で阻害することを示した。

【0308】

実施例 7 . B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素融合阻害アッセイ

m A b 4 6 B 8 C 及び m A b 3 4 B 5 C による中和機構を更に探索するため、ウイルス侵入の際の初期受容体結合段階を迂回する赤血球凝集素媒介細胞間融合アッセイにおける、これらの抗体の阻害効果を、以下のように検査した。H e L a 細胞を、6 ウェル組織培養プレート (C o s t a r 3 5 1 6) において、D M E M + 1 0 % F B S に約 4 0 % の集密として増殖させた。各ウェルの細胞に、1 0 m g の、B / ウイスコンシン / 1 / 2 0 1 0 赤血球凝集素を発現するプラスミドで形質移入した。1 7 時間後、形質移入ミックスを細胞から除去し、1 0 m M の酪酸ナトリウムを含有する新たな培地を細胞に加えた。培地を 6 時間後に再び取り換え、細胞を、一晩かけて約 8 0 % の集密に増殖させ、その後、融合阻害アッセイを実施した。

10

【 0 3 0 9 】

細胞を P B S で洗浄し、P B S 中の 5 m g / m l の T P C K トリプシン (S i g m a カタログ番号 T 1 4 2 6) により 3 7 ° で 7 分間処理した。トリプシンを除去し、5 0 m g / m l のダイズトリプシン阻害剤 (C a l B i o c h e m カタログ番号 6 5 0 3 5) を含有する培養培地を加え、細胞を 3 7 ° で 1 0 分間インキュベートした。次に細胞を、2 0 m g / m l または 2 0 0 m g / m l の m A b 4 6 B 8 C、m A b 3 4 B 5 C、または単純ヘルペスウイルス (H S V) の糖タンパク質 D に特異的な対照のヒト m A b g D 5 2 3 7 を含有する培養培地において、3 7 ° でインキュベートした。1 時間後、抗体を除去し、細胞をインフルエンザ培地 (p H 4 . 8 5) において 3 7 ° で 5 分間インキュベートした。低 p H 培地を除去し、細胞を増殖培地において 3 7 °で一晩インキュベートして、合胞体の完全な形成をもたらした。細胞の位相画像を、N i k o n E c l i p s e T E 2 0 0 0 - E 顕微鏡及び N I S - E l e m e n t s A R 3 . 2 ソフトウェアにより 1 0 × 対物レンズ下で取得した。

20

【 0 3 1 0 】

H e L a 細胞発現 B 型インフルエンザウイルスの B / ウイスコンシン / 1 / 2 0 1 0 の赤血球凝集素を、低 p H C 培地に曝露する前に、2 0 μ g / m l または 2 0 0 μ g / m l の m A b 4 6 B 8 C、m A b 3 4 B 5 C または対照の m A b g D 5 2 3 7 と共にインキュベートした。p H が低下した数時間以内に合胞体が現れ、一晩の培養によって完全に発育した。m A b 4 6 B 8 C は、2 0 μ g / m l 及び 2 0 0 μ g / m l の両方において合胞体の形成を阻害したが、対照的に m A b 3 4 B 5 C または対照の m A b g D 5 2 3 7 は、いずれも、検査したいずれの濃度でも細胞間融合を遮断しなかった。(図 5 を参照すること。)

30

【 0 3 1 1 】

上記の実施例 5 に記載された赤血球凝集阻害 (H I) アッセイにおいて得られた結果と一致して、これらの結果は、m A b 4 6 B 8 C が、赤血球凝集素の柄結合抗体であり、したがって、B 型インフルエンザウイルス膜融合に必要な赤血球凝集素柄における p H 誘発性立体構造変化を遮断できることを示唆した。これらの結果は、m A b 3 4 B 5 C が赤血球凝集素の頭部基に結合し、本明細書に記載されている細胞間融合アッセイにおいて迂回される工程である、初期受容体結合段階を遮断することによって B 型インフルエンザウイルスを中和する可能性も示唆した。

40

【 0 3 1 2 】

実施例 8 . 様々な B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素に対する m A b 4 6 B 8 C の親和性

様々な B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素に対する m A b 4 6 B 8 の親和性を、以下のように実証した。

結合緩衝液 (2 % の F B S、5 0 m M の H E P E S、p H 7 . 2 及び 0 . 1 % のアジ化ナトリウムを有する D M E M) 中に固定濃度のヨウ素化抗 B 型インフルエンザウイルス抗体 (m A b 4 6 B 8 C) 及び段階希釈濃度の非標識抗 B 型インフルエンザウイルス抗体 (m A b 4 6 B 8 C) を含有する 5 0 μ L の競合反応混合物を、9 6 ウェルプレートに入れた。様々な菌株の B 型インフルエンザウイルスを一時的に発現する 2 9 3 個の細胞を

50

、競合反応混合物に、結合緩衝液中0.2 mlあたり50,000個の細胞の密度で加えた。細胞を伴う競合反応液を室温で2時間インキュベートした。2時間のインキュベーションの後、競合反応液をMillipore Multiscreenフィルタープレートに移し、結合緩衝液で4回洗浄して、結合ヨウ素化抗体から遊離物を分離した。フィルターをWallac Wizard 1470ガンマ計数器(PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA)により数えた。結合データを、New Ligandソフトウェア(Genentech)を使用して評価したが、これは結合親和性を決定するためにMunson及びRodbardの当てはめアルゴリズムを使用する(Munson and Rodbard (1980) Anal Biochem 7:2239)。

10

【0313】

下記の表Xは、293T細胞の表面に組み換え的に発現された様々なB型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素三量体に対するmAb 46B8Cのスクッチャード結合分析を示す。下記の表4に示されているように、mAb 46B8Cは、様々なB型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素に対して低nM親和性を示した

表 4

B 型インフルエンザ ウイルス株	mAb 46B8C K _D , nM(誤差%)	抗原密度 部位/細胞
マサチューセッツ /1966	2.5 (16%)	776,000
ロシア/1969	2.9 (10%)	540,000
ウイスコンシン/2010	4.9 (14%)	1.98e6
ブリスベン/2008	5.6 (12%)	1.40e6
ビクトリア/2000	3.5 (12%)	331,000

20

【0314】

実施例9. B/ビクトリア/2000及びB/ウイスコンシン/2010に対する、マウスにおけるmAb 34B5Aのインビボ効力

30

マウスにおけるB型インフルエンザウイルス感染に対するmAb 34B5Aのインビボ効力を、以下のように実施した。DBA/2Jマウス(Jackson Lab, Bar Harbor, ME)を、インフルエンザ培地(DMEM、0.2%のBSA、2 µg/mLのTPCK処理トリプシン)において最小LD₅₀用量(1×10⁴個のウイルス/マウス)で希釈したB型インフルエンザウイルス株のB/ビクトリア/2000の50 µlにより、鼻腔内に感染させた。インフルエンザウイルス感染を、mAb 34B5Aの静脈内投与の前に、72時間進行させた(B/ビクトリア/2000の感染のため)。

【0315】

B型インフルエンザウイルスのB/ビクトリア/2000の感染の72時間後、様々な量のmAb 34B5Aを、200 µlのPBS中の15 mg/kg、3 mg/kg、0.6 mg/kg及び0.12 mg/kgの用量でマウスに静脈内投与した。対照処理動物には、mAb 34B5Aの最高試験用量に等しい用量(すなわち、およそ15 mg/kg)でmAb gD5237を投与した。マウスを、身体状態及び生存について毎日モニターし、また、感染後の21日目まで毎日計量した。

40

【0316】

図6Aは、B型インフルエンザウイルスのB/ビクトリア/2000による感染の72時間後に、様々な量のmAb 34B5Aが投与されたマウスの生存率(%) (経時的、日数)を示す。図6Aに示されているように、100%の死亡率が、対照抗体が投与された感染マウスでは10日目までに観察された。しかし本発明のモノクローナル抗体が投与

50

された感染マウスは、生存の増加を示した。特に、100%の生存率が、B型インフルエンザウイルスのB/ビクトリア/2000により感染したマウスでは、15mg/kgのmAb 34B5Aの治療用量で観察された。

【0317】

並列実験を実施して、mAb 34B5AとTamiflu（オセルタミビル）の効力を比較した。Tamifluを、ウイルス感染後の72時間から開始して、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgの1日2回で投与した。Tamifluは、ビヒクル対照治療動物と比較して、B型インフルエンザウイルスのB/ビクトリア/2000により感染したマウスにいくらかの保護を提供したが、100%の死亡率が、最高投与用量であっても、11日目までに観察された。（図6Bを参照すること。）

10

【0318】

これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体がB型インフルエンザウイルス感染をインビボで治療するのに有効であることを示した。加えて、これらのデータは、本発明のモノクローナル抗体がB型インフルエンザウイルス感染の少なくとも72時間後までに投与されたとき、B型インフルエンザウイルス感染をインビボで治療するのに有効であったことを示した。まとめると、これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体がウイルス感染の72時間後に投与されたとき、Tamifluのインビボ効力と比較してマウスにおいてより良好なインビボ効力を示したことを更に示した。

【0319】

実施例10．B型インフルエンザウイルスのB/ウイスコンシン/2010に対する、マウスにおけるmAb 34B5Cのインビボ効力

20

マウスにおけるB型インフルエンザウイルス感染に対するmAb 34B5Cのインビボ効力を、以下のように実施した。DBA/2Jマウス（Jackson Lab、Bar Harbor、ME）を、インフルエンザ培地（DMEM、0.2%のBSA、2μg/mLのTPCK処理トリプシン）において最小LD₅₀用量（ 1×10^6 個のウイルス/マウス）で希釈したB型インフルエンザウイルス株のB/ウイスコンシン/2010の50μlにより、鼻腔内に感染させた。インフルエンザウイルス感染を、mAb 34B5Cの静脈内投与の前に、48時間または78時間進行させた。

【0320】

B型インフルエンザウイルスのB/ウイスコンシン/2010の感染の48時間または72時間後、様々な量のmAb 34B5Cを、200μlのPBS中の15mg/kg、5mg/kg及び1.7mg/kgの用量でマウスに静脈内投与した。対照処理動物には、mAb 34B5Cの最高試験用量に等しい用量（すなわち、およそ15mg/kg）でmAb gD5237を投与した。マウスを、身体状態及び生存について毎日モニターし、また、感染後の21日目まで毎日計量した。

30

【0321】

図7A及び7Bは、B型インフルエンザウイルスのB/ウイスコンシン/2010による感染の48または72時間後に、様々な量のmAb 34B5Cが投与されたマウスの生存率（%）（経時的、日数）をそれぞれ示す。図7A及び7Bに示されているように、100%の死亡率が、対照抗体が投与された感染マウスでは9日目または10日目までに観察された。しかし、mAb 34B5Cが投与された感染マウスでは、生存の増加を示した。（図7A及び7Bを参照すること。）

40

【0322】

これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が様々なB型インフルエンザウイルス感染を治療するのに有効であることを示した。加えて、これらのデータは、本発明のモノクローナル抗体がB型インフルエンザウイルス感染の少なくとも72時間後までに投与されたとき、B型インフルエンザウイルス感染を治療するのに有効であることを示した。

【0323】

実施例11．B型インフルエンザウイルスのB/ウイスコンシン/2010に対する、マウスにおけるmAb 46B8Cのインビボ効力

50

マウスにおけるmAb 46B8Cのインビボ効力を試験するため、4つの異なるB型インフルエンザウイルス株(B/ウイスコンシン/2010、B/ビクトリア/2000、B/ロシア/1969及びB/マサチューセッツ/1966)により感染したマウスに、抗体を静脈内投与した。DBA/2Jマウス(Jackson Lab、Bar Harbor、ME)を、インフルエンザ培地(DMEM、0.2%のBSA、2µg/mLのTPCK処理トリプシン)に1×LD₅₀用量で希釈した異なるB型インフルエンザウイルス株の50µlにより、鼻腔内に感染させた。

【0324】

一組の実験において、以下のB型インフルエンザウイルス単離菌を使用した。B/ウイスコンシン/2010、B/ビクトリア/2000、B/ロシア/1969及びB/マサチューセッツ/1966。感染の24、48または72時間後、抗赤血球凝集素mAb 46B8Cを、200µlのPBS中のおよそ15mg/kgで静脈内投与した。対照治療動物には、mAb gD5237(15mg/kg)を与えた。マウスを、身体状態及び生存についてモニターし、感染後の21日目まで計量した。

10

【0325】

図8A及び8Bに示されているように、100%の死亡率が、B型インフルエンザウイルス株のB/ウイスコンシン/2010及びB/ビクトリア/2000がそれぞれ投与されたマウスでは、10日目及び9日目までに対照治療群において観察された。B/ビクトリア/2000またはB/マサチューセッツ/1966のいずれかによる感染の24、48または72時間後に15mg/kgで投与された単回用量のmAb 46B8Cは、マウスの100%の生存率をもたらした。(図8B及び8Dを参照すること。)B/ウイスコンシン/2010またはB/ロシア/1969のいずれか(ならびに、B/ビクトリア/2000またはB/マサチューセッツ/1966のいずれか)による感染の24または48時間後に15mg/kgで投与された単回用量のmAb 46B8Cは、マウスの100%の生存率をもたらした。(図8A、8B、8C及び8Dを参照すること。)

20

【0326】

これらの結果は、mAb 46B8Cが、B型インフルエンザウイルスの様々な菌株の感染のインビボにおける治療に有効であったことを示した。特に、これらの結果は、mAb 46B8Cが感染の24、48または72時間後に投与されたとき、B型インフルエンザウイルス感染の治療及び生存の改善に有効であったことを示した。まとめると、これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体が感染の少なくとも72時間後までに投与されたとき、祖先、ヤマガタ及びビクトリア系列のB型インフルエンザウイルス単離菌の治療に有効であったことを示した。

30

【0327】

実施例12. B型インフルエンザウイルス感染の72時間後に投与されたときの、マウスにおけるmAb 46B8Cのインビボ効力

マウスにおけるB型インフルエンザウイルス感染に対するmAb 46B8Cの様々な用量のインビボ効力を、以下のように実施した。DBA/2Jマウス(Jackson Lab、Bar Harbor、ME)を、インフルエンザ培地(DMEM、0.2%のBSA、2µg/mLのTPCK処理トリプシン)において最小LD₅₀用量で希釈したB型インフルエンザウイルス株のB/ウイスコンシン/2010またはB/ビクトリア/2000の50µlにより、鼻腔内に感染させた。インフルエンザウイルス感染を、様々な用量のmAb 46B8Cの静脈内投与の前に、72時間進行させた。

40

【0328】

B型インフルエンザウイルス感染の72時間後、様々な量のmAb 46B8Cを、200µlのPBS中の45mg/kg、15mg/kgまたは5mg/kgの用量でマウスに静脈内投与した。対照処理動物には、最高試験用量に等しい用量のおよそ45mg/kgでmAb gD5237を投与した。マウスを、身体状態及び生存について毎日モニターし、また、感染後の21日目まで毎日計量した。

【0329】

50

図 9 A 及び 9 B に示されているように、B 型インフルエンザウイルス感染の 72 時間後の 45 mg / kg または 15 mg / kg のいずれかによる mAb 46B8C の投与は、B / ウィスコニン 2010 または B / ビクトリア / 2000 のいずれかに感染したマウスの 100 % の生存率をそれぞれもたらした。5 mg / kg の用量であっても、mAb 46B8C の投与は、マウスの生存率 (%) により測定すると、対照治療動物と比較して、B 型インフルエンザウイルスの B / ウィスコニン / 2010 及び B / ビクトリア / 2000 に対して治療処置効力を示した。このデータは、mAb 46B8C が B 型インフルエンザウイルス感染の少なくとも 72 時間後までに投与されたとき、B 型インフルエンザウイルス感染を治療するのに有効であることを示した。

【0330】

実施例 13 . マウスの重篤な B 型インフルエンザウイルス感染における mAb 46B8C とオセルタミビルインビボ効力の比較

マウスにおいて本発明の抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体とオセルタミビルリン酸塩 (Tamiflu (登録商標)) の効力を比較するため、以下の研究を実施した。6 週齢の Balb / c マウス (Charles River Laboratories, Hollister, CA) に、50 μ l の B 型インフルエンザウイルス株の B / ビクトリア / 2000 を $4 \times LD_{100}$ で鼻腔内に感染させた。感染の 48 時間後、抗赤血球凝集素抗体 mAb 46B8C を 200 μ l の PBS 中の単回用量の 45 mg / kg により、または対照 IgG を静脈内投与した。これらの実験において、5 日間の 1 日 2 回 (BID) の 2 mg の投与からなるオセルタミビル投与レジメンを、単回静脈内用量の約 15 mg / kg の mAb 46B8C と比較した。(本明細書に記載されている実施例のいずれかに使用されているオセルタミビル (すなわち、Tamiflu (登録商標)) は、Toronto Research Chemicals、カタログ番号 0701000 から得た。)

【0331】

図 10 A に示されているように、100 % の死亡率が、対照 IgG (mAb gD5237) 治療動物では 9 日目までに観察され、100 % の死亡率が、Tamiflu 治療動物では 11 日目までに観察された。しかし、単回 15 mg / kg 用量の mAb 46B8C は、およそ 75 % の感染動物を致死的な B 型インフルエンザウイルス負荷から保護した。加えて、mAb 46B8C により治療された動物は、体重変化率 (%) に回復を示した。(図 10 B を参照すること。)

【0332】

実施例 14 . mAb 46B8C は、Tamiflu との組み合わせにおいて安全であり、肺力価を低減する

マウスにおいて本発明の抗 B 型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体の使用及び効力とオセルタミビルリン酸塩 (Tamiflu (登録商標)) の使用及び効力を更に検査するため、以下の研究を実施した。6 週齢の Balb / c マウス (Charles River Laboratories, Hollister, CA) に、50 μ l の B 型インフルエンザウイルス株の B / ビクトリア / 2000 を $1 \times LD_{100}$ で鼻腔内に感染させた。感染の 48 時間後、抗赤血球凝集素抗体 mAb 46B8C を 200 μ l の PBS 中の単回用量の 15 mg / kg により、または対照 IgG を静脈内投与した。これらの実験において、5 日間の 1 日 2 回 (BID) の 2 mg の投与 (100 mg / kg) からなるオセルタミビル投与レジメンを、単回静脈内用量の約 15 mg / kg の mAb 46B8C と比較した。併用治療も実施した。

【0333】

図 11 A に示されているように、100 % の死亡率が、対照 IgG (mAb gD5237) 治療動物では 11 日目までに観察された。しかし、単回 15 mg / kg 用量の mAb 46B8C は、単独で、または Tamiflu と組み合わせて投与されたとき、マウスの 100 % の生存率をもたらした。加えて、mAb 46B8C と Tamiflu との組み合わせによる動物の治療は、このインビボ B 型インフルエンザウイルス感染モデルに

10

20

30

40

50

において安全でもあり、有効でもあった。

【0334】

図11Bに示されているように、mAb 46B8Cの単独での、またはTamifluと組み合わせた投与は、対照治療動物またはTamiflu単独で治療された動物に観察されたものと比較して、B型インフルエンザウイルスの肺力価の低減を示した。

【0335】

これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体がノイラミニダーゼ阻害剤（例えば、オセルタミビル）と組み合わせて使用されるとき、安全及び有効であることを示した。

【0336】

実施例15．マウスの重篤なB型インフルエンザウイルス感染モデルにおけるmAb 46B8Cとオセルタミビルの相乗作用 10

マウスにおいて本発明の抗B型インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗体とオセルタミビルリン酸塩（Tamiflu（登録商標））の共投与の効力を更に検査するため、以下の研究を実施した。6週齢のBalb/cマウス（Charles River Laboratories、Hollister、CA）に、50 μ lのB型インフルエンザウイルス株のB/ビクトリア/2000を4 $\times$ LD₅₀で鼻腔内に感染させた。感染の48時間後、抗赤血球凝集素抗体mAb 46B8Cを200 μ lのPBS中の単回用量の15mg/kg若しくは5mg/kgにより、または対照IgGを静脈内投与した。これらの実験において、5日間の1日2回（BID）の2mgの投与からなるオセルタミビル投与レジメンを、単回静脈内用量の約15mg/kgのmAb 46B8Cと比較した。20
これらの実験において、5日間の1日2回（BID）の2mgの投与（100mg/kg）からなるオセルタミビル投与レジメン。動物を、対照抗体、mAb 46B8C単独、オセルタミビル単独、またはmAb 46B8Cとオセルタミビルの組み合わせにより治療した。

【0337】

図12A及び12Bに示されているように、対照抗体またはTamifluのいずれかの単独が投与された動物は、9または10日目までに100%の死亡率を示した。加えて、5mg/kgのmAb 46B8Cが投与された動物は、この重篤なB型インフルエンザウイルス感染モデルにおいて、9日目までに100%の死亡率を示した。しかし、mAb 46B8CとTamifluの併用治療は、5mg/kgまたは15mg/kgのいずれの用量においても生存の増加をもたらした。 30

【0338】

これらの結果は、本発明の抗体をオセルタミビルと一緒に使用した併用治療が、いずれかの治療の単独と比較して、治療成果にある程度の相乗作用を提供することを示した。

【0339】

実施例16．競合的ELISA

競合的ELISAアッセイは、B型インフルエンザウイルス（例えば、/ビクトリア/2000、B/ウイスコンシン/2010等）の赤血球凝集素を使用して開発される。赤血球凝集素被覆ELISAプレートには、飽和濃度の本発明のビオチン標識モノクローナル抗体（例えば、mAb 48B8C等）の添加の前に、様々な濃度（X軸）の試験抗体を結合させる。試験抗体が、本発明のモノクローナル抗体のB型インフルエンザウイルス赤血球凝集素エピトープと競合する場合、ビオチンELISAシグナル（Y軸）は、増加する試験抗体濃度の関数として、減少する。結合データを非線形用量応答曲線に当てはめて、EC₅₀値をnMで決定する。 40

【0340】

本発明のモノクローナル抗体は、製造会社の推奨プロトコール（Sulfo-NHS-LC-LC、Pierce、Rockford、IL）に従ってアミンカップリングを介してビオチン化される。ビオチン化mAbの最終貯蔵濃度は、例えば、13.2mMである。使用の最適濃度を決定するため、ビオチン化mAbを、B型インフルエンザウイルスの固定化した赤血球凝集素に対して段階的に滴定する。組み換え赤血球凝集素タンパク質 50

を、リン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で $2 \mu\text{l} / \text{ml}$ に希釈し、96 ウェル Nunc Maxi sorp プレート (Nunc、Rochester、NY) に分配する ($100 \mu\text{l}$)。プレートを一晩かけて4 で被覆し、PBS ですすぎ、次に1% ウシ血清アルブミン (BSA、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) を含有する PBS により室温で1時間にわたって遮断する。

【0341】

次に各プレートは、1.0% の BSA 及び 0.05% のポリソルベート 20 (Sigma-Aldrich) を含有する PBS による 1/3 希釈液の 88 nM の初期濃度から出発する、 $100 \mu\text{l}$ の段階希釈ビオチン化 mAb を受ける。1時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次に $100 \mu\text{l}$ の 1:5000 希釈のストレプトアビジン複合ホースラデッシュペルオキシダーゼ (Caltag Laboratories、Carlsbad、CA) と共に、室温で30分間インキュベートする。インキュベーションの後、プレートを洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ の TMB 基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.、Gaithersburg、MD) と共に現像した。プレートを、SpectraMax プレート読み取り機 (Molecular Devices、Sunnyvale、CA) により O.D. 450 nM で読み取る。ビオチン化 mAb の最適濃度を、例えば、1 mM と決定する。

10

【0342】

実施例 17. B 型インフルエンザウイルスの B / プリスペン / 2008 に対する、マウスにおける mAb 46B8C のインビボ効力

20

ビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスである、B 型インフルエンザウイルス B / プリスペン / 2008 (Viapur, LLC、San Diego、CA) に対する、マウスにおける mAb 46B8C のインビボ効力を試験するため、以下の研究を実施した。DBA / 2 J マウスに、最小限の $1 \times \text{LD}_{50}$ 用量 (1×10^4 PFU / マウス) の B 型インフルエンザウイルスの B / プリスペン / 2008 を、鼻腔内に感染させた。感染の 24、48 及び 72 時間後に、8 匹の雌マウス / 群に、mAb 46B8C を 0.1 mL の PBS 中の $15 \text{ mg} / \text{kg}$ により静脈内投与した。マウスを、生存についてモニターし、感染後の 21 日目まで計量した。対照として、一群の感染マウスを、ヒト IgG 1 抗体の抗 gD (マウスにおいて既知の標的なし) の $15 \text{ mg} / \text{kg}$ により、感染の 72 時間後に治療した。

30

【0343】

図 26A に示されているように、100% の死亡率が、B 型インフルエンザウイルスの B / プリスペン / 2008 が投与されたマウスでは、対照治療群において 11 日目までに観察された。B 型インフルエンザウイルスの B / プリスペン / 2008 による感染の 24、48 または 72 時間後に $15 \text{ mg} / \text{kg}$ で投与された単回用量の mAb 46B8C は、マウスの 100% の生存率をもたらした。(図 26A を参照すること。) 図 26B は、上記に記載された様々な条件及び治療下でのマウスの体重の変化を示す。

【0344】

これらの結果は、mAb 46B8C がビクトリア系列の B 型インフルエンザウイルスの B / プリスペン / 2008 の感染治療に有効であったことを示した。

40

【0345】

統計分析

統計は、JMP バージョン 9.0.2 ソフトウェア (SAS Institute) を使用して計算した。生存率実験は、ログランク検定 (log-rank test) を使用して比較した。p 値 < 0.05 を有意であるとみなした。IC₅₀ 曲線及び値をプロットし、Graphpad Prism バージョン 5.0 ソフトウェアを使用して計算した。

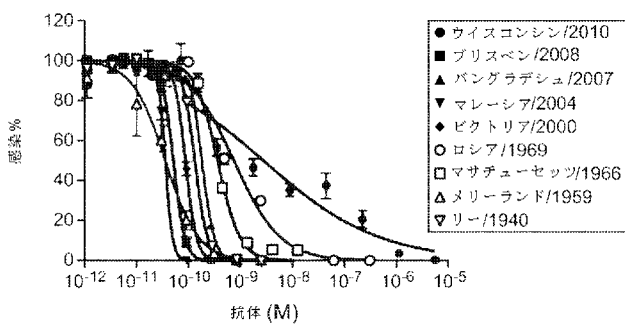
【0346】

前述の発明は、理解の明確化の目的のために説明及び例により幾らか詳細に記載されてきたが、記載及び例は、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。本

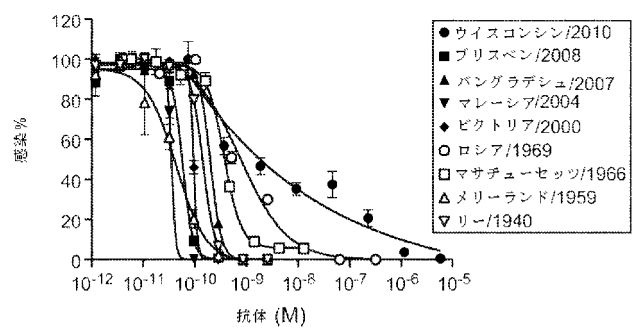
50

明細書に引用されている全ての特許及び科学文献の開示は、その全体が参照として明確に組み込まれる。

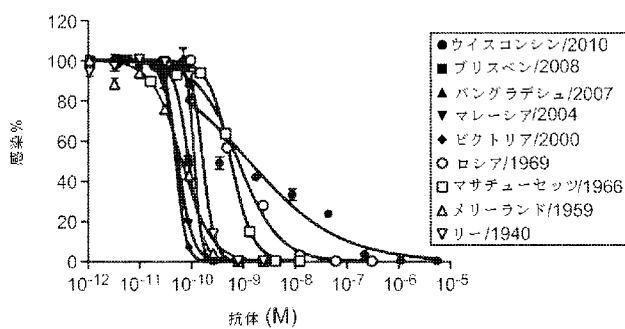
【図 1 A】



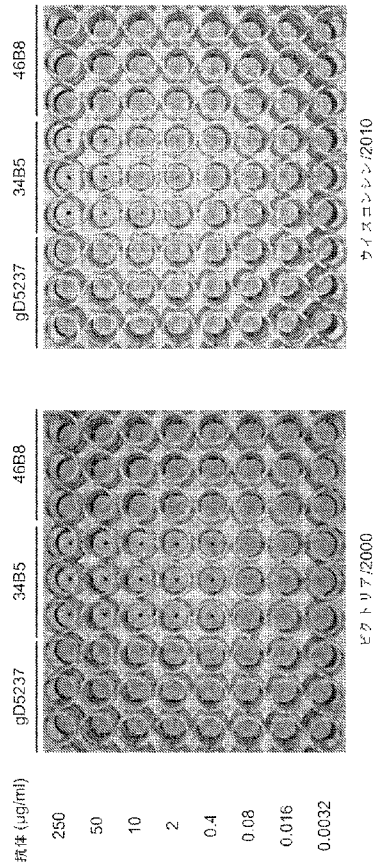
【図 2】



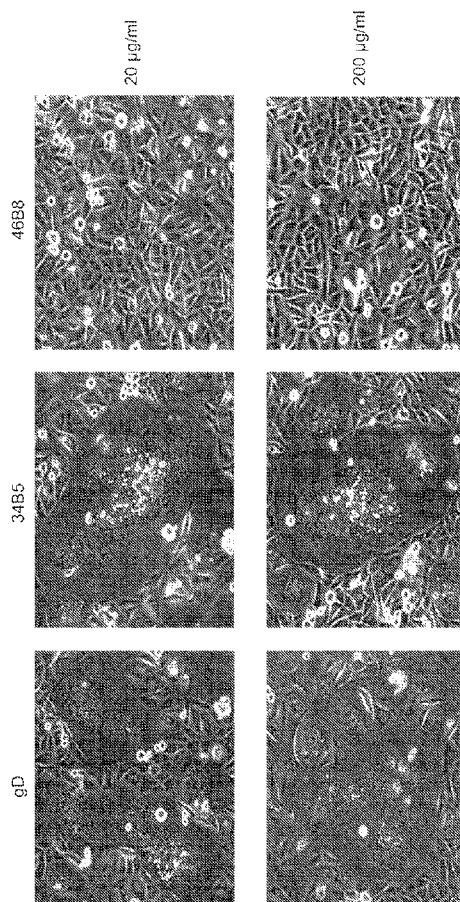
【図 1 B】



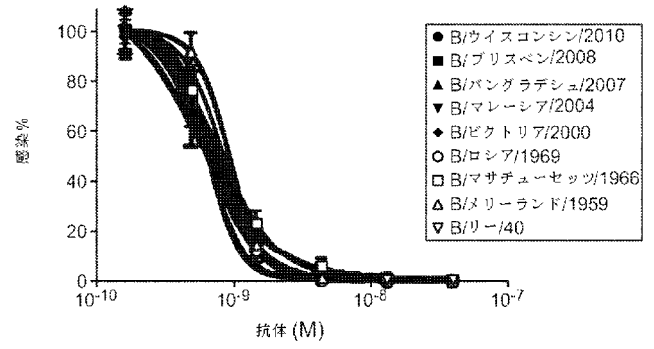
【 図 3 】



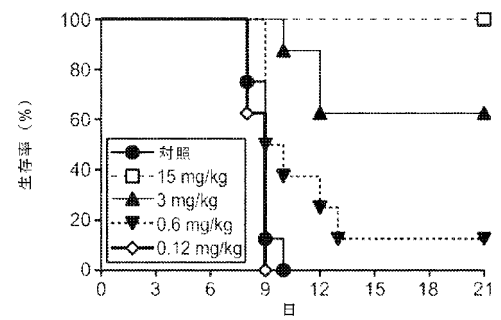
【 図 5 】



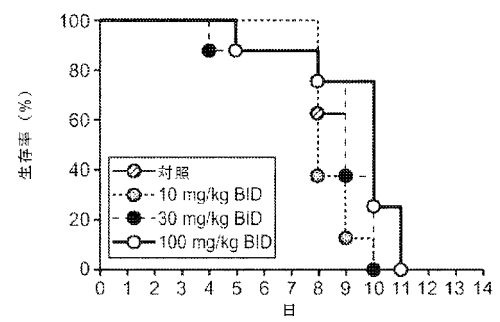
【 図 4 】



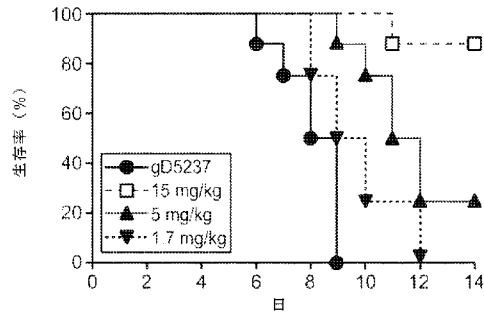
【 図 6 A 】



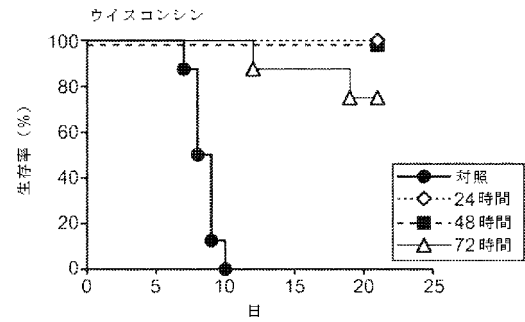
【 図 6 B 】



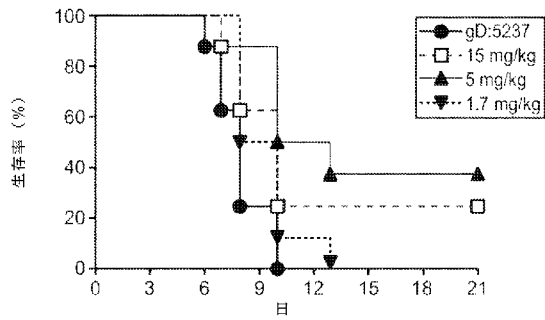
【図 7 A】



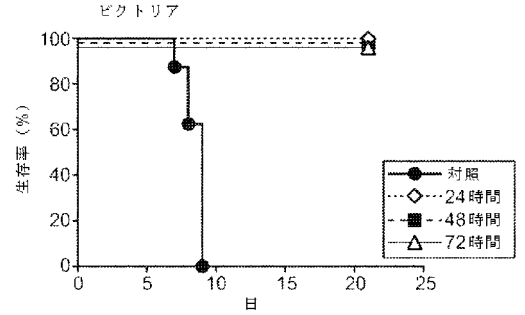
【図 8 A】



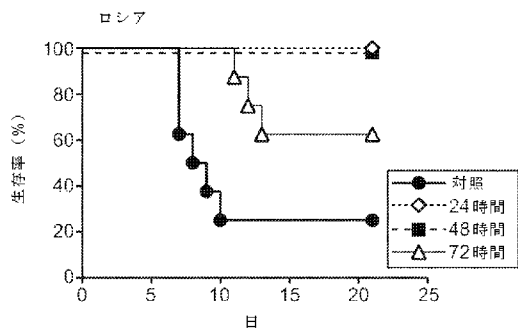
【図 7 B】



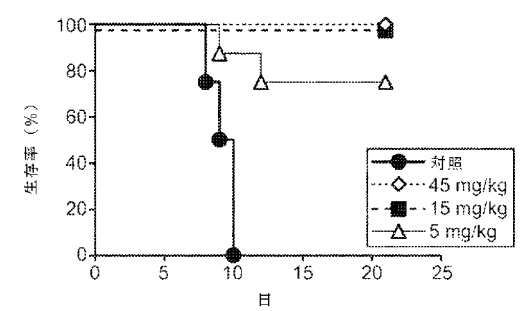
【図 8 B】



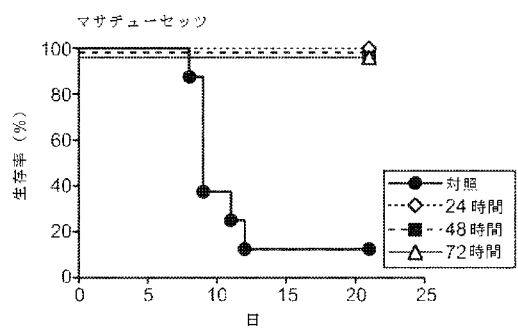
【図 8 C】



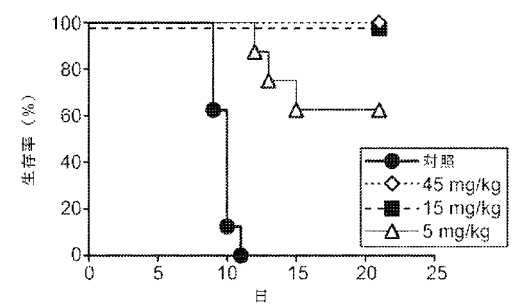
【図 9 A】



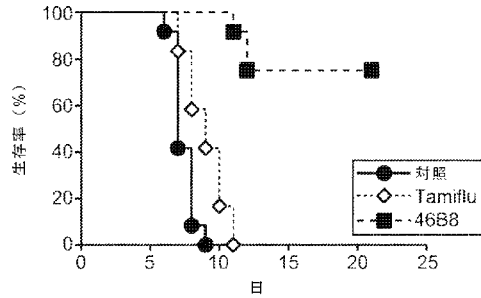
【図 8 D】



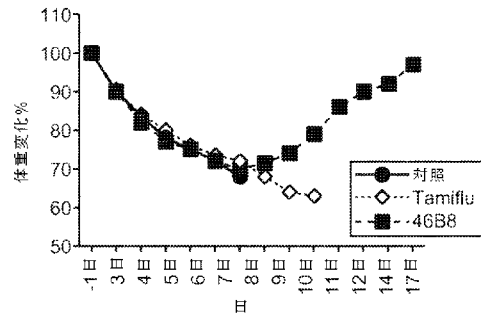
【図 9 B】



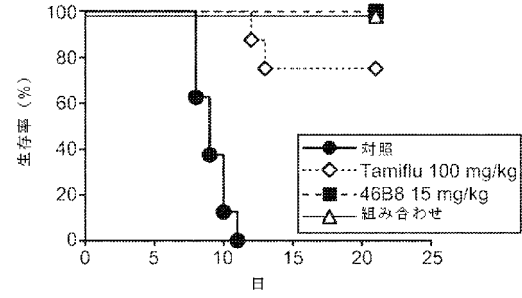
【図 10 A】



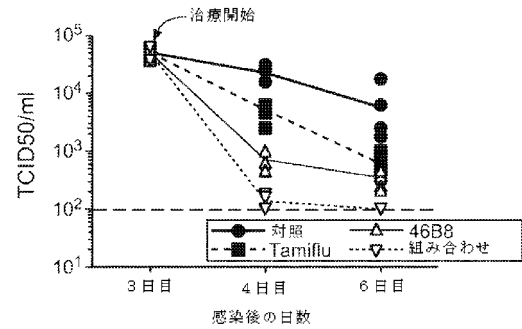
【図 10 B】



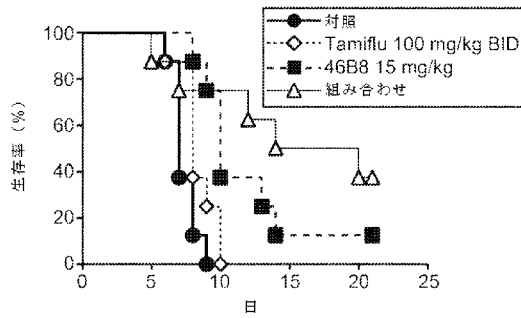
【図 11 A】



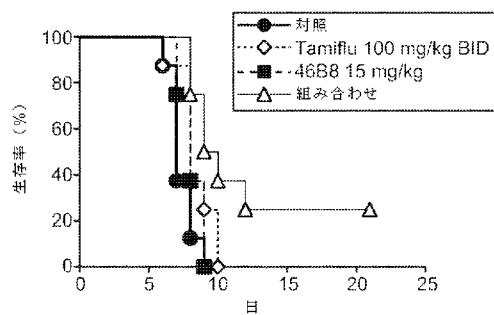
【図 11 B】



【図 12 A】



【図 12 B】



【図 13】

パブ	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
34B5A	TGSTD:GSIYVYS (配列番号: 55)	FVQRPS (配列番号: 57)	ASVAGNNIV (配列番号: 59)	GVYIH (配列番号: 61)	RIDPGSGITVAKFG (配列番号: 64)	WQWSDLYLGHFDP (配列番号: 75)
34B5B	TGSTD:GSIYVYS (配列番号: 55)	FVQRPS (配列番号: 57)	ASVAGNNIV (配列番号: 59)	GVYIH (配列番号: 61)	RIDPGSGITVAKFG (配列番号: 65)	WQWSDLYLGHFDP (配列番号: 75)
34B5C	TGSTD:GSIYVYS (配列番号: 55)	FVQRPS (配列番号: 57)	ASVAGNNIV (配列番号: 59)	GVYIH (配列番号: 61)	RIDPGSGITVAKFG (配列番号: 65)	WQWSDLYLGHFDP (配列番号: 75)
33F8	TGSTD:GSIYVYS (配列番号: 55)	FVQRPS (配列番号: 57)	ASVAGNNIV (配列番号: 59)	AHHNH (配列番号: 62)	WTPNNKNTVAKFG (配列番号: 66)	WQWSDLYLGHFDP (配列番号: 76)
46B8A	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 67)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8B	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 68)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8C	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 69)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8D	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 70)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8E	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 71)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8F	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 72)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8G	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 73)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)
46B8H	RSQSLIRNGYNYLD (配列番号: 56)	LGNNRAS (配列番号: 58)	QALQTPYT (配列番号: 60)	SQMTG (配列番号: 63)	WYFGSDITVSPFG (配列番号: 74)	QPGYSCVHYGMFDT (配列番号: 77)

【☒ 1 4】

maB 34b5A

軽微可変領域

QSVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
CASYAGNNIYVFGSGTKVT (配列番号: 78)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTAS (配列番号: 79)

軽鎖

QSVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
CASYAGNNIYVFGSGTKVTVLGQPKANPTVTLTPPSSELOANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKYAA
SSYLSTPEQWFSKHSYSQCVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号: 80)

重鎖

QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTASASTKGSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFA
VLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCPCPAPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIISKTEPVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVHODMLNGREYKCKVSKKALPAPTEKTIISKAKGQPREPQVYT
LPFSREMTKQVSLTCLVKGYFSPDAVEMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNHTQK
SLSLSPGK (配列番号: 81)

【☒ 1 6】

maB 34b5C

軽微可変領域

SAULTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
ASYAGNNIYVFGSGTKVT (配列番号: 86)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTAS (配列番号: 83)

軽鎖

SAULTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
ASYAGNNIYVFGSGTKVTVLGQPKANPTVTLTPPSSELOANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKYAA
SSYLSTPEQWFSKHSYSQCVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号: 87)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTASASTKGSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFA
VLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCPCPAPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVHODMLNGREYKCKVSKKALPAPTEKTIISKAKGQPREPQVYT
LPFSREMTKQVSLTCLVKGYFSPDAVEMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNHTQK
SLSLSPGK (配列番号: 88)

【☒ 1 5】

maB 34b5B

軽微可変領域

SVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
ASYAGNNIYVFGSGTKVT (配列番号: 82)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTAS (配列番号: 83)

軽鎖

SVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
ASYAGNNIYVFGSGTKVTVLGQPKANPTVTLTPPSSELOANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKYAA
SSYLSTPEQWFSKHSYSQCVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号: 84)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYIFTGYIHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNEGAGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCARWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTASASTKGSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFA
VLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCPCPAPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVHODMLNGREYKCKVSKKALPAPTEKTIISKAKGQPREPQVYT
LPFSREMTKQVSLTCLVKGYFSPDAVEMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNHTQK
SLSLSPGK (配列番号: 85)

【☒ 1 7】

maB 33bF

軽微可変領域

QSVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
CASYAGNNIYVFGSGTKVT (配列番号: 78)

重鎖可変領域

QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYITFNHHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNDGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCVRWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTAS (配列番号: 89)

軽鎖

QSVLTQPPSASGRGQSIITISCTGSDIGSYNVSWYQGHGTAPKVVILYVSQRPSGVDPDRFSGSKSGNTAFILTVSGLQTDDEADYY
CASYAGNNIYVFGSGTKVTVLGQPKANPTVTLTPPSSELOANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKYAA
SSYLSTPEQWFSKHSYSQCVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号: 80)

重鎖

QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYITFNHHHWRQAPQGQLEWNGRIDPNDGTTIAQKFQGRVLTMDTSTITAYMELSLRFD
DTAIYYCVRWNNFDLYLGWFDPMGQGTPTVTASASTKGSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFA
VLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCPCPAPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVHODMLNGREYKCKVSKKALPAPTEKTIISKAKGQPREPQVYT
LPFSREMTKQVSLTCLVKGYFSPDAVEMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNHTQK
SLSLSPGK (配列番号: 90)

【 1 8】

maB 4688A

軽微可変領域

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSS (配列番号: 92)

軽鎖

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPRKAVQMWKDVALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYERKHKYACAEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSSATKSPVFLAPSSKSTSGSTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGGFSVFLPPKPKDITLMISTRFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEHESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVWHEALHSHYTKQSLSLSPGK (配列番号: 94)

【 2 0】

maB 4688C

軽微可変領域

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSS (配列番号: 97)

軽鎖

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPRKAVQMWKDVALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYERKHKYACAEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSSATKSPVFLAPSSKSTSGSTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGGFSVFLPPKPKDITLMISTRFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEHESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVWHEALHSHYTKQSLSLSPGK (配列番号: 96)

【 1 9】

maB 4688B

軽微可変領域

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSS (配列番号: 95)

軽鎖

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPRKAVQMWKDVALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYERKHKYACAEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSSATKSPVFLAPSSKSTSGSTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGGFSVFLPPKPKDITLMISTRFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEHESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVWHEALHSHYTKQSLSLSPGK (配列番号: 96)

【 2 1】

maB 4688D

軽微可変領域

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSS (配列番号: 99)

軽鎖

DIWMTQSPILSPVTPGEPASTISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQILLIYIGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCKQALQTPYTFGGQTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPRKAVQMWKDVALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYERKHKYACAEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVQLVQSGAEVKKPKGSELKISKVSGYSTTSQWIGVWRQMPKGLWIGMYPGDSGTIYSPFQGVTTISADNSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCASGPGYSGYHYGWFDTWGQTLVTVSSATKSPVFLAPSSKSTSGSTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELIGGFSVFLPPKPKDITLMISTRFEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEHESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVWHEALHSHYTKQSLSLSPGK (配列番号: 100)

【☒ 2 2】

mab 46B8E

軽鎖可変鎖錠

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変鎖錠

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSSDTIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSS (配列番号: 101)

軽鎖

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGTASVVCILINNFYPRKAVQMKYDQNAIQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTTLTLKADYVEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSSDTIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSQGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELIGGFSVFLPPPKRDTLMISRFEVTC
VVDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSKKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPFSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAWEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号: 102)

【☒ 2 3】

mab 46B8F

軽鎖可変鎖錠

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変鎖錠

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSDDAIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSS (配列番号: 103)

軽鎖

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGTASVVCILINNFYPRKAVQMKYDQNAIQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTTLTLKADYVEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSDDAIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSQGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELIGGFSVFLPPPKRDTLMISRFEVTC
VVDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSKKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPFSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAWEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号: 104)

【☒ 2 4】

mab 46B8G

軽鎖可変鎖錠

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変鎖錠

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSDTIIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSS (配列番号: 105)

軽鎖

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGTASVVCILINNFYPRKAVQMKYDQNAIQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTTLTLKADYVEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

重鎖

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSDTIIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSQGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELIGGFSVFLPPPKRDTLMISRFEVTC
VVDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSKKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPFSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAWEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号: 106)

【☒ 2 5】

mab 46B8H

軽鎖可変鎖錠

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIK (配列番号: 91)

重鎖可変鎖錠

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGSDTIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSS (配列番号: 107)

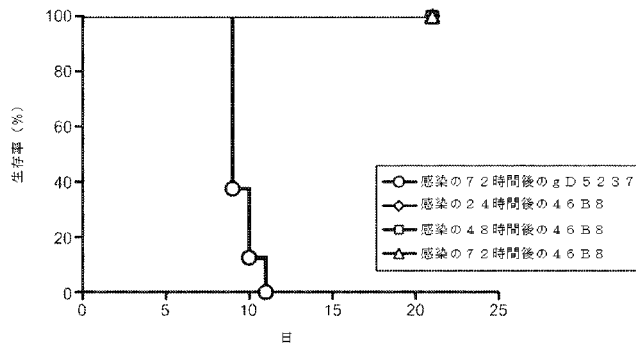
軽鎖

DIWMTQSPLSIPVTPGEPASISCRSSOSILRSNGYNIWDYLQKPGSQPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDTFLTKISRVEAFDVG
VYYCQALQTPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGTASVVCILINNFYPRKAVQMKYDQNAIQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTTLTLKADYVEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 93)

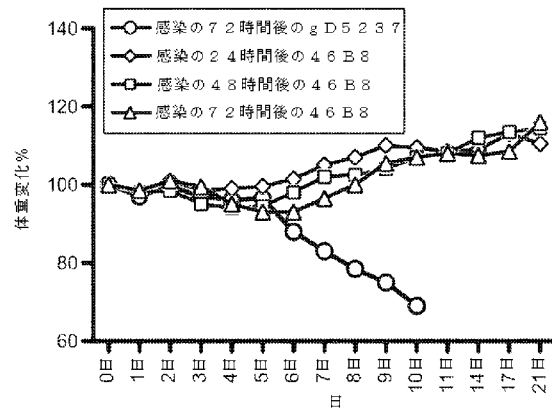
重鎖

EVLVQSGAEVKKKPGESLKISKVSGYSFTSQWIGWVQMPGKGLEWIGMYPGESDTIYSPFQGGVTISADNSISTAYLQWSSILKAS
DTAIYYCASGPGSGYHYGWFDTWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSQGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYICNVNHPKSTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELIGGFSVFLPPPKRDTLMISRFEVTC
VVDVSHEDPEVKFNMYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSKKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPFSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPEVDIAWEESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号: 108)

【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



【配列表】

2017512471000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/022758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/10 A61K39/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/132007 A1 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]) 12 September 2013 (2013-09-12) page 43, last paragraph - page 56, paragraph 2 -----	1-7, 22-31
X	WO 2013/007770 A1 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]; KWAKS THEODORUS HENDRIKUS JACOBUS [NL]; ZUIJD) 17 January 2013 (2013-01-17) examples 1,2,3,48,10 -----	1-7, 22-31
X	WO 2013/114885 A1 (UNIV OSAKA [JP]; UNIV OSAKA RES FOUND [JP]; MEDICAL & BIOL LAB CO LTD) 8 August 2013 (2013-08-08) abstract ----- -/--	1-7, 22-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2015

Date of mailing of the international search report

14/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/022758

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GERALD NAKAMURA ET AL: "An In Vivo Human-Plasmablast Enrichment Technique Allows Rapid Identification of Therapeutic Influenza A Antibodies", CELL HOST & MICROBE, vol. 14, no. 1, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 93-103, XP055103733, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2013.06.004 page 101, left-hand column, paragraph 4 - page 102, right-hand column, last paragraph -----	1-7, 25-29
A	MAYO YASUGI ET AL: "Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus", PLOS PATHOGENS, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 9, no. 2, 1 February 2013 (2013-02-01), pages e1003150-1, XP002738825, ISSN: 1553-7374, DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1003150 [retrieved on 2013-02-07] page 1, left-hand column, paragraph 1 - page 8, left-hand column, last paragraph -----	1-7, 22-31
A	KUBOTA-KOKETSU R ET AL: "Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 387, no. 1, 11 September 2009 (2009-09-11), pages 180-185, XP026378974, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.06.151 [retrieved on 2009-07-04] page 182, right-hand column, paragraph 4 - page 183, last paragraph -----	1-7, 22-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/022758**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7(completely); 22-31(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2015/ 022758

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7(completely); 22-31(partially)

An isolated anti-hemagglutinin monoclonal antibody that specifically binds influenza B virus hemagglutinin comprising light chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 56, 58 and 60; and heavy chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 63 and 77 for CDR1 and 3, respectively and SEQ ID NOs 67-74 for CDR2; nucleic acid sequences encoding these antibodies; application of these antibodies in the treatment and prevention of influenza B infection

2. claims: 8-14(completely); 22-31(partially)

An isolated anti-hemagglutinin monoclonal antibody that specifically binds influenza B virus hemagglutinin comprising light chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 55, 57 and 61; and heavy chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 61 and 75 for CDR1 and 3, respectively, and SEQ ID NOs 64 and 65 for CDR2; nucleic acid sequences encoding these antibodies; application of these antibodies in the treatment and prevention of influenza B infection

3. claims: 15-21(completely); 22-31(partially)

An isolated anti-hemagglutinin monoclonal antibody that specifically binds influenza B virus hemagglutinin comprising light chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 62, 66 and 76; and heavy chain CDR sequences shown in SEQ ID NOs 55, 57 and 59; nucleic acid sequences encoding these antibodies; application of these antibodies in the treatment and prevention of influenza B infection

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/022758

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013132007 A1	12-09-2013	AR 091316 A1	28-01-2015
		AU 2013229488 A1	18-09-2014
		CA 2865594 A1	12-09-2013
		CN 104169298 A	26-11-2014
		EA 201491656 A1	30-12-2014
		EP 2822968 A1	14-01-2015
		HK 1200176 A1	31-07-2015
		JP 2015518369 A	02-07-2015
		KR 20140135753 A	26-11-2014
		PH 12014501776 A1	10-11-2014
		US 2013243792 A1	19-09-2013
		US 2014065165 A1	06-03-2014
		US 2014341929 A1	20-11-2014
		US 2015037345 A1	05-02-2015
		WO 2013132007 A1	12-09-2013
WO 2013007770 A1	17-01-2013	AU 2012282504 A1	06-02-2014
		CA 2838999 A1	17-01-2013
		CN 103906763 A	02-07-2014
		EA 201490288 A1	30-05-2014
		EP 2731967 A1	21-05-2014
		JP 5683752 B2	11-03-2015
		JP 2014527403 A	16-10-2014
		KR 20140095017 A	31-07-2014
		US 2014120113 A1	01-05-2014
		WO 2013007770 A1	17-01-2013
WO 2013114885 A1	08-08-2013	CN 104245731 A	24-12-2014
		EP 2814841 A1	24-12-2014
		JP 2015512867 A	30-04-2015
		US 2014377262 A1	25-12-2014
		WO 2013114885 A1	08-08-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
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 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

- (72)発明者 シュイ, ミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 バラージュ, メルセデス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94545, ヘイワード, ドリフトウッド ストリート
2735
- (72)発明者 チャイ, ニン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 チェン, ナンシー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 チウ, ヘンリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 リン, チョンホア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ナカムラ, ジェラルド アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 バク, ヒョンジュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4B064 AG27 CC24 DA01

4B065 AA90X AA95X AC20 CA45

4C085 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06

4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 BA18 CA40 DA76 EA20 EA22 FA74