

(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2009-528828

(P2009-528828A)

(43) 公表日 平成21年8月13日 (2009.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 16/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/08	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-557594 (P2008-557594)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月6日 (2007.3.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月10日 (2008.11.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2007/000113  
 (87) 国際公開番号 W02007/101441  
 (87) 国際公開日 平成19年9月13日 (2007.9.13)  
 (31) 優先権主張番号 PA200600324  
 (32) 優先日 平成18年3月6日 (2006.3.6)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 60/874,716  
 (32) 優先日 平成18年12月14日 (2006.12.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

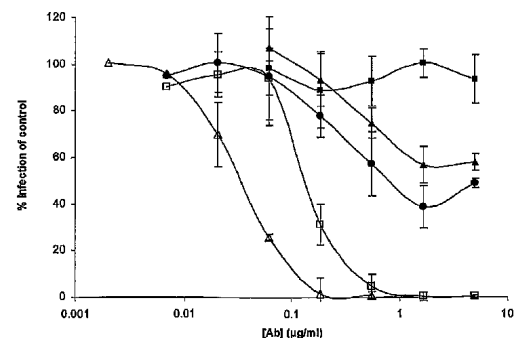
(71) 出願人 505257682  
 シムフォゲン・アクティーゼルスカプ  
 SYMPHOGEN A/S  
 デンマーク、デーコー 2800 コンゲン  
 ス・リングビー、ビッグニング 375、エレ  
 クトロヴァイ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消化器多核体ウイルス感染症の治療のための組み換えポリクローナル抗体

## (57) 【要約】

消化器多核体ウイルス (RSV) を標的とする新規ポリクローナル抗体、および RSV と反応する新規な高親和性抗体が開示される。前記ポリクローナル抗体は、RSV タンパク質 R および RSV タンパク質 G の両方と反応する抗体分子を含んでもよく、好ましくは、前記ポリクローナル抗体は、これらのタンパク質の様々なエピトープを標的とする。本発明の単一の抗体分子は、ピコモル範囲で低い解離定数を提供する親和性を示すことが示される。本発明の抗体を産生する方法ならびに RSV 感染のためのそれらの使用方法もまた開示される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

R S V サブタイプ A および B を中和することができる抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体であって、前記ポリクローナル抗体が、少なくとも 1 種の R S V 外被タンパク質における少なくとも 3 種の異なるエピトープと一緒に特異的に結合する別個の抗体メンバーを含む、抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 2】**

前記ポリクローナル抗体が、少なくとも 2 種の R S V 外被タンパク質に対する特異的な反応性を一緒に提供する別個の抗体メンバーを含む、請求項 1 記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

10

**【請求項 3】**

R S V 外被タンパク質が、R S V G タンパク質、R S V F タンパク質および R S V S H タンパク質から選択される、請求項 1 または 2 記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 4】**

抗 - 外被タンパク質の反応性が抗 - G および抗 - F 反応性であり、前記反応性が少なくとも 2 種の別個の抗 - G 抗体および少なくとも 1 種の別個の抗 - F 抗体により提供される、請求項 1 から 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 5】**

第 1 の抗 - G 抗体が、G - タンパク質における保存されたエピトープに特異的に結合でき、第 2 の抗 - G 抗体が、G - タンパク質システインリッチドメイン (G C R R) に特異的に結合でき、ならびに F - 反応性が、抗原部位 I、I I、I V、V、V I、C、または F 1 のうちの少なくとも 1 つに対して指向性である、請求項 4 記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

20

**【請求項 6】**

少なくとも抗 - G 反応性の一部が C X 3 C モチーフに対して指向性である、請求項 4 または 5 記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 7】**

抗 - G 反応性が、さらに少なくとも 1 種の株特異的なエピトープに対して指向性である、請求項 4 から 6 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

30

**【請求項 8】**

抗 - F 反応性が、少なくとも抗原部位 I I および抗原部位 I V に対して指向性である、請求項 4 から 7 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 9】**

抗 - 外被タンパク質の反応性が、請求項 4 から 8 に対して、または関して指向性であって、さらに S H タンパク質に対して指向性である、請求項 1 から 8 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 10】**

別個の抗体メンバーの組成物が、ドナーにおける R S V 外被抗原に対する多様性、親和性および特異性に関する液性免疫応答を反映する、請求項 1 から 9 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

40

**【請求項 11】**

請求項 1 から 10 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体であって、別個の抗体が、R S V に対する液性免疫応答を上げた一人またはそれ以上のヒトドナーから得られた核酸配列によりコードされ、前記ポリクローナル抗体が、十分にヒト抗体であるポリクローナル抗体。

**【請求項 12】**

別個の抗体メンバーが、ドナーに元々存在する V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> のペアーから構成される、請求項 10 または 11 記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

**【請求項 13】**

50

別個のメンバーが各々、表 5 に示される  $V_H$  および  $V_L$  のペアーの群から選択される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域を含む、請求項 1 から 1 2 のうちのいずれか記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 1 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体および医薬上許容される賦形剤を活性成分として含む、医薬組成物。

【請求項 1 5】

哺乳動物において R S V 感染に関連する 1 つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法であって、前記哺乳動物に請求項 1 から 1 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体または請求項 1 4 記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

10

【請求項 1 6】

有効量が、体重  $k g$  あたり抗体  $100 m g$  またはそれ以下であり、例えば、体重  $k g$  あたり抗体  $90 m g$  またはそれ以下、 $80 m g$  またはそれ以下、 $70 m g$  またはそれ以下、 $60 m g$  またはそれ以下、 $50 m g$  またはそれ以下、 $40 m g$  またはそれ以下、 $30 m g$  またはそれ以下、 $20 m g$  またはそれ以下、 $10 m g$  またはそれ以下、 $9 m g$  またはそれ以下、 $8 m g$  またはそれ以下、 $7 m g$  またはそれ以下、 $6 m g$  またはそれ以下、 $5 m g$  またはそれ以下、 $4 m g$  またはそれ以下、 $3 m g$  またはそれ以下、 $2 m g$  またはそれ以下、 $1 m g$  またはそれ以下、 $0.9 m g$  またはそれ以下、 $0.8 m g$  またはそれ以下、 $0.7 m g$  またはそれ以下、 $0.6 m g$  またはそれ以下、 $0.5 m g$  またはそれ以下、 $0.4 m g$  またはそれ以下、 $0.3 m g$  またはそれ以下、 $0.2 m g$  またはそれ以下および  $0.1 m g$  またはそれ以下である、請求項 1 5 記載の方法。

20

【請求項 1 7】

有効量が、少なくとも体重  $k g$  あたり抗体  $0.01 m g$  であり、例えば、少なくとも  $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$ 、 $0.4$ 、 $0.5$ 、 $0.6$ 、 $0.7$ 、 $0.8 m g$  である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 8】

有効量が、体重  $k g$  あたり抗体  $0.1 \sim 20 m g$  の間である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

抗体が、年間あたり少なくとも 1 回投与され、例えば、年間あたり 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 回で投与される、請求項 1 5 ~ 1 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

抗体が、R S V 感染を誘引するリスクの高い年の間に一定間隔で投与される、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

一定間隔が、1 週間、2 週間、1 ヶ月間、または 2 ヶ月間である、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

哺乳動物における R S V 感染に関連した 1 つまたはそれ以上の症状の治療、改善または予防のための組成物の調製のための請求項 1 から 1 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体または請求項 1 4 記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 2 3】

$V_H$  および  $V_L$  をコードするペアー ( p a i r s ) のレパートリーを作成する方法であって、メンバーが、R S V 感染から生じる液性免疫応答に関連する遺伝子のペアーを反映するものであって、

a . R S V に感染したドナーまたは R S V 感染から回復したドナーからリンパ球を含む細胞画分を提供し；

b . 任意選択的に、前記細胞画分から B 細胞または血漿細胞を濃縮し；

c . 前記細胞画分由来の細胞を複数の容器に個々に分配することを含む、単離された単

50

一細胞の集団を得て；次いで

d．前記単離された単一細胞に由来する鋳型を用いて、重複伸長 ( o v e r l a p e x t e n s i o n ) R T - P C R 法において、増幅させ、 $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーの連結を生じさせ；

e．任意選択的に、連結した  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのネスティド ( n e s t e d ) P C R を実施すること；

を含む方法。

【請求項 24】

請求項 1 から 13 のうちのいずれか 1 項記載の組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体を発現することができる、ポリクローナル細胞株。

10

【請求項 25】

個々の細胞が各々、単一の  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーを発現することができ、全体としてポリクローナル細胞株が  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションを発現することができ、各  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーが、抗 - R S V 抗体をコードする、ポリクローナル細胞株。

【請求項 26】

前記  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションが、請求項 23 の方法により作成される、請求項 25 記載のポリクローナル細胞株。

【請求項 27】

本明細書の表 5 に記載される抗体分子、あるいは前記抗体分子の特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログから選択される単離ヒト抗 R S V - 抗体分子であって、前記結合するフラグメントまたはアナログが、少なくとも前記単離抗体分子の相補性決定領域 ( C D R ) を含む単離ヒト抗 R S V - 抗体分子。

20

【請求項 28】

表 8 に記載された抗体に由来するか、あるいは配列番号：1 ~ 44 のうちの 1 つに含まれる重鎖 C D R アミノ酸配列および配列番号：1 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列より 88 高い配列番号を有する付随の軽鎖 C D R アミノ酸配列を含む、請求項 27 記載の抗体分子、フラグメントまたはアナログ。

【請求項 29】

ヒト抗体由来の F a b における C D R と同一である C D R を含み、前記 F a b は、物質輸送時の制限を避けるために非常に低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え R S V G タンパク質を用いて、B i a c o r e 3000 において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定する場合、500 n M またはそれ以下の R S V G タンパク質に対する解離定数  $K_D$  を示す、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

30

【請求項 30】

$K_D$  が、400 n M またはそれ以下であり、例えば、300 n M またはそれ以下、200 n M またはそれ以下、100 n M またはそれ以下、1 n M またはそれ以下であり、900 p M またはそれ以下、800 p M またはそれ以下、700 p M またはそれ以下、600 p M またはそれ以下、500 p M またはそれ以下、400 p M またはそれ以下、300 p M またはそれ以下、200 p M またはそれ以下、100 p M またはそれ以下、90 p M またはそれ以下、および 80 p M またはそれ以下である、請求項 29 記載の単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

40

【請求項 31】

ヒト抗体由来の F a b における抗原結合部位に同一である抗原結合部位を含み、前記 F a b は、物質輸送時の制限を避けるために非常に低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え R S V G タンパク質を用いて、B i a c o r e 3000 において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定する場合、500 n M またはそれ以下の R S V F タンパク質に対する解離定数  $K_D$  を示す、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

50

## 【請求項 3 2】

$K_D$  が、400 nM またはそれ以下であり、例えば、300 nM またはそれ以下、200 nM またはそれ以下、100 nM またはそれ以下、1 nM またはそれ以下であり、900 pM またはそれ以下、800 pM またはそれ以下、700 pM またはそれ以下、600 pM またはそれ以下、500 pM またはそれ以下、400 pM またはそれ以下、300 pM またはそれ以下、200 pM またはそれ以下、100 pM またはそれ以下、90 pM またはそれ以下、80 pM またはそれ以下、70 pM またはそれ以下、60 pM またはそれ以下、50 pM またはそれ以下、40 pM またはそれ以下、30 pM またはそれ以下、25 pM またはそれ以下、20 pM またはそれ以下、15 pM またはそれ以下、10 pM またはそれ以下、9 pM またはそれ以下、8 pM またはそれ以下、7 pM またはそれ以下、6 pM またはそれ以下、および 5 pM またはそれ以下である、請求項 3 1 記載の単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

10

## 【請求項 3 3】

クローン番号 810、818、819、824、825、827、858 または 894 で産生されるヒト抗体の CDR を含む、請求項 2 7 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 項記載の抗体分子あるいは特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

## 【請求項 3 4】

医薬上許容される担体、賦形剤、ビヒクルまたは希釈液との混合において、請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗体分子あるいは特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログを含む抗体組成物。

20

## 【請求項 3 5】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の 2 種の別個の抗体分子および / または特異的に結合するフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含む、請求項 3 4 記載の組成物。

## 【請求項 3 6】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の少なくとも 3 種の別個の抗体分子および / または特異的に結合するフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含み、かかる組成物が、4、5、6、7、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 種の別個の抗体分子および / またはフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含む、請求項 3 4 記載の組成物。

30

## 【請求項 3 7】

RSV F タンパク質に結合する少なくとも 1 種の抗体分子、フラグメントまたはアナログを含み、RSV G タンパク質に結合する少なくとも 1 種の抗体分子、フラグメントまたはアナログを含む、請求項 3 4 ~ 3 6 のうちのいずれか 1 項記載の組成物。

## 【請求項 3 8】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項で定義される少なくとも 1 種の CDR のアミノ酸配列をコードする、単離核酸フラグメント。

## 【請求項 3 9】

少なくとも表 5 に記載されたクローンのうちの 1 つにより産生される抗体の CDR をコードする、単離核酸フラグメント。

40

## 【請求項 4 0】

配列番号：1 ~ 44 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の CDR 配列をコードする、単離核酸フラグメント。

## 【請求項 4 1】

配列番号：89 ~ 132 のうちのいずれか 1 つに記載される軽鎖アミノ酸配列の CDR 配列をコードする、単離核酸フラグメント。

## 【請求項 4 2】

配列番号：1 ~ 44 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の CDR 配列および配列番号：1 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列より 88 高い配列番号を有する付

50

随の輕鎖 C D R アミノ酸配列をコードする、単離核酸フラグメント。

【請求項 4 3】

配列番号：4 5 ~ 8 8 および / または 1 3 3 ~ 1 7 6 に含まれるコーディング配列を含む、請求項 3 8 ~ 4 2 のうちのいずれか 1 項記載の核酸フラグメント。

【請求項 4 4】

請求項 3 8 ~ 4 3 のうちのいずれか 1 項に記載の核酸フラグメントを含む、ベクター。

【請求項 4 5】

自律的に複製することができる、請求項 4 4 記載のベクター。

【請求項 4 6】

プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群から選択される、請求項 4 4 または 4 5 記載のベクター。

10

【請求項 4 7】

5' 3' 方向および作動可能な連結において、請求項 3 8 ~ 4 3 のうちのいずれか 1 項に記載の第 1 の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも 1 つのプロモーターであって、必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第 1 の核酸フラグメント、任意選択で定常領域をコードする核酸配列、および任意選択で第 1 の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも 1 つの輕鎖 C D R をコードし、ならびに / あるいは

5' 3' 方向および作動可能な連結において、請求項 3 8 ~ 4 3 のうちのいずれか 1 項に記載の第 2 の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも 1 つのプロモーターであって、必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第 2 の核酸フラグメント、任意選択で定常領域をコードする核酸配列、および任意選択で第 2 の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも 1 つの重鎖 C D R をコードするもの

20

を含む、請求項 4 4 ~ 4 6 のうちのいずれか 1 項記載のベクター。

【請求項 4 8】

宿主細胞に導入される時に宿主細胞のゲノムに組み込まれる、請求項 4 4 ~ 4 7 のうちのいずれか 1 項記載のベクター。

【請求項 4 9】

請求項 4 4 ~ 4 8 のうちのいずれか 1 項のベクターを有する、形質転換細胞。

30

【請求項 5 0】

請求項 4 4 ~ 4 8 のうちのいずれか 1 項記載のベクターを有し、請求項 3 8 ~ 4 3 のうちのいずれか 1 項記載の核酸フラグメントを発現し、ならびに任意選択的にその表面上でその組み換え発現産物を分泌または保有する安定な細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、消化器多核体ウイルス感染症に関連した 1 つまたはそれ以上の症状の予防、治療または改善のための組み換えポリクローナル抗体に関する。本発明はまた、抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体 (抗 - R S V r p A b) を産生するポリクローナル発現細胞株に関する。さらに、本出願は、抗 - R S V r p A b を含む診断上および薬理学的組成物ならびに R S V 感染に関連する 1 つまたはそれ以上の症状の予防、治療または改善における使用を記載する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

消化器多核体ウイルス (R S V) は、幼児および小さな子供における下部呼吸器疾患の主な要因である。慢性肺疾患または先天性心臓疾患のごとく根本的な健康問題を抱える未成熟な幼児および子供は、R S V 感染後の細気管支炎および肺炎などの重篤な病気に対して最も高いリスクを有する。最近、R S V はまた、免疫不全の成人、特に骨髓移植被提供者、高齢者および肺疾患にかかっている人などの一定のリスクの高い成人において重要な

50

病変として認識されてきた。

【0003】

ヒトRSVは、パラミクソウイルス科ニューモウイルス属サブファミリーのメンバーであり、AおよびBサブタイプとして存在する。RSVは、外被性非分割型のマイナス鎖RNAウイルスである。ウイルスゲノムは、少なくとも11種のタンパク質をコードし、そのうちの3種が外被関連タンパク質、F（融合糖たんぱく質）、G（受容体-結合糖タンパク質）、およびSH（小疎水性タンパク質）である。外被タンパク質は、ウイルス表面上に存在し、ある程度まで感染した細胞の表面上にも存在する。Fタンパク質は、ウイルスと細胞膜の融合を促進し、それによりウイルスRNAの細胞質への侵入を可能にする。Fタンパク質は、2つのジスルフィド結合サブユニット、F<sub>1</sub>とF<sub>2</sub>からなり、574個のアミノ酸の不活性型N-グルコシル化前駆体のタンパク質分解性切断により産生される。Gタンパク質は、（ウイルス株に依存する）289～299個のアミノ酸のII型膜貫通糖タンパク質である。前駆形態は32kDaであり、N-およびO-連結オリゴ糖の付加により80～90kDaのタンパク質に成熟する。RSV Gタンパク質は、ビリオンの標的細胞への結合に関連する。Gタンパク質の膜-結合形態に加えて、短縮型の可溶性形態もまた産生される。この機能はウイルスと感染細胞から離れている免疫応答を再指令することが示唆される。さらに、Gタンパク質は、リンパ球の取り込みと同様に、ケモカインの修飾やサイトカインの発現のごとく多くの炎症性効果に関連することが示されている。SHタンパク質は64～65個のアミノ酸のタンパク質であり、精製されたRSV粒子の表面上に極めて低い量で存在するが、RSV感染細胞の表面上で豊富に発現される。SHタンパク質の機能は解明されていないが、ゴルジ複合体を介するウイルスタンパク質の輸送を補助しうる可能性がある（Rixon et al 2004, J.Gen.Virol.85:1153-1165）。GおよびFタンパク質の機能を阻害することは、RSV感染の予防に関係すると考えられている。

10

20

30

40

50

【0004】

RSV感染の予防と治療はこの数十年間大きく注目を浴びており、ワクチンの開発、抗ウイルス化合物（治療用に承認されたリバビリン）、アンチセンス薬物、RNA干渉（RNAi）技術および免疫グロブリンやモノクローナル抗体のごとき抗体産物を含む（Maggion and Barik, 2004, Rev.med.Virol.14:149-168で全て総説される）。これらの方法のなかで、静脈注射用免疫グロブリン、RSV-IVIg、およびモノクローナル抗体、パリビズマブはリスクの高い子供のRSV予防用に承認されている。

【0005】

しかしながら、RSV-IVIg（RespiGam）のごとき免疫グロブリン産物は、大量の注射を必要とする低い特異的活性のごとくいくつかの欠点を有することが知られ、前もっての集中的な治療のため静脈投与が限られる子供には困難である。さらに、バッチ間の変動が伴う問題とともに、血清由来の免疫グロブリン産物からのウイルス疾患の伝染のリスクもまた存在する。したがって、正常なドナーの約8%のみがRSVを中和するのに十分高い抗体力価を示すことから、高力価RSV免疫グロブリン産生の要請に見合う十分なドナーを得ることは困難である。

【0006】

Fタンパク質またはGタンパク質に対するモノクローナル抗体は、インビトロにおける中和効果およびインビボにおける予防効果を有することが示されてきた（例えば、Beeler and Coelingh 1989.J.Viro 163:2941-50; Garcia-Barreno et al 1989.J.Virol 63:925-32; Taylor et al 1984.Immunology 52: 137-142; Walsh et al 1984, Infection and Immunity 43:756-758; US 5,842,307およびUS 6,818,216）。今日、モノクローナル抗体パリビズマブはRSV-IVIgの使用から完全に取って代わった。中和アッセイは、パリビズマブおよびRSV-IVIgが、RSVサブタイプBに対して対等に作用する一方、パリビズマブがサブタイプAに対してより有効に作用することを示す（Johnson et al 1997.J.Infect.Dis 176:1215-24）。しかしながら、パリビズマブおよびNumaxのごとく産物により示されるようなモノクローナル抗体の優れた中和および予防効果にもかかわ

らず、これらにはまた、R S V ウイルスの性質による一定の欠点が付随しうる。

【0007】

R S V には、2つの別個の抗原グループまたはサブタイプ、AおよびBが存在する。ほとんどのR S V タンパク質は、2つのサブグループ間で高度に保存され、F タンパク質は91%のアミノ酸相同性を示す。しかしながら、G タンパク質は、AおよびBサブグループ間で53%のみのアミノ酸相同性を有する広範な配列可変性を示す (Sullender 2000, Clin.Microbiol.Rev 13:1-15)。ほとんどのタンパク質はまた、G タンパク質を除いて、アミノ酸レベルにおいて、サブグループA内で20%およびサブグループB内で9%まで相違するサブグループ内で限られた変動を示す。AおよびBのウイルスサブタイプは、異なる年の間で変化する相対頻度を伴って、多くのR S V 伝染病で共循環する。それゆえ、モノクローナル抗体は、両方のサブタイプならびにサブタイプ内の変化を中和することができるように慎重に選択されなければならない。

10

【0008】

2つのR S V サブタイプとサブタイプ内の多様性の問題点に加えて、ヒトR S V は、ほとんどのRNAウイルスと同様に、選択圧の下で急速な変異を行う能力を有する。mAbを用いるインビトロにおけるR S V エスケープ変異体の選択がよく知られている (例えば、Garcia-Barreno et al 1989.J.Virol 63:925-32)。重要なことに、最近、パリビズマブはインビボと同様にインビトロでもエスケープ変異体を選択し、その単離された変異体のいくつかはコットンラットにおけるパリビズマブ予防に完全に耐性であることが知見された (Zhao and Sullender 2005 J.Virol 79:3962-8およびZhao et al 2004.J.Infect.Dis 190:1941-6)。さらに、内在的にパリビズマブに耐性である野生型R S V 株も存在し得、それは、パリビズマブの起源であるマウス抗体がある臨床分離株を中和することに失敗することにより示された (Beeler and Coelingh 1989.J.Virol 63:2941-50)。その上、1つの明らかに耐性なウイルスもまた、免疫応答性コットンラットにおけるパリビズマブ予防後に同定された (Johnson et al 1997.J.Infect.Dis 176:1215-24)。それゆえ、一定条件下において、エスケープ変異体が存在するか、または治療の結果として時間とともに発生しうることから、単独の単一特異性の抗体の使用は、R S V 疾患の治療に適切または十分であり得ない。

20

【0009】

R S V - I V I G およびパリビズマブの有用性に関するさらなる検討事項は、有効な治療に必要とされる用量である。R S V 感染症のコットンラットモデルにおいて、肺のR S V 複製を100倍まで減少させるのに30  $\mu$ g / ml 以上の血清濃度が必要であることが示されている。R S V - I V I G においては、静脈に投与される月に750mg 総タンパク質 / kg の用量が、リスクの高い子供におけるR S V 入院の頻度を減少させるのに有効である一方、パリビズマブにおいては、月に15mg / kg の筋肉内用量が有効であることが証明された。しかしながら、複数回にわたる静脈内または筋肉内の大用量の投与は、患者にとって不便であり、R S V 感染症に対するリスクのある成人の広範なグループの予防および治療のためのこれらの産物の幅広い使用を妨げる。

30

【0010】

したがって、ドナーの利用可能性に依存せず、サブタイプAおよびBを網羅する1種またはそれ以上のR S V 抗原ならびにウイルス変異により生じるいずれかのエスケープ変異体に対して免疫特異的に結合し、高度に強力であり、改善された薬物動態学的プロファイルを示し、それゆえに総体として改善された治療プロファイルを示し、それによりより低頻度の投与および / またはより低用量の投与で足りる、抗体産物が必要である。

40

【0011】

(貢献の開示)

それゆえ、本発明の目的は、極めて強力な代替的な抗-R S V 免疫グロブリン産物であって、組み換えで産生され、消化器多核体ウイルスのサブタイプAおよびBに対して、ならびにエスケープ変異体の可能性を制限する主要な表面抗原のうちの少なくとも1つにおける複数のエピトープに対して、反応性を示す抗-R S V 免疫グロブリン産物を提供する

50



ことである。

【0012】

本発明はまた、新規のヒト抗-RSV抗体分子ならびにそれらの誘導体を提供することを目的とし、この抗体分子または誘導体は、既存のモノクローナル抗-RSV抗体および抗体誘導体を超えた改善された性質を示す。

【0013】

(本発明の説明)

RSVにおける複数のエピトープを標的とするポリクローナル抗体組成物の使用は、エスケープ変異体の発生を最小限にすることが期待され、多様性をもって自然界で循環するウイルスに対する保護をも提供することができる。血清由来のRSV-IVIgとは対照に、本発明のポリクローナル抗体は、非RSV抗原に結合する抗体分子を含まない。

10

【0014】

本発明は、ポリクローナル抗-RSV抗体を提供する。好ましくは、ポリクローナル抗-RSV抗体は、自然には抗体を産生しない細胞から得られる。かかる抗体は、組み換えポリクローナル抗体(rpAb)と呼ばれる。本発明の抗-RSV rpAbは、FまたはGタンパク質における複数のエピトープに対して指向性がある。特に、GおよびFタンパク質の両方における複数のエピトープにして指向性がある抗-RSV rpAbが好ましい。好ましくは、保存されたグループ、潜在的にサブタイプ-特異的グループおよび株-特異的グループに属するGタンパク質エピトープは、抗-RSV rpAbにより網羅される。さらに、第3の外被タンパク質、小分子疎水性(SH)タンパク質に対して反応性を有する抗体は、本発明の抗-RSV rpAbの望ましい構成要素である。

20

【0015】

さらに、本発明は、活性成分が抗-RSVポリクローナル抗体である医薬組成物、ならびにRSV感染症の予防、改善または治療のためのかかる組成物の使用を提供する。

【0016】

本発明は、RSVによる感染によって上昇された液性免疫応答を反映するための方法であって、かかる誘発した個体から元々のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子のペアーを単離し、次いでこの元々のペアーを維持する抗体を産生することによる方法をさらに提供する。

【0017】

(定義)

30

用語「抗体」は、血清の機能的な構成要素を記載し、多くの場合、分子のコレクション(抗体または免疫グロブリン)としてまたは1分子(抗体分子または免疫グロブリン分子)としてのどちらかで呼ばれる。抗体分子は、特異的な抗原性決定基(抗原または抗原性エピトープ)に結合または反応することができ、順に免疫学的なエフェクター機構の誘導を導きうる。個々の抗体分子は通常、単一特異性とされ、抗体分子の組成物は、モノクローナル(すなわち、同一の抗体分子からなる)またはポリクローナル(すなわち、同一の抗原におけるか、または別個の異なる抗原における同一または異なるエピトープと反応する異なる抗体分子からなる)であってもよい。各抗体分子は、その対応する抗原に特異的に結合することを可能にする固有の構造を有し、全ての自然の抗体分子は、2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖の同一の全体基本構造を有する。抗体はまた、免疫グロブリンとして総称される。本明細書で用いられるような用語、抗体は、最も広い意味で用いられ、インタクト(intact)な抗体、キメラ化、ヒト化、完全なヒトのおよび単一鎖の抗体、ならびにFab、FvフラグメントまたはscFvフラグメントのごとき抗体の結合フラグメント、ならびに二量体IgA分子または五価IgGのごとき多量体型を網羅する。いくつかの例では、本出願は、用語「合成もしくは半合成抗体アナログ」を用い、それは、特に(RSV抗原への特異的な結合を示すことより)抗体の性質を示す天然に存在しない分子を意味し、天然に存在する抗体に由来するCDRを含み、-かかるアナログは、例えば、scFvフラグメント、二重特異性抗体などにより表されるが、例えば、本明細書で開示される抗-RSV抗体分子に由来するCDR(例、当該技術分野で周知の移植技術による)を含むように改良される表面上天然に存在する抗体-例えば、かかる抗体

40

50

アナログは、別の動物種の抗体分子に取り込まれている、あるいは同一種由来の異なる抗体アイソタイプもしくはクラスに取り込まれている、本明細書に開示される C D R を含む。

【 0 0 1 8 】

用語「抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体」または「抗 - R S V    r p A b」は、組み換えで産生される多様な抗体分子の組成物であって、各メンバーが消化器多核体ウイルスにおける少なくとも 1 つのエピトープに結合することができ、全体としてのポリクローナル抗体が R S V を中和することができる抗体分子の組成物を記載する。好ましいのは、抗 - R S V    r p A b 組成物は、R S V サブタイプ A および B の両方を中和する。さらに好ましいのは、抗 - R S V    r p A b は、G および F タンパク質に対する結合反応性をさらに含む。好ましいのは、組成物は、単一のポリクローナルを生成する細胞株から産生される。

10

【 0 0 1 9 】

用語「同種 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアー ( p a i r s )」は、同一細胞内に含まれるか、または由来する V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードする配列の元々のペアーを記載する。したがって、同種 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> のペアーは、かかる細胞が由来するドナーに元々存在する V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> のペアーを表す。用語「V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーから発現される抗体」は、抗体または抗体フラグメントが、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードする配列を含むベクター、プラスミドまたは類似物から産生されることを示す。同種の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーが、完全な抗体として、またはそれらの安定なフラグメントとして発現される場合、それらは、それらが由来する細胞で元々発現される抗体の結合親和性および特異性を維持する。同種ペアーのライブラリーはまた、同種ペアーのレパートリーまたはコレクションとも称され、個別に保存されるか、またはプールされうる。

20

【 0 0 2 0 】

用語「組み換えポリクローナル抗体の別個のメンバー」は、可変領域内の 1 つまたはそれ以上の鎖を含む組み換えポリクローナル抗体組成物の個々の抗体分子を表し、他のポリクローナルタンパク質の個々のメンバーと比較してアミノ酸配列の相違により特徴付けられる。これらの鎖は、特に、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域に局在される。

【 0 0 2 1 】

用語「エピトープ」は、一般に、動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトにおける抗原性または免疫原性活性を有する大型分子の一部または大型分子の部分（例、抗原または抗原部位）を記載するのに用いられる。免疫原性活性を有するエピトープは、動物における抗体応答を誘導する大型分子の一部である。抗原性活性を有するエピトープは、当該技術分野でよく知られる方法のいずれかにより、例えば、本明細書に記載される免疫アッセイにより調べられるように、抗体が免疫特異的に結合する大型分子の一部である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。抗原は、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する物質、例えば、毒素、ウイルス、細菌、タンパク質または D N A である。抗原または抗原部位は、それらが非常に小さくない限り、多くの場合、1 つより多くのエピトープを有し、免疫応答を活性化することができる。同一の抗原における異なるエピトープに結合する抗体は、それらがエピトープの局在に依存して、結合する抗原の活性を変化させる効果を示すことができる。抗原の活性部位におけるエピトープに結合する抗体は、抗原の機能を完全に妨害しうる一方、異なるエピトープに結合する別の抗体は、単独で抗原の活性に全くまたはほとんど効果を示し得ない。しかしながら、かかる抗体は、さらに補体を活性化し、それにより抗原の排除が起き、次いで同一の抗原の異なるエピトープに結合する 1 つまたはそれ以上の抗体と結合される場合に相乗効果を生じうる。本発明では、大型分子のエピトープの一部は、好ましくは R S V ポリペプチドの一部である。本発明の抗原は、好ましくは、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、R S V 関連タンパク質、ポリペプチドまたはそれらのフラグメントである。R S V 関連抗原はまた、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、R S V ポリペプチドまたはそのフラグメントのアナログまたは誘導體であってもよい。

30

40

50

## 【 0 0 2 2 】

例えば、DNA、RNAまたはタンパク質の配列に関連して用いられる用語「完全なヒト」は、98から100%のヒト配列を記載する。

## 【 0 0 2 3 】

用語「免疫グロブリン」は、一般に、血液または血清中で見出される抗体の混合物の総称として用いられるが、他の起源に由来する抗体の混合物を表すのに用いられてもよい。

## 【 0 0 2 4 】

用語「液性免疫応答を反映する」は、ポリクローナル抗体に関して用いられる場合、個々の抗体メンバーをコードする核酸配列が、抗-RSV特異的抗体を産生する血漿細胞の発生頻度の上昇を伴うドナーに由来する抗体組成物を意味する。かかるドナーは、RSV感染から回復したものであるか、RSVに感染した個体と密接な関係を示すものであるか、あるいはRSVワクチン接種を受けたもののいずれかであってもよい(RSVワクチンの例は、例えば、Maggon and Barik, 2004, Rev.med.Virol.14:149-168を参照)。感染または誘発によってドナー内で上昇した抗体の親和性および特異性を反映させるために、可変重鎖( $V_H$ )および可変軽鎖( $V_L$ )をコードする配列は、それらが単離される時に、ドナー内に元々存在する遺伝子のペアまたは組合せ(同種のペア)で維持されるべきである。ドナーにおける液性免疫応答の多様性を反映するため、RSVに結合する抗体をコードする全ての配列は、スクリーニング手順に基づいて選択される。単離された配列は、可変領域、特に、CDR領域の多様性に関して、または $V_H$ および $V_L$ ファミリーに関しても解析される。これらの解析に基づいて、RSVに結合する抗体の全体の多様性を表す同種ペアの集団が選択される。かかるポリクローナル抗体は、典型的に、少なくとも5、10、20、30、40、50、100、1000または $10^4$ 個の別個のメンバーを有する。

## 【 0 0 2 5 】

組成物は、その投与が受容する患者により耐性化されうる場合、「薬理学的に許容される」と言われる - 同じことを、組成物の一部である賦形剤、ビヒクル、担体および希釈剤に適用する。

## 【 0 0 2 6 】

用語「ポリクローナル抗体」は、同一または異なる抗原における数種の特異的な抗原性決定基/エピトープと結合するか、または反応することができる異なる(多様な)抗体分子の組成物であって、組成物中のそれぞれ個々の抗体が特定のエピトープと反応することができる組成物を記載する。通常、ポリクローナル抗体の可変性は、いわゆるポリクローナル抗体の可変領域、特にCDR1、CDR2およびCDR3領域に位置される。本発明では、ポリクローナル抗体は、ポリクローナル細胞株からワンポットで産生されるか、または異なるポリクローナル抗体の混合物のどちらかであってもよい。モノクローナル抗体の混合物は、それらが個々のバッチ内で産生され、必ずしも、例えば、翻訳後修飾の相違を生じる同一の細胞株に由来しないことから、ほとんどポリクローナル抗体とは考えられていない。しかしながら、モノクローナル抗体の混合物が、本発明のポリクローナル抗体として同一の抗原/エピトープの範囲(coverage)を提供する場合、ポリクローナル抗体の等価物として考えられる。ポリクローナル抗体のメンバーが抗原/抗原部位/エピトープに対して特異的に結合するか、または特異的な反応性を有すると記載する場合、本明細書では、結合定数が100nM以下、好ましくは10nM以下、さらにより好ましくは1nM以下であることを意味する。

## 【 0 0 2 7 】

用語「組み換え抗体」は、発現ベクターでトランスフェクトされた細胞または細胞株から発現される抗体分子または数種類の分子を記載するのに用いられ、この発現ベクターは、自然界ではその細胞に付随していない抗体のコーディング配列を含む。組み換え抗体組成物中の抗体分子が多様であるか、または相違する場合、用語「組み換えポリクローナル抗体」または「r p A b」は、ポリクローナル抗体の定義に従って適用する。

## 【 0 0 2 8 】

用語「組み換えポリクローナル細胞株」または「ポリクローナル細胞株」は、変異型の核酸配列のレパートリー（例、抗体をコードする核酸配列のレパートリー）でトランスフェクトされるタンパク質の混合物／集団を発現する細胞を意味し、変異型の核酸配列は、自然界ではトランスフェクトされた細胞に付随していない。好ましいのは、トランスフェクションは、組み換えポリクローナル細胞株と一緒に構成する個々の細胞が各々、目的の単一で別個の核酸配列の転写活性コピーを保持し、目的の組み換えポリクローナル抗体の1つのメンバーをコードするように行われる。さらにより好ましいのは、別個の核酸配列の単一コピーのみがゲノム中の特異的な部位に組み込まれる。組み換えポリクローナル細胞株を構成する細胞は、目的の別個の核酸配列の組み込まれるコピーを保持する能力について、例えば、抗生物質選択により選択される。かかるポリクローナル細胞株を構成することができる細胞は、例えば、細菌、真菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または哺乳動物細胞のごとき真核細胞、特に、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、骨髓腫細胞（例、Sp2/0細胞、NS0）、NIH 3T3、YB2/0のごとき不死化哺乳動物細胞株、ならびに、HeLa細胞、HEK293細胞、またはPER.C6のごとき不死化ヒト細胞でありうる。

10

#### 【0029】

用語「 $V_H$  および  $V_L$  のペアーをコードする配列」または「 $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列のペアー」は、各分子が、可変重鎖および可変軽鎖の発現をコードする配列を含む核酸分子を示し、これらは、適切なプロモーターおよび／またはIRES領域が存在し、配列に作動可能に連結される場合、核酸分子に由来する一組として発現されうる。核酸分子はまた、重鎖および／または軽鎖の定常領域の一部または完全な定常領域をコードし、適切なプロモーターおよび／またはIRES領域が存在し、配列に作動可能に連結される場合に、Fabフラグメント、全長抗体または他の抗体フラグメントが発現されてもよい。

20

#### 【0030】

組み換えポリクローナル抗体は、投与される量が生理学的に有意である、例えば、動物またはヒトにおけるRSV感染を予防するか、または弱毒化する場合に、「治療上有効な量」で投与されることとされる。

#### 【0031】

（図面の説明）

30

図1：（A）プロトタイプ株、Long（サブタイプA）および18537（サブタイプB）由来の全体のGタンパク質のアミノ酸配列の並列比較。シグナル／膜貫通領域を点線で囲う。Cane et al1991 J.Gen.Virol. 72:2091-2096により同定されるようなアミノ酸101～133および208～299の間の2つの可変領域を下線で特定する。Gタンパク質の中心フラグメントはE.coliで融合タンパク質として発現され、黒色で囲う。2つのアミノ酸配列を、配列番号：711（サブタイプA）および配列番号：712（サブタイプB）に記載する。（B）（A）に示される中心フラグメントの並列比較。13-aa保存領域およびGタンパク質システインリッチドメイン（GCCR）の局在を角括弧で示す。（両サブタイプ間で同一の）GCCRにおけるジスルフィド架橋を四角角括弧で示す。2つのアミノ酸配列を配列番号：713（サブタイプA）および配列番号：714（サブタイプB）に記載する。

40

#### 【0032】

図2：多重重複伸長RT-PCR（A）およびクローン化工程（B）の模式的概要。（A） $V_H$  および  $V_K$  遺伝子ファミリー各々に特異的な2組のプライマー、CH+VH1-8およびVK1-6+CK1を第一のPCR工程に用いた。 $V_H$  または  $V_K$  プライマー間の相同領域は重複するPCR産物を生じる。第2工程において、この産物をネステッドPCRで増幅させる。プライマーはまた、クローン化を容易にする制限酵素の認識部位を含む。（B）作成した同種の連結 $V_H$  および  $V_K$  をコードするペアーをプールし、隣接するXhoIおよびNotI制限部位の使用により哺乳動物IgG発現ベクターに挿入した。次いで、全長抗体の発現を促進するために、二方向性プロモーターを連結 $V_H$  および  $V_K$

50

をコードする配列間の A s c I - N h e I 制限酵素部位に挿入する。用いられる P C R プライマーを平行矢印により示す。C H 1 : 重鎖定常領域 1、C L : 定常領域、L C : 軽鎖 ; A b : 抗体 ; P 1 - P 2 : 二方向性プロモーター。

#### 【 0 0 3 3 】

図 3 : 哺乳動物全長抗体発現ベクター 0 0 - V P - 5 3 0 の模式図。ベクターは以下の構成要素を含む : A m p および A m p p r o = アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター。p U C 開始点 = p U C 複製開始点。P 1 = 軽鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。P 2 = 重鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。リーダー I G H V = ゲノムヒト重鎖リーダー。V H = 重鎖可変領域をコードする配列。I g G 1 = ゲノム免疫グロブリンアイソタイプ G 1 重鎖定常領域をコードする配列。ウサギ - グロブリン A = ウサギベータ - グロブリンポリ A 配列。カップリーダー = マウスカップリーダーをコードする配列。L C = 軽鎖をコードする配列の配列。S V 4 0 t e r m = サルウイルス 4 0 転写終結配列。F R T = F l p 認識標的的部位。N e o = ネオマイシン耐性遺伝子。S V 4 0 p o l y A = サルウイルス 4 0 ポリ A シグナル配列。

#### 【 0 0 3 4 】

図 4 : ビアコア ( B i a c o r e ) 解析を用いてクローン 8 0 1 から得られた抗体 ( A b 8 0 1 ) のエピトープ特異性の特徴付け。抗体 8 0 1 結合を、3 つの抗体、9 c 5 ( 2 )、1 3 3 - h ( 3 ) およびパリビズマブ ( 4 ) であって、各々、抗原部位 F 1、C および I I に結合する抗体を用いて、タンパク質 F への結合に関する対競合 ( p a i r - w i s e c o m p e t i t i o n ) でテストした。対照の細胞は、競合しない A b 8 0 1 ( 1 ) のタンパク質 F への結合を示す。4 つの抗体の注入時間を矢印により示す。応答を相対的共鳴単位 ( R U ) で示す。長い両方向矢印は競合しない応答の大きさを示し、短い両方向矢印は 9 c 5 で阻害された応答の大きさを示す。

#### 【 0 0 3 5 】

図 5 : 図は、R S V サブタイプ A および B 株のインビトロ中和の結果である。抗 - F 抗体混合物の希釈物を、R S V l o n g ( グラフ A ) および R S V B 1 ( グラフ B ) 株を中和する能力についてテストした。クローン 8 1 0、8 1 8、8 1 9、8 2 5 および 8 2 7 から得られた抗体混合物、抗 - F ( I ) を三角形 ( ) として示し、クローン 7 3 5、8 0 0、8 1 0、8 1 8、8 1 9、8 2 5、8 2 7、8 6 3、8 8 0、8 8 4 および 8 9 4 から得られた抗体混合物、抗 - F ( I I ) を四角形 ( ) として示す。パリビズマブをダイヤモンド ( ) として示し、アイソタイプに適合する陰性コントロール ( 抗 - アカゲザル D ) 抗体を円 ( ) として示す。吸光度を 4 9 0 n m で測定し、R S V 複製と相関関係にある。

#### 【 0 0 3 6 】

図 6 : 図は、インビトロ R S V 融合阻害アッセイの結果である。抗体混合物の希釈物を、R S V B 1 株を中和する能力についてテストした。クローン 8 1 0、8 1 8、8 1 9、8 2 5、8 2 7、7 9 6、8 3 8 8 4 1、8 5 6 および 8 8 8 から得られる抗体混合物、抗 - F ( I ) G を白抜きの四角形 ( ) として示し、7 3 5、8 0 0、8 1 0、8 1 8、8 1 9、8 2 5、8 2 7、8 6 3、8 8 0、8 8 4、8 9 4、7 9 3、7 9 6、8 3 8、8 4 1、8 5 6 および 8 8 8 から得られる抗体混合物、抗 - F ( I I ) G を、白抜きの三角形 ( ) として示す。パリビズマブをダイヤモンド ( ) として示す。吸光度を 4 9 0 n m で測定し、R S V 複製と相関関係にある。

#### 【 0 0 3 7 】

図 7 : 図は、活性な補体の存在下で P R N T により測定されるごとく抗 - G 抗体クローンの組み合わせによる R S V のインビトロ中和からの結果である。( 表 8 に記載される ) 個々の抗体組成物の希釈物を、ウサギ補体の存在下における R S V 株 L o n g とインキュベートし、その後、H E p - 2 細胞を感染させた。インキュベーション 2 4 時間後、感染の程度を、R S V 特異的血小板の免疫検出を用いて検出した。抗 - R S V r p A b 1 3 を白抜き三角形 ( ) として、抗 - R S V r p A b 3 5 を三角形 ( ) として、抗 - R S V r p A b 3 6 を四角形 ( ) として、抗 - R S V r p A b 4 1 を円 ( ) として

10

20

30

40

50

、ならびに抗 - R S V r p A b 4 5 を白抜き四角形 ( ) として示す。データをコントロール  $\pm$  S D と比較して % 感染として表す。

【 0 0 3 8 】

( 発明の詳細な説明 )

標的抗原およびポリクローナル抗体組成物

本発明のポリクローナル抗体は、同一の組成物中に多くの別個の抗体分子を含む。各分子は、R S V 関連抗原に結合する能力に基づいて選択される。本発明のポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体組成物を構成する別個の抗体分子の集められた ( c o m p i l e d ) 結合反応性に相当する結合反応性を含む。

【 0 0 3 9 】

本発明の抗 - R S V ポリクローナル抗体は、好ましくは、G および F タンパク質の両方に対する収集された結合反応性、より好ましくは、エスケープ変異体の発生のリスクを最小限にし、最も高い可能性のある中和能力を達成する複数のエピトープに対する集められた結合反応性を含む。中和抗体により認識される少なくとも 5 つの主要な抗原部位は、F タンパク質において同定されている ( Lopez et al 1998. J. Virol 72:6922-8 )。全ての抗原部位は F<sub>1</sub> 鎖にマップされ、部位 I、I I、I V、V および V I を含み、部位 I および I I は各々、B および A と呼ばれる。部位 I I は、N - 末端分節のプロテアーゼ耐性領域に位置し、ならびに部位 I V、V および V I は、タンパク質のシステインリッチ領域の C 末端に位置する。部位 I は、このシステインクラスターの中央に位置する。F タンパク質上のさらなる抗原部位は、アミノ酸位置 2 4 1 および 2 4 2 を含むエピトープ F 2 が位置する部位 C である。さらに、F 1 と呼ばれる抗原部位に結合するモノクローナル抗体が存在し、F 1 は F 1 a、F 1 b および F 1 c と呼ばれるエピトープを含む。現在、この抗原部位は、F タンパク質上の特定の部位にマップされていない。これらの部位 / エピトープの大半は、広く中和抗体を生じるが、抗原部位 I に特異的ないくつかの抗体は、サブタイプ A 特異的であることが示されている。部位 I に結合する抗体はまた、ウイルス中和における限界効果を示す。パリビズマブにより認識されるエピトープは、アミノ酸位置 2 7 2 における選択されたエスケープ変異体の局在により判断されるような抗原部位 I I に位置する ( Zhao et al 2004 J. Infect. Dis 190:1941-6 )。さらに、エピトープの 3 種のタイプが G タンパク質上で同定された：i) 全ての R S V 株に存在する保存されたエピトープ、ii) 同一のサブタイプに属する全てのウイルスに存在するグループ特異的なエピトープ、ならびに iii) 同一のサブタイプに属する株のサブセットのみに存在する株特異的または可変性エピトープ。保存されたおよびグループ特異的なエピトープは、4 つのシステイン ( アミノ酸残基 1 7 3、1 7 6、1 8 2 および 1 8 6 ) のクラスターならびに全てのヒト R S V 単離体 ( i s o l a t e ) 間で同一配列の短いアミノ酸断片 ( 残基 1 6 4 - 1 7 6 ) を含む G タンパク質の中央部分にマップされている。システインクラスターは、位置 1 7 3 - 1 8 3 および 1 7 6 - 1 8 2 の間のジスルフィド結合により保持され、アミノ酸残基 1 7 1 - 1 8 7 の範囲である G タンパク質システインリッチ領域 ( G C R R ) の中央部を構成し、それにより G C R R は、1 3 個のアミノ酸保存領域と重複する。G 糖タンパク質は、保護的免疫と疾病病因の両方の誘導に役割を果たすようである。例えば、マウスにおける研究は、G 糖タンパク質が、I L - 4、I L - 5、I L - 1 3 および肺好酸球の産生により特徴付けられる T h 2 C D 4 + T 細胞応答を調節することを示した。好酸球の補充と活性は、I L - 4 および I L - 5 のごとき数種の因子により促進される。さらに、マウスの急性感染期間における R S V G タンパク質の発現は、T h 1 サイトカイン発現の減少 ( 例、I L - 2 およびガンマイインターフェロン )、ケモカイン m R N A 発現の変化 ( 例、M I P - 1 アルファ、M I P - 1 ベータ、M I P - 2、I P - 1 0、M C P - 1 )、ならびに感染した肺への N K 細胞輸送の減少により特徴付けられる改善された自然免疫応答に関連していた。特に、G C R R は、自然炎症反応を調節し、それにより可能性として R S V クリアランスを遅延させることに重要な役割を果たすことが示された ( Polack et al., 2005 PNAS 102:8996-9001 )。G C R R は、アミノ酸位置 1 8 2 から 1 8 6 に C X 3 C モチーフを含む。R S V に感染されたマウスにおける呼吸速度の減少は、

10

20

30

40

50

C X 3 Cモチーフに対する抗体が呼吸速度の減少を無効にすることから、このモチーフに関連することが示された (Tripp et al.2003.J.Virol.77:6580-6584およびUS 2004/0009177 (appl.no.10/420,387))。株特異的エピトープは、Gタンパク質の外部ドメインにおけるシステインクラスターの可変領域N末端にマップされるが、好ましいのは、Gポリペプチドの可変C末端の3番目に位置される (Martinez et al.1997.J.Gen.Virol.78:2419-29)。図1は、Long株 (サブタイプA) および18537株 (サブタイプB) 由来のGタンパク質の並列比較を表し、これはGタンパク質の多様な領域を示す。一般的に、モノクローナル抗-Gタンパク質抗体は、RSV中和における限界的効果を有する。しかしながら、モノクローナル抗-G抗体の混合物がインビトロならびにインビボにおけるRSVの中和を高めることが報告されてきた (Walsh et al 1989.J.Gen.Virol 70:2953-61およびMartinez and Melero 1998 J.Gen.Virol.79:2215-20)。モノクローナル抗-G抗体を結合する最も大きな効果は、ウイルスの画分がまだ中和に耐性であっても、抗体が異なるエピトープに結合する時に明確に発揮される。さらに、異なるエピトープ特異性を有する2つの異なる抗-F抗体の組合せならびに1つの抗-Fと1つの抗-G特異的抗体の組合せは、RSVにおけるインビトロ中和効果の上昇を示した (Anderson et al 1988 J.Virol.62: 4232-4238)。モノクローナル抗体を混合することにより得られるいくつかの有利な点は、例えば、活性部位の阻害によるアンタゴニスト効果のごときモノクローナル抗体の個々の特性のためと考えられる。その他の効果は、今のところ理解されていない理由による相乗作用が考えられる。

10

20

30

40

50

#### 【0040】

RSV中和のメカニズムは複雑であり、完全に理解されていない。多くの異なるエピトープ、FおよびGタンパク質のみで同定された、保存されたサブタイプ特異的なならびに株特異的エピトープ、ならびにエスケープ変異体の潜在的な作成は、RSV感染の予防に役割を果たしうる全ての中和メカニズムを定めるのに広範囲な抗体特異性が必要であることを示唆する。それゆえ、合理的な方法において、サブタイプAおよびBの両方のRSV株、ならびにエスケープ変異体および今日知られるRSV株から生じる新しい株によるRSV感染を予防することができるモノクローナル抗体の混合物を選択することは非常に困難である。

#### 【0041】

本発明の態様は、多くの多様性および広範な抗-RSV特異性を有するポリクローナル抗-RSV抗体を提供する。本発明のポリクローナル抗-RSV抗体は、産生時における利用可能なドナーに依存せず、バッチ間の変動は、ドナー由来の抗-RSV免疫グロブリン産物 (例、RSV I V I G) で観察されるものよりかなり小さい。本発明のポリクローナル抗-RSV抗体では、全ての個々の抗体メンバーは、RSV関連抗原に結合することができ、前記ポリクローナル抗体はRSVサブタイプAおよびBを中和することができる。ポリクローナル抗体の各々別個の抗体は、ポリクローナル抗体の他のメンバーのいずれかによっても結合されないエピトープに結合することが好ましい。本発明のポリクローナル抗-RSVは、多価の手段でRSV抗原に結合し、それは通常、結果として、相乗的な中和、マクロファージによる感染細胞の食作用の改善および感染細胞に対する抗体依存性細胞障害 (ADCC) の改良ならびに補体活性の上昇を生じる。さらに、本発明のポリクローナル抗体は、RSV I V I Gの場合である非結合タンパク質により「希釈」されず、この場合、有効であるために750mgの合計タンパク質/kgの用量が必要とされる。750mgの合計タンパク質内におけるRSV特異的抗体の割合は知られていないが、最大で1%より大きくなることはなく、恐らく1%より小さいと考えられる。したがって、パリビズマブのインビトロにおける効力がRSV I V I Gの効力より25-30倍高いとされた場合 (Johnson et al 1997 J.Infect.Dis.176:1215-24)、これはRSV I V I Gの特異的活性の減少により相殺される。それゆえ、RSV-I V I Gに含まれる免疫グロブリン分子のわずか1%がRSVに特異的である場合、RSV-I V I Gポリクローナル抗体の活性のある用量は、モノクローナル抗体パリビズマブの活性のある用量より低い、わずか7.5mg/kgである。

## 【 0 0 4 2 】

これらの理由により、本発明の組み換えポリクローナル R S V - 特異的抗体は、モノクローナル抗体より有意に高い能力であることが期待され、それゆえに、パリビズマブおよび R S V I V I G の有効な用量と比較して、より少ない用量の本発明のポリクローナル抗体で投与することが可能である。したがって、本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体はまた、リスクの高い患者、特に骨髄移植の被提供者、高齢者および慢性肺疾患にかかっている個体の予防および治療に適すると考えられる。本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体のさらなる有利な点は、個々の抗体メンバーの濃度がモノクローナル抗体の濃度より有意に低く（用いられる濃度が同一であったとしても）、したがって個々の抗体が治療上、個々の免疫系により外部物質として認識される可能性が低くなり、1つの個々の抗体が患者内の免疫応答により排除されるとしても、残存する抗体メンバーが無傷であることから、ポリクローナル抗 - R S V 抗体の中和能力またはクリアランス速度に影響することはないようである。

10

## 【 0 0 4 3 】

本発明の具体例は、R S V サブタイプ A および B を中和することができる組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体であり、前記ポリクローナル抗体は、少なくとも1つの R S V 外被タンパク質における少なくとも3つの異なるエピトープと一緒に特異的に結合する別個の抗体メンバーを含む。好ましいのは、F タンパク質は、少なくとも3つの別個の抗体メンバーにより特異的に結合され、前記エピトープは、好ましくは異なる抗原部位に位置する。

20

## 【 0 0 4 4 】

本発明のさらなる具体例は、R S V サブタイプ A および B を中和することができる組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体であり、前記ポリクローナル抗体は、少なくとも2つの R S V 外被タンパク質に対する特異的反応性を一緒に提供する別個の抗体メンバーを含む。2つの外被タンパク質は、R S V G タンパク質、すなわち、R S V F タンパク質および R S V S H タンパク質から選択することができる。好ましくは、本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体は、抗 - G および抗 - F 反応性を含む。かかるポリクローナル抗体の抗 - G および抗 - F 反応性は、好ましくは、少なくとも2つの別個の抗 - G 抗体および少なくとも1つの別個の抗 - F 抗体からなる。好ましいのは、少なくとも3つの別個の抗体は、異なるエピトープに結合し、それにより少なくとも3つの異なるエピトープを網羅し、同時に抗体は、同様に R S V サブタイプ A およびサブタイプ B 株を中和することができる。より好ましい本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体の抗 - G および抗 - F 反応性は、以下に記載される抗 - G および抗 - F 反応性のいずれかの組合せからなる。最も好ましい本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体は、以下で言及される全ての抗原部位 / エピトープに対する抗 - G および抗 - F 反応性からなる。本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体に可能な最も広い特異性を得るために、1つまたはそれ以上の好ましい全ての抗原部位は、1つより多くの別個の抗体により網羅されることが望ましい。したがって、同一抗原または抗原部位における数種のエピトープが、本発明のポリクローナル抗体の別個のメンバーにより結合されることが好ましい。

30

## 【 0 0 4 5 】

本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体の抗 - G 反応性に関して、この反応性は、好ましくは、保存されたエピトープに対する指向性である。より好ましい抗 - G 反応性は、G - タンパク質上の保存されたエピトープに特異的に結合することができる第1の抗 - G 抗体、および G タンパク質システインリッチ領域 ( G C R R ) に特異的に結合することができる第2の抗 - G 抗体からなる。ポリクローナル抗 - R S V 抗体は、好ましくは、少なくとも2つの別個の抗 - G タンパク質を含み、少なくとも1つの第1の抗体は、G タンパク質上の保存されたエピトープに特異的に結合することができ、少なくとも1つの第2の抗体は、サブタイプ A または B のどちらかを認識する異なる保存されたエピトープまたはグループ特異的エピトープに特異的に結合することができる。好ましくは、ポリクローナル抗体は、少なくとも3つの別個の抗 - G 抗体を含み、第1の抗体は、G - タンパク質上の

40

50



保存されたエピトープに特異的に結合することができ、第2の抗体は、サブタイプAのGタンパク質に特異的に結合することができ、第3の抗体は、サブタイプBのGタンパク質に特異的に結合することができる。Gタンパク質システインリッチ領域(GCRR)は、保存されたエピトープが位置する上流13アミノ酸領域およびグループ特異的エピトープが位置する領域と一部重複する。それゆえ、保存されたエピトープに特異的に結合することができる抗体ならびにグループ特異的な抗体は、それらが認識するエピトープがGCRRに位置する場合にGCRRに結合してもよい。好ましくは、保存されたエピトープまたは株特異的なエピトープへの結合により特徴付けられる別個の抗体のうちの少なくとも1つもまた、GCRRを認識する。GCRRのCX3Cモチーフに結合する抗体は、ウイルス中和の観点から特に好ましい。しかしながら、CX3XCモチーフに結合する抗体はまた、フラクタルカインおよび他のヒトCX3Cケモカインのごとく多くの他の関連しないヒト抗原に結合し、それゆえ、望ましくない副作用を産生することから、交差反応(例、実施例における一定の抗体について示されるように)についてかかる抗体をテストし、次いで適するモデル系で同一の抗体をテストする合理的方法が存在する。いずれにしても、副作用が存在しないか、ごく軽微であるか、または少なくとも許容されるかが確実性の程度で立証される前に、臨床試験において、本発明の抗体のごとき所定の医薬品をテストすることが必ず必要である。保存されたおよびグループ特異的な抗-G反応性に加えて、株特異的なエピトープに対して指向性のあるさらなる抗-G反応性もまた、本発明のポリクローナル抗-RSV抗体に含まれてもよい。ほとんどの多くの株特異的エピトープに対して指向性のある株特異的抗-G反応性は、5年以内にRSV感染を生じるウイルス株に存在することが好ましい。本発明では、株特異的エピトープは、限られた数のRSV株に存在するのみのエピトープとして理解される。グループ特異的および/または株特異的抗-G抗体の添加は、本発明の抗-RSV抗体に対してさらなる多様性を提供することができ、Gタンパク質の保存領域に対する反応性を有する抗体と結合される時に相乗作用を誘導しうる。好ましくは、本発明の抗-G抗体は、直接RSVを中和し、ウイルスの細胞への進入を阻害し、細胞移動を防止し、炎症反応を抑制し、および/または多核体形成を予防する。

10

20

30

40

50

#### 【0046】

本発明のポリクローナル抗-RSV抗体の抗-F反応性に関して、この反応性は、好ましくは、1つまたはそれ以上の抗原部位I、II、IV、V、VI、CまたはF1における少なくとも1つのエピトープに対して指向性がある。本発明のさらなる具体例では、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは全てのこれらの抗原部位/エピトープは、本発明のポリクローナル抗-RSV抗体における別個の抗体により網羅される。好ましくは、本発明の抗-F抗体は、直接RSVを中和し、および/またはウイルスの細胞への進入を阻害し、および/または多核体形成を予防する。

#### 【0047】

本発明のポリクローナル抗-RSV抗体組成物では、組成物は、Fタンパク質における全ての抗原部位に対して指向性のある結合反応性を含まず、抗原部位IIのエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの別個の抗-F抗体が存在することが好ましい。より好ましいのは、部位II特異的な抗-F抗体は、抗体バリビズマブとして同一のエピトープまたは抗原部位に結合する。部位II-特異的な抗体に加えて、1つまたはそれ以上の別個の部位IV-特異的な抗-F抗体が望ましく、かかる抗体は、好ましくはRSVF2-5として同一のエピトープに結合する。

#### 【0048】

サブタイプ-特異的な抗-F抗体はまた、当該技術分野で知られている。しかし、Fタンパク質が2つのサブタイプAおよびB間で91%のアミノ酸相同性を示すことから、サブタイプ-特異的な抗-F抗体は、抗-G抗体におけるよりもより少ない。しかしながら、かかる株-特異的な抗-F抗体は、可能な限り広範な特異性を得ることを付与し、それゆえに本発明のポリクローナル抗-RSV抗体の望ましい構成要素である。

#### 【0049】

上で言及された R S V G および F タンパク質抗原に加えて、R S ウイルスは、第 3 の外被タンパク質である小分子疎水性 ( S H ) タンパク質を発現する。S H タンパク質由来のペプチドに対して上昇した過免疫血清は、インビトロで R S V を中和することができないことが示されてきた ( Akerlind-Stopner et al 1993 J.Med.Virol.40:112-120 ) 。しかしながら、タンパク質は主に感染した細胞で発現されることから、S H タンパク質に対する抗体は、融合の阻害における効果を示し、R S V 感染に対するインビボにおける保護に関連する可能性が考えられる。このことは、S H 遺伝子を欠失する R S V 株が上気道において 10 倍低い効率で複製するという事実により支持される ( Bukreyev et al 1997 J.Virol.71:8973-82 ) 。

#### 【 0 0 5 0 】

本発明のさらなる具体例は、R S V サブタイプ A および B を中和し、抗 - S H 反応性、および抗 - G もしくは抗 - F 反応性を含むことができるポリクローナル抗 - R S V 抗体である。S H タンパク質のアミノ酸 41 から 64 / 65 ( サブタイプ A / B ) までの範囲の C - 末端は、細胞表面上に露出される。したがって、この領域に局在するエピトープに対する抗 - S H 反応性が望ましい。S H タンパク質の C 末端は、サブタイプ A および B と異なり、それゆえに本発明のポリクローナル抗体におけるサブタイプ A および B の両方に対する抗 - S H 反応性を含むことが望ましい。この S H 反応性は、少なくとも 2 つの別個の抗 - S H 抗体により提供することができ、第 1 の抗体は、S H サブタイプ A に特異的に結合することができ、第 2 の抗体は、S H サブタイプ B に特異的に結合することができる。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明の一の具体例では、ポリクローナル抗 - R S V 抗体は、S H サブタイプ A および / または B に対する特異的な反応性ならびに G タンパク質に対する特異的な反応性を含む。G タンパク質に対する反応性は、上に記載の反応性のいずれかからなりうる。

#### 【 0 0 5 2 】

代替的な具体例では、S H サブタイプ A および / または B に対する特異的な反応性は、上に記載される抗 - F 反応性のいずれかと組み合わせられてポリクローナル抗 - R S V 抗体が構成されうる。

#### 【 0 0 5 3 】

本発明の好ましい具体例では、ポリクローナル抗 - R S V 抗体は、外被タンパク質、F、G および S H の 3 つ全てに対する反応性を含む。

#### 【 0 0 5 4 】

本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体に含まれる反応性は、組合せが R S V サブタイプ A および B を中和することができる限り、表 1 に記載される抗原 / 抗原部位および / またはエピトープに対する特異的な結合反応性を有する別個の抗体のいずれか可能な組合せを構成してもよい。好ましくは、組合せは、少なくとも 2 つの R S V 外被タンパク質に対する反応性を含む。

#### 【 0 0 5 5 】

好ましくは、本発明によるポリクローナル抗体の個々の別個な抗体メンバーは、それら自身で中和および / または抗 - 炎症特性を有する。しかしながら、これらの特定の特性を持たない抗体もまた、例えば、補体活性を介して、R S V クリアランスに役割を果たしうる。

表 1 : R S V 関連抗原、抗原部位およびエピトープのまとめ

10

20

30

40

【表 1】

抗原	抗原部位／エピトープ
F タンパク質	抗原部位 I
	抗原部位 I I
	抗原部位 I V
	抗原部位 V
	抗原部位 V I
	抗原部位 C
	F 1 エピトープ
G タンパク質	保存領域 (a.a164-176)
	サブタイプ A 特異的
	サブタイプ B 特異的
	G C R R (a.a171-187) (保存されたおよび株特異的)
	C X 3 C モチーフ (a.a182-186)
	株特異的
S H タンパク質	サブタイプ A
	サブタイプ B

10

## 【 0 0 5 6 】

20

好ましくは、本発明のポリクローナル抗体は、抗体分子を自然に発現しないポリクローナル細胞株（組み換えポリクローナル抗体発現とも呼ばれる）由来の単一のバッチまたは数個のバッチとして産生される。モノクローナル抗体を混合することと比較して、組み換えポリクローナル抗体を産生することの有利な点の 1 つは、（単一のモノクローナル抗体を産生するのと同様のコストで）同時に無制限数の別個の抗体分子を産生する能力である。それゆえ、有意に最終産物のコストを増加させることなく、大量の R S V 関連の抗原に対する反応性を有する抗体を含むことが可能である。特に、生物学では完全に理解されていない R S V と同様に複雑な標的に関しては、R S V 単独に対して中和または保護することが示されていない個々の抗体は、他の抗体と結合される時に相乗作用を誘導しうる。それゆえ、ポリクローナル抗体組成物中に上に記載されるものに加えて、別個の抗体を含むことは有利な点であり得、わずかな判断基準は、個々の抗体が R S V 関連抗原に結合する（例えば、R S V 感染細胞への結合により評価される）ことである。好ましくは、上に記載される全てのポリクローナル抗 - R S V 抗体組成物は、組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体（抗 - R S V r p A b）組成物である。

30

## 【 0 0 5 7 】

関連抗原として実証されていないが、その可能性のある R S V 標的抗原に結合する潜在的に関連のある抗原を獲得するための 1 つの方法は、R S V に感染されたドナーの免疫応答（完全な免疫応答）により上昇した個々の抗体からなるポリクローナル抗体組成物を作成することである。R S V に対して完全な免疫応答を示す抗体を得ることに加えて、R S V 感染の保護、中和、および / または排除に特に関連する可能性のある抗原に結合する抗体に対する陽性選択が行われうる。さらに、R S V の保護、中和および / または排除に関連すると考えられる特定の抗原、抗原部位またはエピトープに対する抗体がドナーの完全な免疫応答において同定されない場合、かかる抗体は、特定の抗原（選択された免疫応答）を有するドナーの免疫付与 / ワクチン接種により上昇されてもよい。一般的に、中和は、血小板の減少、マイクロ中和試験または融合阻害アッセイのごときインビトロ中和アッセイにより評価される（例、Johnson et al 1997 J. Infect. Dis 176:1215-24）。したがって、これらのアッセイのうちの 1 つにおいて有意な効果を示す抗体または抗体組成物は、陰性コントロールと比較した時に中和すると考えられる。保護は、一般的に、例えばコottonラットモデル（例、Johnson et al 1997 J. Infect. Dis 176:1215-24）またはマウスモデル（例、Taylor et al 1984 Immunology 52, 137-142 および Mejias, et al 2005 A

40

50

ntimicrob Agents Chemother 49: 4700-4707)におけるインビトロ誘発実験により測定される。インビボ誘発実験は、抗体がウイルス誘発前に投与される予防様式において、または抗体がウイルス誘発後に投与される治療として実施するか、あるいは両方の組合せとして実施することができる。

#### 【0058】

本発明のポリクローナル抗体組成物は、RSV抗原に結合することができる抗体からなり得、このRSV抗原は必ずしも知られていないか、または必ずしも外被タンパク質ではない(抗体は感染細胞に結合するが、選択された抗原または抗原部位には結合しない)が、抗体は、例えば、RSV感染にかかっているか、またはRSV感染から回復する1つまたはそれ以上のドナーに由来する別個の抗体をコードする核酸配列を得ることにより、RSV感染後の完全な免疫応答から獲得される。第二に、同一の完全な免疫応答に由来する抗体は、特定の抗原、抗原部位および/またはエピトープに結合する能力に基づいて選択され、本発明のポリクローナル抗体に含まれる。第三に、特定のRSV関連抗原で免疫付与/ワクチン接種され、それによりこれらのドナーで「選択された」免疫応答が上昇された1つまたはそれ以上のドナーから獲得されたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ペアからコードされる別個の抗体は、本発明のポリクローナル抗体組成物に含まれる。したがって、本発明で言及される技術のいずれかに由来する抗体は、単一のポリクローナル抗体に結合されてもよい。好ましくは、本発明の抗体をコードする核酸は、ヒトドナーから得られ、産生された抗体は、完全なヒト抗体である。

10

#### 【0059】

本発明のポリクローナル抗体組成物の背景にある動機は：仮に、RSVに感染したドナーが抗原に対する液性免疫応答を上げる場合、これらの抗体は、少なくともある程度まで、ウイルスのクリアランスに貢献し、それによりポリクローナル抗体産物中の包含にふさわしいようである。

20

#### 【0060】

本発明のさらなる態様は、抗-RSV r p A bを産生することであって、別個の抗体メンバーの組成物は、RSV外被抗原に対する多様性、親和性および特異性に関して液性免疫応答を反映する。好ましくは、液性応答の反映は以下のうちの1つまたはそれ以上が満たされることを確認することにより立証される。i)かかる抗-RSV r p A b中の個々の抗体メンバーのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域をコードする核酸配列が、例えばRSV感染後にRSVに対する液性免疫応答を上げたドナーに由来すること；ii) V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列が、ドナーに存在するV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列の元々のペアが維持されるようなドナーから単離されること；iii) r p A bの個々のメンバーをコードするV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>のペアが、CDR領域が可能な限り多様であるように選択されること；あるいはiv)抗-RSV r p A bの個々のメンバーの特異性が、抗体組成物が哺乳動物における有意な抗体応答を導く抗原と一緒に結合するように選択されること。好ましくは、抗体組成物は、前記ドナーに由来する血清サンプル中で有意な抗体力価を生じる抗原、抗原部位および/またはエピトープと一緒に結合する。かかる抗原、抗原部位および/またはエピトープは、上記表1にまとめられるが、上に記載されるような未知の抗原、抗原部位および/またはエピトープならびに非外被抗原を構成してもよい。好ましくは、ドナーはヒトであり、ポリクローナル抗体は完全なヒト抗体である。

30

40

#### 【0061】

本発明は、RSV関連抗原に対して結合特異性を有する全長の抗体、F a bフラグメントまたはその他の抗体フラグメントとして表すことができる一連のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ペアを同定した。特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ペアは、実施例2における表5のクローン数により同定される。表5で同定されるようなV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ペアを含む抗体は、好ましくは完全なヒト抗体である。しかしながら、望ましくは、キメラ化抗体もまた産生されてもよい。

#### 【0062】

本発明の好ましい抗-RSV組み換えポリクローナル抗体は、表5に記載されるV<sub>H</sub>お

50

よび  $V_L$  ペアアのグループから選択される重鎖および軽鎖 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域を含む別個のメンバーからなる。好ましくは、CDR 領域は、表 5 に示されるペアアで維持され、望ましいフレームワークに組み込まれる。

#### 【0063】

代替的に、第 1 クロンの重鎖由来の CDR 領域 (CDRH) は、第 2 クロンの軽鎖由来の CDR 領域 (CDRL) と結合される ( $V_H$  および  $V_L$  ペアアの組み換え (scrambling))。CDR 領域はまた、例えば、第 1 クロン由来の CDRL 1 領域を第 2 クロン由来の CDRL 2 および CDRL 3 領域と結合することにより、軽鎖または重鎖内で組み換えられてもよい。かかる組み換えは、好ましくは同一抗原に結合するクローン間で行われる。本発明の CDR 領域はまた、例えば、点変異による親和性成熟を受けてもよい。

10

#### 【0064】

可変重鎖および可変軽鎖をコードするペアアの単離および選択

抗-RSV 組み換えポリクローナル抗体組成物を作成するプロセスは、適する起源に由来する可変重鎖 ( $V_H$ ) および可変軽鎖 ( $V_L$ ) をコードし、それにより  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアアのレパートリーを作成する配列の単離に関する。一般的に、 $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列を得るための適する起源は、RSV に感染されたか、または RSV 感染から回復した動物またはヒトに由来するか、あるいは RSV 株またはかかる株に由来するタンパク質もしくは DNA で免疫付与 / ワクチン接種された動物またはヒトに由来する血液、脾臓または骨髓サンプルのごとき細胞画分を含むリンパ球である。好ましくは、画分を含むリンパ球は、ヒトまたはヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物から採集される。細胞画分を含む採集されたリンパ球は、さらに特定のリンパ球集団、例えば、B リンパ球系列に由来する細胞を得るために濃縮されてもよい。好ましくは、濃縮は、例えば B 細胞、形質芽細胞および / または血漿細胞に対して系列特異的細胞表面マーカータンパク質の特性を利用する、磁気ビーズ細胞分離装置 (MACS) および / または蛍光標示式細胞分取器 (FACS) を用いて行われる。好ましくは、細胞画分を含むリンパ球は、B 細胞、形質芽細胞および / または血漿細胞に関して濃縮される。さらに好ましくは、高い CD 38 発現および中間体 CD 19 および / または CD 45 発現を有する細胞が血液から単離される。これらの細胞は時々、循環血漿細胞、初期血漿細胞または形質芽細胞と呼ばれる。簡潔にするため、本発明では、それらは他の用語が同じ意味で用いられるとしても単に血漿細胞と呼ぶ。

20

30

#### 【0065】

$V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の単離は、 $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列がランダムにベクターに結合して  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列ペアアの組合せライブラリーを作成する従来の方法において行うことができる。しかしながら、本発明では、RSV 感染による液性免疫応答で産生される抗体の多様性、親和性および特異性を反映することが好ましい。このことは、ドナーに元々存在する  $V_H$  および  $V_L$  ペアアの維持に関連し、それにより配列が単離されるドナーから産生された抗体に元々存在する  $V_H$  および  $V_L$  ペアアに相当する可変重鎖 ( $V_H$ ) および可変軽鎖 ( $V_L$ ) をコードする各配列ペアアのレパートリーを生じる。これは  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の同種ペアアとも呼ばれ、この抗体は同種抗体と称される。好ましくは、本発明の  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアア、組合せまたは同種は、ヒトドナーから得られ、それゆえ配列は完全にヒトのものである。

40

#### 【0066】

$V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の同種ペアアを作成するためのいくつかの異なる方法が存在する。1 つの方法は、リンパ球含有細胞画分から分離される単一細胞に由来する  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の増幅と単離に関する。 $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列は、別々に増幅され、第二工程で組み合わせられてもよく、あるいは、それらは増幅中に組み合わせられてもよい (Coronella et al 2000 Nucleic Acids Res 28: E85; Babcook et al 1996 PNAS 93: 7843-7848 および WO 05/042774)。第 2 の方法は、細胞内 (in-cell) 増幅ならびに  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の組合せに関する (Embleton et al

50

1992 Nucleic Acids Res 20: 3831-3837; Chapal et al 1997. BioTechniques 23: 518-524)。第3の方法は、溶血ブランクアッセイを $V_H$ および $V_L$ のcDNAクローニングと組み合わせる選択リンパ球抗体法(SLAM)である(Babcook et al 1996 PNAS 93:7843-7848)。ドナーにおける $V_H$ および $V_L$ 配列ペアの多様性を擬似する $V_H$ および $V_L$ をコードする配列のペアのレパートリーを得るために、 $V_H$ および $V_L$ ペアの組み換え(ランダムな組合せ)ができる限り生じないハイスループット法が好ましく、例えば(本明細書に援用される)WO 05/042774に記載される。

#### 【0067】

本発明の好ましい具体例では、 $V_H$ および $V_L$ をコードするペアのレパートリーは、メンバーのペアがRSV感染から生じる液性免疫応答に関連する遺伝子のペアを反映し、工程i) RSVに感染したか、またはRSV感染から回復したドナーに由来するリンパ球含有細胞画分を提供し；ii) 任意選択的に、前記細胞画分からB細胞または血漿細胞を濃縮し、；iii) 前記細胞画分各々に由来する細胞を複数の容器に分配することを含む、単離された単一細胞の集団を得；iv) 前記単離された単一細胞に由来する鋳型を用いて、多重重複伸長RT-PCR法において増幅し、 $V_H$ および $V_L$ をコードするペアの連結を生じさせ、次いでv) 任意選択的に、連結された $V_H$ および $V_L$ をコードするペアのネステッド(nested)PCRを行うことを含む方法にしたがって作成される。好ましくは、単離された同種 $V_H$ および $V_L$ をコードするペアは、以下に記載されるようにスクリーニングの手法にかけられる。

#### 【0068】

一度 $V_H$ および $V_L$ 配列のペアが作成されると、RSV関連抗原に対する結合反応性を有する $V_H$ および $V_L$ ペアをコードする配列を同定するスクリーニング手法が行われる。好ましくは、RSV関連抗原はRSV外被タンパク質、特にRSV Gタンパク質、RSV Fタンパク質およびRSV SHタンパク質である。 $V_H$ および $V_L$ 配列のペアが組み合わされる場合、スクリーニングの前に、RSVに結合する抗体フラグメントをコードする $V_H$ および $V_L$ ペアを濃縮するためにファージディスプレイ法を適用することができる。

#### 【0069】

RSVによる感染により液性免疫応答時に産生される抗体の多様性、親和性および特異性を反映するために、本発明は、出来る限り最も広範な多様性を得るため、同種ペアのためのスクリーニング手法を発展させた。スクリーニングのために、同種 $V_H$ および $V_L$ をコードするペアのレパートリーは、適する宿主細胞にトランスフェクトされる細菌または哺乳動物のどちらかのスクリーニングベクターを用いて、抗体フラグメント(例、scFvもしくはFab)または全長抗体としてのどちらかで個々に発現される。Fab/抗体のレパートリーは、1つまたはそれ以上のRSV株のウイルス粒子に対する反応性について選択される。好ましくは、少なくとも2つの株、サブタイプAのうちの1つおよびサブタイプBのうちの1つが用いられる。サブタイプA株は、例えば、Long(ATCC VR-26)、A2(ATCC VR-1540)または最近のLong様サブタイプA分離株である。サブタイプB株は、例えば、18537(ATCC VR-1580)、B1(ATCC VR-1400)、9320(ATCC VR-955)または最近の18537様分離株である。同時に、Fab/抗体のレパートリーは、組み換えGタンパク質、組み換えFタンパク質およびRSV抗原に由来するペプチドのごとく選択された抗原に対して選択される。抗原ペプチドは、例えば、Gタンパク質保存領域(アミノ酸164-176)およびGタンパク質のシステインコア領域(サブタイプAならびにサブタイプB株のアミノ酸171-187)、ならびにSHタンパク質の細胞外領域(サブタイプAのアミノ酸42-64およびサブタイプBの42-65)から選択されうる。好ましくは、スクリーニング中のビーズまたはプレートにおける固定を容易にするために、ペプチドがビオチン化される。代替的な固定の方法が用いられてもよい。抗原は、RSVの生物学の知見および期待される中和および/または保護効果に基づいて選択され、これらの抗原に結合することができる可能性のある抗体が提供できる。このスクリーニング手法

は、同様にして組み合わせファージディスプレイライブラリーに適用されうる。スクリーニングに用いられる組み換え G および / または F タンパク質は、細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞または別の適切な発現系において発現されうる。G および / または F タンパク質は、(膜貫通領域のない)可溶性タンパク質として発現されるか、または3番目のタンパク質に融合されるかのどちらかで安定性が上昇されてもよい。G および / または F タンパク質が融合タグと一緒に発現される場合、融合の相手方は、スクリーニング前に切り離されてもよい。好ましくは、サブタイプ A およびサブタイプ B の両方の典型例である G および / または F タンパク質は、スクリーニングのために発現され、用いられる。加えて、株特異的 G タンパク質もスクリーニングのために発現され、用いられる。上に記載される一次スクリーニングに加えて、選択された配列が擬陽性をコードしていないことを確実にするため、二次スクリーニングが実施されてもよい。二次スクリーニングでは、一次スクリーニングで同定した  $V_H$  および  $V_L$  ペアーに結合する全ての R S V / 抗原が、ウイルス株および選択された抗原の両方に対して再度選択される。一般的に、免疫学的アッセイは、本発明で実施されるスクリーニングに適する。かかるアッセイは当該技術分野においてよく知られ、例えば、E L I S P O T S、E L I S A、F L I S A、膜アッセイ(例、ウェスタンブロット)、フィルターを用いる解析、および F A C S を構成する。前記アッセイは、前の濃縮工程がなくても  $V_H$  および  $V_L$  ペアーをコードする配列から産生されるポリペプチドを利用して行うことができる。 $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのレパートリーが同種ペアーである事象では、例えば、ファージディスプレイによる濃縮は、スクリーニングの前には必要とされない。しかしながら、組み合わせライブラリーのスクリーニングでは、免疫アッセイは、好ましくは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌表面ディスプレイ、酵母ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、RNA ディスプレイまたはコバレント(c o v a l e n t)ディスプレイのごとき濃縮方法と組み合わせてまたは濃縮方法の後に行われる(Fitz Gerald, K., 2000. Drug Discov. Today 5, 253-258にて総説される)。

#### 【0070】

スクリーニングで選択された配列をコードする  $V_H$  および  $V_L$  ペアーは、一般的に、配列決定(s e q u e n c i n g)にかけられ、可変領域の多様性に関して解析される。特に、C D R 領域における多様性が興味深い、 $V_H$  および  $V_L$  ファミリーの発現もまた興味深い。これらの解析に基づいて、1つまたはそれ以上のドナーから単離された R S V 結合抗体の全体の多様性を表す  $V_H$  および  $V_L$  ペアーをコードする配列が選択される。好ましくは、全ての C D R 領域(C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3 ならびに C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3)に相違を持つ配列が選択される。異なる  $V_H$  および  $V_L$  ファミリーに属する1つまたはそれ以上の同一または非常に類似した C D R 領域を持つ配列が存在する場合、これらも選択される。好ましくは、少なくとも可変重鎖の C D R 3 領域(C D R H 3)は、選択された配列のペアー間で異なる。潜在的に、 $V_H$  および  $V_L$  配列ペアーの選択は、単に C D R H 3 領域の可変性に基づくことができる。プライミングおよび配列の増幅中に、可変領域のフレームワーク領域、特に最初のフレームワーク領域において変異が生じうる。好ましくは、最初のフレームワーク領域で起きるエラーは、例えば、配列が完全なヒトであるようなドナーの配列に完全にまたは少なくとも98%対応することを確実にするために修復される。

#### 【0071】

$V_H$  および  $V_L$  ペアーをコードする選択された配列のコレクションの全体の多様性が、R S V 感染に対する液性反応における遺伝子レベルで見られる多様性をよく表すことが確実である場合、選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションから発現される抗体の全体の特異性もまた、R S V 感染ドナーで産生される抗体の特異性を表すことが期待される。選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションから発現される抗体の特異性が、感染したドナーで上昇された抗体の特異性を表すかどうかの指標は、ウイルス株ならびにドナー血液のうちの選択された抗原に対する抗体力価を、選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションから発現される抗体の特異性と比較

することにより得ることができる。加えて、選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションから発現される抗体の特異性がさらに解析されうる。特異性の程度は、検出することができる結合反応性に対する異なる抗原の数に相関する。本発明のさらなる具体例では、選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションから発現される個々の抗体の特異性は、エピトープマッピングにより解析される。

#### 【0072】

エピトープマッピングは、多くの方法により行われてもよく、それらは必ずしも相互に排斥しない。抗体クローンのエピトープ特異性をマップする1つの方法は、標的抗原の一次構造に由来する各種大きさのペプチドへの結合性を評価することである。かかるペプチドは、直鎖状および立体構造の両方であってもよく、ELISA、FLISAおよび表面

10

#### 【0073】

さらに、ペプチドは、例えば、標的抗原の細胞外領域または保存領域を表す利用可能な配列および構造データを用いて合理的に選択されてもよく、あるいは、ペプチドは、抗原の選択された部分または全てを表す重複するペプチドのパネルとして設計されてもよい (Meloan RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEPSCAN. In: Immunology Methods Manual. Ed Iwan Lefkovits 1997, Academic Press, pp 982-988)。

#### 【0074】

1つまたはそれ以上のかかるペプチドを有する抗体クローンの特異的な反応性は、一般的にエピトープ特異性の指標である。しかしながら、ペプチドは、多くの場合、立体構造の欠如のため、および抗体とタンパク質で比較されるような抗体とタンパク質抗原間の相互作用の一般的に大きな埋もれた表面積のため、タンパク質性抗原に対して高まった抗体により認識されるエピトープの模倣性に乏しい。エピトープマッピングの第2の方法は、タンパク質抗原において直接的に特異性を定めることが可能であり、従来によく定められた抗体を用いてマスクする選択的エピトープによるものである。ブロッキング後に抗原に対して2番目に結合する抗体の結合性の減少は、共有または重複エピトープの一般的な指標である。選択的なマスクによるエピトープマッピングは、多くの免疫アッセイにより行われてもよく、当該技術分野でよく知られるELISAおよびBiacoreを含むが、これらだけに限定されない (例、Ditzel et al. 1997 J.Mol.Biol. 267:684-695; Aldaz-Carroll et al. 2005 J.Virol. 79: 6260-6271)。抗 - ウイルス抗体のエピトープ特異性を調べるためのさらに別の可能な方法は、抗体の存在下におけるウイルスエスケープ変異体の選択である。かかるエスケープ変異体からの目的遺伝子の配列決定は、一般に、抗体による認識に重要であって、エピトープ (の一部) を構成する抗原におけるアミノ酸を明らかにする。

20

30

#### 【0075】

好ましくは、本発明の抗 - RSV r p A b に含まれる個々のメンバーは、抗体組成物の特異性が共同で、RSVサブタイプAとBの両方、およびRSV関連抗原タンパク質FとG、ならびに好ましくはGを網羅するように選択される。

#### 【0076】

選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーに由来する組み換えポリクローナル抗体の産生

40

本発明のポリクローナル抗体は、1または数個のバイオリアクターまたはそれらの等価物中でポリクローナル発現細胞株から産生される。この方法の後に、抗 - RSV r p A b は、そのプロセスの間に抗 - RSV r p A b を構成する個々のメンバーを分離することなく、単一の調製物としてリアクターから精製することができる。ポリクローナル抗体が1つ以上のバイオリアクターで産生される場合、各バイオリアクターからの上澄み液は、精製前にプールされうるか、あるいは精製された抗 - RSV r p A b は、各バイオリアクターから各々精製された上澄み液から得られた抗体をプールすることにより得られうる。

50



## 【 0 0 7 7 】

組み換えポリクローナル抗体を産生する 1 つの方法は、WO 2004/061104 および WO 2006/007850 (PCT/DK2005/000501) に記載される (これらの文献は出典明示により本明細書に援用する)。本明細書に記載される方法は、抗体をコードする配列の各宿主細胞のゲノムへの部位特異的な組み込みを基にし、 $V_H$  および  $V_L$  タンパク質鎖が、生成期間に元々のペアーで維持されることを確実にする。さらに、部位特異的な組み込みは、位置効果を最小限にし、それゆえ、ポリクローナル細胞株における個々の細胞の増殖と発現の特性がきわめて類似することが期待される。一般に、前記方法は以下に関する： i) 1 つまたはそれ以上のリコンビナーゼ認識部位を有する宿主細胞； ii) 宿主細胞に適合する少なくとも 1 つのリコンビナーゼ認識部位を有する発現ベクター； iii) 全長抗体または抗体フラグメントがベクターから発現されうるように、選択された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーをスクリーニングベクターから発現ベクターに移すことによる発現ベクターコレクションの作成 (かかる移行は、必ずしもスクリーニングベクターが発現ベクターと同一である必要はない)； iv) 発現ベクターおよび宿主細胞のゲノム中のリコンビナーゼ認識部位をベクター中の認識部位と結合させることが可能なリコンビナーゼをコードするベクターのコレクションによる宿主細胞のトランスフェクション； v) トランスフェクトされた宿主細胞からポリクローナル細胞株を得ること / 作成すること、次いで vi) 前記ポリクローナル細胞株からポリクローナル抗体を発現させ、収集すること。

## 【 0 0 7 8 】

好ましくは、CHO 細胞、COS 細胞、BHK 細胞、骨髓腫細胞 (例、Sp2/0 または NS0 細胞) のとき哺乳動物細胞、NIH3T3 のとき線維芽細胞、ならびに HeLa 細胞、HEK293 細胞、または PER.C6 のとき不死化ヒト細胞が用いられる。しかしながら、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、真菌、E.coli などのごとく非哺乳動物の真核または原核細胞もまた用いられうる。適する宿主細胞は、そのゲノム中に 1 つまたはそれ以上の適するリコンビナーゼ認識部位を含む。宿主細胞はまた、組み込み体を選択することができるために、組み込み部位に作動可能に連結される選択様式を含むべきである (すなわち、組み込み部位中に抗-RSV A b 発現ベクターまたは発現ベクターフラグメントの組み込まれたコピーを有している細胞)。ゲノム中の予定された位置に FRT 部位を有する細胞の調製物は、例えば、US 5,677,177 に記載された。好ましくは、宿主細胞は単一の組み込み部位のみを有し、その部位は組み込み体の高発現を可能にする部位 (いわゆるホットスポット) に位置される。

## 【 0 0 7 9 】

適する発現ベクターは、宿主細胞のリコンビナーゼ認識部位に適合する組み換え認識部位を含む。好ましくは、リコンビナーゼ認識部位は、宿主細胞の構築に用いられる選択遺伝子とは異なる適切な選択遺伝子に連結される。選択遺伝子は、当該技術分野においてよく知られ、グルタミン合成酵素遺伝子 (GS)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (DHFR)、およびネオマイシンを含み、GS または DHFR は、挿入された  $V_H$  および  $V_L$  配列の遺伝子増幅に用いられてもよい。ベクターはまた、ベクターの完全な組み込みの代わりに、抗体をコードする配列のリコンビナーゼ介在カセット交換 (Recombination-mediated cassette exchange; RMCE) を可能にする 2 つの異なるリコンビナーゼ認識部位を含んでもよい。RMCE は、Langer et al 2002. Nucleic Acids Res. 30, 3067-3077; Schlake and Bode 1994. Biochemistry 33, 12746-12751 および Belteki et al 2003. Nat. biotech. 21, 321-324 に記載される。適するリコンビナーゼ認識部位は当該技術分野でよく知られ、FRT、lox および attP/attB 部位を含む。好ましくは、組み込みベクターは、アイソタイプをコードするベクターであり、定常領域 (好ましくはイントロンを含む) は、スクリーニングベクターからの  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーの移行前のベクターに存在する (あるいは、スクリーニングが全長抗体において行われる場合、定常領域はスクリーニングベクター中にすでに存在する)。ベクターに存在する定常領域は、全体の重鎖定常領域 ( $CH_1$  から  $CH_3$  または  $CH_4$  まで) であるか、抗体の  $F_c$  部分をコードする定常領域 ( $CH_2$  から  $CH_3$  または  $C$

10

20

30

40

50

H<sub>4</sub>まで)のどちらかであり得る。軽鎖カップまたはラムダ定常領域はまた、移行前に存在してもよい。定常領域数の選択は、存在するとしても用いられるスクリーニングおよび移行システムに依存する。重鎖の定常領域は、アイソタイプ I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g M、I g D および I g E から選択することができる。好ましいアイソタイプは、I g G 1 および / または I g G 3 である。さらに、抗-R S V 抗体をコードする核酸の部位特異的な組み込みのための発現ベクターは、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 鎖の各々の高レベル発現を指示する適切なプロモーターまたはその等価な配列を含む。図 3 は、発現ベクターを設計するための 1 つの可能な方法を示すが、他の多くの設計も可能である。

#### 【 0 0 8 0 】

スクリーニングベクターからの選択された V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーの移行は、各発現ベクター分子が 1 つの V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーを含むように、慣用的な制限酵素切断およびライゲーションにより行うことができる。好ましくは、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーは各々移行されるが、任意選択的に、まとめて移行されてもよい。全ての選択された V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードするペアーが発現ベクターに移行されると、発現ベクターのコレクションまたはライブラリーが得られる。移行の代替的な方法は、任意選択で用いられてもよい。スクリーニングベクターが発現ベクターと同一である場合、発現ベクターのライブラリーは、スクリーニング中に選択された V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 配列ペアーからなり、それらはスクリーニング / 発現ベクター中に配置される。

#### 【 0 0 8 1 】

核酸配列を宿主細胞にトランスフェクトする方法は当該技術分野において周知である。部位特異的な組み込みを確実にするために、適切なりコンビナーゼが宿主細胞にも提供されるべきである。これは、好ましくはリコンビナーゼをコードするプラスミドの共トランスフェクションにより達成される。適切なりコンビナーゼは、例えば、F l p、C r e またはファージ C 3 1 インテグラーゼであり、対応するリコンビナーゼ認識部位を有する宿主細胞 / ベクターシステムと一緒に用いられる。宿主細胞は、まとめてトランスフェクトされ得、それは、発現ベクターのライブラリーが 1 回の単一反応で細胞株にトランスフェクトされ、それによりポリクローナル細胞株を得ることを意味する。代替的に、発現ベクターのコレクションは、宿主細胞に個別にトランスフェクトされ、それにより個々の細胞株のコレクションを作成することができる (各細胞株は特定の特異性を有する抗体を産生する)。次いで、トランスフェクションにより作成された細胞株 (各々またはポリクローナル) は、トランスフェクション前にまだこれらの特性を示さなかった場合、部位特異的な組み込み体について選択され、懸濁液および血清を含まない培地で増殖させるのに用いられる。トランスフェクションが個別に実施された場合、個々の細胞株は、それらの増殖特性および抗体産生に関してさらに解析される。好ましくは、同様の増殖速度および抗体発現レベルを有する細胞株は、ポリクローナル細胞株の作成について選択される。次に、ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を所定の割合で混合することにより作成される。一般に、ポリクローナルマスター細胞バンク (p M C B)、ポリクローナルリサーチ細胞バンク (p R C B) および / またはポリクローナルワーキング細胞バンク (p W C B) がポリクローナル細胞株から構築される。ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を所定の割合で混合することにより作成される。ポリクローナル細胞株は、アンプルに分配され、それによりポリクローナルリサーチ細胞バンク (p R C B) またはマスター細胞バンク (p M C B) を作成し、ポリクローナルワーキング細胞バンク (p W C B) は、リサーチまたはマスター細胞バンクから細胞を増殖させることにより作成することができる。リサーチ細胞バンクは、主として概念研究の証拠のためのものであり、ポリクローナル細胞株は、マスター細胞バンクにおけるポリクローナル細胞株ほど多くの個々の抗体を含み得ない。通常、p M C B は、産生のために p W C B を構築するためにさらに増殖させられる。p W C B が使い果たされると、p M C B からのアンプルが増殖させられて新しい p W C B を構築することができる。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明の一の具体例は、本発明の組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体を発現することができるポリクローナル細胞株である。

【 0 0 8 3 】

本発明のさらなる具体例は、各々個別の細胞が単一の  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーを発現することができるポリクローナル細胞株であって、前記ポリクローナル細胞株が、全体として  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションを発現することができ、各  $V_H$  および  $V_L$  のペアーが抗 - R S V 抗体をコードする。好ましくは、 $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのコレクションは、本発明の方法により作成される同種ペアーである。

【 0 0 8 4 】

本発明の組み換えポリクローナル抗体は、抗体の十分な発現が可能な期間、適切な培地中で p W C B からの 1 つのアンプルを培養することにより発現され、このポリクローナル細胞株は安定した状態を保つ（期間（window）はおよそ 15 日と 50 日の間である）。流加または灌流のごとき培養方法が用いられてもよい。組み換えポリクローナル抗体は、培地から得られ、慣用的な精製技術により精製される。イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用およびゲルろ過のごとく後の精製工程と一緒にしたアフィニティークロマトグラフィーが I g G の精製によく用いられる。精製後、ポリクローナル抗体組成物中の全ての個々のメンバーの存在が、例えば、イオン交換クロマトグラフィーにより試験される。ポリクローナル抗体組成物の特徴付けは、WO 2006/007853（PCT/DK2005/000504）（出典明示により本明細書に援用する）に詳細に記載される。

【 0 0 8 5 】

組み換え宿主において抗体の混合物を発現させる代替的な方法は、WO 04/009618に記載される。この方法は、単一の細胞株に由来する同一の軽鎖に結合した異なる重鎖を有する抗体を生成する。この方法は、抗 - R S V r p A b が組み合わせライブラリーから産生される場合に適用してもよい。

【 0 0 8 6 】

治療用組成物

本発明の別の態様は、活性成分として抗 - R S V r p A b もしくは抗 - R S V 組み換えポリクローナル F a b または別の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体フラグメントを含む医薬組成物である。好ましくは、かかる組成物の活性成分は、本発明に記載されるような抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体である。かかる組成物は、R S V 感染の予防および/または治療を目的とされる。好ましくは、医薬組成物は、ヒト、家畜、またはペットに投与される。

【 0 0 8 7 】

医薬組成物は、医薬上許容される賦形剤をさらに含む。

【 0 0 8 8 】

抗 - R S V r p A b またはそのポリクローナルフラグメントは、単一用量形態において、医薬上許容される希釈剤、担体、または賦形剤内で投与されてもよい。慣用的な医薬上の実施が用いられることにより、R S V に感染した患者、または R S V に感染するリスクの高いであろう患者に投与するのに適切な製剤または組成物が提供されてもよい。好ましい具体例では、投与は予防である。別の好ましい具体例では、投与は治療であり、R S V 感染に関連する症状の発症後に投与されることを意味する。適切な投与経路が用いられてもよく、例えば、投与は、経口、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、座剤、または経口投与であってもよい。例えば、医薬製剤は、液状溶液または懸濁液の形態であってもよく、経口投与用には、製剤は、錠剤、カプセル、チューインガムまたはペースト状の形態であってもよく、鼻腔内用には、粉末、点鼻剤、またはエアロゾルの形態であってもよい。

【 0 0 8 9 】

本発明の医薬組成物は、例えば、従来の溶解、凍結乾燥、混合、顆粒化または調合プロセスを用いて、それ自体周知な手法で調製される。医薬組成物は、慣用的な製薬の実施に

10

20

30

40

50

従って製剤化されてもよい（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacology (20th ed.), ed. A.R.Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAおよびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds.J.Swarbrick and J.C.Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, NYを参照。）。

#### 【0090】

好ましくは、活性成分の溶液もしくは懸濁液、特に等張水溶液もしくは懸濁液は、本発明の医薬組成物を調製するのに用いられる。活性成分のみまたは担体、例えば、マンニトールと一緒にした活性成分を含む凍結乾燥された組成物の場合、かかる溶液もしくは懸濁液は、可能であるならば、使用前に産生されてもよい。医薬組成物は、滅菌されていてもよく、ならびに／あるいは賦形剤、例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤および／または乳化剤、可溶化剤、浸透圧を調節する塩および／または緩衝液を含んでいてもよく、例えば、慣用的な溶解または凍結乾燥プロセスを用いて、それ自身よく知られる手法で調製される。前記溶液もしくは懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドンまたはゼラチンのごとき粘度増加物質を含んでもよい。

10

#### 【0091】

注入組成物は、滅菌状態で慣用的な手法において調製される；同じく、組成物をアンプルまたはバイアルに導入し、容器を密閉することに適用する。

#### 【0092】

経口投与のための医薬組成物は、活性成分を液体担体と一緒にすることにより、望ましくは生じた混合物を顆粒化し、次いで、所望または必要であるならば、適切な賦形剤を錠剤、ピル、またはカプセルへ添加した後、混合物を処理することにより得ることができ、セラック、糖またはその両方でコートされていてもよい。それらはまた、活性成分を一定量で拡散し、または解離されうるプラスチック担体に取り込まれることも可能である。

20

#### 【0093】

医薬組成物は、約1%から約95%まで、好ましくは約20%から約90%までの活性成分を含む。本発明による医薬組成物は、例えば、アンプル、バイアル、座薬、錠剤、ピル、またはカプセルの形態のごとき単一用量の形態であってもよい。製剤は、治療上または予防上有効量（例、病態を予防、排除、または軽減する量）でヒトの個体に投与されることにより、病気または状態に対する治療が提供されうる。投与される治療剤の好ましい用量は、RSV感染の重症度、各患者の総体的な健康状態、化合物賦形剤の剤形、およびその投与経路のごとき変動するものに依存すると考えられる。

30

#### 【0094】

本発明による組成物の治療上の使用

本発明による医薬組成物は、哺乳動物における病気の治療、改善または予防に用いられてもよい。本願の医薬組成物で治療または予防することができる状態は、RSVに感染した患者の治療、またはRSVに感染するリスクのある患者、特にRSVに感染する高いリスクを有する患者の予防、および治療を含む。高いリスクの患者は、例えば、幼児および小さい子供である。特に、慢性肺疾患または先天性心疾患のごとき問題を抱える未熟な幼児および子供は、RSV感染後に細気管支炎および肺炎のごとき深刻な病気に対して最も高いリスクを有する。また、免疫不全の成人、特に骨髄移植被提供者、高齢者および慢性肺疾患にかかっている患者のごとき高いリスクの成人は、好ましくは、本発明による医薬組成物による予防または治療上の処置を受けることができる。

40

#### 【0095】

本発明の一の具体例は、哺乳動物におけるRSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法であって、前記哺乳動物に本発明の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体の有効量を投与することを含む。

#### 【0096】

本発明のさらなる具体例は、哺乳動物におけるRSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状の治療、改善または予防のための組成物の調製のための本発明の抗-RSV組み

50

換えポリクローナル抗体の使用である。

【0097】

好ましくは、上記具体例における哺乳動物は、ヒト、家畜またはペットである。

【0098】

さらなる具体例では、RSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法を受けさせる哺乳動物は、好ましくは40kgを超える体重を有する。

【0099】

対象がヒトである具体例では、好ましくは、未成熟な幼児、慢性肺疾患または先天性心疾患にかかっている子供である。代替的な具体例では、ヒトは、免疫不全の成人、特に骨髓移植被提供者、高齢者または慢性肺疾患にかかっている個体である。

10

【0100】

診断上の使用

本発明の別の具体例は、診断用キットを目的とする。本発明によるキットは、本発明に従って調製される抗-RSV r p A bを含み、このタンパク質は、検出可能な標識で標識されていてもよく、または非標識検出用に標識されていなくてもよい。キットは、RSVで感染された個体を同定するのに用いられてもよい。

【0101】

本発明の抗体分子およびそれに関連した態様

本明細書で開示される新規な抗体分子がそれら自体の権利において技術常識に貢献すると信じられることは特筆されるべきである。したがって、本発明はまた、本明細書で開示される抗体分子のいずれか1つならびにこれらの抗体のフラグメントおよびアナログに関連し、前記フラグメントまたはアナログは、少なくとも本明細書で開示される抗体のCDRを含む。

20

【0102】

例えば、ヒトのドナーから単離された完全なヒト抗体分子のいずれかは、抗原結合部位としては、公知の従来技術のモノクローナル抗体を超えた極めて高い改善された動力学的特性を示す結合部位を含むことが本発明者らにより見出された。それゆえ、本願の開示におけるポリクローナル抗体組成物に多くの着目がなされたとしても、本明細書で説明されるポリクローナル抗体の利用に関する全ての対象物はまた、本明細書で開示される単一の抗体分子のうちのいずれか1つに関連する。すなわち、本発明のポリクローナル抗体組成物に関連する製剤化、用量、投与などに関する全ての開示は、本明細書で開示される個々の抗体分子、抗体フラグメントおよび抗体アナログ、好ましくはフレームワーク配列に準用する。

30

【0103】

したがって、本発明はまた、本明細書中の表5に記載される抗体分子から選択される単離ヒトRSV-抗体分子、あるいは前記単離抗体分子に特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログであって、前記結合するフラグメントまたはアナログは、少なくとも前記単離抗体分子の相補性決定領域(CDR)を含むものに関連する。多くの場合、元々のヒト抗体の可変領域に由来するフレームワーク領域は、抗体の抗原特異性がCDRおよびフレームワーク領域の3D構成によることが知られることから、フラグメントまたはアナログにも含まれる。

40

【0104】

用語「単離された抗体分子」は、天然の夾雑物から単離され、同一のアミノ酸配列(すなわち、同一の可変領域および定常領域)を示す別個の抗体コレクションを表すことが意図される。

【0105】

典型的に、抗体分子、フラグメントまたはアナログは、表8に記載される抗体に由来するか、あるいは、配列番号: 1-44のうちの1つに含まれる重鎖CDRアミノ酸配列および配列番号: 1-44から選択されるアミノ酸配列より88高い配列番号: を有する付随の軽鎖CDRアミノ酸配列を含む。このことは、抗体分子、フラグメントまたはアナロ

50

グが上に記載される44個のクローン以外の同一物から見出される可変領域の同種のペアを含むことを意味する。

【0106】

上に記載されるように、多くの本抗体分子は、非常に高い親和性を示し、本発明はまた、ヒト抗体に由来するFab中のCDRに同一のCDRを含む、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログに関連し、前記Fabは、物質輸送時の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換えRSVGタンパク質を用いて、Biacore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定した場合、500 nMまたはそれ以下のRSVGタンパク質の解離定数 $K_D$ を示す。

単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体は、典型的に、400 nMまたはそれ以下、例えば、300 nMまたはそれ以下、200 nMまたはそれ以下、100 nMまたはそれ以下、1 nMまたはそれ以下、900 pMまたはそれ以下、800 pMまたはそれ以下、700 pMまたはそれ以下、600 pMまたはそれ以下、500 pMまたはそれ以下、400 pMまたはそれ以下、300 pMまたはそれ以下、200 pMまたはそれ以下、100 pMまたはそれ以下、90 pMまたはそれ以下、および80 pMまたはそれ以下のごときより低い $K_D$ を示す。

【0107】

本発明の別の具体例は、ヒト抗体に由来するFab中の抗原結合部位に同一の抗原結合部位を含む、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログに関連し、前記Fabは、物質輸送時の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換えRSVGタンパク質を用いて、Biacore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定した場合、500 nMまたはそれ以下のRSVGタンパク質の解離定数 $K_D$ を示す。この単離された抗体、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体は、典型的に、400 nMまたはそれ以下、例えば、300 nMまたはそれ以下、200 nMまたはそれ以下、100 nMまたはそれ以下、1 nMまたはそれ以下、900 pMまたはそれ以下、800 pMまたはそれ以下、700 pMまたはそれ以下、600 pMまたはそれ以下、500 pMまたはそれ以下、400 pMまたはそれ以下、300 pMまたはそれ以下、200 pMまたはそれ以下、100 pMまたはそれ以下、90 pMまたはそれ以下、80 pMまたはそれ以下、70 pMまたはそれ以下、60 pMまたはそれ以下、50 pMまたはそれ以下、40 pMまたはそれ以下、30 pMまたはそれ以下、25 pMまたはそれ以下、20 pMまたはそれ以下、15 pMまたはそれ以下、10 pMまたはそれ以下、9 pMまたはそれ以下、8 pMまたはそれ以下、7 pMまたはそれ以下、6 pMまたはそれ以下、および5 pMまたはそれ以下のごとき $K_D$ を示す。

【0108】

特に有用な抗体分子または特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログは、クローン番号810、818、819、824、825、827、858または894で産生されるヒト抗体のCDRを含む。

【0109】

上に記載されるように、本発明のこれらの有用な抗体分子は、本発明のポリクローナル製剤と同一の方法および同一の適用で製剤化されてもよい。したがって、本発明は、医薬上許容される担体、賦形剤、ビヒクルまたは希釈剤と混合した、このセクションに記載される抗体分子、特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログを含む抗体組成物に関する。組成物は、1つ以上の結合特異性を含んでもよく、例えば、2つの本発明の別個の抗体分子ならびに/あるいは本発明の特異的に結合するフラグメントおよび/または合成もしくは半合成の抗体アナログを含んでもよい。組成物は、少なくとも3つの別個の抗体分子および/または抗体フラグメントおよび/または合成もしくは半合成抗体アナログ、特に本発明の結合フラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログを含んでもよく、それゆえに4、5、6、7、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

29 または 30 個の別個の抗体分子および / またはフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含む組成物を構成してもよい。

【0110】

特に目的とする組成物は、少なくとも 1 つの R S V F タンパク質に結合する本発明の抗体分子、フラグメントまたはアナログ、ならびに少なくとも 1 つの R S V G タンパク質に結合する本発明の抗体分子、フラグメントまたはアナログを含む。

【0111】

本発明の一部はまた、核酸フラグメントのごとく、本発明の抗体分子のうちの少なくとも 1 つの定義された C D R のアミノ酸をコードする単離された核酸フラグメントであって、それは、少なくとも表 5 に記載されるクローンのうちの 1 つにより產生される抗体の C D R をコードする。核酸フラグメントは、典型的には D N A であるが、R N A でもありうる。

10

【0112】

別の具体例は、配列番号：1 - 44 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の C D R 配列をコードする、単離された核酸フラグメントであるか、あるいは、配列番号：89 - 132 のうちのいずれか 1 つに記載される軽鎖アミノ酸配列の C D R 配列をコードする、単離された核酸フラグメントである。本発明の好ましい核酸フラグメントは、配列番号：1 - 44 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の C D R 配列をコードし、配列番号：1 - 44 から選択されるアミノ酸配列より 88 高い配列番号：を有する付随する軽鎖 C D R アミノ酸配列に記載される。このことは当然、核酸フラグメントが上で記載される 44 個のクローン由来の同一物中に見出される可変領域の同種のペアーをコードすることを意味する。それゆえ、核酸フラグメントは、配列番号：45 - 88 および / または 133 - 176 に含まれるコーディング配列を含んでもよい。

20

【0113】

利便的に、核酸フラグメントがベクターに導入されても、本発明の一部となる。かかるベクターは、自律的に複製することができてもよく、典型的には、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群から選択される。

【0114】

本発明のベクターが発現ベクターである場合では、それは、好ましくは以下に概略を示す（参考：図 3 の典型的なベクター）：

30

- 5' 3' 方向および作動可能な連結において、上記に示される第 1 の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも 1 つのプロモーターであって、それは、いずれかの必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第 1 の核酸フラグメント、任意選択で抗体の定常領域をコードする核酸配列、ならびに任意選択で第 1 の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも 1 つの軽鎖 C D R をコードし、ならびに / あるいは

- 5' 3' 方向および作動可能な連結において、本発明の第 2 の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも 1 つのプロモーターであって、それは、いずれかの必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第 2 の核酸フラグメント、任意選択で抗体の定常領域をコードする核酸配列、ならびに任意選択で第 2 の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも 1 つの重鎖 C D R をコードする。

40

【0115】

かかるベクターは、安定に宿主細胞を形質転換することに用いることができ、次いで組み換え発現産物を得るために培養されうる場合に特に有用である。したがって、好ましいベクターは、宿主細胞に導入される時に、宿主細胞ゲノムに組み込まれるものである。

【0116】

したがって、本発明はまた、このセクションに記載される発明のベクターを保有する形質転換された細胞、ならびにこのベクターを保有し、このセクションに記載される本発明の核酸フラグメントを発現する安定な細胞株に関連する。形質転換された細胞および細胞

50

株の両方は、必要に応じて、その表面上の組み換え発現産物（すなわち、本発明の抗体分子、抗体フラグメントまたはアナログ）を分泌するか、または保有する。

【実施例 1】

【0117】

この実施例は、本発明を例示するために適用された方法を集めたものである。

【0118】

a. ドナー血液由来のラムダ - 陰性の形質芽細胞の分別

末梢血単核細胞（P B M C）を、製造業者の説明書に従って L y m p h o p r e p（A x i s S h i e l d）および勾配遠心分離を用いて、ドナーから採集した血液から単離した。単離した P B M C を、- 150 で F C S；10% D M S O 中で凍結保存するか、または直接使用した。B 細胞画分を抗 - C D 19 抗体で標識し、磁気細胞分離（M A C S）を用いて P B M C 画分から単離した。P B M C（ $1 \times 10^6$  細胞）を抗 - C D 19 - F I T C 抱合抗体（B D P h a r m i n g e n）と 4 で 20 分間インキュベートした。細胞を M A C S 緩衝液（M i l t e n y i B i o t e c）で 2 回洗浄し、再懸濁させた。抗 - F I T C M i c r o B e a d s（M i l t e n y i B i o t e c）を、標識した細胞と混合し、4 で 15 分間インキュベートした。細胞 - ビーズ懸濁液を L S M A C S カラム（M i l t e n y i B i o t e c）にアプライする前に洗浄の手順を繰り返した。C D 19 陽性細胞画分を、製造業者の説明書に従ってカラムから溶離し、F C S - 10% D M S O 中で保存するか、または直接単一細胞を分別した。

10

【0119】

20

形質芽細胞を、C D 19、C D 38、および C D 45 細胞表面タンパク質の発現プロファイルに基づいた蛍光表示式細胞分取器（F A C S）により、C D 19<sup>+</sup> B 細胞画分から選択した。C D 19 は、血漿細胞前駆体上でも発現される B - 細胞マーカーである一方、C D 38 は、形質芽細胞および血漿細胞上で強く発現される。形質芽細胞は、明らかに残りの C D 19<sup>+</sup> 細胞よりいくらか低い C D 19 および C D 45 の発現を示し、このことは別々の集団への分離を可能にする。細胞を F A C S 緩衝液（P B S；1% B S A）で洗浄し、抗 - C D 19 - F I T C、抗 - C D 38 - A P C、抗 - ラムダ - P E（B D P h a r m i n g e n）で 20 分間染色した。P C R の鋳型として供給できない細胞を排除させるためにラムダ軽鎖染色を含めた（セクション c を参照）。染色された細胞を F A C S 緩衝液で洗浄し、再懸濁させた。

30

【0120】

F A C S 中の細胞の流速を約 200 イベント / 秒に設定し、細胞濃度を  $5 \times 10^5$  / m l にして高い血漿細胞レスキューを得た。以下のゲート設定を用いた。各ゲートは作成者の設定（d a u g h t e r o f t h e f o r m e r）である。

【0121】

ゲート 1：F S C / S S C ゲート。最も高い F S C を示すリンパ球集団を選択し、それにより生存細胞の分別を確実にした。

【0122】

ゲート 2：S S C h / S S C w。このゲートは単一細胞の分別を確実にした。

【0123】

40

ゲート 3：形質芽細胞を表すイベントを C D 38 高 / C D 19 中間として C D 38 / C D 19 ドットプロットで表した。

【0124】

ゲート 4：セクション c で記載される P C R 法のみがカップバ軽鎖を増幅するため、ラムダ - 陰性イベントをラムダ / C D 19 ドットプロットで表した。

【0125】

ゲート 3 の代替としてまたはゲート 3 に加えて、形質芽細胞を C D 45 / C D 38 ドットプロット中の C D 38 高および C D 45 中間として同定した。これは、抗 - C D 45 - P e r C P による細胞の染色を必要とする。

【0126】

50



これらの4つの基準を満たした得られた集団を、分別緩衝液を含む96 - ウェルPCRプレートに単一細胞に分別した(セクションcを参照)。前記細胞を含むプレートを - 80 で保存した。

#### 【0127】

##### b. ELISpot

ELISpotを用いることにより、得られた細胞サンプル、すなわち、PBMC、MACS - 精製CD19<sup>+</sup>細胞、またはFACSで分別した形質芽細胞の集団において、抗-RSV抗体を発現する形質芽細胞の割合を評価した。ニトロセルロース表面を伴う96 - ウェルプレート(Millipore)を25 µg/mlの不活性化RSV Long粒子(HyTest)溶液でコートした。ウェルをRPMI、2% 粉乳とのインキュベーションによりブロックし、4 で約5時間静置し、続いて37 で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、細胞サンプルをRPMI培地中で各ウェルに添加し、続いて一般的な組織培養条件で24時間インキュベートした。分泌されたRSV - 特異的な抗体は、抗体産生細胞周辺の固定化されたウイルス粒子に結合する。細胞をPBS; 0.01% Tween 20で3回およびPBSで3回洗浄することにより取り除いた。HRP - 抱合抗 - ヒトIgG (H+L) (CalTaq) およびHRP - 抱合抗 - ヒトIgA (Serotec)を加え、固定化された抗体と37 で1時間反応させた。洗浄の手順を繰り返し、発色基質(N, N - DMF (ジ - メチルホルムアミド)中に可溶化された3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール)を添加した。発色をH<sub>2</sub>Oの添加により4分後に停止させた。赤色スポットを抗原 - 特異的抗体 - 分泌細胞が局在する部位として同定した。

10

20

#### 【0128】

##### c. 同種V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ペアーの連結

V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列の連結を、セクションaに記載されるように得られた単一細胞上で行い、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列の同種のペアーを容易にした。手法は、一工程(one - step)の多重重複伸長RT - PCRに続いてネステッドPCRに基づく二工程(two - step)PCR法を利用した。本実施例で用いられるプライマーミックスは、カップ軽鎖のみを増幅する。しかしながら、ラムダ軽鎖を増幅することができるプライマーを任意選択で多重プライマーミックスおよびネステッドPCRプライマーミックスに添加することができた。ラムダプライマーを添加する場合、セクションaにおける分取の手法は、ラムダ陽性細胞が排除されないように用いられるべきである。同種V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の連結のための原理を図2に示す。

30

#### 【0129】

セクションaで産生された96 - ウェルPCRプレートを融解させ、分取した細胞を多重重複伸長RT - PCRの鋳型として供給した。単一細胞分取前に各ウェルに添加した分取緩衝液は、反応緩衝液(One Step RT - PCR緩衝液; Qiagen)、RT - PCR用プライマー(表2を参照)およびRNase阻害剤(RNasin、Promega)を含有した。これにOne Step RT - PCR酵素ミックス(25x希釈率; Qiagen)およびdNTP(各200 µM)を補充して20 µlの反応体積で所定の最終濃度を得た。

#### 【0130】

プレートを55 で30分間インキュベートして各細胞からのRNA逆転写を可能にした。RT後、プレートを以下のPCRサイクルにかけた: 94 で10分、35x(94 で40秒、60 で40秒、72 で5分)、72 で10分。

40

#### 【0131】

24個の96 - ウェルプレート用のPeel Seal Bagetを備えるH20BITサーマルサイクラー(ABgene)でPCR反応を実施してハイスループットを容易にした。PCRプレートをサイクリング後に - 20 で保存した。

#### 【0132】

表2: RT - PCR多重重複伸長プライマーミックス

【表 2】

プライマー名	最終濃度、 nM	配列	配列番号:
VHセット			
CH-IgG	0.2	GACSGATGGGCGCTTGGTGG	179
CH-IgA	0.2	GAGTGGCTCCTGGGGGAAGA	180
VH-1	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGRTGCAGCTGGTGCT	181
VH-2	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCAGCTGGTRCAGT	182
VH-3	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGRTCACCTTGAAGGAGT	183
VH-4	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTGGTGAG	184
VH-5	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGGTGCAGCTACAGCAGT	185
VH-6	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGSTGCAGCTGCAGGAGT	186
VH-7	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGCAGCTGGTGAGT	187
VH-8	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTC	188
LCセット			
CK1	0.2	ATATATATGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCTGTTG	189
VL-1	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGACATCCAGWTGACCCAGTCT	190
VL-2	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATGTTGTGATGACTCAGTCT	191
VL-3	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAATTGTGWTGACRCAGTCT	192
VL-4	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATATTGTGATGACCCACACT	193
VL-5	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAACGACACTCACGCAGT	194
VL-6	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCT	195

10

20

30

W = A / T、R = A / G、S = G / C

## 【0133】

ネステイドPCR工程では、96-ウェルプレートの各ウェル(20-μl反応物)に以下の混合物を調製して所定の最終濃度を得た: 1×FastStart緩衝液(Roche)、dNTPミックス(各200μM)、ネステイドプライマーミックス(表3を参照)、Phusion DNAポリメラーゼ(0.08U; Finnzymes)およびFastStart High Fidelity Enzyme Blend(0.8U; Roche)。ネステイドPCRの鑄型として、1μlを多重重複伸長PCR反応物から移した。ネステイドPCRプレートを以下のPCRサイクルにかけた: 35×(95で30秒、60で30秒、72で90秒)、72で10分。

40

## 【0134】

無作為に選択した反応物を1%アガロースゲル上で解析して約1070bpの重複伸長フラグメントの存在を確認した。

## 【0135】

さらにPCRフラグメントを処理するまでプレートを-20で保存した。

## 【0136】

表3: ネステイドプライマーのセット

【表 3】

プライマー名	最終濃度 nM	配列	配列番号
CK2	0.2	ACCGCCTCCACGCGCGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC TCTT	196
PJ 1-2	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTGCC	197
PJ 3	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCATTGTCCC	198
PJ 4-5	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCC	199
PJ 6	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	200

10

## 【0137】

d. 同種  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのスクリーニングベクターへの挿入

R S V 粒子または抗原に対して結合特異性を有する抗体を同定するために、セクション c に記載されるように得られた  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列を全長抗体として発現させた。このことは、 $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのレパートリーの発現ベクターへの挿入および宿主細胞への形質転換に関連した。

## 【0138】

連結された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーを含む発現ベクターのレパートリーを作成するために、二工程クロニング法を採用した。統計的に、発現ベクターのレパートリーがスクリーニングレパートリーの作成に用いられる同種ペアーの  $V_H$  および  $V_L$  P C R 産物の数より 10 倍多い組み換えプラスミドを含む場合、全てユニークな遺伝子ペアーが表される可能性は 99% である。それゆえ、400 個の重複伸長 V - 遺伝子フラグメントがセクション c で得られた場合、少なくとも 4000 個のクローンのレパートリーがスクリーニングにより作成された。

20

## 【0139】

簡単に説明すると、セクション c におけるネステッド P C R からの連結された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのレパートリーを、(他のドナーに由来するペアーを混合することなく) プールした。P C R フラグメントを、P C R 産物の末端に導入された認識部位において X h o I および N o t I DNA エンドヌクレアーゼを用いて切断した。一般的なライゲーションの方法により、切断および精製されたフラグメントを X h o I / N o t I で消化した哺乳動物 I g G 発現ベクター (図 3) に結合させた。ライゲーション混合物を E . c o l i にエレクトロポレートし、適切な抗生物質を含む 2 x Y T プレートに添加し、37 で一晩インキュベートした。増幅されたベクターのレパートリーを、一般的な DNA 精製方法 (Q i a g e n) を用いて、プレートから回収した細胞から精製した。プロモーター - リーダーフラグメントの挿入のために、A s c I および N h e I エンドヌクレアーゼを用いる切断によりプラスミドを調製した。これらの酵素の制限部位は、 $V_H$  および  $V_L$  をコードする遺伝子のペアー間に局在した。ベクターの精製後に、A s c I - N h e I で消化された二方向性哺乳動物プロモーター - リーダーフラグメントを、一般的なライゲーション法により A s c I および N h e I 制限部位に挿入した。結合されたベクターを E . c o l i 中で増幅させ、一般的な方法を用いてプラスミドを精製した。作成されたスクリーニングベクターのレパートリーを慣用的な手法により E . c o l i に形質転換させた。得られたコロニーを 384 - ウェルマスタープレートに集め、保存した。アレイしたコロニー数は、インプットした P C R 産物の数を少なくとも 3 倍超え、それによりセクション c で得られた全てのユニークな V - 遺伝子ペアーの存在について 95% の可能性が与えられた。

30

40

## 【0140】

## e. スクリーニング

セクション d で集められた細菌コロニーを、同様の 384 - ウェルプレート中の培地に播種し、一晩培養した。トランスフェクション用の DNA を細胞培養プレートの各ウェルから調製した。トランスフェクション前日に、384 - ウェルプレートに 20  $\mu$  l 培地中

50

で3000細胞/ウェルにおいてCHO-Flp-In細胞(Invitrogen)を播種した。細胞を、製造業者の説明書に従ってFugene6(Roche)を用いてDNAとともにトランスフェクトさせた。2-3日間の培養後、スクリーニングに用いるため、全長抗体を含む上澄み液を収集し、保存した。

#### 【0141】

Applied Biosystems 8200 FMT(登録商標)システム、ホモジニアス(homogeneous)ビーズに基づいた可溶化キャプチャーFLISA(蛍光連結免疫吸着アッセイ)を用いてスクリーニングを行った(Swartzman et al1999, AnalBiochem271:143-151)。RSV抗原に由来するウイルス粒子、組み換えGタンパク質およびビオチン化ペプチドを含む多くの抗原をスクリーニングに使用した。ペプチドは、Gタンパク質の保存領域(アミノ酸164-176)とシステインコア領域(アミノ酸171-187、株Longおよび18537)およびSH-タンパク質の細胞外領域(A2株のアミノ酸42-64および18537株の42-65)に由来した。不活性化されたRSV株Longのウイルス粒子(HyTest)を、300 $\mu$ lのウイルスストック(タンパク質濃度:200 $\mu$ g/ml)と一緒に300 $\mu$ lの5% w/vビーズ(直径6.79 $\mu$ m、SpheroTech Inc.)をインキュベートすることによりポリスチレンビーズ上に固定化させた。可溶性組み換えGタンパク質(18537株の配列のアミノ酸66-292)を同様に直接ポリスチレンビーズ上に固定化させた一方、ビオチン化されたペプチドを、前コートされたストレプトアビジンポリスチレンビーズ(直径6.0-8.0 $\mu$ m、Gerlinda Kisker)上で飽和濃度において補促させた。コート混合物を一晩インキュベートし、PBSで2回洗浄した。ビーズを、1%ウシ血清アルブミン(PBS/BSA)および5 $\mu$ lヤギ-抗-ヒトIgG Alexa647抱合体(Molecular probes)を含む50mlのPBSで再懸濁した。再懸濁したコート混合物の10 $\mu$ lに、FMT適合性の384-ウェルプレート中で20 $\mu$ lの抗体を含む上澄み液を添加し、約12時間インキュベートし、その後、各ウェル中のビーズ表面における蛍光を測定した。蛍光の強度がバックグラウンド基準を超えた少なくとも6つの標準偏差である場合、蛍光イベント(event)が陽性であると判断した。

10

20

30

40

#### 【0142】

最初の当たりで生じたクローンを元々のマスタープレートから取り出し、新しいプレートに収集した。これらのクローンからDNAを単離し、V-遺伝子のDNA配列決定を行った。この配列を並列比較し、全てのユニークなクローンを選択した。

#### 【0143】

選択されたクローンをさらに検証した。簡単に説明すると、 $2 \times 10^6$ 個のフリースタイル(Freestyle)293細胞(Invitrogen)を、製造業者の説明書に従って、2mlのフリースタイル培地(Invitrogen)中において、選択されたクローン由来の1.7 $\mu$ g DNAおよび0.3 $\mu$ gのpAdVAntagEプラスミド(Promega)でトランスフェクトした。2日後、上澄み液を、IgG発現について、ならびに一次スクリーニングに用いられる異なる抗原および組み換え精製Fタンパク質とE.coli産生のGタンパク質フラグメント(18537株配列のアミノ酸127-203)との反応性について、FLISAおよび/またはELISAによりテストした。抗体上澄み液を連続希釈でテストすることにより、抗原反応性によるクローンのランキングを可能にした。

#### 【0144】

##### f. クローン修復

セクションcに記載されるような多重PCR法を用いると、高い相同性により、一定頻度のV-遺伝子ファミリー内および間のクロスプライミングが予想される。クロスプライミングは、免疫グロブリンフレームワーク中に天然に存在しないアミノ酸を導入し、いくつかの潜在的な結果、例えば、構造変化および免疫原性の増加をもたらし、それらは全て治療活性の減少を招く。

50

## 【0145】

これらの欠点を解消し、選択されたクローンが自然の液性免疫応答を反映することを確実にするために、かかるクロスプライミング変異をクローン修復 (clone repair) と呼ばれるプロセスで修復した。

## 【0146】

クローン修復手順の第一工程では、 $V_H$  配列を、目的クローンの起源である  $V_H$  - 遺伝子に対応する配列を含むプライマーセットで PCR 増幅し、それによりクロスプライミングにより導入された変異のいずれかを修正した。PCR フラグメントを  $XhoI$  および  $AscI$  で消化し、慣用的なライゲーション手法を用いて、 $XhoI / AscI$  で消化された哺乳動物発現ベクター (図3) に結合させた。結合したベクターを  $E. coli$  中で増幅させ、一般的な方法によりプラスミドを精製した。 $V_H$  配列の配列を決定して修正を確認し、ベクターを  $NheI / NotI$  で消化して軽鎖の挿入用に調製した。

10

## 【0147】

第二工程では、完全な軽鎖を、目的クローンの起源である  $V_L$  - 遺伝子に対応する配列を含むプライマーセットで PCR 増幅し、それによりクロスプライミングにより導入された変異のいずれかを修正した。PCR フラグメントを  $NheI / NotI$  で消化し、上記で調製されたベクターを含む  $V_H$  に結合させた。ライゲーション産物を  $E. coli$  で増幅させ、一般的な方法により精製した。次いで、軽鎖の配列を決定して修正を確認した。

## 【0148】

選択されたクローンのカッパ定常領域が、セクション c に記載の遺伝子増幅中に導入された変異を含んだ場合、未変異の定常領域により置換された。これは、(定常領域を除いて増幅された) 修復  $V_L$  - 遺伝子を、(別々の PCR で得られた) 修正配列を伴う定常領域に繋ぐ重複 PCR において行った。全体の配列を増幅し、上に記載されるごとくベクターを含む  $V_H$  にクローン化し、修復された軽鎖の配列を決定して修正を確認した。

20

## 【0149】

## g. ポリクローナル細胞株の作成

組み換えポリクローナル抗体を産生するポリクローナル発現細胞株の作成は、単一の  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子配列に由来するユニークな抗体を各々発現する個々の発現細胞株の作成に関する複数 - 工程手順である。ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を混合し、混合物をアンプルに分配し、それによりポリクローナルリサーチ細胞バンク (pRCB) またはマスター細胞バンク (pMCB) を作成することにより得られ、ポリクローナルワーキング細胞バンク (pWCB) は、リサーチまたはマスター細胞バンクから細胞を増殖させることにより作成されうる。一般的に、pRCB 由来のポリクローナル細胞株は、pWCB を作成することなく直接用いられる。

30

## 【0150】

ポリクローナル細胞株を作成するプロセスにおける各工程を以下に記載する。

## 【0151】

## g - 1 哺乳動物細胞株のトランスフェクションおよび選択

F1p - In CHO 細胞株 (Invitrogen) を開始細胞株として用いた。より均一な細胞株を得るために、親の F1p - In CHO 細胞株を、希釈を制限してサブクローン化し、いくつかのクローンを選択し、増殖させた。増殖の具合に基づいて、1つのクローン、CHO - F1p - In (019) を開始細胞株として選択した。CHO - F1p - In (019) 細胞を 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む HAM - F12 中で接着細胞として培養した。

40

## 【0152】

セクション f で得た選択および修復された  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーを各々含む各プラスミド調製物を、Fugene 6 (Roche) を用いて、T175 フラスコ中の  $\sim 1.9 \times 10^6$  個の CHO - F1p - In (019) 細胞 (より詳細については、WO 04/061104 を参照) に、F1p リコンビナーゼをコードするプラスミドで共トランスフェクトした。細胞を 24 時間後にトリプシン処理し、2-layer ( $1260 \text{ cm}^2$ ) ce

50

1 l f a c t o r y ( N u n c ) に移した。トランスフェクション48時間後に添加した500  $\mu$ g / ml のジェネティシンの存在下で培養することにより、組み換え細胞株を選択した。約2週間後にクローンが現れた。クローンを数え、細胞をトリプシン処理し、その後、RSV特異的な抗体のうちの1つを発現するクローンのプールとして培養した。

#### 【0153】

##### g - 2 血清を含まない懸濁培養への適応

接着した抗-RSV抗体を発現する細胞培養物各々をトリプシン処理し、遠心分離し、適切な無血清培地 ( E x c e l l 3 0 2 、 J R H B i o s c i e n c e s ; 5 0 0  $\mu$ g / ml ジェネティシン、抗凝集剤 ( 1 : 2 5 0 ) および4 mM L - グルタミン ) 中に  $1.15 \times 10^6$  細胞 / ml の入った別々の振盪フラスコ ( 2 5 0 ml ) に移した。増殖と細胞形態を数週間にわたって経過観察した。4 - 6週間後、細胞株は通常、30時間より少ない倍加時間を有する良好かつ安定な増殖状態を示し、次いで用いた各細胞株を複数のアンプルに凍結保存した。

10

#### 【0154】

適応中に発現された各抗体を、セクション i ) に記載される方法を用いて上澄み液から精製した。精製された抗体を以下に記載されるごとく抗原特異性および生化学的特性の特徴付けに用いた。

#### 【0155】

##### g - 3 細胞株の特徴付け

全ての各細胞株を抗体産生および増殖に関して特徴付けを行った。これを以下のアッセイで行った：

20

#### 【0156】

##### 産生：

各発現細胞株の組み換え抗体の産生を、カップパ特異的 E L I S A による適応期間後に続けた。E L I S A プレート、炭酸緩衝液、pH 9.6 中のヤギ - 抗 - ヒト F c 精製抗体 ( S e r o t e c ) で一晚コートした。プレートを洗浄緩衝液 ( P B S ; 0.05% T w e e n 2 0 ) で6回洗浄し、2% スキムミルクを含む洗浄緩衝液中で1時間のインキュベーションによりブロックした。細胞培地の上澄み液を添加し、さらに1時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で6回洗浄し、二次抗体 ( ヤギ - 抗 - ヒトカップパ H R P 、 S e r o t e c ) を添加し、インキュベーションを繰り返した。激しい洗浄後、E L I S A を T M B 基質液で発色させ、 $H_2SO_4$  の添加により反応を止めた。プレートを450 nm で読み取った。

30

#### 【0157】

さらに、細胞内染色を用いることにより、一般的な発現レベルならびに組み換え抗体の発現に関する細胞集団の均一性 ( h o m o g e n e i t y ) を調べた。 $5 \times 10^5$  個の細胞を、C e l l F i x ( B D - B i o s c i e n c e s ) 中で20分間のインキュベーションによる固定の前に、冷 F A C S 緩衝液 ( P B S ; 2% F C S ) で洗浄した。細胞をペレット状にし、氷冷メタノールで10分間透過処理し、F A C S 緩衝液で2回洗浄した。懸濁液に、蛍光タグをつけた抗体 ( ヤギ F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメント、抗 - ヒト I g G ( H + L ) - P E 、 B e c k m a n C o u l t e r ) を添加した。20分後、氷上で細胞を洗浄し、F A C S 緩衝液で再懸濁し、次いで F A C S 解析を行った。

40

#### 【0158】

##### 増殖：

細胞懸濁液のアリコットを1週間に2から3回取り、細胞数、細胞の大きさおよび生存率を V i - C e l l X R ( C e l l v i a b i l i t y a n a l y z e r 、 B e c k m a n C o u l t e r ) 解析により調べた。細胞培養の倍加時間を V i - C e l l 測定からの細胞数を用いて算出した。

#### 【0159】

##### g - 4 各抗体の抗原特異性の特徴付け

よく特徴付けられた特性を有する抗-RSV r p A b の作成を行うために、各々発現

50

される抗体の抗原およびエピトープ特異性を測定した。すでにセクション e に記載されるように、スクリーニング中に同定された抗体を、単一の R S V 抗原（組み換え G タンパク質、組み換えまたは精製 F タンパク質）またはそのペプチドフラグメント（タンパク質 G、サブタイプ A および B の保存領域およびシステインコアモチーフ、ならびに S H タンパク質、サブタイプ A および B の細胞外ドメイン）に対するそれらの結合特性を F L I S A、E L I S A および表面プラズモン共鳴（S P R ; B i a c o r e）により測定することで確認した。エピトープ特異性を、よく特徴付けられた市販の抗体であって、そのうちのいくつかは表 4 に示される抗体との競合による E L I S A において調べた。必ずしも表 4 に示された全ての抗体を、本発明の各々の抗体の特徴付けに用いておらず、それらが結合する抗原、抗原部位および / またはエピトープに関して特徴付けられた潜在的な他の抗体または抗体フラグメントもまた用いられてもよい。簡単に説明すると、エピトープのブロッキングに用いられる抗体または抗体フラグメントを、過剰量、すなわち、実験的に調べられたように 75 % の最大結合を与える濃度の 100 倍（Ditzel et al., J.Mol.Biol.1997, 267:684-695）の固定化抗体（R S V L o n g 粒子、H y T e s t）とインキュベートした。洗浄後、各抗体クローンを、様々な濃度でブロックした抗原とインキュベートし、いずれかの結合したヒト I g G を、一般的な E L I S A プロトコルに従ってヤギ - 抗 - ヒト H R P 抱合体（S e r o t e c）を用いて検出した。エピトープ特異性を、ブロッキングおよびプロービング（p r o b i n g）の両方の（実験的に調べられた）飽和濃度を用いる B i a c o r e において、異なる抗体クローン間の対（p a i r - w i s e）競合によりさらに特徴付けした。直接アミンカップリング（B i a c o r e）により固定化された精製 F または G タンパク質を抗原として用いた。E L I S A - および B i a c o r e - の両方に基づいたエピトープマッピングでは、エピトープブロッキング後の減少した結合を競合させていない結合と比較した。

10

20

【 0 1 6 0 】

表 4 : 抗 - F および抗 - G 抗体のエピトープマッピングのモノクローナル抗体

【表 4】

MAb/Fab	抗原	抗原部位	エピトープ(aa)	Ref.
131-2a	F	F1	F1a	1,2
9C5	F	F1	F1a	5
92-11c	F	F1	F1b	1,2
102-10b	F	F1	F1c	1,2
133-1h	F	C	F2	1,2,3
130-8f	F	C	F2 (241/421)	1,2,3,4
143-6c	F	A/II	F3	1,2,3
パリビズマブ	F	A/II	(272)	8
1153	F	A/II	(262)	3,4
1142	F	A/II		3
1200	F	A/II	(272)	2,4
1214	F	A/II	(276)	3,4
1237	F	A/II	(276)	3,4
1129	F	A/II	(275)	3,4
1121	F	A/II		3
1112	F	B/I	(389)	3,6
1269	F	B/I	(389)	3,6
1243	F	C	(241/421)	3,6
Fab 19	F	A/II	(266)	7
RSVF2-5	F	IV	(429)	4
Mab19	F	IV	(429)	12
7.936	F	V	(432-447)	13
9.432	F	VI	(436)	13
63-10f	G (A)	G11	GCRR (A171-187)	1,2
130-6d	G (A)	G12	(A174-214)	1,2,9
131-2g	G (A+B)	G13	(150-173)	1,2,9
143-5a	G (A+B)	G5a		2
L9	G (A+B)	A1/B1	保存(164-176)	14,15
8C5	G	ND		5
1C2	G (A)	ND	GCRR (A172-188)	10,11
3F4	G (A)	ND		10,11
4G4	G (A)	ND	GCRR (A172-188)	10,11

10

20

30

## 【 0 1 6 1 】

欄「抗原」は、M a b / F a bにより結合されるR S V関連抗原を示し、サブタイプ特異性が知られている場合、これは( )で示される。欄「エピトープ(a a)」は、M A b / F a bにより認識されるエピトープ名を示し、さらに、( )では、R S Vエスケープ変異体を生じるアミノ酸の位置、または結合が示されたペプチド/タンパク質が示される。表 4 に示す参考文献 ( R e f . ) の番号は、

1. Anderson et al., J.Clin.Microbiol.1986, 23:475-480.
2. Anderson et al., J.Virol.1988, 62:1232-4238.
3. Beeler & van Wyke Coelingh, J.Virol.1989, 63:2941-2950.
4. Cowe et al., JID 1998, 177:1073-1076.
5. Somnina et al., Vestn Ross Akad Med Nauk 1995, 9:49-54.
6. Collins et al., Fields Virology, p1313-1351.
7. Crowe et al., Virology 1998, 252:373-375.

40

50



8. Zhao & Sullender, J.Virol.2004, 79:3962-3968.
9. Sullender, Virology 1995, 209:70-79.
10. Morgan et al., J.Gen.Virol.1987, 68:2781-2788.
11. McGill et al., J.Immunol.Methods 2005, 297:143-152.
12. Arbiza et al., J.Gen.Virol.1992, 73:2225-2234.
13. Lopez et al., J.Virol.1998, 72:6922-6928.
14. Walsh et al., J.Gen.Virol.1989, 70:2953-2961.
15. Walsh et al., J.Gen.Virol.1998, 79:479-487.

に対応する。

#### 【0162】

さらに、抗体クローンを、異なるRSV株（LongおよびB1）で感染させた咽頭上皮HEp-2細胞（ATCC CCL-23）への結合に関してもFACSにより特徴付けした。簡単に説明すると、HEp-2細胞を、無血清培地中で0.1pfu/細胞の割合においてRSV Long（ATCC番号VR-26）株またはRSV B1（ATCC番号VR-1400）株のどちらかで24時間（Long株）または48時間（B1株）感染させた。剥離および洗浄後、細胞を96-ウェルプレートに分注し、各抗-RSV抗体の希釈液（4pM - 200μM）において37℃で1時間インキュベートした。細胞を1%ホルムアルデヒドで固定し、細胞表面結合抗体をヤギF(ab)<sub>2</sub>抗-ヒトIgG-PE抱合体（Beckman Coulter）との4℃で30分間のインキュベーションにより検出した。モック（mock）感染HEp-2細胞に対する結合を同様に解析した。タンパク質G特異的として選択されたクローンもまた、組み換えヒトフラクタルキン（CX3CL1；R&D systems）との交差反応性についてELISAによりテストした。抗-ヒトCX3CL1/フラクタルキンモノクローナル抗体（R&D systems）を陽性コントロールとして用いた。

#### 【0163】

##### g-5 各抗体の結合反応速度の特徴付け

本発明の抗体の動力学的解析を、物質移動の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え抗原を用いて、Biacore 3000（スウェーデン、ウプサラのBiacore AB）で表面プラズモン共鳴分析を用いて行った。ImmunoPure Fab調製キット（Pierce）を用いて各抗体クローンから調製されたFabフラグメントを用いて解析を行った。簡単に説明すると、合計200共鳴単位（RU）の組み換えタンパク質Fまたは合計50RUの組み換えタンパク質Gを、製造業者の説明書に従ってアミンカップリングキット（Biacore）を用いてCM5チップ表面に抱合させた。Fabフラグメントを連続希釈でチップ表面上に注入し、固定化タンパク質を有するチップ上でテストされる時に25を超えるRU最大値を生じることのない最適化濃度で開始した。結合速度定数（k<sub>a</sub>）および解離定数（k<sub>d</sub>）を、BIAevaluation 4.1ソフトウェア（Biacore）における所定の1:1（Langmuir）結合および解離モデルを用いて全体的に評価した。

#### 【0164】

Fabフラグメントにおける動力学的解析を行うことにより、実際に得られたデータがRSVタンパク質に対する結合親和性を反映することを確認した。完全な抗体を用いた場合、データは結合親和性を反映し、容易に抗体の結合特性と抗原との正確な形の意味のある測定に置き換えることができないであろう。

#### 【0165】

##### g-6 各抗体の生化学的特性の特徴付け

不均一性（heterogeneity）は、抗体および組み換えタンパク質における共通の現象である。抗体の修飾は、典型的には、例えば、N-糖鎖付加、タンパク質分解フラグメント化、およびN-とC-末端不均一性のごとき翻訳後修飾が発現中に起き、大きさまたは帯電の不均一性を生じる。加えて、メチオニン酸化および脱アミド化のごとき修飾は、後の短期または長期保存中に生じうる。これらのパラメーターは、治療抗体でよ

10

20

30

40

50

く定められていることが必要となるため、それらは、ポリクローナル細胞株の作成前に解析された。

#### 【0166】

精製された各抗体の特徴付け（セクション i を参照）に用いられる方法は、SDS-PAGE（還元と非還元状態）、弱陽イオン交換クロマトグラフィー（IEX）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、および RP-HPLC（還元と非還元状態）を含んだ。還元と非還元状態下における SDS-PAGE 解析および SEC は、精製された抗体が微量のフラグメント化および凝集化された形態を伴い、実質的に無傷であることを示した。精製された抗体の IEX プロファイル解析は、単一のピークを示すプロファイルまたは複数のピークを示すクロマトグラフを結果として生じ、これらはこれらの特定の抗体における帯電の不均一性を示す。IEX 解析における複数のピークおよび / または SDS ゲルにおける軽もしくは重鎖の異常な移動、あるいは異常な RP-HPLC プロファイルを生じる抗体調製物を、N-末端の配列決定により無傷な N-末端について、およびオリゴ糖プロファイルの相違により引き起こされる不均一性について詳細に解析した。さらに、選択された抗体を、酵素処理およびその後の SDS-PAGE 解析を用いて、可変鎖における N-糖鎖付加部位の存在について解析した。

10

#### 【0167】

g-7 抗-RSV 組み換えポリクローナル抗体産生のためのポリクローナル細胞株の樹立

樹立された発現細胞株のコレクションから、サブセットを選択して混合し、ポリクローナル細胞株およびポリクローナルリサーチ / マスター細胞バンク（pRCB / pMCB）を作成する。選択パラメーターを、ポリクローナル細胞株から産生されるポリクローナル抗体の使用、ならびに各細胞株の能力に従って定めることができる。一般的に以下のパラメーターを考慮する：

20

- ・細胞株の性質；ポリクローナル細胞株の安定性を最適化すること、21～30時間の倍加時間を有する各細胞株および 1 pg / 細胞 / 日を超える抗体産生が好ましい。

- ・反応性；抗-RSV r p A b が反応性を示す抗原 / 抗原部位およびエピトープを慎重に考慮する。

- ・タンパク質化学；明確な生化学的性質を示す好ましい抗体が最終的な抗-RSV r p A b に含まれる。

30

#### 【0168】

組み換え抗-RSV 抗体を発現する選択された各細胞株を、振盪フラスコにおける無血清培地中において 37 で融解し、増殖させて 21 - 34 時間の倍加時間の集団を示す各クローンの少なくとも  $4 \times 10^8$  個の細胞とした。生存率は、好ましくは 93% から 96% までの範囲である。ポリクローナル細胞株を、各細胞株から  $2 \times 10^6$  個の細胞を混合することにより調製する。ポリクローナル細胞株を、 $5.6 \times 10^7$  個の細胞を含有する凍結アンプルに分け、凍結保存する。ポリクローナル細胞株を有するこのバイアルのコレクションをポリクローナルリサーチ / マスター細胞バンク（pRCB / pMCB）と名付け、ポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）は、pRCB / pMCB から 1 つのアンプルを増殖させることにより、pRCB / pMCB のアンプルと同じ細胞密度を有する約 200 個のアンプルのポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）を作出するために十分量の細胞とすることにより作成することができる。前記細胞バンクに由来する細胞をマイコプラズマおよび無菌性についてテストする。

40

#### 【0169】

h. 組み換えポリクローナル抗-RSV 抗体の発現

組み換えポリクローナル抗-RSV 抗体のバッチを 5 リットルのバイオリアクター（ドイツ、メルズンゲンの B. Braun Biotech International）で産生する。簡単に説明すると、pRCB または pWCB に由来するバイアルを融解し、振盪フラスコ（Corning）中で増殖させる。播種した列の細胞を、G418 および抗凝集剤を含む Ex Cell 302 培地中で 37、5% CO<sub>2</sub> で培養する。このバイオリアクターに、G418 および

50

抗凝集剤を含まない 3 l の E x C e l l 3 0 2 培地中に懸濁させて  $0.6 \times 10^6$  細胞 / m l で播種する。細胞数 / 生存細胞を C A S Y または V i C e l l 計数により毎日モニターする。50 時間で 2000 m l の E x C e l l 3 0 2 培地を補充し、92 時間後に 37 から 32 に温度を下げる。細胞培養上澄み液を 164 時間後に回収し、セクション i に記載されるごとく精製にかける。

#### 【0170】

i . 各抗 - R S V 抗体およびポリクローナル抗 - R S V 抗体の精製

セクション g . g - 2 および h に記載されるように発現される抗体、全ての I g G 1 アイソタイプを、M a b S e l e c t S u R e カラム ( プロテイン - A ) を用いてアフィニティー精製した。各抗体が固定化されたプロテイン - A に p H 7 . 4 で相互作用し、一方で夾雑するタンパク質をカラムから洗浄した。次いで、結合した抗体を、p H を 2 . 7 まで下げることにによりカラムから溶出した。280 n m の吸光度測定から調べられた抗体を含む画分をプールし、G - 25 カラムを用いて 5 m M 酢酸ナトリウム、150 m M N a C l 、p H 5 で緩衝液交換し、- 20 で保存した。

10

#### 【0171】

j . インビトロ中和アッセイ

j - 1 インビトロ使用のための活性な R S V の調製

ヒト咽頭上皮 H E p - 2 細胞 ( A T C C C L L - 23 ) を  $1 \times 10^7$  細胞 / フラスコで  $175 \text{ cm}^2$  フラスコに播種した。細胞を、R S V L o n g ( A T C C 番号 V R - 26 )、R S V B 1 ( A T C C 番号 V R - 1400 ) または R S V B W a s h / 18537 ( Advanced Biotechnologies Inc. ) のうちのいずれかで  $0.1 \text{ p f u}$  / 細胞の割合において 3 m l 無血清培地中に感染させた。細胞を、37 ; 5 % C O <sub>2</sub> で 2 時間感染させ、続いて 37 m l の完全 M E M 培地を添加した。細胞変性効果が観察されるまで細胞をインキュベートした。細胞を掻き取ることににより剥がし、培地と細胞を 20 秒間超音波処理し、一定分量にし、液体窒素で凍結させ、- 80 で保存した。

20

#### 【0172】

j - 2 プラーク減少中和試験 ( P R N T )

H E p - 2 細胞を  $2 \times 10^4$  細胞 / ウェルで 96 - ウェル培養プレート中に播種し、37 ; 5 % C O <sub>2</sub> で一晩インキュベートした。試験物質を無血清 M E M 中に希釈させ、補体 ( ウサギに由来する補体血清、S i g m a ) の非存在または存在下において 37 で 30 分間前インキュベートした。この混合物を H E p - 2 細胞の単層にアブライし、37 ; 5 % C O <sub>2</sub> で 24 時間インキュベートした。細胞を 80 % アセトン ; 20 % P B S で 20 分間固定した。洗浄後、ビオチン化されたヤギ抗 - R S V 抗体 ( A b D S e r o t e c ) を、1 % B S A を含有する P B S 中に添加し ( 1 : 200 )、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、H R P - アビジンを添加し、30 分間インキュベートした。プラークを 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール ( A E C ) 基質との 25 分間 ( R S V L o n g ) および 45 分間 ( R S V B 1 ) のインキュベートにより発達させた。プラークを B i o r e a d e r ( B i o - S y s G m b H ) でカウントした。力価の比較ができるように適用可能な場合には、E C <sub>50</sub> 値 ( プラーク数の 50 % の減少を引き起こすのに必要とされる有効濃度 ) を算出した。

30

40

#### 【0173】

j - 3 融合阻害アッセイ

融合阻害アッセイを、基本的に、R S V をテスト物質の添加前に感染させることを除いてプラーク減少中和アッセイと同様に行った。実際には、ウイルスを無血清培地中で H E p - 2 細胞の単層に 1 . 5 時間添加した。

#### 【0174】

上澄み液を除去し、試験物質を補体 ( ウサギ由来の補体血清、S i g m a ) の存在するまたは存在しない完全 M E M 培地に添加した。プレートを一晩インキュベートし、プラーク減少中和アッセイに関して上に記載されるように処理した。

#### 【0175】

50

## j - 4 マイクロ中和アッセイ

セクション j - 2 および j - 3 に記載される P R N T および融合阻害アッセイに加えて、R S V タンパク質の検出に基づくマイクロ中和アッセイを R S V 中和および融合阻害の測定に用いた。

## 【 0 1 7 6 】

中和テストでは、試験物質を無血清 M E M で希釈し、R S V で 9 6 ウェル培養プレート中において室温で 3 0 分間インキュベートした。トリプシン処理した H E p - 2 細胞を  $1.5 \times 10^4$  細胞 / ウェルで添加し、3 7 °C ; 5 % C O <sub>2</sub> で 2 - 3 日間インキュベートした。細胞を洗浄し、8 0 % アセトン ; 2 0 % P B S において 4 °C で 1 5 分間固定し、乾燥させた。

10

## 【 0 1 7 7 】

次いで、プレートを 0 . 5 % ゼラチン含有の P B S 中において室温で 3 0 分間ブロックし、0 . 5 % ゼラチンおよび 0 . 5 % T w e e n - 2 0 含有の P B S 中で 1 : 2 0 0 に希釈した R S V タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 ( N C L - R S V 3 、 N o v o c a s t r a ) のプールにおいて室温で 2 時間染色した。洗浄後、0 . 5 % ゼラチンおよび 0 . 5 % T w e e n - 2 0 含有の P B S で 1 : 1 0 0 0 に希釈したポリクローナルウサギ抗 - マウス免疫グロブリン H R P - 抱合体 ( P 0 2 6 0 ; D a k o C y t o m a t i o n ) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、オルト - フェニレンジアミンの添加により発色させた。H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> の添加により反応を止め、プレートを E L I S A プレートリーダーで 4 9 0 n m を読み取った。

20

## 【 0 1 7 8 】

融合阻害アッセイを、ウイルスが細胞に添加され、完全 M E M で希釈された試験物質が添加される前に 3 7 °C ; 5 % C O <sub>2</sub> で 1 . 5 時間インキュベートすることを除いて、基本的にマイクロ中和試験と同様に行った。プレートを 3 7 °C ; 5 % C O <sub>2</sub> で 2 - 3 日間インキュベートし、上に記載のとおりにより発色させた。

## 【 0 1 7 9 】

## k . インビボ保護アッセイ

## k - 1 マウス誘発モデル

7 - 8 週齢の雌 B A L B / c マウスに、0 . 2 m l 抗体調製物を研究 - 1 日目に腹腔内に接種した。プラセボ処理マウスを同様に 0 . 1 m l P B S 緩衝液で腹腔内に接種した。研究 0 日目に、マウスに吸入イソフルオランを用いて麻酔をかけ、5 0 μ l 中の  $10^{-6}$  ~  $10^{-7}$  p f u の R S V 株 A 2 または細胞溶解物 ( 偽の接種菌液 ) で鼻腔内に接種した。麻酔から完全に回復させて真っ直ぐに立たせると同時に、マウスに 3 0 秒接種菌液を吸引させた。

30

## 【 0 1 8 0 】

誘発 5 日後、マウスを過剰量のペントバルビタールナトリウムで屠殺した。屠殺後、血清を調製するために腋窩脈管からの放血により血液を得た。肺を取り除き、滅菌した砂を用いて 2 . 5 m l 緩衝液中でホモジェナイズした。肺のホモジェナイズ物を遠心分離して砂と細胞破片を沈降させ、上澄み液を一定分量採取し、- 7 0 °C で保存した。

## 【 0 1 8 1 】

40

ウイルス負荷を、逆転写酵素 ( R T - ) P C R を用いる肺サンプル中の R S V R N A コピー数の定量化により調べた。製造業者の説明書に従って、抽出システムを自動化した M a g N A P u r e L C T o t a l N u c l e i c A c i d キット ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) を用いて、肺のホモジェナイズサンプルから R N A を抽出した。W h i l e y ら ( J . C l i n i c a l M i c r o b i o l . 2 0 0 2 , 4 0 : 4 4 1 8 - 2 2 ) により開示される g g o t k R S V サブタイプ A の N 遺伝子に特異的なプライマーおよびフルオロフォア標識プローブによる L i g h t C y c l e 機器および試薬 ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) を用いて、s i n g l e - t u b e リアル - タイム R T - P C R により、R S V R N A の検出を行った。公知の R S V R N A コピー数を有するサンプルを同様に解析することにより標準曲線を作成した。

50

## 【0182】

肺組織サンプルにおける異なるサイトカインおよびケモカインのレベルを、齧歯類の multi-analyte profile (MAP) を用いる Rules-Based Medicine (テキサス州、オースティン) で市販される複数の免疫アッセイにより調べた。

## 【0183】

## k - 2 コットンラット誘発モデル

6 - 8 週齢の雌コットンラット (*Sigmodon hispidus*) に、0.5 ml の抗体調製物またはプラセボ (PBS) を研究 - 1 日目に腹腔内に接種する。24 時間後、イソフルオランで早急に麻酔にかけ、 $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  pfu の RSV 株 A2 またはコントロール培地 (偽の接種菌液) の鼻腔内誘発を与える。総体積 100  $\mu$ l の接種菌液を投与し、両方の鼻腔に均等に分布させる。鼻腔内誘発の完了後、各ラットを最低 30 秒間真っ直ぐに立たせてから接種菌液を完全に吸気させる。誘発 5 日後、ペントバルビタールの致死性腹腔内注射により屠殺し、心臓穿刺により放血させる。血清サンプルを採取し、-80 で凍結し、各ラットを肺および鼻腔組織を除去するために無菌条件下で解剖する。組織サンプルをホモジェナイズし、上澄み液を -80 において一定分量で保存した。

## 【0184】

組織サンプルにおけるウイルス負荷を、Vam Elden らの方法 (J Clin Microbiol 2003, 41(9):4378-4381) に基づく Taq - Man リアル - タイムアッセイにより RSV RNA コピー数を定量化することで調べる。簡単に説明すると、製造業者の説明書に従って RNeasy (Qiagen) 法を用いて、肺のホモジェナイズしたサンプルから RNA を抽出する。抽出された RNA を cDNA に逆転写させ、次いで、RSV サブタイプ A の N 遺伝子に特異的なプライマーおよび標識プローブとともに Superscript III Platinum One Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen) を用いて PCR により増幅する。公知の RSV 濃度を有するサンプルを同様に解析して標準曲線を作成する。

## 【実施例 2】

## 【0185】

本実施例では、抗 - RSV 特異性を有する全長抗体として発現される同種  $V_H$  および  $V_L$  ペアーを含むクローンの単離、スクリーニング、選択および保存を例示した。

## 【0186】

## ドナー

合計 89 人のドナーを、RSV の季節に従業者およびビッドゥビエ病院 (デンマーク) の小児科に入院した子供の両親の中から採用した。18 ml の最初の血液サンプルを採血し、CD19<sup>+</sup> B 細胞を精製し (実施例 1、セクション a)、ELISpot を用いて抗 - RSV 抗体の存在について検査し (実施例 1、セクション b)、血漿細胞の発生頻度を FACS 解析により調べた。

## 【0187】

最初の血液サンプルのスクリーニング時に 11 人のドナーが陽性で見出され、これらのうちの 10 人から 450 ml の 2 回目の血液サンプルを採血した。形質芽細胞を実施例 1 のセクション a に従って単一細胞に分別した。ELISpot を CD19 陽性 B 細胞の画分について行った。

## 【0188】

2 回目の供血では、合計血漿細胞集団のうちの 0.2 および 0.6 % 間の RSV 特異的な血漿細胞 (IgG<sup>+</sup> および IgA<sup>+</sup>) の ELISpot 頻度を有する 4 人のドナーを同定した。これらの頻度を、同種  $V_H$  および  $V_L$  ペアーのレパートリーの連結を促進するのに十分高いと考えた。

## 【0189】

同種  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーの単離

抗体のレパートリーをコードする核酸を、5人のドナーに由来する単一細胞に分別された血漿細胞から多重重複伸長RT-PCR（実施例1、セクションc）により単離した。多重重複伸長RT-PCRは、重鎖可変領域遺伝子フラグメント（ $V_H$ ）および全長軽鎖（ $L_C$ ）の間に物理的連結を作出する。 $V_H$ 増幅用に1つおよび $L_C$ 増幅用に1つである2つのプライマーセットを用いることにより、全ての $V_H$ -遺伝子ファミリーとカッパ軽鎖の抗体遺伝子を増幅するためにプロトコルを設計した。逆転写および多重重複伸長PCRに続いて、連結された配列をネステッドプライマーのセットによる2番目のPCR増幅にかけた。

#### 【0190】

各々のドナーについて個別に処理し、多重重複RT-PCRにより1480から2450個の重複産物を作成した。各ドナーからの同種の連結した $V_H$ および $V_L$ をコードするペアの作成したコレクションをプールし、実施例1のセクションd）に記載されるごとく哺乳動物IgG発現ベクター（図3）に組み込んだ。作成したレパートリーをE. coliに形質転換させ、20個の384-ウェルプレート中で一元管理し、保存した。レパートリーは、ドナーあたり $1 \times 10^6$ および $3.6 \times 10^6$ 個の間のクローンで構成した。

10

#### 【0191】

##### スクリーニング

IgG抗体を含む上澄み液を、マスタープレートに由来する細菌クローンから調製したDNAで一過的にトランスフェクトしたCHO細胞から得た。上澄み液を実施例1、セクションe）に記載されるごとく選択した。約600個の一次ヒット物を配列決定し、並列比較した。大部分は2つまたはそれ以上のメンバーのクラスターに収まったが、いわゆるシングルトンとして単離されたわずかなクローンも存在した。各クラスターおよびシングルトンに由来する代表的なクローンを、実施例1、セクションe）に記載されるごとく検証研究にかけた。多くの一次ヒット物を、不對システイン、潜在的なPCRエラーである保存されていない変異、多重コドンの挿入および/または欠失、ならびに切断のとき望まれている配列の特徴のため、さらなる特徴付けから排斥した。

20

#### 【0192】

合計85個のユニークなクローンが検証を通過した。これらを表5にまとめる。各クローン番号は、特定の $V_H$ および $V_L$ ペアを特定する。IGHVおよびIGKV遺伝子ファミリーは、各クローンについて示され、選択されたクローンのフレームワーク領域（FR）を特定する。各クローンから発現される抗体の相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列が示され、CDRH1、CDRH2、CDRH3は、重鎖のCDR領域1、2および3を示し、CDRL1、CDRL2およびCDRL3は、軽鎖のCDR領域1、2および3を示す。

30

#### 【0193】

完全な可変重鎖および軽鎖配列は、表5の情報から定めることができる。

#### 【0194】

表5の各欄についてのさらなる詳細を以下に記載する。

#### 【0195】

IGHVおよびIGKV遺伝子ファミリー名を公式のHUGO/IMGT命名法（IMGT; Lefranc & Lefranc, 2001, The Immunoglobulin FactsBook, Academic Press）に従って割り当てた。番号付けと並列比較は、Chothia（Al-Lazikani et al. 1997 J. Mol. Biol. 273:927-48）による。クローン809はCDRH1の5'に対して2個のコドンの挿入を有し、伸長されたCDRループに翻訳されうる。クローン831はCDRH1の位置31に1個のコドンの欠失を有する。

40

#### 【0196】

欄「Ag」は、ELISA、FLISAおよび/またはBiacoreにより調べられるごとく、命名されたクローンから産生される抗体により認識されるRSV関連抗原を示す。「+」は、クローンがRSV粒子および/またはRSV感染細胞に結合するが、抗原

50

が同定されていないことを示す。

【 0 1 9 7 】

欄「エピトープ」は、命名されたクローンから産生される抗体により認識される抗原部位またはエピトープを示す（表 4 および下記を参照）。「U」は、エピトープが知られていないことを示す。UCI および UCI I は、未知のクラスター I および I I を意味する。これらのクラスターに属する抗体は、類似の反応プロファイルを示すが、いまだ特定のエピトープに割り当てられていない。いくつかの抗体は、A & C のごとく複合的なエピトープを認識する。（ ）に示されるエピトープは E L I S A のみで同定されている。

【 0 1 9 8 】

【表 5】

クローン	IGHV 遺伝子	CDRH1	CDRH2	CDRH3	IGKV 遺伝子	CDRL1	CDRL2	CDRL3	Ag	エピソード
735	4-59	D--YDWS	NIN--IRGNINPNSLKS	CARDVGGGGQYFAM--	3-11	RASQSVNS--HLA	NTNRVT	COQSNWPPALTE	F	UCI
736	3-30	T--YGMH	FIRY--DGSQDVIADSVK	CAKMDYXGSRYSVYIYGM--DWW	1-39	RASQRIIN--HLN	GASTLOS	COQSYRTPE--INF	F	A/II
743	1-69	T--YALT	RUTP--BEDITNVAQKFG	CARGAVAIIPAAEDPYYIGM--DWW	2-28	RSSQILLHS--NGNVLID	LASNRRAS	CMQSLQI--PTE	G	Centr. dom
744	1-2	G--YMH	WINT--SSGNTNVAQKFG	CARDGFMGTNSWYGMF--DWW	3-20	RASQSVSS--YLA	GASSRAT	COQYDSSLSLWTF	F	A/II
743	3-11	D--YMS	VINR--GGTIIYIADSVK	CARGLILALPTATVELGAE--DIW	1-39	RASQITIG--YLA	ATSTLOS	COQSYNT--LTF	G	保存
794	1-18	N--YGLN	WINA--YNDNTIYSPSQG	CARSYRSGTDLITRGVPGDVFDMW	1-12	RASEGLSS--WLA	AASTLOS	COQINSEF--YTF	G	GCRRA
795	4-30-4	SGDYWS	YIF--HSGTIIYNPNSLKS	CARDVDFFPWGNRXL--ALW	3-20	RASQSVSS--YLA	GASTGAT	COQVGRTP--YTF	F	UCI
796	3-30	H--FGMH	LISY--DGNVHVADSVK	CAKDDVATDLAAYYF--DWW	2-29	RASQILLRS--DGKTFY	EVSSRFS	COQGLKTR--RTE	G	保存
797	1-18	R--FGIS	WISA--DNGNTIYIADSVK	CVRGQVTVNRVYIYGM--DWW	1-16	RASQDINN--YLA	AASLOS	COQVDTVP--LTF	G	GCRRA
798	7-4-1	S--YVMN	WINT--NTGDPAYAQDFTG	CAWFGEGELF--DWW	2-9	RASQGLSS--YLA	AASLOS	COQVDTVP--LTF	G	GCRRA
799	3-30	N--YGMH	VISY--DGRNKYEADSVK	CARGSVQVWLHLGLF--DWW	1-5	RASQSVSS--WVA	EASLES	COQXHSYG--YTF	F	U
801	3-33	S--YAMH	VIMH--DGSNKYIADSVK	CARTKWLGM--DWW	1D-13	RASQGLTD--SLA	IGSNRAS	COQXKSP--ATE	F	F1
802	3-48	S--YEHM	YIGT--GSDIYIADSVK	CARAPGKVK--DWW	2-28	RSSQILLNS--NGENVVD	VASLES	CMQALETP--LTF	F	F1
803	4-30-4	SGDYWS	VLY--SSGSTFYNASLKS	CARGGTLYTTGGEM--HIV	1-9	RASQGLSS--YLA	GASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
804	3-64	N--YAMH	ATST--DGGSTIYIADSVK	CARFHWGNGFF--DWW	3-20	RASQSVSS--YLA	GASGRAT	COQVGGSG--YTF	F	F1
805	4-59	G--DWS	VLY--YEGSTIYNPNSLKS	CARGHSGGDIYIYF--DWW	1-39	RASQGLNT--YLA	AASLOS	COQVGGSG--LTF	F	(F1)
806	5-51	S--YWG	IYYP--GSDTYIYSPSQG	CVRGGCTATGCVAGHWF--DWW	3-20	RASQSVSS--YLA	GASGRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
808	2-70	TTRMSVS	RID--WDDKYIYSTSLKT	CARVHTSGGYNPNM--DWW	1-39	RASQITAS--YLS	TASSLOS	COQVGGSG--LTF	F	(F1)
809	5-51	FVSTWIG	IINP--ADSTIYIYSPSQG	CARVHTSGGYNPNM--DWW	3D-15	RASQVGS--KLA	GASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	(F1)
811	1-46	N--YIYH	VINP--NGSTIYIYSPSQG	CARVHTSGGYNPNM--DWW	1D-17	RASQVGS--KLA	GASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	(F1)
812	1-69	S--YIS	MILP--ISGNTIYIYSPSQG	CLRGSTGMDTDF--DWW	4-1	RASQVGS--KLA	WASTRES	COQVGGSG--LTF	F	U
813	5-51	S--YWG	IYYP--GSDTYIYSPSQG	CVRGQYDNGYHEKYAF--DWW	1-5	RASQSVSS--YLA	KSSILES	COQVGGSG--LTF	F	(F1)
814	3-30-3	T--YAMH	VISY--DGRNKYEADSVK	CARVHTSGGYNPNM--DWW	1-5	RASQSVSS--YLA	DASSLES	COQVGGSG--LTF	F	U
816	3-23	T--YAMT	VIRA--SGSELYIADSVK	CANTGQRRYCSGDHCYGF--DWW	2-28	RSSQILLHS--DGRYVD	LASNRRAS	CMQGLHTE--WTF	G	保存
817	3-30	T--HGMH	IISL--DGIRTHYIADSVK	CARTQVHGTWAFYFVTF--DWW	3-15	WASQITIG--YLA	GASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
818	2-70	AGRVGS	RID--WDDKAERTSLKT	CARTQVHGTWAFYFVTF--DWW	3-11	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	B/I/F1
819	4-30-4	GADYWS	ETI--DGSSTIYNPNSLKS	CARDVGGSGIYIYIY--DWW	1D-33	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	A/II
822	5-51	N--SWIG	IYYP--GSDTYIYSPSQG	CARQGRG--DWW	1D-33	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
823	4-6	SG--HFWG	SIF--HSGTIIYNPNSLKS	CARVHGGG--DWW	1D-33	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
824	4-59	N--YWG	HY--FGNTIYNPNSLKS	CARVHGGG--DWW	1D-33	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U
825	1-18	S--NGLS	WISA--SSGKKIYAPKFG	CAKGGTYVYIYDAF--DWW	4-1	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	F1/C
827	1-24	A--LSKH	FEDP--EDGDTIYAPKFG	CATVAAGNF--DWW	1-39	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	UCI
828	1-3	T--NGLH	LINA--GNGDTIYAPKFG	CARTIATVNRPF--DWW	1-39	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	A&C/IV
829	2-70	RNRMSVS	RID--WDDKAERTSLKT	CARTIATVNRPF--DWW	1-39	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	A&C
830	1-18	T--YGV	WISA--YNGNTIYIYSPSQG	CARTIATVNRPF--DWW	1-39	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	U (F1)
831	1-3	Y--YAMH	WINV--GNGQIYIYSPSQG	CARTIATVNRPF--DWW	1-39	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	GCRRA
833	3-30	Y--IGMH	WISA--DGSNKYIADSVK	CAKDDFGNSGVFMSRV--AFW	1-5	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	Centr. dom
834	1-18	T--YGLN	WISA--HNGNTIYIYSPSQG	CVRGNEQIYIYDAF--DWW	1-12	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	GCRRA
835	1-18	S--YGS	WSSV--YNGDTIYIYSPSQG	CARDNVLLIYIYDAF--DWW	1-9	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	GCRRA
836	4-6	SG--HYMG	SIY--DGSNTIYIYSPSQG	CARVHGGG--DWW	1-12	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	F	(A/II)
838	3-30	T--FGMH	VISY--DGNKKYIADSVK	CAQTPYIYESSGLV--DWW	1-27	RASQSVSS--YLA	DASTRAT	COQVGGSG--LTF	G	保存

10

20

30

40

表5：ユニークで有効なクローン各々の配列および特異性のまとめ

【0199】



40

50

【 0 2 0 1 】

C D R H 2 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：286 - 370 と同じ順番で記載される。

【0202】

C D R H 3 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：371 - 455 と同じ順番で記載される。

【0203】

C D R L 1 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：456 - 540 と同じ順番で記載される。

【0204】

C D R L 2 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：541 - 625 と同じ順番で記載される。

【0205】

C D R L 3 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：626 - 710 と同じ順番で記載される。

【0206】

抗原特異性の特徴付け

検証期間に、クローンの抗原特異性を、ウイルス粒子、可溶性 G および F タンパク質ならびに G タンパク質のフラグメントに対する結合性によりある程度まで調べた。

【0207】

抗 - F 反応性を有するクローンにおいては、さらに、抗原部位、可能ならば各クローンにより結合されるエピトープを調べるために、クローンから発現される各抗体の特異性を測定した（実施例 1、セクション g - 4 を参照）。図 4 は、B i a c o r e 解析を用いて、クローン 801 から得られた抗体のエピトープ特異性の特徴付けを示す。解析は、タンパク質 F が、抗体 801 の B i a c o r e 細胞への注入前に 133 - 1 h またはバリビズマブ（抗原部位 C および I I 各々）により阻害される場合、高い抗体 801 結合性が検出できることを示す。競合した 801 抗体の結合性は、競合しない 801 抗体の結合性と比較してわずかに減少する。しかしながら、この減少は非常に低いため、結合部位の直接競合より立体構造の障害による可能性が高い。抗体 801 の B i a c o r e 細胞への注入前の 9c5 抗体（抗原部位 F 1）を有するタンパク質 F の阻害は、F タンパク質への抗体 801 結合性のほぼ完全な阻害を示す。それゆえ、抗体 801 は F 1 部位、またはそれに非常に近い部位でタンパク質 F に結合することとなる。

【0208】

抗 - G 反応性を有するクローンにおいては、さらに、各抗体が G タンパク質の中心ドメイン、保存領域、または G C R R に結合するかどうか、また、エピトープが保存またはサブタイプ特異的であるかを調べるために、クローンから発現される各抗体の特異性を測定した。このことは、以下の G タンパク質フラグメントを用いる E L I S A および / または F L I S A により行った：

G ( B ) : ( D G 4 4 C H O 細胞で発現される ) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 6 6 - 2 9 2

G ( B ) フラグメント : ( E . c o l i で発現される ) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 1 2 7 - 2 0 3

G C R R A : ( 選択的に形成されたシステイン架橋を伴って合成される ) R S V 株 L o n g に由来する残基 1 7 1 - 1 8 7

G C R R B : ( 選択的に形成されたシステイン架橋を伴って合成される ) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 1 7 1 - 1 8 7

G 保存 : 残基 1 6 4 - 1 7 6

【0209】

さらなるエピトープ解析を、実施例 1、セクション g - 4 に記載されるごとく競合アッセイにより抗 - G 反応性クローンにおいても行った。

【0210】

10

20

30

40

50

さらに、実施例 1、セクション e に記載されるごときスクリーニング手法で同定されたクローンのうちの 1 つは、S H 特異的な抗体を産生する。加えて、多くのクローンは、1 つまたはそれ以上の試験された R S V 株に結合するが、抗原は調べられなかった。

#### 【0211】

全ての検証されたクローンにおける抗原特異性に関するデータを表 5 にまとめる。検証されたクローンはいずれもヒト咽頭上皮細胞に結合せず、試験された G - 特異的クローン (793、816、835、841、853、855、856、および 888) のいずれもまたヒトフラクタルカイン (CX3CL1) に結合しなかった。

#### 【0212】

結合反応速度の特徴付け

10

組み換え R S V 抗原に関する結合親和性を、番号付けした抗体クローンにおける表面プラズモン共鳴により調べた。全長抗体の酵素切断により調製された Fab フラグメントで解析を行った。ピコモルからナノモル範囲における  $K_D$  値を有する多くの高親和性抗体クローンについてのデータを表 6 に表す。市販されているバリビズマブ (Synagis) から得た Fab フラグメントを対照として同様に解析した。

#### 【0213】

表 6：選択されたクローンの動力学的結合定数および親和性

#### 【表 7】

Fab クローン (抗原)	$k_{on}$ ( $10^5 M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-5} 1/s$ )	$t_{1/2}$ (min)	$K_D$ (pM)
735 (F)	4.07	9.18	130	226
810 (F)	17.40	34.80	33	200
818 (F)	1.92	2.20	530	115
817 (F)	0.92	7.54	150	820
819 (F)	3.56	4.99	230	140
825 (F)	7.72	15.00	77	195
858 (F)	4.97	0.34	3400	7
831 (F)	3.72	42	28	1130
796 (G)	8.33	40.3	28.67	480
811 (G)	4.98	17.1	68	340
816 (G)	20.20	17.80	65	90
838 (G)	2.64	5.06	230	190
853 (G)	17.7	140	8.25	790
859 (G)	3.8	4.63	250	120
Synagis (F)	2.00	75.70	15	3780

20

30

#### 【0214】

表 5 におけるクローン番号 735、736、744、793、795、796、799、800、801、804、810、811、812、814、816、817、818、819、824、825、827、828、829、830、831、835、838、841、853、855、856、857、858、859、861、863、868、870、871、880、881、884、885、886、888、894 および 955 に対応する 47 個のユニークな同種  $V_H$  および  $V_L$  をコードするペアーのサブセットを、単一の  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子配列からユニークな抗体をそれぞれ発現する安定な個々の発現細胞株の作成のために選択した。44 個の選択されたクローン (上記に同定された 828、885、および 955 を除く) の全配列 (DNA および推定アミノ酸) を配列番号：1 - 176 に示す。

40

#### 【0215】

44 個のクローンを、配列番号：1 - 44 に記載される以下の  $V_H$  配列を産生すること

50

により特徴付けする：

【 0 2 1 6 】

クローン番号 7 3 5：

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSNGAIGDYDWSWIRQSPGKGLEWIGNINRGNTNYPNPSLKSRVTMSLRSTMTMQFSL  
KLSSATAADTAVYYCARDVGYGGGQYFAMDVWSPGTTVTVSS

【 0 2 1 7 】

クローン番号 7 3 6：

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTYGMHWRQAPGKGLEWVAFIRYDGSTQDYVDSVKGRFTISRDNSKMNMY  
VQMNSLRVEDTAVYYCAKMDYYGSRYSVTYYYGMDVWQGQTTVTVSS

【 0 2 1 8 】

クローン番号 7 4 4：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYYMHWRQAPGQGLEWMMGWINTSSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAH  
MELRRLRSDDTAVYYCAREDTMGNTNSWYGFDPWQGQTLVTVSS

【 0 2 1 9 】

クローン番号 7 9 3：

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFGDYMSWIRQAPGKGLEWVAYINRGTTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF  
LQMNSLRAGDTALYYCARGLILALPTATVELGAFDIWQGQTMVTVSS

【 0 2 2 0 】

クローン番号 7 9 5：

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGASISSGDYWSWIRQSPRKGLEWIGYIFHSGTYYNPSLKSRVAVISLDTSKNQF  
SLRLTSVTAADTAVYYCARDVDDFPVWGMNRYLALWGRGTLVTVSS

【 0 2 2 1 】

クローン番号 7 9 6：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFHFHGMHWRQVPGKGLEWVAISYDGNNVHYADSVKGRFTISRDNSKNTLF  
LQMNSLRDDDTGVYYCAKDDVATDLAAYYYFDVWGRGTLVTVSS

【 0 2 2 2 】

クローン番号 7 9 9：

QVQLVESGGGVVQPGRSLKLSCEASGFNFNNYGMHWRQAPGKGLEWVAVISYDGRNKYFADSVKGRFISRDNSRNTVF  
LQMNSLRVEDTAVYYCARGSVQVWLHLGLFDNWQGQTLVTVSS

【 0 2 2 3 】

クローン番号 8 0 0：

QVQLVESGGAVVQPGRSLRLSCEVSGFSFSDYGMNWRQGPQKGLEWVAVIWHDGSNKNYLDVSKGRFTVSRDNSKNTLF  
LQMNSLRAEDTAVYYCARTPYEFWSGYYFDVWQGQTLVTVSS

【 0 2 2 4 】

クローン番号 8 0 1：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFNSYAMHWRQAPGKGLEWVAVIYEGSNEYADSVKGRFTISRDNSKNTLY  
LQMDSLRAEDTAVYYCARKWLGMDFWQGQTLVTVSS

【 0 2 2 5 】

クローン番号 8 0 4：

EVQLVESGGGLVLRPGGSLRLSCSASGFTFSNYAMHWRQAPGKRLEYVSATSTDGGSTYYADSLKGTFTISRDNSKNTLY  
LQMSSLSTEDTAIYYCARRFWGFGNFFDYWGRGTLVTVSS

【 0 2 2 6 】

クローン番号 8 1 0：

QVQLVQSGAEVKKSGSSVKVSCRASGGTFGNIAINWVRQAPGQGLEWVGRIPVFDTTNYAQKFQGRVTITADRSTNTA  
I MQLSSLRPQDTAMYYCLRGSTRGWDTDGFDIWQGQTMVTVSS

【 0 2 2 7 】

クローン番号 8 1 1：

QVQLVQSGAVVETPGASVKVSCKASGYIFGNYYIHWVRQAPGQGLEWMAVINPNGGSTTSAQKFQDRITVTRDTSTTTVY  
LEVNDNRSEDATATYYCARQRSVTGGFDAWLLIPDASNTWQGQTMVTVSS

【 0 2 2 8 】

10

20

30

40

50

クローン番号 8 1 2 :

QVQLVQSGAEMKKPGSSVKVSCASGGSFSSYSISWVRQAPGRGLEWVGMILPISGTTNYAQTFQGRVILSADTSTSTAY  
MELTSLSLSEDTAVYFCARVFRFSTSTLDPYYFDYWGQGLTVTVSS

【 0 2 2 9 】

クローン番号 8 1 4 :

QVQLVESGGGVVQPGKSVRLSCVSGFRLMDYAMHWRQAPGKGLDWVAVISYDGANEYYAESVKGRFTVSRDNSDNTLY  
LQMKSLRAEDTAVYFCARAGRSSMNEEVIMYFDNWGLGLTVTVSS

【 0 2 3 0 】

クローン番号 8 1 6 :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSTYAMTWVRQAPGKGLEWVSVIRASGDSEIYADSVRGRFTISRDNSKNTVF  
LQMDSLRVEDTAVYFCANIGQRRYCSGDHCYGHFDYWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 1 】

クローン番号 8 1 7 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFGFNTHGMHWRQAPGKGLEWLSILSLDGIKTHYADSVKGRFTISRDNSKNTVF  
LQLSGLRPEDTAVYYCAKDHIGGTNAYFEWTVPFDGWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 2 】

クローン番号 8 1 8 :

QVTLRESGPAVVKPTETLTLTCAFSGFSLNAGRVGVSWIRQPPGQAPEWLARLDWDDDKAFRTSLKTRLSISKDSSKNQV  
VLTLSNMDPADTATYYCARTQVFASGGYYLYLDHWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 3 】

クローン番号 8 1 9 :

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSSGASISGADYYWSWIRQPPGKGLEWVGFIDYSGSTYYNPSLRSRVTISIDTSKKQF  
SLKLTSTVAADTAVYYCARDLGYGNSYSHSYYYGLDVGWGRGTTVTVSS

【 0 2 3 4 】

クローン番号 8 2 4 :

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGNYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYFGGNTNYNPSLQSRVTISVDTSRNQFSL  
KLNSVTAADTAVYYCARDSSNWPAGYEDWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 5 】

クローン番号 8 2 5 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTFTSNGLSWVRQAPGQGFELGWISASSGNKKYAPKFQGRVTLTTDILSTSTAY  
MELRSLRSDDTAVYYCAKDGGTYVPYSDAFDFWGQGTMTVTVSS

【 0 2 3 6 】

クローン番号 8 2 7 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRVSCHTFTALSKHWMRQPGGGGLEWMGFFDPEDGDTGYAQKFQGRVTMTEDTATGTAY  
MELSSLTSDDTAVYYCATVAAAGNFDNWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 7 】

クローン番号 8 2 9 :

QVTLKESGPALVKATQTLTCTFSGFSLSRNRMSVSWIRQPPGKALEWLARLDWDDDKFYNTSLQTRLTISKDTSKNQV  
VLTMTNMDPVDATATYYCARTGIDSSGYYLYYFDYWGQGLTVTVSS

【 0 2 3 8 】

クローン番号 8 3 0 :

QVQLVQSGAEVKVPGASVKVSCASGYTFTTYGVSWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTYYLQKLQGRVTMTTDTSTSTAY  
MELRGLRSDDTAMYYCARDRVGGSSSEVLSSRAKNYGLDWGQGTTVTVSS

【 0 2 3 9 】

クローン番号 8 3 1 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASANIFTYAMHWRQAPGQRLEWMGWINVGNGQTKYSQRFQGRVTITRDTSAATTAYM  
ELSTLRSEDTAVYYCARRASQYGEVYGNFYFDYWGQGLTVTVSS

【 0 2 4 0 】

クローン番号 8 3 5 :

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYTFISYGFSSWVRQAPGQGLEWMGWSSVYNGDTNYAQKFHGRVNMTTDTSTNTAY

10

20

30

40

50

MELRGLRSDDTAVYFCARDRNVLLPAAPFGGMDVWGQGTMTVTVSS

【 0 2 4 1 】

クローン番号 8 3 8 :

QVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSTFGMHWRQAPGKGLEWVAV I SYDGNKKYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY  
LQVNSLRVEDTAVYYCAAQTPYFNESSGLVPDWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 2 】

クローン番号 8 4 1 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF I SFG I SWVRQAPGQGLEWMGW I SAYNGNTDYAQRQLQDRVMTMRDTATSTAY  
LELRLSKSDDTAVYYCTRDESMLRGVTEGFGP I DYWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 3 】

クローン番号 8 5 3 :

EVQLVQSGAEVKKPGQSLK I SCKTSGY I FTNYW I GWVRQRPKGKLEWMGV I FPADSDARYSPSFQGGVTF I SADKS I GTAY  
LQWSSLKASDTA I YYCARPKYYFDSSGQFSEMYFDFWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 4 】

クローン番号 8 5 5 :

QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYVLTNYAFSWVRQAPGQGLEWLGW I SGSNGNTYYAEKFQGRVTMTTDTSTSTAY  
MELRSLRSDDTAVYFCARDLLRSTYFDYWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 5 】

クローン番号 8 5 6 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYGFSWVRQAPGRGLEWMGW I SAYNGNTYYAQNQLQGRVTMTTDTSTTTAY  
MVLRLSLRSDDTAMYYCARDGNTAGVDMWSRDGFD I WGQGTMTVTVSS

【 0 2 4 6 】

クローン番号 8 5 7 :

EVQLLESGGGLVQPGGPLRLSCVASGFSFSSYAMNW I RLAPGKGLEWVSG I SGSGGSTYYGDSVKGRFT I SRDNSKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKEPW I D I VVASV I SPYYYDGMDVWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 7 】

クローン番号 8 5 8 :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGSFDGYT I SWLRQAPGQGLEWMGRVPTLGFPNYAQKFQGRVTVTADRSTNTAY  
LELRLTSED TAVYYCARMNLGSHSGRPGFDMWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 4 8 】

クローン番号 8 5 9 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGSSF SKYGI HWWVRQAPGKGLEWVAV I SYDGSKKYFTDSVKGRFT I ARDNSQNTVF  
LQMNSLRAEDTAVYYCATGGGVNVTWSVSDVEHSSSLGYWGLGTLTVTVSS

【 0 2 4 9 】

クローン番号 8 6 1 :

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAF I WNDGSNKYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCVKDEVYDSSGYLYYFDSWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 5 0 】

クローン番号 8 6 3 :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSS I SASTVLTYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY  
LQMSSLRAEDTAVYYCAKDYDFWSGYPGGQYWFDDLWGRGTLTVTVSS

【 0 2 5 1 】

クローン番号 8 6 8 :

QVQLQESGPGLVTPSETLSVTCTVSNYS I DNAYYWGWI RQPPGKGLEW I GS I HHSGSAYYNSSLKSRAT I S I DTSKNQFS  
LNLRSVTAADTAVYYCARDT I LTFGEPHWFDPWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 5 2 】

クローン番号 8 7 0 :

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDS I SNYYWSWI RQPPGKGLEW I GE I SNTWSTNYPNPSLKSRVT I SLDMPKNQLSL  
KLSSVTAADTAVYYCARGLFYDSGGYYLFYFQHWGQGTTLTVTVSS

【 0 2 5 3 】

10

20

30

40

50

クローン番号 8 7 1 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRVSCAASGFTFSNYGMHWRQAPGKGLEWVAVI WYDDSNKQYGDSVKGRFTI SRDNSKSTLY  
LQMDRLRVEDTAVYYCARASEYSI SWRHRGVLDYWGQGT LVT VSS

【 0 2 5 4 】

クローン番号 8 8 0 :

QITLKESGPTLVRPTQTLTLTCTFSGFSLSTSKLGVGWIRQPPGKALEWLALVDWDDRRYRPSLKSRLTVTKDTSKNQV  
VLTMTNMDPVDATYYCAHSAYYTSSGYLQYFHHWGP GT LVT VSS

【 0 2 5 5 】

クローン番号 8 8 1 :

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEVSGFTFNSYEMTWVRQAPGKGLEWVSHI GNSGSMIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLY  
LQMNSLRVEDTAVYYCARSDYYDSSGYLLYLD SWGHGT LVT VSS

【 0 2 5 6 】

クローン番号 8 8 4 :

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGHTFI NFAMHWRQAPGQGLEWMGYI NAVNGNTQYSQKFQGRVTFTRDTSANTAY  
MELSSLRSED TAVYYCARNNGGSAI I FYYWGQGT LVT VSS

【 0 2 5 7 】

クローン番号 8 8 6 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAVI SNDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKKTMY  
LQMNSLRAEDTAVYFCAKTTDQRLLDWFD PWGQGT LVT VSS

【 0 2 5 8 】

クローン番号 8 8 8 :

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTASGGSI NSSNFYWGWI RQPPGKGLEWIGSI FYSGTTYYNPSLKS RV TI SVDT SKNQF  
SLKLSPVTAADTAVYHCARHGFRYC NNGVCS I NLDAFD I WGQGT MVT VSS

【 0 2 5 9 】

クローン番号 8 9 4 :

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFRFSDYGMHWRQAPSKGLEWVAVI WHDGSNI RYADSVRGRFSI SRDNSKNTLY  
LQMNSMRADD TAFYYCARVPFQI WSGLYFDHWGQGT LVT VSS

【 0 2 6 0 】

これらの V<sub>H</sub> アミノ酸配列は、以下の核酸配列によりコードされるクローンに存在し、  
それらはまた、配列番号：45 - 88として記載される：

【 0 2 6 1 】

クローン番号 7 3 5 :

cagggtgcagctgcaggagt cgggcccaggactgggtgaagccttcggagaccctgtccctcacgtgcactgtgtctaatgg  
cgccatcggcgactacgactggagctggattcgctcagtc cccagggaagggactggagtggattgggaacataaa ttaca  
gagggaacaccaactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatgtccctacgcacgtccacgatgcagttctccctg  
aagctgagctctgcgaccgctgcggacacggcctctattactgtgcgagagatgtaggctacggtggcgggcagtttt  
cgcgatggagctctggagcccagggaccacgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 2 】

クローン番号 7 3 6 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcggtgggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtacagcgtctggatt  
caccttcagttacctatggcatgcactgggtccgccaggctcccggcaaggggctggaatgggtggcat ttatacggtatg  
atggaagtactcaagactatgtagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagaatatggtgtat  
gtgcagatgaacagcctgagagttgaggacacggctgtctattactgtgcgaaagacatggattactatggttcgcggag  
ttattctgtcacctactactacggaatggacgtctggggccaagggaccacgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 3 】

クローン番号 7 4 4 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgagggtctcctgcaaggcttctggata  
caccttcagcggctattatatgcactgggtgcgacaggccccctggacaagggttgagtggaatggatggatcaacacta  
gcagtggtggcacaacattatgcgcagaagtttcagggcagggtcaccatgaccaggggacacgtccatcagcacagcccac  
atggaactgaggaggctgagatctgacgacacggcctgtattattgtgcgagagaggacggcaccatgggtactaatag

10

20

30

40

50

ttggtatggctgggttcgacccctggggccagggaaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 4 】

クローン番号 7 9 3 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcctgggtcaagccctgggggggtccctgagactctcctgtgcggcctctggatt  
ccccttcggtgactactacatgagctggatccgccaggctccagggaagggactggagtgggttgcatataatagag  
gtggcactaccataatactacgcagactctgtgaagggccgattcaccatctccagggaacacgccaagaactccctgttt  
ctgcaaatgaacagcctgagagccggggacacggccctctattactgtgcgagagggctaattctagcactaccgactgc  
tacggttgagttaggagcttttgatatctggggccaagggaacaatgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 5 】

クローン番号 7 9 5 :

cagggtgcagctgcaggagtgcggcccaggactgggtgaagcccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtgc  
ctccatcagcagtggtgattattactggagtggatccgtcagctctccaaggaagggcctggagtggattgggtacatct  
tccacagtgaggaccagctactacaacccgtccctcaagagtcgagctgtcatctcactggacacgtccaagaaccaattc  
tcctgaggctgacgtctgtgactgccgcagacacggccgtctattattgtgccagagatgtcgacgattttcccgtttg  
gggtatgaatcgatatcttgccctctggggccgggggaaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 6 】

クローン番号 7 9 6 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagccctgggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
cagcttcagtcactttggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggagtgggtggcaattatatcatatg  
atgggaataatgtacactatgccgactccgttaaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgttt  
ctgcaaatgaacagcctgagagatgacgacacgggtgtgtattactgtgcgaaggacgacgtggcgacagatttggctgc  
ctactactacttcgatgtctggggccgtggcaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 7 】

クローン番号 7 9 9 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagccctgggagggtccctgaaactctcttgtgaagcctctggatt  
caacttcaataattatggcatgcactgggtccgccaggcaccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatttcatatg  
acggaagaaaataagttattttgctgactccgtgaagggccgattcatcatctccagagacgattccaggaacacagtggtt  
ctgcaaatgaacagcctgcgagtgaagatacggccgtctattactgtgcgagaggcagcgtacaagctctggctacattt  
gggactttttgacaactggggccagggaaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 8 】

クローン番号 8 0 0 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagccctgggagggtccctgagactctcctgtgaagtgtctggatt  
cagtttcagtgactatggcatgaactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggcatg  
acggaagtaataaaaaattatctagactccgtgaagggccgattcaccgtctccagagacaattccaagaacacattgttt  
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaagacacggctgtatattactgtgcgaggacgccttacgagttttggagtggcta  
ttactttgacttctggggccagggaaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 9 】

クローン番号 8 0 1 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagccctgggagggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggatt  
ccccttcaatagctatgcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggagtgggtggcagtgatataattatg  
aagggagtaataaataattatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacactctgtat  
ttgcaaatggatagcctgagagccgaggacacggctgtctattactgtgcgaggaagtggctggggatggacttctgggg  
ccagggaaccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 7 0 】

クローン番号 8 0 4 :

gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcctgggtccggccctgggggggtccctgagactctcctgttcagcctctggatt  
caccttcagtaactatgctatgcactgggtccgccagggtccagggaagagactggaatatgtttcagctactagtactg  
atgggggggagcacatactacgcagactccctaaagggcacattcaccatctccagagacaattccaagaacacactgtat  
cttcaaatgagcagctctcagctactgaggacacggctatttattactgtgcgcccgccgattctggggatttggaaacttttt  
tgactactggggccgggggaaccctgggtcaccgtctcgagt

10

20

30

40

50



## 【 0 2 7 1 】

クローン番号 8 1 0 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagtccgggtcctcggtgaaggctctcctgcagggcttctggagg  
caccttcggcaattatgctatcaactgggtgcgacaggccccctggacaagggtctgagtggtgggaaggatcatccctg  
tctttgatacaaaaactacgcacagaagtccaggggcagagtcacgattaccgaggacagatccacaaacacagccatc  
atgcaactgagcagctctgcgacctcaggacacggccatgtattatgtttgagagggtccacccgtggctgggatactga  
tggttttgatactctggggccaagggaacaatggtcaccgtctcgagt

## 【 0 2 7 2 】

クローン番号 8 1 1 :

cagggttcagctgggtgcagctctggggctgtcggtggagacgcctggggcctcagtgagggtctcctgcaaggcatctggata  
catcttcggcaactactatataccactgggtgcgacaggccccctggacaagggtctgagtggtggcagttatcaatccca  
atgggtggtagcacaacttcgcacagaagtccaagacagaatcaccgtgaccagggacacgtccacgaccactgtctat  
ttggagggtgacaacctgagatctgaggacacggccacatatattgtgtagacagagatctgtaacaggggggtttga  
cgctgggttttaatccagatgcttctaataacctggggccaggggacaatggtcaccgtctcgagt

10

## 【 0 2 7 3 】

クローン番号 8 1 2 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggggctgagatgaagaagcctgggtcctcggtgaagggtctcctgcaaggcttctggagg  
ctccttcagcagctattctatcagctgggtgcgacaggccccctggacgagggtctgagtggtgggaatgatcctgccta  
tctctggtacaacaaactacgcacagacatttcaggggcagagtcatttagcgaggacacatccacgagcacagcctac  
atggagctgaccagcctcacatctgaagacacggccgtgtatttctgtgtagagagcttttagagaatttagcacctcgac  
ccttgaccctactactttgactactggggccaggggaaccttgggtcaccgtctcgagt

20

## 【 0 2 7 4 】

クローン番号 8 1 4 :

cagggtgcagctgggtggagctctgggggaggcgtgggtccagcctgggaagtccgtgagactctcctgtgtaggctctggctt  
cagggtcatggactatgctatgcactgggtccgcccagggtccaggcaagggtggtatgggtggcagttatttcataatg  
atggagccaatgaatactacgcagagtcctgaagggtccgattcaccgtctccagagacaattcagacaacactctgtat  
ctacaaaatgaagagcctgagagctgaggacacggctgtgtatttctgtgtagagagcgggcccgttctctatgaatgaaga  
agttattatgtactttgacaactggggcctgggaaccttgggtcaccgtctcgagt

## 【 0 2 7 5 】

クローン番号 8 1 6 :

gagggtgcagctgttggagctctgggggagggttgggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtgtagcctccggatt  
cacctttagtagctacgcatgacctgggtccgcccagggtccagggaagggttggagtgggtctcagtcattcgtgcta  
gtggtgatagtgaattctacgcagactccgtgaggggtccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgggtgttt  
ctgcaaatggacagcctgagagctgaggacacggccgtatatttctgtgcaaatataggccagcgtcggtattgttagtgg  
tgatcactgctacggacactttgactactggggccaggggaaccttgggtcaccgtctcgagt

30

## 【 0 2 7 6 】

クローン番号 8 1 7 :

cagggtgcagctgggtggagctctgggggaggcgtgggtccaacctgggaggtccctgagactctcctgtgagcctctggatt  
cgggttcaacacccatggcatgcactgggtccgcccagggtccaggcaagggttggagtgggtgtcaattatctcacttg  
atgggattaaagaccactatgcagactccgtgaagggtccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgggtgttt  
ctacaattgagtgccctgagacctgaagacacggctgtatattactgtgcaagatcatattggggggacgaacgcata  
ttttgaatggacagctccgtttgacggctggggccaggggaaccttgggtcaccgtctcgagt

40

## 【 0 2 7 7 】

クローン番号 8 1 8 :

cagggtcaccttgagggtgctgggtccagcgtgggtgaagcccacagaaacgctcactctgacctgcgcccttctctgggtt  
ctcactcaacgccgtagagtgggtgtgagtggatccgtcagccccagggtcaggccccgggaatggcttgacagcatg  
attgggatgatgataaagcgttccgcacatctctgaagaccagactcagcatctccaaggactcctccaaaaaccagggtg  
gtccttacactgagcaacatggaccttgcggacacagccacatatctgtgtcccgacacagggtcttcgcaagtggagg  
ctactacttgtactaccttgaccactggggccaggggaaccttgggtcaccgtctcgagt

## 【 0 2 7 8 】

50

クローン番号 8 1 9 :

cagggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactgggtgaagcccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctagtggtg  
cgccatcagtggtgctgattactactggagtggatccgccagccccagggaagggcctggagtgggttgggttcatct  
atgacagtgaggagcactactacaacccgtccctcaggagtcgagtgaccatatcaatagacacgtccaagaagcagttc  
tccctgaagctgacctctgtgactgccgcagacacggcctgtattactgtgccagagatctaggctacggtggtaactc  
ttactcccactcctactactacgggttggacgtctggggccaggggaccacggtcaccgtctcgagt

【 0 2 7 9 】

クローン番号 8 2 4 :

cagggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactgggtgaagcccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtg  
ctccatcggaattactactggggctggatccggcagccccagggaagggacttgagtggattgggcatatctacttcg  
gtggcaacaccaactacaacccctccctccagagtcgagtcacatttcagtcgacacgtccaggaaccagttctccctg  
aagttgaactctgtgaccgccgaggacacggcctgtattactgtgagggatagcagcaactggcccgcaggctatga  
ggactggggccagggaacccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 0 】

クローン番号 8 2 5 :

cagggttcagctgggtgcagctctggagctgaggtgaagaagccctggggcctcagtgagggtctcctgcaagggttcttggtta  
cacctttaccagtaattggtctcagctgggtgagacaggccctggacaagggttgagtggctgggatggatcagcgcta  
gtagtggaacacaaaagtatgccccgaaattccagggaagagtcaccttgaccacagacatttcacagacacagcctac  
atggaactgaggagcttgagatctgacgatacggcctatatattactgtgcgaaagatgggggcacctacgtgccctattc  
tgatgcctttgatttctggggccagggggacaattggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 1 】

クローン番号 8 2 7 :

cagggtccagctgggtacagctctggggctgaggtgaagaagccctggggcctcagtgagggtctcctgcagggttccggaca  
cactttcactgcattatccaaacactggatgagacagggtcctggaggagggttgagtggatgggattttttgatcctg  
aagatgggtgacacaggctacgcacagaagttccagggcagagtcacattgaccgaggacacagccacaggcacagcctac  
atggagctgagcagcctgacatctgacgacacggcctatatattgtgcaacagtagcggcagctggaaactttgacaa  
ctggggccagggaacccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 2 】

クローン番号 8 2 9 :

cagggtcacctgaaggagctctgggtcctgcgctgggtgaaagccacacagaccctgacactgacctgcaccttctctgggtt  
ttcactcagtaggaatagaatgagtgtagctggatccgtcagccccagggaagggcctggagtggcttgacgcattg  
attgggatgatgataaattctacaacacatctctgcagaccaggctcacattccaaggacacctccaaaaaccagggtg  
gtccttacaatgaccaacatggacctgtggacacagccacctattactgagcagggactgggatatatgatagtagtggt  
ttattacctctactactttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 3 】

クローン番号 8 3 0 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggagctgaggtgaagggtgctggggcctcagtgagggtctcctgcaaggcttctgggtta  
cacctttaccacttacggtgtcagctgggtgagcagggccctggacaagggttgagtggatgggttggatcagcgctt  
acaatggtaacacatactatctacagaagctccagggcagagtcacattgaccacagacacatccacgagcacagcctac  
atggagctgcggggcctgaggtctgacgacacggcctgtattactgtgagagatcggtgtgggggcagctcgccga  
ggttctatcgcgggccaaaaactacgggttggacgtctggggccaaggggaccacggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 4 】

クローン番号 8 3 1 :

cagggttcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagccctggggcctcagtgagggttctcctgcaaggcttctgcaaa  
catcttcacttatgcaatgcatgggtgagcagggcccccggacaaaggcttgagtggatgggatggatcaacgttggca  
atgggtcagacaaaaatattcacagaggttccagggcagagtcacattaccaggggacacgtccgagctacagcctacatg  
gagctgagcaccctgagatctgaggacacggctgtgtattactgtgagaggctgagagccaatatggggagggtctatgg  
caactactttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 5 】

クローン番号 8 3 5 :

10

20

30

40

50

cagggtgcagctgggtgcagctctggagctgagggtgaagaggcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaaggcttcagggtta  
cacctttatcagctatgggtttcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggttgagtggtatgggatggagcagcgctt  
acaatgggtgacacaaactatgcacagaagttccacggcagagttcaacatgacgactgacacatcgacgaacacggcctac  
atggaactcaggggcttgagatctgacgacacggccgtgtatctctgtgagggatcgcaatgttgttctacttccagc  
tgctccttttggagggtatggacgtctggggccaagggaacatgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 6 】

クローン番号 8 3 8 :

cagggtgcagctgggtggagctctgggggaggcgtgggtccagccggggacttccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
caccttcagtacgtttggcatgcactgggtccgcccaggctccaggcaaggggctggagtggttgccagttatatcataatg  
atggaaaataagaaatactatgcagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ctgcaagtgaacagcctgagagtcgaggacacggcgtgtgtattactgtgcgggccaaactccatatctcaatgagagcag  
tgggttagtgccggactggggccaggggcacccctgggtcaccgtctcgagt

10

【 0 2 8 7 】

クローン番号 8 4 1 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggagctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaaggcttctgggtta  
cacctttatcagttttggcatgcactgggtgcgacaggccccctggacaaggacttgagtggtatgggatggatcagcgctt  
acaatggtaacacagactatgcacagaggctccaggacagagttcaccatgactagagacacagccacgagcacagcctac  
ttggagctgaggagcctgaaaatctgacgacacggccgtgtactattgcactagagacgagtcgatgtctcggggagttac  
tgaaggattcggaccattgactactggggccagggaacccctgggtcaccgtctcgagt

20

【 0 2 8 8 】

クローン番号 8 5 3 :

gaagtgcagctgggtgcagctctggagcagagggtgaaaaagccggggcagttctctgaagatctcctgtaagacttctggata  
catctttaccaactactggatcggtgggtgcgcccagaggccccggaaaggcctggagtggtatgggggtcatctttcctg  
ctgactctgatgccagatacagcccgtcgttccaaggccagggtcaccatctcagccgacaagttccatcggtactgcctac  
ctgcagtggtatagcctgaaggcctcgacacaccgccaatatattactgtgagagaccgaaatatattactttgatagtagtgg  
gcaattctccgagatgtactactttgacttctggggccagggaacccctgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 9 】

クローン番号 8 5 5 :

cagggttcagctgggtgcagctctggacctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaaggcttctgggtta  
tgtgttgaccaactatgccttcagctgggtgcggcaggccccctggacaagggttgagtggttggtatggatcagcggt  
ccaatggtaacacatactatgcagagaagttccaggggccgagttcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctac  
atggagctgaggagctctgagatctgacgacacggccgtttatctctgtgagagagatctctcggggtccacttactttga  
ctactggggccagggaacccctgggtcaccgtctcgagt

30

【 0 2 9 0 】

クローン番号 8 5 6 :

cagggtgcagctgggtgcagctctggagctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaaggcttctgggtta  
caccttttccaactacgggtttcagctgggtgcgacaggccccctggacgagggttgagtggtatgggatggatcagcgctt  
acaatggtaacacatactatgcacagaacctccaggggcagagttcaccatgaccacagacacatccacgaccacagcctac  
atggtactgaggagcctgagatctgacgacacggccatgtattactgtgagagagatggaaatacagcaggggttgatat  
gtggtcgctgatgggttttgatatctggggccagggggacaatgggtcaccgtctcgagt

40

【 0 2 9 1 】

クローン番号 8 5 7 :

gagggtgcagctgttggagctctgggggaggccttggtacagcctggggggccccctgaggctctcctgtgtagcctctggatt  
cagcttttagcagctatgccatgaactggatccgcttggtccagggaaggggctggagtggttctcagggtatagtggtta  
gcggtggttagcacttactacggagactccgtgaaggggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatatattactgtgcaaagagccgtggatcgatatagtagtggc  
atctgtttatatccccctactactacgacggaatggacgtctggggccaaggggaccacgggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 2 】

クローン番号 8 5 8 :

cagggttcagctgggtgcagctctggggctgagggtgaagaagcctgggtcctcggtgaagggtctcctgcaaggcctctggagg

50

atccttcgacggctacactatcagctggctgacagggccctggacaggggttgagtggatgggaagggtcgtcccta  
cacttggttttccaaactacgcacagaagttccaaggcagagtcaccgttaccgcggacagatccaccaacacagcctac  
ttggaattgagcagactgacatctgaagacacggccgtatatctactgtgcgaggatgaatctcgatcgcatagcgggcg  
ccccgggttcgacatgtggggccaaggaaccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 3 】

クローン番号 8 5 9 :

caggtgcagctggaggagtctgggggaggcgtgggtccagcctgggaggtcccttgagactctcctgtgcagtgctggatc  
cagcttcagtaaaataggcatacactgggtccgccagggtccaggcaaggggtggagtgggtggcagttatatcgtagt  
atggaagtaaaaagtatttcacagactccgtgaaggggccgattcaccatcgccagagacaattcccagaacacggttttt  
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtctattactgtgcgacaggaggggtgttaatgtcacctcgtg  
gtccgacgtagagcactcgtcgtccttaggctactggggcctgggaaccctggtcaccgtctcgagt

10

【 0 2 9 4 】

クローン番号 8 6 1 :

caggtgcagctggaggagtctgggggaggcgtgggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggatt  
caccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggtggagtgggtggcatttatatggaatg  
atggaagtaataaatactatgcagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaagatgagggtctatgatagtagtggtta  
ttacctgtactactttgactcttggggccagggaaccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 5 】

クローン番号 8 6 3 :

gaggtgcagctgttggagtctgggggaggcgtgggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
cacgtttagctcctataccatgagctgggtccgccagggtccagggaaggggtggagtgggtctcaagtattagtgcta  
gtactgttctcacatactacgcagactccgtgaaggggccgcttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ctgcaaatgagtagcctgagagccgaggacacggccgtatatctactgtgcgaaagattacgatttttggagtggctatcc  
cgggggacagctactgggttcttcgatctctggggccgtggcaccctggtcaccgtctcgagt

20

【 0 2 9 6 】

クローン番号 8 6 8 :

caggtgcagctgcaggagtgcggcccaggactgggtgacgccttcggagaccctgtccgtcacttgcactgtctctaatta  
ttccatcgacaatgcttactactggggctggatccggcagccccagggaagggtctggagtggataggcagtatccatc  
atagtgaggagcgcctactacaatttcgtccctcaagagtcgagccaccatatctatagacacgtccaagaaccaattctcg  
ttgaacctgaggctctgtgaccgcccagacacggccgtatatctactgtgcgcgcgataccatcctcacgttcggggagcc  
ccactgggttcgacccctggggccagggaaccctggtcaccgtctcgagt

30

【 0 2 9 7 】

クローン番号 8 7 0 :

caggtgcagctgcaggagtgcggcccaggactgggtgaagccttcggagacccttgtccctcacctgcactgtctcaggtga  
ctccatcagtaattactactggagtggatccggcagccccagggaagggtggagtggatggagaaatatctaaca  
cttggagaccaattacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatatctctagacatgcccaagaaccagttgtccctg  
aagctgagctctgtgaccgctgcggacacggccgtatatctactgtgcgagagggcttttctatgacagtggtggttacta  
cttgttttacttccaacactggggccagggcaccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 8 】

クローン番号 8 7 1 :

caggtgcagctggaggagtctgggggaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagagtctcctgtgcagcgtctggatt  
caccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggtggagtgggtggcagttatatggtagt  
atgacagtaataaacagtatggagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagagtacgctgtat  
ctgcaaatggacagactgagagtgcaggacacggctgtgtattatgtgcgagagccctccgagtatagtatcagctggcg  
acacaggggggtcccttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcgagt

40

【 0 2 9 9 】

クローン番号 8 8 0 :

cagatcaccttgaaggagtctgggtccctacgctgggtgagaccacacagaccctcacactgacctgcaccttctctgggtt  
ctcactcagcactagtaaacctgggtgtgggctggatccgtcagccccaggaaaggccctggagtggcttgcactcgttg

50

attgggatgatgataggcgctacaggccatctttgaagagcaggctcacggtaccaaggacacctccaaaaaccagggtg  
gtccttacaatgaccaacatggacctgtggacacagccacataattactgtgcacacagtcgctactatactagtagtgg  
ttattaccttcaatacttccatcactggggcccgggcaccctgggtcacggtctcgagt

【 0 3 0 0 】

クローン番号 8 8 1 :

gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcggtgtacagcctggaggctccctgagactctcctgtgaagtctccggatt  
caccttcaatagttatgaaatgacctgggtccgccaggccccagggaaggggtggagtgggtttcacacattggtaata  
gtggttctatgataactacgctgactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactatat  
ctgcaaatgaacagcctgagagtcgaggacacggctgtttattactgtgagaggtcagattactatgatagtagtgggtta  
ttatctcctctacttagactcctggggccatggaaccctgggtcacggtctcgagt

10

【 0 3 0 1 】

クローン番号 8 8 4 :

cagggtgcagctgggtgcagtctggggctgagggtgaggaagcctggggcctcagtgaagggtttcctgcaaggcttctggaca  
tactttcattaaactttgctatgcatgggtgcccaggcccccgacaggggttgagtggatgggatacatcaacgctg  
tcaatggtaacacacagtatccacagaagttccagggcagagtcacctttacgagggacacatccgcgaacacagcctac  
atggagctgagcagcctgagatctgaagacacggctgtgtattactgtgagagaacaatgggggctctgctatcatttt  
ttactactggggccagggaaccctgggtcacggtctcgagt

【 0 3 0 2 】

クローン番号 8 8 6 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcggtgtccagcctgggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatt  
cagcttcagtagctatggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggtggagtgggtggcagttatatcaaatg  
atggaagtaataaaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaaaacgatgtat  
ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtatttctgtgcaagacaacagaccagcggctatttagtgga  
ctgggttcgacccctggggccagggaaccctgggtcacggtctcgagt

20

【 0 3 0 3 】

クローン番号 8 8 8 :

cagctgcagctgcaggagtgcggcccaggactgggtgaagccatcgagaccctgtccctcacctgcactgcctctgggtgg  
ctccatcaacagtagtaatttctactggggctggatccgccagccccagggaaggggtggagtggattgggagttatct  
tttatagtgggaccactactacaaccctccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtccaagaaccagttc  
tccctgaagctgagccctgtgaccgcccagacacggctgtctatcactgtgagagacatggcttccgggtattgtaataa  
tgggtgatgctctataaaatctcgatgcttttgatatctggggccaagggacaatgggtcacggtctcgagt

30

【 0 3 0 4 】

クローン番号 8 9 4 :

cagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgctgtccagcctggaaaagtcctgagactctcctgtgcagcgtctggatt  
cagattcagtgactacggcatgcactgggtccggcagggtccaagcaaggggtggagtgggtggcagttatctggcatg  
acggaagtaataaaggatgcagactccgtgaggggcccgttttccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat  
ttgcaaatgaacagcatgagagccgacgacacggctttttattattgtgagagagtcgggttccagatttggagtgggtct  
ttattttgaccactggggccagggaaccctgggtcacggtctcgagt

【 0 3 0 5 】

同一のクローンにおいて、軽鎖の完全なアミノ酸配列（すわなち、定常領域および可変  
領域を含む軽鎖）は以下のアミノ酸配列を有し、それらはまた、配列番号：8 9 - 1 3 2  
として記載される：

40

【 0 3 0 6 】

クローン番号 7 3 5 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSHLAWYQQKPGQAPRLLIYNTFNRVTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLAT  
EDFGVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 0 7 】

クローン番号 7 3 6 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQRI SNHLNHWYQQKPGKAPKLLIFGASTLQSGAPSRFSGSGSGTDFTLTITNVQP

50

DDFATYYCQQSYRTPP I NFGQGTRLD I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 0 8 】

クローン番号 7 4 4 :

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E  
P E D F A V Y Y C Q Q Y D S S L S T W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S  
N S Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 0 9 】

クローン番号 7 9 3 :

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I T G Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A T S T L Q S E V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q S Y N T L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E  
S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 0 】

クローン番号 7 9 5 :

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I H G A S T G A T G T P D R F S G S G S G T D F T L T I S T L E  
P E D F A V Y Y C Q Q Y G R T P Y T F G Q G T K L E N K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S  
Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 1 】

クローン番号 7 9 6 :

D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C R S S Q S L L R S D G K T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q P L M Y E V S S R F S G V P D R F S G S G S G A D F T L N I  
S R V E T E D V G I Y Y C M Q G L K I R R T F G P G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 2 】

クローン番号 7 9 9 :

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T F S C R A S Q S V S S W A W Y Q Q K P G K A P K L L I S E A S N L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q Y H S Y S G Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S  
Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 3 】

クローン番号 8 0 0 :

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T L T C R A S Q G I T D S L A W Y Q Q K P G K A P K V L L Y A A S R L E S G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q Y S K S P A T F G P G T K V E I R R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 4 】

クローン番号 8 0 1 :

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L N S N G F N Y V D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L E T P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 5 】

クローン番号 8 0 4 :

E I V L T Q S P G T L S L S P G G R A T L S C R A S Q S V S S G Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S G R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E  
P E D F A V Y Y C Q Q Y F G S P Y T F G Q G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S  
Q E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 6 】

クローン番号 8 1 0 :

N I Q M T Q S P S A M S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L V W F Q Q K P G K V P K R L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C L Q H N I S P Y T F G Q G T K L E T K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K S D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 3 1 7 】

クローン番号 8 1 1 :

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R S S E T V L Y T S K N Q S Y L A W Y Q Q K A R Q P P K L L L Y W A S T R E S G V P A R F S G S G S G T D F T L A

10

20

30

40

50

ISSLQAEDVAVYYCQQFFRSPFTFGPGTRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 1 8 】

クローン番号 8 1 2 :

EIVLTQSPGTLSPGERVTLSRCRASQSVSSSYIAWYQQKPGQAPRLVITYAASRRATGVPDRFSGSGSATDFTLTISRLE  
PEDLAVYYCQHYGNSLFTFGPGTKVDVKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 1 9 】

クローン番号 8 1 4 :

DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSIGSRLAWYQQQPGKAPKFLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ  
EDLATYYCQQYNRDPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 0 】

クローン番号 8 1 6 :

DIVMTQSPSLSPVTPGPASISCRSSQSLLHSDGRYYVDWYLQKPGQSPHLLIYLASNRRASGVPDRFTGSGSGTDFTLK  
SRVEAEDGVVYCMQGLHPTWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 1 】

クローン番号 8 1 7 :

EIVMTQSPATLSASPGERATLSCWASQTI GGNLAWYQQKPGQAPRLIYGASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLAISLQ  
EDFAVYYCQQYKNWYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 2 】

クローン番号 8 1 8 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQTI ASYVNWYQQKPGRAPSLIYAASNLRSGVPPRFSGSGSGTDFTLTISGLQ  
DDFATYYCQQSYSYRALTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 3 】

クローン番号 8 1 9 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSLAWYQQTPGQAPRLIYDASYRVGTIPARFSGSGSGIDFTLTISLQ  
EDFAVYYCQQRSNWPPGLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 4 】

クローン番号 8 2 4 :

AIQLTQSPSSLSASVGDVTVTCRPSQDISSALAWYQQKPGKPPKLLIYGASTLDYGVPLRFSGTASGTHFTLTISLQ  
EDFATYYCQQFNTYPTFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 5 】

クローン番号 8 2 5 :

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIHLASTREYGVDPDRFSGSGSGTDFAL  
ISSLQAEDVAVYYCQQYYQTPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 6 】

クローン番号 8 2 7 :

DIQMTQSPSSLAASVGDRTVITCRASQFISSYLHWYQQRPGKAPKLLMYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSYTNPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 7 】

クローン番号 8 2 9 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIASYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ

10

20

30

40

50

EDFATYYCQHSYSTRFTFGPGTKVDVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 8 】

クローン番号 8 3 0 :

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVTSELAWYQQKPGKAPNFLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ  
DDFATYYCQQYNSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 2 9 】

クローン番号 8 3 1 :

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNIYNWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ  
DDFATYYCQQYNSLSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【 0 3 3 0 】

クローン番号 8 3 5 :

DIQLTQSPSFLSASLEDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLLDAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ  
EDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 1 】

クローン番号 8 3 8 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDVATYYCQKYNSAPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【 0 3 3 2 】

クローン番号 8 4 1 :

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYWASTRASGVPPDRFSGSGSGTDFTLT  
LSSLQAEDVAVYYCQQFHSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 3 】

クローン番号 8 5 3 :

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAAGMPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  
PEDFAVYYCQQYGNSTLTFGGGTEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【 0 3 3 4 】

クローン番号 8 5 5 :

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQAISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQ  
EDFATYYCQQADTFPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 5 】

クローン番号 8 5 6 :

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLDSNDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTFYSYRASGVPPDRFSGSGSGTDFTLK  
ISRVEAEDVGYYCMQRIEFYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

【 0 3 3 6 】

クローン番号 8 5 7 :

DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHRNEYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYWGSNRASGVPPDRFSGSGSGTDFTLK  
SRVEAEDVGYYCMQTLQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 7 】

クローン番号 8 5 8 :

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIFDATKLETGVPTRFISGSGSGTDFTVTITSLQ

50



EDVATYYCQHAFANLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 8 】

クローン番号 8 5 9 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNYLAWYQQKPGKVPKLLVFAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDVATYYCQRYNSAPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 3 9 】

クローン番号 8 6 1 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQII ASYLNWYQQKPGRAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQSYSTPIFTFGPGTKVNIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【 0 3 4 0 】

クローン番号 8 6 3 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFAVYYCQQRSDWLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 1 】

クローン番号 8 6 8 :

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSI KNNLAWYQVKPGQAPRLLTSGASARATGIPGRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDIAVYYCQEYNNWPLLTFGGGTKVEIQRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【 0 3 4 2 】

クローン番号 8 7 0 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRI ASYLNWYQQKPGRAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDYATYYCQSYSTPIYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 3 】

クローン番号 8 7 1 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIFDASNLESEVPSRFSGRGSGTDFTFSISLQ  
EDIAFYCQQYDNFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【 0 3 4 4 】

クローン番号 8 8 0 :

DIQMTQSPSSLAASVGDRVTITCRASQTI ASYVNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFASYFCQQSYSPYTFGQGTKLDIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 5 】

クローン番号 8 8 1 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTI ASYVNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQSYSPRLTFGGGKVDITRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

【 0 3 4 6 】

クローン番号 8 8 4 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTI SVFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLHSAVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDSATYYCQESFSSSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 7 】

クローン番号 8 8 6 :

EIVMTQSPATLSVSPGETATLSCRASQSVSSNLAWYQHKPGQAPRLLI HSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQ

50

EDFAVYYCQQYNMPPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 8 】

クローン番号 8 8 8 :

DIVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSLLRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSIRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKIS  
SRVEAEDVGVYYCMQSLQTSITFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 4 9 】

クローン番号 8 9 4 :

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGNLAWYQQRPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS  
EDFAVYYCQQYDKWPETFGQGTKVDIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 5 0 】

これらのクローンにおいて核酸フラグメントをコードする軽鎖は、以下の核酸配列を有し、それらはまた、配列番号：133 - 176として提供される：

【 0 3 5 1 】

クローン番号 7 3 5 :

gaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtccttgtctccaggagaaagagccaccctctcctgcagggccagtc  
gagtgtaacagccacttagcctggtagcaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctataatacatcaata  
gggtcactggcatcccagccagggttcagtgccagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagccttgcgact  
gaagattttggcgtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctcccgccctcactttcggcggagggaccaaagtgg  
gatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctg  
ttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggaggataacgcccctccaatcgggtaac  
tcccaggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggg  
gagagtgt

【 0 3 5 2 】

クローン番号 7 3 6 :

gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtgggagacagagtcaccttcacttgccgggcccagtc  
gaggattagcaacctttaaaatgggtatcaacaaaagccagggaagccccctaaactcctgatctttggtgcatccactc  
ttcaaagtggggcccatcaagggttcagtgccagtggtctgggacagatttcactctcaccatcactaatgtacaacct  
gacgattttgcaacttactactgtcaacagagttacagaactcccccgatcaacttcggccaagggacacgcctggacat  
taagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggaggataacgcccctccaatcgggtaactcc  
caggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【 0 3 5 3 】

クローン番号 7 4 4 :

gaaattgtgttgacgagctctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtc  
gagtgtagcagcagctacttagcctggtagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatcca  
gcagggccactggcatcccagacagggttcagtgccagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag  
cctgaagattttgagtgtagttactgtcagcagtagtagctcactttctacgtggagcttcggccaagggaccaagggt  
ggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcct  
ctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggaggataacgcccctccaatcgggta  
aactcccaggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc  
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaaca  
ggggagagtgt

【 0 3 5 4 】

クローン番号 7 9 3 :

gacatccagatgaccagtgctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtacccatcacttgccgggcaagtca  
gagcattaccggctattttaaattgggtatcagcagaaaccagggaagccctaaactcctgatctatgctacatccactt  
tgcaaagtgaggtcccatcaagggtcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcttcaacct  
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttataataccctcactttcgggcggagggaaccaaggtggagatcaaacg  
aactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcc  
tgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccccaatcgggtaactcccaggag  
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa  
acacaaagtctacgctgccaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt  
【 0 3 5 5 】

クローン番号 7 9 5 :

10

gaaattgtgtgacgcagtgctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggggccagtca  
gagtgttagcagcagctacttagcctgggtatcagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatatcaggcgcattca  
ccggggccactggcaccacagacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccatcagtagactggag  
cctgaagattttgagtggtattactgtcagcaatatggtaggacaccgtacacttttgccaggggaccaagctggagaa  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccccaatcgggtaactcc  
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgctgccaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

20

【 0 3 5 6 】

クローン番号 7 9 6 :

gatatgtgatgaccagactccactctctctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcagggtctagtca  
gagcctcctgccaagtgtggaagacgtttttgtattgggtatctgcagaagccaggccagtctccccaacccctaatgt  
atgagggtgccagccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcaggggcagatttcacactgaacatc  
agccgggtggagactgaggaagtgtgggatctattactgcatgcaaggtttgaaaaatcgctcgagcgtttggccagggac  
caaggtcgaaatcaagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa  
ctgcctctgttgtgtgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccccca  
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgccaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct  
tcaacaggggagagtgt

30

【 0 3 5 7 】

クローン番号 7 9 9 :

gacatccagatgaccagtgctccttccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtaccccttctcttgccgggccagtca  
gagtgttagtagttgggtggcctgggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctctgaggcctccaatt  
tggaagtggggtcccatcccgttcagcggcagtggtccgggacagaattcactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gaagattttgcaacttattactgccaacagtatcatagttactctgggtacacttttgccaggggaccaagttggaat  
caagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccccaatcgggtaactcc  
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgctgccaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

40

【 0 3 5 8 】

クローン番号 8 0 0 :

gcatccagttgaccagtgctccatcgctccctgtctgcatctgtaggcgacagagtacccctcacttgccgggcgagtca  
gggcattaccgatctttagcctgggtatcagcagaaaccagggaagccctaaaggtcctgctctatgctgcttccagat  
tggaagtggggtcccatccagggttcagtggcctgggtctgggacggatttactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gaagactttgcaacttattactgtcaacagtatctaaagtccccgagcagttcgggccagggaaccaaggtggaaatcag  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgt  
gcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga

50

gaaacacaaaagtctacgacctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

【 0 3 5 9 】

クローン番号 8 0 1 :

gatatgtgatgaccagctctccactctccctgcccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcagggtctagtca  
gagcctcctaaatagtaattgattcaactatgtggattggtacctgcagaagccagggcagctctccacaactcctgatct  
atttgggttctaatacgggcctccgggtccctgacagggtcagtggcagtggtcaggcacagattttacactgaaaatc  
agcagagtggaggctgaggatgttgggtttattactgcatgcaagctctagaaactccgctcactttcggcggaggagac  
caagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa  
ctgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaa  
tcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgag  
caaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgacctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct  
tcaacaggggagagtgt

10

【 0 3 6 0 】

クローン番号 8 0 4 :

gaaattgtgtgacgcagctctccaggcacccctgtctttgtctccagggggaagagccaccctctcctgcaggggccagttca  
gagtgttagcagcggctacttagcctggtagcagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccg  
gcaggggccactggcatcccagacagggtcagtggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagactggag  
cctgaagattttgcagtgattactgtcagcagttttggctcaccgtacacttttggccaggggaccaagctggagct  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaaagtctacgacctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

20

【 0 3 6 1 】

クローン番号 8 1 0 :

aacatccagatgaccagctctccatctgccatgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgtcgggcgagtca  
gggcattagtaattatttagtctgggtttcagcagaaaccaggggaaagtccctaagcgctgatctatgctgcatccagtt  
tgcaaagtgggttccatcaagggtcagcggcagtggtctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcct  
gaagattttgcaacttattactgtctacagcataataatttccccttacacttttggccaggggaccaagctggagaccaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagtctacgacctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

30

【 0 3 6 2 】

クローン番号 8 1 1 :

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaactgcagggtccagtga  
gactgtttttatcacctctaaaaatcagagctacttagcttggtagcagcagaaagcacgacagcctcctaaactactcc  
tttactgggcatctaccggggaatccgggtccctgcccgatcagtggcagcggatctgggacagatttcaactctcgcc  
atcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatttttaggagtcctttcactttcgccccgg  
gaccagactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg  
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctc  
caatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgacctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga  
gcttcaacaggggagagtgt

40

【 0 3 6 3 】

クローン番号 8 1 2 :

gaaattgtgtgacgcagctctccaggcacccctgtctttgtctccagggggaagagttacccctctctgcaggggccagttca  
gagtgttagcagcagttacatagcctggtagcagcagaaacctggccaggctcccaggctcgtcatctatgctgcatccc

50

gcagggccactggcgtcccagacaggttcagtggcagtggtctcgacagacttcactctcaccatcagtagactggag  
cctgaagatcttgagtgatctactgtcagcactatggtaactcactatcactttcgccctgggaccaaggtggatgt  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcggttaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaaagtctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccctcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【 0 3 6 4 】

クローン番号 8 1 4 :

gacatccagatgaccagtgctccctccaccctgtctgcatctgtcgagagacagagtcaccatcacttgccgggcccagtc  
gagtatggtagccggttggcctgggtatcagcagcaaccagggaagccccctaaattcctgatctatgatgcctccagtt  
tggaagtggttccatcaaggttcagcggcagtggtcagggacagaattcactctcaccatcagcagcctgcagccg  
gaggtatctgcaacttattactgccaacagtacaatagagattctccgtggacgttcggccaagggaaccaaggtggaaat  
caagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcggttaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaaagtctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccctcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【 0 3 6 5 】

クローン番号 8 1 6 :

gatattgtgatgaccagtgctccactctccctgcccgtcaccccaggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtca  
gagcctcctgcatagtgatggacgctactatgtggattggtacctgcagaagccagggcagtgctccacacctcctgatct  
atttggcttctaatacgggcctccgggtccctgacaggttcactggcagtggtcaggcacagattttacactgaaaaatc  
agcagagtgaggctgaggtatgtggcgttattactgcatgcaaggtctacacactccttgagcgttcggccaggggac  
caagtgagatcaagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaa  
ctgcctctgttgtgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcccccca  
tcgggttaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag  
caaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccctcacaaagagct  
tcaacaggggagagtgt

【 0 3 6 6 】

クローン番号 8 1 7 :

gaaattgtaatgacacagtgctccagccaccctgtctgctgctccccaggggaaagagccaccctctcctgttgggcccagtc  
gactattggaggcaacttagcctggtagcagcagaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccacca  
gggcccactgggtgtcccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagagttcactctcgccatcagcagcctgcagtgct  
gaagattttgcagtttattactgtcagcagtataaaaactggtagacttttggccaggggaccaagctggagctcaaacg  
aactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgccc  
tgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcggttaactcccaggag  
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaa  
acacaaaagtctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccctcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

【 0 3 6 7 】

クローン番号 8 1 8 :

gacatccagatgaccagtgctccatcctccctgtctgcatctgttaggagacagagtcaccatcacttgccgggccaagtca  
gaccttgccagttacgtaaattggtaccaacaaaaaccaggggagagccccctagtgctcctgatctatgctgcatctaact  
tgagagtggttcccaccaaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcgggtctgcaacct  
gacgattttgcaacttattactgtcaacagagttacagttatcgagcgtcactttcgccggaggggaccaaggtggagat  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcggttaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaaagtctacgcttgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccctcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

10

20

30

40

50

## 【 0 3 6 8 】

クローン番号 8 1 9 :

gaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtcgttgtccccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtggttagcagctccttagcctggtagcaacagacacctggccaggctcccaggcttctcatctatgatgcgtcctacagggtcactggcatcccagccagggtcagtggcagtggtctgggatagacttactctcaccatcagcagccttagagcctgaagattttgcagtttactattgtcagcagcgtagcaactggcctccggggctcactttcggcggggggaccaagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt

10

## 【 0 3 6 9 】

クローン番号 8 2 4 :

gccatccagttgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgttggagacacagtcaccgtcacttgccggccaagtcaggacattagcagtgctttagcctggtagcagaaaaccagggaacccctaagctcctgatctatggtgcctccactttggattatgggtcccattaagggtcagcggcactgcatctgggacacatttactctcaccatcagcagcctgcaacctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatacttaccatctcactttcgccctgggaccaaagtggaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggggagagtggt

20

## 【 0 3 7 0 】

クローン番号 8 2 5 :

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtcagccagagtggtttatatacaactccaacaataagaactacttagcctggtagcagaaaaccaggacagcctcctaagctcctcatttacttggcatctacccgggaatacgggggtccctgaccgatcagtggcagcgggtctgggacagatttcgctctcatcatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacaataattatcaaactcctctaacttttggccaggggaccaagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggggagagtggt

30

## 【 0 3 7 1 】

クローン番号 8 2 7 :

gacatccagatgaccagctctccatcctccctggctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcaggttcattagcagctatttacaattggtagcagaaaagaccagggaaggccctaaactcctgatgtatgctgcctccactttgcaaagtggggtcccatcaagggtcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcttgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacactaacccatacacttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggggagagtggt

40

## 【 0 3 7 2 】

クローン番号 8 2 9 :

gacatccagatgaccagctctccatcctccctatctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattgccagctattttaaattggtagcagaaaaccagggaaggcccccacaaactcctgatctatgctgcatccagtttgcatagtggggtcccatcaagattcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcttgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacacagttacagtactcgattcactttcgccctgggaccaaagtggaatgtcaa

50

acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagttacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

【 0 3 7 3 】

クローン番号 8 3 0 :

gacatccagatgaccagttctccttcgacccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcccagtc  
gagtgttactagttagttggcctgggtatcagcagaaaccagggaagccccctaacttcttgatctataaggcgtctagt  
tagaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggacagaattcactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gatgatcttgcaacttattacttgccaacagtataatagttttccgtacacttttggccaggggaccaagctggagatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagttacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

10

【 0 3 7 4 】

クローン番号 8 3 1 :

gacatccagatgaccagttctccttccacccctgtctgcatctgtaggcgacagactcaccatcacttgccgggcccagtc  
gaatatcttataaactgggtggcctgggtatcagcagaaaccagggaagccccctaactccttgatctatgacgcctccact  
tggaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gatgatcttgcgacttattacttgccaacaataataatagtttgtctccgacgttcggccaaggggaccaaggtggaaatcaa  
gcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagttacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

20

【 0 3 7 5 】

クローン番号 8 3 5 :

gacatccagttgaccagttctccatccttccctgtctgcatctttagaagacagagtcactatcacttgccgggcccagtc  
gggcattagcagttatttagcctgggtatcagcaaaaaccagggaagccccctaagctcctgctcgatgctgcatccact  
tgcaaatcagggttcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggacagagttcactctcacaaatcagcagcctgcagcct  
gaagattttgcaacttattactgtcaacagcttaataagttaccctcggacgttcggccaaggggaccaaggtggacatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagttacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

30

【 0 3 7 6 】

クローン番号 8 3 8 :

gacatccagatgaccagttctccatccttccctgtctgcatctgtaggagacagagtcagcatcacttgccgggcccagtc  
gggcattagcaattatttagcctgggtatcagcagaaaccagggaaggttccctaagctccttgatctatgctgcatccact  
tgcaaatcagggttcccatctcggttcagtggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gaggatgttgcaacttattactgtcaaaaagtataaacagtgtccccctcaaacgttcggccaaggggaccaaggtggaaatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagttacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

40

【 0 3 7 7 】

50

クローン番号 8 4 1 :

gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctctgggagagagggccaccatcaactgcagggtccagcca  
gagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtagcagcagaaaccaggagacgctcctaagctgctcg  
tttactgggcatcaaccgggcatccgggggtccctgaccgatcagtgccagcgggtctgggacagatttactctcacc  
ctcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcagtttcatagtactcctcgagcgttcggccaagg  
gaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg  
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaagggtggataacgcccctc  
caatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga  
gcttcaacaggggagagtggt

10

【 0 3 7 8 】

クローン番号 8 5 3 :

gaaatttgtgtgacgcagctctccaggcaccctgtcttttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggggccagtca  
gagtgttagcagcaactacttagcctggtagcagcagaaacctggccagggtcccagggtcctcatctatgggtgcatcca  
gcagggccgctggcatgccagacaggttcagtgccagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagactggag  
cctgaagattttgcagtgattactgtcagcagtatggtaactcaccgctcactttcggcggaggggaccgagggtggagat  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaagggtggataacgcccctccaatcgggtaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtggt

20

【 0 3 7 9 】

クローン番号 8 5 5 :

gacatccagatgaccagctctccatcttctgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgtcgggcgagtca  
ggctatttagtaactgggttagcctggtagcagcagaaaccaggaaaaagccccctaagctcctgatctatgctgcatccagt  
tgcaaagtggggtcccatcaagattcagcggcagtggtctgggacagatttactctcactatcagcggcctgcagcct  
gaggattttgcaacttactattgtcaacaggctgacactttccctttcactttcggccctgggaccaaagtggatatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaagggtggataacgcccctccaatcgggtaactccag  
gagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg  
gt

30

【 0 3 8 0 】

クローン番号 8 5 6 :

gatatttgtgatgaccagactccactctccctgcccgtcacccttgagagccggcctccatctcctgcagggtctagtca  
gagcctcttggatagtaatgatggaaacacctatttggactggtagctgcagaagccaggggcagctctccacagctcctga  
tttatacattttccatcgggcctctggaggtcccagacaggttcagtgccagtggtctggcactgatttcacactgaaa  
atcagcaggggtggaggccgaggatgttggagtttattactgcatgcaacgtatcgagtttccgtacacttttggccaggg  
gaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg  
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaagggtggataacgcccctc  
caatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga  
gcttcaacaggggagagtggt

40

【 0 3 8 1 】

クローン番号 8 5 7 :

gatatttgtgatgaccagctctccactctccctgcccgtcacccttgagagccggcctccatctcctgcagggtctagtca  
gagcctcctgcatagaaatgagtacaactatttggattggtagcttgacagaagccaggggcagctctccacagctcctgatct  
attgggggttctaactcgggcctccgggggtccctgacaggttcagtgccagtggtcaggcacagattttacttgaaaatc  
agcagagtgagggtgaggatgttgggggtttattactgcatgcaaaccttacaacactcctcgagcgttcggccaagggac  
caagggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa

50



ctgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaa  
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgag  
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagct  
tcaacaggggagagtgt

【 0 3 8 2 】

クローン番号 8 5 8 :

gacatccagatgaccagcttccatcctccgtgtctgcatctgtgggagacagagtacccatcacttgccaggcgagtca  
agacattagcaactatttaaatgggtatcagcagaaaccagggaagccccctaagctcctgatcttcgatgcaacaaat  
tgagagacaggggtccaacaagggttcatitggaagtggatctgggacagattttactgtcaccatcaccagcctgcagcct  
gaagatgttgcaacataattactgtcaacactttgctaattctccatacacttttggccaggggaccaagctggagatcaa  
gcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt  
gt

【 0 3 8 3 】

クローン番号 8 5 9 :

gacatccagatgaccagcttccatcttccctgtctgcatctgttaggagacagagtacccatcacttgccgggcgagtca  
gggcattaggaattatttagcctgggtatcagcagaaaccagggaagttcctaagctcctgggtctttgctgcatccactt  
tgcaatcaggggtcccatctcgggttcagtggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcct  
gaggatgttgcaacttattactgtcaaaggataaacagtgcctcgctcactttcggcggaggggacgaagggtggagatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt  
gt

【 0 3 8 4 】

クローン番号 8 6 1 :

gacatccagatgaccagcttccatcctccctgtctgcatctgttaggagacagagtacccatcacttgccgggcaagtca  
gatcattgccagctattttaaattgggtatcagcagaaaccaggcagagccccctaagctcctgatctatgctgcatccagtt  
tgcaaagtggggtcccatcaagggttcagtggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagcttgcaacct  
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccccatatttactttcggccctgggaccaagggtgaatat  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgt  
tgtgcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcc  
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【 0 3 8 5 】

クローン番号 8 6 3 :

gaaattgtgttgacacagcttccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggaccagttca  
gagtgttagcagctacttagcctggtagcaacagaaacctggccagggtcccagggtcctcatctatgatgcttccaata  
gggacctggcatccagccagggttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagccttagagcct  
gaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagtactggctcactttcggcggaggggaccaagggtggagatcaaagc  
aactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcc  
tgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggag  
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa  
acacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

【 0 3 8 6 】

クローン番号 8 6 8 :

gaaattgtaattgacacagcttccagccaccctgtctgtgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggggccagttca

gagtattaaaaacaacttggcctggtaccaggtgaaacctggccaggctcccaggctcctcacctctggtgcatccgcca  
gggccactggaattccaggcaggttcagtggcagtggtctgggactgacttcactctcaccatcagcagcctccagttc  
gaagatatgtcagtttatctactgtcaggagtataataattggccccctgctcactttcggcggaggggaccaaggtggagat  
ccaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcgggtaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【0387】

クローン番号870:

10

gacatccagatgaccaggtctcctccctccctgtctgcatctgtgggagacagagtcacatcacttgccgggcaagtca  
gaggattgccagctatttaaatgggtatcagcagaaaccaggagagccccctaagctcctgatcttctgtgcatccagtt  
tacaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagtagtctgcaacct  
gaagattatgagacttactactgtcaacaggttacagtactcccatctacacttttggccaggggaccaagctggagat  
caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcgggtaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【0388】

20

クローン番号871:

gacatccagatgaccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccaggcgagtca  
gggcattagcaactatttaaatgggtatcaacagaaaccagggaagccccctaagctcctgatcttctgatgcatccaatt  
tggaatcagagggtcccatcaaggttcagtgacgtggatctgggacagatttactttctccatcagcagcctgcagcct  
gaagatatgcaacatatcttctgtcaacagttatgataatttcccgtagacttttggccaggggaccaagctggagatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcgggtaactccag  
gagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

30

【0389】

クローン番号880:

gacatccagatgaccaggtctccatcctccctggctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcaagtca  
gacgattgccagttatgtaaattgggtatcaacagaaaccagggaagccccctaattcctgatctatgctgcatccagtt  
tgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagttctgcaacct  
gaagattttgcatcttacttctgtcaacaggttacagtttcccgtagacttttggccaggggaccaagctggatatcaa  
acgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcgggtaactccag  
gagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaagtctacgcttgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt  
gt

40

【0390】

クローン番号881:

gacatccagatgaccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcaagtca  
gacatgccagctatgtaaattgggtatcagcagaaaccagggaagccccctaagctcctgatctatgctgcatccaatt  
tgcaaagtggggtcccttcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagttctgcaacct  
gaagattttgcaacttactactgtcaacaggttacagtggtccctcggtcactttcggcggaggggaccaaggtggacat  
cacacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccccccaatcgggtaactcc  
caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta

50

cgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggag  
agtgt

【 0 3 9 1 】

クローン番号 8 8 4 :

gacatccagatgaccagtgctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacccatcacttgccgggtcaagtc  
gaccattagcgtctttttaaattgggtatcagcagaaaccagggaaagcccttaagctcctgatctatgccgcatccagtt  
tgacagtgccgtcccatcaagggttcagtgccagtggtatctgggacagatttctctcaccatcagcagtgctgcaacct  
gaagattctgcaacttactactgtcaagagagtttcagtagctcaactttcggcggagggaccaagggtggagatcaaagc  
aactgtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcc  
tgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataaacgccctccaatcgggtaactcccaggag  
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa  
acacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

10

【 0 3 9 2 】

クローン番号 8 8 6 :

gaaattgtaatgacacagtgctccagccacccctgtctgtgtctccaggggaaacagccacccctctcctgcaggggcagtc  
gagtgtagcagcaacttagcctggtagcaataaaccctggccaggctcccaggctcctcatccatagtgcatccacca  
gggccactgggatcccagccagggttcagtgccagtggtctgggacagagttcactctcaccataagcagcctgcagtgct  
gaagattttgcagtttattactgtcagcagtatataatgtggcctccctggacgttcggccaagggaccaagggtggaaat  
caaacgaactgtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgt  
tgtgcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataaacgccctccaatcgggtaactcc  
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagacta  
cgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggag  
agtgt

20

【 0 3 9 3 】

クローン番号 8 8 8 :

gatattgtgatgaccagtgctccactctccctgcccgtcacccttgagcgccggcctccatctcctgcagggtctagtca  
gagcctcctgcgtactaatggatacaactatttggtatggtagcctgcagaagccagggcagtgctccacagctcctgatct  
atttgggttctattcgggctccgggtccctgacagggttcagtgccagtggtcaggcacagattttacactgaaaatc  
agcagagtggaggctgaggatgttgggtttattactgcatgcaatctctacaaacttcgatcaccttcggccaagggac  
acgactggagattaaacgaactgtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa  
ctgcctctgttgtgtgcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataaacgccctcca  
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgag  
caaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagct  
tcaacaggggagagtgt

30

【 0 3 9 4 】

クローン番号 8 9 4 :

gaaattgtaatgacacagtgctccagccacccctgtctgtgtctccgggggaaagagccacccctctcctgcagggttagtca  
gagtggtggaacaacttagcctggtagcagagacctggccaggctcccagactcctcatctatggtgcgtccacca  
gggccactgggtatcccagccagggttcagtgccagtggtctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagtgct  
gaggattttgcagtttattactgtcagcagtatgataagtgccctgagacgttcggccaggggaccaagggtggacatcaa  
gcgaactgtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt  
gcctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataaacgccctccaatcgggtaactcccag  
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacga  
gaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagt  
gt

40

【 0 3 9 5 】

上記で考察された 4 4 個のクローンの全てにおいて、コードされた抗体は、同一の定常  
I g G 重鎖を含み、それらは、以下のアミノ酸配列を有する（配列番号 1 7 8）：

SASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN

50

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY  
TQKSLSLSPGK

【 0 3 9 6 】

この重鎖をコードするゲノム配列は、以下の核酸配列を有する（配列番号：177）：

【 表 8 】

aagtccctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcacctctccaagaacacctctgggggacagcgccctgggctgctg  
gtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtatcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgacacaccttccgggtgtccta  
cagtcctcaggactctactccctcagcagcggtgtgacggtgacctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatc  
acaagcccaacacaccaaggtgagacaagagagttggtgagaggccagcacagggagggaggggtgtgctggaagccaggct  
cagcgctcctgctggagcgcacccggctatgcagtcacagtcaggggcagcaaggcaggccccgtgtgctcttaccgggagggcc  
tctgcccgcctcatgctcagggagaggggtcttctggttttcccaggctctgggcaggcacaggctaggtgccctaaccac  
ggccctgcacacaaaggggaggtgtggtcagacctgccaagagccatccgggaggacccctgcccctgacctagccac  
cccaaaggccaaactctccactccctcagctcgacaccttctctctccagattccagtaactccaatcttctctgagagccca  
aatcttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccaggtgaagccagccaggcctcgccctccagctcaaggcgaggacaggtgc  
cctagagtagcctgcatccagggacagggcccgaggggtgtgacacgtccacctccatcttctctcagcacctgaactcctgggg  
ggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgattctccggacccctgaggtcacatgctggtgtgagcg  
tgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggagcggtggaggtgcataatgccaagacaaagccggggagg  
agcagtacaacagcagctaccgtgtgtgagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaag  
gtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggtgggacccgtgggtgagggccacatg  
gacagaggccgggtcgggccacccctgtgacctgagagtgaccgctgtaccaacctgttcctacagggcagccccgagaaccaca  
ggtgtacacctgccccatcccgaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatccagcg  
acatgccctggagtgaggaagcaatgggcagccggaggaactacaagaccacgctcccggtgctgactccgacggctcctt  
cttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgacagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgagaggtctgca  
caaccactacacgcagaagagcctctcctgtccccgggtaatga

10

20

【 0 3 9 7 】

この配列において、エクソンは二重下線により示される。さらに、最初のSerをコードするヌクレオチドaggt（ボールド体下線）は、IgG発現ベクターにおいて、可変重鎖部位をコードするXhoIで消化されたPCR産物のXhoIで消化された発現ベクターへの導入の結果として作成される。

30

【 0 3 9 8 】

上に記載されるV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードするペアーは、ELISAおよび/またはFLISAにおける様々な抗原およびペプチドに対する結合特異性、エピトープマッピング、抗原多様性、ならびに配列多様性により選択された。誤りが見つかった場合、選択された同種V-遺伝子ペアーをクローン修復（実施例1、セクションf）にかけた。各々の発現構築物を、CHO-FlpIn受容細胞株（Invitrogen）へのFlp-リコンビナーゼを発現するプラスミドを用いて共トランスフェクトし、次いで、組み込み体の抗生物質選択を行った。トランスフェクション、選択、および無血清培地への適応を、実施例1、セクションg-1およびg-2に記載されるごとく行った。

40

【 0 3 9 9 】

各抗体を産生する細胞株の細胞バンクを作成するために、安定的にトランスフェクトされ、無血清の懸濁培地が適応された個々の発現細胞株を複数のアンプルで凍結保存した。

【 実施例 3 】

【 0 4 0 0 】

インビトロ中和実験を、単一抗体クローンおよび精製された抗体の組み合わせの両方で行った。以下に記載される全ての抗体混合物は、本発明の各抗-RSV抗体の多くからなり、それらを等量の異なる抗体を用いた混合物中に混合させた。

50

## 【 0 4 0 1 】

## 単一抗体のテスト

最初に、各抗体の中和活性を、実施例 1、セクション j - 2 で上に記載されるごとく、R S V サブタイプ A および B 株に対する補体の存在下における P R N T で調べた。多くの精製抗体の  $EC_{50}$  値を表 7 に示す。興味深いことに、ほとんどの抗 - F 抗体が各々ウイルス中和活性を示した一方、 $EC_{50}$  は抗 - R S V タンパク質 G 抗体の大半で測定されなかった。このことは、これらの抗体が各々、ウイルスを中和することができないことを示す。空欄は、まだ解析を行っていないことを示す。ND は、 $EC_{50}$  値が非常に低いか、もしくは中和活性を欠失しているため、P R N T で測定できなかったことを示す。

## 【 0 4 0 2 】

表 7 : R S V サブタイプ A および B に対する精製された抗 - R S V タンパク質 F およびタンパク質 G 抗体の  $EC_{50}$  値

【表 9】

クローン	抗原特異性	$EC_{50}$ 値( $\mu$ g/ml)	
		サブタイプ A	サブタイプ B
793	G	2.52	
800	F	0.15	0.16
810	F	0.06	0.14
816	G	ND	
818	F	1.86	0.21
819	F	0.18	
824	F	0.03	0.02
825	F	0.12	0.04
827	F	0.16	0.10
831	F	0.08	1.66
853	G	1.49	
855	G	6.35	ND
856	G	ND	
858	F	ND	
868	G	ND	
880	F	0.38	0.40
888	G	0.14	
894	F	0.08	0.07

## 【 0 4 0 3 】

## 抗 - F 抗体の混合物

サブタイプ A および B の R S V 株を中和する抗 - R S V タンパク質 F 抗体の混合物の能力を、パリビズマブ（抗 - F 抗体についても）を用いて得られた中和効果と比較した。中和能力を、実施例 1、セクション j に記載されるごとくマイクロ中和試験または P R N T を用いて測定した。最初の実験では、5 個および 11 個の異なる抗 - F 抗体を含む 2 つの抗体混合物、抗 - F ( I ) および抗 - F ( I I ) を各々、マイクロ中和試験を用いてパリビズマブと比較した。抗 - F ( I ) は、クローン 810、818、819、825 および 827 から得られる抗体からなる。抗体 810 および 819 は、抗原部位 A / I I に結合し、抗体 818 は、部位 B / I または F 1 に、抗体 825 は、部位 A および C と重複する複合エピトープに結合し、ならびに抗体 827 は、別の複合エピトープに結合する（表 5 を参照）。抗 - F ( I I ) は、クローン 735、800、810、818、819、825、827、863、880、884 および 894 から得られる抗体からなる。抗 - F ( I I ) は、所定の抗原部位のいずれかに対する複数の結合部位を含む：抗体 810、819 および 863 は A / I I に結合し、抗体 800 および 818 は F 1（または B / I）に

結合し、抗体 8 2 7 および 8 2 5 は、上に記載される複合エピトープに、抗体 7 3 5 および 8 9 4 は、未知のクラスター（UC）I に属し、抗体 8 8 0 は、UC II に、ならびに 8 8 4 は、別のいまだ未知のエピトープに結合する（表 5 を参照）。図 5 に示されるごとく、組成物抗 - F（I）および F（II）の両方は、両サブタイプの RSV 株の中和に関してパリビズマブよりより強力である。

#### 【0404】

図 5 はまた、5 個の抗体（抗 - F（I））の組み合わせが 11 個の抗体（抗 - F（II））の組み合わせより強力であることが示唆されることを示す。抗 - F（I）混合物は、これまで明確にされてきた異なるエピトープ特異性のうちで最も強力な個々の中和抗体のいくつかを含む。抗 - F（II）混合物は、同一の 5 個の極めて強力な抗体を含むが、それはまた、所定のエピトープのいくつかに対するさらなる結合部位を含み、含まれた抗体はまた、それら自身におけるより広い範囲の中和活性を示す。それゆえ、極めて強力な抗体の活性は、F タンパク質における中和エピトープへの結合による競合のため、抗 - F（II）組み合わせで希釈される可能性がある。しかしながら、各々の抗体に関連する中和効果以外の効果、例えば、食作用の増加、抗体依存性細胞障害活性（ADCC）の上昇、抗炎症効果、補体活性、およびエスケープ変異体が作成される可能性の低下が可能性として存在することから、インビボを考慮に入れると、この結果は、5 個の抗体混合物がインビボで用いられる際に 11 個の抗体混合物よりも良好であるという指標として解釈されるべきではない。

10

20

#### 【0405】

この最初の実験および補体の存在下で極めて強力である F - 特異的な抗体クローンの多くの組み合わせが同定されたことから、インビトロアッセイおよびクローンの組み合わせの両方が精査された。さらなる抗 - F 抗体組成物の  $EC_{50}$  値（ブランク数の 50% 減少を引き起こすのに必要とされる有効濃度）として表される中和能力を表 8 に記載する。組成物中のクローンの正確な数によらず、F - 特異的な抗体のテストされた組み合わせの大半は、RSV 株サブタイプ A の中和に関してパリビズマブよりも強力である。

#### 【0406】

##### 抗 - G 抗体の混合物

サブタイプ A の RSV 株を中和する抗 - G 抗体混合物の能力を、実施例 1、セクション j - 2 に記載されるように、PRNT を用いてテストした。テストした抗 - G 抗体組成物からの  $EC_{50}$  値を表 8 に記載する。2 つの抗 - G 抗体の組成物のほとんどは、個々の抗 - G 抗体と比較してウイルスを中和する能力の顕著な上昇を示さなかった。2 または 3 つの抗 - G 抗体のうちのいくつかの組み合わせは、濃度にかかわらず、決して 100% のウイルス中和率には到達しなかった。しかしながら、さらなる抗 - G 抗体を組成物に添加すると能力が上昇し、それは、可能性として抗 - G 抗体間における相乗的な中和効果を示唆する。図 7 は、複数の G - 特異的なクローンを組み合わせた際の能力の上昇の一例を示す。

30

#### 【0407】

##### 抗 - F および抗 - G 抗体の混合物

RSV サブタイプ B 株を中和する抗 - RSV タンパク質 F およびタンパク質 G 抗体混合物の能力を、パリビズマブを用いて得られる中和効果と比較した。実施例 1、セクション j - 4 に記載するときマイクロ中和融合阻害アッセイまたはブランク減少中和アッセイ（実施例 1、セクション j - 2）のどちらかを用いて中和能力を測定した。

40

#### 【0408】

最初に、2 つの抗体混合物、抗 - F（I）G および抗 - F（II）G の中和活性をマイクロ中和融合阻害アッセイで測定した。これらの混合物の各々は、上に記載される組成物抗 - F（I）および抗 - F（II）の抗 - F 抗体ならびにクローン 7 9 3、7 9 6、8 3 8、8 4 1、8 5 6 および 8 8 8 から得られる抗 - G 抗体を含み、ここで、抗体 7 9 3、7 9 6、8 3 8 は G タンパク質の保存領域に結合し、8 4 1、9 5 6 は RSV サブタイプ A の GCRR に結合し、および 8 8 8 は両方のサブタイプの GCRR に結合する（表 5 を

50

参照)。図6に示されるように、両組成物抗-F(I)GおよびF(II)Gは、RSVB1株の中和に関してパリビズマブよりも強力である。さらに、2つの混合物の中和活性はおよそ同等である。それゆえ、抗-F抗体を多くのタンパク質G-特異的クローンと組み合わせると、2つの抗-F抗体混合物間で以前観察された能力の差異は減少するように思われる。このことは、RSVにおける広い範囲の抗原およびエピトープを認識する抗体を組み合わせると、一般的に中和活性が増加することを示唆しうる。

#### 【0409】

その後、抗-Fおよび抗-G抗体の両方の多くの異なる組み合わせを、補体の存在または非存在下におけるPRNTを用いてテストした。活性な補体の存在下でこのアッセイにより得られる $EC_{50}$ 値を表8に表す。抗-Fおよび抗-G抗体の両方を含む全てのテストされた組成物はRSVサブタイプAを中和し、これらの大半はパリビズマブよりより強力である。

#### 【0410】

結果はまた、本発明の抗体クローニング技術を用いてヒトドナーから自然に高い親和性を有する抗体を繰り返し得られうることを示す。

#### 【0411】

表8：RSVサブタイプAおよびBに対する抗-RSV抗体の組み合わせの $EC_{50}$ 値。空欄は、解析がまだ行われていないことを示す。NDは、 $EC_{50}$ 値が非常に低いか、もしくは中和活性を欠失しているため、PRNTにおいて測定できなかったことを示す。

#### 【表10】

組成物番号	組成物中の抗体	EC <sub>50</sub> 値 (μg/ml)	
		サブタイプA	サブタイプB
1	810, 818, 819, 825, 827	0.19	0.38
2	810, 818, 819, 825, 827, 831, 858, 863, 884, 894, 793, 796, 816, 838, 853, 856, 859, 888	0.34	
3	810, 818, 825, 827, 884, 886, 793, 853, 868, 888	0.30	
4	810, 818, 825, 827, 831, 858, 884, 886, 793, 796, 816, 853, 856, 868, 888	0.19	
5	810, 818, 825, 827, 831, 858, 884, 886, 793, 853, 868, 888	0.21	
6	810, 819, 825, 827, 831, 793, 853, 856, 858, 868	0.20	
7	810, 811, 817, 819, 825, 827, 831, 838, 853, 856, 858, 859, 863, 868	0.18	
8	800, 801, 811, 838, 853, 855, 859, 861, 880, 894, 736, 795, 796, 799	ND	
9	810, 818, 825	0.14	0.29
10	810, 818, 819, 825, 827, 884	0.21	0.42
11	810, 818, 819, 825, 827, 884, 886	0.15	0.29
12	793, 816, 853, 856	0.06	
13	793, 816, 853, 855, 856	0.03	
14	793, 868, 888, 853, 856	0.34	

【表 1 1】

組成物番号	組成物中の抗体	E C 5 0 値 (μg/ml)	
		サブタイプ A	サブタイプ B
15	793, 796, 818, 816, 838, 853, 855, 856, 859, 868, 888	0.11	
16	810, 818, 827	0.11	0.21
17	810, 818, 825, 827, 858, 886	0.10	0.16
18	810, 818, 825, 827, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856	0.04	0.15
19	818, 825, 827, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856	0.06	
20	810, 818, 819, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856	0.10	
21	810, 793, 816, 853, 855, 856	0.04	
22	818, 825, 827, 831, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856	0.06	
23	818, 825, 827, 831, 858, 819, 793, 816, 853, 855, 856	0.06	
24	818, 827, 831, 858, 819, 793, 816, 853, 855, 856	0.06	

10

20



【表 1 2】

25	810, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856	0.07	
26	831, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856	0.08	
27	831, 818, 819, 824, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856	0.05	
28	810, 818, 824	0.06	0.04
29	810, 824	0.05	
30	818, 824	0.04	
31	810, 818	0.11	
32	824, 793, 816, 853, 855, 856	0.05	
33	810, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 894, 793, 816, 853, 855, 856	0.07	0.03
34	810, 818, 819, 824, 825, 827, 894, 793, 816, 853, 855, 856	0.07	
35	793, 816	5.94	
36	855, 856	ND	
37	793, 856	ND	
38	793, 853	2.35	
39	853, 856	0.21	
40	793, 853, 856	2.84	
41	793, 816, 853	1.97	
42	853, 855, 856	0.25	
43	793, 816, 853, 856	0.45	
44	793, 853, 855	0.26	
45	793, 853, 855, 856	0.16	
46	816, 853, 855, 856	0.07	
47	816, 856	0.06	
48	816, 853	0.75	
49	816, 853, 856	0.07	
50	810, 818, 824, 816	0.09	
51	810, 818, 824, 853	0.11	

10

20

30

【表 1 3】

組成物番号	組成物中の抗体	E C 5 0 値 (μg/ml)	
		サブタイプ A	サブタイプ B
52	810, 818, 824, 856	0.10	
53	810, 818, 824, 816, 853	0.09	
54	810, 818, 824, 816, 856	0.05	
55	810, 818, 824, 853, 856	0.08	
56	810, 818, 824, 816, 853, 856	0.05	0.03
	パリビズマブ	0.14	

40

## 【実施例 4】

## 【0 4 1 2】

50

### R S V 感染マウス肺におけるウイルス負荷の減少

R S V 感染に対する本発明の精製抗体の組み合わせのインビボ保護能力を、実施例 1、セクション k - 1 に記載されるように、B A L B / c マウスモデルにおいて示した (Taylor et al. 1984. Immunology 52, 137-142; Mejias, et al. 2005. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4700-4707)。表 9 において、本発明の異なる抗体クローンの等量からなる 3 つの異なる抗 - R S V r p A b を用いる実験からのデータを、同一の実験の未感染コントロールマウスおよびプラセボ (P B S) 処理マウスからのデータと比較して表す。各処理群は 5 匹ずつのマウスを含み、このモデルにおいてウイルス複製のだいたいのピークである感染 5 日後にサンプルを得た。表 9 に示されるように、予防的に投与されると、r p A b 組み合わせは、少なくとも投与量の順にウイルス負荷を有効に減少させる。コピー数を平均 ± 標準偏差として表す。2 つの処理群では、コピー数はこのアッセイの検出限界点またはそれ以下、すなわち、 $3.8 \log_{10} \text{RNA コピー/ml}$  であった。

10

#### 【0413】

表 9：マウス肺における予防および R S V 誘発後のウイルス負荷

【表 14】

処理群	RT-PCRによるウイルス負荷 (log10 RNA コピー/ml)	新規データ
未感染	陰性	
PBS	5.14 ± 0.09	4.25
抗-RSV rpAb 18 (50 mg/kg)	ND	
抗-RSV rpAb 18 (5 mg/kg)	4.61 ± 0.22	3.64
抗-RSV rpAb 9 (50 mg/kg) 小 F Hi	ND	
抗-RSV rpAb 9 (5 mg/kg) 小 F Lo	4.74 ± 0.38	3.82
抗-RSV rpAb 17 (50 mg/kg) 大 F Hi	4.41 ± 0.14	3.04
抗-RSV rpAb 17 (5 mg/kg) 大 F Lo	4.69 ± 0.05	3.90

20

#### 【0414】

R S V 感染マウスに由来する肺サンプルにおけるサイトカインおよびケモカインレベル  
試験的なマウス予防研究に由来する肺サンプルを市販されている複合的な免疫アッセイを用いて解析することにより、実施例 1、セクション k - 1 に記載されるように、R S V 感染および r p A b 18 による抗体予防後における異なるサイトカインおよびケモカインのレベルを調べた (表 8)。未感染および未処理マウスからのサンプルについても、B A L B / c マウスの基準データを得るために解析した。感染 5 日後に全てのサンプルを得た。データを平均 ± 標準偏差として表す。

30

#### 【0415】

解析では、ヒトとマウスの両方において、R S V 感染、次いで炎症応答の重要なマーカーとして示される多くのサイトカインおよびケモカインは、インターフェロン (I F N) - 、インターロイキン (I L) - 1、I L - 4、I L - 6、I L - 8 (K C / G R O)、I L - 10、マクロファージ炎症タンパク質 (M I P) - 1、発現および分泌標準 T 細胞活性調整 (R A N T E S、C C L 5) および腫瘍壊死因子 (T N F) - を含み、それらサイトカインおよびケモカイン数のレベルがプラセボ処理マウスの肺で上昇する一方、約  $50 \text{ mg/kg}$  の r p A b で処理したマウスの肺は、未感染のコントロールマウスとほぼ同一のレベルであることが示された。同様の結果を他の抗 - R S V r p A b の組み合わせで得た。マウスは I L - 8 の自明なホモログを有していないが、K C と呼ばれるヒト G R O に機能的な相同性 (I L - 8 と同様な機能) を有することは注目すべきである。

40

#### 【0416】

炎症応答の動力学および抗体予防の用量応答効果は調査中である。

#### 【0417】

表 10：R S V 感染マウスに由来する肺組織におけるサイトカインおよびケモカインのレベル

50

【表 15】

組織サンプル のレベル (pg/ml)	未感染の コントロールマウ ス	プラセボ処理マウス	抗-RSV rpAb処理マウス
IL-1 $\beta$	270 $\pm$ 71	570 $\pm$ 100	310 $\pm$ 140
IL-4	7.7 $\pm$ 4.7	26 $\pm$ 4.6	14 $\pm$ 8.5
IL-6	6.4 $\pm$ 2.6	22 $\pm$ 12	8.2 $\pm$ 3.8
IL-10	120 $\pm$ 17	320 $\pm$ 58	170 $\pm$ 41
IFN- $\gamma$	20 $\pm$ 7.6	420 $\pm$ 88	81 $\pm$ 72
KC/GRO $\alpha$ (IL-8)	51 $\pm$ 38	290 $\pm$ 83	94 $\pm$ 99
MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	39 $\pm$ 16	940 $\pm$ 170	160 $\pm$ 110
RANTES (CCL5)	60 $\pm$ 28	380 $\pm$ 32	140 $\pm$ 66
TNF- $\alpha$	18 $\pm$ 6.1	95 $\pm$ 10	38 $\pm$ 25

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0418】

【図1】(A)プロトタイプ株、Long (サブタイプA)および18537 (サブタイプB)由来の全体のGタンパク質のアミノ酸配列の並列比較。シグナル/膜貫通領域を点線で囲う。Cane et al 1991 J.Gen.Virol 72:2091-2096により同定されるようなアミノ酸101~133および208~299の間の2つの可変領域を下線で特定する。Gタンパク質の中心フラグメントはE.coliで融合タンパク質として発現され、黒色で囲う。2つのアミノ酸配列を、配列番号:711 (サブタイプA)および配列番号:712 (サブタイプB)に記載する。(B)(A)に示される中心フラグメントの並列比較。13-a a保存領域およびGタンパク質システインリッチドメイン(GCRR)の局在を角括弧で示す。(両サブタイプ間で同一の)GCRRにおけるジスルフィド架橋を四角角括弧で示す。2つのアミノ酸配列を配列番号:713 (サブタイプA)および配列番号:714 (サブタイプB)に記載する。

20

【図2】多重重複伸長RT-PCR(A)およびクローン化工程(B)の模式的概要。(A)V<sub>H</sub>およびV<sub>K</sub>遺伝子ファミリー各々に特異的な2組のプライマー、CH+VH1-8およびVK1-6+CK1を第一のPCR工程に用いた。V<sub>H</sub>またはV<sub>K</sub>プライマー間の相同領域は重複するPCR産物を生じる。第2工程において、この産物をネステッドPCRで増幅させる。プライマーはまた、クローン化を容易にする制限酵素の認識部位を含む。(B)作成した同種の連結V<sub>H</sub>およびV<sub>K</sub>をコードするペアーをプールし、隣接するXhoIおよびNotI制限部位の使用により哺乳動物IgG発現ベクターに挿入した。次いで、全長抗体の発現を促進するために、二方向性プロモーターを連結V<sub>H</sub>およびV<sub>K</sub>をコードする配列間のAscI-NheI制限酵素部位に挿入する。用いられるPCRプライマーを平行矢印により示す。CH1:重鎖定常領域1、CL:定常領域、LC:軽鎖; Ab:抗体; P1-P2:二方向性プロモーター。

30

40

【図3】哺乳動物全長抗体発現ベクター00-Vp-530の模式図。ベクターは以下の構成要素を含む: AmpおよびAmp<sup>r</sup> = アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター。pUC開始点 = pUC複製開始点。P1 = 軽鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。P2 = 重鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。リーダーIGHV = ゲノムヒト重鎖リーダー。VH = 重鎖可変領域をコードする配列。IgG1 = ゲノム免疫グロブリンアイソタイプG1重鎖定常領域をコードする配列。ウサギ - グロブリンA = ウサギベータ - グロブリンポリA配列。カップリーダー = マウスカップリーダーをコードする配列。LC = 軽鎖をコードする配列の配列。SV40 term = サルウイルス40転写終結配列。FRT = Flp認識標的的部位。Neo = ネオマイシン耐性遺伝子。SV40 polyA = サルウイルス40ポリAシグナル配列。

50

【図４】ピアコア（Biacore）解析を用いてクローン８０１から得られた抗体（Ab 801）のエピトープ特異性の特徴付け。抗体８０１結合を、３つの抗体、９ｃ５（２）、１３３－ｈ（３）およびパリビズマブ（４）であって、各々、抗原部位Ｆ１、ＣおよびＩＩに結合する抗体を用いて、タンパク質Ｆへの結合に関する対競合（pair-wise competition）でテストした。対照の細胞は、競合しないAb 801（１）のタンパク質Ｆへの結合を示す。４つの抗体の注入時間を矢印により示す。応答を相対的共鳴単位（RU）で示す。長い両方向矢印は競合しない応答の大きさを示し、短い両方向矢印は９ｃ５で阻害された応答の大きさを示す。

【図５】図は、RSVサブタイプＡおよびＢ株のインビトロ中和の結果である。抗－Ｆ抗体混合物の希釈物を、RSV long（グラフＡ）およびRSV B1（グラフＢ）株を中和する能力についてテストした。クローン８１０、８１８、８１９、８２５および８２７から得られた抗体混合物、抗－Ｆ（Ｉ）を三角形（ ）として示し、クローン７３５、８００、８１０、８１８、８１９、８２５、８２７、８６３、８８０、８８４および８９４から得られた抗体混合物、抗－Ｆ（ＩＩ）を四角形（ ）として示す。パリビズマブをダイヤモンド（ ）として示し、アイソタイプに適合する陰性コントロール（抗－アカゲザルＤ）抗体を円（ ）として示す。吸光度を４９０nmで測定し、RSV複製と相関関係にある。

【図６】図は、インビトロRSV融合阻害アッセイの結果である。抗体混合物の希釈物を、RSV B1株を中和する能力についてテストした。クローン８１０、８１８、８１９、８２５、８２７、７９６、８３８、８４１、８５６および８８８から得られる抗体混合物、抗－Ｆ（Ｉ）Ｇを白抜きの四角形（ ）として示し、７３５、８００、８１０、８１８、８１９、８２５、８２７、８６３、８８０、８８４、８９４、７９３、７９６、８３８、８４１、８５６および８８８から得られる抗体混合物、抗－Ｆ（ＩＩ）Ｇを、白抜きの三角形（ ）として示す。パリビズマブをダイヤモンド（ ）として示す。吸光度を４９０nmで測定し、RSV複製と相関関係にある。

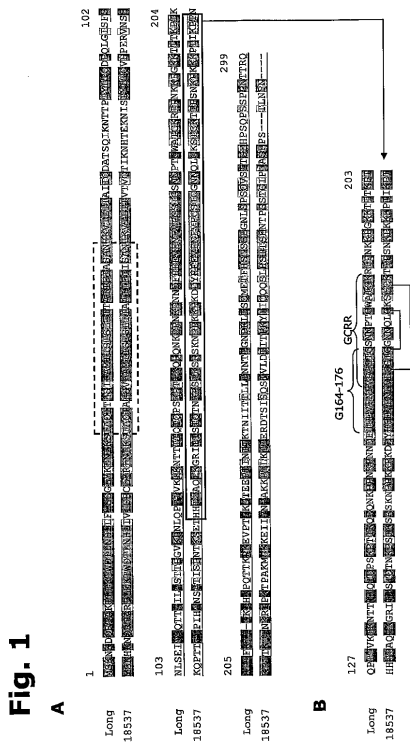
【図７】図は、活性な補体の存在下でPRNTにより測定されるごとく抗－Ｇ抗体クローンの組み合わせによるRSVのインビトロ中和からの結果である。（表８に記載される）個々の抗体組成物の希釈物を、ウサギ補体の存在下におけるRSV株Longとインキュベートし、その後、HEp-2細胞を感染させた。インキュベーション２４時間後、感染の程度を、RSV特異的血小板の免疫検出を用いて検出した。抗－RSV rpAb13を白抜き三角形（ ）として、抗－RSV rpAb35を三角形（ ）として、抗－RSV rpAb36を四角形（ ）として、抗－RSV rpAb41を円（ ）として、ならびに抗－RSV rpAb45を白抜き四角形（ ）として示す。データをコントロール±SDと比較して％感染として表す。

10

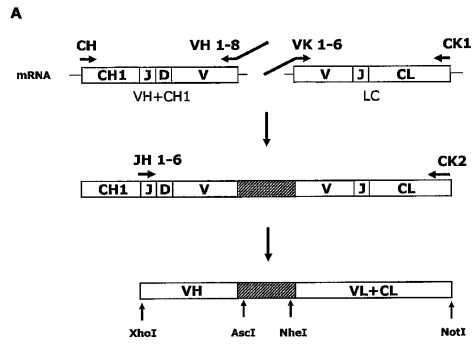
20

30

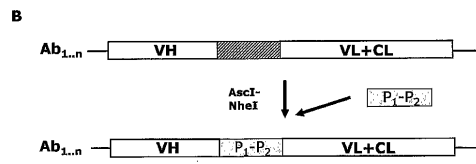
【 図 1 】



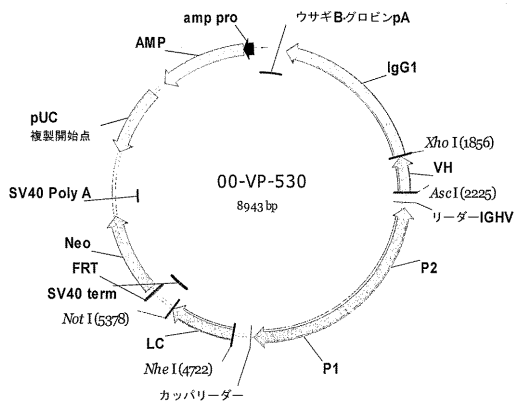
【 図 2 A 】



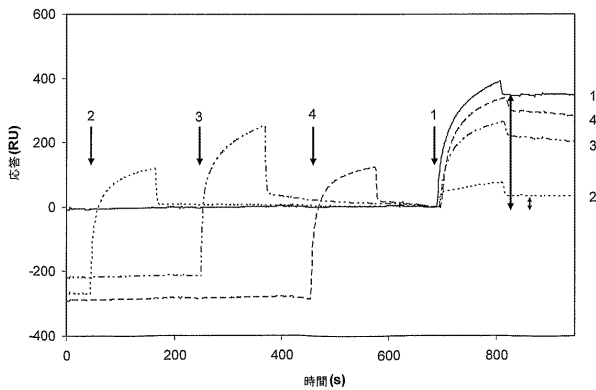
【 図 2 B 】



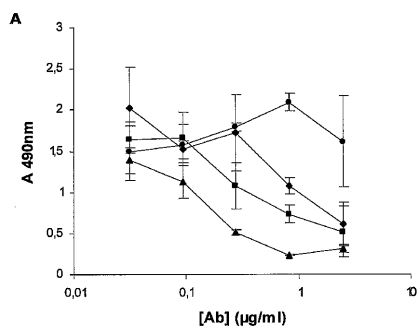
【 図 3 】



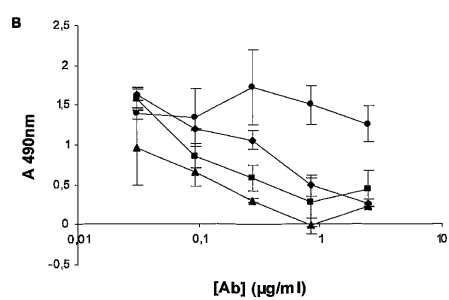
【 図 4 】



【 図 5 A 】

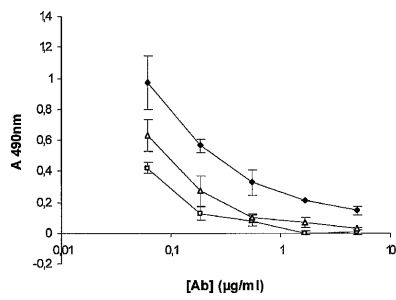


【 図 5 B 】

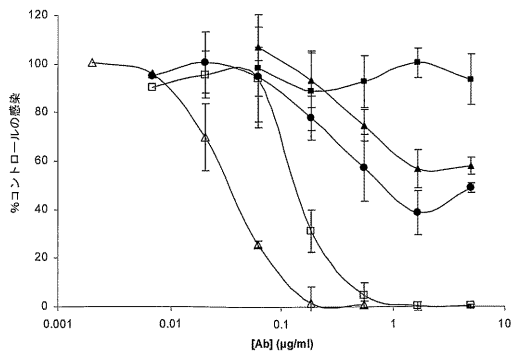


【 図 6 】

Fig. 6



【 図 7 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成20年11月10日 (2008.11.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2009528828000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/10 A61K39/42 A61P31/14		International application No PCT/DK2007/000113
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 A61P 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MCGILL A ET AL: "Analysis of the binding of monoclonal and polyclonal antibodies to the glycoproteins of antigenic variants of human respiratory syncytial virus by surface plasmon resonance"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 297, no. 1-2, February 2005 (2005-02), pages 143-152, XP004793114</p> <p>ISSN: 0022-1759</p> <p>page 145</p> <p>pages 149-150; table 5</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-10,12, 24-26, 38,44-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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  30 July 2007		Date of mailing of the international search report  09/08/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Domingues, Helena

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2007/000113

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RESPIGAM PRESCRIPTION INFORMATION:[Online] May 2000 (2000-05), XP002444042 Retrieved from the Internet: URL:http://www.medimmune.com/pdf/products/ respigam_pi.pdf> [retrieved on 2007-07-25] the whole document	1-8, 10-12, 14-22, 27-37, 39-50
X	SASTRE PATRICIA ET AL: "Comparison of affinity chromatography and adsorption to vaccinia virus recombinant infected cells for depletion of antibodies directed against respiratory syncytial virus glycoproteins present in a human immunoglobulin preparation" JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 76, no. 2, June 2005 (2005-06), pages 248-255, XP002444395 ISSN: 0146-6615 page 250 page 253	1-8, 10-12, 14-22, 27-37, 39-50
Y	EP 1 516 929 A (SYMPHOGEN AS [DK]) 23 March 2005 (2005-03-23) page 13; example 11	1-50
Y	WO 2004/061104 A (SYMPHOGEN AS [DK]; HAURUM JOHN S [DK]; WIBERG FINN C [DK]; COLJEE VINC) 22 July 2004 (2004-07-22) the whole document	1-50
Y	MEJFAS ASUNCION ET AL: "Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: Time versus potency" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 49, no. 11, November 2005 (2005-11), pages 4700-4707, XP002444035 ISSN: 0066-4804 the whole document	1-50
Y,P	BREGENHOLT SOREN ET AL: "Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 12, no. 16, 2006, pages 2007-2015, XP008080864 ISSN: 1381-6128 the whole document	1-50

-/-



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2007/000113

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	HAURUM ET AL: "Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 11, no. 13-14, July 2006 (2006-07), pages 655-660, XP005511756 ISSN: 1359-6446 the whole document	1-50
E	WO 2007/065433 A (SYMPHOGEN AS [DK]; JENSEN ALLAN [DK]; LANTTO JOHAN [SE]; HANSEN MARGIT) 14 June 2007 (2007-06-14) abstract; examples 1-3	1-50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2007/000113

**Box 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:  
  
Although claims 15-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2007/000113

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1516929	A	23-03-2005	AU 2004286019 A1	12-05-2005
			BR PI0414282 A	21-11-2006
			CA 2539576 A1	12-05-2005
			WO 2005042774 A2	12-05-2005
			EP 1670912 A2	21-06-2006
			IS 8415 A	12-04-2006
			JP 2007505611 T	15-03-2007
			KR 20060092218 A	22-08-2006
WO 2004061104	A	22-07-2004	AT 338816 T	15-09-2006
			AU 2004203727 A1	22-07-2004
			BR 0406678 A	20-12-2005
			CA 2512647 A1	22-07-2004
			EP 1583830 A2	12-10-2005
			HK 1078896 A1	26-01-2007
			JP 2006515520 T	01-06-2006
			KR 20050101538 A	24-10-2005
			MX PA05006724 A	08-09-2005
			NZ 541458 A	28-04-2006
WO 2007065433	A	14-06-2007	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00
			A 6 1 K	39/395
				A
				D

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

(72)発明者 ヨハン・ラント

スウェーデン、エスエー - 2 2 7 3 6 ルンド、ブリッガレガータン 4 番

(72)発明者 ルシーラ・ステイナー

デンマーク、デーコー - 2 9 7 0 ヘルスホルム、ステンハーヴェヴァイ 1 2 ペー番

(72)発明者 クラウス・ケーフェーズ

デンマーク、デーコー - 2 3 0 0 コペンハーゲン・エス、ルエズ・ランガールズスヴァイ 2 3、5  
チル・ヘイレ

(72)発明者 ラース・エス・ニールセン

デンマーク、デーコー - 2 9 9 0 ニヴォ、ニヴォパルク 5 8 番

(72)発明者 ヘンリエッテ・シェーニング・ニールセン

デンマーク、デーコー - 3 4 0 0 ヴェアレセ、ラウネフースパーケン 3 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA51 BA61 CA01 GA11 HA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44

4C085 AA13

4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA22 FA74