

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7644087号
(P7644087)

(45)発行日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(24)登録日 令和7年3月3日(2025.3.3)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14 Z N A
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	39/395 S
A 6 1 K	31/711(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
請求項の数 17 (全182頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-505261(P2022-505261)	(73)特許権者	515178513
(86)(22)出願日	令和2年7月24日(2020.7.24)		ヴァンダービルト ユニバーシティ
(65)公表番号	特表2022-541652(P2022-541652 A)		アメリカ合衆国, テネシー州 3 7 2 4
(43)公表日	令和4年9月26日(2022.9.26)		0, ナッシュビル, ウェスト エンド ア
(86)国際出願番号	PCT/US2020/043415		ベニュー 2 2 0 1, カークランドホール
(87)国際公開番号	WO2021/021605		3 0 5, センター フォー テクノロジー
(87)国際公開日	令和3年2月4日(2021.2.4)		トランスファー アンド コマーシャライ
審査請求日	令和5年7月19日(2023.7.19)	(74)代理人	ゼーション
(31)優先権主張番号	63/047,330		100102978
(32)優先日	令和2年7月2日(2020.7.2)	(74)代理人	弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		100160923
(31)優先権主張番号	62/878,955	(74)代理人	弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和1年7月26日(2019.7.26)		100119507
最終頁に続く		(74)代理人	弁理士 刑部 俊
			100142929
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 エンテロウイルスD 6 8に対するヒトモノクローナル抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
エンテロウイルスD68に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、
(i)それぞれSEQ ID NO: 314、315および316に対応する重鎖CDR1、CDR2およびCD R3の配列、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 506、507および508に対応する軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の配列；または
(ii)それぞれSEQ ID NO: 413、414および415に対応する重鎖CDR1、CDR2およびC DR3の配列、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 605、606および607に対応する軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3の配列
を特徴とする、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項2】
前記抗体またはその抗原結合断片が、
(i) それぞれSEQ ID NO: 40および39、もしくはそれぞれSEQ ID NO: 106および105 に対応する、軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる；あるいは
(ii) それぞれSEQ ID NO: 168および167、もしくはそれぞれSEQ ID NO: 234および 233に対応する、軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、
請求項1記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。
【請求項3】
前記抗原結合断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F（ab'）₂断片

またはFv断片である、請求項1または2記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

前記抗体が、キメラ抗体であるか、または二重特異性抗体である、請求項1または2記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項5】

前記抗体が、

IgGであるか、または、

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素学的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体またはその抗原結合断片である、

請求項1～4のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項6】

前記抗体またはその抗原結合断片が、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである、請求項1～5のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項7】

エンテロウイルスD68（EV-D68）に感染した対象を治療するか、またはEV-D68に罹患するリスクがある対象の感染の可能性を低減するための薬学的組成物であって、請求項1～4のいずれか一項記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項1～4のいずれか一項記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列を含むポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドを含むベクターを含む、前記薬学的組成物。

【請求項8】

(i) 前記薬学的組成物が、第2の療法と組み合わせて用いられ、

(ii) 前記薬学的組成物が、感染前または感染後に投与され、

(iii) 前記治療が、肺感染および/もしくは神経感染を治療するか、または治療が、肺感染および/もしくは神経感染を低減し、かつ/あるいは

(iv) 前記抗体またはその抗原結合断片が、投与によって、または前記モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列を含むポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドを含むベクターによる遺伝的送達によって前記対象に送達される、

請求項7記載の薬学的組成物。

【請求項9】

前記第2の療法が、抗ウイルス療法または抗炎症療法である、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

対象のエンテロウイルスD68（EV-D68）感染を検出するインビトロ方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 前記対象から得られた試料と、請求項1～3のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片とを接触させる工程；ならびに

(b) 前記抗体またはその抗原結合断片を前記試料中のEV-D68抗原に結合させることによって、前記試料中のEV-D68を検出する工程。

【請求項11】

(i) 前記試料が体液、血液、痰、涙液、唾液、粘膜もしくは血清、精液、子宮頸部分泌物もしくは膺分泌物、羊水、胎盤組織、尿、滲出液、濾出液、呼吸器飛沫もしくはエアロゾル、組織擦過物または糞便であり、

(ii) 検出がELISA、RIA、ラテラルフローアッセイまたはウエスタンブロットを含み、かつ/あるいは

前記方法が、工程（a）および（b）を再度行い、第1のアッセイと比較してEV-D68抗原レベルの変化を決定する工程をさらに含む、

請求項10記載の方法。

【請求項12】

請求項1～6のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を発現する操作された細胞。

【請求項13】

（a）請求項1～6のいずれか一項記載の1つまたは複数のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、あるいは

（b）請求項1～5のいずれか一項記載の第1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含む1つまたは複数の発現ベクター

を含む、ワクチン製剤。

【請求項14】

（i）前記発現ベクターが、シンドビスウイルスベクターまたはVEEベクターである、

（ii）前記ワクチン製剤が、針注射、ジェット注射またはエレクトロポレーションによる送達のために製剤化されている、

（iii）前記発現ベクターが、シンドビスウイルスベクターまたはVEEベクターであり、かつ前記ワクチン製剤が、針注射、ジェット注射またはエレクトロポレーションによる送達のために製剤化されている、あるいは

（iv）前記ワクチン製剤が、第2のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする1つまたは複数の発現ベクターをさらに含む、

請求項13記載のワクチン製剤。

【請求項15】

前記第2のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、請求項1～5のいずれか一項記載の別個の抗体またはその抗原結合断片である、請求項14記載のワクチン製剤。

【請求項16】

エンテロウイルスD68に感染したか、エンテロウイルスD68に感染するリスクがある妊娠中の対象の胎盤および/または胎児の健康を保護するための薬学的組成物であって、請求項1～5のいずれか一項記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項1～5のいずれか一項記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列を含むポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドを含むベクターを含む、前記薬学的組成物。

【請求項17】

（i）前記薬学的組成物が、感染前または感染後に投与され、

（ii）前記対象が、妊娠中の女性、性的に活発な女性、または不妊治療を受けている女性であり、かつ/あるいは

（iii）前記抗体またはその抗原結合断片が、投与によって、または前記抗体もしくはその抗原結合断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列を含むポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドを含むベクターによる遺伝的送達によって前記対象に送達されるか、あるいは

（iv）前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、未治療対照と比較して、胎盤のサイズを増加させるか、あるいは

（v）前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、未治療対照と比較して、胎児のウイルス量および/または病態を減少させる、

請求項16記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

優先権主張

本出願は、それぞれ2019年7月26日、2019年9月12日および2020年7月2日に出願された米国仮出願第62/878,955号、米国仮出願第62/899,503号および米国仮出願第63/047,330号の優先権の恩典を主張し、各出願の内容全体を参照により本明細書に組み入れる。

【0002】

1. 本開示の分野

本開示は、一般に、医学、感染症および免疫学の分野に関する。さらに具体的には、本開示は、エンテロウイルス (enterovirus) D68に結合するヒト抗体、ならびにそのような抗体を使用してエンテロウイルスD68感染を診断および治療する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 背景

エンテロウイルス-D68 (EV-D68) は、ピコルナウイルス (Picornaviridae) 科エンテロウイルス属のポジティブセンス一本鎖RNAウイルスである。この属内の他の一般的なヒト病原体には、ポリオウイルス (poliovirus)、エコーウイルス (echovirus)、コクサッキーウイルス (coxsackievirus)、ライノウイルス (rhinovirus)、およびエンテロウイルス-A71などの他の番号が付けられたエンテロウイルスが含まれる (Zell et al., 2017)。これらのウイルスは、構造的および遺伝的に類似しているが、新生児敗血症、心筋炎、灰白髄炎、髄膜炎、気道感染および手足口病を含む多種多様な小児疾患を引き起こす。EV-D68は、ライノウイルスと同様に、主に、酸に不安定であり、33°Cで最もよく複製する呼吸器病原体である (Oberste et al., 2004)。これらの類似性は、EV-D68の株がライノウイルス87として最初に報告されたことさえあるような類似性である (Blomqvist et al., 2002)。

【0004】

1962年のカリフォルニア州の肺炎患児における最初の同定 (Schieble et al., 1967) から世紀の変わり目にかけて、EV-D68はごく稀に検出されたのみであった (Khetsuriani et al., 2006)。それ以来、EV-D68は、主に小児の呼吸器疾患のアウトブレイクにおける世界的な検出のために、ますます重要性が増している病原体として認識されている (Xiang and Wang, 2016)。米国では、これまでに知られている最大のアウトブレイクが2014年に発生し、アラスカ州を除くすべての州にわたって1,152件の症例が確認された (Oermann et al., 2015)。軽度の上気道感染は、このウイルスを検出するために必要な特殊な検査に至る可能性が低いと、この数は、2014年のEV-D68の実際の症例数を著しく過小評価している可能性が高い。喘息患児は特に重度の感染を経験したが (Biggs et al., 2017)、1つの施設の試験から、喘息患児では、EV-D68が非EV-D68エンテロウイルス/ライノウイルス感染よりも重度ではないことが見出された (Overdahl et al., 2016)。入院患者の半数超が集中治療室に入院し、80%が酸素補充を受け、23%が非侵襲的換気が必要とし、8%が挿管および機械的換気が必要とし、1%が死亡した (Midgley et al., 2015)。

【0005】

2014年のアウトブレイクと同時に、コロラド州では、急性発症の弛緩性麻痺および脳神経機能不全を有する小児患者の小さなクラスターが認められた (Messacar et al., 2015)。この症候群は急性弛緩性脊髄炎 (AFM) と呼ばれており、典型的には、非対称性の弛緩性四肢脱力と、脊髄撮像で見られる主に灰白質の脊髄炎とを伴う灰白髄炎様疾患として定義されている (Div. of Viral Diseases, CDC, 2018)。2014年のアウトブレイク以来、AFMのさらに多くの症例およびクラスターがEV-D68と関連付けられている。現在までに、いずれの患者供給源由来のEV-D68検査も陽性である74件のAFM症例が6つの大陸にわたって特定されている (Messacar et al., 2018)。米国疾病管理予防センター (CDC) は、EV-D68をAFMの証明された原因として正式に認めていないが (Nat'l Center for Immun. Resp. Disease)、多くの専門家は、この2つの間の関係が因果的であると考え

るのに十分に説得力のある証拠の優位性を見出している (Messacar et al.2018)。世界的なアウトブレイクが継続しているため、世界保健機関の研究開発ブループリントは現在、EV-D68を主要な公衆衛生リスクとして指定している (Ann.Rev.of Diseases,2018)。
【0006】

EV-D68が最近になってようやく重要度の高い病原体として浮上してきたため、ほとんどの初期の試験では、免疫応答を特性評価するのではなく、ウイルスの発生生態を定義することに焦点が当てられていた。したがって、EV-D68に対する体液性免疫の試験は始まったばかりである。エンテロウイルス属の他のウイルスからの保護に果たす血清抗体の役割は様々である。例えば、不活化ポリオウイルスワクチンの3回投与は、血清中和抗体の100%の誘導に達し、麻痺性灰白髄炎を予防するのに80~96%有効であるが、ワクチン接種は、鼻腔または十二指腸のIgAを誘導することができないため (Sutter et al.,2018)、腸または鼻咽頭のポリオウイルス排出を完全には防止しない (Vidor et al.,2018)。ライノウイルス感染の試験では、特定の血清型のウイルスに対する体液性免疫が、数ヶ月以内のホモタイプのウイルス再感染に対して確実に防御することができないことが示されている (Howard et al.,2016)。抗体応答に関連する防御の程度におけるこれらの差は、これらのウイルスに関する異なる部位の病態、すなわち、ライノウイルスの局所的な気道感染と対比した、ポリオウイルスの最初の経腸感染後の二次的なニューロン拡散に起因する可能性が高い。EV-D68感染は気道内で疾患を引き起こす可能性があり、中枢神経系の疾患に関連しているため、防御および病因に果たす抗体の役割は複雑である可能性が高い。この役割をさらによく理解することは、EV-D68感染のためのワクチンおよび治療の開発を助けるであろう。

【発明の概要】

【0007】

概要

したがって、本開示によれば、対象のエンテロウイルスD68 (EV-D68) 感染を検出する方法であって、(a) 該対象から得られた試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした (clone-paired) 重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片とを接触させる工程、ならびに (b) 該抗体または抗体断片を該試料中のEV-D68抗原に結合させることによって、該試料中のEV-D68を検出する工程を含む方法が提供される。試料は、体液、例えば、血液、痰、涙液、唾液、粘膜または血清、精液、子宮頸部分泌物または膺分泌物、羊水、胎盤組織、尿、滲出液、濾出液、組織擦過物、呼吸器飛沫またはエアロゾル、糞便などであり得る。検出は、例えば、ELISA、RIA、ラテラルフローアッセイ、ウエスタンブロットなどを含み得る。方法は、工程 (a) および (b) を再度行い、第1のアッセイと比較してEV-D68抗原レベルの変化を決定する工程をさらに含み得る。

【0008】

抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv (一本鎖断片可変) 抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。

【0009】

別の局面では、本開示は、エンテロウイルスD68 (EV-D68) に感染した対象を治療するか、またはEV-D68に罹患するリスクがある対象の感染の可能性を低減する方法であって、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片を該対象に送達する工程を含む方法を提供する。抗体または抗体断

片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、限定されることなく、IgGを含むか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、もしくは、グリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む組換えIgG抗体または抗体断片を含む、任意のアイソタイプであり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。

【0010】

抗体または抗体断片は、感染前または感染後、例えば、感染後約7日未満、約5日未満、約3日未満、約2日未満または約1日未満などに投与され得る。治療は、肺感染および/または神経感染を治療し得るか、治療は、肺感染および/または神経感染を低減する。送達は、エアロゾル送達などによる抗体もしくは抗体断片の全身投与、または抗体もしくは抗体断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列もしくはベクターによる遺伝的送達を含み得る。方法は、第2の療法、例えば、抗ウイルス療法または抗炎症療法を用いて該対象を治療する工程をさらに含み得る。

【0011】

さらに別の局面では、モノクローナル抗体が提供され、抗体または抗体断片は、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする。抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、限定されることなく、IgGを含むか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、もしくは、グリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む組換えIgG抗体または抗体断片を含む、任意のアイソタイプであり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。抗体または抗体断片は、細胞透過性ペプチドをさらに含み得、および/またはイントラボディである。

【0012】

抗体または抗体断片をコードするハイブリドーマまたは操作された細胞であって、抗体または抗体断片が、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする、ハイブリドーマまたは操作された細胞。ハイブリドーマまたは操

10

20

30

40

50

作された細胞は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる抗体または抗体断片をコードし得る。ハイブリドーマまたは操作された細胞は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含むか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含むか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む抗体または抗体断片を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、IgGであり得るか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、もしくは、グリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片であり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。抗体または抗体断片は、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである。

【0013】

それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする1つまたは複数の抗体または抗体断片を含むワクチン製剤も提供される。抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、IgGであり得るか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、もしくは、グリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片であり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。抗体または抗体断片は、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである。

【0014】

さらに別の態様は、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする抗体または抗体断片をコードする1つまたは複数の発現ベクターを含むワクチン製剤を含む。抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab'

)₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、IgGであり得るか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、もしくは、グリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片であり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。発現ベクターは、シンドビスウイルスベクターまたはVEEベクターである。ワクチン製剤は、針注射、ジェット注射またはエレクトロポレーションによる送達のために製剤化され得る。ワクチン製剤は、第2の抗体または抗体断片、例えば、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする別個の抗体または抗体断片をコードする1つまたは複数の発現ベクターをさらに含み得る。抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。

【0015】

なおさらなる態様は、エンテロウイルスD68に感染したか、エンテロウイルスD68に感染するリスクがある妊娠中の対象の胎盤および/または胎児の健康を保護する方法であって、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片を該対象に送達する工程を含む方法を含む。抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされ得る。抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。抗体は、IgGであり得るか、または、LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片であり得る。抗体は、キメラ抗体または二重特異性抗体であり得る。抗体または抗体断片は、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである。

【0016】

抗体または抗体断片は、感染前または感染後、例えば、感染後約7日未満、約5日未満、約3日未満、約2日未満または約1日未満などに投与され得る。対象は、妊娠中の女性、性的に活発な女性、または不妊治療を受けている女性であり得る。送達は、抗体もしくは抗体断片の投与、または抗体もしくは抗体断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列もしくはベクターによる遺伝的送達を含み得る。抗体または抗体断片は、未治療対照と比較して、胎盤のサイズを増加させ得る。抗体または抗体断片は、未治療対照と比較して、胎児のウイルス量および/または病態を減少させ得る。

【0017】

さらにまた別の態様では、エンテロウイルスD68抗原の抗原完全性、正確な立体配座および/または正確な配列を決定する方法であって、(a) 該抗原を含む試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する第1の抗体または抗体断片とを接触させる工程、ならびに(b) 該抗原に対する該第1の抗体または抗体断片の検出可能な結合によって、該抗原の抗原完全性、正確な立体配座および/または正確な配列を決定する工程を含む方法が提供される。試料は、組換え生成された抗原を含み得るか、ワクチン製剤またはワクチン生産バッチを含み得る。検出は、ELISA、RIA、ウエスタンブロット、表面プラズモン共鳴もしくはバイオレイヤー干渉法を使用するバイオセンサー、またはフローサイトメトリー染色を含み得る。

10

【0018】

第1の抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる。第1の抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。第1の抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。方法は、工程(a)および(b)を再度行って、抗原の抗原安定性を経時的に決定する工程をさらに含み得る。

20

【0019】

方法は、(c) 該抗原を含む試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する第2の抗体または抗体断片とを接触させる工程、ならびに(d) 該抗原に対する該第2の抗体または抗体断片の検出可能な結合によって、該抗原の抗原完全性を決定する工程をさらに含み得る。第2の抗体または抗体断片は、表1に記載のクローンと組にした可変配列によって、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%もしくは90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によって、または表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる。第2の抗体または抗体断片は、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得るか、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含み得る。第2の抗体断片は、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片であり得る。方法は、工程(c)および(d)を再度行って、抗原の抗原安定性を経時的に決定する工程を含み得る。

30

【0020】

ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞も提供され、該抗体は、少なくとも2つのウイルスクレードにわたってEV-D68に結合する。

40

【0021】

追加の態様は、ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞を含み、該抗体は、EV-D68 VP1、VP2およびVP3に結合する。抗体は、EV-D68 VP1 DEループ、および/またはEV-D68 VP2 EEループ、および/またはEV-D68 VP3 N末端ループに結合し得る。

【0022】

特許請求の範囲および/または明細書において用語「含む (comprising)」と組み合わせて使用される場合の単語「a」または「an」の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは1つを超える」の意味とも一致する

50

。単語「約」は、記載された数の±5%を意味する。

【0023】

[本発明1001]

エンテロウイルスD68（EV-D68）に感染した対象を治療するか、またはEV-D68に罹患するリスクがある対象の感染の可能性を低減する方法であって、それぞれ表3および表4のクローンと組にした（clone-paired）重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片を前記対象に送達する工程を含む、前記方法。

[本発明1002]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1001の方法。

10

[本発明1003]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のものに対して95%の同一性を有するクローンと組にした軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1004]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1001の方法。

20

[本発明1006]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

前記抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F（ab'）₂断片もしくはFv断片であるか、または前記抗体が、キメラ抗体もしくは二重特異性抗体である、本発明1001～1007のいずれかの方法。

30

[本発明1009]

前記抗体が、

IgGであるか、または、

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、

40

本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

第2の療法、例えば、抗ウイルス療法または抗炎症療法を用いて前記対象を治療する工程をさらに含む、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記抗体または抗体断片が、感染前または感染後に投与される、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記治療が、肺感染および/もしくは神経感染を治療するか、または治療が、肺感染および/もしくは神経感染を低減する、本発明1001～1011のいずれかの方法。

50

[本発明1013]

送達する工程が、抗体もしくは抗体断片の投与、または抗体もしくは抗体断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列もしくはベクターによる遺伝的送達を含む、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

対象のエンテロウイルスD68 (EV-D68) 感染を検出する方法であって、以下の工程を含む方法:

- (a) 前記対象から得られた試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片とを接触させる工程;ならびに
- (b) 前記抗体または抗体断片を前記試料中のEV-D68抗原に結合させることによって、前記試料中のEV-D68を検出する工程。

[本発明1015]

前記試料が体液である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記試料が、血液、痰、涙液、唾液、粘膜もしくは血清、精液、子宮頸部分泌物もしくは膺分泌物、羊水、胎盤組織、尿、滲出液、濾出液、呼吸器飛沫もしくはエアロゾル、組織擦過物または糞便である、本発明1014の方法。

[本発明1017]

検出がELISA、RIA、ラテラルフローアッセイまたはウエスタンブロットを含む、本発明1014～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

工程 (a) および (b) を再度行い、第1のアッセイと比較してEV-D68抗原レベルの変化を決定する工程をさらに含む、本発明1014～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列によってコードされる、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1022]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1023]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1024]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1014～1018のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記抗体断片が、組換えscFv (一本鎖断片可変) 抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1014～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

モノクローナル抗体であって、該抗体または抗体断片が、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする、前記モノクローナル抗体

10

20

30

40

50

o—

[本発明1027]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1026のモノクローナル抗体。

[本発明1028]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列に対して少なくとも70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1026のモノクローナル抗体。

[本発明1029]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列に対して少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1026のモノクローナル抗体。

10

[本発明1030]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1026のモノクローナル抗体。

[本発明1031]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1026のモノクローナル抗体。

[本発明1032]

前記抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1026～1031のいずれかのモノクローナル抗体。

20

[本発明1033]

前記抗体が、キメラ抗体であるか、または二重特異性抗体である、本発明1026～1031のいずれかのモノクローナル抗体。

[本発明1034]

前記抗体が、
IgGであるか、または、
LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、
本発明1026～1033のいずれかのモノクローナル抗体。

30

[本発明1035]

前記抗体または抗体断片が、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである、本発明1026～1034のいずれかのモノクローナル抗体。

[本発明1036]

抗体または抗体断片をコードするハイブリドーマまたは操作された細胞であって、抗体または抗体断片が、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする、前記ハイブリドーマまたは操作された細胞。

40

[本発明1037]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1038]

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした可変配列に対して少なくとも70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1039]

50

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした可変配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1040]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1041]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした可変配列に対して少なくとも70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1042]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1036のハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1043]

前記抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1036～1042のいずれかのハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1044]

前記抗体が、キメラ抗体または二重特異性抗体である、本発明1036～1043のいずれかのハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1045]

前記抗体が、

IgGであるか、または、

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、

本発明1036～1043のいずれかのハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1046]

前記抗体または抗体断片が、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである、本発明1036～1045のいずれかのハイブリドーマまたは操作された細胞。

[本発明1047]

それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を特徴とする1つまたは複数の抗体または抗体断片を含む、ワクチン製剤。

[本発明1048]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、表1のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1047のワクチン製剤。

[本発明1049]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、表1のクローンと組にした配列に対して少なくとも70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1047のワクチン製剤。

[本発明1050]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、表1のクローンと組にした配列に対して少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1047のワクチン製剤。

[本発明1051]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、表2のクローンと組にした配列の通

10

20

30

40

50

りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1047のワクチン製剤。

[本発明1052]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1047のワクチン製剤。

[本発明1053]

前記抗体断片のうちの少なくとも1つが、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1047～1052のいずれかのワクチン製剤。

[本発明1054]

前記抗体のうちの少なくとも1つが、キメラ抗体であるか、または二重特異性抗体である、本発明1047～1052のいずれかのワクチン製剤。

[本発明1055]

前記抗体が、

IgGであるか、または、

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、
本発明1047～1054のいずれかのワクチン製剤。

[本発明1056]

前記抗体または抗体断片のうちの少なくとも1つが、細胞透過性ペプチドをさらに含む、および/またはイントラボディである、本発明1047～1055のいずれかのワクチン製剤。

[本発明1057]

本発明1026～1034のいずれかの第1の抗体または抗体断片をコードする1つまたは複数の発現ベクターを含む、ワクチン製剤。

[本発明1058]

前記発現ベクターが、シンドビスウイルスベクターまたはVEEベクターである、本発明1057のワクチン製剤。

[本発明1059]

針注射、ジェット注射またはエレクトロポレーションによる送達のために製剤化された、本発明1057～1058のいずれかのワクチン製剤。

[本発明1060]

第2の抗体または抗体断片、例えば、本発明1026～1034のいずれかの別個の抗体または抗体断片をコードする1つまたは複数の発現ベクターをさらに含む、本発明1057のワクチン製剤。

[本発明1061]

エンテロウイルスD68に感染したか、エンテロウイルスD68に感染するリスクがある妊娠中の対象の胎盤および/または胎児の健康を保護する方法であって、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する抗体または抗体断片を前記対象に送達する工程を含む、前記方法。

[本発明1062]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1061の方法。

[本発明1063]

前記抗体または抗体断片が、表1に記載のものに対して95%の同一性を有するクローンと組にした軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1061～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

10

20

30

40

50

前記抗体または抗体断片が、表1のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1061~1062のいずれかの方法。

[本発明1065]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1061の方法。

[本発明1066]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1061の方法。

[本発明1067]

前記抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1061の方法。

[本発明1068]

前記抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1061~1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

前記抗体が、

IgGであるか、または、

LALA、N297、GASD/ALIE、YTE、DHSもしくはLS変異など、半減期を増加させるためにおよび/もしくは治療効果を増加させるためにFcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように変異されたFc部分、またはグリカンの酵素的もしくは化学的な付加もしくは除去、もしくは定義されたグリコシル化パターンを有する操作された細胞株内での発現など、FcR相互作用を変化させる（排除もしくは増強する）ように改変されたグリカンを含む、組換えIgG抗体または抗体断片である、

本発明1061~1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

前記抗体が、キメラ抗体または二重特異性抗体である、本発明1061~1067のいずれかの方法。

[本発明1071]

前記抗体または抗体断片が、感染前または感染後に投与される、本発明1061~1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

前記対象が、妊娠中の女性、性的に活発な女性、または不妊治療を受けている女性である、本発明1061~1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

送達、抗体もしくは抗体断片の投与、または抗体もしくは抗体断片をコードするRNA配列もしくはDNA配列もしくはベクターによる遺伝的送達を含む、本発明1061~1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

抗体または抗体断片が、未治療対照と比較して、胎盤のサイズを増加させる、本発明1061の方法。

[本発明1075]

抗体または抗体断片が、未治療対照と比較して、胎児のウイルス量および/または病態を減少させる、本発明1061の方法。

[本発明1076]

エンテロウイルスD68抗原の抗原完全性、正確な立体配座および/または正確な配列を決定する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a) 前記抗原を含む試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する第1の抗体または抗体断片とを接触させる工程;ならびに

(b) 前記抗原に対する前記第1の抗体または抗体断片の検出可能な結合によって、前記

10

20

30

40

50

抗原の抗原完全性、正確な立体配座および/または正確な配列を決定する工程。

[本発明1077]

前記試料が、組換え生成された抗原を含む、本発明1076の方法。

[本発明1078]

前記試料が、ワクチン製剤またはワクチン生産バッチを含む、本発明1076の方法。

[本発明1079]

検出が、ELISA、RIA、ウエスタンブロット、表面プラズモン共鳴もしくはバイオレイヤー干渉法を使用するバイオセンサー、またはフローサイトメトリー染色を含む、本発明1076～1078のいずれかの方法。

[本発明1080]

前記第1の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列によってコードされる、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1081]

前記第1の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1082]

前記第1の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1083]

前記第1の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1084]

前記第1の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1085]

前記第1の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1076～1079のいずれかの方法。

[本発明1086]

前記第1の抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1076～1085のいずれかの方法。

[本発明1087]

工程（a）および（b）を再度行って、前記抗原の抗原安定性を経時的に決定する工程をさらに含む、本発明1076～1086のいずれかの方法。

[本発明1088]

以下の工程をさらに含む、本発明1076～1087のいずれかの方法:

（c）前記抗原を含む試料と、それぞれ表3および表4のクローンと組にした重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を有する第2の抗体または抗体断片とを接触させる工程;ならびに

（d）前記抗原に対する前記第2の抗体または抗体断片の検出可能な結合によって、前記抗原の抗原完全性を決定する工程。

[本発明1089]

前記第2の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列によってコードされる、本発明1088の方法。

[本発明1090]

前記第2の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした可変配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1089の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1091]

前記第2の抗体または抗体断片が、表1に記載のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列によってコードされる、本発明1089の方法。

[本発明1092]

前記第2の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列の通りの軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1089の方法。

[本発明1093]

前記第2の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して70%、80%または90%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1089の方法。

10

[本発明1094]

前記第2の抗体または抗体断片が、表2のクローンと組にした配列に対して95%の同一性を有する軽鎖可変配列および重鎖可変配列を含む、本発明1089の方法。

[本発明1095]

前記第2の抗体断片が、組換えscFv（一本鎖断片可変）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片またはFv断片である、本発明1089の方法。

[本発明1096]

工程(c)および(d)を再度行って、前記抗原の抗原安定性を経時的に決定する工程をさらに含む、本発明1089の方法。

20

[本発明1097]

ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞であって、前記抗体が、少なくとも2つのウイルスクレードにわたってEV-D68に結合する、前記ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

[本発明1098]

ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞であって、前記抗体が、EV-D68 VP1、VP2およびVP3に結合する、前記ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

30

[本発明1099]

前記抗体が、EV-D68 VP1 DEループに結合する、本発明1098のヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

[本発明1100]

前記抗体が、EV-D68 VP2 EEループに結合する、本発明1098のヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

[本発明1101]

前記抗体が、EV-D68 VP3 N末端ループに結合する、本発明1098のヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

[本発明1102]

前記抗体が、(a) EV-D68 VP3 N末端ループおよびEV-D68 VP2 EEループ、または(b) EV-D68 VP2 EEループおよびEV-D68 VP1 DEループ、または(c) EV-D68 VP1 DEループおよびEV-D68 VP3 N末端ループ、または(d) EV-D68 VP3 N末端ループ、EV-D68 VP1 DEループおよびEV-D68 VP2 EEループに結合する、本発明1098のヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、またはそれを産生するハイブリドーマもしくは操作された細胞。

40

本明細書において記載される任意の方法または組成物は、本明細書において記載される任意の他の方法または組成物に関して実施することができることが企図される。本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。ただし、本開示の趣旨および範囲内の様々な変更および修正は、この詳細な説明から当業者には明ら

50

かになると考えられるため、詳細な説明および具体的な例は、本開示の具体的な態様を示しているが、例示としてのみ与えられていることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0024】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示の特定の局面をさらに実証するために含まれている。本開示は、本明細書において提示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせ、これらの図面のうちの1つまたは複数を参照することによってさらによく理解され得る。

【0025】

【図1】図1：抗体単離。64個のヒトモノクローナル抗体を単離し、2014年のEV-D68アウトブレイク由来の生ウイルス単離株をELISAプレート上に直接コーティングする間接ELISAを使用してスクリーニングした。次いで、任意のヒットをミエローマ細胞と融合させて、理論的には永久に分裂し続けるハイブリドーマを作製する。抗体を精製した後、それらの表現型を定義するために、いくつかのインビトロ特性評価工程を行う。

【図2】図2：インビトロでの抗体中和。細胞培養50%感染用量、すなわちCCID₅₀アッセイを使用して、インビトロ中和を行う。一部の抗体は非常に強力であり、一部の抗体は依然として非常に強力であり、他の抗体は弱く、mAbの約1/3がいくつかの検出可能な中和活性を示す。

【図3-1】図3：クレード間の交差反応性結合。全mAbにわたって比較するために、ELISAからの50%有効濃度、すなわちEC₅₀を使用してヒートマップを生成した。一部は全クレードに非常によく結合するが、一部は、典型的には遠いA2クレードでは顕著な脱落を有する。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図3-3】図3-1の説明を参照のこと。

【図4-1】図4：競合により、少なくとも4つの主要な表面エピトープが明らかにされる。本発明者らは、ピアソン相関を使用して、クラスターへの着色読み出しとして関連性を生成した。この関連性は、抗体を選別するのに役立つが、実際の干渉パーセンテージではない。本発明者らは、ここで、互いに関連し得る3~4つの表現型を記載した。これにより、臨床開発のための候補の特定が可能になる。

【図4-2】図4-1の説明を参照のこと。

【図4-3】図4-1の説明を参照のこと。

【図4-4】図4-1の説明を参照のこと。

【図5】図5：臨床候補。中和に加えて、追加の特性評価により、追加の臨床候補が明らかにされた。mAb 159は、非常に強力であり、ウイルスのモック調製物に結合しないにもかかわらず、ELISAまたはCCID₅₀では交差反応しない。mAb 105は、依然として非常に強力であるが、非常によく交差反応する。

【図6】図6A~C：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価。EV-D68-228による処置は、感染後1日目（図6A）、3日目（図6B）および5日目（図6C）に肺ウイルス力価を有意に低下させた。10、3または1mg/kgのEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。IVIgによる処置は、感染後1日目にのみ肺ウイルス力価を低下させることができた。グアニジンには、感染後1日目および3日目に肺ウイルス力価を有意に低下させたが、5日目には低下させなかった。プラセボ処置マウスと比較して**P<0.01、****P<0.0001。

【図7】図7A~C：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価。EV-D68-228 mAbによる処置は、感染後1日目（図7A）、3日目（図7B）および5日目（図7C）に血液ウイルス力価を低下させた。IVIgによる処置は、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。グアニジンは、感染後1日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させたが、3日目には低下させなかった。プラセボ処置マウスと比較して**P<0.01、***P<0.001、****P<0.

10

20

30

40

50

0001。

【図8】図8：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α およびIL-1 β の肺濃度。EV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目にIL-1 α およびIL-1 β の濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、IL-1 α またはIL-1 β の肺濃度を有意に低下させなかった。プラセボ処置マウスと比較して**** $P < 0.0001$ 。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図9】図9：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-6およびMCP-1の肺濃度。EV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目にIL-6およびMCP-1の濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、感染後3日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図10】図10：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のRANTESの肺濃度。EV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、感染後のいかなる日にもRANTESの肺濃度を有意に低下させなかった。プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図11】図11：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-2、IL-3およびIL-4の肺濃度。EV-D68による感染後に、IL-2、IL-3またはIL-4の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図12】図12：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-5、IL-10およびIL-12p70の肺濃度。EV-D68による感染後に、IL-5、IL-10またはIL-12p70の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図13】図13：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-17、IFN γ およびTNF α の肺濃度。EV-D68による感染後に、IL-17、IFN γ またはTNF α の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図14】図14：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMIP-1 α およびGM-CSFの肺濃度。EV-D68による感染後に、MIP-1 α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図15】図15：実験NIA-1850。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて処置した10日齢のAG129マウスの生存率。(n=マウス6匹/群)。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、マウスを死亡から完全に保護した。10mg/kgの用量のIVIgは、マウス6匹のうち4匹を死亡から保護した。100mg/kg/日の用量のグアニジンは、マウスを死亡から完全に保護した。プラセボ処置マウスの全6匹が、感染により死亡した。プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

【図16】図16：実験NIA-1850。EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染10日齢AG129マウスの平均体重。10、3または1mg/kgの用量による処置は、感染に関連する体重減少からマウスを保護した。10mg/kgの用量のIVIgによる処置も、マウスを体重減少から保護した。100mg/kg/日の用量のグアニジンを用いて処置したマウスも、体重減少から保護された。プラセボ処置マウスと比較して、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

【図17】図17A～C：実験NIA-1850。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて処置した10日齢のAG129マウスの血液ウイルス力価。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目(図17A)、3日目(図17B)または

5日目（図17C）に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。100mg/kg/日の用量のグアニジンによる処置によっても、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価が有意に低下した。プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

【図18】図18：実験NIA-1850。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて処置した10日齢のAG129マウスの神経学的スコア。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、神経学的スコアによって測定した場合、麻痺の臨床徴候を予防した。10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、感染後3日目、4日目および5日目に神経学的スコアを低下させた。100mg/kg/日のグアニジンを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図19】図19A～B：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価。EV-D68-228による処置は、感染後3日目（図19A）および5日目（図19B）に肺ウイルス力価を有意に低下させた。10mg/kgのEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染24時間後以内に肺ウイルス力価は検出されなかった。感染48時間後の時点での10および1mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、感染後3日目および5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させた。IVIgによる処置は、感染24時間後に処置した場合、肺ウイルス力価を低下させなかった。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P < 0.0001$ ）。

【図20】図20A～B：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価。EV-D68-228 mAbによる処置は、感染後3日目（図20A）および5日目（図20B）に血液ウイルス力価を低下させた。感染48時間後までのEV-D68-228による処置は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を検出限界未満まで低下させた。IVIgによる処置は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、**** $P < 0.0001$ ）。

【図21】図21：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α およびIL-1 β の肺濃度。EV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目および5日目にIL-1 α およびIL-1 β の濃度を有意に低下させた。IVIgによる処置は、感染後3日目および5日目のみにIL-1 α またはIL-1 β の肺濃度を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図22】図22：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-5およびIL-6の肺濃度。感染48時間後までのEV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目にIL-5およびIL-6の濃度を有意に低下させた。感染24時間後のIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5およびIL-6の肺濃度を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図23】図23：実験NIA-1849。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMCP-1およびRANTESの肺濃度。感染48時間後以内のEV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目および5日目にMCP-1およびRANTESの濃度を有意に低下させた。感染24時間後のIVIgによる処置は、感染後3日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図24】図24：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-2、IL-3およびIL-4の肺濃度。EV-D68による感染後に、IL-2、IL-3またはIL-4の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図25】図25：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-10、IL-12p70およびIL-17の肺濃度。EV-D68による感染後に、IL-5、IL-10またはIL-12p70の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図26】図26：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIFN γ およびTNF α の肺濃度。EV-D68による感染後に、IFN γ またはTNF α の濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

10

【図27】図27：実験NIA-1869。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMIP-1 α およびGM-CSFの肺濃度。EV-D68による感染後に、MIP-1 α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図28】図28：実験NIA-1870。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスの生存率。（n＝マウス6匹/群、n＝マウス7匹/感染120時間後に処置した群）。10mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、感染24時間後の時点でマウスを死亡から完全に保護した。感染48時間後の時点のEV-D68-228による処置は、マウス6匹のうち4匹を死亡から保護した。EV-D68-228を用いて感染72時間後に処置したマウス6匹のうち1匹のみが感染から生き残った。EV-D68-228を用いて感染120時間後に処置した群ではマウス7匹のうち生存していたマウスはいなかったにもかかわらず、生存曲線は、死亡日の遅延のためにプラセボ処置マウスとは異なっていた。10mg/kgの用量のIVIgは、感染24時間後に処置した場合、全6匹のマウスを死亡から保護した。プラセボ処置マウスの全6匹が、感染により死亡した（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ）。

20

【図29】図29：実験NIA-1870。EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染10日齢AG129マウスの平均体重。感染24時間後または48時間後の10mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、感染に関連する体重減少からマウスを保護した。感染24時間後の10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、マウスを体重減少から保護しなかった。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ ）。

30

【図30】図30A～C：実験NIA-1870。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスの血液ウイルス力価。感染後1日目（図30A）、3日目（図30B）または5日目（図30C）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、感染24時間後、48時間後または72時間後に投与した場合、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。感染24時間後に投与された10mg/kgの用量のIVIgもまた、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。

40

【図31】図31A～B：実験NIA-1870。EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスの神経学的スコア。感染後2日目および3日目（図31A）ならびに感染後4日目および5日目（図31B）の神経学的スコアを示す。感染24時間後の10mg/kgの用量のEV-D68-228による処置は、神経学的スコアによって測定した場合、3日目、4日目および5日目に麻痺の臨床徴候を予防した。感染24時間後の10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、感染後3日目、4日目および5日目に神経学的スコアを低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図32-1】図32：EV-D68免疫ヒト対象由来のmAbの競合結合群。B1クレードEV-D

50

68単離株による競合結合ELISAから関連性スコアを作成し、1~4と命名した4つの競合結合群にmAbをクラスタリングするために使用した。赤色または青色で記載されたクローン番号はmAbを強力に中和しており、青色のクローン名は、後の図で詳細に試験した2つのmAbを示す。

【図32-2】図32-1の説明を参照のこと。

【図32-3】図32-1の説明を参照のこと。

【図32-4】図32-1の説明を参照のこと。

【図33-1】図33A~C：ヒトmAbの中和効力および結合能。（図33A）MAbを、B1クレード単離株を使用したCCID₅₀中和アッセイにおけるIC₅₀値によって、競合結合群（Comp.group、第5群は、単集合の残差集合（residual collection）を示す）内にランク付けした。本発明者らはまた、21個の最も強力に中和するmAbについてDクレードおよびFermon（Fer.）単離株の中和を試験した。「>」は、50 µg/mLまでの濃度で試験した場合に中和が検出されなかったことを示す。空白セルは試験されていないことを示す。赤色または青色で記載されたクローン番号はmAbを強力に中和しており、青色のクローン名は、後の図で詳細に試験した2つのmAbを示す。（図33B）S字形用量反応曲線に適合するように精製mAb希釈物を用いた間接ELISA（図33C）を使用することによって生成されたEC₅₀値を使用して、生ウイルス単離株またはモックウイルス調製物に対する結合強度を示す。「>」は、EC₅₀値が試験した最大濃度100 µg/mLを超えることを示し、結合が不十分であるかまたは結合がないことを示唆している。

【図33-2】図33-1の説明を参照のこと。

【図33-3】図33-1の説明を参照のこと。

【図34】図34A~C：2つの免疫複合体間の構造的特徴の比較。（図34A）EV-D68:Fab EV68-159（左）またはEV-D68:Fab EV68-228（右）の放射状着色クライオEMマップ。各マップは、2回対称軸に投影される。各非対称単位の5回軸、3回軸および2回軸は、それぞれ1つの五角形、2つの小さい三角形、および1つの楕円によって標識された三角形の輪郭を使用して示されている。（図34B）非対称単位を用いた結合位置の比較。ウイルスタンパク質は、青色（VP1）、緑色（VP2）および赤色（VP3）に着色されている。Fab分子は灰色（EV68-159）または紫色（EV68-228）に着色され、重鎖または軽鎖はそれぞれ暗色または明色の強度によって同じ色で示されている。（図34C）EV68-159 Fab（左）またはEV68-228 Fab（右）のフットプリント。RIVEMを用いて、ウイルス表面の放射状着色2D投影を作成した。4 Åの距離内でFab分子からのいずれかの原子に面するウイルス表面残基を明るい青色（VP1）、明るい緑色（VP2）および明るい赤色（VP3）で示す。キャニオン領域は黄色で示す。（図34A）および（図34C）のスケールバーは、Å単位で測定された半径方向距離を示す。

【図35】図35：EV68-159およびEV68-228の結合界面の拡大図。ウイルスクャプシドを表面として示し、Fabをカートーン表現で示す。VP1、VP2およびVP3は、それぞれ白色、暗灰色および銀色に着色されている。重鎖または軽鎖は、それぞれオレンジ色または黄色に着色されている。相互作用をもたらすウイルス残基を重鎖および軽鎖に基づいて着色し、着色強度はいずれかのVPに基づいて変化する。結合界面に関与する重鎖相補性決定領域および軽鎖相補性決定領域（それぞれHCDRおよびLCDR）を矢印で示す。

【図36】図36A~D：ビリオン-Fab相互作用の分子詳細。EV-D68:Fab EV68-159（図36A~C）およびEV-D68:Fab EV68-228（図36D）の結合界面における代表的な相互作用。水素結合はシアン色に着色され、塩橋はマゼンタ色に着色されている。

【図37】図37A~D：MAb EV68-228は、予防または治療のいずれかとして使用されると、マウスをEV-D68誘発性呼吸器疾患から保護する。4週齢のAG129系統マウス（n=4/時点）にマウス適応B1クレードEV-D68を鼻腔内接種し、抗体を腹腔内投与し、示された組織のウイルス力価をCCID₅₀アッセイによって測定した。（図37A~B）示された用量の抗体の24時間後にマウスにウイルスを接種し、次いで、示された時点でウイルス力価を測定した。（図37C~D）マウスにウイルスを接種した後、4、24または48時間後に10 mg/kg（示されている場合を除く）の抗体を接種し、次いで、ウイルス力価を測定した。

【図38】図38A～F：MAb EV68-228は、EV-D68感染マウスの肺炎症を減少させる。4週齢のAG129マウス（ $n=4$ /時点）に、（図38A～C）示された用量の抗体の24時間後にウイルスを鼻腔内接種するか、または（図38D～F）ウイルスを鼻腔内接種した後、4、24もしくは48時間後に10mg/kg（示されている場合を除く）の抗体を接種し、次いで、示された時点でサイトカインを測定した。ELISAを使用して、肺ホモジネートからサイトカインを定量した。DunnettのT3多重比較検定による一元配置分散分析を使用して、各時点について、処置群からの値とプラセボ群とを比較した（* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$ ）。IL-インターロイキン；MCP-単球走化性タンパク質。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図39】図39A～F：MAb EV68-228は、予防または治療のいずれかとして使用されると、EV-D68誘発性神経疾患からマウスを保護する。10日齢のマウスにマウス適応B1クレードEV-D68を腹腔内接種し、抗体を腹腔内投与し、示された組織のウイルス力価をCCID₅₀アッセイによって測定した。（図39A～C）示された用量の抗体の24時間後にマウスにウイルスを接種し、次いで、（図39A）ウイルス力価を測定し（ $n=3$ /時点）、（図39B）生存をモニタリングし、（図39C）神経学的スコア（ $n=6$ /時点）を示された時点で記録した。スコアが高いほど重度の運動障害を示す。（図39D～F）マウスにウイルスを接種した後、10mg/kg用量の抗体を接種し、次いで、（図39D）ウイルス力価を測定し（ $n=3$ /時点）、（図39E）生存をモニタリングし、（図39F）神経学的スコア（ $n=6$ /時点、120時間後の $n=9$ を除く）を記録した。色付きの縦の矢印は、処置の時間を示す。

【図40】図40：ウエスタンブロットデータ。ウエスタンブロットによって、B1クレードウイルスを染色する能力について全mAbを試験した。あらゆる陽性結果が示されている。

【図41-1】図41：ヒトmAbの詳細な特性。B1クレード単離株を使用するCCID₅₀中和アッセイにおけるIC₅₀値によって、競合結合群内にMAbをランク付けした。本発明者らはまた、21個の最も強力に中和するmAbについてDクレードおよびFermon（Fer.）単離株の中和を試験した。「>」は、50 μ g/mLまでの濃度で試験した場合に中和が検出されなかったことを示す。空白セルは試験されていないことを示す。赤色または青色のフォントによって記載されたクローン番号はmAbを強力に中和しており、青色のクローン名は、後の図で詳細に試験した2つのmAbを示す。各mAbの最終IC₅₀値は、二連で行った3つの別個の実験から得られたEC₅₀値の対数の平均である。S字形用量反応曲線に適合するように精製mAb希釈物を用いた間接ELISAを使用して生成されたEC₅₀値に基づいて、生ウイルス単離株に対する結合強度を示す。「>」は、予測EC₅₀値が試験した最大濃度100 μ g/mLを超えることを示し、結合が不十分であるかまたは結合がないことを示唆している。各mAbの最終EC₅₀値は、二連で行った3つの別個の実験から得られたEC₅₀値の対数の平均である。IgGサブタイプを表現型的に決定した。軽鎖タイプは、カッパ（K）またはラムダ（L）であり、遺伝的に決定した。WBはウエスタンブロット反応性を示し、全mAbを試験し、空白行は反応性がないことを示している。

【図41-2】図41-1の説明を参照のこと。

【図41-3】図41-1の説明を参照のこと。

【図42-1】図42：全mAbの間接ELISAデータ。S字形用量反応曲線に適合するように精製mAb希釈物を用いた間接ELISAを使用することによって生成されたEC₅₀値によって、生ウイルス単離株に対する結合強度を示す。3つの実験のうちの1つから得られた代表的なデータが示されており、エラーバーは二連の技術的反復の標準偏差を示す。各mAbの最終EC₅₀値は、3つ全部の実験から得られたEC₅₀値の対数の平均である。ウイルスのモック調製物は、ウイルスを接種しなかったが、ウイルス感染細胞と同じ方法で調製したRD細胞単層から得られたものであった。

【図42-2】図42-1の説明を参照のこと。

【図42-3】図42-1の説明を参照のこと。

【図42-4】図42-1の説明を参照のこと。

【図43】図43：EV-D68:Fab EV68-228電子密度マップから得られた代表的な密度。

ウイルスタンパク質は、青色 (VP1)、緑色 (VP2)、赤色 (VP3) およびマゼンタ色 (VP4) に着色されている。

【図 4 4】図44：免疫複合体マップ分解能の推定。マップ分解能は、0.143のゴールドスタンダードのFourierシェル相関 (FSC) カットオフに基づいて推定されている。EV68-159 (赤色曲線) 複合体またはEV68-228 (青色曲線) 複合体の最終分解能は、それぞれ2.9 Å または3.1 Å である。

【図 4 5】図45：Fab結合部位の比較。EV68-159およびEV68-228はそれぞれ金色および青色に着色され、ウイルス表面はシアン色に着色されている。左側のパネルは可変ドメインおよび定常ドメインの両方を示しているのに対して、右側のパネルは可変ドメインのみを示し、2つのFabのフットプリントが重複しないことを示している。

【図 4 6】図46：Fabフットプリントの拡大図を示すロードマップ。RIVEMを用いて、ウイルス表面の放射状着色2D投影を作成した。4 Å の距離内でFab分子からのいずれかの原子に面するウイルス表面残基を明るい青色 (VP1)、明るい緑色 (VP2) および明るい赤色 (VP3) で示す。キャニオン領域は黄色で示す。

【図 4 7】図47：EV68-228 Fab重鎖の嵩高い側鎖。この図は、EV68-159 Fabの構造にも見られる、EV68-228 Fabを安定化するための疎水性相互作用ネットワークを形成する嵩高い側鎖の例を示している。

【図 4 8】図48A～C：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価。感染後1日目 (図48A)、3日目 (図48B) および5日目 (図48C) の肺ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後5日目のみに肺ウイルス力価を有意に低下させた。(プラセボ処置マウスと比較して**P<0.01、****P<0.0001。)

【図 4 9】図49A～C：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価。感染後1日目 (図49A)、3日目 (図49B) および5日目 (図49C) の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスの血液では、感染後1日目、3日目または5日目にウイルスは検出されなかった。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。(プラセボ処置マウスと比較して*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。)

【図 5 0】図50：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1α、IL-1β、IL-2およびIL-3の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後1日目、3日目および5日目にIL-1αの濃度を有意に低下させた。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置はまた、感染後3日目にIL-1βの濃度を低下させた。hIVIgによる処置は、感染後3日目のみにIL-1βの肺濃度を有意に低下させた。感染後、IL-2またはIL-3の濃度に有意な変化は観察されなかった。(プラセボ処置マウスと比較して*P<0.05、***P<0.001、****P<0.0001)。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図 5 1】図51：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-5、ならびに感染後3日目および5日目にIL-6の濃度を有意に低下させた。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5およびIL-6の肺濃度を有意に低下させた。感染後、IL-4またはIL-10の濃度に有意な変化は観察されなかった。(プラセボ処置マウスと比較して*P<0.05、***P<0.001、****P<0.0001)。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図 5 2】図52：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染2

10

20

30

40

50

4時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN- γ の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の濃度を有意に低下させた。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。感染後、IL-12p70、IL-17またはIFN- γ の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図53】図53：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後1日目および3日目にMIP-1 α の肺濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。10mg/kg用量のhIVIGは、感染後1日目および3日目にMIP-1 α の濃度を有意に低下させ、感染後3日目にRANTESの濃度も低下させた。EV-D68による感染後、TNF α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図54】図54A～B：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価。感染後3日目（図54A）および5日目（図54B）の肺ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目のみに肺ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。）

【図55】図55A～B：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価。感染後3日目（図55A）および5日目（図55B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスの血液では、感染後3日目または5日目にウイルスは検出されなかった。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。）

【図56】図56：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2およびIL-3の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-1 α およびIL-1 β の濃度を有意に低下させた。EV68-228-TPを用いて処置したマウスおよびhIVIgを用いて処置したマウスでは、IL-3の濃度は感染後3日目に有意に低下した。感染後、IL-2の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図57】図57：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-5、ならびに感染後3日目および5日目にIL-6の濃度を有意に低下させた。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5の肺濃度を有意に低下させた。感染後、IL-4またはIL-10の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図58】図58：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN- γ の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の濃度を有意に低下させた。10mg/kgのhIVIgによる処置

は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。感染後、IL-12p70、IL-17またはIFN- γ の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P<0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図59】図59：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にMIP-1 α の肺濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。EV-D68による感染後、TNF α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P<0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

10

【図60】図60A～B：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価。感染後3日目（図60A）および5日目（図60B）の肺ウイルス力価を示す。EV68-228-CHOのみが、感染後3日目または5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P<0.0001$ ）。

【図61】図61A～B：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価。感染後3日目（図61A）および5日目（図61B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスの血液では、感染後3日目または5日目にウイルスは検出されなかった。10mg/kgのhIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P<0.0001$ ）。

20

【図62】図62：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2およびIL-3の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-CHOによる処置のみが、感染後3日目にIL-1 α およびIL-1 β の濃度を有意に低下させた。感染後、IL-2またはIL-3の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して** $P<0.01$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図63】図63：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-6の濃度を有意に低下させた。感染後、IL-4、IL-5またはIL-10の濃度に有意な変化は観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して** $P<0.01$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

30

【図64】図64：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN- γ の肺濃度。感染後、IL-12p70、IL-17、MCP-1またはIFN- γ の濃度に有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

40

【図65】図65：実験NIA-1930。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度。EV-D68による感染後、TNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFまたはRANTESの濃度の有意な変化は観察されなかった。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図66】図66：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの生存率。（ n =マウス10匹/群）。10mg/kgの用量のEV68-228-TPによる処置は、マウスを死亡から完全に保護した。10mg/kgのEV68-228-CHOを用いて処置したマウス10匹はいずれも、死亡から保護された。10mg/kgの用量のIVIgは、マウス10匹のうち8匹を死亡から保護した。

50

プラセボ処置マウス10匹のうち9匹が、感染により死亡した（プラセボ処置マウスと比較して*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。

【図67】図67：実験NIA-1931。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染10日齢AG129マウスの初期体重に対するパーセンテージ。プラセボ処置マウスと比較して、10mg/kg用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したマウスでは、体重減少の有意差は観察されなかった。10mg/kg用量のhIVIgによる処置は、マウスを体重減少から保護しなかった。

【図68】図68A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価。感染後1日目（図68A）および3日目（図68B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPによる感染24時間前の処置は、感染後1日目および3日目にウイルス力価を有意に低下させた。10mg/kgのEV68-228-CHOによる感染24時間前の処置は、感染後1日目および3日目にウイルス力価を有意に低下させた。10mg/kgの用量のIVIgによる感染24時間前の処置は、感染後3日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.0001$ ）。

【図69】図69A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価。感染後5日目（図69A）および7日目（図69B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間前の処置は、感染後5日目にウイルス力価を低下させた。感染後7日目にウイルスは検出されなかった。

【図70】図70A～C：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの感染後2～10日目の神経学的スコア。感染後2～4日目（図70A）、5～7日目（図70B）および8～10日目（図70C）の神経学的スコアを示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間前の処置は、神経学的スコアによって測定した場合、麻痺の臨床徴候を完全に予防した。感染24時間前に10mg/kgの用量のIVIgを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。（プラセボ処置マウスと比較して**** $P < 0.0001$ ）。

【図71】図71：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの生存率（ n ＝マウス10匹/群）。10mg/kgの用量のEV68-228-TPによる処置は、マウスを死亡から完全に保護した。10mg/kgのEV68-228-CHOを用いて処置したマウス10匹はいずれも、死亡から保護された。10mg/kgの用量のIVIgは、マウス10匹のうち10匹を死亡から保護した。プラセボ処置マウス10匹のうち8匹が、感染により死亡した（プラセボ処置マウスと比較して*** $P < 0.001$ ）。

【図72】図72：実験NIA-1931。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染10日齢AG129マウスの初期体重に対するパーセンテージ。プラセボ処置マウスと比較して、10mg/kg用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したマウスでは、体重減少の有意差は観察されなかった。10mg/kg用量のhIVIgによる処置は、マウスを体重減少から保護しなかった。

【図73】図73A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価。感染後1日目（図73A）および3日目（図73B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPによる感染24時間後の処置は、感染後3日目にウイルス力価を有意に低下させた。10mg/kgのEV68-228-CHOによる感染24時間後の処置は、感染後3日目にウイルス力価を有意に低下させた。10mg/kgの用量のIVIgによる感染24時間後の処置は、感染後3日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$ ）。

【図74】図74A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価。感染後5日目（図74A）および7日目（図74B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間後の処置後、感染後5日目にウイルスは検出されなかった。いずれのマウスにも感染後7日目にウイルスは検出されなかった。

【図75】図75A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後2～9日目の神経学的スコア。感染後2～5日目（図75A）および6～9日目（図75B）の神経学的スコアを示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間後の処置は、感染後2～9日目の神経学的スコアによって測定した場合、麻痺の徴候を有意に減少させた。感染24時間後の10mg/kgの用量のhIVIgによる処置は、感染後2日目および3日目のみに神経学的スコアを低下させた。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図76】図76A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後10～17日目の神経学的スコア。感染後10～13日目（図76A）および14～17日目（図76B）の神経学的スコアを示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間後の処置は、感染後10～16日目の神経学的スコアによって測定した場合、麻痺の徴候を有意に減少させた。感染24時間後の10mg/kgの用量のhIVIgによる処置は、神経学的スコアを有意に低下させなかった。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【図77】図77：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの生存率。（ n =マウス10匹/群）。10mg/kgの用量のEV68-228-TPによる処置は、マウス10匹のうち9匹を死亡から保護した。10mg/kgのEV68-228-CHOを用いて処置したマウス10匹のうち8匹が死亡から保護された。10mg/kgの用量のIVIgは、マウス10匹のうち6匹を死亡から保護した。プラセボ処置マウス10匹のうち9匹が感染により死亡した（プラセボ処置マウスと比較して** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ）。

【図78】図78：実験NIA-1931。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染10日齢AG129マウスの初期体重に対するパーセンテージ。プラセボ処置マウスと比較して、10mg/kg用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したマウスでは、体重減少の有意差は観察されなかった。10mg/kg用量のhIVIgによる処置は、マウスを体重減少から保護しなかった。

【図79】図79A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価。感染後1日目（図79A）および3日目（図79B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染48時間後の処置は、血液ウイルス力価を有意に低下させなかった。10mg/kgの用量のIVIgによる感染48時間後の処置は、血液ウイルス力価を有意に低下させなかった。

【図80】図80A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価。感染後5日目（図80A）および7日目（図80B）の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる感染24時間後の処置後、感染後5日目にウイルスは検出されなかった。いずれのマウスにも感染後7日目にウイルスは検出されなかった。

【図81】図81A～B：実験NIA-1931。EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後3～10日目の神経学的スコア。感染後3～6日目（図81A）および7～10日目（図81B）の神経学的

スコアを示す。10mg/kgのEV68-228-TPによる感染48時間後の処置は、感染後3～5日目に神経学的スコアを有意に低下させた。感染48時間後の10mg/kg用量のEV68-228-CHOの単回投与は、感染後3～6日目の神経学的スコアによって測定した場合、麻痺の徴候を有意に減少させた。感染48時間後の10mg/kgの用量のhIVIgによる処置は、感染後の神経学的スコアを有意に低下させなかった。（プラセボ処置マウスと比較して* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。グラフ内の試料の名称は、上から下への縦の説明とともに左から右に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0026】

例示的な態様の説明

上述のように、エンテロウイルスD68（EV-D68）は、世界中で主に小児の呼吸器疾患のアウトブレイクを引き起こし得る。急性弛緩性脊髄炎、灰白髄炎様神経筋脱力症候群のクラスターは、EV-D68の呼吸器アウトブレイクと同時に起こることが多い。血清疫学的試験では、2～5歳を超えるほぼすべての人の血清が抗EV-D68中和抗体を含有することが見出されており、EV-D68が小児期の遍在性病原体であることを示唆している。ただし、体液性免疫応答が対象とするウイルスエピトープの知識は、関連ウイルスの以前の試験から推測されるにすぎない。本明細書において、本発明者らは、一部が強力に中和する、EV-D68に対する64個のヒトモノクローナル抗体を生成した。これらは、この病原体に対する最初のヒトmAbであると考えられ、本発明者らは、EV-D68感染の検出、治療および予防にそれらを使用することを提案する。本開示のこれらおよび他の局面は、以下に詳細に説明される。

【0027】

I. エンテロウイルスD68

エンテロウイルス68（EV68、EV-D68、HEV68）は、エンテロウイルスであるピコルナウイルス科のメンバーである。エンテロウイルス68は、1962年にカリフォルニア州で初めて単離され、かつては希少と考えられたが、21世紀には世界的に急増傾向にある。急性弛緩性脊髄炎と呼ばれるポリオ様障害を引き起こすことが疑われている。

【0028】

EV68は、ポリオウイルス、コクサッキーウイルスおよびエコーウイルスを含むssRNAウイルスの群である100種類超のエンテロウイルスのうちの1つであり、エンベロープを有しない。他のすべてのエンテロウイルスとは異なり、EV68は、ヒトライノウイルスの両特徴である酸不安定性と、比較的低い最適増殖温度とを示す。これは、一部の研究者によって以前はヒトライノウイルス87と呼ばれていた。5歳未満の小児および喘息を有する小児がこの疾患のリスクが最も高いようであるが、喘息および免疫抑制を有する成人における疾患も報告されている。

【0029】

その発見以来、EV68は、孤立した症例でほとんどが散発的に報告されていた。2005～2011年に、6つのクラスター（10症例以上）またはアウトブレイクが、フィリピン、日本、オランダ、ならびに米国のジョージア州、ペンシルベニア州およびアリゾナ州から報告されている。EV68は、カリフォルニア州では、ポリオ様疾患の2012/13クラスターの最中に小児5例のうち2例に見られた。米国では、このウイルスは、2014年8月に呼吸器疾患のクラスターを引き起こした。10月半ばまでに、46の州およびコロンビア特別区で691例がEV-D68によって引き起こされる呼吸器疾患に罹患し、小児5例が死亡した。2016年には、29の症例が欧州で報告された（フランスおよびスコットランドで5件。スウェーデン、ノルウェーおよびスペインでそれぞれ3件）。

【0030】

2000年以降、元のウイルス株は多様化し、遺伝的に異なるアウトブレイク株、クレードB1を進化させた。AFMに関連しており、動物モデルでは神経障害性であるのは、古い株ではなくクレードB1である。典型的には北半球の8月および9月であるエンテロウイルスシーズン（おおよそ、春分と秋分との間の期間）の後期に症例が発生することが報告され

10

20

30

40

50

ている。

【0031】

EV68はほぼ呼吸器疾患のみを引き起こし、これは軽度から重度まで様々であるが、全くの無症状から、わずかなインフルエンザ様症状まで、呼吸器疾患を衰弱させるものまで、およびポリオ様症状を伴う症候群における稀な関与の疑いまで、様々な症状を引き起こす可能性がある。EV68は、あらゆるエンテロウイルスと同様に、様々な発疹、腹痛および軟便を引き起こし得る。初期症状は、鼻水、喉の痛み、咳、および発熱を含む、一般的な風邪の初期症状と同様である。疾患が進行するにつれて、肺炎のような呼吸困難、覚醒度の低下、尿生成の低下、および脱水を含むさらに重篤な症状が発生する可能性があり、呼吸不全につながる可能性がある。

10

【0032】

経験される症状の重症度は、当該の人口統計学的集団に依存するように思われる。専門家は、集団の大部分が実際にはエンテロウイルスに曝露されているが、健康な成人では症状が示されないと推定している。対照的に、EV-D68は、非常に若い小児、および非常に脆弱な小児では、不相応に衰弱性である。大部分が若年者である数百例（472例）がこの疾患に曝されたが、これらの患者のうち100例未満が重度の症状（麻痺など）と診断された。

【0033】

このウイルスについて陽性と判定されたカリフォルニア州の小児2例が、発症の48時間以内にピーク重症度に達する1本または複数本の手足の麻痺を有したため、このウイルスは、通常はポリオに起因する稀な筋力低下である急性弛緩性脊髄炎の原因の1つとして疑われている。運動機能の回復は、6ヶ月の追跡調査では不十分であった。2014年10月の時点で、CDCは、エンテロウイルスD68活性の増加と一致して、コロラド州における麻痺および/または頭蓋機能不全の10症例、および全国の他の報告を調査していた。2014年10月の時点で、実際の症例数は100件以上であると考えられていた。2018年の時点で、EV-D68と麻痺との関連は強く、6つのBradford Hill基準を完全に満たし、2つは部分的に満たしている。CDCは、2018年10月17日に、「今現在、ポリオウイルスがこれらのAFM症例の原因ではないことが分かっている。CDCは、AFM患者から得られたあらゆる便検体を検査しており、いずれの検体もポリオウイルスについて陽性と判定していない」と主張する声明を出した。2014年、CDCによって、検出を高速化するためのリアルタイムPCR検査が開発された。

20

30

【0034】

具体的な治療は存在せず、ワクチンもないため、この疾患は進行するほかなく、治療は症状を対象とするものである（対症療法）。ほとんどの人が完全に回復するが、一部は入院する必要があるが、一部はこのウイルスの結果として死亡している。5例のEV68麻痺症例では、ステロイド、静脈内免疫グロブリンおよび/または血漿交換法による治療が成功しなかった。運動機能の回復が見られなかったため、治療には明らかな効果はなかった。2015年の試験では、抗ウイルス薬プレコナリルがEV-D68の治療に有用であり得ることが示唆された。

【0035】

このウイルスは、唾液および痰ならびに便を介して拡散するため、手を洗うことが重要である。罹患した人々は、くしゃみまたは咳をする際に鼻および口を覆うなどの基本的な衛生対策によって、このウイルスの拡散を減少させようと試みることができる。表面および玩具の洗浄を含む他の手段。EV-D68感染を有する入院患者については、CDCは、あらゆるエンテロウイルスについて推奨されるように、および飛沫予防策を考慮するために、感染経路別予防策、すなわち、標準的予防策、接触予防策を推奨している。2003年のCDCによれば、医療現場の表面は、いくつかの非エンベロープ型ウイルス（例えば、ノロウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス）のいずれかに対するEPAラベルクレームを伴う病院グレードの消毒剤を用いて洗浄されるべきである。

40

【0036】

50

A. ウイルスエピトープ

血清抗体ウイルス中和能の測定値は、ポリクローナル抗体レパートリー全体の活性を反映する。ただし、ウイルスに対する体液性応答を完全に理解するためには、個々の抗体が結合する特異的ウイルスエピトープを定義し、特異的エピトープへの抗体結合が疾患を防御するかどうかを決定することが必要である。かつて、ライノウイルス-B14に対して惹起されたマウスモノクローナル抗体の試験によって、エンテロウイルス属のウイルスに対する4つの中和免疫エピトープ (Nim) が同定された (Rossmann et al., 1985)。EV-D68特異的モノクローナル抗体エピトープの試験はこれまで行われていない。ただし、EV-D68の結晶構造の決定から、ライノウイルスとの構造相同性の観察によって、EV-D68ビリオン上の4つのNimの可能性のある位置が示唆された (Liu et al., 2015a)。米国 (Zhang et al., 2015) または日本 (Imamura et al., 2014) からのEV-D68の近年のヒト単離株の表面タンパク質のアミノ酸配列とFermon参照ウイルス株のものとを比較する試験では、Nimおよび近くの隣接残基における変異が、特に、結晶構造が無秩序である、キャプシドタンパク質VP1のBCループおよびDEループに生じていることが示唆されている (Liu et al., 2015a)。これらのVP1多型は、既存の体液性免疫を回避することによってウイルスの病原性の増大に寄与する可能性がある。マウスモノクローナル抗体は市販されているが (供給元には、GeneTex、ThermoFisherおよびSigmaが含まれる)、免疫原として使用された特異的ウイルス表面タンパク質を列挙することを除けば、これらの抗体のエピトープに関する情報は入手できない。注目すべきことに、これらの市販の抗体のいくつかは、他のエンテロウイルス属ウイルスの免疫原から生成され、これは、EV-D68に結合するヘテロタイプ抗体の能力を示唆している。この可能性をさらに裏付けるように、2つのマウスmAbが40の異なるエンテロウイルス種に交差反応したが、興味深いことに、EV-D68は、それらが反応しなかった試験された唯一のウイルスであった (Miao et al., 2009)。他のタイプのエンテロウイルスによって誘導される抗体によるEV-D68のヘテロタイプ分子認識は、幼児期には、観察された普遍的なEV-D68血清有病率に寄与する可能性がある。EV-D68に対するヒト抗体エピトープの優れた特異性と、そのような抗体のタイプ特異性または幅広さを理解するには、自然感染によって誘導されるクローン化ヒトモノクローナル抗体を用いた試験が必要であろう。

【0037】

米国における2014年のEV-D68のアウトブレイクの間、ほぼすべてのウイルス単離株が新たに出現したB1クレードであり、密接に関連するB2クレードまたは遠く関連するDクレード由来のウイルスの検出は少なかった (Tan et al., 2016)。この試験では、対象の1例を除く全例がB1クレード単離株に感染していた (表E)。2014年以来、B3クレードウイルスが優勢であり、B1クレードウイルスはもはや伝播していない (Dyrdak et al., 2019)。2018年に、米国疾病管理予防センターによって配列決定されたEV-D68単離株は、いずれもB3クレード由来であった (Kujawski et al., 2019)。本発明者らは、最初に、B1クレードEV-D68単離株を使用して、50%細胞培養感染用量 (CCID₅₀) アッセイで各mAbのインビトロ中和能を測定した (図33A)。28個のmAbは、50 µg/mL未満の50%阻害濃度 (IC₅₀) で中和を示し、mAb EV68-159は、0.32 ng/mLのIC₅₀値で最も強い中和を示した (図41)。本発明者らは、Dクレード単離株に対して最も強力に中和する21個のmAbをさらに試験し、11個のmAbがそのウイルスを中和し、そのうち7個が異種ウイルスに対するIC₅₀値による効力の少なくとも10分の1の低下を示すことを見出した。Fermon株は1962年に得られた単離株であり、クレード分類スキームに適合しないほど現代のEV-D68単離株とは縁遠い (Tan et al., 2016)。9つのmAbは、Fermon実験室参照株を中和したが、現代のB1クレードウイルスを阻害するほど強力ではなかった。

【0038】

本発明者らは、中和アッセイが交差反応性を過小評価し得ることを認識し、上記と同じ間接ELISA手法を使用して、B1クレード、B2クレードまたはDクレード由来の代表的なEV-D68単離株への結合のために、50%有効濃度 (EC₅₀) の精製mAbを生成した (図33B～Cおよび図42)。B1クレード単離株に対する $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ の結合についてEC₅₀値を有す

るmAbのうち、いずれもがB2クレード単離株に結合したが、約半分がDクレード単離株にも結合した（図33Bおよび図41）。概して弱く結合したが、試験した全クレード由来のウイルスに交差反応した追加のクラスのmAbが観察された。

【0039】

現在まで、抗体-EV-D68相互作用の構造試験はマウスmAbに限定されている（Zheng et al.,2019）。本発明者らは、2つの強力に中和するヒトmAb、クレード特異的mAb EV68-159と、高度に交差反応性のmAb EV68-228とを選択して、クライオ電子顕微鏡法（クライオEM）試験のために、抗原結合断片（Fab）およびB1クレードEV-D68単離株との免疫複合体を作製した。最終的な密度マップは、2.9 Å（EV68-159）または3.1 Å（EV68-228）の分解能を達成した（図34A、図43、図44および表G）。構造から、2つの異なる結合部位が明らかにされた。EV68-159は、3回対称軸の周りに結合し、EV68-228は、キャニオン領域を形成する凹部間の5回軸の周りに結合した（図34A～C、図45）。したがって、各Fabについて、合計60コピーがウイルス粒子に結合した。ウイルス表面と相互作用したFab可変ドメインは、ウイルスクャプシドタンパク質と同様の強い密度を示し、各Fabの原子モデルを4つのウイルスクャプシドタンパク質とともに構築した。対照的に、ウイルス表面から遠くに位置するFab定常ドメインは、比較的弱い密度を示し、原子モデル構築から除外した。ポリペプチド鎖の骨格、およびアミノ酸側鎖の大部分は、密度マップでは十分に秩序化されており、ウイルス粒子とFab分子との間の結合界面の重要な特徴を示している。

【0040】

B. 神経疾患の動物モデル

インビトロで抗体によるウイルスの中和を測定することは、典型的には、抗体の抗ウイルス機能を特性評価するための最も迅速で再現性のある方法である。ただし、この試験様式は、補体活性化、または細胞表面Fc受容体との係合など、インビボでのみ作用する、抗体のFc部分によって媒介されるエフェクター機能を測定しない。その結果、インビトロ中和能の大きさは、インビボで観察されるウイルス複製の阻害または疾患に対する保護のレベルと完全に相関しない可能性がある（（Lu et al.,2018）に概説される）。抗体のFc媒介エフェクター機能の多くは、完全な保護効果を媒介するために自然免疫系または適応免疫系のFc受容体担持細胞を必要とする。前臨床試験では、体液性免疫の効果を評価するのに感染の小動物モデルが必要である。

【0041】

コロラド州（Hixon et al.,2017a;2017b）、ユタ州（Morrey et al.,2018）および中国（Zhang et al.,2018）の研究者は、2017年初期からEV-D68のマウスモデルを報告している。報告された3つのモデルではいずれも、10日齢以下のマウスにウイルスを接種する。これらのモデルにわたって、EV-D68は、腹腔内経路（Hixon et al.,2017a;2017b;Morrey et al.,2018;Zhang et al.,2018）、筋肉内経路（Hixon et al.,2017a;2017b）または脳内経路（Hixon et al.,2017b）によって投与された場合、弛緩性四肢麻痺および死を引き起こすことができることが示されている。注目すべきことに、鼻腔内接種は、試験した非近交系NIH Swiss Websterマウス73匹のうち2匹のみに麻痺を引き起こし、脊髄内でウイルスが検出された（Hixon et al.,2017b）のに対して、インターフェロンI型受容体およびインターフェロンII型受容体を欠くAG129マウスの鼻腔内接種は、マウス4匹のうち2匹に麻痺を引き起こし、脊髄ではなく筋肉内でウイルスが検出された（Morrey et al.,2018）。ただし、マウスを対象として体液性免疫を評価した試験ではいずれも、ウイルス接種の非生理学的経路が使用された。

【0042】

ウイルス抗原は、骨格筋（Morrey et al.,2018;Zhang et al.,2018）および脊髄（Hixon et al.,2017b;Morrey et al.,2018）における免疫染色によって組織内で可視化されている。筋肉および脊髄の両方の関与は、EV-D68が、2つの機構、すなわち、1）骨格筋に対する直接的な病理学的作用および2）中枢運動ニューロンの喪失によって麻痺を誘発し得ることを示唆する。脊髄内の運動ニューロンが感染し、これは灰白髄炎の病因に類

似している。免疫染色試験におけるマウスニューロン関与のこのパターンはまた、AFM患者の脊髄イメージング上の灰白質変化の所見とも相関する (Hixon et al., 2017b; Morrey et al., 2018)。さらに高感度のリアルタイム定量RT-PCR試験では、EV-D68 RNAは、筋肉および脊髄内で主に検出されたが、脳、心臓、肺、腸、肝臓、脾臓、腎臓内および血液中でも検出された (Zhang et al., 2018)。ただし、脊髄および筋肉以外では、検出されたRNAの量の重要性は疑わしいものであり、これらの組織に対する真のトロピズムではなく、これらの組織内の血液中に存在するウイルスゲノムコピーをよく反映している可能性がある。

【0043】

麻痺および致死のこれらのモデルを対象とした試験では、抗体が神経疾患から保護する能力の予備的試験が促進された。ナイーブマウスに受動的に移入された免疫マウス由来の熱不活化血清は、EV-D68を脳内経路によって直接接種した場合であっても、神経疾患を予防した (Hixon et al., 2017b)。また、ヒトIVIGの治療的投与は、マウスの感染後最大6日であっても運動障害を軽減し (Hixon et al., 2017a)、これは、IVIGにおけるEV-D68特異的抗体の高力価の所見と一致していた (Zhang et al., 2015)。この観察結果は、個々の患者がEV-D68と時間的に関連するAFMの特徴を有すると特定された後に、ワクチンまたはヒトモノクローナル抗体が治療効果を媒介することができるという希望をもたらす。さらに、EV-D68の公知のアウトブレイク中に母体の体液性免疫が喪失しつつある乳児および幼児などの集団に標的ワクチン接種または免疫予防を行えば、AFMの症例を予防することができる。

【0044】

C. 呼吸器疾患の動物モデル

EV-D68感染の現在のマウス試験の主な限界には、麻痺および死を誘導するための非生理学的な接種経路の使用、およびヒトではEV-D68感染の主な症状である呼吸器疾患の欠如がある。コットンラット (アラゲコットンラット (*Sigmodon hispidus*)) (Patel et al., 2016) およびフェレット (ムステラ・プトリウス・フロ (*Mustela putorius furo*)) (Zheng et al., 2017a) の両方について、各々の単一の試験では、EV-D68の鼻腔内接種が鼻および肺内でウイルスの複製をもたらし、肺内で炎症誘発性自然免疫分子転写物の増加を誘導することが実証された。接種したフェレットの約25%では、上気道感染 (咳、鼻汁および鼻乾燥) と一致する臨床症状も発現した。試験では、筋肉または中枢神経系組織内のEV-D68の存在について評価されておらず、明らかな四肢の衰弱または麻痺も認められなかった。以下にさらに記載される所見では、コットンラットのワクチン接種は、いくつかのレベルの既存の体液性免疫が呼吸器感染に対して完全に防御せず、実際に有害であり得ることを示した (Patel et al., 2016)。

【0045】

ヒト呼吸器ウイルス感染のモデルとしてのコットンラットおよびフェレットの理論的利点は、それらの呼吸上皮が、特に、ヒトでは高度に $\alpha 2,6$ -結合しているがマウスでは $\alpha 2,6$ -結合していない、上皮表面上のグリカンのシアリル化に関して、ヒトのものを比較的厳密に模倣し得ることである (Gagneux et al., 2003)。EV-D68は、インビトログリカンアレイでは、 $\alpha 2,3$ -結合シアル酸よりも $\alpha 2,6$ -結合シアル酸に優先的に結合した (Imamura et al., 2014)。蛍光標識レクチンによる気道の染色では、コットンラットは、それらの下気道では $\alpha 2,6$ -結合シアル酸のみを有し、上気道では $\alpha 2,6$ -結合シアル酸と $\alpha 2,3$ -結合シアル酸とが混在していることが示された (Blanco et al., 2018)。同様のレクチンに基づく方法を使用すると、フェレットは、上気道の上皮グリカン上に $\alpha 2,6$ -結合シアル酸を有し (Leigh et al., 1995)、下気道では $\alpha 2,6$ -結合シアル酸と $\alpha 2,3$ -結合シアル酸とが混在していることが示された (Zheng et al., 2017a)。ただし、ヒト (Walther et al., 2013)、マウス (Bern et al., 2013) およびフェレット (Jia et al., 2014) の呼吸器組織のさらに最近の高度なグライコミクス分析では、単に $\alpha 2,6$ -結合シアリル化の密度よりも複雑な一連のグリカン修飾が、様々な動物種に対する呼吸器ウイルスのトロピズムを決定する可能性が高いことが示された。それにもかかわらず、ヒトEV-D68呼吸器疾患を

模倣したラットおよびフェレットにおける初期試験の成功により、ヒト病理発生モデルとしてそれらをさらに開発することが促進されている。

【0046】

D. ワクチン

EV-D68の実験的ワクチン候補は未だ臨床開発に入っていないが、酵母細胞 (Zhang et al., 2018a) もしくは昆虫細胞 (Dai et al., 2018) 内で作製されたウイルス様粒子 (VLP) ワクチン、または β -プロピオラクトン不活化EV-D68 (Zhang et al., 2018) のいずれかをマウスに接種した初期試験は有望性を示している。VLPワクチンは、その後の致死的な腹腔内攻撃感染からマウスを保護する抗体応答を誘導した。これらのワクチン候補の各々では、ナイーブマウスへのワクチン免疫血清の受動的移入は、致死的な腹腔内攻撃感染からの保護に十分であった。VLPベースのワクチンの存在し得る欠点には、これらの合成構築物が粒子の表面上のあらゆる立体配座感受性構造を完全に再現するかどうかという不確実性がある。他のウイルスに対する多くの強力なヒトウイルス中和抗体は、厳しい立体配座制約を有する複雑な四次抗原部位を認識する (Crowe, JE, 2017)。VLP上のヒト抗体エピトープの完全性は、これらのエピトープが未知であるため、現在評価することができない。これらのマウスワクチン試験の有望性をさらに抑えるものには、生きたEV-D68またはUV不活化EV-D68のいずれかを筋肉内接種し、その後、同種の生ウイルスを鼻腔内負荷したコットンラットにおける所見があり、この所見では、ナイーブ動物の感染と比較して、炎症の増強が肺に見られた (Patel et al., 2016)。具体的には、UV不活化ウイルスワクチン接種は、肺または鼻腔内でウイルス複製を制限せず、得られたサイトカインシグネチャーを、生ウイルスワクチン接種からの免疫で見られるバランスのとれたTh1表現型およびTh2表現型ではなく、Th2表現型に向けてゆがめた。呼吸器合胞体ウイルス (Karron, R, 2018) および麻疹 (Strebel et al., 2018) に対する不活化ウイルスワクチン候補では、炎症および疾患の増強が認められている。これらの矛盾した所見を考慮すると、EV-D68ワクチン候補によって引き起こされる防御または増強の免疫相関をさらに慎重に試験することが必要である。

【0047】

II. モノクローナル抗体およびその生成

「単離された抗体」は、その天然環境の成分から分離および/または回収されたものである。その天然環境の汚染成分は、抗体の診断的使用または治療的使用を妨げる材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質を含み得る。特定の態様では、抗体は、(1) ローリー法によって決定した場合、抗体の95重量%超、最も具体的には99重量%超まで、(2) スピニングカップシークエネーターを使用してN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3) クーマシーブルーもしくは銀染色を使用した還元条件もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。単離された抗体は、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内にインサイチューで抗体を含む。ただし、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0048】

塩基性4本鎖抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドとともに5つの塩基性ヘテロ四量体単位からなり、したがって10個の抗原結合部位を含むが、分泌されたIgA抗体は重合して、J鎖とともに2~5つの塩基性4鎖単位を含む多価集合体を形成することができる。IgGの場合、4鎖単位は一般に約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に連結され、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて1つまたは複数のジスルフィド結合によって互いに連結される。各H鎖およびL鎖はまた、規則的に間隔を置いて配置された鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端に可変領域(V_H)を有し、その後に α 鎖および γ 鎖の各々について3つの定常ドメイン(C_H)が続く、 μ およびアイソタイプについて4つの C_H ドメインが続く。各L鎖は、N末端に可変領域(V_L)を有し、その後にその他端に定常ドメイン(C_L)が続く。 V_L は

V_H と整列し、 C_L は重鎖の第1の定常ドメイン (C_{H1})と整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域との間に界面を形成すると考えられている。 V_H と V_L との対合は、単一の抗原結合部位を一緒になって形成する。様々なクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6を参照されたい。

【0049】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメイン (C_L) のアミノ酸配列に基づいて、 κ および λ と呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てられ得る。免疫グロブリンは、それらの重鎖 (C_H) の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。免疫グロブリンには、5つのクラス、すなわち、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれる重鎖を有するIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがある。それらの γ クラスおよび α クラスは、 C_H の配列および機能の比較的わずかな差に基づいてサブクラスにさらに分割され、ヒトは以下のサブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2を発現する。

【0050】

用語「可変」は、Vドメインの特定のセグメントの配列が抗体間で大幅に異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。ただし、可変性は、可変領域の110アミノ酸スパンにわたって均一に分布しているわけではない。代わりに、V領域は、それぞれ9~12アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極端な可変性の比較的小さい領域によって分離された15~30アミノ酸のフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる比較的不変の伸長部からなる。天然の重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、3つの超可変領域によって接続された、 β シート構造を主に採用する4つのFRを含み、3つの超可変領域は、 β シート構造を接続し、場合によっては β シート構造の一部を形成するループを形成する。各鎖内の超可変領域は、FRによって近接して一緒に保持され、他方の鎖の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) を参照)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞食作用 (ADCP)、抗体依存性好中球食作用 (ADNP) および抗体依存性補体沈着 (ADCD) における抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。

【0051】

本明細書において使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に関与する、抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基 (例えば、Kabatナンバリングシステム; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) に従ってナンバリングした場合、 V_L 内の約残基24~34 (L1)、50~56 (L2) および89~97 (L3)、ならびに V_H 内の約残基31~35 (H1)、50~65 (H2) および95~102 (H3)) ; および/または「超可変ループ」からの残基 (例えば、Chothiaナンバリングシステム; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) に従ってナンバリングした場合、 V_L 内の残基24~34 (L1)、50~56 (L2) および89~97 (L3)、ならびに V_H 内の残基26~32 (H1)、52~56 (H2) および95~101 (H3)) ; および/または「超可変ループ」/CDRからの残基 (例えば、IMGTナンバリングシステム; Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000) に従ってナンバリングした場合、 V_L 内の残基27~38 (L1)、56~65 (L2) および105~120 (L3)、ならびに V_H 内の残基27~38 (H1)、56~65 (H2) および105~120 (H3)) を含む。任意で、抗体は、AHO; Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001) に従ってナンバリングした場合、以下の点、すなわち、 V_L 内の28、36 (L1)、63、74~75 (L2) および123 (L3)、ならびに V_{subH} 内の28、36 (H1)、63、74~75 (H2) および

123 (H3) のうちの1つまたは複数に対称的な挿入を有する。

【0052】

「生殖細胞系核酸残基」とは、定常領域または可変領域をコードする生殖細胞系遺伝子に天然に存在する核酸残基を意味する。「生殖細胞系遺伝子」は、生殖細胞（すなわち、卵または精子になるように定められた細胞）に見出されるDNAである。「生殖細胞系変異」は、単一細胞段階で生殖細胞または接合子に生じた特定のDNAの遺伝的变化を指し、子孫に伝達されると、そのような変異は体の全細胞に組み込まれる。生殖細胞系変異は、単一の体細胞で獲得される体細胞変異とは対照的である。場合によっては、可変領域をコードする生殖細胞系DNA配列内のヌクレオチドが変異し（すなわち、体細胞変異）、異なるヌクレオチドによって置換される。

10

【0053】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在し得る天然に存在する可能性のある変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原部位を対象とする。さらに、異なる決定基（エピトープ）を対象とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。モノクローナル抗体は、それらの特異性に加えて、他の抗体によって汚染されずに合成され得るという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本開示において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製され得るか、細菌細胞、真核生物細胞または植物細胞（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）を対象とした組換えDNA法を使用して、抗原特異的B細胞、感染もしくは免疫化に応答する抗原特異的形質芽球、またはバルク選別された抗原特異的コレクション内の単一細胞からの連結された重鎖および軽鎖の捕捉の単一細胞選別の後に作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に記載されている技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

20

【0054】

A. 一般的な方法

30

EV-D68に結合するモノクローナル抗体は、いくつかの用途を有することが理解される。これらには、EV-D68感染の検出および診断、ならびにEV-D68感染の治療に使用するための診断キットの製造が含まれる。これらの状況では、そのような抗体を診断剤もしくは治療剤に連結するか、それらを競合アッセイにおいて捕捉剤もしくは競合剤として使用するか、またはそれらに追加の薬剤を付着させることなくそれらを個別に使用してもよい。抗体は、以下にさらに説明されるように、変異または修飾され得る。抗体を調製し、特性評価するための方法は、当技術分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 米国特許第4,196,265号を参照）。

【0055】

40

モノクローナル抗体 (MAb) を生成するための方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するための方法と同じ道筋に沿って開始する。これらの方法ではともに、第1の工程は、適切な宿主の免疫化、または以前の自然感染、もしくは認可ワクチンもしくは実験ワクチンによるワクチン接種のために免疫性である対象の特定である。当技術分野において周知のように、免疫化のための所与の組成物は、その免疫原性が異なり得る。したがって、ペプチド免疫原またはポリペプチド免疫原を担体にカップリングすることによって達成され得るように、宿主免疫系を増強することが多くの場合必要である。例示的かつ好ましい担体は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) およびウシ血清アルブミン (BSA) である。オボアルブミン、マウス血清アルブミンまたはウサギ血清アルブミンなどの他のアルブミンも担体として使用することができる。ポリペプチドを担体タンパク質にコン

50

ジュゲートするための手段は当技術分野において周知であり、グルタルアルデヒド、m-マレイミドベンコイル (maleimidobencoyl) -N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス-ピアゾ化ベンジジンを含む。また、当技術分野において周知のように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる、免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって増強され得る。動物では、例示的かつ好ましいアジュバントには、完全フロイントアジュバント（死滅した結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を含有する、免疫応答の非特異的刺激物質）、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが含まれ、ヒトでは、ミョウバン、CpG、MFP59、および免疫刺激分子の組合せ (AS01またはAS03などの「アジュバント系」) が含まれる。EV-D68特異的B細胞を誘導するための追加の実験的接種形態が可能であり、これには、ナノ粒子ワクチン、または物理的送達系（脂質ナノ粒子、または金微粒子銃ビーズ上など）においてDNA遺伝子もしくはRNA遺伝子として送達され、針、遺伝子銃、経皮的エレクトロポレーション装置を用いて送達される遺伝子コード抗原が含まれる。抗原遺伝子はまた、複製能のあるまたは欠陥のあるウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルスもしくはアルファウイルスレプリコン、またはウイルス様粒子によってコードされるように担持され得る。

10

【0056】

天然病原体に対するヒト抗体の場合、好適な手法は、病原体に曝露された対象、例えば、疾患に罹患したと診断された対象、または病原体に対する防御免疫を生じさせるため、もしくは実験ワクチンの安全性もしくは有効性を試験するためにワクチン接種された対象を特定することである。循環する抗病原体抗体を検出することができ、次いで、抗体陽性対象由来のB細胞をコードまたは産生する抗体を得てもよい。

20

【0057】

ポリクローナル抗体の生成に使用される免疫原組成物の量は、免疫原、および免疫化に使用される動物の性質によって異なる。様々な経路を使用して免疫原を投与することができる（皮下、筋肉内、皮内、静脈内および腹腔内）。ポリクローナル抗体の生成は、免疫化後の様々な時点で免疫化された動物の血液をサンプリングすることによってモニタリングしてもよい。第2のブースター注入が投与されてもよい。ブーストおよび滴定のプロセスは、好適な力価が達成されるまで繰り返される。所望のレベルの免疫原性が得られる場合、免疫化された動物を採血し、血清を単離し、保存することができ、および/またはその動物を使用してMAbを生成することができる。

30

【0058】

免疫化後、MAb生成プロトコルに使用するために、抗体を産生する可能性のある体細胞、具体的にはBリンパ球（B細胞）を選択する。これらの細胞は、生検された脾臓、リンパ節、扁桃もしくはアデノイド、骨髓吸引物もしくは骨髓生検、肺もしくは消化管などの粘膜器官から得られた組織生検、または循環血液から得てもよい。次いで、免疫化された動物または免疫ヒト由来の抗体産生Bリンパ球を、免疫化された動物、またはヒト細胞もしくはヒト/マウスキメラ細胞と一般に同じ種の1つである不死性ミエローマ細胞の細胞と融合させる。ハイブリドーマ生成融合手順に使用するのに適したミエローマ細胞株は、好ましくは、非抗体産生性であり、高い融合効率を有し、所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を補助する特定の選択培地中で増殖することを不可能にする酵素欠損を有する。当業者に公知であるように、多数のミエローマ細胞のいずれか1つを使用してもよい（Goding, pp.65-66, 1986; Campbell, pp.75-83, 1984）。HMA2.5細胞またはMFP-2細胞は、そのような細胞の特に有用な例である。

40

【0059】

抗体産生脾臓細胞または抗体産生リンパ節細胞とミエローマ細胞とのハイブリッドを生成する方法は、通常、体細胞とミエローマ細胞とを2:1の比率で混合することを含むが、この比率は、細胞膜の融合を促進する単数または複数の作用物質（化学的または電氣的）の存在下で、それぞれ約20:1～約1:1まで変動し得る。場合によっては、最初の工程としてのエプスタイン・バー（Epstein Barr）ウイルス（EBV）によるヒトB細胞の形質転換

50

は、B細胞のサイズを増加させ、比較的大きなサイズのエローム細胞との融合を増強する。EBVによる形質転換効率は、形質転換培地中でCpGおよびChk2阻害薬を使用することによって増強される。あるいは、ヒトB細胞は、追加の可溶性因子、例えば、IL-21、およびTNFスーパーファミリーのII型メンバーであるヒトB細胞活性化因子（BAFF）を含有する培地中で、CD40リガンド（CD154）を発現するトランスフェクト細胞株と共培養することによって活性化され得る。センダイウイルス（Sendai virus）を使用する融合法は、KohlerおよびMilstein（1975;1976）によって記載されており、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば37%（v/v）PEGを使用する融合法は、Geftter et al.（1977）によって記載されている。電気誘導融合法の使用も適切であり（Goding, pp.71-74, 1986）、効率を向上させるプロセスが存在する（Yu et al., 2008）。融合手順は、通常、約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-8} の低頻度で生存可能なハイブリッドを生成するが、最適化された手順では、200に1に近い融合効率を達成することができる（Yu et al., 2008）。ただし、生存可能な融合したハイブリッドは、選択培地中で培養することによって、親の注入された細胞（特に、通常は無期限に分裂し続ける注入されたエローム細胞）から分化するため、融合の比較的低い効率は問題を引き起こさない。選択培地は、一般に、組織培養培地中のヌクレオチドのデノボ合成を遮断する作用物質を含有するものである。例示的かつ好ましい作用物質は、アミノプテリン、メトトレキセートおよびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成を遮断するが、アザセリンはプリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキセートが使用される場合、培地（HAT培地）には、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンが補充される。アザセリンが使用される場合、培地にはヒポキサンチンが補充される。B細胞源がEBV形質転換ヒトB細胞株である場合、エロームに融合していないEBV形質転換株を排除するために、ウアバインが加えられる。

【0060】

好ましい選択培地は、HAT、またはウアバインを含むHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を操作することができる細胞のみが、HAT培地中で生存することができる。エローム細胞は、サルベージ経路の重要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR）を欠損しており、生存することができない。B細胞はこの経路を操作することができるが、培養中の寿命は限られており、一般に約2週間以内に死亡する。したがって、選択培地中で生存することができる唯一の細胞は、エローム細胞およびB細胞から形成されたハイブリッドである。融合に使用されるB細胞の供給源がEBV形質転換B細胞の株である場合、本明細書中のように、ウアバインはまた、EBV形質転換B細胞が薬物殺傷に感受性であるが、使用されるエロームパートナーがウアバイン耐性であるように選択されるため、ハイブリッドの薬物選択にも使用され得る。

【0061】

培養は、特異的ハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。典型的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート内の単一クローン希釈によって細胞を培養し、続いて（約2~3週間後に）個々のクローン上清を所望の反応性について試験することによって行われる。アッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどのように、高感度で、単純かつ迅速でなければならない。次いで、選択されたハイブリドーマを段階希釈するか、またはフローサイトメトリーソーティングによって単一細胞選別し、個々の抗体産生細胞株にクローニングし、次いで、そのクローンを無限に増殖させてmAbを提供することができる。この細胞株は、2つの基本的な方法でmAb生成のために利用され得る。ハイブリドーマの試料を動物（例えばマウス）に注射することができる（多くの場合、腹腔腔に）。任意で、動物は、注射前に炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの油によってプライミングされる。ヒトハイブリドーマをこのように使用する場合、腫瘍拒絶を防ぐために、SCIDマウスなどの免疫無防備状態のマウスに注射することが最適である。注射された動物は、融合細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発症する。次いで、動物の体液、例えば、血清または腹

水を穿刺して、高濃度のMAbを提供することができる。個々の細胞株をインビトロで培養することもでき、この場合、MAbは、それらが高濃度で容易に得られ得る培養培地に自然に分泌される。あるいは、ヒトハイブリドーマ細胞株をインビトロで使用して、細胞上清中で免疫グロブリンを生成することができる。細胞株は、高純度のヒトモノクローナル免疫グロブリンを回収する能力を最適化するために、無血清培地中での増殖に適合させることができる。

【0062】

いずれの手段によって生成されたMAbも、所望であれば、濾過、遠心分離および様々なクロマトグラフィー法、例えば、FPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーを使用して、さらに精製されてもよい。本開示のモノクローナル抗体の断片は、ペプシンまたはパ

10

【0063】

モノクローナル抗体を生成するために分子クローニング手法が使用され得ることも企図される。関心対象の抗原によって標識された単一B細胞は、常磁性ビーズ選択またはフローサイトメトリーソーティングを使用して物理的に選別され得、次いで、RNAが、単一細胞、およびRT-PCRによって増幅された抗体遺伝子から単離され得る。あるいは、抗原特異的バルク選別された細胞集団を微小胞内に分離し、重鎖アンプリコンと軽鎖アンプリコンとの物理的連結、または小胞からの重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子との共通バーコード化を使用して、一致した重鎖可変遺伝子と軽鎖可変遺伝子とを単一細胞から回収することができる。単一細胞由来の一致した重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子は、細胞1つ当たり1つのバーコードを用いて転写物をマーキングするためのRT-PCRプライマーおよびバーコードを担持する細胞透過性ナノ粒子によって細胞を処理することによって、抗原特異的B細胞の集団から得ることもできる。抗体可変遺伝子はまた、ハイブリドーマ株のRNA抽出によって単離され得、抗体遺伝子はRT-PCRによって得られ、免疫グロブリン発現ベクターにクローニングされ得る。あるいは、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーが、細胞株から単離されたRNAから調製され、適切な抗体を発現するファージミドが、ウイルス抗原を使用したパニングによって選択される。従来のハイブリドーマ技術に対するこの手法の利点は、約 10^4 倍もの数の抗体を一回で生成およびスクリーニングすることができること、ならびにH鎖とL鎖との組合せによって新しい特異性が生成され、これにより、適切な抗体を見出す可能性がさらに高まることである。

20

30

【0064】

本開示において有用な抗体の生成を教示する、各々参照により本明細書に組み入れられる他の米国特許には、コンビナトリアル手法を使用したキメラ抗体の生成を記載する米国特許第5,565,332号、組換え免疫グロブリン調製物を記載する米国特許第4,816,567号、および抗体-治療剤コンジュゲートを記載する米国特許第4,867,973号が含まれる。

【0065】

B. 本開示の抗体

40

本開示による抗体は、第1の例では、それらの結合特異性によって定義され得る。当業者に周知の技術を使用して所与の抗体の結合特異性/親和性を評価することによって、当業者であれば、そのような抗体が本特許請求の範囲内に入るかどうかを決定することができる。例えば、所与の抗体が結合するエピトープは、抗原分子内に位置する3個以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20）のアミノ酸の単一の連続配列からなり得る（例えば、ドメイン内の線状エピトープ）。あるいは、エピトープは、抗原分子内に位置する複数の非連続アミノ酸（またはアミノ酸配列）からなり得る（例えば、立体構造エピトープ）。

【0066】

当業者に公知の様々な技術を使用して、抗体がポリペプチドまたはタンパク質内の「1

50

つまたは複数のアミノ酸と相互作用する」かどうかを決定することができる。例示的な技術には、例えば、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に記載されているものなどの常用的な交差遮断アッセイが含まれる。交差遮断は、ELISA、バイオレイヤー干渉法または表面プラズモン共鳴などの様々な結合アッセイで測定することができる。他の方法には、アラニン走査変異分析、ペプチドブロット分析 (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248:443-63)、ペプチド切断分析、単一粒子再構成を使用する高分解能電子顕微鏡法技術、クライオEM、またはトモグラフィ、結晶学的試験およびNMR分析が含まれる。さらに、エピトープ切除、エピトープ抽出、および抗原の化学修飾などの方法を使用することができる (Tomer (2000) Prot. Sci. 9:487-496)。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用することができる別の方法は、質量分析によって検出される水素/重水素交換である。一般的に言えば、水素/重水素交換法は、関心対象のタンパク質を重水素標識し、続いて、抗体を重水素標識タンパク質に結合させることを含む。次に、タンパク質/抗体複合体を水に移し、抗体複合体によって保護されているアミノ酸内の交換可能なプロトンが、界面の一部ではないアミノ酸内の交換可能なプロトンよりも遅い速度で重水素から水素への逆交換を受ける。その結果、タンパク質/抗体界面の一部を形成するアミノ酸は、重水素を保持するため、界面に含まれないアミノ酸と比較して比較的高い質量を示し得る。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析に供し、それによって、抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267:252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265Aを参照されたい。抗体がEV-D68を中和する場合、高濃度の抗体の存在下でインビトロまたは動物モデルにおいてEV-D68を増殖させることによって、抗体エスケープ変異体バリエーション生物を単離することができる。抗体が標的とする抗原をコードするEV-D68遺伝子の配列分析は、抗体エスケープを付与する変異を明らかにし、エピトープ内の残基、またはエピトープの構造にアロステリックに影響を及ぼす残基を示す。

【0067】

用語「エピトープ」は、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、タンパク質の三次フォールディングによって並置された連続アミノ酸または非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露時に保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒による処理時に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的立体配座で少なくとも3個、さらに一般的には少なくとも5個または少なくとも8~10個のアミノ酸を含む。

【0068】

修飾支援プロファイリング (MAP) は、抗原構造に基づく抗体プロファイリング (ASAP) としても知られており、化学的または酵素的に修飾された抗原表面に対する各抗体の結合プロファイルの類似性に従って、同じ抗原を対象とする多数のモノクローナル抗体 (mAb) をカテゴリー化する方法である (参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第2004/0101920号を参照)。各カテゴリーは、別のカテゴリーによって表されるエピトープとは明確に異なるか、そのようなエピトープと部分的に重複する固有のエピトープを反映し得る。この技術は、特性評価が、遺伝的に異なる抗体に焦点を当てることができるように、遺伝的に同一の抗体の迅速なフィルタリングを可能にする。ハイブリドーマスクリーニングに適用される場合、MAPは、所望の特性を有するmAbを産生する希少なハイブリドーマクローンの同定を容易にし得る。MAPを使用して、本開示の抗体を異なるエピトープに結合する抗体の群に選別してもよい。

【0069】

本開示は、同じエピトープ、またはエピトープの一部に結合し得る抗体を含む。同様に、本開示はまた、標的またはその断片への結合について、本明細書において記載される具体的な例示的な抗体のいずれかと競合する抗体を含む。抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するか、参照抗体と結合について競合するかどうかは、当技術分野において公知の

常用的な方法を使用することによって容易に決定することができる。例えば、試験抗体が参照と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体を飽和条件下で標的に結合させる。次に、標的分子に結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が参照抗体との飽和結合後に標的分子に結合することができる場合、試験抗体は参照抗体とは異なるエピトープに結合するとの結論を下すことができる。一方、試験抗体が参照抗体との飽和結合後に標的分子に結合することができない場合、試験抗体は、参照抗体によって結合されたエピトープと同じエピトープに結合し得る。

【0070】

抗体が参照抗EV-D68抗体と結合について競合するかどうかを決定するために、上記の結合方法を2つの方向で行う。第1の方向では、参照抗体を飽和条件下でEV-D68抗原に結合させ、続いて、EV-D68抗原への試験抗体の結合を評価する。第2の方向では、試験抗体を飽和条件下でEV-D68抗原分子に結合させ、続いて、EV-D68抗原への参照抗体の結合を評価する。両方向で、第1の（飽和）抗体のみがEV-D68に結合することができる場合、試験抗体および参照抗体はEV-D68への結合について競合するとの結論が下される。当業者には理解されるように、参照抗体と結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合するわけではないが、重複または隣接するエピトープに結合することによって参照抗体の結合を立体的に遮断し得る。

【0071】

2つの抗体は、各々が抗原への他方の結合を競合的に阻害（遮断）する場合、同じまたは重複するエピトープに結合する。すなわち、1倍、5倍、10倍、20倍または100倍過剰の一方の抗体は、競合結合アッセイで測定した場合に、他方の結合を少なくとも50%、好ましくは75%、90%またはさらには99%阻害する（例えば、Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502を参照）。あるいは、一方の抗体の結合を低減または排除する、抗原内の本質的にあらゆるアミノ酸変異が他方の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を低減または排除する一部のアミノ酸変異が他方の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は重複するエピトープを有する。

【0072】

次いで、試験抗体の結合の観察された欠如が実際に参照抗体と同じエピトープへの結合によるものであるかどうか、または立体遮断（または別の現象）が、観察された結合の欠如の原因であるかどうかを確認するために、追加の常用的な実験（例えば、ペプチドの変異分析および結合分析）を行うことができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野において利用可能な任意の他の定量的もしくは定性的抗体結合アッセイを使用して行うことができる。また、EMまたは結晶解析法による構造試験では、結合について競合する2つの抗体が同じエピトープを認識するかどうかを実証され得る。

【0073】

別の局面では、それぞれ表3および表4に示す重鎖および軽鎖由来のクローンと組にしたCDRを有するモノクローナル抗体が提供される。そのような抗体は、本明細書において記載される方法を使用して、実施例の節において以下に説明されるクローンによって生成され得る。

【0074】

別の局面では、抗体は、追加の「フレームワーク」領域を含むそれらの可変配列によって定義され得る。これらは、完全な可変領域をコードするかまたは表す表1および表2に提供されている。さらに、以下にさらに詳細に説明される方法を任意で使用して、これらの配列から抗体配列を変化させてもよい。例えば、核酸配列は、（a）可変領域が、軽鎖および重鎖の定常ドメインから分離され得ること、（b）核酸が、それによってコードされる残基に影響を及ぼさずに上記のものから変化し得ること、（c）核酸が、所与の割合、例えば、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性によって上記のものから変化し得ること、（d）核酸が、

約50℃～約70℃の温度で約0.02M～約0.15MのNaClによって提供されるような、低塩および/または高温条件によって例示されるような高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする能力によって上記のものから変化し得ること、(e) アミノ酸が、所与の割合、例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性によって上記のものから変化し得ること、または(f) アミノ酸が、保存的置換（以下に説明）を可能にすることによって上記のものから変化し得ることという点で上記のものから変化し得る。上記の各々は、表1に記載の核酸配列および表2のアミノ酸配列に適用される。

【0075】

ポリヌクレオチド配列とポリペプチド配列とを比較する場合、以下に記載されるように、2つの配列内のヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、最大の対応についてアライメントされた際に同じである場合、2つの配列は「同一」とであると言われる。2つの配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局所領域を同定および比較するために比較ウィンドウにわたって配列を比較することによって行われる。本明細書において使用される「比較ウィンドウ」は、2つの配列が最適にアライメントされた後、配列が、同じ数の連続する位置の参照配列と比較され得る、少なくとも約20個の連続する位置、通常は30～約75、40～約50の連続する位置のセグメントを指す。

【0076】

比較のための配列の最適なアライメントは、デフォルトパラメータを使用して、Lasergene suite of bioinformaticsソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) 内のMegalignプログラムを使用して行われ得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載されているいくつかのアライメントスキームを具体化する: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins--Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogeny pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

【0077】

あるいは、比較のための配列の最適なアライメントは、Smith and Waterman (1981) Add. APL Math 2:482の局所同一性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の同一性アライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性法の探索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装によって (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA)、または調査によって行われ得る。

【0078】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの特定の一例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、例えば、本明細書において記載されるパラメータとともに使用して、本開示のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのパーセント配列同一性を決定することができる。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センターを通じて公的に入手可能である。抗体配列の再編成された性質、および各遺伝子の可変長は、単一の抗体配列について複数回のBLAST

探索を必要とする。また、異なる遺伝子の手作業によるアセンブリは困難であり、間違いが起こりやすい。配列分析ツールIgBLAST（ワールドワイドウェブ、ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）は、生殖細胞系V遺伝子、生殖細胞系D遺伝子および生殖細胞系J遺伝子に対する一致、再編成接合部における詳細、Ig Vドメインフレームワーク領域および相補性決定領域の描写を特定する。IgBLASTは、ヌクレオチド配列またはタンパク質配列を分析することができ、配列をバッチで処理することができ、生殖細胞系遺伝子データベースおよび他の配列データベースに対する検索を同時に可能にして、最良に一致する生殖細胞系V遺伝子の場合により欠失する可能性を最小限に抑える。

【0079】

例示としての一例では、ヌクレオチド配列の場合、パラメータM（一对の一致残基の報酬スコア値；常に >0 ）およびN（不一致残基のペナルティスコア；常に <0 ）を使用して、累積スコアが計算され得る。累積アライメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ減少した場合、1つもしくは複数の負のスコアの残基アライメントの蓄積のために累積スコアがゼロもしくはそれ以下になった場合、またはいずれかの配列の末端に到達した場合、各方向における文字列ヒットの延長が停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アライメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、11の文字列長さ（W）、および10の期待値（E）、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff and Henikoff (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.US A 89:10915を参照）アライメント、50の（B）、10の期待値（E）、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、および両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。

【0080】

アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを使用して累積スコアを計算することができる。累積アライメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ減少した場合、1つもしくは複数の負のスコアの残基アライメントの蓄積のために累積スコアがゼロもしくはそれ以下になった場合、またはいずれかの配列の末端に到達した場合、各方向における文字列ヒットの延長が停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アライメントの感度および速度を決定する。

【0081】

1つの手法では、「配列同一性のパーセンテージ」は、少なくとも20の位置の比較ウィンドウにわたって最適にアライメントさせた2つの配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適なアライメントのために、（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して、20パーセント以下、通常5～15パーセント、または10～12パーセントの付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得て、一致した位置の数を参照配列内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【0082】

抗体を定義するさらに別の方法は、以下に記載される抗体およびそれらの抗原結合断片のいずれかの「誘導体」としてである。用語「誘導体」は、抗原に免疫特異的に結合するが、「親」（または野生型）分子と比較して1、2、3、4、5またはそれ以上のアミノ酸の置換、付加、欠失または修飾を含む抗体またはその抗原結合断片を指す。そのようなアミノ酸の置換または付加は、天然に存在するアミノ酸残基（すなわち、DNAによってコードされた）または天然に存在しないアミノ酸残基を導入し得る。用語「誘導体」は、例えば、増強されたまたは損なわれたエフェクター特性または結合特性を示すヴァリエントFc領域を有する例えば抗体などを形成するように変化したCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域またはCH4領域を有するバリエントを包含する。用語「誘導体」は、非アミノ酸修飾、例えば、グリコシル化され得る（例えば、マンノース、2-N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、グルコース、シアル酸、5-N-アセチルノイラミン酸、5-グリコールノイラミン酸などの含有量が増加している）、アセチル化され得る、ペグ化され得

る、リン酸化され得る、アミド化され得る、公知の保護/ブロッキング基、タンパク質分解切断によって誘導体化され得る、細胞リガンドまたは他のタンパク質に連結され得るアミノ酸などをさらに包含する。いくつかの態様では、炭水化物修飾の変化は、抗体の可溶化、抗体の細胞内輸送および分泌の促進、抗体集合の促進、立体配座の完全性、ならびに抗体媒介エフェクター機能のうちの1つまたは複数を調節する。特定の態様では、炭水化物修飾の変化は、炭水化物修飾を欠く抗体と比較して抗体媒介エフェクター機能を増強する。抗体媒介エフェクター機能の変化をもたらす炭水化物修飾は、当技術分野において周知である（例えば、Shields,R.L.et al. (2002) 「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,」 J.Biol.Chem.277 (30) :26733-26740;Davies J .et al. (2001) 「Expression Of GNTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line:Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC γ RIII,」 Biotechnology & Bioengineering 74 (4) :288-294を参照）。炭水化物含有量を変化させる方法は当業者に公知であり、例えば、Wallick,S.C.et al. (1988) 「Glycosylation Of A V H Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1----6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,」 J.Exp.Med.168 (3) :1099-1109;Tao,M.H.et al. (1989) 「Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG.Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region,」 J.Immunol.143 (8) :2595-2601;Routledge,E.G.et al. (1995) 「The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody,」 Transplantation 60 (8) :847-53;Elliott,S.et al. (2003) 「Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering,」 Nature Biotechnol.21:414-21;Shields,R.L.et al. (2002) 「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,」 J.Biol.Chem.277 (30) :26733-26740) を参照されたい。

【0083】

誘導体抗体または誘導体抗体断片は、ビーズベースもしくは細胞ベースのアッセイ、または動物モデルを対象としたインビボ試験によって測定した場合、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、抗体依存性好中球食作用（ADNP）または抗体依存性補体沈着（ADCD）の機能に好ましいレベルの活性を付与するために、操作された配列またはグリコシル化状態を用いて生成され得る。

【0084】

誘導体抗体または誘導体抗体断片は、限定されることなく、特異的な化学的切断、アセチル化、製剤化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、当業者に公知の技術を使用した化学修飾によって修飾され得る。一態様では、抗体誘導体は、親抗体と同様または同一の機能を有する。別の態様では、抗体誘導体は、親抗体と比較して変化した活性を示す。例えば、誘導体抗体（またはその断片）は、親抗体よりも強くそのエピトープに結合するか、またはタンパク質分解に対して親抗体よりも耐性であり得る。

【0085】

C. 抗体配列の操作

様々な態様では、発現の改善、交差反応性の改善またはオフターゲット結合の減少などの様々な理由のために、同定された抗体の配列を操作することを選択することができる。修飾された抗体は、標準的な分子生物学的技術による発現、またはポリペプチドの化学合成を含む、当業者に公知の任意の技術によって作製され得る。組換え発現のための方法は、この文献中の他の箇所でも扱われる。以下は、抗体操作のための関連する目標技術の一般的な説明である。

【0086】

ハイブリドーマを培養し、次いで、細胞を溶解し、全RNAを抽出してもよい。RTとともに

にランダムヘキサマーを使用してRNAのcDNAコピーを生成してもよく、次いで、あらゆるヒト可変遺伝子配列を増幅すると予測されるPCRプライマーのマルチプレックス混合物を使用してPCRを行ってもよい。PCR産物をpGEM-T Easyベクターにクローニングし、次いで、標準的なベクタープライマーを使用した自動DNA配列決定によって配列決定することができる。結合および中和のアッセイは、ハイブリドーマ上清から回収され、Protein Gカラムを使用してFPLCによって精製された抗体を使用して行ってもよい。

【0087】

組換え完全長IgG抗体は、クローニングベクターからの重鎖Fv DNAおよび軽鎖Fv DNAをIgGプラスミドベクターにサブクローニングし、293（例えばFreestyle）細胞またはCHO細胞にトランスフェクトすることによって生成することができ、293細胞またはCHO細胞の上清から抗体を回収および精製することができる。他の適切な宿主細胞系には、細菌、例えば大腸菌（E.coli）、昆虫細胞（S2、Sf9、Sf29、High Five）、植物細胞（例えば、ヒト様グリカンの操作の有無にかかわらず、タバコ）、藻類、または様々な非ヒトトランスジェニックの状況では、例えば、マウス、ラット、ヤギもしくはウシが含まれる。

【0088】

抗体をコードする核酸の発現も、その後の抗体精製の目的、および宿主の免疫化の両方のために企図される。抗体コード配列は、天然RNAまたは修飾RNAなどのRNAであり得る。修飾RNAは、mRNAに高い安定性および低い免疫原性を付与し、それによって、治療上重要なタンパク質の発現を促進する特定の化学修飾を企図する。例えば、N1-メチル-プソイドウリジン（N1mΨ）は、翻訳能力に関していくつかの他のヌクレオシド修飾およびそれらの組合せよりも優れている。組み込まれたN1mΨヌクレオチドは、免疫/eIF2αリン酸化依存的な翻訳阻害をオフにすることに加えて、mRNA上のリボソームの休止および密度を増加させることによって翻訳プロセスの動態を劇的に変化させる。修飾mRNAのリボソーム負荷の増加は、同じmRNA上でのリボソームリサイクル、またはデノボリボソーム動員のいずれかを促進することによって、それらを開始に対してさらに許容性にする。そのような修飾は、RNAの接種後にインビボで抗体発現を増強するために使用され得る。RNAは、天然であろうと修飾されていようと、裸のRNAとして、または脂質ナノ粒子などの送達ビヒクル内で送達され得る。

【0089】

あるいは、抗体をコードするDNAを同じ目的のために使用してもよい。DNAは、宿主細胞内で活性なプロモーターを含む発現カセットに含まれ、プロモーターは宿主細胞のために設計されている。発現カセットは、有利には、従来のプラスミドまたはミニベクターなどの複製可能なベクターに含まれる。ベクターにはウイルスベクターが含まれ、例えば、ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびレンチウイルスが企図される。抗体遺伝子をコードするレプリコン、例えば、VEEウイルスまたはシンドビスウイルスに基づくアルファウイルスレプリコンも企図される。そのようなベクターの送達は、筋肉内経路、皮下経路もしくは皮内経路を介した針によって、またはインビボ発現が所望される場合、経皮的エレクトロポレーションによって行われ得る。

【0090】

最終的なcGMP製造プロセスと同じ宿主細胞および細胞培養プロセスで生成された抗体の迅速な利用可能性は、プロセス開発プログラムの期間を短縮する可能性を有する。Lonzaは、CHO細胞内で少量（最大50g）の抗体を迅速に産生するために、CDACF培地中で増殖させたプールされたトランスフェクタントを使用する一般的な方法を開発した。真の一過性の系よりもわずかに遅いが、利点には、比較的高い生成物濃度、ならびに産生細胞株と同じ宿主およびプロセスの使用が含まれる。使い捨てバイオリアクター、すなわち、フェドバッチモードで操作した使い捨てバッグバイオリアクター培養物（5L作業容量）中でのモデル抗体を発現するGS-CHOプールの増殖および生産性の例では、トランスフェクションの9週間以内に2g/Lの回収抗体濃度が達成された。

【0091】

抗体分子は、例えば、mAbのタンパク質分解切断によって生成される断片（例えば、F

10

20

30

40

50

(ab')、F(ab')₂)、または例えば組換え手段によって生成され得る一本鎖免疫グロブリンを含む。F(ab')抗体誘導体は一価であるが、F(ab')₂抗体誘導体は二価である。一態様では、そのような断片を互いに、または他の抗体断片もしくは受容体リガンドと組み合わせ、キメラ結合分子を形成することができる。重要なことに、そのようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合することができる置換基を含み得る。

【0092】

関連する態様では、抗体は、開示される抗体の誘導体、例えば、開示される抗体と同一のCDR配列を含む抗体（例えば、キメラ抗体またはCDR移植抗体）である。あるいは、抗体分子に保存的变化を導入するなどの修飾を行いたい場合がある。そのような変化をもたらす際に、アミノ酸のヒドロパシー指標が考慮され得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際のヒドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当技術分野において一般的に理解されている（Kyte and Doolittle, 1982）。アミノ酸の相対的なヒドロパシー特性が、結果として生じるタンパク質の二次構造に寄与し、それにより、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用が規定されることが認められている。

【0093】

同様のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて効果的に行われ得ることも当技術分野において理解されている。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号では、隣接するアミノ酸の親水性によって制御される、タンパク質の最大局所平均親水性が、タンパク質の生物学的特性と相関することが記載されている。米国特許第4,554,101号に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：塩基性アミノ酸：アルギニン（+3.0）、リジン（+3.0）およびヒスチジン（-0.5）；酸性アミノ酸：アスパルテート（+3.0±1）、グルタメート（+3.0±1）、アスパラギン（+0.2）およびグルタミン（+0.2）；親水性非イオン性アミノ酸：セリン（+0.3）、アスパラギン（+0.2）、グルタミン（+0.2）およびトレオニン（-0.4）、硫黄含有アミノ酸：システイン（-1.0）およびメチオニン（-1.3）；疎水性非芳香族アミノ酸：バリン（-1.5）、ロイシン（-1.8）、イソロイシン（-1.8）、プロリン（-0.5±1）、アラニン（-0.5）およびグリシン（0）；疎水性芳香族アミノ酸：トリプトファン（-3.4）、フェニルアラニン（-2.5）およびチロシン（-2.3）。

【0094】

アミノ酸は、同様の親水性を有する別のものに置換され、生物学的または免疫学的に修飾されたタンパク質を産生することができると理解される。そのような変化では、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、±0.5以内であるアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。

【0095】

上記で概説したように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。様々な前述の特性を考慮に入れた例示的な置換は当業者に周知であり、アルギニンおよびリジン；グルタメートおよびアスパルテート；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンを含む。

【0096】

本開示は、アイソタイプ修飾も企図する。Fc領域を異なるアイソタイプを有するように修飾することにより、異なる機能性を実現することができる。例えば、IgG₁への変化は抗体依存性細胞傷害を増加させることができ、クラスAへの切替えは組織分布を改善することができ、クラスMへの切替えは結合価を改善することができる。

【0097】

代替的または追加的に、アミノ酸修飾を、IL-23p19結合分子のFc領域のC1q結合および/または補体依存性細胞傷害（CDC）機能を変化させる1つまたは複数の追加のアミノ酸修飾と組み合わせることが有用である場合がある。特定の関心対象の結合ポリペプチドは、C1qに結合し、補体依存性細胞傷害を示すものであり得る。既存のC1q結合活性を有し

10

20

30

40

50

、任意でCDCを媒介する能力をさらに有するポリペプチドは、これらの活性の一方または両方が増強されるように修飾され得る。C1qを変化させる、および/またはその補体依存性細胞傷害機能を修飾するアミノ酸修飾は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第0042072号に記載されている。

【0098】

例えば、C1q結合および/またはFcγR結合を修飾し、それによって、CDC活性および/またはADCC活性を変化させることによって、エフェクター機能が変化した、抗体のFc領域を設計することができる。「エフェクター機能」は、(例えば、対象の)生物学的活性を活性化または低下させる役割を果たす。エフェクター機能の例には、限定されることなく、C1q結合;補体依存性細胞傷害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC);食作用;細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)のダウンレギュレーションなどが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせられることを必要とする場合があり、様々なアッセイ(例えば、Fc結合アッセイ、ADCCアッセイ、CDCアッセイなど)を使用して評価され得る。

【0099】

例えば、改善されたC1q結合および改善されたFcγRIII結合を有する、抗体のバリエーションFc領域を生成することができる(例えば、改善されたADCC活性および改善されたCDC活性の両方を有する)。あるいは、エフェクター機能を低下または消失させることが望まれる場合、バリエーションFc領域を、CDC活性の低下および/またはADCC活性の低下を伴って操作することができる。他の態様では、これらの活性の一方のみを増加させてもよく、任意で、他方の活性も低下させてもよい(例えば、改善されたADCC活性を有するが、低下したCDC活性を有するFc領域バリエーションを生成すること、およびその逆)。

【0100】

FcRn結合。Fc変異はまた、新生児型Fc受容体(FcRn)との相互作用を変化させ、それらの薬物動態特性を改善するために導入および操作され得る。FcRnへの結合が改善されたヒトFcバリエーションの集合が記載されている(Shields et al., (2001) .High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR, (J.Biol.Chem.276:6591-6604)。アラニン走査変異誘発、ランダム変異誘発、および新生児型Fc受容体(FcRn)への結合および/またはインビボ挙動を評価するためのスクリーニングを含む技術によって、アミノ酸修飾を含む半減期の延長をもたらすいくつかの方法が知られている(Kuo and Aveson, (2011))。変異を起こすアミノ酸変異のうちの1つを選択するために、変異誘発に続く計算戦略も使用され得る。

【0101】

したがって、本開示は、FcRnへの結合が最適化された抗原結合タンパク質のバリエーションを提供する。特定の態様では、抗原結合タンパク質の該バリエーションは、該抗原結合タンパク質のFc領域に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、該修飾は、該親ポリペプチドと比較して226、227、228、230、231、233、234、239、241、243、246、250、252、256、259、264、265、267、269、270、276、284、285、288、289、290、291、292、294、297、298、299、301、302、303、305、307、308、309、311、315、317、320、322、325、327、330、332、334、335、338、340、342、343、345、347、350、352、354、355、356、359、360、361、362、369、370、371、375、378、380、382、384、385、386、387、389、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、403、404、408、411、412、414、415、416、418、419、420、421、422、424、426、428、433、434、438、439、440、443、444、445、446および447のFc領域からなる群より選択され、Fc領域のアミノ酸のナンバリングはKabatのEUインデックスのナンバリングである。本開示のさらなる局面では、修飾はM252Y/S254T/T256Eである。

【0102】

さらに、様々な刊行物は、FcRn結合ポリペプチドを分子に導入することによって、また

は分子を、FcRn結合親和性が保存されているが他のFc受容体に対する親和性が大幅に低下している抗体と融合することによって、もしくは抗体のFcRn結合ドメインと融合することによって、半減期が改変された生理学的に活性な分子を得るための方法を記載しており、例えば、Kontermann（2009）を参照されたい。

【0103】

誘導体化抗体を使用して、哺乳動物、特にヒトにおける親抗体の半減期（例えば、血清半減期）を変化させてもよい。そのような変化は、15日を超える、好ましくは20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2ヶ月を超える、3ヶ月を超える、4ヶ月を超える、または5ヶ月を超える半減期をもたらし得る。哺乳動物、好ましくはヒトでは、本開示の抗体またはその断片の半減期が延長すると、哺乳動物における該抗体または抗体断片の血清力価が高くなり、ひいては、該抗体または抗体断片の投与頻度を低下させ、および/または投与される該抗体または抗体断片の濃度を低下させる。インビボ半減期が延長した抗体またはその断片は、当業者に公知の技術によって生成され得る。例えば、インビボ半減期が延長した抗体またはその断片は、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に関与すると同定されたアミノ酸残基を修飾する（例えば、置換するか、欠失させるか、または付加する）ことによって生成され得る。

【0104】

Beltramello et al. (2010) は、以前に、そのデングウイルス感染を増強する傾向に起因して、中和mAbの、CH2ドメインの1.3位および1.2位のロイシン残基（Cドメインに関するIMGT固有のナンバリングによる）がアラニン残基によって置換されたものを生成することによる修飾を報告した。「LALA」変異としても知られているこの修飾は、Hessell et al. (2007) によって記載されているように、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIaへの抗体結合を消失させる。4つのデングウイルス血清型による感染を中和および増強する能力について、バリエーションおよび未修飾組換えmAbが比較された。LALAバリエーションは、未修飾mAbと同じ中和活性を保持したが、増強活性を完全に欠いていた。したがって、この性質のLALA変異は、本開示の抗体と関連して企図される。

【0105】

グリコシル化の変化。本開示の特定の態様は、シアル酸、ガラクトースまたはフコースを含まない実質的に均一なグリカンを含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。モノクローナル抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、これらはいずれも、それぞれ重鎖定常領域または軽鎖定常領域に結合していてもよい。上述の実質的に均一なグリカンは、重鎖定常領域に共有結合していてもよい。

【0106】

本開示の別の態様は、新規Fcグリコシル化パターンを有するmAbを含む。単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、GNGNグリコフォームまたはG1/G2グリコフォームによって表される実質的に均一な組成で存在する。Fcグリコシル化は、治療用mAbの抗ウイルス特性および抗癌特性に重要な役割を果たす。本開示は、フコースを含まない抗HIV mAbの抗レンチウイルス細胞媒介性ウイルス阻害の増加をインビトロで示す近年の試験と一致している。コアフコースを欠く均一なグリカンを有する本開示のこの態様は、2倍を超える、特定のウイルスに対する保護の増加を示した。コアフコースの除去は、ナチュラルキラー（NK）細胞によって媒介されるmAbのADCC活性を劇的に改善するが、多形核細胞（PMN）のADCC活性に対しては反対の効果を有するようである。

【0107】

GNGNグリコフォームまたはG1/G2グリコフォームによって表される実質的に均一な組成を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、実質的に均一なGNGNグリコフォームを有さず、G0、G1F、G2F、GNF、GNGNFまたはGNGNFXを含むグリコフォームを有する同じ抗体と比較して、FcγRIおよびFcγRIIIに対して増加した結合親和性を示す。本開示の一態様では、抗体は、 1×10^{-8} M以下のKdを有するFcγRIから、および 1×10^{-7} M以下のKdを有するFcγRIIIから解離する。

【0108】

Fc領域のグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付着を指す。O結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうちの1つの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用され得る。アスパラギン側鎖ペプチド配列への炭水化物部分の酵素的付着のための認識配列は、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンであり、ここで、Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である。したがって、ポリペプチド内のこれらのペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。

【0109】

グリコシル化パターンは、例えば、ポリペプチド内に見られる1つまたは複数のグリコシル化部位を欠失させること、および/またはポリペプチド内に存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位を付加することによって変化させてもよい。抗体のFc領域へのグリコシル化部位の付加は、(N結合型グリコシル化部位では)上記のトリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含むようにアミノ酸配列を変化させることによって都合よく達成される。例示的なグリコシル化バリエーションは、重鎖の残基Asn297のアミノ酸置換を有する。変化はまた、(O結合型グリコシル化部位では)元のポリペプチドの配列への、1つもしくは複数のセリン残基もしくはトレオニン残基の付加または1つもしくは複数のセリン残基もしくはトレオニン残基による置換によって行われ得る。さらに、AlaへのAsn297の変化は、グリコシル化部位のうちの1つを除去することができる。

【0110】

一定の態様では、抗体は、GnT IIIがGlcNAcをIL-23p19抗体に付加するように、β (1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnT III)を発現する細胞内で発現される。そのような様式で抗体を産生するための方法は、国際公開公報第9954342号、国際公開公報第03011878号、特許公報第20030003097号、およびUmana et al., Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999に提供されている。細胞株は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)などのゲノム編集技術を使用して、グリコシル化などの特定の翻訳後修飾を増強または低減または排除するように変化させることができる。例えば、CRISPR技術を使用して、組換えモノクローナル抗体を発現するために使用される293細胞またはCHO細胞内のグリコシル化酵素をコードする遺伝子を排除することができる。

【0111】

モノクローナル抗体タンパク質配列易障害性 (protein sequence liabilities) の排除。ヒトB細胞から得られた抗体可変遺伝子配列を操作して、それらの製造可能性および安全性を高めることが可能である。潜在的なタンパク質配列易障害性は、以下を含む部位に関連する配列モチーフを探索することによって特定することができる:

- 1) 不対合Cys残基、
- 2) N結合型グリコシル化、
- 3) Asn脱アミド化、
- 4) Asp異性化、
- 5) SYE切断、
- 6) Met酸化、
- 7) Trp酸化、
- 8) N末端グルタメート、
- 9) インテグリン結合、
- 10) CD11c/CD18結合、または
- 11) 断片化

【0112】

そのようなモチーフは、組換え抗体をコードするcDNAの合成遺伝子を変化させることによって排除することができる。

10

20

30

40

50

【0113】

治療用抗体の開発の分野におけるタンパク質操作の取り組みは、特定の配列または残基が溶解度の差に関連することを明確に明らかにしている (Fernandez-Escamilla et al., Nature Biotech., 22 (10), 1302-1306, 2004; Chennamsetty et al., PNAS, 106 (29), 11937-11942, 2009; Voynov et al., Biocon. Chem., 21 (2), 385-392, 2010) 文献中の溶解度を変化させる変異からの証拠は、アスパラギン酸、グルタミン酸およびセリンなどの一部の親水性残基が、アスパラギン、グルタミン、トレオニン、リジンおよびアルギニンなどの他の親水性残基よりもタンパク質溶解度に顕著に有利に寄与することを示している。

【0114】

安定性。抗体は、生物物理学的特性を増強するために操作され得る。平均見かけ融解温度を使用して、抗体をアンフォールディングして相対的安定性を決定するために、高温を使用することができる。示差走査熱量測定 (DSC) は、温度の関数として分子の熱容量 C_p (それを温めるのに必要な熱、1度当たり) を測定する。抗体の熱安定性を試験するために DSC を使用することができる。mAb の DSC データは、mAb 構造内の個々のドメインのアンフォールディングを分解し、サーモグラムに最大 3 つのピークを生成することがあるため、特に興味深い (Fab ドメイン、 C_H2 ドメインおよび C_H3 ドメインのアンフォールディングから)。典型的には、Fab ドメインのアンフォールディングが最も強いピークを生成する。DSC プロファイルと、Fc 部分の相対的安定性とは、ヒトの IgG₁、IgG₂、IgG₃ および IgG₄ サブクラスでは特徴的な差を示す (Garber and Demarest, Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, 751-757, 2007)。CD 分光計を用いて行われる円二色性 (CD) を使用して、平均見かけ融解温度を決定することもできる。抗体について、200~260 nm の範囲で 0.5 nm 刻みで Far-UV CD スペクトルを測定する。最終スペクトルは、20 回の累積の平均として決定することができる。残基残率値は、バックグラウンド減算後に計算することができる。抗体 (0.1 mg/mL) の熱アンフォールディングは、25~95 °C、および 1 °C / 分の加熱速度から 235 nm でモニタリングすることができる。凝集の傾向を評価するために動的光散乱 (DLS) を使用することができる。DLS は、タンパク質を含む様々な粒子のサイズを特性評価するために使用される。系のサイズが分散していない場合、粒子の平均有効径を決定することができる。この測定は、粒子コアのサイズ、表面構造のサイズ、および粒子濃度に依存する。DLS は、粒子による散乱光強度の変動を本質的に測定するため、粒子の拡散係数を決定することができる。市販の DLA 機器の DLS ソフトウェアは、様々な直径の粒子集団を示す。安定性試験は、DLS を使用して簡便に行うことができる。試料の DLS 測定は、粒子の流体力学的半径が増加するかどうかを決定することによって、粒子が経時的に凝集するかどうか、温度変動とともに凝集するかどうかを示すことができる。粒子が凝集すると、比較的大きな半径を有する粒子の比較的大きな集団を見ることができる。温度に依存する安定性は、インサイチューで温度を制御することによって分析することができる。キャピラリー電気泳動 (CE) 技術には、抗体安定性の特徴を決定するための実証された方法が含まれる。脱アミド化、C 末端リジン、シアリル化、酸化、グリコシル化、およびタンパク質の pI の変化をもたらす得る、タンパク質に対するいずれかの他の変化に起因する抗体タンパク質電荷バリエーションを分解するために、iCE 手法を使用することができる。発現された抗体タンパク質の各々は、Protein Simple Maurice 機器を使用して、キャピラリーカラム (cIEF) におけるハイスループット自由溶液等電点電気泳動 (IEF) によって評価することができる。等電点 (pI) に集束する分子のリアルタイムモニタリングのために、カラム全体の UV 吸収検出を 30 秒ごとに行うことができる。この手法は、従来のゲル IEF の高分解能と、カラムベースの分離に見られる定量および自動化の利点とを組み合わせながら、動員工程の必要性を排除する。この技術は、発現された抗体の同一性、純度および不均一性プロファイルの再現性のある定量的分析をもたらす。結果により、吸光度および天然蛍光検出モードの両方、ならびに最低 0.7 μg/mL の検出感度で、抗体の電荷不均一性および分子サイズが特定される。

【0115】

溶解度。抗体配列の固有の溶解度スコアを決定することができる。固有の溶解度スコアは、CamSol Intrinsic (Sormanni et al., J Mol Biol 427,478-490,2015) を使用して計算することができる。オンラインプログラムを介して、scFvなどの各抗体断片のHCDR3内の残基95~102 (Kabatナンバリング) のアミノ酸配列を評価して、溶解度スコアを計算することができる。実験室技術を使用して溶解度を決定することもできる。溶液が飽和し、溶解限度に達するまで凍結乾燥タンパク質を溶液に加えること、または好適な分子量カットオフを有するマイクロコンセンレーターでの限外濾過による濃縮を含む様々な技術が存在する。最も簡単な方法は非晶質沈殿の誘導であり、これは、硫酸アンモニウムを使用するタンパク質沈殿を含む方法を使用してタンパク質溶解度を測定する (Trevino et al., J Mol Biol, 366:449-460,2007) 。硫酸アンモニウム沈殿は、相対的溶解度値に関する迅速かつ正確な情報をもたらす。硫酸アンモニウム沈殿は、明確に定義された水相および固相を有する沈殿溶液を生成し、比較的少量のタンパク質を必要とする。硫酸アンモニウムによる非晶質沈殿の誘導を使用して行われる溶解度測定も、様々なpH値で容易に行うことができる。タンパク質溶解度は高度にpH依存性であり、pHは、溶解度に影響を及ぼす最も重要な外因性因子と考えられている。

【0116】

自己反応性。一般に、自己反応性クローンは、個体発生中に陰性選択によって排除されるべきであると考えられているが、成体成熟レパートリーには自己反応性特性を有する多くのヒト天然抗体が存続し、自己反応性が病原体に対する多くの抗体の抗ウイルス機能を増強し得ることが明らかになっている。早期B細胞発達中の抗体内のHCDR3ループは、多くの場合、正電荷に富み、自己反応性パターンを示すことが注目されている (Wardemann et al., Science 301,1374-1377,2003) 。顕微鏡法 (接着性のHeLa上皮細胞またはHEp-2上皮細胞を使用) およびフローサイトメトリー細胞表面染色 (懸濁Jurkat T細胞および293Sヒト胚腎細胞を使用) でヒト起源細胞への結合レベルを評価することによって、自己反応性について所与の抗体を試験することができる。組織アレイにおける組織への結合の評価を使用して、自己反応性を調査することもできる。

【0117】

好ましい残基 (「ヒト類似性」) 。多くの近年の試験では、血液ドナー由来のヒトB細胞のB細胞レパートリーのディープシーケンシングが広範囲に行われている。ヒト抗体レパートリーの重要な部分に関する配列情報は、健康なヒトに一般的な抗体配列特徴の統計的評価を容易にする。ヒト組換え抗体可変遺伝子参照データベース内の抗体配列特徴に関する知識を用いて、抗体配列の「ヒト類似性」 (HL) の位置特異的度合いを推定することができる。HLは、治療用抗体、またはワクチンとしての抗体のように、臨床用途では抗体の開発に有用であることが示されている。目標は、抗体のヒト類似性を高めて、抗体薬物の効果の顕著な低下をもたらすか、深刻な健康上の影響を誘発し得る潜在的な有害作用および抗抗体免疫応答を減少させることである。合計約4億の配列の健康なヒト血液ドナー3例の組み合わせられた抗体レパートリーの抗体特性を評価することができ、抗体の超可変領域に焦点を合わせた新規な「相対的ヒト類似性」 (rHL) スコアを作り出した。rHLスコアは、ヒト配列 (陽性スコア) と非ヒト配列 (陰性スコア) とを容易に区別することを可能にする。抗体は、ヒトレパートリーでは一般的ではない残基を排除するように操作され得る。

【0118】

D. 一本鎖抗体

一本鎖可変断片 (scFv) は、短い (通常、セリン、グリシン) リンカーと一緒に連結された、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合物である。このキメラ分子は、定常領域の除去、およびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。この修飾は、通常、特異性を変化させないままにする。これらの分子は、抗原結合ドメインを単一ペプチドとして発現することが非常に簡便であるファージディスプレイを促進するためにかつて作製された。あるいは、scFvは、ハイブリドーマまたはB細胞に由来するサブクローニングされた重鎖および軽鎖から直接作製することができ

る。一本鎖可変断片は、完全な抗体分子に見られる定常Fc領域、したがって、抗体を精製するために使用される共通の結合部位（例えば、プロテインA/G）を欠く。これらの断片は、多くの場合、プロテインLがκ軽鎖の可変領域と相互作用するため、プロテインLを使用して精製/固定化され得る。

【0119】

可撓性リンカーは、一般に、ヘリックス促進アミノ酸残基およびターン促進アミノ酸残基、例えば、アラニン、セリンおよびグリシンから構成される。ただし、他の残基も同様に機能することができる。Tang et al. (1996) は、タンパク質リンカーライブラリーから一本鎖抗体 (scFv) 用に調整されたリンカーを迅速に選択する手段としてファージディスプレイを使用した。重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの遺伝子が、可変組成の18アミノ酸ポリペプチドをコードするセグメントによって連結されているランダムリンカーライブラリーが構築された。scFvレパートリー（約 5×10^6 の異なるメンバー）が繊維状ファージ上に提示され、ハプテンによる親和性選択に供された。選択されたバリエーションの集団は、結合活性の顕著な増加を示したが、かなりの配列多様性を保持した。1054の個々のバリエーションをスクリーニングしたところ、続いて、可溶性形態で効率的に生成された触媒活性scFvが得られた。配列分析により、選択されたテザーの唯一の共通の特徴として、V_HC末端の2残基後のリンカー内の保存されたプロリンと、他の位置の豊富なアルギニンおよびプロリンとが明らかにされた。

【0120】

本開示の組換え抗体はまた、受容体の二量体化または多量体化を可能にする配列または部分を含み得る。そのような配列には、J鎖と併せて多量体の形成を可能にする、IgAに由来するものが含まれる。別の多量体化ドメインは、Gal4二量体化ドメインである。他の態様では、鎖は、2つの抗体の組合せを可能にするビオチン/アビジンなどの作用物質によって修飾されてもよい。

【0121】

別の態様では、一本鎖抗体は、非ペプチドリンカーまたは化学単位を使用して受容体の軽鎖および重鎖を連結することによって作製され得る。一般に、軽鎖および重鎖は、別個の細胞内で産生され、精製され、続いて適切な様式で一緒に連結される（すなわち、重鎖のN末端は、適切な化学架橋を介して軽鎖のC末端に付着している）。

【0122】

架橋試薬、例えば、安定化剤および凝固剤は、2つの異なる分子の官能基を結合する分子架橋を形成するために使用される。ただし、同じ類似体の二量体もしくは多量体、または異なる類似体から構成されるヘテロマー複合体を作製することができると考えられる。2つの異なる化合物を段階的に連結するために、望ましくないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性クロスリンカーを使用することができる。

【0123】

例示的なヘテロ二官能性クロスリンカーは、一方は第一級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、他方はチオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する2つの反応性基を含む。クロスリンカーは、第一級アミン反応性基を介して、1つのタンパク質（例えば、選択された抗体または断片）のリジン残基と反応してもよく、すでに第1のタンパク質に結合されているクロスリンカーは、チオール反応性基を介して、他のタンパク質（例えば、選択剤）のシステイン残基（遊離スルフヒドリル基）と反応する。

【0124】

血液中で合理的な安定性を有するクロスリンカーが使用されることが好ましい。標的化剤および治療/予防剤をコンジュゲートするために首尾よく使用され得る多くの種類のジスルフィド結合含有リンカーが知られている。立体障害されたジスルフィド結合を含むリンカーは、インビボでさらに大きな安定性をもたらし、作用部位に到達する前に標的化ペプチドの放出を妨げることを示し得る。したがって、これらのリンカーは、連結剤の1つの群である。

【0125】

別の架橋試薬はSMPTであり、SMPTは、隣接するベンゼン環およびメチル基によって「立体障害された」ジスルフィド結合を含む二官能性クロスリンカーである。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血液中に存在し得るグルタチオンなどのチオレートアニオンによる攻撃から結合を保護する機能を果たし、それによって、付着した薬剤を標的部位に送達する前にコンジュゲートが分離するのを防止するのに役立つと考えられる。

【0126】

SMPT架橋試薬は、他の多くの公知の架橋試薬と同様に、システインまたは第一級アミンのSH（例えば、リジンのεアミノ基）などの官能基を架橋する能力を付与する。別の可能なタイプのクロスリンカーには、切断可能なジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性光反応性フェニルアジド、例えばスルホスクシンイミジル-2-（p-アジドサリチルアミド）エチル-1,3'-ジチオプロピオネートが含まれる。N-ヒドロキシ-スクシンイミジル基は第一級アミノ基と反応し、フェニルアジド（光分解時）は任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0127】

障害されたクロスリンカーに加えて、非障害リンカーも本明細書に従って使用することができる。保護されたジスルフィドを含むか生成するとは考えられない他の有用なクロスリンカーには、SATA、SPDPおよび2-イミノチオランが含まれる（Wawrzynczak & Thorpe, 1987）。そのようなクロスリンカーの使用は、当技術分野においてよく理解されている。別の態様は、可撓性リンカーの使用を含む。

【0128】

米国特許第4,680,338号は、リガンドとアミン含有ポリマーおよび/またはタンパク質とのコンジュゲートを生成するために、特に、キレーター、薬物、酵素、検出可能な標識などとの抗体コンジュゲートを形成するために有用な二官能性リンカーを記載している。米国特許第5,141,648号および米国特許第5,563,250号は、様々な穏やかな条件下で切断可能な不安定な結合を含む切断可能なコンジュゲートを開示している。このリンカーは、関心対象の作用物質がリンカーに直接結合し、切断により活性作用物質が放出され得るという点で特に有用である。特定の用途には、遊離アミノ基または遊離スルフィドリル基をタンパク質、例えば、抗体または薬物に付加することが含まれる。

【0129】

米国特許第5,856,456号は、ポリペプチド成分を接続して、融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を作製する際に使用するためのペプチドリリンカーを提供している。リンカーは、最大約50アミノ酸長であり、荷電アミノ酸（好ましくはアルギニンまたはリジン）とそれに続くプロリンの少なくとも1つの存在を含み、比較的高い安定性と、凝集の減少とを特徴とする。米国特許第5,880,270号は、様々な免疫診断技術および分離技術に有用なアミノオキシ含有リンカーを開示している。

【0130】

E. 多重特異性抗体

一定の態様では、本開示の抗体は、二重特異性または多重特異性である。二重特異性抗体とは、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、単一抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。他のそのような抗体は、第1の抗原結合部位を第2の抗原に対する結合部位と組み合わせ得る。あるいは、抗病原体アームが、感染細胞に細胞防御機構を集中させ、局在化させるために、白血球上のトリガー分子、例えばT細胞受容体分子（例えばCD3）、またはIgGのFc受容体（FcγR）、例えば、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）およびFcγRIII（CD16）に結合するアームと組み合わせられ得る。二重特異性抗体はまた、感染細胞に細胞傷害剤を局在化させるために使用され得る。これらの抗体は、病原体結合アームと、細胞傷害剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン-α、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセートまたは放射性同位体ハプテン）に結合するアームとを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製することができ

10

20

30

40

50

る。国際公開公報第96/16673号は、二重特異性抗ErbB2/抗Fc γ RIII抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は、二重特異性抗ErbB2/抗Fc γ RI抗体を開示している。国際公開公報第98/02463号には、二重特異性抗ErbB2/Fc α 抗体が示されている。米国特許第5,821,337号は、二重特異性抗ErbB2/抗CD3抗体を教示している。

【0131】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。完全長二重特異性抗体の従来の生成は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、2つの鎖は異なる特異性を有する (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖のランダムな組合せのために、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、10個の異なる抗体分子のうちの1つのみが正確な二重特異性構造を有する。正確な分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって行われるが、かなり面倒であり、生成物の収率は低い。同様の手順は、国際公開公報第93/08829号およびTrauncker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

【0132】

異なる手法によれば、所望の結合特異性 (抗体-抗原結合部位) を有する抗体可変領域を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。好ましくは、融合は、ヒンジ領域、C_{H2}領域およびC_{H3}領域の少なくとも一部を含むIg重鎖定常ドメインとの融合である。融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域 (C_{H1}) を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別個の発現ベクターに挿入し、好適な宿主細胞に同時トランスフェクトする。構築に使用される3つのポリペプチド鎖の比が等しくない場合に所望の二重特異性抗体の最適な収率が得られる態様では、これにより、3つのポリペプチド断片の相互比率を調整する際にさらに大きな柔軟性がもたらされる。ただし、等しい比での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらす場合、または比が所望の鎖の組合せの収率に顕著な影響を及ぼさない場合、2つまたは3つ全部のポリペプチド鎖のコード配列を単一の発現ベクターに挿入することが可能である。

【0133】

この手法の特定の態様では、二重特異性抗体は、一方のアームに第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (第2の結合特異性を提供する) とから構成される。二重特異性分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在すると容易な分離方法がもたらされるため、この非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。この手法は、国際公開公報第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体の生成の追加の詳細については、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986) を参照されたい。

【0134】

米国特許第5,731,168号に記載されている別の手法によれば、抗体分子対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大化するように操作することができる。好ましい界面は、C_{H3}ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面からの1つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖が、さらに大きな側鎖 (例えば、チロシンまたはトリプトファン) によって置換される。大きなアミノ酸側鎖をさらに小さなもの (例えば、アラニンまたはトレオニン) によって置換することによって、大きな側鎖と同一または類似のサイズの代償的「キャビティ」が、第2の抗体分子の界面上に作り出される。これは、ホモ二量体などの他の望ましくない最終生成物よりもヘテロ二量体の収率を増加させる機構を提供する。

【0135】

二重特異性抗体には、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート内の抗体の一方をアビジンに、他方をビオチンにカップリングさせることができる。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に対し

て標的化し（米国特許第4,676,980号）、HIV感染を治療するために提案されている（国際公開公報第91/00360号、国際公開公報第92/200373号およびEP03089）。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤は当技術分野において周知であり、いくつかの架橋技術とともに米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0136】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術も文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) には、インタクトな抗体をタンパク質分解的に切断してF(ab')₂断片を生成する手順が記載されている。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防ぐ。次いで、生成されたFab'断片をチオニトロベンゾエート（TNB）誘導体に変換する。次いで、Fab'-TNB誘導体の一方をメルカプトエチルアミンによる還元によってFab'-チオールに再変換し、等モル量の他方のFab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための作用物質として使用され得る。

【0137】

二重特異性抗体を形成するために化学的にカップリングされ得る、大腸菌由来のFab'-SH断片の直接回収を容易にする技術が存在する。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) には、ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の生成が記載されている。二重特異性抗体を形成するために、各Fab'断片が大腸菌から別個に分泌され、インビトロで指向性化学カップリングに供された。このように形成された二重特異性抗体は、ErbB2受容体を過剰発現する細胞および正常ヒトT細胞に結合できるとともに、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘導することができた。

【0138】

二重特異性抗体断片を組換え細胞培養物から直接作製および単離するための様々な技術も記載されている（Merchant et al., *Nat. Biotechnol.* 16, 677-681 (1998) doi:10.1038/nbt0798-677 PMID:9661204）。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して生成されている（Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553, 1992）。Fosタンパク質およびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に連結された。抗体ヘテロ二量体を形成するために、抗体ホモ二量体が、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで、再酸化された。この方法は、抗体ホモ二量体の生成にも利用することができる。Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) によって記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替機構を提供している。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーによってV_Lに接続されたV_Hを含む。したがって、1つの断片のV_HドメインおよびV_Lドメインは、別の断片の相補的なV_LドメインおよびV_Hドメインと対合され、それによって、2つの抗原結合部位が形成される。一本鎖Fv (sFv) 二量体の使用によって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994) を参照されたい。

【0139】

特定の態様では、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、DOCK-AND-LOCK（商標）（DNL（商標））複合体として形成され得る（例えば、各々の実施例のセクションが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,521,056号、米国特許第7,527,787号、米国特許第7,534,866号、米国特許第7,550,143号および米国特許第7,666,400号を参照）。一般に、この技術は、cAMP依存性タンパク質キナーゼ（PKA）の調節（R）サブユニットの二量体化およびドッキングドメイン（DDD）配列と、様々なAKAPタンパク質のいずれかに由来するアンカードメイン（AD）配列との間で生じる特異的かつ高親和性の結合相互作用を利用する（Baillie et al., *FEBS Letters*, 2005;579:3264; Wong and Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:959）。DDDペプチドおよびADペプチドは、任意のタンパク質、ペプチドまたは他の分子に付着してもよい。DDD配列は自発的に二量体化し

、AD配列に結合するため、この技術は、DDD配列またはAD配列に付着し得る任意の選択された分子間の複合体の形成を可能にする。

【0140】

2つを超える結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる (Tutt et al., J. Immunol. 147:60, 1991; Xu et al., Science, 358 (6359) : 85-90, 2017)。多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって、二価抗体よりも速く内在化（および/または異化）され得る。本開示の抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に生成され得る、3つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体（例えば、四価抗体）であり得る。多価抗体は、二量体化ドメインおよび3つ以上の抗原結合部位を含むことができる。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む（またはそれからなる）。この状況では、抗体は、Fc領域と、Fc領域に対してアミノ末端にある3つ以上の抗原結合部位とを含む。本明細書における好ましい多価抗体は、3～約8つ、好ましくは4つの抗原結合部位を含む（またはそれからなる）。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖（および好ましくは2つのポリペプチド鎖）を含み、ポリペプチド鎖は2つ以上の可変領域を含む。例えば、ポリペプチド鎖は、VD1- (X1)_n-VD2- (X2)_n-Fcを含み得、ここで、VD1は第1の可変領域であり、VD2は第2の可変領域であり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1およびX2はアミノ酸またはポリペプチドを表し、nは0または1である。例えば、ポリペプチド鎖は、VH-CH1-可撓性リンカー-VH-CH1-Fc領域鎖またはVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を含み得る。本明細書における多価抗体は、好ましくは、少なくとも2つ（好ましくは4つ）の軽鎖可変領域ポリペプチドをさらに含む。本明細書における多価抗体は、例えば、約2～約8つの軽鎖可変領域ポリペプチドを含み得る。本明細書において企図される軽鎖可変領域ポリペプチドは、軽鎖可変領域を含み、任意でC_Lドメインをさらに含む。

【0141】

多重特異性抗体の状況では、電荷修飾が特に有用であり、Fab分子におけるアミノ酸置換は、Fabベースの二重特異性/多重特異性抗原結合分子の結合アームの1つ（または、2つを超える抗原結合Fab分子を含む分子の場合、それ以上）におけるVH/VL交換を用いたFabベースの二重特異性/多重特異性抗原結合分子の生成時に起こり得る、軽鎖と非適合重鎖との誤対合を減少させる（Bence-Jones型副産物）（参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT公開番号WO2015/150447、特にその中の実施例も参照）。

【0142】

したがって、特定の態様では、治療剤に含まれる抗体は、

(a) 第1の抗原に特異的に結合する第1のFab分子

(b) 第2の抗原に特異的に結合する第2のFab分子を含み、Fab軽鎖およびFab重鎖の可変ドメインVLおよびVHは、互いに置換され、

第1の抗原は活性化T細胞抗原であり、第2の抗原は標的細胞抗原であり、または第1の抗原は標的細胞抗原であり、第2の抗原は活性化T細胞抗原であり、

ここで、

i) a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸によって置換されており（Kabatによるナンバリング）、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸によって置換されており（Kabat EUインデックスによるナンバリング）、または

ii) b) の下の第2のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸によって置換されており（Kabatによるナンバリング）、b) の下の第2のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸によって置換されている（Kabat EUインデックスによるナンバリング）。

【0143】

抗体は、i) およびii) の下で述べた両修飾を含まなくてもよい。第2のFab分子の定常ドメインCLおよびCH1は、互いによって置換されていない（すなわち、交換されないままで

ある)。

【0144】

抗体の別の態様では、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって独立して置換されており (Kabatによるナンバリング) (好ましい態様では、リジン (K) またはアルギニン (R) によって独立して)、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸または213位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

【0145】

さらなる態様では、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって独立して置換されており (Kabatによるナンバリング)、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

10

【0146】

特定の態様では、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって置換されており (Kabatによるナンバリング) (好ましい態様では、リジン (K) またはアルギニン (R) によって独立して)、123位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって置換されており (Kabatによるナンバリング) (好ましい態様では、リジン (K) またはアルギニン (R) によって独立して)、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されており (Kabat EUインデックスによるナンバリング)、213位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

20

【0147】

さらに特定の態様では、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、リジン (K) によって置換されており (Kabatによるナンバリング)、123位のアミノ酸は、リジン (K) またはアルギニン (R) によって置換されており (Kabatによるナンバリング)、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) によって置換されており (Kabat EUインデックスによるナンバリング)、213位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) によって置換されている (Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

30

【0148】

さらになお特定の態様では、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCLでは、124位のアミノ酸は、リジン (K) によって置換されており (Kabatによるナンバリング)、123位のアミノ酸は、アルギニン (R) によって置換されており (Kabatによるナンバリング)、a) の下の第1のFab分子の定常ドメインCH1では、147位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) によって置換されており (Kabat EUインデックスによるナンバリング)、213位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) によって置換されている (Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

40

【0149】

F. キメラ抗原受容体

人工T細胞受容体 (キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、キメラ抗原受容体 (CAR) としても知られている) は、免疫エフェクター細胞に任意の特異性を移植する操作された受容体である。典型的には、これらの受容体は、レトロウイルスベクターによって促進されるそれらのコード配列の移入によって、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植するために使用される。このように、養子細胞移入のために多数の標的特異的T細胞を生成することができる。この手法の第I相臨床試験は効果を示している。

【0150】

50

これらの分子の最も一般的な形態は、CD3- ζ 膜貫通ドメインおよびエンドドメインに融合された、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片 (scFv) の融合物である。そのような分子は、その標的のscFvによる認識に応答して ζ シグナルの伝達をもたらす。そのような構築物の例は、ハイブリドーマ14g2a (ジシアロガングリオシドGD2を認識する) に由来するscFvの融合物である14g2a- ζ である。T細胞は、この分子を発現すると (通常、オンコレトロウイルスベクター形質導入によって達成される)、GD2を発現する標的細胞 (例えば、神経芽細胞腫細胞) を認識し、死滅させる。悪性B細胞を標的とするために、研究者らは、B系統分子、CD19に特異的なキメラ免疫受容体を使用して、T細胞の特異性を方向転換させた。

【0151】

免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖の可変部分は、可撓性リンカーによって融合されてscFvを形成する。このscFvの前には、新生タンパク質を小胞体およびその後の表面発現 (これは切断される) に導くシグナルペプチドが存在する。可撓性スパーサーは、scFvを異なる方向に向けることを可能にして、抗原結合を可能にする。膜貫通ドメインは、細胞内に突出し、所望のシグナルを伝達するシグナル伝達エンドドメインの元の分子に通常由来する典型的な疎水性 α ヘリックスである。

【0152】

I型タンパク質は、実際には、間にある膜貫通 α ヘリックスによって連結された2つのタンパク質ドメインである。膜貫通ドメインが通過する細胞膜脂質二重層は、内側部分 (エンドドメイン) を外側部分 (エクトドメイン) から単離するように作用する。あるタンパク質からのエクトドメインを別のタンパク質のエンドドメインに付着させることにより、前者の認識と後者のシグナルとを組み合わせる分子が得られることは、それほど驚くべきことではない。

【0153】

エクトドメイン。シグナルペプチドは、新生タンパク質を小胞体内に導く。これは、受容体がグリコシル化され、細胞膜に固定される場合に必須である。いずれかの真核生物シグナルペプチド配列が、通常、良好に機能する。一般に、アミノ末端の最も多くの成分に天然に付着したシグナルペプチドが使用される (例えば、軽鎖-リンカー-重鎖の配向を有するscFvでは、軽鎖の天然シグナルが使用される)。

【0154】

抗原認識ドメインは、通常、scFvである。ただし、多くの代替案がある。天然T細胞受容体 (TCR) の α -一本鎖および β -一本鎖由来の抗原認識ドメインは、単純なエクトドメイン (例えば、HIV感染細胞を認識するためのCD4エクトドメイン) と、比較的外来物の認識成分、例えば連結されたサイトカイン (これはサイトカイン受容体を有する細胞の認識をもたらす) とを有するものとして記載されている。実際、所与の標的に高い親和性で結合するほとんどのものを抗原認識領域として使用することができる。

【0155】

スパーサー領域は、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結する。スパーサー領域は、抗原結合ドメインが抗原認識を容易にするために様々な方向に配向することを可能にするのに十分に柔軟でなければならない。最も単純な形態は、IgG1由来のヒンジ領域である。代替案には、免疫グロブリンのCH₂CH₃領域、およびCD3の一部が挙げられる。scFvベースの構築物のほとんどでは、IgG1ヒンジで十分である。ただし、最良のスパーサーは、経験的に決定されなければならないことが多い。

【0156】

膜貫通ドメイン。膜貫通ドメインは、膜にまたがる疎水性 α ヘリックスである。一般に、エンドドメインの最も膜近位の構成要素からの膜貫通ドメインが使用される。興味深いことに、CD3- ζ 膜貫通ドメインを使用すると、天然のCD3- ζ 膜貫通荷電アスパラギン酸残基の存在に依存する因子である天然のTCRへの人工TCRの組み込みがもたらされ得る。異なる膜貫通ドメインは、異なる受容体安定性をもたらす。CD28膜貫通ドメインは、鮮やかに発現される安定な受容体をもたらす。

10

20

30

40

50

【0157】

エンドドメイン。これは、受容体の「業務終了」である。抗原認識後、受容体はクラスターを形成し、シグナルが細胞に伝達される。最も一般的に使用されるエンドドメイン成分は、3つのITAMを含むCD3- ζ である。これは、抗原が結合した後に活性化シグナルをT細胞に伝達する。CD3- ζ は、完全に適格な活性化シグナルを提供しない場合があり、追加の共刺激シグナル伝達が必要である。

【0158】

「第1世代」CARは、典型的には、内因性TCRからのシグナルの主要な伝達物質であるCD3 ξ -鎖由来の細胞内ドメインを有した。「第2世代」CARは、様々な共刺激タンパク質受容体（例えば、CD28、41BB、ICOS）からの細胞内シグナル伝達ドメインをCARの細胞質尾部に付加して、T細胞に追加のシグナルを提供する。前臨床試験では、第2世代のCAR設計が、T細胞の抗腫瘍活性を改善することが示されている。さらに最近では、「第3世代」CARは、効力をさらに増強するために、CD3 ζ -CD28-41BBまたはCD3 ζ -CD28-OX40などの複数のシグナル伝達ドメインを組み合わせる。

【0159】

G. ADC

抗体薬物コンジュゲート、すなわちADCは、感染症を有する人々を治療するための標的療法として設計された新しいクラスの非常に強力な生物医薬品である。ADCは、不安定な結合を有する安定な化学リンカーを介して、生物学的に活性な細胞傷害性/抗ウイルス性のペイロードまたは薬物に連結された抗体（全mAbまたは抗体断片、例えば、一本鎖可変断片、すなわちscFv）から構成される複合分子である。抗体薬物コンジュゲートは、バイオコンジュゲートおよびイムノコンジュゲートの例である。

【0160】

モノクローナル抗体の独特の標的化能力を細胞傷害性薬物の癌殺傷能力と組み合わせることによって、抗体-薬物コンジュゲートは、健康な組織と疾患組織との間の高感度の識別を可能にする。これは、従来の全身的手法とは対照的に、抗体-薬物コンジュゲートが感染細胞を標的とし攻撃し、その結果、健康な細胞はあまり深刻な影響を受けないことを意味する。

【0161】

ADCベースの抗腫瘍療法の開発では、特定の細胞マーカー（例えば、理想的には、感染細胞内または感染細胞上にのみ見出されるタンパク質）を特異的に標的とする抗体に、抗癌薬（例えば、細胞毒素または細胞毒）をカップリングさせる。抗体は、これらのタンパク質を体内で追跡し、癌細胞の表面に付着する。抗体と標的タンパク質（抗原）との間の生化学的反応は、腫瘍細胞内でシグナルを誘発し、これにより、腫瘍細胞は、細胞毒とともに抗体を吸収または内在化する。ADCが内在化された後、細胞傷害性薬物は放出され、細胞を死滅させるか、ウイルス複製を損なう。この標的化に起因して、理想的には、この薬物は他の薬剤よりも副作用が低く、治療域が広い。

【0162】

抗体と細胞傷害性/抗ウイルス剤との間の安定な連結は、ADCの重要な側面である。リンカーは、ジスルフィド、ヒドラゾンもしくはペプチド（切断可能）またはチオエーテル（切断不可能）を含む化学モチーフに基づき、標的細胞への細胞傷害剤の分布および送達を制御する。前臨床試験および臨床試験では、切断可能型および切断不可能型のリンカーが安全であることが証明されている。ブレンツキシマブベドチンは、強力で非常に毒性の高い抗微小管剤であり、合成抗新生物剤であるモノメチルオーリスタチンE、すなわちMMAEをヒト特異的CD30陽性悪性細胞に送達する酵素感受性切断可能リンカーを含む。チューブリンの重合を遮断することによって細胞分裂を阻害するその高い毒性MMAEのために、単剤化学療法薬として使用することはできない。ただし、抗CD30モノクローナル抗体（cAC10、腫瘍壊死因子、すなわちTNF受容体の細胞膜タンパク質）に連結されたMMAEの組合せは、細胞外液中で安定であり、カテプシンによって切断可能であり、治療にとって安全であることが証明された。他の承認済みADCであるトラスツズマブエムタンシンは

10

20

30

40

50

、メイタンシンの誘導体である微小管形成阻害剤メルタンシン（DM-1）と、安定な切断不可能なリンカーによって接着された抗体トラスツズマブ（Herceptin（登録商標）/Genentech/Roche）との組合せである。

【0163】

さらに良好かつさらに安定なリンカーの利用可能性は、化学結合の機能を変化させた。切断可能または切断不可能なリンカーのタイプは、細胞傷害性（抗癌）薬物に特異的特性を付与する。例えば、切断不可能なリンカーは、薬物を細胞内に保持する。その結果、抗体、リンカーおよび細胞傷害剤全体が標的とされた癌細胞に入り、そこで抗体がアミノ酸のレベルまで分解される。得られた複合体（アミノ酸、リンカーおよび細胞傷害剤）は、ここで活性薬物になる。対照的に、切断可能なリンカーは、細胞傷害剤を放出する宿主細胞内の酵素によって触媒される。

10

【0164】

現在開発中の別のタイプの切断可能なリンカーは、細胞傷害性/抗ウイルス薬と切断部位との間に余分な分子を付加する。このリンカー技術は、研究者が、切断速度の変化を心配することなく、柔軟性の高いADCを作製することを可能にする。研究者はまた、ペプチド内のアミノ酸を配列決定する方法である、エドマン分解に基づくペプチド切断の新しい方法を開発している。ADCの開発における将来の方向には、安定性および治療指数、ならびに α 放出イムノコンジュゲートおよび抗体-コンジュゲートナノ粒子をさらに改善するための部位特異的コンジュゲーション（TDC）の開発も含まれる。

【0165】

20

H. BiTE

二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）は、抗癌薬として使用するために研究されている人工二重特異性モノクローナル抗体のクラスである。それらは、感染細胞に対する宿主の免疫系、さらに具体的にはT細胞の細胞傷害活性を導く。BiTEは、Micromet AGの登録商標である。

【0166】

BiTEは、異なる抗体の2つの一本鎖可変断片（scFv）、または約55キロダルトンの単一ペプチド鎖上の4つの異なる遺伝子からのアミノ酸配列からなる融合タンパク質である。scFvの一方はCD3受容体を介してT細胞に結合し、他方は特定の分子を介して感染細胞に結合する。

30

【0167】

他の二重特異性抗体と同様に、また、通常のモノクローナル抗体とは異なり、BiTEは、T細胞と標的細胞との間の連結を形成する。これにより、T細胞は、MHC Iまたは共刺激分子の存在とは無関係に、パーフォリンおよびグランザイムのようなタンパク質を産生することによって、感染細胞に対して細胞傷害性/抗ウイルス活性を発揮する。これらのタンパク質は、感染細胞に入り、細胞のアポトーシスを開始する。この作用は、感染細胞に対するT細胞攻撃中に観察される生理学的過程を模倣する。

【0168】

I. イントラボディ

特定の態様では、抗体は、細胞内での作用に適した組換え抗体であり、そのような抗体は「イントラボディ」として知られている。これらの抗体は、様々な機構によって、例えば、細胞内タンパク質輸送を変化させること、酵素機能を妨害すること、およびタンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質-DNA相互作用を遮断することによって標的機能を妨害し得る。それらの構造は、多くの点で、上述の一本鎖抗体および単一ドメイン抗体の構造を模倣するか、またはそれらと並行する。実際、単一転写物/一本鎖は、標的細胞内の細胞内発現を可能にし、細胞膜を通過するタンパク質をさらに実現可能にする重要な特徴である。ただし、追加の特徴が必要とされる。

40

【0169】

イントラボディ治療の実施に影響を与える2つの主要な問題は、細胞/組織標的化を含む送達、および安定性である。送達に関して、組織指向性送達、細胞型特異的プロモーター

50

の使用、ウイルスベースの送達、および細胞透過性/膜透過性ペプチドの使用などの様々な手法が使用されている。この手法は、安定性に関して、一般に、ファージディスプレイを含み、コンセンサス配列の配列成熟もしくは発達、または挿入安定化配列（例えば、Fc領域、シャペロンタンパク質配列、ロイシンジッパー）およびジスルフィド置換/修飾などの指向性の高い修飾を含み得る方法を含め、総当たりでスクリーニングすることである。

【0170】

イントラボディが必要とし得る追加の特徴には、細胞内標的化のためのシグナルがある。イントラボディ（または他のタンパク質）を細胞内領域、例えば、細胞質、核、ミトコンドリアおよびERに標的化することができるベクターが設計されており、市販されている（Invitrogen Corp.; Persic et al., 1997）。

10

【0171】

イントラボディは、細胞に入るそれらの能力のために、他のタイプの抗体が達成し得ない追加の用途を有する。本抗体の場合、生細胞内のMUC1細胞質ドメインと相互作用する能力は、MUC1 CDに関連する機能、例えば、シグナル伝達機能（他の分子への結合）またはオリゴマー形成を妨害し得る。特に、そのような抗体を使用して、MUC1二量体形成を阻害することができると考えられる。

【0172】

J. 精製

一定の態様では、本開示の抗体は精製され得る。本明細書において使用される用語「精製された」は、他の成分から単離可能な組成物を指すことを意図し、タンパク質は、その天然に得られる状態と比較して任意の程度まで精製される。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に存在し得る環境を含まないタンパク質を指す。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この指定は、タンパク質またはペプチドが組成物の主成分を形成し、例えば、組成物内のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれ以上を構成する組成物を指す。

20

【0173】

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、あるレベルでは、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への細胞環境の粗分画を含む。ポリペプチドを他のタンパク質から分離した後、関心対象のポリペプチドをクロマトグラフィー技術および電気泳動技術を使用してさらに精製して、部分的または完全な精製（または均一性までの精製）を達成してもよい。純粋なペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー; ポリアクリルアミドゲル電気泳動; 等電点電気泳動である。タンパク質精製のための他の方法には、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などによる、または熱変性による沈殿、その後の遠心分離; ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィー; ならびにそのような技術と他の技術との組合せが含まれる。

30

【0174】

本開示の抗体の精製では、ポリペプチドを原核生物または真核生物の発現系内で発現させ、変性条件を使用してタンパク質を抽出することが望ましい場合がある。ポリペプチドは、ポリペプチドのタグ化部分に結合するアフィニティークラムを使用して、他の細胞成分から精製され得る。当技術分野において一般的に知られているように、様々な精製工程を行う順序を変更してもよい、特定の工程を省略してもよく、それでも実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適した方法が得られると考えられる。

40

【0175】

一般に、完全抗体は、抗体のFc部分に結合する作用物質（すなわちプロテインA）を利用して分画される。あるいは、抗原を使用して、適切な抗体を同時に精製および選択してもよい。そのような方法は、多くの場合、カラム、フィルターまたはビーズなどの支持体に結合した選択剤を利用する。抗体を支持体に結合させ、汚染成分を除去し（例えば、洗い流し）、条件（塩、熱など）を適用することによって抗体を放出させる。

【0176】

50

タンパク質またはペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に照らして当業者に公知であろう。これらには、例えば、活性画分の比活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析によって画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価する別の方法は、画分の比活性を計算して、それを初期抽出物の比活性と比較し、ひいては純度の程度を計算することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、言うまでもなく、精製に続くように選択された特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかに依存する。

【0177】

ポリペプチドの移動は、異なる条件のSDS/PAGEを用いると、時には著しく変動し得ることが知られている (Capaldi et al., 1977)。したがって、異なる電気泳動条件下では、精製された、または部分的に精製された発現産物の見かけの分子量は変動し得ることが理解される。

【0178】

III. エンテロウイルスD68感染の能動的/受動的免疫化および治療/予防

A. 製剤および投与

本開示は、抗EV-D68抗体およびそれを生成するための抗原を含む薬学的組成物を提供する。そのような組成物は、予防的または治療的に有効な量の抗体もしくはその断片、またはペプチド免疫原と、薬学的に許容される担体とを含む。特定の態様では、用語「薬学的に許容される」は、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって承認されていること、または動物、さらに具体的にはヒトに使用するために米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に記載されていることを意味する。用語「担体」は、治療薬とともに投与される希釈剤、賦形剤またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、滅菌液体、例えば、水および油、例えば、石油、動物起源のもの、植物起源のもの、または合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などであり得る。水は、薬学的組成物が静脈内投与される場合、特定の担体である。生理食塩水ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液も、特に注射液用の液体担体として使用することができる。他の好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。

【0179】

組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤などの形態をとることができる。経口製剤は、標準的な担体、例えば、医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムを含むことができる。好適な医薬品の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態を提供するように、好適な量の担体とともに、好ましくは精製された形態の予防的または治療的に有効な量の抗体またはその断片を含有する。製剤は、経口、静脈内、動脈内、頬内、鼻腔内、噴霧、気管支吸入、直腸内、膣内、局所であり得るか、機械的換気によって送達され得る投与様式に適合すべきである。

【0180】

EV-D68感染のリスクがある対象では、開示されたものと同様の抗体がインビボで産生される活性ワクチンも想定される。そのようなワクチンは、非経口投与用に製剤化することができる、例えば、皮内経路、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、エアロゾル経路またはさらには腹腔内経路を介した注射用に製剤化することができる。皮内経路および筋肉内経路による投与が企図される。あるいは、ワクチンは、粘膜に対する直接局所経路によって、例えば、点鼻薬、吸入によって、ネブライザーによって、または直腸内送達もしくは膣送達によって投与され得る。薬学的に許容される塩には、酸塩、および無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸、または有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸な

どを用いて形成されるものが含まれる。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩はまた、無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄など、および有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導され得る。

【0181】

抗体の受動的移入は、人工的に獲得された受動免疫として知られており、一般に、静脈内注射または筋肉内注射の使用を含む。抗体の形態は、静脈内（IVIG）使用または筋肉内（IG）使用のためのプールされたヒト免疫グロブリンとして、免疫化されたまたは疾患から回復しているドナー由来の高力価のヒトIVIGまたはIGとして、およびモノクローナル抗体（MAb）として、ヒトまたは動物の血漿または血清であり得る。そのような免疫は一般に短期間しか持続せず、過敏反応、および血清病、特に、非ヒト起源のγグロブリンに起因する血清病の潜在的リスクもある。ただし、受動免疫は即時防御をもたらす。抗体は、注射に適した担体、すなわち、滅菌され、注射可能な担体中で製剤化される。

【0182】

一般に、本開示の組成物の成分は、例えば、活性作用物質の量を示すアンプルまたはサシェ（sachette）などの密閉容器内の乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、単位剤形で別個に供給されるか一緒に混合される。組成物が注入によって投与される場合、組成物は、無菌医薬グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルを用いて分注することができる。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

【0183】

本開示の組成物は、中性形態または塩形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、アニオンを用いて形成されたもの、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもの、およびカチオンを用いて形成されたもの、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものが含まれる。

【0184】

2. ADCC

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）は、免疫エフェクター細胞による抗体被覆標的細胞の溶解をもたらす免疫機構である。標的細胞は、Fc領域を含む抗体またはその断片が、一般にFc領域のN末端であるタンパク質部分を介して特異的に結合する細胞である。

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）が増加/減少した抗体」とは、当業者に公知の任意の好適な方法によって決定した場合、ADCCが増加/減少した抗体を意味する。

【0185】

本明細書において使用される場合、用語「増加/減少したADCC」は、上記で定義されたADCCの機構による、標的細胞を取り囲む培地中の抗体の所与の濃度で、所与の時間内に溶解される標的細胞の数の増加/減少、および/またはADCCの機構による、所与の時間内に所与の数の標的細胞の溶解を達成するために必要な、標的細胞を取り囲む培地中の抗体の濃度の減少/増加のいずれかとして定義される。ADCCの増加/減少は、同じ標準的な産生方法、精製方法、製剤化方法および保存方法（当業者に公知の）を使用して、同じタイプの宿主細胞によって産生される同じ抗体によって媒介されるが、操作されていないADC Cと比較したものである。例えば、本明細書において記載される方法によってグリコシル化の変化したパターン（例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、GnTIII、または他のグリコシルトランスフェラーゼを発現するように）を有するように操作された宿主細胞によって産生された抗体によって媒介されるADCCの増加は、同じタイプの操作されていない宿主細胞によって産生された同じ抗体によって媒介されるADCCと比較したものである。

【0186】

3. CDC

補体依存性細胞傷害（CDC）は、補体系の機能である。CDCは、免疫系の抗体または細胞が関与することなく病原体の膜を損傷することによって病原体を死滅させる、免疫系におけるプロセスである。3つの主要なプロセスがある。3つはいずれも、致死的なコロイド浸透圧膨潤、すなわちCDCを引き起こす1つまたは複数の膜攻撃複合体（MAC）を病原体に挿入する。これは、それによって抗体または抗体断片が抗ウイルス効果を有する機構の1つである。

【0187】

IV. 抗体コンジュゲート

本開示の抗体は、抗体コンジュゲートを形成するために少なくとも1つの作用物質に連結され得る。診断剤または治療剤としての抗体分子の効果を高めるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結または共有結合または複合化することが従来から行われている。そのような分子または部分は、限定されることなく、少なくとも1つのエフェクター分子またはレポーター分子であり得る。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体に付着したエフェクター分子の非限定的な例には、毒素、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射性核種、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出され得る任意の部分として定義される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例には、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、光親和性分子、着色粒子または着色リガンド、例えばビオチンが挙げられる。

【0188】

抗体コンジュゲートは、一般に、診断剤として使用するのに好ましい。抗体診断は、一般に、様々なイムノアッセイなどのインビトロ診断に使用するのためのものと、一般に「抗体指向性イメージング」として知られるインビボ診断プロトコルに使用するのためのものの2つのクラスに分類される。多くの適切なイメージング剤は、抗体へのそれらの付着のための方法と同様に、当技術分野において公知である（例えば、米国特許第5,021,236号、米国特許第4,938,948号および米国特許第4,472,509号を参照）。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、NMR検出可能物質およびX線イメージング剤であり得る。

【0189】

常磁性イオンの場合、例として、クロム（III）、マンガン（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（III）、サマリウム（III）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）および/またはエルビウム（III）などのイオンを挙げることができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線イメージングなどの他の状況で有用なイオンには、限定されることなく、ランタン（III）、金（III）、鉛（II）、特にビスマス（III）が含まれる。

【0190】

治療用途および/または診断用途のための放射性同位体の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレン、³⁵硫黄、テクニシウム（technetium）^{99m}および/またはイットリウム⁹⁰を挙げることができ、一定の態様では、¹²⁵Iが使用するのに好ましいことが多く、テクニシウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹も、それらのエネルギーが低く、長距離検出に適しているために好ましいことが多い。本開示の放射性標識モノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法に従って生成され得る。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムなどの化学酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素酸化剤との接触によってヨウ素化され得る。本開示によるモノクローナル抗体は、例えば、第一スズ溶液を用いてペルテクネート（pertechnetate）を還元し、Sephadexカラム上で還元テクニチウムをキレート化し

、このカラムに抗体を適用することによるリガンド交換プロセスによってテクニチウム^{99m}によって標識され得る。あるいは、例えば、ペルテクネート、 SnCl_2 などの還元剤、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液などの緩衝液、および抗体をインキュベートすることによって、直接標識技術を使用してもよい。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合するために多くの場合使用される中継官能基 (Intermediary functional group) は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

【0191】

コンジュゲートとしての使用が企図される蛍光標識には、アレクサ350、アレクサ430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミンググリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミンおよび/またはテキサスレッドが含まれる。

【0192】

本開示において企図される追加のタイプの抗体は、発色基質と接触すると着色生成物を生成する二次結合リガンドおよび/または酵素 (酵素タグ) に連結されている、主にインビトロでの使用を意図した抗体である。好適な酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋ワサビ) 水素ペルオキシダーゼまたはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい二次結合リガンドは、ビオチン化合物およびアビジン化合物およびストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,939,350号、米国特許第3,996,345号、米国特許第4,277,437号、米国特許第4,275,149号および米国特許第4,366,241号に記載されている。

【0193】

抗体への分子の部位特異的付着のさらに別の公知の方法は、抗体とハプテンベースの親和性標識との反応を含む。本質的に、ハプテンベースの親和性標識は、抗原結合部位のアミノ酸と反応し、それによって、この部位を破壊し、特異的抗原反応を遮断する。ただし、これは、抗体コンジュゲートによる抗原結合を喪失させるため、有利でない場合がある。

【0194】

また、低強度紫外光によって生成される反応性ニトレン中間体を介してタンパク質に対する共有結合を形成するために、アジド基を含む分子が使用され得る (Potter and Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジド類似体は、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的光プローブとして使用されている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするために使用されており (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989)、抗体結合剤として使用され得る。

【0195】

抗体をそのコンジュゲート部分に付着またはコンジュゲーションするためのいくつかの方法が当技術分野において公知である。いくつかの付着方法は、例えば、抗体に付着したジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) などの有機キレート剤;エチレントリアミン四酢酸;N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド;および/またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル-3を使用する金属キレート錯体の使用を含む (米国特許第4,472,509号および米国特許第4,938,948号)。モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカ-とのコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号では、乳房腫瘍のイメージングがモノクローナル抗体を使用して達成され、検出可能なイメージング部分が、メチル-

10

20

30

40

50

p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを使用して抗体に結合される。

【0196】

他の態様では、抗体結合部位を変化させない反応条件を使用して、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法に従って生成された抗体コンジュゲートは、改善された長寿命性、特異性および感度を示すことが開示されている（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,196,066号）。レポーター分子またはエフェクター分子がFc領域内の炭水化物残基にコンジュゲートされている、エフェクター分子またはレポーター分子の部位特異的付着も文献に開示されている（O'Shannessy et al., 1987）。この手法は、現在臨床評価中の診断的および治療的に有望な抗体を生成することが報告されている。

【0197】

V. 免疫検出方法

なおさらなる態様では、本開示は、EV-D68およびその関連抗原の結合、精製、除去、定量および他の一般的な検出のための免疫検出方法に関する。そのような方法は従来の意味で適用され得るが、別の用途は、本開示による抗体を使用してウイルス内の抗原の量または完全性（すなわち、長期安定性）を評価することができる、ワクチンおよび他のウイルスストックの品質管理およびモニタリングである。あるいは、方法は、適切な/所望の反応性プロファイルについて様々な抗体をスクリーニングするために使用され得る。

【0198】

他の免疫検出方法は、対象におけるEV-D68の存在を決定するための特異的アッセイを含む。多種多様なアッセイ形式が企図されるが、具体的には、対象から得られた流体、例えば、唾液、血液、血漿、痰、精液、尿、呼吸器飛沫またはエアロゾル中のEV-D68を検出するために使用されるものである。特に、精液は、EV-D68を検出するための実行可能な試料として示されている（Purpura et al., 2016; Mansuy et al., 2016; Barzon et al., 2016; Gornet et al., 2016; Duffy et al., 2009; CDC, 2016; Halfon et al., 2010; Elder et al., 2005）。これらのアッセイは、好都合なことに、家庭用妊娠検査に類似するラテラルフローアッセイ（下記を参照）を含め、非保健医療（家庭）用途のために形式を合わせられ得る。これらのアッセイは、家族の一員の対象による使用を可能にするための適切な試薬および説明書とともにキットの形態で包装され得る。

【0199】

いくつかを挙げると、いくつかの免疫検出方法には、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、イムノラジオメトリックアッセイ、フルオロイムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイおよびウエスタンブロットが含まれる。特に、試料中の特異的寄生生物エピトープを対象とするEV-D68抗体の検出および定量のための競合アッセイも提供される。様々な有用な免疫検出方法の工程は、例えば、Doolittle and Ben-Zeev (1999)、Gulbis and Galand (1993)、De Jager et al. (1993) および Nakamura et al. (1987) などの科学文献に記載されている。一般に、免疫結合方法は、EV-D68を含有すると疑われる試料を得ること、および場合によっては、免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、試料と本開示による第1の抗体とを接触させることを含む。

【0200】

これらの方法は、EV-D68または関連抗原を試料から精製する方法を含む。抗体は、好ましくは、固体支持体、例えば、カラムマトリックスの形態に連結され、EV-D68または抗原性成分を含有すると疑われる試料が固定化抗体に適用される。望ましくない成分をカラムから洗浄し、EV-D68抗原を固定化抗体に対して免疫複合体化したままにし、次いで、これを生物または抗原をカラムから除去することによって回収する。

【0201】

免疫結合方法はまた、試料中のEV-D68または関連成分の量を検出および定量する方法、ならびに結合プロセス中に形成された任意の免疫複合体の検出および定量を含む。ここ

で、EV-D68またはその抗原を含有すると疑われる試料を得て、試料とEV-D68またはその成分に結合する抗体とを接触させ、続いて、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出および定量する。抗原検出に関して、分析される生物学的試料は、EV-D68またはEV-D68抗原を含有すると疑われる任意の試料、例えば、組織切片もしくは検体、ホモジナイズされた組織抽出物、血液および血清を含む生物学的流体、または糞便もしくは尿などの分泌物であり得る。

【0202】

選択された生物学的試料と、免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするのに十分な有効条件下および期間にわたり抗体とを接触させることは、一般に、抗体組成物を試料に単純に加え、抗体がEV-D68または存在する抗原と免疫複合体を形成する、すなわちEV-D68または存在する抗原に結合するのに十分な期間にわたって混合物をインキュベートすることである。この時間の後、組織切片、ELISAプレート、ドットブロットまたはウエスタンブロットなどの試料-抗体組成物を一般に洗浄して、非特異的に結合した抗体種を除去し、一次免疫複合体内で特異的に結合した抗体のみを検出することを可能にする。

【0203】

一般に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数の手法の適用によって達成され得る。これらの方法は、一般に、標識またはマーカー、例えば、それらの放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグおよび酵素的タグのいずれかの検出に基づく。そのような標識の使用に関する特許には、米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,939,350号、米国特許第3,996,345号、米国特許第4,277,437号、米国特許第4,275,149号および米国特許第4,366,241号が含まれる。言うまでもなく、当技術分野において知られているように、二次結合リガンド、例えば、第2の抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配列の使用を通して追加の利点を見出すことができる。

【0204】

検出に使用される抗体は、それ自体が検出可能な標識に連結されてもよく、その場合、この標識を単に検出することによって、組成物中の一次免疫複合体の量を決定することができる。あるいは、一次免疫複合体内で結合するようになる第1の抗体は、抗体に対して結合親和性を有する第2の結合リガンドによって検出され得る。これらの場合、第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。第2の結合リガンドは、それ自体が抗体であることが多く、したがって「二次」抗体と呼ばれ得る。二次免疫複合体の形成を可能にするのに十分な有効条件下および期間にわたって、一次免疫複合体と、標識された二次結合リガンドまたは抗体とを接触させる。次いで、二次免疫複合体を一般に洗浄して、非特異的に結合した標識された二次抗体または二次リガンドを除去し、二次免疫複合体内の残りの標識を検出する。

【0205】

さらなる方法は、二段階手法による一次免疫複合体の検出を含む。上記のように、二次免疫複合体を形成するために、抗体に対して結合親和性を有する抗体などの第2の結合リガンドが使用される。洗浄後、再度、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに十分な有効条件下および期間にわたって、二次免疫複合体と、第2の抗体に対して結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体とを接触させる。第3のリガンドまたは抗体は、検出可能な標識に連結され、このように形成された三次免疫複合体の検出を可能にする。この系は、所望であれば、シグナル増幅をもたらし得る。

【0206】

免疫検出の1つの方法は、2つの異なる抗体を使用する。第1のビオチン化抗体を使用して標的抗原を検出し、次いで、第2の抗体を使用して複合体化ビオチンに付着したビオチンを検出する。この方法では、試験される試料は、第1の工程の抗体を含有する溶液中で最初にインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、抗体の一部が抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの連続溶液中でのインキュベ-

ションによって抗体/抗原複合体を増幅し、各工程で抗体/抗原複合体に追加のビオチン部位を付加する。増幅工程は、好適なレベルの増幅が達成されるまで繰り返され、その時点で、試料は、ビオチンに対する第2の工程の抗体を含有する溶液中でインキュベートされる。この第2の工程の抗体は、例えば、色素原基質を使用する組織酵素的方法（histoenzymology）によって抗体/抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素によって標識される。好適な増幅により、巨視的に視認可能なコンジュゲートを生成することができる。

【0207】

免疫検出の別の公知の方法は、イムノPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を利用する。PCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と同様であるが、複数回のストレプトアビジンおよびビオチン化DNAのインキュベーションを使用する代わりに、抗体を放出させる低pHまたは高塩緩衝液を用いてDNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を洗い流す。次いで、得られた洗浄溶液を使用して、適切な対照を有する好適なプライマーを用いてPCR反応を行う。少なくとも理論的には、PCRの膨大な増幅能力および特異性を利用して、単一の抗原分子を検出することができる。

【0208】

A. ELISA

イムノアッセイは、その最も単純かつ直接的な意味で、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、当技術分野において公知の様々なタイプの酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）である。組織切片を使用した免疫組織化学的検出も特に有用である。ただし、検出はそのような技術に限定されず、ウエスタンブロッティング、ドットブロッティング、FACS分析なども使用され得ることは容易に理解されるであろう。

【0209】

1つの例示的なELISAでは、本開示の抗体は、タンパク質親和性を示す選択された表面、例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレート内のウェルに固定化される。次いで、EV-D68またはEV-D68抗原を含有すると疑われる試験組成物をウェルに加える。結合させ、洗浄して非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗原が検出され得る。検出は、検出可能な標識に連結された別の抗EV-D68抗体を加えることによって達成され得る。このタイプのELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第2の抗EV-D68抗体を加え、続いて、第2の抗体に対して結合親和性を有する第3の抗体を加えることによって達成され得、第3の抗体は検出可能な標識に連結されている。

【0210】

別の例示的ELISAでは、EV-D68またはEV-D68抗原を含有すると疑われる試料をウェル表面上に固定化し、次いで、本開示の抗EV-D68抗体と接触させる。結合させ、洗浄して非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗EV-D68抗体が検出される。最初の抗EV-D68抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接検出され得る。ここでも、免疫複合体は、第1の抗EV-D68抗体に対して結合親和性を有する第2の抗体を使用して検出され得、第2の抗体は検出可能な標識に連結されている。

【0211】

使用される形式にかかわらず、ELISAは、特定の特徴、例えば、コーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的に結合した種を除去するための洗浄、ならびに結合した免疫複合体の検出を共通して有する。これらについて以下に説明する。

【0212】

プレートを抗原または抗体によってコーティングする際には、一般に、プレートのウェルを抗原または抗体の溶液と一晩または指定された期間にわたってインキュベートする。次いで、プレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を除去する。次いで、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質によって、ウェルの残りの利用可能な表面を「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、または粉乳の溶液が含まれる。コーティングは、固定化表面上の非特異的吸着部位のブ

10

20

30

40

50

ロッキングを可能にし、ひいては、表面上への抗血清の非特異的結合によって引き起こされるバックグラウンドを低減する。

【0213】

ELISAでは、直接的な手順ではなく、二次または三次検出手段を使用することの方が慣例的である可能性がある。したがって、タンパク質または抗体をウェルに結合させ、非反応性材料によってコーティングしてバックグラウンドを低減させ、洗浄して未結合材料を除去した後、免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするのに有効な条件下で、固定化表面と試験される生物学的試料とを接触させる。次いで、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは二次抗体、および標識された三次抗体または第3の結合リガンドと組み合わせた二次結合リガンドまたは二次抗体を必要とする。

10

【0214】

「免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするのに有効な条件下」とは、条件が、好ましくは、溶液、例えば、BSA、ウシγグロブリン（BGG）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）/Tweenを用いて抗原および/または抗体を希釈することを含むことを意味する。これらの加えられた作用物質はまた、非特異的バックグラウンドの低減を助ける傾向がある。

【0215】

「好適な」条件はまた、インキュベーションが、効果的な結合を可能にするのに十分な温度または期間であることを意味する。インキュベーション工程は、典型的には、好ましくは25℃～27℃程度の温度で約1～2～4時間程度であるか、または約4℃程度で一晩であってよい。

20

【0216】

ELISAでは、全インキュベーション工程の後、接触した表面を洗浄して、非複合体化材料を除去する。好ましい洗浄手順は、PBS/Tweenまたはボレート緩衝液などの溶液を用いた洗浄を含む。試験試料と最初に結合した材料との特異的免疫複合体の形成、およびその後の洗浄の後、微量であっても免疫複合体の発生を決定することができる。

【0217】

検出手段を提供するために、第2または第3の抗体は、検出を可能にする関連する標識を有する。好ましくは、これは、適切な発色基質とインキュベートすると発色を生じる酵素である。したがって、例えば、追加の免疫複合体形成の発達を促進する期間にわたって、および追加の免疫複合体形成の発達を促進する条件下で、第1の免疫複合体および第2の免疫複合体を、ウレアーゼコンジュゲート抗体、グルコースオキシダーゼコンジュゲート抗体、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体または水素ペルオキシダーゼコンジュゲート抗体と接触させるかインキュベートすることが望まれる（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中で室温で2時間インキュベートする）。

30

【0218】

標識された抗体とのインキュベーション、およびその後の未結合材料を除去するための洗浄の後、標識の量は、例えば、尿素もしくはプロモクレゾールパープルなどの発色基質、または酵素標識としてのペルオキシダーゼの場合には2,2'-アジノ-ジ-（3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）もしくはH₂O₂とのインキュベーションによって定量される。次いで、例えば、可視スペクトル分光光度計を使用して、生成された色の程度を測定することによって定量が達成される。

40

【0219】

別の態様では、本開示は、競合フォーマットの使用を企図する。これは、試料中のEV-D68抗体の検出に特に有用である。競合ベースのアッセイでは、未知量の分析物または抗体は、既知量の標識された抗体または分析物を置換する能力によって決定される。したがって、シグナルの定量可能な損失は、試料中の未知の抗体または分析物の量の指標である。

【0220】

ここで、本発明者は、試料中のEV-D68抗体の量を決定するための標識されたEV-D68モノクローナル抗体の使用を提案する。基本フォーマットは、既知量のEV-D68モノクローナル抗体（検出可能な標識に連結されている）とEV-D68抗原または粒子とを接触させ

50

ることを含む。EV-D68抗原または生物は、好ましくは支持体に付着している。標識されたモノクローナル抗体が支持体に結合した後、試料を加え、試料中の任意の標識されていない抗体が標識されたモノクローナル抗体と競合し、したがって標識されたモノクローナル抗体を置換することを可能にする条件下でインキュベートする。失われた標識または残っている標識のいずれかを測定する（および結合した標識の元の量からそれを差し引く）ことによって、どの程度の標識されていない抗体が支持体に結合しているか、したがってどの程度の抗体が試料中に存在していたかを決定することができる。

【0221】

B. ウェスタンブロット

ウェスタンブロット（あるいは、タンパク質イムノブロット）は、組織ホモジネートまたは組織抽出物の所与の試料中の特定のタンパク質を検出するために使用される分析技術である。それは、ポリペプチドの長さ（変性条件）によって、またはタンパク質の3-D構造（天然/非変性条件）によって、天然または変性タンパク質を分離するためにゲル電気泳動を使用する。次いで、タンパク質はメンブレン（典型的にはニトロセルロースまたはPVDF）に転写され、そこで標的タンパク質に特異的な抗体を使用してプローブ（検出）される。

【0222】

試料は、組織全体または細胞培養物から採取され得る。ほとんどの場合、固体組織は、ブレンダーを使用して（試料体積が大きい場合）、ホモジナイザーを使用して（体積が小さい場合）、または超音波処理によって最初に機械的に破壊される。細胞はまた、上記の機械的方法のうちの1つによって破壊されてもよい。ただし、細菌試料、ウイルス試料または環境試料がタンパク質の供給源である場合があるため、ウェスタンブロッティングは細胞試験のみに限定されないことに留意されたい。細胞の溶解を促進し、タンパク質を可溶化するために、様々な界面活性剤、塩および緩衝液を使用してもよい。プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤は、それ自体の酵素による試料の消化を防ぐために加えられることが多い。組織の調製は、タンパク質の変性を避けるために低温で行われることが多い。

【0223】

試料のタンパク質は、ゲル電気泳動を使用して分離される。タンパク質の分離は、等電点（pI）、分子量、電荷、またはこれらの要因の組合せによるものであり得る。分離の性質は、試料の処理、およびゲルの性質に依存する。これは、タンパク質を決定するための非常に有用な方法である。単一の試料からタンパク質を二次元に広げる二次元（2-D）ゲルを使用することも可能である。タンパク質は、第1の次元では等電点（中性の正味電荷を有するpH）に従って、第2の次元では分子量に従って分離される。

【0224】

抗体検出のためにタンパク質を接近可能にするために、それらをゲル内からニトロセルロースまたはポリビニリデンジフルオリド（PVDF）から作製されたメンブレン上に移動させる。ゲルの上にメンブレンを置き、その上に濾紙のスタックを置く。スタック全体を緩衝液に入れ、緩衝液は毛細管作用によって紙を上昇し、タンパク質と一緒に運ぶ。タンパク質を転写する別の方法は、エレクトロブロッティングと呼ばれ、電流を使用してタンパク質をゲルからPVDFメンブレンまたはニトロセルロースメンブレンに引き込む。タンパク質は、ゲル内で有した構成を維持しながら、ゲル内からメンブレン上に移動する。このブロッティングプロセスの結果として、タンパク質は、検出のために薄い表面層上に露出される（下記を参照）。両方の種類のメンブレンは、それらの非特異的タンパク質結合特性（すなわち、あらゆるタンパク質に等しく良好に結合する）のために選択される。タンパク質結合は、疎水性相互作用、およびメンブレンとタンパク質との間の荷電相互作用に基づく。ニトロセルロースメンブレンはPVDFよりも安価であるが、はるかに脆弱であり、反復プロービングに十分に耐えられない。ゲルからメンブレンへのタンパク質の転写の均一性および全体的な効果は、クーマシーブリリアントブルー色素またはボンソーS色素を用いてメンブレンを染色することによって確認することができる。転写後、タンパク質

10

20

30

40

50

は、標識された一次抗体または標識されていない一次抗体を使用して検出され、その後、一次抗体のFc領域に結合する標識されたプロテインAまたは二次標識された抗体を使用して間接的に検出される。

【0225】

C. ラテラルフローアッセイ

ラテラルフローイムノクロマトグラフィーアッセイとしても知られているラテラルフローアッセイは、専用の高価な装置を必要とせずに試料（マトリックス）中の標的分析物の存在（または非存在）を検出することを意図した単純な装置であるが、読み取り装置によって補助される多くの実験室ベースの用途が存在する。典型的には、これらの検査は、家庭用検査、ポイントオブケア検査、または実験室での使用のいずれかのための低資源医療診断として使用される。広く普及している周知の用途は、家庭用妊娠検査である。

【0226】

この技術は、多孔質紙片または焼結ポリマー片などの一連の毛細管床に基づく。これらの要素の各々は、流体（例えば、尿）を自発的に輸送する能力を有する。第1の要素（試料パッド）はスポンジとして作用し、過剰な試料流体を保持する。浸漬されると、流体は、第2の要素（コンジュゲートパッド）に移動し、この第2の要素には、製造業者により、標的分子（例えば、抗原）と、粒子の表面に固定化されたその化学的パートナー（例えば、抗体）との間の最適化された化学反応を保証するためのすべてを含有する塩-糖マトリックス内に、いわゆるコンジュゲート、生物活性粒子の乾燥フォーマット（下記を参照）が保存されている。試料流体は、塩-糖マトリックスを溶解するが、粒子も溶解し、1つの複合輸送作用では、試料とコンジュゲートとが多孔質構造を通して流れる間に混合する。このように、分析物は、第3の毛細管床をさらに通って移動しながら粒子に結合する。この材料は、第3の分子が製造業者によって固定化されている1つまたは複数の領域（多くの場合ストライプと呼ばれる）を有する。試料-コンジュゲート混合物がこれらのストリップに到達するまでに、分析物が粒子上に結合し、第3の「捕捉」分子が複合体に結合する。しばらくして、ますます多くの流体がストライプを通過すると、粒子が蓄積し、ストライプ領域が色を変える。典型的には、少なくとも2つのストライプが存在し、1つ（対照）は、任意の粒子を捕捉し、それによって、反応条件および技術がうまく機能したことを示し、第2のストライプは、特定の捕捉分子を含有し、分析物分子が固定化された粒子のみを捕捉する。流体は、これらの反応ゾーンを通過した後、単に廃棄物容器として作用する最終的な多孔質材料（ウィック）に入る。ラテラルフロー試験は、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイのいずれかとして機能することができる。ラテラルフローアッセイは、米国特許第6,485,982号に開示されている。

【0227】

D. 免疫組織化学

本開示の抗体はまた、免疫組織化学（IHC）による試験のために調製された新鮮凍結組織ブロックおよび/またはホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックの両方と併せて使用され得る。これらの微粒子標本から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子の以前のIHC試験で首尾よく使用されており、当業者に周知である（Brown et al.,1990;Abbondanzo et al.,1990;Allred et al.,1990）。

【0228】

要約すると、小さなプラスチックカプセル内のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中、室温で50ngの凍結「粉碎」組織を再水和させ、遠心分離によって粒子をペレット化し、それらを粘性包埋媒体（OCT）に再懸濁し、遠心分離によってカプセルおよび/またはペレット化を反転させ、-70℃のイソペンタン中でスナップ凍結し、プラスチックカプセルを切断し、および/または凍結された円筒状の組織を取り出し、クライオスタットミクロトームチャック上に円筒状の組織を固定し、および/またはカプセルから25～50個の連続切片を切り出すことによって、凍結切片が調製され得る。あるいは、凍結組織試料全体を連続切片切断に使用してもよい。

【0229】

10

20

30

40

50

プラスチック製微量遠心チューブ内で50mgの試料を再水和し、ペレット化し、10%ホルマリンに再懸濁して4時間固定し、洗浄/ペレット化し、温かい2.5%寒天に再懸濁し、ペレット化し、氷水中で冷却して寒天を硬化させ、チューブから組織/寒天ブロックを取り出し、ブロックをパラフィンに浸透および/または包埋し、および/または最大50個の連続する永久切片を切り出すことを含む同様の方法によって、永久切片が調製され得る。ここでも、組織試料全体を置換してもよい。

【0230】

E. 免疫検出キット

なおさらなる態様では、本開示は、上記の免疫検出方法とともに使用するための免疫検出キットに関する。抗体はEV-D68またはEV-D68抗原を検出するために使用され得るため、抗体はキットに含まれ得る。したがって、免疫検出キットは、好適な容器手段では、EV-D68またはEV-D68抗原に結合する第1の抗体と、任意で免疫検出試薬とを含む。

【0231】

一定の態様では、EV-D68抗体は、マイクロタイタープレートのカラムマトリックスおよび/またはウェルなどの固体支持体に予め結合されていてもよい。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体に会合または連結された検出可能な標識を含む様々な形態のいずれか1つをとり得る。二次結合リガンドと会合するかまたは二次結合リガンドに結合する検出可能な標識も企図される。例示的な二次リガンドは、第1の抗体に対して結合親和性を有する二次抗体である。

【0232】

本キットに使用するのにさらに適した免疫検出試薬には、第2の抗体に対して結合親和性を有する第3の抗体とともに、第1の抗体に対して結合親和性を有する二次抗体を含む二成分試薬が含まれ、第3の抗体は検出可能な標識に連結されている。上述のように、多数の例示的な標識が当技術分野において公知であり、そのような標識はいずれも、本開示に関連して使用され得る。

【0233】

キットは、検出アッセイのための標準曲線を作成するために使用され得るように、標識されているか標識されていないかにかかわらず、EV-D68またはEV-D68抗原の好適に分注された組成物をさらに含み得る。キットは、完全にコンジュゲートされた形態で、中間体の形態で、またはキットの使用者によってコンジュゲートされる別個の部分としてのいずれかで抗体標識コンジュゲートを含み得る。キットの構成要素は、水性媒体形態または凍結乾燥形態のいずれかで包装され得る。

【0234】

キットの容器手段は、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の容器手段を含み、その中に抗体が配置され得るか、好ましくは好適に分注され得る。本開示のキットはまた、典型的には、抗体、抗原、および任意の他の試薬容器を市販用に厳重に密閉して収容するための手段を含む。そのような容器には、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれ得る。

【0235】

F. ワクチンおよび抗原の品質管理アッセイ

本開示はまた、試料中のウイルス抗原の抗原完全性を評価する際に使用するための本明細書において記載される抗体および抗体断片の使用を企図する。ワクチンのような生物学的医薬品は、通常は分子的に特性評価することができないという点で、化学薬品とは異なる。抗体は、かなり複雑な大きな分子であり、調製物ごとに大きく異なる能力を有する。それらはまた、生涯の開始時の小児を含む健康な個体に投与されるため、それら自体が害を引き起こすことなく、生命を脅かす疾患を予防または治療するのに有効であることを可能な限り保証するために、それらの品質に強く重点が置かれなければならない。

【0236】

ワクチンの生成および流通におけるグローバル化の増加は、公衆衛生上の懸念をさらに良好に管理するための新たな可能性を開いているが、様々な供給源にわたって調達される

10

20

30

40

50

ワクチンの同等性および互換性に関して疑問も提起している。したがって、出発材料の国際標準化、生成および品質管理の試験、ならびにこれらの生成物の製造および使用方法に関する規制上の監視に対する高い予測の設定は、継続的な成功のための基盤となっている。ただし、これは絶えず変化している分野であり、この分野における継続的な技術的進歩は、最も古い公衆衛生上の脅威、ならびに新しい脅威、すなわち、いくつか例を挙げると、マラリア、パンデミックインフルエンザおよびHIVに対して強力な新しい武器を開発するという有望性を提供するが、生成物が達成可能な最高品質基準を満たし続けることを保証するために、製造業者、規制当局およびさらに広範囲の医療団体に大きな圧力をかける。

【0237】

そのため、任意の供給源から、または製造プロセス中の任意の時点で抗原またはワクチンを得てもよい。したがって、品質管理プロセスは、ウイルス抗原に対する本明細書において開示される抗体または断片の結合を同定するイムノアッセイのための試料を調製することから開始し得る。そのようなイムノアッセイは、本明細書中の他の箇所に開示されており、これらのいずれかを使用して、抗原の構造的完全性/抗原完全性を評価してもよい。許容可能な量の抗原的に正確でインタクトな抗原を含有する試料を見出すための基準は、規制当局によって確立され得る。

【0238】

抗原の完全性を評価する別の重要な態様は、貯蔵寿命および貯蔵安定性を決定することである。ワクチンを含むほとんどの医薬品は、経時的に劣化する可能性がある。したがって、例えばワクチン中の抗原が、対象に投与された際にもはや抗原性でなく、および/または免疫応答を生じさせることができないように分解または不安定化する程度を経時的に決定することが重要である。ここでも、許容可能な量の抗原的にインタクトな抗原を含有する試料を見出すための基準は、規制当局によって確立され得る。

【0239】

一定の態様では、ウイルス抗原は、複数の保護エピトープを含み得る。これらの場合、複数の抗体、例えば、2、3、4、5またはそれ以上の抗体の結合を調べるアッセイを使用することが有用であることが判明し得る。これらの抗体は、密接に関連するエピトープに結合し、その結果、それらは互いに隣接するか、または重なり合う。他方、それらは、抗原の異質な部分とは異なるエピトープを表し得る。複数のエピトープの完全性を検討することによって、抗原の全体的な完全性、ひいては防御免疫応答を生じさせる能力のさらに完全な像を決定することができる。

【0240】

本開示に記載される抗体およびその断片はまた、防御EV-D68抗体の存在を検出することによってワクチン接種手順の効果をモニタリングするためのキットに使用され得る。本開示に記載される抗体、抗体断片、またはそのバリエーションおよび誘導体はまた、所望の免疫原性を有するワクチン製造をモニタリングするためのキットに使用され得る。

【実施例】

【0241】

VI. 実施例

以下の実施例は、好ましい態様を実証するために含まれている。以下の実施例に開示される技術は、態様を実施する際に良好に機能するために本発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましい様式を構成すると考えることができることを当業者は理解すべきである。ただし、当業者は、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、開示される具体的な態様では多くの変更を行うことができ、依然として同様または類似の結果を得ることができることを本開示に照らして理解すべきである。

【0242】

実施例1-材料および方法

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research (USTAR) ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の4週齢の雄および雌のAG129マウス。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet (Harl

10

20

30

40

50

an Teklad) およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0243】

抗体および化合物。モノクローナル抗体 (mAb) EV-D68-228は、Vanderbilt University Medical CenterのJames Croweによって提供された。EV-D68-228を1.134mg/mlの濃度で溶液中に提供し、処置のために10、3および1mg/kgの用量になるように滅菌生理食塩水で希釈した。rRSV-90を5mg/mlの濃度で溶液中に提供し、10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン (IVIg、Carimune、CSL Behring、King of Prussia,PA) を地元の薬局から購入し、EV-D68-228 mAbに対する比較対照として使用した。グアニジンHCl (グアニジン) をSigma-Aldrich (St.Louis,MO) から入手し、陽性対照として用いた。

10

【0244】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した横紋筋肉腫 (RD) 細胞内で3回ブランク精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスをEV-D68 MP30 PPと命名した。

【0245】

実験デザイン。表Iに示すように、マウス合計78匹を、マウス各12匹の6つの群に無作為化により割り付け、マウス6匹の群は、正常対照に使用した。感染の24時間前に、EV-D68-228 mAb、IVIgまたはプラセボmAbの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを処置した。90μl容量のMEM中の $1 \times 10^{4.5}$ CCID₅₀のEV-D68 MP30 PPの鼻腔内 (IN) 点滴注入によってマウスを感染させた。グアニジンによる処置を感染4時間後に開始し、5日間にわたり1日2回続けた。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および肺サイトカイン濃度の評価のために、感染後1日目、3日目および5日目に、各処置群からマウス4匹を安楽死させた。

20

【0246】

肺サイトカイン/ケモカインの評価。製造業者の説明書 (Quansys Biosciences Q-Plex (商標) Array、Logan,UT) に従って化学発光ELISAに基づくアッセイを使用して、サイトカインおよびケモカインについて肺ホモジネートの各試料を試験した。QuansysマルチプレックスELISAは、16個の異なる捕捉抗体が規定されたアレイで96ウェルプレートの各ウェルに適用される定量的試験である。IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17、MCP-1、IFN-γ、TNFα、MIP-1α、GM-CSFおよびRANTESについて各試料上清を試験した。略語の定義は以下の通りである:IL - インターロイキン;MCP - 単球走化性タンパク質;IFN - インターフェロン;TNF - 腫瘍壊死因子、MIP - マクロファージ炎症性タンパク質;GM-CSF - 顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子;ならびにRANTES - 活性化時に制御され、正常なT細胞によって発現および分泌される (regulated upon activation,normal T cell expressed and secreted)。

30

【0247】

統計分析。Prism 8.0.2. (GraphPad Software Inc.) を使用して、あらゆる数値および統計分析を完了した。感染後の各日について、一元配置分散分析 (ANOVA) を使用して、処置群から得られた肺ウイルス力価および血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。各サイトカイン/ケモカインについて、二元配置ANOVAを使用して、処置マウスから得られた濃度とプラセボ処置マウスとを比較した。

40

【0248】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、2019年3月2日付け (2022年3月1日満了) ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府 (国立衛生研究所) の承認は、National Institutes of

50

Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (改訂;2011)に従って、2018年3月9日に更新された (PHS保証番号D16-00468 [A3801-01])。

【0249】

(表I) マウスのEV-D68呼吸器感染の処置のためのEV-D68-228のテキスト効果に対する実験デザイン

匹/ ケージ	群番号	感染	化合物	投与量	経路	処置 スケジュール	観察
12	1	有	rRSV-90 (プラセボ)	10 mg/kg	iP	感染24時間前に 1回	肺ウイルス力価、 血液ウイルス力価 および 肺サイトカイン のために、 感染後1日目、 3日目および 5日目に、 マウス4匹/群を 安楽死させた。
12	3	有	EV-D68-228	10 mg/kg			
12	5	有	EV-D68-228	3 mg/kg			
12	7	有	EV-D68-228	1 mg/kg			
12	9	有	IVIg (Carimune NF)	10 mg/kg			
12	11	有	グアニジン	100 mg/kg/日		b. i. d. ×5 感染4時間後に 開始	
6	2	無	正常対照	-	-	-	肺サイトカイン のために、 感染後1日目、 3日目および5日目に、 マウス2匹/群を 安楽死させた。

10

20

【0250】

実施例2-結果

この試験の目的は、4週齢のAG129マウスにおけるエンテロウイルスD68 (EV-D68) 呼吸器感染に対するEV-D68-228による処置の効果を決定することであった。この試験では、4週齢のAG129マウスにおけるEV-D68呼吸器感染の処置に対するEV-D68-228 mAbの効果が決定された。

【0251】

図6A～Cは、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価を示す。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、感染後1日目に肺ウイルス力価を有意に低下させたが、感染後3日目または5日目には低下させなかった。100mg/kg/日の用量でのグアニジン処置は、感染後1日目および3日目に肺ウイルス力価を有意に低下させたが、感染後5日目には低下させなかった。

30

【0252】

図7A～Cは、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置も、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。グアニジンは、感染後1日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させたが、3日目には低下させなかった。

40

【0253】

図8は、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1αおよびIL-1βの肺濃度を示す。EV-D68-228による処置は、感染後3日目にIL-1αおよびIL-1βの濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、IL-1αまたはIL-1βの肺濃度を有意に低下させなかった。

【0254】

EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-6およびMCP-1の

50

肺濃度を図9に示す。EV-D68-228による処置は、感染後3日目にIL-6およびMCP-1の濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、感染後3日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させたが、IL-6は低下させなかった。

【0255】

EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のRANTESの肺濃度を図10に示す。EV-D68-228による処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を有意に低下させた。IVIgまたはグアニジンによる処置は、感染後1日目、3日目または5日目にRANTESの肺濃度を有意に低下させなかった。

【0256】

図11は、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-2、IL-3およびIL-4の肺濃度を示す。EV-D68による感染後に、IL-2、IL-3またはIL-4の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0257】

図12は、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-5、IL-10およびIL-12p70の肺濃度を示す。EV-D68による感染後に、IL-5、IL-10またはIL-12p70の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0258】

EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-17、IFN γ およびTNF α の肺濃度を図13に示す。EV-D68による感染後に、IL-17、IFN γ またはTNF α の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0259】

EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMIP-1 α およびGM-CSFの肺濃度を図14に示す。EV-D68による感染後に、MIP-1 α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0260】

実施例3-考察

この試験では、4週齢のAG129マウスにおける、EV-D68によって引き起こされる呼吸器感染の処置について、EV-D68に対するmAbであるEV-D68-228の効果が決定された。

【0261】

10、3および1mg/kgの用量のEV-D68-228は、EV-D68感染によって引き起こされる肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および炎症誘発性サイトカインを減少させるのに極めて効果的であった。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1およびRANTESの肺濃度は、EV-D68-228による処置によって有意に低下した。

【0262】

EV-D68-228は、EV-D68による感染を予防するのに極めて効果的であった。

【0263】

実施例4-材料および方法

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research (USTAR) ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の10日齢のAG129マウス。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0264】

抗体および化合物。モノクローナル抗体 (mAb) EV-D68-228は、Vanderbilt University Medical CenterのJames Croweによって提供された。EV-D68-228を1.134mg/mlの濃度で溶液中に提供し、処置のために10、3および1mg/kgの用量になるように滅菌生理食塩水で希釈した。rRSV-90を5mg/mlの濃度で溶液中に提供し、10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン (IVIg, Carimune, CSL Behring, King of Prussia, PA) を地元の薬局から購入し、EV-D68-228 mAbに対する比較対照として使用した。グアニジンHCl (グアニジン) をSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手し、陽性対照として用いた。

10

20

30

40

50

【0265】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した横紋筋肉腫 (RD) 細胞内で3回ブランク精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスをEV-D68 MP30 PPと命名した。

【0266】

実験デザイン。表IIに示すように、マウス合計42匹を、マウス各6匹の7つの群に無作為化により割り付けた。感染24時間前に、EV-D68-228 mAb、IVIgまたはプラセボmAbの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを処置した。100 µl容量のMEM中の $1 \times 10^{6.5}$ CCID₅₀のEV-D68 MP30 PPの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを感染させた。グアニジンによる処置を感染4時間後に開始し、5日間にわたり1日2回続けた。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。罹患率、死亡率および神経学的スコアについて、全マウスを21日目まで連日観察した。神経学的スコア (NS) を以下のように記録した: NS0 - 観察可能な麻痺なし、NS1 - 後肢を異常に広げるが、歩行は正常であるか、またはわずかに遅い、NS2 - 前進運動に使用中に、後肢は部分的に虚脱し、足を引きずる、NS3 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、後肢を前進運動に使用せず、NS4 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、前進運動なし。NS4のスコアが観察されたいずれの動物も、人道的に安楽死させた。

【0267】

統計分析。Prism 8.0.2. (GraphPad Software Inc.) を使用して、Kaplan-Meier生存曲線を作成した。Log-rank (Mantel-Cox) 検定、続いてGehan-Breslow-Wilcoxon検定を使用して、生存曲線を比較した。感染後の各日について、一元配置分散分析 (ANOVA) を使用して、処置群から得られた血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。一元配置分散分析を使用して、平均体重を比較した。Kruskal-Wallis検定、続いてDunnの多重比較検定を使用して、神経学的スコアを比較した。

【0268】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、2019年3月2日付け (2022年3月1日満了) ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府 (国立衛生研究所) の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (改訂;2011) に従って、2018年3月9日に更新された (PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]) 。

【0269】

(表II) マウスのEV-D68神経学的感染の処置のためのEV-D68-228のテキスト効果に対する実験デザイン

10

20

30

40

50

匹/ ケージ	群番号	感染	化合物	投与量	経路	処置 スケジュール	観察
6	1	有	FSV-90 (プラセボ)	10 mg/kg	IP	感染24時間前に 1回	生存率、体重および 神経学的スコア について、マウスを 連日観察した。
6	3	有	EV-D68-228	10 mg/kg			
6	5	有	EV-D68-228	3 mg/kg			
6	7	有	EV-D68-228	1 mg/kg			
6	9	有	IVIg (Carimune NF)	10 mg/kg			
6	11	有	グアニジン	100 mg/kg/日		b. i. d. ×5 感染4時間後に 開始	血液ウイルス力価 のために、感染後 1日目、3日目および 5日目にマウス3匹/群 から血液を採取した。
6	2	無	正常対照	-	-	-	

【0270】

実施例5-結果

この試験の目的は、10日齢のAG129マウスにおけるエンテロウイルスD68（EV-D68）神経学的感染に対するEV-D68-228による処置の効果を決定することであった。この試験では、10日齢のAG129マウスにおけるEV-D68神経学的感染の処置に対するEV-D68-228 mAbの効果が決定された。

【0271】

図15は、EV-D68に感染させ、EV-D68-228、IVIgまたはグアニジンを用いて処置した10日齢のAG129マウスのKaplan-Meier生存曲線を示す。EV-D68に感染したマウス6匹の各群では、10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228は、死亡からの100%の保護を提供した。10mg/kgの用量のIVIgを用いて処置したマウス6匹のうち2匹は感染から生き残らなかった。100mg/kg/日の用量のグアニジンによる処置は、マウス全6匹を死亡から保護した。

【0272】

図16は、EV-D68に感染させ、EV-D68-228、IVIgまたはグアニジンを用いて処置した10日齢のAG129マウスの平均体重を示す。10、3または1mg/kgの用量は、感染に関連する体重減少からマウスを保護した。10mg/kgの用量のIVIgもマウスを体重減少から保護した。さらに、100mg/kg/日の用量のグアニジンは、マウスを体重減少から保護した。

【0273】

図17A～Cは、EV-D68-228を用いて処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置も、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。100mg/kg/日の用量でのグアニジン処置は、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。

【0274】

EV-D68に感染させ、EV-D68-228、IVIgまたはグアニジンを用いて処置した10日齢のAG129マウスの神経学的スコアを図18に示す。10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228 Abを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。10mg/kgの用量のIVIgを用いて処置したマウスでは、感染後4日目、5日目および6日目に神経学的スコアが観察された。ただし、IVIgを用いて処置したマウスの神経学的スコアは、プラセボ処置マウスと比較して有意に低下した。100mg/kg/日の用量のグアニジンを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。

【0275】

実施例6-考察

この試験では、10日齢のAG129マウスにおける、EV-D68によって引き起こされる神経学的感染の処置について、EV-D68に対するmAbであるEV-D68-228の効果が決定された。

【0276】

EV-D68感染マウスでは、10、3および1mg/kgの用量のEV-D68-228は、死亡および体重減少からの保護を提供した。さらに、EV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。神経学的スコアによって測定した場合、10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、麻痺は観察されなかった。

10

【0277】

EV-D68-228は、10mg/kgの用量のIVIgを用いて処置したマウスに観察された生存率、血液ウイルス力価および神経学的スコアによって示されるように、市販のIVIgと比較してEV-D68感染からの保護を提供するように思われた。

【0278】

EV-D68-228は、陽性対照であるグアニジンによる処置と比較した場合、死亡および麻痺からの同等の保護を提供した。ただし、グアニジン処置マウスでは、感染後3日目に血液ウイルス力価が依然として検出されたが、10、3または1mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスの血液では、感染後1日目、3日目または5日目にウイルスは検出されなかった。

20

【0279】

実施例7-マウスの呼吸器感染に対するEV-D68-228の効果

材料および方法

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research (USTAR) ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の4週齢の雄および雌のAG129マウス。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0280】

抗体および化合物。モノクローナル抗体 (mAb) EV-D68-228は、Vanderbilt University Medical CenterのJames Croweによって提供された。EV-D68-228を1.134mg/mlの濃度で溶液中に提供し、処置のために10または1mg/kgの用量になるように滅菌生理食塩水で希釈した。rRSV-90を5mg/mlの濃度で溶液中に提供し、10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン (IVIg, Carimune, CSL Behring, King of Prussia, PA) を地元の薬局から購入し、EV-D68-228 mAbに対する比較対照として使用した。

30

【0281】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した横紋筋肉腫 (RD) 細胞内で3回ブランク精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスをEV-D68 MP30 PPと命名した。

40

【0282】

実験デザイン。表Cに示すように、マウス合計52匹を、マウス各8匹の6つの群に無作為化により割り付け、マウス4匹の群は、正常対照に使用した。感染4時間後、24時間後または48時間後にEV-D68-228 mAb、IVIgまたはプラセボmAbの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを処置した。90 µl容量のMEM中の1×10^{4.5} CCID₅₀のEV-D68 MP30 PPの鼻腔内 (IN) 点滴注入によってマウスを感染させた。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および肺サイトカイン濃度の評価のために、感染後3日目および5日目に、各処置群からマウス4匹を安楽死させた。

50

【0283】

肺サイトカイン/ケモカインの評価。製造業者の説明書（Quansys Biosciences Q-Plex（商標）Array、Logan, UT）に従って化学発光ELISAに基づくアッセイを使用して、サイトカインおよびケモカインについて肺ホモジネートの各試料を試験した。QuansysマルチプレックスELISAは、16個の異なる捕捉抗体が規定されたアレイで96ウェルプレートの各ウェルに適用される定量的試験である。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17、MCP-1、IFN- γ 、TNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESについて各試料上清を試験した。略語の定義は以下の通りである：IL - インターロイキン；MCP - 単球走化性タンパク質；IFN - インターフェロン；TNF - 腫瘍壊死因子、MIP - マクロファージ炎症性3タンパク質；GM-CSF - 顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子；ならびにRANTES - 活性化時に制御され、正常なT細胞によって発現および分泌される。

10

【0284】

統計分析。Prism 8.2.0. (GraphPad Software Inc.) を使用して、あらゆる数値および統計分析を完了した。感染後の各日について、一元配置分散分析（ANOVA）を使用して、処置群から得られた肺ウイルス力価および血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。各サイトカイン/ケモカインについて、二元配置ANOVAを使用して、処置マウスから得られた濃度とプラセボ処置マウスとを比較した。

【0285】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府（国立衛生研究所）の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（改訂;2011）に従って更新された（PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]）。

20

【0286】

（表C）実験NIA-1869 実験デザイン-マウスのEV-D68呼吸器感染の処置のためのEV-D68-228の治療効果

匹/ ケージ	群番号	感染	化合物	投与量	経路	処置 スケジュール	観察
12	1	有	rRSV-90 (プラセボ)	10 mg/kg	IP	感染24時間後に 1回	肺ウイルスカ価、 血液ウイルスカ価 および 肺サイトカイン のために、 感染後3日目 および5日目に、 マウス4匹/群を 安楽死させた。
12	3	有	EV-D68-228	10 mg/kg		感染4時間後に 1回	
12	5	有	EV-D68-228	10 mg/kg		感染24時間後に 1回	
12	7	有	EV-D68-228	10 mg/kg		感染48時間後に 1回	
12	9	有	EV-D68-228	1 mg/kg			
12	11	有	IVIg (Carimune NF)	10 mg/kg		感染24時間後に 1回	
4	2	無	正常対照	-	-	-	肺サイトカイン のために、 感染後3日目 および5日目に、 マウス2匹/群を 安楽死させた。

30

40

【0287】

結果および考察

この試験では、4週齢のAG129マウスにおけるEV-D68呼吸器感染の処置に対するEV-D68-228 mAbの治療効果が決定された。

50

【0288】

図19は、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価を示す。10mg/kgのEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後4時間または24時間の時点で処置を開始した場合、感染後3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。感染48時間後に処置したマウスでは、10mg/kgの用量のEV-D68-228は、感染後3日目および5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させた。感染48時間後に投与された1mg/kgの用量でも、感染後3日目および5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させた。感染24時間後に投与された10mg/kgの用量のIVIgによる処置は、感染後3日目または5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させなかった。

【0289】

図20は、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。感染後4時間、24時間または48時間の時点で10mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて処置したマウスでは、感染後3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。感染48時間後に投与した1mg/kgの低用量のEV-D68-228は、血液ウイルス力価を検出限界未満に低下させた。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置も、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。

【0290】

図21は、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α およびIL-1 β の肺濃度を示す。EV-D68-228による治療処置は、感染後3日目および5日目にIL-1 α およびIL-1 β の濃度を有意に低下させた。IVIgによる処置は、IL-1 α またはIL-1 β の肺濃度を有意に低下させたが、感染後3日目のみであった。

【0291】

EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-5およびIL-6の肺濃度を図224に示す。EV-D68-228による治療処置は、感染後3日目にIL-5およびIL-6の濃度を有意に低下させた。感染24時間後のIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5およびIL-6の肺濃度を有意に低下させた。

【0292】

EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMCP-1およびRANTESの肺濃度を図23に示す。EV-D68-228による治療処置は、プラセボ処置マウスと比較して、感染後3日目および5日目にMCP-1およびRANTESの肺濃度を有意に低下させた。IVIgによる処置は、感染後3日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。

【0293】

図24は、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-2、IL-3およびIL-4の肺濃度を示す。EV-D68による感染後に、IL-2、IL-3またはIL-4の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0294】

図25は、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-10、IL-12p70およびIL-17の肺濃度を示す。EV-D68による感染後に、IL-10、IL-12p70またはIL-17の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0295】

EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIFN γ およびTNF α の肺濃度を図26に示す。EV-D68による感染後に、IFN γ またはTNF α の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0296】

EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のMIP-1 α およびGM-CSFの肺濃度を図27に示す。EV-D68による感染後、MIP-1 α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0297】

したがって、この試験では、4週齢のAG129マウスにおける、EV-D68によって引き起

10

20

30

40

50

こされる呼吸器感染の処置について、EV-D68に対するmAbであるEV-D68-228の治療効果が決定された。10および1mg/kgの用量のEV-D68-228は、感染48時間後以内に投与した場合、EV-D68感染によって引き起こされる肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および炎症誘発性サイトカインを減少させるのに極めて効果的であった。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、IL-6、MCP-1およびRANTESの肺濃度は、EV-D68-228による処置によって有意に低下した。EV-D68-228は、AG129マウスのEV-D68呼吸器感染のための治療処置として極めて効果的であったため、プレチスモグラフィーを今後の試験で使用して、肺機能に対するEV-D68-228処置の影響を決定することができる。

【0298】

実施例8-マウスの呼吸器感染に対するEV-D68-228の効果

10

材料および方法

この試験の目的は、10日齢のAG129マウスにおけるエンテロウイルスD68 (EV-D68) 神経学的感染に対するEV-D68-228による処置の治療効果を決定することであった。

【0299】

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research (USTAR) ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の10日齢のAG129マウス。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0300】

抗体および化合物。モノクローナル抗体 (mAb) EV-D68-228は、Vanderbilt University Medical CenterのJames Croweによって提供された。EV-D68-228を1.134mg/mlの濃度で溶液中に提供し、処置のために10mg/kgの用量になるように滅菌生理食塩水で希釈した。rRSV-90を5mg/mlの濃度で溶液中に提供し、10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン (IVIg, Carimune, CSL Behring, King of Prussia, PA) を地元の薬局から購入し、EV-D68-228 mAbに対する比較対照として使用した。

20

【0301】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した横紋筋肉腫 (RD) 細胞内で3回プラーク精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスをEV-D68 MP30 PPと命名した。

30

【0302】

実験デザイン。表Dに示すように、マウス合計42匹を、それぞれ6種類の処置マウスの6つの群に無作為化により割り付け、マウス9匹の1つの群は、各処置前の死亡を説明するためのものである。マウス3匹の1つの群は、正常対照として使用した。100 μ l容量のMEM中の $1 \times 10^{6.5}$ CCID50のEV-D68 MP30 PPの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを感染させた。感染24時間後、48時間後、72時間後または120時間後に、EV-D68-228 mAbの腹腔内 (IP) 投与によってマウスを処置した。感染24時間後に、IVIgまたはプラセボAbによる処置を1回行った。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。罹患率、死亡率および神経学的スコアについて、全マウスを21日目まで連日観察した。神経学的スコア (NS) を以下のように記録した: NS0 - 観察可能な麻痺なし、NS1 - 後肢を異常に広げるが、歩行は正常であるか、またはわずかに遅い、NS2 - 前進運動に使用中に、後肢は部分的に虚脱し、足を引きずる、NS3 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、後肢を前進運動に使用せず、NS4 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、前進運動なし。NS4のスコアが観察されたいずれの動物も、人道的に安楽死させた。

40

【0303】

統計分析。Prism 8.0.2. (GraphPad Software Inc.) を使用して、Kaplan-Meier生存曲線を作成した。Log-rank (Mantel-Cox) 検定、続いてGehan-Breslow-Wilcoxon

50

検定を使用して、生存曲線を比較した。感染後の各日について、一元配置分散分析（ANOVA）を使用して、処置群から得られた血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。一元配置分散分析を使用して、平均体重を比較した。Kruskal-Wallis検定、続いてDunnの多重比較検定を使用して、神経学的スコアを比較した。

【0304】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府（国立衛生研究所）の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（改訂;2011）に従って更新された（PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]）。

【0305】

（表D）実験NIA-1870 実験デザイン-マウスのEV-D68神経学的感染の処置のためのEV-D68-228の治療効果

匹/ ケージ	群番号	感染	化合物	投与量	経路	処置 スケジュール	観察
6	1	有	rRSV-90 (プラセボ)	10 mg/kg	iP	感染24時間後に 1回	生存率、体重および 神経学的スコア について、 マウスを 連日観察した。 血液ウイルス力価 のために、感染後 1日目、3日目、 5日目および7日目に マウス3匹/群から 血液を採取した。
6	3	有	EV-D68-228	10 mg/kg		感染24時間後に 1回	
6	5	有	EV-D68-228			感染48時間後に 1回	
6	7	有	EV-D68-228			感染72時間後に 1回	
9	9	有	EV-D68-228			感染120時間後に 1回	
6	11	有	IVIg (Canimmune NF)	10 mg/kg		感染24時間後に 1回	
3	2	無	正常対照	-	-	-	正常な 体重増加が 観察された。

【0306】

結果および考察

この試験では、10日齢のAG129マウスにおけるEV-D68神経学的感染の治療処置に対するEV-D68-228 mAbの効果が決定された。

【0307】

図28は、EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスのKaplan-Meier生存曲線を示す。EV-D68-228を10mg/kgの用量で単回投与すると、感染24時間後、48時間および120時間後に処置したマウスでは、有意な生存利益が観察された。感染120時間後に処置したマウスにおける生存利益の差は、処置したマウス全7匹が依然として感染により死亡したこと、死亡日の増加によるものであった。10mg/kgの用量のIVIgは、感染24時間後に投与した場合、マウスを死亡から完全に保護した。

【0308】

図29は、EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスの平均体重を示す。10mg/kgのEV-D68-228の単回用量は、感染24時間後または48時間後に投与した場合、感染に関連する体重減少からマウスを保護した。感染24時間後に投与されたIVIgの単回投与は、体重減少からマウスを保護しなかった。

【0309】

図30A～Cは、EV-D68-228を用いて、感染後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。感染24時間後、48時間後または72時間後の時点での10mg/kg

のEV-D68-228の単回投与は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。感染24時間後の10mg/kgの用量でのIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。生存マウスのいずれにも、感染後7日目にウイルス力価は検出されなかった。

【0310】

EV-D68に感染させ、EV-D68-228を用いて感染後に処置した10日齢のAG129マウスの神経学的スコアを図31A～Bに示す。3日目、4日目および5日目の神経学的スコアは、10mg/kgの用量のEV-D68-228を用いて感染24時間後に処置したマウスでは有意に低下した。感染24時間後に投与された10mg/kgの用量のIVIgは、感染後3日目、4日目および5日目に神経学的スコアを低下させた。神経学的スコアの比較は、全プラセボ処置マウスが死亡したため、感染後5日目以降に完了しなかった。

10

【0311】

したがって、この試験では、10日齢のAG129マウスにおける、EV-D68によって引き起こされる神経学的感染の治療について、EV-D68に対するmAbであるEV-D68-228の治療効果が決定された。感染48時間後以内に投与した場合、10mg/kgのEV-D68-228の単回用量は、死亡および体重減少からマウスを保護した。感染72時間後以内に処置したマウスでは、血液ウイルス力価の有意な低下が観察された。神経学的スコアによって測定した場合、感染24時間後に10mg/kgのEV-D68を用いて処置したマウスでは、麻痺の減少が観察された。EV-D68-228はEV-D68のアウトブレイク中の予防療法として使用することができるため、感染前の様々な時点で投与した場合のEV-D68-228の効果を決定することは有益であろう。

20

【0312】

実施例9-材料および方法

試験デザイン。本発明者らは、EV-D68感染に応答してヒトが産生することができるいずれかの抗体を同定しようと試みるためにこの試験をデザインした。したがって、本発明者らは、間接ELISAスクリーニングに生ウイルス単離株を使用して、EV-D68結合抗体を分泌するB細胞を同定し、次いで、それらのB細胞をミエローマ細胞と電気融合して、モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを作製した。次いで、本発明者らは、CCID₅₀、ELISAおよびクライオEMに基づく技術を使用して、インビトロでこれらの個々のmAbの中和および結合特性を特性評価した。本発明者らはインビボ実験を追求して、ヒトを対象とした予防剤および/または治療剤としてのmAb EV68-228の開発を裏付ける前臨床データを生成した。この目的のために、本発明者らは、理論的利益に基づいてAFMを用いてヒトを治療するために広く使用されているヒトIVIgと比較して、EV-D68感染からマウスを保護する際のmAb EV68-228の効果を試験したが、このIVIg治療はこれまで効果的であることは証明されていない。AG129マウス感染モデルの利点は、本発明者らが、感染の呼吸器モデルおよび神経学的モデルの両方を対象として抗体処置の効果を測定することができたことである。

30

【0313】

細胞株。RD細胞（ヒト、女性起源）は、American Type Culture Collection (ATCC CCL-136) から入手した。10%熱不活化ウシ胎児血清 (HI-FBS; HyClone)、1mMピルビン酸ナトリウムおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アンホテリシンB (ThermoFisher Scientific) を補充したDulbecco改変イーグル培地 (DMEM) (ThermoFisher Scientific) 中、37°C、5%CO₂でRD細胞を培養した。構造試験のために、10%HI-FBS (Sigma-Aldrich) および非必須アミノ酸 (NEAA、Life Technologies) を補充したDMEM (Sigma-Aldrich) 中でRD細胞を培養した。ExpiCHO（ハムスター、雌起源）細胞株をThermoFisher Scientificから購入し、製造業者のプロトコルに従って培養した。H MMA2.5株は、マウスミエローマ細胞株をヒトミエローマ細胞株と融合することによって作製された非分泌マウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株（性別情報は入手できない）である (Posner et al., 1987)。この細胞株を以前に記載されているように培養した (Yu et al., 2008)。全細胞株をマイコプラズマ (Mycoplasma) について毎月検査し、いずれの

40

50

場合も陰性であることが分かった。

【0314】

ウイルス。この試験で使用したウイルス単離株の一覧については表Kを参照されたい。以下に記載される酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）に使用するために、RD細胞単層培養物中で2世代にわたってEV-D68単離株を増殖させた。RD細胞単層に所与のウイルス単離株を接種し、70～90%の細胞死が観察されるまでモニタリングした。次いで、この細胞培養フラスコを-80℃に凍結し、解凍し、内容物を掻き取り、50mLコニカルチューブ内に回収した。この調製物を倒立カップソニケーター（inverted cup sonicator）内で最大出力設定（Fisherbrand）で20秒間3回超音波処理し、30秒間ボルテックスし、次いで、20秒間さらに2回超音波処理した。細胞残屑をペレット化し、ウイルス含有上清をPBS（w/v）クッション中30%スクロース上で10℃で100,000×gで4時間遠心した。上清を捨て、ペレットをNTE緩衝液（20mM Tris、120mM NaCl、1mM EDTA pH8.0）中0.01%（w/v）ウシ血清アルブミン（BSA）に4℃で一晩浸漬した。次いで、10,000×gで10分間の遠心分離によって、再懸濁したペレットをさらに清澄化してから、使用準備ができるまで-80℃でウイルスアリコートを保存した。

10

【0315】

構造試験のために、US/MO/14-18947単離株を使用した。ウイルスをRD細胞内で継代し、大規模増殖の前に-80℃で保存した。RD細胞を80%コンフルエントまで増殖させ、0.01の感染多重度でEV-D68に感染させた。感染2日後、細胞を上清とともに回収し、遠心した。細胞ペレットを回収し、複数回の凍結/解凍サイクルの後、遠心して細胞残屑を除去した。全上清を合わせ、210,000×gで2時間かけてペレット化した。ペレットをインキュベートし、250mM HEPES（pH=7.5）、250mM NaCl緩衝液に再懸濁し、次いで、最終濃度5mM MgCl₂、0.01mg/mL DNase（Sigma-Aldrich）、0.8mg/mLトリプシン、15mM EDTAおよび1%（w/v）n-ラウリル-サルコシンを補充した。次いで、試料を210,000×gで2時間かけてペレット化し、再懸濁し、160,000×gで2時間の超遠心分離の最後の回のために酒石酸カリウム勾配（10～40%、w/v）にロードした。チューブの中央で青色バンドとして観察された精製ウイルス試料を抽出し、20mM Tris、120mM NaCl、1mM EDTA（pH=8.0）緩衝液に緩衝液交換して酒石酸カリウムを除去した。

20

【0316】

CCID₅₀アッセイによるウイルス負荷の検出。RD細胞培養単層におけるCCID₅₀アッセイによって、マウス血液または肺試料中のウイルスストックまたはウイルスの滴定を行った。要約すると、試料の10倍希釈物を96ウェルプレートの三連ウェル（50μL）内のRD細胞単層に適用し、33℃で5%CO₂中で5日間インキュベートし、次いで、1%パラホルムアルデヒドによって固定し、クリスタルバイオレットによって染色した。いずれかの細胞変性効果を有するウェルをウイルスについて陽性としてスコア化し、Spearman-Kaerber方程式に基づく式を使用して力価を決定した（Ramakrishnan,2016）。検出限界は136 CCID₅₀/mLであった。

30

【0317】

ウイルス中和アッセイ。本質的にポリオウイルスについて以前に記載されているように（Weldon et al.,2016）、示されたウイルスを使用して、CCID₅₀形式でウイルス中和アッセイを行った。ウイルスを漸増濃度のmAbとともに33℃で1時間二連でインキュベートし、次いで、各懸濁液を96ウェルプレートの特殊四連ウェル（50μL）内のRD細胞の単層に加えた。33℃で5%CO₂中で5日間インキュベートした後、細胞を1%パラホルムアルデヒドによって固定し、クリスタルバイオレットによって染色した。いずれかの細胞変性効果を有するウェルをウイルスについて陽性としてスコア化し、Spearman-Kaerber方程式に基づく式を使用して50%阻害濃度（IC₅₀）を決定した（Ramakrishnan,2016）。検出限界は57μg/mL～4.8pg/mLであった。

40

【0318】

マウスモデル。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research（USTAR）ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニーから、10日齢（神経学的モデル）また

50

は4週齢（呼吸器モデル）の雄および雌のAG129マウス（インターフェロン α/β および γ の受容体が欠損している）を得た。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。この試験は、2019年3月2日付け（2022年3月1日満了）ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府（国立衛生研究所）の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（改訂;2011）に従って、2018年3月9日に更新された（PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]）。

【0319】

抗体および対照処置をPBSで希釈し、EV-D68接種の前または後の示された時点で腹腔内注射によって投与した。グアニジンHCl (Sigma-Aldrich) を処置の陽性対照として用い (Hurst et al.,2019)、感染4時間後に開始し、5日間にわたって1日2回続けた。腹腔内注射（神経学的モデル;100 μ L容量のMEM中のCCID₅₀ 10^{6.5}）または鼻腔内点滴注入（呼吸器モデル;90 μ L容量のMEM中の10^{4.5} CCID₅₀）によって、マウス適合EV-D68の懸濁液を投与した。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。示されるように、肺ウイルス力価、血液ウイルス力価または肺サイトカイン濃度の測定のために、感染後の示された時点でマウスを人道的に安楽死させた。神経学的モデルについては、罹患率、死亡率および神経学的スコアについて、全マウスを21日目まで連日観察した。神経学的スコア（NS）を以下のように記録した: NS0 - 観察可能な麻痺なし、NS1 - 後肢を異常に広げるが、歩行は正常であるか、またはわずかに遅い、NS2 - 前進運動に使用中に、後肢は部分的に虚脱し、足を引きずる、NS3 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、後肢を前進運動に使用せず、NS4 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、前進運動なし。NS4のスコアが観察されたいずれの動物も、人道的に安楽死させた。

【0320】

肺サイトカイン/ケモカインの評価。製造業者の説明書 (Quansys Biosciences Q-Plex (商標) Array, Logan, UT) に従って定量的化学発光ELISAに基づくアッセイを使用して、サイトカインおよびケモカインについて肺ホモジネートの各試料を試験した。QuansysマルチプレックスELISAは、16個の異なる捕捉抗体が規定されたアレイで96ウェルプレートの各ウェルに適用される定量的試験である。

【0321】

ヒトモノクローナル抗体 (mAb) の生成。研究室で実証されたEV-D68上気道感染 (Bochkov et al.,2014) を有するChildhood Onset of Asthma (COAST) 出生コホート (Lemanske,2002) から対象を特定した。書面によるインフォームドコンセントを得た後、末梢血を採取し、製造業者のプロトコルに従ってSepMateチューブ (Stemcell Technologies) を使用して末梢血単核球 (PBMC) を精製することができるまで室温で保存し、次いで、10% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) のウシ胎児血清 (FBS) 溶液中で凍結保存し、液体窒素の気相中で保存した。Medium A (STEMCELL Technologies) 中でエプスタイン・バーウイルス、細胞周期チェックポイントキナーゼ2 (chk2) 阻害剤 (Sigma-Aldrich)、CpG (Sigma-Aldrich) およびシクロスポリンA (Sigma-Aldrich) とを混合することによって、PBMC内のメモリーB細胞から、以前に記載されているように (Smith and Crowe,2015) リンパ芽球様細胞株 (LCL) を生成した。1週間後、LCLを計数し、次いで、無関係のドナー由来の γ 照射ヒトPBMCのフィーダー層上で増殖させた。2014年の臨床単離株から生成された細胞培養増殖EV-D68ウイルスを含む生EV-D68ウイルスを抗原として使用する間接ELISAによって、EV-D68反応性IgGの存在について、LCL上清をもう一週間スクリーニングした。以前に記載されているように (Yu et al.,2008)、電気融合によって、ウイルス反応性抗体を含むウェルから得られたLCLをHMMMA2.5 ミエローマ細胞に融合した。融合反応後、抗体生成のための上清のスクリーニングの前に、384ウェルプレート内のHAT培地補助物質 (Sigma-Aldrich) およびウアバイン (Sigma-Aldrich) を含有する選択培地中でハイブリドーマ株を培養した。2週間後、生ウイル

スを抗原として用いた間接ELISAによって、得られたハイブリドーマ細胞株からの上清をスクリーニングし、EV-D68反応性抗体を有するウェルから得られた細胞株を培養で増殖させ、次いで、単一細胞フローサイトメトリーソーティングによって384ウェル細胞培養プレートにクローニングした。これらのクローニングされた細胞を12ウェル組織培養処理プレート（Corning）内で約50%コンフルエントになるまでMedium E中で増殖させ、それらの上清をELISAによってウイルス結合についてスクリーニングした。その後の使用のためにmAb産生ハイブリドーマ細胞株として、ELISAにおいて最も高いシグナルを有するウェルを選択した。

【0322】

MAbアイソタイプおよび遺伝子配列分析。西洋ワサビペルオキシダーゼ（Southern Biotech）とコンジュゲートされたマウス抗ヒトIgG1抗体、マウス抗ヒトIgG2抗体、マウス抗ヒトIgG3抗体またはマウス抗ヒトIgG4抗体を使用して、分泌された抗体のアイソタイプおよびサブクラスを決定した。フローサイトメトリーソーティングによって生物学的にクローニングされたハイブリドーマ株から得られたRNAから、抗体の重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子を配列決定した。RNeasy Miniキット（Qiagen）を使用して、全RNAを抽出した。改変した5'RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）手法を使用した（Turchaninova et al.,2016）。要約すると、5 μ Lの全RNAをcDNA合成プライマーミックス（各10 μ M）と混合し、70°Cで2分間インキュベートし、次いで、インキュベーション温度を42°Cに下げて合成プライマーをアニーリングした（1~3分間）。インキュベーション後、プライマーをアニーリングした全RNA反応物に、5×first-strand buffer（Clontech）、DTT（20mM）、5'テンプレートスイッチオリゴ（10 μ M）、dNTP溶液（各10mM）および10×SMARTScribe Reverse Transcriptase（Clontech）を含有する混合物を加え、42°Cで60分間インキュベートした。1.8×の比でAmpure Size Select Magnetic Bead Kit（Beckman Coulter）を使用して、first-strand合成反応物を精製した。続いて、以下の条件、すなわち、90秒間の初期変性、続いて98°Cで10秒間の30サイクルの変性、60°Cで20秒間のアニーリング、および72°Cで40秒間の伸長、続いて72°Cで4分間の最終伸長工程による熱サイクリングに、5 μ Lのfirst-strand cDNA、2×Q5 High Fidelity Mastermix（NEB）、dNTP（各10mM）、フォワードユニバーサルプライマー（10 μ M）およびリバースプライマーミックス（重鎖混合物中各0.2 μ M、軽鎖混合物中各0.2 μ M）を含有する単一PCR増幅反応物を供した。このプロトコルで使用されるプライマー配列はいずれも以前に記載された（（Turchaninova et al.,2016）。0.6×の比でAMPure Size Select Magnetic Bead Kit（Beckman Coulter）を使用して、第1のPCR反応物を精製した。次いで、Multiplex SMRT Sequencing protocol（Pacific Biosciences）に従ってアンプリコンライブラリーを調製し、Sequel platform instrument（Pacific Biosciences）を用いて配列決定した。生の配列決定データを逆多重化し、SMRT Analysis tool suite（Pacific Biosciences）を使用して循環コンセンサス配列（circular consensus sequence）（CCS）を決定した。ImMunoGeneTicsデータベースを使用して、アライメントによって、生殖細胞系遺伝子由来の遺伝子セグメント、相補性決定領域（CDR）および変異の同一性を決定した（Giudicelli and Lefranc,2011）。

【0323】

抗体の生成および精製。ハイブリドーマ由来mAbについては、ハイブリドーマSFM（1X）無血清培地（Gibco）中でハイブリドーマ細胞を枯渇するまで増殖させた。組換えmAb生成のために、重鎖および軽鎖の遺伝子をコードするcDNAを合成し、完全長IgG1タンパク質をコードするDNAプラスミド発現ベクターにクローニングし（McLean et al.,2000）、大腸菌細胞に形質転換した。製造業者のプロトコルに従って、ExpiCHO細胞の一過性トランスフェクション後にMAbタンパク質を生成した。Protein Gカラム（GE Healthcare Life Sciences）を使用して、AKTA装置を用いた高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）によって、濾過した培養上清から、得られた分泌されたIgGを精製した。精製mAbをPBSに緩衝液交換し、滅菌0.45 μ m孔径フィルター装置（Millipore）を使用

して濾過し、濃縮し、使用するまで-80℃でアリコートで保存した。また、各mAbのアリコートを、mAbに対して20倍モル過剰のビオチンを含むEZ-Link NHS-PEG₄-ビオチンキット (ThermoFisher Scientific) を使用して96ウェルフォーマットで直接ビオチン化し、続いて脱塩プレート (Zeba、7kDaカットオフ) を使用して緩衝液交換してPBSに戻した。ハイブリドーマ由来mAbをインビトロ実験で使用し、組換えmAbをインビボ実験で使用した。プールしたヒト免疫グロブリンを静脈内免疫グロブリン (IVIG、Carimune、CSL Behring、King of Prussia, PA) として購入した。RSV90は、本発明者らの研究室で生成された組換えヒトIgG1 mAbであり、マウス実験では陰性対照、プラセボmAbとして使用された。ウエスタンブロットに使用するポリクローナル抗VP1抗体、ポリクローナル抗VP2抗体およびポリクローナル抗VP3抗体をGenetexから購入した。

10

【0324】

Fab断片生成。Fab断片を生成し、Pierce Fab Preparation Kit (ThermoFisher Scientific) を介して精製した。使用前に消化緩衝液 (システインHCl 35mg/供給されたFab消化緩衝液10mL、pH約7.0) を用いて、固定化PapainバイアルスピンカラムおよびZeba Spin Desalting Columnを平衡化した。使用前にPBS緩衝液を用いて、NAb Protein A Plus Spin Columnを平衡化した。元のIgG試料をZeba Spin Desalting Columnに通し、調製したIgG試料0.5mLを固定化Papainバイアル上に適用し、37℃で5時間Fab消化のためにインキュベートした。次いで、最終Fab断片をPBSに緩衝液交換し、4℃で保存した。

【0325】

20

EV-D68特異的ELISA。100mMバイカーボネート/カーボネート緩衝液、pH9.6に希釈したウイルスストックによって、培地結合、黒色蛍光イムノアッセイマイクロタイタープレートのウェル (Greiner Bio-One) をコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。2%BSAの0.05%Tween-20含有Dulbeccoリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) (DPBS-T) 溶液を用いて、プレートを1時間ブロッキングした。mAbスクリーニングアッセイでは、ハイブリドーマ培養上清をウェルに加え、周囲温度で2時間インキュベートした。HRPとコンジュゲートされたFc特異的ヤギ抗ヒトIgG (Southern Biotech) およびQuantaBlu蛍光発生ペルオキシダーゼ基質 (ThermoFisher Scientific) を使用して、結合した抗体を検出した。20分後、100mMグリシン (pH10.5) を加えて反応をクエンチし、Synergy H1マイクロプレートリーダー (Biotek) を使用して325nmでの励起後に420nmで発光を測定した。用量応答アッセイおよび交差反応性アッセイのために、精製mAbの段階希釈物を二連の技術的反復でウェルに適用し、mAb結合を上記のように検出した。実験は少なくとも3回行った。競合ELISAのために、マイクロタイタープレートをウイルスによって最初にコーティングし、次いで、精製mAbを100 µg/mLで加え、33℃で3時間インキュベートした。次いで、最終濃度5 µg/mLでビオチン化mAbをこの混合物にスパイクし、周囲温度で1.5時間インキュベートした。洗浄し、アビジン-ペルオキシダーゼ (ThermoFisher Scientific) と30分間インキュベートした後、mAb結合を上記のように検出した。

30

【0326】

ウエスタンブロット。B1クレードウイルス調製物を変性および還元負荷緩衝液と混合し、100℃で5分間煮沸し、次いで、Novexシャーププレステインドタンパク質スタンダード (ThermoFisher Scientific) とともにSDS-PAGEゲル上で泳動させた。タンパク質をメンブレンに転写し、ブロッキング緩衝液 (Li-Cor) 中でブロッキングし、次いで、個々のレーンがブロッキング緩衝液中の精製mAbによって染色され得るようにストリップに切断した。IRDye 800CWコンジュゲートヤギ抗ヒト二次抗体 (Li-Cor) を使用して、mAb結合を検出した。ストリップを再構築して分子量を可視化し、Odyssey CLx近赤外イメージャー (Li-Cor) を用いてイメージングした。

40

【0327】

クライオEM試料の調製およびデータ収集。EV-D68:Fab EV68-159複合体およびEV-D68:Fab EV68-228複合体の両方について、精製されたEV-D68ウイルスおよびFabを1:2

50

00のモル比で混合した。室温で45～60分間インキュベートした後、3.5 μ Lのウイルス-Fab混合物試料をグロー放電した400メッシュレーシー炭素膜銅グリッド (Ted Pella Inc.) に加えた。グリッドを液体エタン中でプランジ凍結 (Cryoplunge 3システム、Gatan) してから、湿度75～80%で3.5秒間ブロットした。300kV Titan Krios Microscope (Thermo Fisher Scientific) を用いてクライオEMデータセットを収集した。EV-D68:Fab EV68-228データセットでは、64,000Xの倍率でK3 Direct Detection Camera (Gatan) を用いてプログラムLeginon (Suloway et al.,2005) を使用して動画を収集し、0.7～2 μ mの焦点ずれ範囲で0.662 Åの超分解能画素サイズを得た。2.6秒間の露光にわたる44.2電子/Å²の総電子線量を50フレームにわたって記録した。公称倍率81,000XでK2 Summit直接電子検出器 (Gatan) を用いてEV-D68:Fab EV68-159データセットを取得し、0.874 Åの超分解能画素サイズ、0.7～3.5 μ mの焦点ずれ範囲を得た。12秒間の露光にわたる31.4電子/Å²の総電子線量を60フレームに分割した。全体として、EV-D68:Fab EV68-228およびEV-D68:Fab EV68-159のデータセットについて、それぞれ462個の動画および732個の動画を取得した。

【0328】

画像処理。両データセットについて、データ収集中にAppion (Lander et al.,2009) で実施されたように、MotionCor2 (Zheng et al.,2017b) を介して生の動画フレームに対して動き補正を行った。CTFFIND4を用いて整列したフレームを用いてコントラスト伝達関数 (CTF) を推定した (Rohou and Grigorieff,2015)。Appion Manual Picker (Lander et al.,2009) を使用して粒子ピッキングテンプレートを生成し、XMIPP (Sorzano et al.,2004) の2次元 (2D) 分類によって自動ピッキング用のテンプレートを得た。次いで、これらのテンプレートをFindEM (Roseman,2004) での自動ピッキングに使用し、RELIONを使用して粒子を抽出した。次いで、これらの粒子をRELION (Scheres,2012) で複数回の2D分類および3D分類に供した。これにより、EV-D68:Fab EV68-228およびEV-D68:Fab EV68-159のデータセットについて20,194個および30,554個の粒子が得られ、これを、ゴールドスタンダードの精密化法 (Guo and Jiang,2014) に従ってプログラムJSPRを使用して最終的な3D正二十面体再構築のために選択した。両マップの最終分解能は、0.143のゴールドスタンダードのFourierシェル相関カットオフに基づいて推定した (Scheres and Chen,2012)。RELION (Scheres,2012) 後処理でマップ鮮鋭化を行った。データ収集パラメータおよび関連項目を表Gに要約する。

【0329】

モデル構築、精密化および分析。EV-D68:Fab EV68-159およびEV-D68:Fab EV68-228の原子構造に同じ方法を使用した。モデル構築の開始基準としてEV-D68Fermon株 (PDBコード:4WM8) のX線結晶解析法モデルを選択し、プログラムChimera (Pettersen et al.,2004) を使用して密度マップに手でフィッティングした。初期フィッティングを基礎として使用して、このモデルをCoot (Emsley et al.,2010) で再構築し、PHENIX (Adams et al.,2010) で実空間精密化を使用して精密化して、外れ値、および不適切にフィッティングされた回転異性体を補正した。Chimera (Pettersen et al.,2004)、Coot (Emsley et al.,2010) およびCCP4i2-PISA (Potterton et al.,2018) を使用して、結合界面残基を決定した。MolProbity (Chen et al.,2012) で最終的な原子モデルを検証した。精密化統計を表Gに記載する。

【0330】

中和エスケープ変異ウイルスの選択。クレードB1 EV-D68単離株を、RD細胞内の精製mAbの量を増加させながら選択下で継代した。mAbおよびウイルスを33℃で1時間インキュベートした後、この混合物を33℃で2時間かけて細胞単層に加えた。次いで、単層を3回すすぎ、mAb含有培地を加え戻した。この培養物を、少なくとも70%の細胞変性効果が観察されるまで (細胞がプレートから持ち上げられるまで) 33℃でインキュベートし、その時点で、細胞および上清を一緒に回収し、-80℃に凍結した。この試料を解凍し、倒立カップソニケーター内の同じ微量遠心チューブ内で最大出力3×20秒で超音波処理し、最大出力で30秒間ボルテックスし、再び2×20秒で超音波処理した。細胞残屑を10,000×

gで10分間清澄化した。次いで、ウイルス含有上清を、さらに高い濃度のmAbを含有する新鮮な培地と1:1で混合した。3回の継代にわたって、mAb濃度を5から50、500ng/mLに増加させた。TRI ReagentおよびDirect-zol RNA MiniPrepキット (Zymo Research) を使用してウイルスRNAを回収した。本発明者らは、三連でcDNA鋳型を作製し、そこから、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara) およびプライマー 5'- CCTCCGGCCCCCTGAAT (Fwd; SEQ ID

NO: 641) および 5'- CCATTGAATCCCTGGGCCTT (Rev; SEQ ID NO: 642)

を用いて、ウイルスゲノムのP1領域を包含する3,080bpアンプリコンを作製した。本発明者らは、Pacific Biosciences (PacBio) 次世代配列決定プラットフォームを使用して、3つの反復の各々の配列を生成した。各配列決定ランの2,000個のリードを使用して、各変異が観察されたリードの割合を定量した。陰性対照選択mAb選択から得られた全リードの野生型コンセンサス配列と比較して、変異を決定した。

【0331】

定量および統計分析。技術的反復および生物学的反復は、方法、および図の説明に示されている。Prism v8 (GraphPad) を使用して統計分析を行った。

【0332】

競合結合アッセイ。無関係な事前競合mAbを加えない対照ウェルから決定された最大結合の割合に対して、ELISA蛍光値を正規化した。Pandas Pythonパッケージ (McKinney, 2010) のcorr法を使用した3つの異なる実験からの阻害率中央値を使用して、各他のピオチン化mAbに対する各ピオチン化mAbのピアソン相関を計算した。次いで、Seaborn Pythonパッケージのクラスターマップ法を使用して、これらのピアソン相関に対して階層的クラスタリングを行った。クラスタリング情報は、newick形式でエクスポートし、階層的にクラスタリングされたヒートマップを表示するために使用したInteractive Tree of Life v4 (Letunic and Bork, 2019) にインポートしてから、最終的な表示のためにExcel (Microsoft) にインポートした。

【0333】

抗体ELISA結合実験。0の底値と最大飽和蛍光値を有するmAbの最大蛍光値よりも低い頂値とに拘束された4パラメータS字形用量反応非線形回帰分析を使用して、抗体濃度のlog変換後にmAb結合に関するEC₅₀値を決定した。

【0334】

ウイルスアッセイ。Spearman-Kaerber方程式に基づく式を使用してMAb IC₅₀値を計算した (Ramkrishnan, 2016)。一元配置分散分析 (ANOVA) およびDunnettの多重比較検定を使用して、単一のプール分散によりマウスの血漿中のウイルス力価および肺内のウイルス力価を比較した。p<0.05の値を有意とみなした。

【0335】

肺サイトカイン/ケモカインの評価。Brown-Forsythe一元配置分散分析検定およびDunnettのT3多重比較検定を使用して、各比較のために計算された個々の分散により、各サイトカイン/ケモカインについて、処置したマウスから得られた濃度とプラセボ処置マウスとを比較した。本発明者らは、各測定について等しい標準偏差を仮定しなかったため、この分析を選択した。

【0336】

インビボ保護試験。Kaplan-Meier法を使用して生存曲線を作成し、log rank検定 (Mantel-Cox) を使用して曲線を比較した。カイ二乗検定を使用して神経学的スコアを比較した。

【0337】

実施例10-結果

書面によるインフォームドコンセンストが得られた後、米国の2014年のアウトブレイク中にEV-D68気道感染が以前に実証されている対象12例が献血し、その中から、本発明者らは末梢血単核球 (PBMC) を単離した。対象は、感染時に12~15歳、採血時に16~18

10

20

30

40

50

歳であった。各対象は、EV-D68関連呼吸器疾患の病歴を有し、AFMの症状を有しなかった（表E）。回収したPBMcをエプスタイン・バーウイルスの接種によってインビトロで形質転換して、抗体を分泌するメモリーB細胞由来リンパ芽球様細胞株（LCL）を生成した。間接ELISAでLCL培養上清を使用して、EV-D68反応性IgGの存在についてスクリーニングした。本発明者らは、2014年の臨床単離株から生成された、EV-D68の実験室増殖生ウイルス調製物に結合したが、同様に調製した非感染細胞上清には結合しなかった抗体を用いて培養物を選択した。EV-D68特異的抗体を分泌するLCLと非分泌ミエローマ細胞株との電気融合後、得られたハイブリドーマ細胞を単一細胞ソーティングして、完全ヒトmAbを分泌するクローンハイブリドーマを生成した（表F）。

【0338】

本発明者らは、自然感染に応答して作製されたヒトmAbによってウイルス表面上のいくつかの主要抗原部位が結合されるかを決定しようとした。本発明者らは、類似のエピトープを認識する抗体の群を同定するために、間接ELISAにおいて、mAbが生ウイルスへの他のmAbの各々の結合と競合し得るかどうかを決定した。競合結合実験のために、ウイルスをELISAプレートに直接コーティングし、次いで、高濃度の1つの非標識mAbとインキュベートした。次に、ビオチン化によって標識されたmAbをさらに低い濃度で加え、第1のmAbの存在下で第2のmAbがウイルスに結合する能力を決定した。次いで、本発明者らは、阻害データとのピアソン相関を使用して、抗体結合パターンの相互の関連性を決定し、4つの主要な競合結合群を同定し（図32）、それらを第1群～第4群と名付けた。本発明者らは、各mAbを使用してEV-D68調製物のウェスタンブロットを染色し、競合結合群2および3では、ほぼ全部のmAbがVP1タンパク質内の線状エピトープに結合したのに対して、ただ1つの他のmAbがウイルス調製物中のいずれかのタンパク質に結合したことを見出した（図40）。

【0339】

米国における2014年のEV-D68のアウトブレイクの間、ほぼすべてのウイルス単離株が新たに出現したB1クレードであり、密接に関連するB2クレードまたは遠く関連するDクレード由来のウイルスの検出は少なかった（Tan et al., 2016）。この試験では、対象の1例を除く全例がB1クレード単離株に感染していた（表E）。2014年以来、B3クレードウイルスが優勢であり、B1クレードウイルスはもはや伝播していない（Dyrdak et al., 2019）。2018年に、米国疾病管理予防センターによって配列決定されたEV-D68単離株は、いずれもB3クレード由来であった（Kujawski et al., 2019）。本発明者らは、最初に、B1クレードEV-D68単離株を使用して、50%細胞培養感染用量（CCID₅₀）アッセイで各mAbのインビトロ中和能を測定した（図33A）。28個のmAbは、50 µg/mL未満の50%阻害濃度（IC₅₀）で中和を示し、mAb EV68-159は、0.32 ng/mLのIC₅₀値で最も強い中和を示した（図41）。本発明者らは、Dクレード単離株に対して最も強力に中和する21個のmAbをさらに試験し、11個のmAbがそのウイルスを中和し、そのうち7個が異種ウイルスに対するIC₅₀値による効力の少なくとも10分の1の低下を示すことを見出した。Fermon株は1962年に得られた単離株であり、クレード分類スキームに適合しないほど現代のEV-D68単離株とは縁遠い（Tan et al., 2016）。9つのmAbは、Fermon実験室参照株を中和したが、現代のB1クレードウイルスを阻害するほど強力ではなかった。

【0340】

本発明者らは、中和アッセイが交差反応性を過小評価し得ることを認識し、上記と同じ間接ELISA手法を使用して、B1クレード、B2クレードまたはDクレード由来の代表的なEV-D68単離株への結合のために、50%有効濃度（EC₅₀）の精製mAbを生成した（図33B～Cおよび図42）。B1クレード単離株に対する $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ の結合についてEC₅₀値を有するmAbのうち、いずれもがB2クレード単離株に結合したが、約半分がDクレード単離株にも結合した（図33Bおよび図41）。概して弱く結合したが、試験した全クレード由来のウイルスに交差反応した追加のクラスのmAbが観察された。

【0341】

現在まで、抗体-EV-D68相互作用の構造試験はマウスmAbに限定されている（Zheng e

10

20

30

40

50

t al., 2019)。本発明者らは、2つの強力に中和するヒトmAb、クレード特異的mAb EV68-159と、高度に交差反応性のmAb EV68-228とを選択して、クライオ電子顕微鏡法（クライオEM）試験のために、抗原結合断片（Fab）およびB1クレードEV-D68単離株との免疫複合体を作製した。最終的な密度マップは、2.9 Å（EV68-159）または3.1 Å（EV68-228）の分解能を達成した（図34A、図43、図44および表G）。構造から、2つの異なる結合部位が明らかにされた。EV68-159は、3回対称軸の周りに結合し、EV68-228は、アニオン領域を形成する凹部間の5回軸の周りに結合した（図34A～C、図45）。したがって、各Fabについて、合計60コピーがウイルス粒子に結合した。ウイルス表面と相互作用したFab可変ドメインは、ウイルスキャプシドタンパク質と同様の強い密度を示し、各Fabの原子モデルを4つのウイルスキャプシドタンパク質とともに構築した。対照的に、ウイルス表面から遠くに位置するFab定常ドメインは、比較的弱い密度を示し、原子モデル構築から除外した。ポリペプチド鎖の骨格、およびアミノ酸側鎖の大部分は、密度マップでは十分に秩序化されており、ウイルス粒子とFab分子との間の結合界面の重要な特徴を示している。

【0342】

両モデルについて、Fabに面し、Fabから4 Åの距離内にあるウイルス表面残基をフットプリントとして同定した（図34C、図46および表H）。フットプリントは、両Fab分子が1つのプロトマー内に存在することを示す。EV-D68:Fab EV68-159複合体では、各Fabが約990 Å²のウイルス表面積をマスクしていた。結合界面（図35）では、EV68-159軽鎖と、VP1のC末端上の3つの残基、すなわち、Glu271およびArg 272（図36A）ならびに Asp285（図36B）との間に必須の相互作用が見出された。残基Glu271およびArg272は、CDR3およびCDR1と水素結合を形成した。Arg272およびAsp285は、それぞれCDR3残基およびCDR2残基と塩橋を形成した。EV68-159の重鎖は、マスクされた表面積の77%に寄与した。B-β鎖（βB）の前の重鎖相補性決定領域2（CDR2）およびCDR3とVP3 N末端ループとの間に一連の水素結合が見出された（図36C）。

【0343】

EV-D68:Fab EV68-228複合体では、各Fabはウイルスキャプシド表面の約1,170 Å²をマスクしていた。EV68-159と同様に、EV68-228 Fabの重鎖は、表面積の約84%をマスクすることによってウイルスキャプシドとの相互作用を支配していた。結合界面（図35）は、主に、重鎖CDRとVP 1βBおよびVP3 C末端との間に形成される水素結合によって安定化された（図36D）。軽鎖CDR1はVP2 EFループと相互作用した。加えて、重鎖フレームワーク領域（FR）3とVP1 DEループとの間に水素結合が形成された。さらに、軽鎖CDR3とVP1 C末端との間に塩橋が形成された。全体として、EV68-228 Fabは、5回軸の周りでウイルス表面に結合し、古典的ピコルナウイルス（picornavirus）中和免疫原性部位（Nim）Nim-IB（VP1 DEループ）およびNim-II（VP2 EFループ）を認識した（Rossmann et al., 1985）。

【0344】

嵩高い側鎖が両Fabの界面に見出され、疎水性相互作用ネットワークを介して構造を安定化するように作用する（図47）。さらに、重鎖および軽鎖のCDR1およびCDR3の周囲にもジスルフィド結合が検出された。別のシステインの対、Cys101およびCys106が、EV68-228重鎖のCDR3内に見出され、正確な距離および配向でジスルフィド結合を形成していた（図36D）。具体的には、等高レベルが低下すると、2つのシステイン側鎖の密度が接続した。EV-D68:Fab EV68-228複合体について上述したように、水素結合およびジスルフィド結合の両方を形成する、重鎖CDR3とCys101を含むアニオンに隣接するVP3 C末端残基との間に水素結合が観察された。これらのシステイン残基は、Fab構造およびウイルス-Fab結合界面の両方の安定化に重要な役割を果たす。

【0345】

本発明者らは、次に、強力に中和し、高度に交差反応性のヒトmAb EV68-228が、EV-D68感染の小動物モデルでは感染および疾患を予防または治療することができるかどうかを決定しようと努めた。本発明者らは、インターフェロンα/βおよびγの受容体が欠損し

たAG129系マウスに呼吸器疾患またはAFM様神経疾患のいずれかを引き起こす2つの異なる確立された感染モデルを使用して、インビボでこの抗ウイルス活性を試験した（Evans et al., 2019; Hurst et al., 2019）。最初に、本発明者らは、抗体が感染の呼吸器モデルではウイルス血症および肺ウイルス複製を減少させることができるかどうかを試験した。ウイルス接種の前日に予防として全身投与されたMAb EV68-228は、試験した各濃度で血液（図37A）および肺（図37B）に殺菌免疫をもたらしたが、ヒトIVIGは血液のみを殺菌した。EV68-228処置マウスの肺では、炎症誘発性サイトカイン分泌の誘導が阻害された（図38A～C）。ウイルス接種後に漸増時間で行われる処置として使用した場合、この場合も、処置はいずれも血液を殺菌する点で極めて効果的であったが（図37C）、肺ではEV68-228のみが効果を有した（図37D）。本発明者らは、EV68-228処置マウスの肺内の炎症誘発性サイトカインレベルの低下を同様に観察した（図38D～F）。

【0346】

次に、本発明者らは、AFM疾患を模倣する、感染の神経学的モデルにおける抗体の受動的移入の効果を評価した。EV68-228予防法は、血液の殺菌免疫（図39A）と、死亡（図39B）またはいずれかの神経疾患の発症（図39C）からの完全な保護とを提供したが、IVI G免疫は部分的に保護したのみであった。治療的に考えると、EV68-228処置は、所与の各時点で投与の24時間以内に血液を殺菌した（図39D）。EV68-228は、感染48時間後に投与しても生存率および神経疾患を改善し（図39E）、感染72時間後に投与すると、生存していたマウスは臨床的に改善した（図39Fおよび表I）。

【0347】

（表E）末梢血単核球を提供した対象の特性

対象	献血時の年齢 ¹	性別 ²	民族性 ³	人種 ⁴	ウイルス単離株のGenBankアクセッション番号	ウイルスクレード	発病日	献血日	症状 ⁵	重症度 ⁶
1	18	F	Unk.	W	KX255352 KX255415	B1 B1	8/11/14	12/27/17	R, H	Mod.
2	17	F	NHL	B & W	KX255378	B1	9/5/14	8/7/17	NR	NR
3	17	M	NHL	W	KX255367	B1	9/11/14	8/1/17	NR	軽度
4	17	M	NHL	W	KX255385 KX433163	B1	9/11/14	7/19/17	C, R, H, SP	軽度
5	16	M	NHL	W	KX255382	B1	8/3/14	7/12/17	NR	NR
6	17	F	NHL	W	KX255364 KX255373	B1 B1	8/13/14	7/5/17	C, R	Mod.
7	17	M	NHL	W	KX433162	A1	8/7/12	6/21/17	C, R, H, W	重度
8	17	M	NHL	W	KX255407	B1	9/23/14	6/19/17	C, R, H, W	軽度
9	17	M	NHL	W	KX255379	B1	9/26/14	6/8/17	C, R	軽度
10	18	F	NHL	W	KX255411	B1	9/4/14	6/6/17	C	軽度
11	18	F	NHL	W	KX255390 KX255362 KX255403	B1 B1 B1	7/18/14	5/30/17	C, H, R, W	Mod.
12	18	M	NHL	W	KX255389	B1	9/26/14	1/22/18	C, R, W	Mod.

¹年齢; ²F:女性、M:男性; ³Unk.:不明、NHL:ヒスパニック系でもラテンアメリカ系でもない; ⁴B:黒人、W:白人; ⁵C:咳、H:嘔声、R:鼻炎、SP:副鼻腔痛、W:喘鳴、NR:記録なし; ⁶Mod.:中等度、NR:記録なし。

【0348】

（表F）ヒトmAbの配列特性

10

20

30

40

50

クローン	重鎖				軽鎖		
	V遺伝子	J遺伝子	D遺伝子	CDR3	V遺伝子	J遺伝子	CDR3
EV68-37	V3-30*04	J4*02	D6-13*01	ARPTLPYXNNWYAPEY	LV3-10*01	LJ2*01	SSTDSSGNFVL
EV68-40	V3-23*04	J4*02	D6-6*01	AKVVRIAAVLVYFDY	KV3-11*01	KJ5*01	QQRSSWPIT
EV68-41	V3-23*04	J3*02	D1-1*01	ARVKSTIGTIALVFDI	LV8-61*01	LJ3*02	GLYMGSGIWI
EV68-43	V3-30*03	J6*02	D4-17*01	AKDKHGFDFYVGV DV	KV1-12*01	KJ1*01	QQADSFPRT
EV68-46	V3-30*03	J4*02	D1-26*01	ARRRPGSFPGLCDY	KV1-5*03	KJ2*01	QQHNSYSYT
EV68-48	V1-69*06	J3*01	D5-12*01	ARMVSGHDGV DV	KV3-11*01	KJ1*01	QQRSTWPPGM
EV68-71	V4-39*01	J3*02	D4-17*01	ARHLTHLYG DYVTPDALDI	KV3-20*01	KJ1*01	QQVSNRLI
EV68-72	V3-48*02	J5*02	D3-3*01	ARAHGRIVNSGVVINKFDP	LV2-14*01	LJ2*01	SSYTTSNILVV
EV68-74	V1-2*03	J4*02	D2-2*01	ARMGCRSDRCYSTNYNFDQ	LV3-21*02	LJ2*01	QVWDSGDV V
EV68-75	V3-21*01	J4*02	D6-6*01	ARERGHSTSSSYFDS	LV3-21*01	LJ3*02	RVWDSDTDHRV
EV68-76	V3-15*01	J4*02	D3-22*01	STGPFYYDTSGYPQPF DY	LV3-1*01	LJ2*01	QAWDSSITV V
EV68-79	V3-21*01	J6*02	D3-9*01	ARDRPIMEGEGLD ELTGYYVYQYYAMDV	ND		
EV68-84	V1-2*02	J4*02	D5-24*01	ARAGRNGYDY	LV3-25*03	LJ2*01	QSGDSSGTYLV
EV68-85	V3-23*01	J4*02	D4-11*01	TVPWGNVNDYVSDY	KV3-11*01	KJ3*01	HQHSIWPRGT
EV68-88	V3-30-3*01	J4*02	D6-13*01	ARHFLPYSSSWYQGFVY	LV6-57*01	LJ2*01	QSYDNSNRVV
EV68-89	V3-33*01	J4*02	D4-17*01	ARGVPYGDITLGLVY	LV6-57*01	LJ3*02	QSYDNSDRV
EV68-95	V2-26*01	J4*01	D2-15*01	ARLLVAGTFLPSHYFDY	LV3-21*01	LJ2*01	QVWDSSENHPV
EV68-97	V3-48*01	J4*02	D2-15*01	IRQVGADFSGRGF DY	LV3-1*01	LJ3*02	QAWDSSITAV
EV68-98	V3-48*01	J3*02	D1-14*01	ATARHITNDGFDI	KV1-9*01	KJ3*01	QQLNSHPRMET
EV68-105	V4-38-2*01	J4*02	D2-21*02	ARGPGHCYGGDDCYAVYFDQ	KV1-12*01	KJ3*01	QQANSFPFT
EV68-110	V1-69*06	J4*02	D2-8*01	ARSLPYCTNDVCSNQNTFDY	LV3-25*03	LJ2*01	QSADSSGTYVV
EV68-114	V3-23*01	J4*02	D4-17*01	VRRFPMITVT8FDS	LV2-11*01	LJ2*01	GAYAGFNAL
EV68-116	V3-7*03	J4*02	D2-2*01	VREGVRRVVVRSTGYFDF	LV3-16*01	LJ3*02	YSTDSSGYQRA
EV68-150	V4-31*03	J5*02	D2-21*02	ARHVVIASGW FDF	KV3-11*01	KJ2*01	QQRSRWPPFYI
EV68-152	V3-30-3*01	J6*02	D3-22*01	ARVTADYIYESSGKVF	KV1-5*03	KJ1*01	QQYQTF8WT

10

20

30

40

50

EV68-153	ND					LV1-47*01	LJ2*01	AAWDDRLSGVV
EV68-156	V4-59*01	J1*01	D2-8*02	ARGSMPHI		LV1-47*01	LJ1*01	AAWDDSLKAPV
EV68-158	V3-23*01	J3*02	D3-22*01	AKDSHSMIVVDHAFDI		LV3-21*02	LJ1*01	QVWDSYNVHV
EV68-159	V3-21*01	J4*02	D1-14*01	AREEGFRAYNLY		LV1-47*01	LJ2*01	AAWDDILSGVV
EV68-160	V3-30*04	J4*02	D2-8*01	ARDWDLVRSVGV		LV2-11*01	LJ3*02	CSYAGTYTVV
EV68-161	V4-61*01	J6*02	D3-3*01	ERLRILSIERNYYAMDV		KV3-20*01	KJ1*01	QQYGSFWI
EV68-162	V3-30-3*01	J6*02	D2-15*01	ARDHVPPKDCSDGVCHSDYQMDV		KV1-5*03	KJ2*01	QQHNSYSYT
EV68-164	V3-48*02	J6*02	D3-10*01	ARVYTMIRGASMDV		KV3-11*01	KJ3*01	QLRITWPPFT
EV68-165	V1-2*02	J4*02	D2-12*01	ARVKCSSANCYGNFDY		LV2-8*01	LJ1*01	SSYAGSNLV
EV68-166	V3-51*01	J5*01	D3-12*01	ARQITQNSGYDRWFDS		LV1-44*01	LJ3*02	AAWDDSLNGWV
EV68-178	ND					KV1-5*03	KJ1*01	QQYNSYPLT
EV68-181	V3-23*01	J4*02	D3-3*01	AISVPLLRFLFWPQHFFDF		KV3-15*01	KJ1*01	HQYENWPPWT
EV68-183	V3-21*01	J4*02	D4-11*01	VRFTMTTIVTNFDS		LV3-11*01	LJ3*02	CSHAGSHTWV
EV68-185	V3-30*03	J3*02	D3-12*01	PKVIPHPIYDSSGDDAFDI		KV3-15*01	KJ5*01	QQYSLKLPIT
EV68-208	V1-69*01	J4*03	D3-10*01	ARFISTASVVPCTFEDV		KV3-11*01	KJ2*02	QQRSDWPPGT
EV68-210	V3-21*01	J4*02	D4-17*01	ARMVPMNTVIAFDY		LV2-23*02	LJ1*02	CSYGGNSWM
EV68-219	V1-24*01	J4*02	D2-21*01	ATWGVVWNGRRDYDS		LV3-25*03	LJ2*01	QSADNTRITV
EV68-220	V3-48*03	J3*01	D3-22*01	ARDVRDCSALTCPRRGDAFDF		KV2-30*01	KJ3*01	MQGTHWPT
EV68-221	V3-21*01	J4*02	D2-15*01	VKVGGSKHQYTFDY		LV1-44*01	LJ2*01	AAWDDSLNGVV
EV68-224	V1-18*01	J4*02	D3-2*02	ARERCSTSTCYSRVADY		KV1-39*01	KJ1*01	QQSYRSPRT
EV68-225	V3-42*03	J3*02	D3-9*01	MREGLTYDSTI		LV4-69*01	LJ3*02	QTWGTGFRV
EV68-227	V3-9*01	J3*02	D3-16*01	AKDDYEGAGFDI		KV3-11*01	KJ5*01	QQRSNWPI
EV68-238	V4-38-2*02	J4*02	D2-15*01	VRHEGSCNDGSCYGSFVDN		KV1-12*01	KJ4*01	QQADSFI
EV68-239	ND					KV3-11*01	KJ4*01	QQRSNWPLI
EV68-231	V3-23*01	J2*01	D1-21*02	ARGGITHNWFYDL		KV3-15*01	KJ1*01	QQYKNWPR
EV68-234	V3-23*01	J6*03	D5-12*01	AKGHTYSYYTMAV		KV3-20*01	KJ4*01	QQYGTST
EV68-235	V1-24*01	J4*02	D2-21*01	ATWGVVWNGRDEFFDS		LV3-25*03	LJ2*01	QSADTRITV
EV68-236	V1-24*01	J4*02	D2-21*01	ATWGVAVVSGRRDYDS		LV3-25*03	LJ2*01	QTADTKYTV
EV68-241	V4-30-4*01	J5*02	D3-3*01	ARAYAYEFWVGYPNWFDP		KV1-39*01	KJ1*01	QQSYSPWRT
EV68-242	ND					KV1-5*03	KJ1*01	QQYNSLPWT
EV68-247	V3-30*01	J4*02	D2-2*01	ARGLGYCSGTGGSCTPFEY		KV1-39*01	KJ4*01	QQSDSAPPT
EV68-254	V4-34*02	J5*02	D2-2*01	VRVPRRGFESEFGCDTACRYGHTWFDP		KV1-39*01	KJ1*01	QQSYLTPT
EV68-266	V3-11*01	J2*01	D2-8*02	AGSKVGYTTGERNWFYDL		LV2-8*01	LJ2*01	SSYAGNNLV
EV68-269	V1-46*01	J3*02	D2-2*02	ARDLVVVVPEMSRRAFDI		LV3-21*02	LJ2*01	QVWDSITDHGV
EV68-271	V1-2*06	J4*02	D3-16*02	ARDYRDDYMWGSYPLDY		KV3-11*01	KJ4*01	QQRSNGLI

10

20

30

International ImMunoGeneTics (IMGT) Information System、ワールドワイドウェブ、imgt.orgによって同定される配列特性。IMGTが複数の遺伝子を除外できなかった場合、最初のコールを列挙する。ND:決定されず。

【0349】

(表G) クライオEMデータ取得パラメータおよび精密化統計

40

50

	EV-D68:Fab EV68-159	EV-D68:Fab EV68-228
クライオEMデータ取得および処理		
倍率	81,000X	64,000X
カメラ	K2 Summit直接 電子検出器 (Gatan)	K3 Direct Detection Camera (Gatan)
電圧(kV)	300	300
画素サイズ(Å)	0.874	0.662
焦点ずれ範囲(μm)	0.7-3.5	0.7-2.0
総電子線量 (電子/Å ²)	31.4	44.2
選択した粒子	42,078	27,390
使用した粒子	30,554	20,194
マップ分解能 (FSC閾値=0.143)	2.9	3.1
モデル構築および精密化		
モデル構築基準 (PDBコード)	4WM8	4WM8
MolProbityスコア	1.93	1.96
クラッシュスコア	9.05	8.7
回転異性体外れ値(%)	0.46	0.00
R. m. s. 偏差		
結合長(Å)	0.005	0.005
結合角 (°)	0.691	0.689
Ramachandranプロット(%)		
好ましい	93.08	91.70
許容される	6.92	8.20
外れ値	0.00	0.10

【 0 3 5 0 】

(表 H) EV-D68およびそれぞれのFabの構造的接触アミノ酸残基

10

20

30

40

50

ウイルスアミノ酸	Fabアミノ酸	存在し得る相互作用
EV68-159		
VP1: GLU271	L: ILE95	水素結合
VP1: ARG272	L: SER26	水素結合
	L: SER27	水素結合
	L: ASP94	塩橋
	L: LYS51	塩橋
VP3: GLU59	H: ARG102	水素結合
VP3: SER60	H: GLY100	水素結合
VP3: MET64	H: TYR56	水素結合
VP3: GLU65	H: SER51	水素結合
	H: THR52	水素結合
	H: SER53	水素結合
EV68-228		
VP1: LYS71	H: SER30	水素結合
VP1: ARG72	H: TYR27	水素結合
VP1: SER73	H: ASN31	水素結合
VP1: GLY129	H: SER73	水素結合
VP1: LYS268	L: ASP92	塩橋
VP2: ASN136	L: SER30	水素結合
VP3: GLY 234	H: ASN102	水素結合
VP3: LEU236	H: ASN102	水素結合
VP3: ASP237	H: TYR34	水素結合
	H: SER100	水素結合
	H: CYS101	水素結合
	H: ASN102	水素結合
VP3: HIS238	H: TYR53	水素結合
	H: TYR54	水素結合
VP3: GLU243	H: TYR33	水素結合

重鎖および軽鎖は、それぞれHおよびLとして表示されている。特に、高分解能の電子密度マップで明確に観察される直接的な相互作用のみが列挙されている。これは、最大水素結合距離での全体のフットプリントを表示するために4 Åのカットオフを使用するロードマップ（図34Cおよび図46）で強調されている接触残基とは異なる。

【0351】

（表I）EV-68接種後に抗体を用いて処置した個々のマウスの神経学的スコア

日	プラセボ - 24 時間後						EV68-228 - 24 時間後					
2	1	2	1	1	2	0	0	1	1	0	0	0
3	2	2	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1
4	3	3	4	2	4	2	1	1	1	1	1	1
5	4	4		3		3	1	1	1	1	1	1
6				4		4	1	1	1	1	1	1
7							1	1	0	1	1	1
8							1	1	0	1	1	1
9							1	1	1	1	1	1
10							1	1	1	1	1	1

日	EV68-228 - 48 時間後						EV68-228 - 72 時間後					
2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	4	4	0	3	3	4	4
5	2	2	2	2	4			0	3	3		
6	2	2	2	2				0	4	4		
7	1	2	1	1				0				
8	1	2	1	1				0				
9	1	2	1	1				0				
10	1	1	1	1				0				

日	EV68-228 - 120 時間後											
2	1	0	1	0	1	1	1	0	0			
3	1	1	1	2	1	1	1	2	1			
4	1	1	2	3	2	2	2	2	3			
5	2	2	3	3	3	4	3	4	4			
6	3	4	4	3	4		4					
7	4			4								
8												
9												
10												

日	IVIG - 24 時間後											
2	0	1	0	0	1	0						
3	1	1	1	1	1	1						
4	1	1	1	1	1	1						
5	1	1	1	1	1	1						
6	2	2	1	1	2	2						
7	1	2	2	1	1	1						
8	1	2	2	1	2	1						
9	0	2	2	0	1	0						
10	0	1	1	0	0	1						

各列は、図39Fのグラフに対応する示された処置群内の個々のマウスから得られたデータである。「日」は、スコアを決定した、EV-D68接種後の日数を表す。4のスコアではマウスを殺処分したか、マウスはすでに死亡していたため、4が記録された後の数日間の追加のスコアは列挙していない。強調されたセルは、臨床的に改善しているマウスの例を示している。

【0 3 5 2】

(表 J) 中和エスケープアミノ酸変異体

10

20

30

40

50

アミノ酸			平均読み取り率(%) ¹			接触残基 ²	
位置	WT ³	変異体	RSV-90	EV68-159	EV68-228	EV68-159	EV68-228
VP2 135	HIS	TYR	0	13	0		隣接
VP2 139	ALA	THR	20	2	3		隣接
VP3 42	SER	ASN	7	15	3		
VP1 71	LYS	MET	12	11	33		接触
VP1 126	ALA	VAL	1	3	0		
VP1 157	LYS	GLU	6	17	4		
VP1 270	ARG	LYS	1	0	1	隣接	

10

¹ RD細胞培養におけるEV-D68の3回の継代のための選択として、列挙されているmAbの各々を使用し、RSV-90は、インビボ実験のためのプラセボ処置として使用されたものと同じ陰性対照mAbであった。各処置について、3回の技術的反復において次世代配列決定を使用して構造遺伝子を配列決定し、1反復当たり2000個の配列を分析した。列挙された数字は、これらの反復の平均である。² Fabアミノ酸の4 Å以内に位置するウイルスアミノ酸である、この原稿からのクライオEM構造によって決定される接触残基。隣接とは、接触残基に直接隣接するアミノ酸を指す。³ WT:野生型。RSV-90選択ウイルス配列のコンセンサス配列を表す。

【0353】

20

(表K) 使用したEV-68単離株

株の名称	略語	クレード	供給元	供給元ID	GenBank アクセッション	Pubmed ID
US/MO/14-18947	MO/47	B1	BEI	NR-49129	KM851225	25414503
US/MO/14-18949	MO/49	B1	BEI	NR-49130	KM851227	25414503
US/IL/14-18956	IL/56	B1	BEI	NR-49133	MK268345	25414503
US/IL/14-18952	IL/52	B2	BEI	NR-49131	KM851230	25414503
US/KY/14-18953	KY/53	D	BEI	NR-49132	KM851231	25414503
Fernon	Fer.	1962 参照株	ATCC	VR-1826	AY426531	15302951
マウス適合 US/MO/14-18949		B1	HurstおよびTarbet, USU	NA	MH708882	30521834

30

ATCC:American Type Culture Collection;BEI:Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository,NIAID,NIH;USU:ユタ州立大学;NA:該当なし。

【0354】

40

実施例11-考察

これらの試験では、EV-D68感染に対するヒトB細胞応答の多様な特徴が明らかにされる。本発明者らは、生ウイルス単離株をスクリーニング抗原として使用して、これらのmAbを単離する手法に偏りがないように努めた。結合および中和の両方を伴う、EV-D68のクレード間の広範囲の交差反応性を観察したため、本発明者らが回収した抗体表現型の多様性は、この戦略の結果であり得る。興味深いことに、生ウイルス粒子への強い結合から、必ずしも高い中和効力は予測されなかった。観察された競合結合群のうち、第2群および第3群のみが表現型の均一性を示した。両群のMabは交差反応性であったが、第2群のmabはウイルスを中和したのに対して、第3群のmabは中和しなかった。第2群および第3群のほぼ全部のmAbが、ウエスタンブロットではVP1に結合し(図40および図41)、これ

50

らが線状エピトープに結合することが示唆された。特に、競合結合試験では完全長IgG分子を使用したため、見られる競合はヒト組織内で起こるように機能的であり、ウイルス表面に4つの構造的に異なるエピトープのみが存在することを必ずしも示すものではない。

【0355】

EV68-159およびEV68-228のウエスタンブロット反応性の欠如は、両エピトープが3つの主要なウイルス表面タンパク質いずれにも及ぶことを示す構造試験における知見と相關する。線状エピトープを認識する、AFM患者の脳脊髄液中の抗体についてスキャンされるペプチドマイクロアレイ (Mishra et al., 2019) 技術およびファージライブラリー (Schubert et al., 2019) 技術を使用する近年の診断の進歩のために、これらの2つの強力に中和するmAbのエピトープの立体配座依存的性質は注目に値する。線状エピトープを認識する抗体の検出は、現在、貴重な診断ツールで使うことができるが、これらの試験は、これらの検査が、エンテロウイルス感染に回答してこれらの患者に起こる抗体応答の質に関してせいぜい部分的にしか情報価値がないことを明らかにしている。この構造はまた、抗体媒介中和の分子基盤を示唆する。プロトマー内の3つ全部の構造タンパク質を接触させることによって、両mAbは感染に必要な動的構造転移を阻害することができるように思われるが、これはあまり理解されていない。

【0356】

EV68-228重鎖のCDR3内のジスルフィド結合は構造部分であり、本発明者らは、抗ウイルスヒトmAbを広域中和する点で、C型肝炎 (Flyak et al., 2018) およびインフルエンザAウイルス (Bangaru et al., 2019) の両方を含むいくつかのウイルスを現在観察している。システイン間に介在する4~5個のアミノ酸は、完全なCDR3ループの最も遠位の先端で比較的小さな構造化ループを形成し、ウイルス抗原に結合するのに最適な予め構成された状態でCDR3を安定化する。Cys101はまた、EV68-228では、具体的には、水素結合を介してVP3と直接相互作用するため、このシステインは、CDR3ループ安定化、および標的との相互作用の両方に関与する。

【0357】

EV68-159軽鎖と相互作用する3つのVP1残基 (Glu271、Arg272およびAsp285)、およびEV68-159重鎖と相互作用する、VP3のN末端ループ上のGlu59は、シアル酸受容体結合部位 (Liu et al., 2015) に隣接しており、EV68-159 Fabが、ウイルスがシアル酸受容体に結合するのを阻止し得ることを示唆している。特に、これらの3つのVP1残基は、AFM患者の脳脊髄液中に見出される抗体によって結合される22アミノ酸のVP1 C末端ペプチド上に位置する (Mishra et al., 2019; Schubert et al., 2019)。さらに、4つのVPのN末端はキャプシド安定性に寄与するため、EV68-159 Fab重鎖とVP3 N末端ループとの相互作用は、ウイルスの脱被覆を防止し得る (Filman et al., 1989)。EV68-228は、VP1 βBに結合し、侵入に必要な、VP1のN末端の外在化を阻害することによって、ウイルスが脱被覆するのを防止し得る。さらに、抗体フットプリントは、古典的なN1mの一部ではない、VP3のC末端上の残基を含む。これらの残基は、キャニオン受容体結合部位に隣接しており、mAb EV68-228がまた、受容体へのウイルス結合を阻止し得ることを示唆している。

【0358】

最後に、ポリオウイルス2型および3型が根絶された時点で、AFMは増加しており、この麻痺性疾患の流行を引き起こすことに果たすEV-D68の役割はますます明らかになっている。ヒトmAb EV68-228による予防がインビボでいかに良好に機能するかを考慮すると、これらのデータは、効果的なEV-D68ワクチンがAFM疾患を予防し得ることを示唆している。実際、近年の試験は、ウイルス様粒子 (Zhang et al., 2018a; Dai et al., 2018) および不活化EV-D68 (Patel et al., 2016) ワクチン候補が免疫原性であり、マウスでは感染に対して保護的であることを示している。しかし、不活化EV-D68をワクチン接種したコットンラットの試験では、その後のEV-D68感染時に、コットンラットの呼吸器疾患が悪化した可能性があることが示唆された (Messacar et al., 2016)。この知見は、EV-D68感染の抗体依存性増強 (ADE) の可能性を示唆し得るが、本発明者らは、マウスでは

、試験した抗体濃度の範囲内で、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって引き起こされるADEを観察しなかった。また、EV-D68感染の早期に治療法としてmAb EV68-228を使用するという見込みは魅力的であり、これは、特にこの抗体が、ヒト細胞材料への明らかな自己反応性結合を伴わず多様な一連のウイルス単離株を強力に中和するためである（図33C）。IVIGは、以前のインビボ試験では、EV-D68に起因するAFM様疾患からマウスを保護したが（Hixon et al.,2017a）、これまでのところ、IVIGがAFMを有するヒトに対して利益をもたらすことは示されていない（Messacar et al.,2016）。ただし、IVIGは、EV-D68を認識するほんのわずかな画分を有するポリクローナル抗体の複合体混合物である。EV-D68関連AFMのMAb予防またはMAb治療は、高い特異性、高い効力、および使用することができる比較的低い抗体用量のためにIVIGよりも有望である。ただし、複数のエピトープを対象とするmAbのカクテルは、mAb単独療法よりも保護的であり得ることが可能である。mAbカクテルは、理論的には、mAb耐性ウイルスの出現に対してさらに高い障壁を提供するであろうが、本発明者らはインビボで耐性を観察しなかった（図37A～Dおよび図39A～F）。インビトロでEV68-228耐性ウイルスを選択するために最適化された条件下であっても、本発明者らは、有意性が不明な変異を有するウイルスゲノムを同定することしかできなかった（表J）。これらの変異を有する組換えウイルスを作製するための逆遺伝学系が存在しない場合、これらの変異が中和からのエスケープを引き起こすかどうかを具体的に検証することができなかった。したがって、本発明者らは、潜在的な治療的使用中に耐性が出現する可能性は低いことを見出している。これらの実験はまた、AFMとの関連が認識される前に、2014年のEV-D68のアウトブレイクに対して公衆衛生当局の注意を喚起した臨床症候群である、EV-D68に起因する重度の呼吸器疾患を有する患者に対する治療効果についても希望を与える（Midgley et al.,2014）。全体として、本明細書において提示される試験は、ヒトの天然EV-D68感染が、気道および神経系の両方における感染および疾患を予防または治療することができる広域かつ強力に中和する抗体をコードするB細胞を誘導することを示す。

【0359】

実施例12

この試験の目的は、4週齢のAG129マウスにおけるエンテロウイルスD68（EV-D68）呼吸器感染に対するタバコ産生EV68-228による処置の効果を決定することであった。

【0360】

材料および方法

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research（USTAR）ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の4週齢の雄および雌のAG129マウス。マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet（Harlan Teklad）およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0361】

抗体および化合物。タバコ植物（EV68-228-TP）およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（EV68-228-CHO）内で産生されたモノクローナル抗体（mAb）EV68-228は、本発明者らによって提供された。タバコ産生抗体およびCHO抗体の両方を溶液として提供し、10mg/kgの濃度で投与した。タバコ産生抗HIV（抗HIV-TP）抗体を10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン（HIVIg、Carimune、CSL Behring、King of Prussia,PA）を地元の薬局から購入し、陽性対照として使用した。

【0362】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection（Manassas, VA）から入手した横紋筋肉腫（RD）細胞内で3回プラーク精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスをEV-D68 MP30 PPと命名した。

【0363】

実験デザイン。表1に示すように、マウス合計118匹を、マウス12匹の4つの群、マウス8匹の8つの群、および正常対照に使用したマウス6匹の追加の群に無作為化により割り付けた。感染24時間前、または感染24時間後もしくは48時間後に、EV68-228 mAb、HIVIgまたはプラセボmAbの腹腔内（IP）投与によってマウスを処置した。90 μ l容量のMEM中の $1 \times 10^{4.5}$ CCID₅₀のEV-D68 MP30 PPの鼻腔内（IN）点滴注入によってマウスを感染させた。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および肺サイトカイン濃度の評価のために、感染後1日目、3日目および5日目に、各処置群からマウス4匹を安楽死させた。感染24時間後および48時間後に処置したマウスについては、感染後3日目および5日目にのみ試料を収集した。

【0364】

肺サイトカイン/ケモカインの評価。製造業者の説明書（Quansys Biosciences Q-Plex（商標）Array、Logan, UT）に従って化学発光ELISAに基づくアッセイを使用して、サイトカインおよびケモカインについて肺ホモジネートの各試料を試験した。QuansysマルチプレックスELISAは、16個の異なる捕捉抗体が規定されたアレイで96ウェルプレートの各ウェルに適用される定量的試験である。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17、MCP-1、IFN- γ 、TNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESについて各試料上清を試験した。略語の定義は以下の通りである：IL - インターロイキン；MCP - 単球走化性タンパク質；IFN - インターフェロン；TNF - 腫瘍壊死因子、MIP - マクロファージ炎症性タンパク質；GM-CSF - 顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子；ならびにRANTES - 活性化時に制御され、正常なT細胞によって発現および分泌される。

【0365】

統計分析。Prism 8.4.2.（GraphPad Software Inc.）を使用して、あらゆる数値および統計分析を完了した。感染後の各日について、一元配置分散分析（ANOVA）を使用して、処置群から得られた肺ウイルス力価および血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。各サイトカイン/ケモカインについて、二元配置ANOVAを使用して、処置マウスから得られた濃度とプラセボ処置マウスとを比較した。

【0366】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、2019年3月2日付け（2022年3月1日満了）ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府（国立衛生研究所）の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（改訂；2011）に従って、2018年3月9日に更新された（PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]）。

【0367】

（表L）実験NIA-1930/実験デザイン：マウスのEV-D68呼吸器感染の処置のためのEV68-228-TPの効果

10

20

30

40

50

匹/ ケージ	群番号	感染	処置	用量	処置 スケジュール	経路	観察
12	1	有	抗HIV-TP*	10 mg/kg	感染 24時間前に 1回	IP	肺ウイルス力価 および 肺サイトカイン のために、感染後 1日目、3日目および 5日目に、マウス 4匹/群を 屠殺した。
12	2	有	EV68-228-TP				
12	3	有	EV68-228-CHO				
12	4	有	hIVlg				
8	5	有	抗HIV-TP*	10 mg/kg	感染 24時間後に 1回	IP	肺ウイルス力価 および 肺サイトカイン のために、感染後 3日目および5日目に、 マウス4匹/群を 屠殺した。
8	6	有	EV68-228-TP				
8	7	有	EV68-228-CHO				
8	8	有	hIVlg				
8	9	有	抗HIV-TP*	10 mg/kg	感染 48時間後に 1回	IP	正常サイトカイン 対照のために、1日目、 3日目および5日目に、 マウス2匹/群を 屠殺した。
8	10	有	EV68-228-TP				
8	11	有	EV68-228-CHO				
8	12	有	hIVlg				
6	13	無	正常対照	-	-	-	

【0368】

結果および考察

この試験では、4週齢のAG129マウスにおけるEV-D68呼吸器感染の処置に対するタバコ産生EV68-228 mAbの効果が決定された。

【0369】

図48A～Cは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量のhIVlgによる処置は、感染後5日目に肺ウイルス力価のみを有意に低下させた。

【0370】

図49A～Cは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後1日目、3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量によるhIVlgによる処置も、感染後1日目、3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。

【0371】

図50は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2およびIL-3の肺濃度を示す。EV68-228-TPを用いて処置したマウスおよびEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後1日目および3日目に、IL-1 α の肺濃度の有意な低下が観察された。タバコ産生物処置およびCHO産生物処置はいずれも、感染後3日目にIL-1 β の濃度を低下させた。hIVlgによる処置は、IL-1 α またはIL-1 β の肺サイトカイン濃度に有意な影響を及ぼさなかった。EV-D68による感染後、IL-2またはIL-3の肺濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0372】

EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度を図51に示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-5の濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にIL-6の濃度を低下させた。hIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5およびIL-6の肺濃度を有意に低下させた。EV-D68による感染後、IL-4またはIL-10の肺濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0373】

図52は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN γ の肺濃度を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。hIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。EV-D68による感染後、IL-12p70、IL-17またはIFN γ の濃度の有意な変化は観察されなかった。

10

【0374】

図53は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後1日目および3日目にMIP-1 α の肺ウイルス濃度を低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。10mg/kg用量のhIVIgは、感染後1日目および3日目にMIP-1 α の肺濃度を低下させ、感染後3日目にRANTESの濃度を低下させた。EV-D68による感染後、TNF α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。

20

【0375】

図54A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後3日目または5日目に肺ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量のhIVIgによる処置は、感染後3日目に肺ウイルス力価のみを有意に低下させた。

【0376】

図55A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのhIVIgによる処置も、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。

30

【0377】

図56は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2およびIL-3の肺濃度を示す。EV68-228-TPを用いて処置したマウスおよびEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後3日目にIL-1 α およびIL-1 β の肺濃度の有意な低下が観察された。hIVIgによる処置は、IL-1 α またはIL-1 β の肺サイトカイン濃度に有意な影響を及ぼさなかった。EV68-228-TPを用いて処置したマウスおよびhIVIgを用いて処置したマウスでは、IL-3の濃度は感染後3日目に有意に低下した。EV-D68による感染後、IL-2の肺濃度の有意な変化は観察されなかった。

40

【0378】

EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度を図57に示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-5の濃度を有意に低下させ、感染後3日目および5日目にIL-6の濃度を低下させた。hIVIgによる処置は、感染後3日目にIL-5の肺濃度を有意に低下させた。EV-D68による感染後、肺組織内のIL-4またはIL-10の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0379】

50

図58は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN γ の肺濃度を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。hIVIgによる処置は、感染後3日目および5日目にMCP-1の肺濃度を有意に低下させた。EV-D68による感染後、IL-12p70、IL-17またはIFN γ の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0380】

図59は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度を示す。10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にMIP-1 α の肺ウイルス濃度を低下させ、感染後3日目および5日目にRANTESの濃度を低下させた。10mg/kg用量のhIVIgは、感染後のMIP-1 α またはRANTESの肺濃度を有意に低下させなかった。EV-D68による感染後、TNF α またはGM-CSFの濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0381】

図60A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの肺ウイルス力価を示す。10mg/kg用量のEV68-228-CHOによる処置のみが、感染48時間後に処置を行った場合に肺ウイルス力価を低下させた。10mg/kgのEV68-228-TPまたはhIVIgによる処置はいずれも、感染48時間後に処置を行った場合、肺ウイルス力価を有意に低下させなかった。

【0382】

図61A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後3日目または5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのhIVIgによる処置も、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させた。

【0383】

図62は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2およびIL-3の肺濃度を示す。IL-1 α およびIL-1 β の肺濃度の有意な低下は、EV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは感染後3日目に観察されたが、EV68-228-TPを用いて処置したマウスでは観察されなかった。hIVIgによる処置は、IL-1 α またはIL-1 β の肺サイトカイン濃度に有意な影響を及ぼさなかった。EV-D68による感染後、IL-2またはIL-3の肺濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0384】

EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10の肺濃度を図63に示す。10mg/kgのEV68-228-CHOによる処置は、感染後3日目にIL-6の濃度を有意に低下させた。EV68-228-TPまたはhIVIgによる処置は、IL-6の肺濃度を有意に低下させなかった。EV-D68による感染後、肺組織内のIL-4、IL-5またはIL-10の濃度の有意な変化は観察されなかった。

【0385】

図64は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のIL-12p70、IL-17、MCP-1およびIFN γ の肺濃度を示す。感染48時間後に処置を行った場合、EV-D68に感染させたマウスでは、IL-12p70、IL-17、MCP-1またはIFN γ の肺濃度に有意な変化は観察されなかった。

【0386】

図65は、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウス由来のTNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFおよびRANTESの肺濃度を示す。感染48時間後に処置を行った場合、EV-D68に感染させたマウスでは、TNF α 、MIP-1 α 、GM-CSFまたはRANTESの肺濃度に有意な変化は観察されなかった。

【0387】

結論

この試験では、4週齢のAG129マウスにおける、EV-D68によって引き起こされる呼吸器感染の処置について、EV-D68に対するタバコ産生EV68-228 mAbの効果が決定された。CHO産生EV68-228 Abを比較対照として使用した。

【0388】

感染24時間前または感染24時間後のいずれかに処置を行った場合、タバコ産生Abは、CHO産生Abと比較して、肺ウイルス力価、血液ウイルス力価および肺サイトカイン濃度に同様の低下をもたらした。

【0389】

感染48時間後に投与した場合、Abの効果にわずかな差が観察された。CHO産生Abは、感染後3日目および5日目に肺ウイルス力価を有意に低下させることができたが、タバコ産生Abは、感染後3日目または5日目のいずれにも肺ウイルス力価を低下させることができなかった。タバコ産生AbおよびCHO産生Abはいずれも、感染後3日目および5日目に血液ウイルス力価を低下させることができた。さらに、CHO産生Abは、IL-1 α 、IL-1 β およびIL-6の肺濃度を有意に低下させたが、タバコ産生Abは、サイトカイン濃度の同様の低下をもたらさなかった。

【0390】

肺ウイルス力価および肺サイトカイン濃度のこれらの差は、処置が感染48時間後に行われた場合にのみ観察され、この変動性は、感染後のAb処置の限界に起因する可能性がある。ただし、CHO産生抗体によるEV-D68呼吸器感染の処置後を評価する以前の試験（NIA-1869）では、1mg/kgの用量は、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、MCP-1およびRANTESの肺濃度を低下させることができた。タバコ産生抗体とCHO産生抗体との間に有意差があるかどうかを決定するための追加の試験が有益であろう。

【0391】

実施例13

この試験の目的は、10日齢のAG129マウスにおけるエンテロウイルスD68（EV-D68）神経学的感染に対するタバコ産生EV68-228抗体による処置の効果を決定することであった。チャイニーズハムスター卵巣細胞内で産生された抗体を効果のための比較対照として使用した。

【0392】

材料および方法

動物。ユタ州立大学のUtah Science Technology and Research（USTAR）ビルで飼育された、特定病原体を含まないコロニー由来の10日齢のAG129マウス。ユタ州立大学のUSTARビルで、マウスを繁殖させ、放射線照射Teklad Rodent Diet（Harlan Teklad）およびオートクレーブした水道水を用いて飼育した。

【0393】

抗体および化合物。タバコ植物（EV68-228-TP）およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（EV68-228-CHO）内で産生されたモノクローナル抗体（mAb）EV68-228は、Vanderbilt University Medical Centerにおいて本発明者らによって提供された。タバコ産生抗体およびCHO抗体の両方を溶液として提供し、10mg/kgの濃度で投与した。タバコ産生抗HIV（抗HIV-TP）抗体を10mg/kgの用量で陰性対照抗体として使用した。静脈内免疫グロブリン（IVIg、Carimune、CSL Behring、King of Prussia,PA）を地元の薬局から購入し、陽性対照として使用した。

【0394】

ウイルス。エンテロウイルスD68は、BEI Resources、NIAID、NIH:エンテロウイルスD68、US/MO/14-18949、NR-49130から入手した。ウイルスを4週齢のAG129マウスの肺内で30回連続継代し、次いで、American Type Culture Collection（Manassas, VA）から入手した横紋筋肉腫（RD）細胞内で3回ブラック精製した。得られたウイルスストックをRD細胞内で2回増幅して、作業ストックを作製した。感染に使用したウイルスを

10

20

30

40

50

EV-D68 MP30 PPと命名した。

【0395】

実験デザイン。表1に示すように、マウス合計125匹を、マウス各10匹の12の群に無作為化により割り付け、体重増加のための正常対照として追加のマウス5匹を使用した。感染24時間前、24時間後または48時間後に、EV68-228-TPもしくはEV68-228-CHO、IVIgまたはプラセボの腹腔内（IP）投与によってマウスを処置した。0.1mL容量のMEM中の $1 \times 10^{6.5}$ CCID₅₀のEV-D68 MP30 PPの腹腔内（IP）投与によってマウスを感染させた。処置前およびその後連日マウスの体重を測定した。血液ウイルス力価を評価するために、感染後1日目、3日目、5日目および7日目に、群からマウス5匹の血液を採取した。罹患率、死亡率および神経学的スコアについて、全マウスを21日目まで連日観察した。神経学的スコア（NS）を以下のように記録した：NS0 - 観察可能な麻痺なし、NS1 - 後肢を異常に広げるが、歩行は正常であるか、またはわずかに遅い、NS2 - 前進運動に使用中に、後肢は部分的に虚脱し、足を引きずる、NS3 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、後肢を前進運動に使用せず、NS4 - 後肢の硬直した麻痺が認められ、前進運動なし。NS4のスコアが観察されたいずれの動物も、人道的に安楽死させた。

【0396】

統計分析。Prism 8.4.2. (GraphPad Software Inc.) を使用して、Kaplan-Meier生存曲線を作成した。Log-rank (Mantel-Cox) 検定、続いてGehan-Breslow-Wilcoxon検定を使用して、生存曲線を比較した。感染後の各日について、一元配置分散分析（ANOVA）を使用して、処置群から得られた血液ウイルス力価と、プラセボ処置マウスから得られた肺力価および血液力価とを比較した。一元配置分散分析を使用して、平均体重を比較した。Kruskal-Wallis検定、続いてDunnの多重比較検定を使用して、神経学的スコアを比較した。

【0397】

実験動物に関する倫理規定。この試験は、2019年3月2日付け（2022年3月1日満了）ユタ州立大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeの承認に従って行った。この研究は、AAALACによって認定された、ユタ州立大学のLaboratory Animal Research Centerで行った。米国政府（国立衛生研究所）の承認は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（改訂;2011）に従って、2018年3月9日に更新された（PHS保証番号D16-00468 [A3801-01]）。

【0398】

（表M）実験NIA-1931/実験デザイン：マウスにおけるEV-D68神経学的感染の処置のためのEV68-228-TPの効果

10

20

30

40

50

匹/ ケージ	群番号	感染	化合物	投与量	経路	処置 スケジュール	観察
10	1	有	抗HIV-TP (プラセボ)	10 mg/kg	IP	感染 24時間前に 1回	生存率、体重および 神経学的スコア について、マウスを 連日観察した。
10	2	有	EV68-228-TP				
10	3	有	EV68-228- CHO				
10	4	有	hIVlg				
10	5	有	抗HIV-TP (プラセボ)	10 mg/kg	IP	感染 24時間後に 1回	血液ウイルス力価 のために、感染後 1日目、3日目、5日目 および7日目に マウス5匹/群から 血液を採取した。
10	6	有	EV68-228-TP				
10	7	有	EV68-228- CHO				
10	8	有	hIVlg				
10	9	有	抗HIV-TP (プラセボ)	10 mg/kg	IP	感染 48時間後に 1回	
10	10	有	EV68-228-TP				
10	11	有	EV68-228- CHO				
10	12	有	hIVlg				
5	13	無	正常対照	-	-	-	正常な体重増加が 観察された。

【0399】

結果および考察

この試験では、10日齢のAG129マウスにおけるEV-D68神経学的感染の処置に対するタバコ産生EV68-228 mAbの効果が決定された。

【0400】

図66は、EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスのKaplan-Meier生存曲線を示す。感染24時間前のEV68-228-TP処置またはEV68-228-CHO処置はいずれも、死亡からの完全な保護を提供した。単回10mg/kg用量のhIVIGは、マウス10匹のうち8匹（80%）を死亡から保護した。プラセボ処置マウス10匹のうち9匹が感染により死亡した。

【0401】

図67は、EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの初期体重に対するパーセンテージを示す。プラセボ処置群の生存マウスの体重が感染から回復した後に増加したため、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したマウスでは、体重減少からの有意な保護は観察されなかった。

【0402】

図68A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後1日目または3日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのIVIGに

よる処置も、感染後3日目に血液ウイルス力価を低下させた。

【0403】

図69A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したEV-D68感染AG129マウスの感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置は、感染後5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させなかった。感染後7日目には、いずれの処置群の血液中にもウイルスは検出されなかった。

【0404】

EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置した10日齢のAG129マウスの感染後2～10日目の神経学的スコアを図70A～Bに示す。感染後のいずれかの日に10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。さらに、感染後のいずれの時点でも、10mg/kgの用量のIVIgを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアは観察されなかった。唯一生存しているプラセボ処置マウスは麻痺の徴候を示さなかったため、感染後7日目の後に神経学的スコアの有意な低下は観察されなかった。

【0405】

EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスのKaplan-Meier生存曲線を図71に示す。感染24時間後の10mg/kg用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、マウスを死亡から完全に保護した。感染24時間後に投与された単回用量のhIVIgもまた、マウス全10匹（100%）を死亡から保護した。プラセボ処置マウス10匹のうち8匹が感染により死亡した。

【0406】

図72は、EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの初期体重に対するパーセンテージを示す。プラセボ処置群の生存マウス2匹の体重が感染に増加したため、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したマウスでは、体重減少からの有意な保護は観察されなかった。

【0407】

EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のマウスから得られた感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価を図73A～Bに示す。感染24時間後に処置を行ったため、感染後1日目に血液ウイルス力価の有意な低下は観察されなかった。感染後3日目に、EV68-228-TPおよびEV68-228-CHOによる処置は、血液ウイルス力価を有意に低下させた。感染24時間後のhIVIgによる処置は、感染後3日目に血液ウイルス力価を有意に低下させた。

【0408】

EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のマウスから得られた感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価を図74A～Bに示す。EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置したマウスの血液中にウイルスは検出されなかったが、採血について、2匹のプラセボ処置マウスのみが依然として生存しており、いずれの動物の血液中にもウイルスは検出されなかった。プラセボ処置動物におけるウイルス力価の欠如のために、いずれの処置群についても統計学的有意性を決定することができなかった。感染後7日目には、いずれの群の血液中にもウイルスは検出されなかった。

【0409】

図75A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後2～9日目の神経学的スコアを示す。感染後24時間のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOによる処置は、感染後2～9日目の神経学的スコアの低下によって示されるように、麻痺の徴候を有意に減少させた。感染24時間後の単回10mg

10

20

30

40

50

/kg用量のhIVIgは、感染後2日目および3日目に神経学的スコアを低下させたが、試験の残りの部分では転帰を改善しなかった。

【0410】

EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後10～17日目の神経学的スコアを図76A～Bに示す。EV68-228-TPおよびEV68-228-CHOはともに、感染後10～15日目に神経学的スコアを有意に低下させた。hIVIgの投与は、感染後10～17日目に神経学的スコアを有意に低下させなかった。

【0411】

図77は、EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスのKaplan-Meier生存曲線を示す。10mg/kgの用量でのEV68-228-TPによる処置は、マウス10匹のうち9匹（90％）を死亡から保護した。EV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置されたマウス10匹のうち8匹（80％）が感染から生き残った。単回10mg/kg用量のhIVIgは、マウス10匹のうち6匹（60％）を死亡から保護した。プラセボ処置マウス10匹のうちの1匹が感染から生き残った。

【0412】

図78は、EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの初期体重に対するパーセンテージを示す。プラセボ処置群の生存マウスの体重が感染後に増加したため、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染24時間前に処置したマウスでは、体重減少からの有意な保護は観察されなかった。

【0413】

図79A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの感染後1日目および3日目の血液ウイルス力価を示す。感染後1日目では、その時点で処置が行われなかったため、処置群のいずれも有意に異ならなかった。感染後3日目の時点で、10mg/kgのEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは血液ウイルス力価が比較的低かったが、差は統計的に有意ではなかった。これは、3日目の採血のわずか24時間前に行われた処置に起因する可能性が高い。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置は、感染後1日目または3日目に血液ウイルス力価を有意に低下させなかった。

【0414】

図80A～Bは、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置したEV-D68感染AG129マウスの感染後5日目および7日目の血液ウイルス力価を示す。10mg/kgの用量のEV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、感染後5日目に血液ウイルス力価は検出されなかった。10mg/kgの用量でのIVIgによる処置は、感染後5日目に血液ウイルス力価を有意に低下させなかった。感染後7日目には、いずれの処置群の血液中でもウイルスは検出されなかった。

【0415】

EV-D68に感染させ、EV68-228-TPまたはEV68-228-CHOを用いて感染48時間後に処置した10日齢のAG129マウスの感染後3～10日目の神経学的スコアを図81A～Bに示す。10mg/kgのEV68-228-TPによる処置は、感染後3～5日目に神経学的スコアを有意に低下させた。10mg/kgのEV68-228-CHOによる処置は、感染後3～6日目に神経学的スコアを有意に低下させた。10mg/kgのhIVIgを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアが感染後3～5日目に有意に低下した。感染後7～10日目には、神経学的スコアの有意な低下は、いずれの処置群にも観察されなかった。

【0416】

結論

この試験では、10日齢のAG129マウスにおけるEV-D68神経学的感染に対するタバコ産生EV68-228 mAbの効果が決定された。

【0417】

タバコ産生mAbは、処置を感染24時間前および感染24時間後または48時間後に行った

10

20

30

40

50

場合、CHO産生mAbと比較して、死亡からの同様の保護を提供した。

【0418】

さらに、EV-D68に感染させた10日齢のAG129マウスでは、EV68-228-TPおよびEV68-228-CHOの両mAbを用いて処置したマウスに血液ウイルス力価の同様の低下が観察された。

【0419】

EV68-228-TPおよびEV68-228-CHOを用いて処置したマウスでは、神経学的スコアの低下によって示されるような麻痺からの同様の保護が観察された。

【0420】

要約すると、タバコ産生EV68-228は、CHO産生EV68-228と比較して、死亡からの同様の保護、血液ウイルス力価の低下、および麻痺からの保護を提供した。

【0421】

(表1) 抗体可変領域のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

クローン	SEQ ID NO:	鎖	可変配列領域
EV-D68-37	1	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCATGTGCAGCCTCTGGAT TCATCTTCAGTCGCTACGCTCTGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCAGTTATATCATAT GATGCAAGAAATTCATATTACACAGACTCCGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAAAACACGCTGTTT CTGCAGATGAACAGTCTGAGAGCTGACGACACGGCTGTCT ATTACTGTGCGAGACCGACTTTGCCCTACAGCAACAAC TG GTACGCGCCTGAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
	2	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAAACGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATT ACCAAAAAAATATGCTTCTTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCC AGGCCCCCTGTGCTGGTCATCTATGAAGACACCAAACGACC CTCCGGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGG ACAATGGCCACCTTGACTATCAGTGGGGCCCAGGTGGAAG ATGAAAGTGACTACTACTGTTCTCGACAGACAGCAGTGGT AATCCTGTGCTATTCCGGCGAGGGACCAAGTTGACCGTCC TA
EV-D68-40	3	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCTCCTTTAGCAGCTATGCCATGGCCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGT AACGGTAATGGGAGATCCTATGCAGATTCTCTGAAGGGCC GGTTCACCACCTCCAAAGACCTTTCCAAGTATACCCTGTAT CTGCAAATGAACAATCTGAGACCCGAGGACACGGCCATAT ATTACTGTGCGAAAGTTGTCCGTATAGCAGCTGTTTTGTAT TACTTTGACTATTGGGGCCCGGAACCCAGGTTACCGTCT CCTCA
	4	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCACCTACTTAGCCTGGTACCAACAAAAGCCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAAGCATCCACCAG GGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCATCATCAGCAGCCTAGAGCCTG AAGATTTTGCAGTTTATCACTGTCAGCAGCGCAGCTCCTGG CCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTGAA
EV-D68-41	5	重鎖	GACGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCTGCCTCTGGAT TCACTTTTAGCAACTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT CTAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTTCTATTAGTGGTA GTGGTGGCCTCACATATTTGCACACTCCGTGAAGGGCCG GCTCACCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAATACCCTCTATC TGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATA TTACTGTGCGAGAGTGAAAAGTACAACCTGGAACGACGGCG TTAGTTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT CTCTTCG
	6	軽鎖	CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCC CTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCTTGAGTTCTGG

10

20

30

40

50

			CTCAGTCTCTAGTAGTTACTACCCAGTTGGTACCAGCAGACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAGTATAAACAGACGTTCTTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTTCA TCCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCACCATCAGGGGGGCCCA GGCAGATGATGAATCTGATTATTACTGTGGGCTGTATATGG GTAGTGGCATTTGGATCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCCTA
EV-D68-43	7	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCATTAAGTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAAATG ATGGAAGTTATAACTACGATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAAGGTTTATC TACAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTA TTTCTGTGCGAAAGACAAACACGGTGACTTCGACTACTACG GTGTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCCCCA
	8	軽鎖	GACGTCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC TATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGGGTCAG GGAATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAATTTG CAAAGTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGAACTTACTATTGTCAACAGGCTGACAGTTTCC CTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
EV-D68-46	9	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCCTAT GATGGAAGTGATAACACCTATGCACCTTTTGTGAACGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGACGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGGCGTCGGCCTGGGAGCTTCCCAGGACT TTGCGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCC TCA
	10	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCGCCTTCCACTATGTCTGCTTC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAG AGTATTAGTAAGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAG GGAAAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTACCTTA CAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGAATTCACCTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAT GATTTTGCACTTATTACTGCCAACAGCATAATAGTTATTG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAG
EV-D68-48	11	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAG GCAGCTTCAGCAGACTTACTATCATCTGGGTGCGGCAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGCACATCCC TATCTTTGGAACAACAACTACGCACTGAAGTTCCAGGGCA GAGTCACGATTACCGCGGACAAAACCACGAGCACAGCCTA CATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATA TATTACTGTGCGAGAATGTATAGTGGCCATGACGGCGTTGA TGTCTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACCGTCTCTTCA
	12	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA

10

20

30

40

50

			GAGTGTTAGGAGCTACTTAGCCTGGTACCAACACAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCAAGGGCATCCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCACCT GGCCTCCGGAATGTTCCGCCAAGGGACCAGGGTGAAAA TCAAA
EV- D68- 71	13	重鎖	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CATTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG GCTCCATCAGCAGTGGTTTTACTACTGGGGCTGGATCCG CCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTAGAGTGGATTGGGACTAT CTATGATAGTGGGAGAACCCTATGACAACCCGTCCCTCAAG AGTCGAGTCACCATATCCGCAGACACGTCCAAGAAGCAGT TCTCACTGACACTGAGGTCTGCGACCGCCGCGGACACGG CTGTGTATTTCTGTGCGAGACACCTTACCCACCTCTACGGT GACTACGTCACCCTGATGCTTTAGATATCTGGGGCCAAG GGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	14	輕鎖	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAAGGCCAGTCAG AGCGTTAGTAGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCGTCCAG CAGGGCCACCGGCATCCCAGACAGGTTGAGAGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTATATTACTGTCAGCAGTATAGTAA CTCACGTCTGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATC AAA
EV- D68- 72	15	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCACTACCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTACATACATTAGTAGTG GTAGTAGTAACATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGAATC TGCAAATGAGCAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGAGCCCACGGACGTATAGTGAATTCTGGA GTGGTTATTAGTAGGTTGACCCCTGGGGCCAGGGAATCC TGGTCACCGTCTCCTCA
	16	輕鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTC CTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGACGTTGGTGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACTGC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTTGGAGTCACT TATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAA GTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAG GCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCCTATACAAC CAGCAACACTCTCGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTA
EV- D68- 74	17	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTAGGACTTCTGGAT ACACCTTACGGCCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGC CCCCGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGAAGGATCAACCC GAGCAGTGGTGGCGCACAGTATGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAACT ACATGACCCTGAGCGGGCTGACATCTGACGACACGGCCGT GTTTACTGTGCGAGAATGGGTTGTCGTAGTGACCGGTGC

10

20

30

40

50

			TATTCGACCAACTACAACTTTGACCAGTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	18	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCC CAGGACAGACGGCCAGGATTCCCTGTGGGGGAAACAACAT TGGAACTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCCCCCTGTGCTGGTCGTCTCTAATGACAGCGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGG GGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATAGTGGT ATTGATGTCGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC TA
EV- D68- 75	19	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTATCAGTCCCTATGGCATGAACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTCAATAGTAGT AGTAGTCGTTACACATATTACGCAGACTCAGTGAAGGGCC GTTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCAGTGTCT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGAGAGGGGCCATAGCACCTCGTCCTC ATACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
	20	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAATTGGCCC CAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACAT TGGAACTAAAAGTGTGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCCCCCTGTGCTGGTCATGTATTATGATAGTGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACGGCCACCCTGACCATCAACAGGGTCGAGGCCGG GGATGAGGCCGACTATTACTGTGCGGTGTGGGATAGTGAT ACTGATCATCGAGTGTTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGACC GTCCTA
EV- D68- 76	21	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTAAAG CCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTAGTAACGCCTGGATTAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATTCAAACC AAAAGTATGAGGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGA AAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACG TTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAG CCTTGTATTATTGTAGCACAGGACCGTATTACTATGATACTA GTGGTTACCCCCAACCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
	22	軽鎖	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCC CAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATT GGGAGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC CAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATACCAAGCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATG GATGAGGCTGACTATTACTGTGAGCGGTGGGACAGCAGCA CTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
EV- D68- 80	23	重鎖	GAGGTACAGATGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG CCGGGGGGGTCCCTCAGACTCTCCTGTTCACTCTCTGGAT TCGACTTCAGTAGATACACCATGAACTGGTTCGCCAGGCT CCAGGGGAGGGGCTGAAGTGGGTCTCGTCCATTAGTAGTA CTAGTCTTTACACATTCTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGA TTCTCCATCTCCAGAGACAACGCCAGGGTTCCTGTCTCT

10

20

30

40

50

			ACAAATGAGCAGCCTGAGACCCGAAGATACGGCTGTCTAT TATTGTGCGAGAGTCGTTGGTCCC GCCGAGTTAGATTACT GGGGCCAGGGAGTGCTGGTCACCGTCTCCTCA
	24	軽鎖	GTCACCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTC TGTCGGGGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG GACATTGGAGTTGACTTAGGTTGGTTTCAGCAGAGACCTG GGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTATGGTGCCTCCAGGTT GCAGAGTGGGGTCCCATCACGCTTCAGCGGGCGTGATC TGGCACATTTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG AAGATTTTACAACCTTACTTCTGTCTTCAAGATTATAATTACC CTTGGACGCTCGGCCAGGGGACCACGGTGGGAGTCAAA
EV- D68- 84	25	重鎖	CAGGTGCACCTGGTGCAGTCTGGGTCTGCGGTGAGGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT ACACCTTCACCGACTACTATTTCACTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCT AAAAGTGGTGGCTCAAATTATACACAGAGGTTTCAGGCCAG GGTCACCATGACCTGGGACACGTCCTCAGTACAGCCTAC ATGGAGTTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT ATTATTGTGCGAGGGCGGGCAGAAATGGCTACGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	26	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAGACGGCCAGGATCACCTGCTCTGCAGATGCATT GCCAAAGCAATATGCTTATTGGTACCAACAGAAGCCAGGC CAGGCCCTGTGTTGATGATATATCAAGACACTGAGAGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGGTCCAGCTCAGG GACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAGAA GACGAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGGAGACAGCAGTG GTAATTATCTAGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTA
EV- D68- 85	27	重鎖	GAGGTACAGCTCTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CAAATTTAGAACTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTACTAGTG GTGGTAGTACAGAGTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGGT TCATCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGTTATATTTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCCGTATATT ACTGTACAGTGCCGTGGGGTAACTACAATGACTACGTGTCT GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCCCGTCTCCTCA
	28	軽鎖	GAAGTTGTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGCAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG CGTGTGGCAACTCCTTAGCCTGGTACCAACAAAACCTG GCCAGGCTCCCAGCCTCCTCATCTATGATGCTTCCAAGAG GGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCATCAGCCTAGAGTCTGA AGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACCAACATAGCACCTGGC CTCGGGGACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA A
EV- D68- 88	29	重鎖	CAGGTGCACCTGGTTGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCATCTTCAGTAGATATCCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCACTTATATCATATG ATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTC TCCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTA

10

20

30

40

50

			TTACTGTGCGAGACATTTCTCCCATATAGCAGTAGTTGGT ACCAGGGCTTTAACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
	30	軽鎖	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAGTCTCC GGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGG CAGCATTGCCACCACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGC CCGGGCAGTTCCCCCACCCCTATAATCTTTGAAGATAGTCA AAGACCGTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATC GACAGCTCCTCCAATTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGA GAGGACTGACGACGAGGCTGACTACTACTGTCACTCTTAT GATAACAGCAATCGGGCTGTTGTATTGCGCGGAGGGACCA AGCTGACCGTCCTA
EV- D68- 89	31	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAAGCGTCTGGAT TCCTCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCAGTTATATCCTGAT GATGGAAATAAGAAATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCAAAGAACACGTTGTATC TGCAAGTGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTA TTACTGTGCGAGAGGTGTCCCGTACGGTGACACCCTTACA GGGCTTGTCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA
	32	軽鎖	AATTTTATGCTGACTCAGCCGCACTCTGTGTGCGGAGTCTCC GGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGG CACCATTGCCAGCACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGC CCGGGCAGTGCCCCACCACTGTAATCTATGAGGATAACC AAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCAT CGACAGCTCCTCCAATCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGA CTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCACTCTT ATGATAACAGCGATCGGGTGTTGCGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCCTT
EV- D68- 95	33	重鎖	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAC CCACAGAGACCCTCAGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGT CTCACTCAGGAACGCTAGAATGGGAGTGAGCTGGATCCGT CAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGACACATTT TTTCGAATGACGAAAAATCCTACAACACATCTCTGAAGAGC AGACTCTCCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGG TCCTTACCATGACCAGCATGGACCCTTTGGACACAGCCAC ATATTTCTGTGCACGGCTACTGGTGGCTGGTACTTTCCTCC CCTCTCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAATCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
	34	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCACTGACCC CAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACAT TGGACTTAAAAGTGTCTTCTGGTACCAGGAGAGGCCAGAC CAGGCCCCCTGTGGTGGTCATCTATTATGATAGCGCCCGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGAATCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACGGCCACCCTGACCATCACCAGGGTCGAAGCCGG GGATGAGGCCGACTATTTTTGTCAAGTGTGGGATAGTAGT CGTAATCATCCGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCG TCCTC
EV- D68- 97	35	重鎖	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTACCTATAGCATGAATTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTA

10

20

30

40

50

			GTAGTAGTACCATACAGTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATC TGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTGTA TTATTGTACGAGACAGGTCGGGGCGGATTTTCAGTGGCCGC GGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGCTCACCGTCT CCTCA
	36	軽鎖	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCC CAGGACAGACAGCCACCATCACCTGCTTTGGAGATAAATT GGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC CAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTACCAAGATAGCAAGCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCAATG GATGAGGCTGACTATTACT-GT- CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGCAGTGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTC
EV- D68- 98	37	重鎖	GAGGTACAACTAGTGGAGTCAGGGGGAGGCTTGTTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCAAGTTTTCCGTCTATGCCTTGAGTTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATATATTAGTAGTA GTGGTTCTACCATATATTATTCAGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATGTGCGGAACCTCACTGTTTGT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGGTATTTAT TACTGTGCGACAGCCCGCCACATCACCAATGATGGTTTTGA TATTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCATCGTCTCTTCA
	38	軽鎖	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAG GGCATTAGTAGGTTTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCGTCCACTTTAC AAAGGGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATTTGG GACAGATTTCACTCTCACAACTCAGTAGCCTTCAGCCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAACCTTAATAGTCACCCCC GAATGTTCACTTTGCGCCCTGGGACCACAGTGGATATCAA G
EV- D68- 105	39	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTGTCTGGTT ACTTAATCAGCAATGGTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCA GCCCCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTA TCATACTAGAAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTC GAGTCAGCATCTCAGTAGACACGTCCAAGAACCGGTTCTC CCTGAGGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCTTT TATTACTGTGCGAGAGGCCAGGCCACTGTTATGGTGATG ACGACTGCTACGCGTACTACTTTGACCAGTGGGGCCAGGG AACCCCGGTACCGTCTCCCCA
	40	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTTCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAG GGTATTAGCAACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAACCCAG GGAAAGCTCCTAAACTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCT TTCACTTTGCGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
EV- D68- 110	41	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAG GCACCTTCAGCAGGTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGC

10

20

30

40

50

			CCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGAGGGATCCTCCCT ATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCA GAGTCACGATTACCGCGGACACATCCACGAGCACAGCCTA CATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT GTATTACTGTGCGAGATCCCTCCCCTATTGTACTAATGATG TATGCTCAAACCAGAACACATTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCTGGTCACCGTCTCCTCA
	42	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAGGCGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATT GCCTAAGCAATATGCTTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCCCCCTGTGTTGGTGATATATGAAGACAATAAGAGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG GACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAGAA GACGAGGCTGACTATTACTGTCAATCAGCAGACAGCAGTG GTACTTATGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTA
EV- D68- 111	43	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG GCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGTTGGATCCG CCAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACAT CTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGA GTGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCG TGATTACTGTGCCAGCCGCTACGGTGACCCGATAGGGGA CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
	44	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAGTGACCC CAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACAT TGGACTTAAAGTGTCTTCTGGTACCAGGAGAGGCCAGAC CAGGCCCCCTGTGGTGGTCATCTATTATGATAGCGCCCGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGAATCTCTGGCTCCAAGTCTGG GAACACGGCCACCCTGACCATCACCAGGGTCCAAGCCGG GGATGAGGCCGACTATTTTGTGAGGTGTGGGATAGTAGT CGTAATCATCCGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCG TCCTC
EV- D68- 114	45	重鎖	GAGGTGCAACTGTTGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTGCAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCCGGA TTCAGGTTTAGCTTCTATGGCATGACCTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGG TACTGGTGCTACCAGAAACTGCGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACGCTGT ACCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCCGT TTTTTATTGTGTGAGACGTTCCCGATGACCACGGTGACAA GCTTTGACTCTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
	46	軽鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGATGTTGGTGGTTATAACTTTGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCGGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTTTGATGTCACT GGCGGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCGCTGGGCTCCA GGCTGAAGATGAGGCTGATTATTATTGTGGCGCATATGCG GGCTTTAACGCTCTTTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCG TCCTA

10

20

30

40

50

EV-D68-116	47	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGGGGAGGCTTGGTCCGG CCGGGGGGGTCCGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAT TCCCCTTCAATATGTTTTGGATGGGCTGGGTCCGCCAGACT CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAATATAAAACAG GATGGCAGTGAGAAATACTATGTGCGACTCCGTGAAGGGCC GATTCCGCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCTCTCTT CTTCAAATGGACAGCCTGAGTGTGCGGGACACGGCCATCT ATTATTGTGTGAGAGAGGGGGTGCGAAGGGTCGTCTACG TAGTACCGGTTACTTCGACTTTTGGGGCCAGGGACAGCTG GTCACCGTCTCCTCA
	48	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGATGTGAGTGTCCC CAGGACAAACGGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCAGT GCCAATAAAATATGTTTATTGGTACCAACAGAGGTCAGGCC AGGCCCTGTATTAGTCATCTATGAAGACGACAGACGACC CTCCGGGATCTCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGTTCAGGG ACAACGGCCACCTTGACTATCACTGGGGCCAGGTGGAGG ATGAAGGTGACTACTATTGCTATTCAACAGACAGTAGTGGT TATCAGAGAGCGTTCGGCGGGGGGACCACGCTGACCGTC CTA
EV-D68-150	49	重鎖	CGGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGCCCCAGGACTGGTGAGG CCTTCAGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTG GCCCCATCAGCAATGGTCCTTATTACTGGAGCTGGATCCG CCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTATC TTTTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCCGGG GGCGCGTAACCATGGCAGTGGACACGTCTAAGAACCAGTT CTCCCTGAGGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTTTATTACTGTGCGAGACATGTGGTGAAGTGCCTCGGGGT GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA
	50	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTGGCACCAGCTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGGTCCTCATCTATGATGCATTCAAGA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTCGAGCC TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAGGT GGCCTCCCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
EV-D68-151	51	重鎖	CGGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGCCCCAGGACTGGTGAGG CCTTCAGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTG GCCCCATCAGCAATGGTCCTTATTACTGGAGCTGGATCCG CCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTATC TTTTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCCGGG GGCGCGTAACCATGGCAGTGGACACGTCTAAGAACCAGTT CTCCCTGAGGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTTTATTACTGTGCGAGACATGTGGTGAAGTGCCTCGGGGT GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA
	52	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTGGCACCAGCTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGGTCCTCATCTATGATGCATTCAAGA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTCGAGCC

10

20

30

40

			TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGGT GGCCTCCCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
EV- D68- 152	53	重鎖	CAGGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGACTCTGGAG TCACCTTCAGTGACAATGCTTTGTAAGTGGGTCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAGTTATCTCATATG ATGGAAGCAGTAGATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCG GTTACCATATCCAGAGACAATTCCAAGGACACGCTGTATC TGCAAATGAACAGACTGAGAGCTGAGGACACGGCTATTTAT TACTGTGCGAGAGTCACAGCGGATTACTATGAGAGTAGTG GCAAGGTGTTTTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCGTCGTCTC CTCA
	54	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATC TGTGGGGGACAGAGTCTCCATCACTTGCCGGGCCAGTCAG AGTGTTAGGAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCACAAACCG GGAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTA GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGAATTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA TGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCAGACTTTTTT CTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAGTCAAA
EV- D68- 154	55	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGCACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT GCTCCATCAGTGATCACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCC CCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGCTACATCTATACC AGTGGGACCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAG TCACCATATCAGTAGACACATCCAAGAAGCAGTTCTCCCTG AATCTGAGGTCTGTGACCGCCGACAGACACGGCCGTGTATT ACTGTGCGAGAAGTCTAGAAACGGTGATCCGTTTCTACTAC TACCACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAAGGTGA TCGTCTCATCA
	56	軽鎖	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCTCCTGCCCCGTCAC CCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAG AGCCTCCTGCAGAGTGATGGGTACAGCTATTTGGATTGGT ACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTA TTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTT AGTGTCAATTGGATCAGGCACATATTTTACACTGAAAATCAG CAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCGTTTATTTCTGCATG CAAGCTCTACAACTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCA AGGTGGAATCAAA
EV- D68- 155	57	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTGCTGGCG GCTCCATCGGTGATTACCACTGGAAGTGGATCCGGCAGCC CGCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGCGTATACATAG CAGTGGGAACACTGACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGA GTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCT GAAACTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGGCAAAATGTTTTTGATATCTGGGGCCAAGG GACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	58	軽鎖	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTCTGT CTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCA GAGTGTTTTATTAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTT ACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATT

10

20

30

40

50

			CAGTGGCAGCGGGTCTGAGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTTCTGTCA GCAATTTTATACTACTCCGCTCACTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAA
EV- D68- 156	59	重鎖	CAGGTACAGATGCAGGAGTCGGGCCCAGGGCTGGTGAAG GCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTA TCTCCATCAATACTACTATTGGAGTTGGTTCCGCCAGCCC CCCGGGAAGGGCCTGGAGTGGATCGGATATGTCTATTCTA CTGGGAGTTCCAAGTACAATCCCTCCCTCGAGCGTCGAGC CACCATGTCAGTAGACACGTCCAACAACAACCTTCTCCCTGA GGCTGACGTCTGTGACCACTGCGGACACGGCCGTCTACTA CTGTGCGCGGGGGAGTATGCCGCATATCTGGGGCCAGGG CCTCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	60	軽鎖	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCCGGGACCC CCGGACAGAGGGTCACCATCTCCTGTTCTGGTAGCACCTC CAACATCGAGACTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGGTCC CAGGAACGGGCCCCCAAGCCCCTCGTCTATAGGAATGATCA GCGCCCCTCGGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCGGA CCGAGGATGAGGCTGCTTATTATTGTGCAGCTTGGGATGA CAGTCTGAAAGCTCCGGTCTTCGGAGCTGGGACCAAGGTC GCCGTCCTC
EV- D68- 157	61	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATAAAG CCGGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAA TCACTTTAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCGTATTGAAAGC AAAATTGACGGTGGGACAATAGACTACGCTACACCCGTGA AAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACG CTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAG CCGTCTATTACTGTACCACAGACCAGGGCTACTATGATAGA AGTGGTTATTGGGTGTCGGGAACCACTTTGACTACTGGG GCCAGGGAATCCTGGTCACCGTCTCCTCA
	62	軽鎖	CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCC CCAGGGCTGAGGGTCACCATCTCCTGTACTGGGAGCAGCA CCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCA CCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACA GCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC CAGGCTGACGATGCGGCTGATTATTACTGCCAGTCTATG ACAGAAGCCTGAGTACTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAA GGTCACCGTCCTA
EV- D68- 158	63	重鎖	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGT ACTACAGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT ATTACTGTGCGAAAGATTCTCACTCCATGATAGTAGTTGAT CATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCG TCTCTTCA
	64	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCC CAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAATAT TGGAACATAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGC

10

20

30

40

50

			CAGGCCCTGTGCTGGTCTATGATGATAGCGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTG GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCG GGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTTAT AATGTTCAATTATGTCTTCGGAACAGGGACCAAGGTCACCGT CCTA
EV- D68- 159	65	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCCTGGTCAAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTACTTATATCATGACCTGGGTCCGCCAGGCC CCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACCA GTAGTGTTTACACATTCTATGCAGATTCACTGAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCAGTGTATCT GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTTTAT TACTGTGCGAGGGAAGAAGGGTTTCGAGCTTATAACCTATA CTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
	66	輕鎖	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCGTCAGCGTCTGGGACCC CCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTC CAACATCGAATACAATTATGTTTACTGGTACCAGAAATCCC AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAAAAAATAATCAGC GGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTC TGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGGTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACA TCCTGAGTGGTGTGGTTTTTCGGCGGGGGACCAAGCTGAC CGTCCTC
EV- D68- 160	67	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCAGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACGTTCAGTAGGTTTGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTTCGTTT GATGGAAGTAATAGATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGGC GATTCACCATCACCAGAGACAATTCCAAGAACACATTGTAT CTGCAAATGAACAACCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTAT ATTACTGCGCGAGAGATTGGGATAGGCTGGTTTCGTTTCGGC GGTTGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTC CTCA
	68	輕鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGTAAT GATGTTGGTGGTTATAAATTTGTCTCCTGGTATCAGCAACA CCCAGGCAAGCCCCAACTAATGATTTTTGATGTCATTA GGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGGTCGCTTCTCTGGCTCCAA GTCTGGCGACACGGCCTCCCTTATCATCTCTGGACTCCAG GCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCTGCTCATATGCAG GCACCTACACCTGGGTATTCGGCGCAGGGACCACTGAC CGTCCTA
EV- D68- 161	69	重鎖	CAGGTGCACCTGCAGGAGTCGGGCCCACGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG GCTCCGTCAGCACTGCCACTTACTACTGGAGCTGGATCCG GCAGTCCCCAGGGAGGGGACTGGAGTGGATAGGATATATC TATTCCAGTGGTAACACCAACTACAACCCCTCCCTTAAGAG TCGAGTCACCATTTCTTTAGACACGCCCAACAACCACTCT CCCTGACGTTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCAT TTATTATTGTGAGAGGCGCTTACGTATTCTGAGTATTGAGA GGAATACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCC GGTCACCGTCTCCTCA

10

20

30

40

50

	70	軽鎖	GAAGTTGTGTTGACGCAGACTCCAGGCACCCTGTCTTTGT CTCCGGGGGAAGGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC AGAGGGTTGTCAACAACACTTAGCCTGGTACCAGCAGAG AGCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATTTTTTGGTGCATCC AACAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTG GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGGAAGCTGGA GCCCCAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAATATGGTA GCCCCGTGGACGTTTCGGCCACGGGACCAAGGTGGAAATGA AA
EV- D68- 162	71	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTATGCTATGCATTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAGGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATG ATGCAAGCAAGAAATACCACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACAATCTCCAGAGACAGTTCCAAGAACACGCTGTTTC TGCAAATGAATAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGAGATCATGTCCCCCACAAGGATTGCAGT GATGGTAATTGCCACTCGGACTACGGTATGGACGTCTGGG GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	72	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCGCCTTCCACTATGTCTGCTTC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAG AGTATTAGTAAGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAG GGAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTACCTTA CAAACCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGAATTCAGTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAT GATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCATAATAGTTATTCTG TACACTTTTGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAG
EV- D68- 163	73	重鎖	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGGCCCTCAGTGAAGATTTCTTGCAAGGCTTCTGGATA CTCCTTCACTAACTTTGCTGTGCATTGGGTGCGCCAGGCC CCCGGACAAAGACTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTG GCAATAGAAACACAAAGTATTCACACAACCTTCAGGGCAGA GTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAACACAGCCTACA TGGAAGTGAAGCAGCCTGAGATCTCAAGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGACTTCCGATAGCAGCAGCTGGCAGGGGC TGGTTGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCC
	74	軽鎖	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTATCAGCACCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAGA CCTGGCCAGGCTCCCAGGGTCTCATCTATGATGTATCCA CCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTG GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTCTATTTCTGTCAACAGTATGGTA GTTCAACCGCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA
EV- D68- 164	75	重鎖	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAATACTTATGGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTG CCACCACTACCTTCTACTACGCAGACTCTGTGAGGGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAATTCACTATTTCT GCACATGAAGAGCCTGAGAGACGAAGACACGGCAGTTTAT TACTGTGCGAGAGTCTATACTATGCTTCGCGGAGCGAGTAT

10

20

30

40

50

			GGACGTCTGGGGCCACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC A
	76	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTGGCACCTACCTGGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATTCAGCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCCGGTTCAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGTGCGCATCACCT GGCCTCCTATATTCACTTTGCGCCCTGGGACCAAAGTGGA TGTCAAA
EV- D68- 165	77	重鎖	CAGGTGCACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG TCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTTTGGAT ACACCTTCACCGCCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAGGGGCCTGAGTGGATGGGATGGATCAACCC TATCAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGTCTCCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCT ACATGGGCCTGAGCAGGCTGAGACCTGACGACACGGCCG TCTATTACTGTGCGAGAGTGAAGTGTAGTAGTGCCAACTGC TATGGGAACTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTGGTCA CCGTCTCCTCA
	78	軽鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTC CTGGAGAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACAGCAG TGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGAGGTCAGT AAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATGCA GGCAGCAACAATTTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGA CCGTCCTA
EV- D68- 166	79	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG CCCGGTGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGAT ACAGGTTTACCAACTACCGGATCGGCTGGGTGCGCCAGAT GCCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCC CGGTGGCTCTGATACCAGATACAGTCCGTCCCTCCAAGGC CAGGTCACCATGTGAGTCGACAAGTCCATCAGCACCGCCT ACCTGATGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCAT GTATTACTGTGCTCGACAGACCACTCAAAATAGTGGCTACG ATAGATGGTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCACGTAC CGTCTCCTCA
	80	軽鎖	CAGTCTGTAAGTACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCC CCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTC CAGCATCGGAAGTAATATTGTAAATTGGTACCAACACCTCC CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATATTAATAATCAG CGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT CTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTC TGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCAGCATGGGATGAC AGCCTGAATGGTTGGGTGTTGCGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTG
EV- D68- 181	81	重鎖	GAGGTGCAGGTGTTGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAA TCACCTTTAGCAGGCATACTATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGG GAGTGGTGGTAGCACATATCATGCAGACTCCGTGAAGGGC

10

20

30

40

50

			CGCTTCACCATCTCCAGAGACAGTTCCAAGAGCACGCTGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT TTATTACTGTGCGATCTCCGTGCCATTATTACGATTTTTGGA GTGGTTTCAACACCCTTTTGA CTCTCTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA
	82	軽鎖	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTGT CTCCAGGGGAAAGAGTCAACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTGGCAGCACCTTAGCCTGGTACCAGCACAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCACCA GGGCCACTGGTGTCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGT CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGTC TGAAGATTTTGCAGTTTACTACTGTCACCAGTATATTAAGTG GCCTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA
EV- D68- 183	83	重鎖	GAGGTGCGGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAA CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAATACATATTCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCTCCATTAGTAGTA CCGGAAGTTACATATAACAATGCAGACTCACTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTTC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCTGTGTA TACTGTGTGAGATTCACCATGACTACAGTGACTAACTTTG ACTCATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACGCTCTCCTCA
	84	軽鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGATGTTGGTGCTTATAGCTATGTCTCCTGGTACCAACAAC ACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCTAC AGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGGTCCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGATGAGGCTGATTACTACTGCTGCTCACATGCA GGCAGTCACACCTGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGGTG ACCGTCCTA
EV- D68- 185	85	重鎖	CAGCTGCAGGTGGTGGCGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTAAAGCCTCTGGAT TCACGTTACCAATTATGGCATGCACTGGGTTCGCCAGGC GCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTTTTATATCATAC GATGGAGGTAATAAATTTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACGGTTTATC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGTGGCGGACACGGCTATGTA TACTGTCCGAAGGTCATCCCCACCCGCTATTATGATAGTA GTGGTGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAT GGTCGCCATTTCTTCA
	86	軽鎖	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGT CTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCTCTCCTGTGGGCCAGTCA GAGTATTAGCCGCAACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCTG GCCAGGCTCCCCGACTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAG GGCCACTGGTATCCCCGCCAAGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCCTCAGCAGCCTGCAGTCTG AAGACCTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAGTAAGTTG CCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAT
EV- D68- 200	87	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCCCTTCAGTAGTTATAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATACATAAGTGGT

10

20

30

40

50

			AGTGGTGGTGACATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGGGACAATGCCAGGAACCTCACTGTCT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTGT ATTACTGTGCGAGAGGGCTGGTAGCAACAACCTGGTACAAG GTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
	88	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGGAGTTACTTAGCCTGGTACCAACAGAGACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGTCAGGTTCACTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCTACT GGCCTCCGTTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT CAAA
EV- D68- 208	89	重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCGGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAG GCACCTTCAGGAGGTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGC CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCT ATCCTAGGTAGAGGAAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCA GAGTCAGGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTA CATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGATTTATTTGACAGCCTCCTATGTTCC GGGGACCTTCGAGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAACGGT CACCGTCTCCTCA
	90	軽鎖	GACATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCGCTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGT CTGAGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATGTTGCGGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCGACT GGCCTCCGGGGACTTTTGGCCAGGGGACCAACGTGGAGA TCAAA
EV- D68- 210	91	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGGAACATAACATCAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTA CTGGTAGTTACATACACTACGCAGATTTAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTATAT TACTGTGCGCGAATGGTTAGGAATACGGTGACTGCCTTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCTCCGTCTCCTCA
	92	軽鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTC CTGGCCAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG TGATGTTGGTGGCTATAACTTTGTCTCCTGGTACCAACAAC AGCCAGGCAGAGCCCCCAAACCTCTTATTTATGAAGTCATT AAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCGACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTGCTCATATGGG GGTAACAACCTCTGGATGTTGCGCGGAGGGACCATGCTGA CCGTCCTA
	93	重鎖	CAGGTCCAGGTGGTACAGTCTGGGGCTGAGATGAAGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATA

10

20

30

40

50

EV-D68-219			CAGGCTCATTGATTTACCCTTGCACTGGGTGCGACAGGCT CCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTTTTGATCCTG AAAAGGCTGAAGCCATCTACTCACAGAAATCCAGGACAAG GTCACCATAAGCGAGGACACATCTATCGACACAGCCTACAT GGAACCTGAACAGCCTGCGCTCTGAAGACACGGCCGTCTAC TACTGTGCAACTTGGGGAGTTGAGGTGGTGAATGGGAGAA GGGACTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
	94	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAGACGGCCAGGATCACATGCTATGCAGATGTGTT GTCAAACCAATATACTTACTGGTATCAACAGAAGCCAGGCC AGGCCCTGTGTTGGTGATATATAAAGACACTGAGAGGCC CTCAGGGATCCCTGAGCGATTTGCTGGCTCCAGCTCAGGG ACAACAGTCACCTTAGTCATCAATGGAGTCCGGGCAGAGG ACGAGGCTTACTATTACTGTCAATCAGCCGACAACACCAGA ATTACGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGTCCGTCCTA
EV-D68-220	95	重鎖	GGGGTGCACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGATACAG CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTTTGAAATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTACTA GTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTCAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGGAACCTCACTGTCTC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTA TACTGTGCGAGAGACGTGAGGGATTGTAGTGCTCTTACG TGCCCCCGAAGGGGAGATGCTTTTGATTTCTGGGGCCGTG GGACAAGGGTCACCGTCTCTTCA
	96	軽鎖	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTAC CCTTGGACAGTCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAA AGCCTCGTATACAGTGATGGAACACCTACTTGAATTGGTT TCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT AAGGTTTCTAACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCA GCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAG CAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGGTACACACTGGCCTCGCACTTTCGGCCCTGGGACCA AAGTGGATATCAAA
EV-D68-221	97	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCAGTTTCAGTGTCTATCCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATAAGTAGTA GTAGTCGTTACATATCCTACGCAGACTCACTGAGGGGTGCG AATCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGTGAAAGTCGGGGGTAGCAAACACCAATACTACT TTGACTACTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCCTC A
	98	軽鎖	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAACGTCTGGGATCC CCGGGCAGACGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGGTC CAACATCGGAAGTTATACTGTAACTGGTACGAGCAACTCC CAGGAACGGCCCCCAAACCTCGTCATCTTTAATAATAATCAG CGTCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT CTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTC TGAGGGTGAAGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAC AGCCTGAATGGTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGA CCGTCCTA

10

20

30

40

50

EV-D68-224	99	重鎖	CAGGTTCAAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGGC CTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTTCTGCAAGGCTTCTGGTTA CACCTTTACGAATTATGACATCATCTGGGTGCGACAGGCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGGCTGGATCAGCACTTA CAATGGTAACACAACTATGAACAGAACCTCCAGGGCAGA GTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTA CTATTGTGCGAGAGAGCGTTGTAGTACTAGTACCTGCTATA GTCGTTATGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
	100	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTGGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTAATATCTATTTGAATTGGTATCAGCAAAAACCGGG GAAAGCCCCTAAGGTCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCCGTGGCAGTGGGTCTGG GACAGATTTTCATCCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ACTTTGCAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGGTCCCCT CGGACGTTCCGGCCAAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA
EV-D68-225	101	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGCACAG CCTGGAGAGTCCATGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAT TCACCTTAAGTCGTTATGAAGTGAAGTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTAGAGTGGCTTTTCATACATTAGCAGT GGTGGTCTTCCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCC GATTCACGATCTCCAGAAACAGCGCCGAGAACTCACTGGA ACTACAAATGTCCACCCTGAGGACCGAGGACACGGCTGTT TATTATTGTATGAGAGAGGGTCTTACTTATTATGATAGTACT ATTTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCGCTCTCCTCA
	102	軽鎖	CAGAATGTGCTGACTCAATCGCCCTCTGCCTCTGCCTCCCT GGGAGCCTCGGTCAAACCTCACCTGCACTCTGAACAGTGGG CACAGCAGATACGCCATCGCATGGCATCAACATCAGCCAC AGAGGGGCCCTCGGTTCTGATGAAGATTAATAGTGATGG CAGACACATCAGGGGGGACGGCATCTCTGATCGCTTCTCA GGCTCCGCCTCTGGGGCTGAGCGTCATCTCACCATCTCCA GCCTCCAGCCTGAGGATGAGGCTGACTATTATTGTCAGAC CTGGGGCACTGGCTTTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAA ACTGACCGTCCTA
EV-D68-227	103	重鎖	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTGATGAATATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGTT CCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGA ATGGTGGTAGCAAAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGATAACGCCAGGTATTCCCTGTCTC TGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACGGCCTTATAT TACTGCGCAAAAGATGATTACGAGGGGGCTGGTTTTGATAT CTGGGGCCAAGGGACAGTGGTCAACGCTCTCTTCA
	104	軽鎖	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCTACTTAGGCTGGTACCAACAGAAATCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG AAGATTTTGCAATTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGG CCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

10

20

30

40

50

EV-D68-228	105	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCT ATTTAATTAGCAATGGTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAG TCCCCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATT ATACTAGGGACACCTACTACAACCTGGTCCCTCAAGAGTCGA ATCACCATATCAGTGGACACGTCCAAGAAACAGTTCTCCCT GAAGTTGTATTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCGTCTAT TACTGTGTGAGACATGAGGGTTCTTGCAATGATGGAAGCT GTTACGGCTCGTTTCGTTGACAACCTGGGGCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCTCA
	106	輕鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC TG TAGGAGACAGAGTGACCCTCACTTGTGCGGGCAGTCAG GATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG GGACACATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTGACAGTTTCAT CACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
EV-D68-231	107	重鎖	GAGGTGCAACTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGATT TCACCTTCAGCAGCTACACCATGGCCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTGAATGGGTCTCATCTATTAGTGGT GATGGTGTAGCACAAAAACGCAGACTCCGTGAAGGGCC GATTCTCCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTTTTT CTGCAACTGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTTT ATTACTGTGCGAGGGGGGGGACCTTCCATAACTGGTACTT CGATCTCTGGGGCCGTGGCGTCTTGGTCACTGTCTCCTCA
	108	輕鎖	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGT CTCCAGGGGAAACAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTATTGGCGACAACCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCACAA GGGCCACTGATTTCCAGCCAGGTTCCGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT GAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAAACG GCCTCGGACGTTCCGCCGAGGGACCAAGGTGGAAGTCAG A
EV-D68-234	109	重鎖	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCCGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGG TAGTGGTGGTAGCACAAACTACGCAGACTCTGCGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTA TATTATTGTGCGAAAGGGACCATTACTTACTCCTACTACTAC ATGGCCGTCTGGGGCAAAGGGACCAACGGTCACCGTCTCCT CA
	110	輕鎖	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGGCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAGA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGACTTCACGCTCACCATCGGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA

10

20

30

40

50

			CCTCAATAACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA A
EV- D68- 235	111	重鎖	CAGGTCCAGGTGGTACAATCTGGGGCTGAGATGAGGAAGC CTGGGGCCTCAGTGAGGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATA CAGGCTCACTGATTTACCCTTGCACTGGGTGCGACAGGCT CCTGGAAAAGGGCTTGAATGGATTGGATTTGTTGATCTTGA AAAGCGCGAAATCATCTACGCACAGAAATTCAGGGCAAA GTCACCATAACCGAGGACACATCTGCAGACACCGCCTACA TGGAACTGAACAGCCTGCGATCTGAAGACACGGCCGTCTA CTACTGTGCAACTTGGGGAATTGAGGTGGTGAATGGGAGG GACGAATTCTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCT CCGTCTCCTCA
	112	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAGACGGCCAGGATCACATGCTATGCAGATGTGTT GTCAAAGCAATATACTTACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCC AGGCCCCTGTGTTGGTGATATATAAAGACACTGAGAGGCC CTCAGGGATCCCTGAGCGATTTGCTGGCTCCAGCTCAGGG ACAACAGTCACCTTGATCATCAATGGAGTCCGGACAGAGG ACGAGGCGTACTATTACTGTCAATCAGCCGACACCAGAATT ACGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGTCCGTCCTA
EV- D68- 236	113	重鎖	CAGGTCCAGGTGGTCCAGTCTGGGGCTGAGATGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGAT ATAGTCTCAGTGATTTACCCTTGCACTGGGTGCGACAGGCT CCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTTTTGATCCTAT AAACGGTGAAATCATCTACGCACAGACATTCCAGGGCAAA GTCACCATAAGCGAGGACACATCGATAGACACAGCCTACA TGGAACTCAACAGCCTGCGATCTGAAGACACGGCCGTGTA CTATTGTGCAACTTGGGGAGTTGCGGTGGTGAGTGGGAGA AGGGACTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCA
	114	軽鎖	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCC CAGGACAGACGGCCAGGATCACATGCTATGCAGCTGTATT GTCAAACCAATATACTTACTGGTATCAACAGAAGCCAGGCC AGGCCCCTGTTTTGGTGATATATAAAGACACTGAGAGGCC CTCAGGGATCCCTGAGCGATTTGCTGGCTCCAGCTCAGGG ACAACAGTCACCTTGATCATCAATGGAGTCCGGACAGAGG ACGAGGCTTACTATTACTGTCAAACAGCCGACACCAATAT ACGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGTCCGTCCTA
EV- D68- 241	115	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG GCTCCATCACCAGTGGTGATTACTACTGGAATTGGATCCGC CAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATC TATCACAGTGGGACCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGA GTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACAGGTTT TCCCTGAAGTTGTCTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCG TGTATTTTTGTGCCAGAGCCTACGCTTATGAATTTTGGAGC GGTTACCCTAACTGGTTTCGACCCCTGGGGCCTGGGAACCC TGGTCACCGTCTCATCA
	116	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG CGCATTAGTACCTATGTAAATTGGTATCAGGTGAAAGCAGG GACAGCCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCGTCCAGTTTG CAAACCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACCTCTACCATTGTCAGTCTACAACCTGAA

10

20

30

40

50

			GATTTTACAACCTACTTCTGTCAACAGAGTTACAGTCCCC GTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
EV- D68- 247	117	重鎖	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGTAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGT TCATCTTCAATAGATATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGCAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCTCTTATATCATATG ATGGAATTAATAAATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGA TTCTCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGTACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTCAGAGCTGAGGACACGGCTATCTTT TACTGTGCGAGAGGACTAGGATATTGTAGTGGTACCGGTG GTAGCTGTACACCCTTTGAATATTGGGGCCAGGGAATCCT GGTCACCGTCTCCTCA
	118	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCAT CTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA GAGCATTAAAGAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGAATGCCCTAAGCTCCTCATCTATGGCGCATCCAATTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTGCTCTCTCCATCAGCAGTCTGGAACTGAA GATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTGACAGTGCCCC TCCCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGTTCAAA
EV- D68- 254	119	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAACAGCGGGGCGCAGGGCTGTTGAAG CCCTCGGAGACCCCTGTCCCTTACCTGCGAAATCTATGGTG CATCCCTCAATGATTACGACTGGACCTGGATCCGCCAGCC CCCAGGGAAGAGGCTGGAGTGGATTGGGGTCATCAATCGT CGTGACACTGTTGACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGGG TCACCCTCTCACTTGACACGTCCAAGAACCAACTTTCCCTG AGTCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATT ACTGTGTGAGAGTCCACGTCGGGGCTTTGAAGGGTCTTT CGGATTTTGTGATGATACTGCCTGCCGCTACGGGCATACC TGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA
	120	軽鎖	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCATC TGTTGGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGTATTAGAGATTATTTAAATTGGTATCAACAAAGACCAGG GAAAGCCCCTAAAGTCCTGATCTTTGCTGGTTCCCGTTTGG AAAGTGGGGTCCCATCGAGGTTTAGAGGCCGTGGATCTGG GACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCGATCTGCAACCTGAG GATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACCTTACACCT CCGACATTTCGGCCAAGGGACCAACCGTCGATATCAAA
EV- D68- 260	121	重鎖	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAAC CCACAGAGACCCCTACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGATT CTCACTCCGCAATGGTAGAATGGGTGTGAGCTGGATCCGT CAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGACACATTT TTGCGAGTGACGAAAAATCTTACAGTACATCTCAGAGGACC AGGCTCTCCATCTCCAGGGACACCTCCAAAAGCCAAGTGG TCCTTAGCATGACCGACATGGACCCTGTGGACACAGCCAC ATATTACTGTGCGCGGATTTTGAAGTTTGGGACAAATGAGGG CCGCATACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGT CCCCGTCTCCTCA
	122	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAGTGGCCC CAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAATCAACAT TGGAATTAGAACTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCCCCATGTTGGTCATCTATTATGATAGCGACCGGC CCTTAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGG

10

20

30

40

50

			GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGG GGATGAGGCCGACTATTACTGTGAGGTGTGGGATAGTAGT AGTGATCATGTTGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG CCCTA
EV- D68- 266	123	重鎖	CAGGTGCACTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAG CCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTTTCTGGAT TCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGC TCCGGGGAAGGGAAGTGGAGTGGCTTTCATACATTAGTAGT AGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTATGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAGGAACCTCACTCTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCTTTT ATTACTGTGCGGGGTCAAAGGTTGGCTATACTACTGGTCG AAGGAACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTG GTCACCTGTCTCCTCA
	124	軽鎖	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTC CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAAGCAG TGACGTTGGTGCTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGC ACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGAGGTCACT AAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCTCTCTGACCGTCTCTGGGCTCCA GGCTGAGGATGAGGCTGATTACTGCAGCTCATATGCA GGCAACAACAATTTAGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGA CCGTCCTA
EV- D68- 269	125	重鎖	CAGGTGCAGTTGCTGCAGTCTGGGTCTGAGGTGAGGAAAC CTGGGGCCTCAGTGAACATTCAGTGAAGGCATCTGGATT CACTTTCACCGACTTCTATTTACACTGGGTGCGACAGGCC CTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGATAATCAACCCTGA AACCGGTGAGACAACCTACTCACAGAAGTTTCAGGGCAGA GTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGTGTAGTGAATC TGGAAGTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATATA TTACTGTGCGAGAGATCTCGTTGTCTAGTCCCCGTTGAAA TGCTCGGCGTGCCTTTGACATTTGGGGCCAAGGATTAT GGTCACAGTCTCCTCA
	126	軽鎖	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCC CAGGACAGACGGCCAGGATTCCCTGTGGGGGCAACAACAT TGAACGTAAAAGTGTCCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGC CAGGCCCCCTGTGTTGGTCGTCTATGATGATACTGTCCGGC CCTCAGGTATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCCG GAGCACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGGAGCCGG GGATGAGGGCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGACAGCACC ACTGACCATGGGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCCTA
EV- D68- 271	127	重鎖	CGGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTGCACTTCTGGAT ACATTTTCAGCGCCTACTACATCTATTGGGTGCGACAGGCC CCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGACGGATGAACGCTA AGAGTGGAGGCGCAAACACTGCACAGCAGTTTCAGGGCAG ACTCACCATGACCAGGGACATGTCCGTGAGCACAGCCTAC ATGGAAGTGAAGAGGCTGCGATCGGACGACACGGCCGTC TATTATTGTGCGAGAGACTATAGGGATGACTACATGTGGGG GAGTTATCGGCCTTTAGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCA
	128	軽鎖	GAAGTTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCTCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG

10

20

30

40

			AGTGTTAGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACACAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAG GGCCGCTGGCATCCCAGCCAGGTTCCGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTTCTGTGAGCAGCGTAGCAACGG GCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCGAGATCAAA
--	--	--	--

【 0 4 2 2 】

(表 2) 抗体可変領域のタンパク質配列

50

クローン	SEQ ID NO:	鎖	可変配列
EV-D68-37	129	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYALHWVRQ APGKGLDWVAVISYDARNSSYYTDSVKGRFTISRDN SKNTL FLQMNSLRADDTAVYYCARPTLPYSNNWYAPEYWGQGT LTVSS
	130	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYASWYQQKSG QAPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGSSSGTMTALTISGAQVED ESDYCSSTDSSGNPVLFGGGTKLTVL
EV-D68-40	131	重鎖	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYAMAWVRQ APGKGLQWVSSISGNGNGRSYADSLKGRFTTSKDL SKYTL YLQMNNLRPEDTAIYYCAKVVRIAAVLYYFDYWGPQTQVT VSS
	132	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSTYLAWYQQKP GQAPRLIYEASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLISSLEPED FAVYHCQQRSSWPITFGQGTRLEIE
EV-D68-41	133	重鎖	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQ ALGKGLEWVSSISGSGGLTYFAHSVKGRLTISRDN SKNTLY LQMSSLRAEDTAVYYCARVKSTTGTTALVFDIWGQGTMTV VSS
	134	軽鎖	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSSSYPSWYQ QTPGQAPRTLISINRRSSGVPDRFSGFILGNKAALTIRGAQ ADDESYYCGLYMGSGIWIFGGGTKLTVL
EV-D68-43	135	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFINYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISNDGSYNYDADSVKGRFTISRDN SKNKV YLQMNSLRPEDTAVYFCAKDKHGDFDYGVVDVWGQGTTV TVSP
	136	軽鎖	DVQMTQSPSSVSASIGDRVITITCRAGQGIISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSGTDFTLISSLQPE DFGTYYCQQADSFPRTFGQGTKVEIK
EV-D68-46	137	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSNTYAPFVNGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRADDTAVYYCARRRPGSFPGLCDYWQGQALVT VSS
	138	軽鎖	DIQMTQSPSTMSASVGDRTITCRASQSISKWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASTLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPD DFATYYCQQHNSYSYTFGQGTKVEIK
EV-D68-48	139	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGSFSRLTIHWVRQA PGQGLEWMGGHIPIFGTTNYALKFQGRVTITADKTTSTAYM ELSSLRSEDTAIYYCARMYSGHDGVDVWGQGT LTVSS
	140	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQH KP GQAPRLIYDASNRAKGIPARFSGSGSGTDFTLISSLEPED FAVYYCQQRSTWPPGMFGQGT RVEIK

10

20

30

40

50

EV-D68-71	141	重鎖	QLQLQESGPGLVKHSETLSLTCTVSGGSISSGFYYWGWIR QPPGKGLEWIGTIYDSGRTYDNPSLKSRTISADTSKKQFS LTLRSATAADTAVYFCARHLTHLYGDYVTPDALDIWGQGT MVTVSS
	142	軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFRGSGSGTDFLTISRLEP EDFAVYYCQQYSNSRLTFGQGTKEIK
EV-D68-72	143	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYSMNWVRQ APGKGLEWISYISSGSSNIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLN QMSSLRDEDTAVYYCARAHGRIVNSGVVISRFDWPWGQGL VTVSS
	144	軽鎖	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQL HPGKAPKLMIFEVYRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYFCSSYTTSNTLVVFGGGTKLTVL
EV-D68-74	145	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRTSGYFTAYYMHWVRQ APGQGPPEWMGRINPSSGGAQYAQKFQGRVTMTRDTSIST TYMTLSGLTSDDTAVFYCARMGCRSDRCYSTNYNFDQWG QGTSLTVSS
	146	軽鎖	SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIGTKSVHWYQQKPG QAPVLVVSNDSDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDSGIDVVFGGGTKLTVL
EV-D68-75	147	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTISPYGMNWVRQ APGKGLEWVSFISSSSRYTYADSVKGRFTISRDNANKNSLS LQMNSLRAEDTAVYYCARERGHSTSSSYFDSWGQGTSLT VSS
	148	軽鎖	SYVLTQPPSVSLAPGKTARITCGGNNIGTKTVSWYQQKPG QAPVLVMYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTINRVEAG DEADYYCRVWDSDDHRVFGGGTKLTVL
EV-D68-76	149	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWISWVRQ APGKGLEWVGRIQTKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLKTEDTALYYCSTGPIYYDTSGYPQPFYWG QGTSLTVSS
	150	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKP GQSPVLVIYQDTRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAM DEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
EV-D68-80	151	重鎖	EVQMVESGGGLVKPGGSLRLSCSVSGFDFSRVTMNWFR QAPGEGLKWVSSISSTSLYTFYADSVKGRFSISRDNAAQGS LSLQMSSLRPEDTAVYYCARVVGPAELDYWGQGVLTVS S
	152	軽鎖	VTQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGVDLGWFQQR GKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFGSGSGTFFTLTISSLQPE DFTTYFCLQDYNYPWTLGQGTTVGVK

10

20

30

40

50

EV-D68-84	153	重鎖	QVHLVQSGSAVRKPGASVKVSCASGYTFTDYYIHWWVRQ APGQGLEWMGWINPKTGGSNYTQRFQARVTMTWDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCARAGRNGYDYWGQGLTVTVSS
	154	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSADALPKQYAYWYQQKPG QAPVLMYQDTERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAED EADYYCQSGDSSGTYLVFGGGTKLTVL
EV-D68-85	155	重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKFRNYAMTWVRQ APGKGLEWVSTITSGGSTHEYADAVKGRFIISRDNSKNTLYL QMNSLRADDTAVYYCTVPWGNYN DYVSDYWGQGLTVPV SS
	156	軽鎖	EVVLTQSPATLSLSPGQRATLSCRASQRVGNLAWYQQK PGQAPSLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIISESE DFAVYYCHQHSTWPRGTFGQGTRLEIK
EV-D68-88	157	重鎖	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYPMHWWVRQ APGKGLEWVALISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL FLQMNSLRAEDTAVYYCARHFLPYSSSWYQGFNYWGQGI LTVSS
	158	軽鎖	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIATNYVQWYQQR PGSSPTPIIFEDSQRPSPGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLR TDDEADYYCQSYDNSNRAVVFVFGGGTKLTVL
EV-D68-89	159	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCEASGFLFSRYGMHWVR QAPGKGLDWVAVISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQVNSLRVEDTAVYYCARGVPYGDTLTGLVYWGQGLTV TVSS
	160	軽鎖	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGTIASNYVQWYQQR PGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGL KTEDEADYYCQSYDNSDRVFGGGTKLTVL
EV-D68-95	161	重鎖	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLRNARMGVSWIR QPPGKALEWLAHIFSNDEKSYNTSLKSRLSISKDTSKSQVV LTMTSMDPLDTATYFCARLLVAGTFLPSHYFDYWGQGILVT VSS
	162	軽鎖	SYVLTQPPSVSVTPGKTARITCGGNIGLKSVFWYQERPD QAPVVVIYYDSARPSGIPERISGSKSGNTATLTITRVEAGDE ADYFCQVWDSSRNHPVFVFGGGTKLTVL
EV-D68-97	163	重鎖	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQ APGKGLEWVSYISSSSSTIQYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCTRQVGADFSGRGFDYWGQGTLLT VSS
	164	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTATITCFGDKLGDKYACWYQQKPG QSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMD EADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL

10

20

30

40

50

EV-D68-98	165	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKFSVYALSWVRQ APGKGLEWISYISSSGSTIYYSDSVKGRFTISRDNVGNLFLV QMNSLRAEDTGIYYCATARHITNDGFDIWGQGTMVIVSS
	166	軽鎖	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISRFLAWYQQKPG KAPKLLIYSASTLQRGVPSRFSGSGFGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQLNSHPRMFTFGPGTTVDIK
EV-D68-105	167	重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYLISNGYYWGWRQ PPGKGLEWIGSIYHTRSTYYNPSLKSRSVSISVDTSKNRFSL RLRSVTAADTAFFYYCARGPGHCHYGDDDCYAYYFDQWGQ GTPVTVSP
	168	軽鎖	DIQMTQSPSSVSSSVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQNP GKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPE DFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVDIK
EV-D68-110	169	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSRFAISWVRQ APGQGLQWMGGILPIFGTANYAQKFQGRVTITADTSTSTA YMEISSLRSEDTAVYYCARSLPYCTNDVCSNQNTFDYWG QGTLVTVSS
	170	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQAARITCSGDALPKQYAYWYQQKP GQAPVLVIYEDNKRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAE DEADYYCQSADSSGTYVVFGGGTKLTVL
EV-D68-111	171	重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIR QPPGKGLEWIGIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAFFYYCASRYGDPIDNWFDPWGQGTLLTV SS
	172	軽鎖	SYVLTQPPSVSVTPGKTARITCGGNNIGLKSVMFYQERPD QAPVVVIYYDSARPSGIPERISGSKSGNTATLTITRVEAGDE ADYFCQVWDSSRNHPVFVGGGTKLTVL
EV-D68-114	173	重鎖	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFSFYGMTWVRQ APGKGLEWVSSISGTGATRNCAADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMDSLVRDDTAFFYCVRRFPMTTVTSFDSWGQGTLLTV VSS
	174	軽鎖	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNFVSWYQ QHPGKAPKLMIFDVTGRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTIAG LQAEDEADYYCGAYAGFNALFGGGTKLTVL
EV-D68-116	175	重鎖	EVQLVQSGGGLVVRPGGSVRLSCVASGFPFNMFWMGWVR QTPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFAISRDNKNS LFLQMDSL SVGDTAIYYCVREGVRRVVRSTGYFDWVGQ GQLVTVSS
	176	軽鎖	SYELTQPPSMSVSPGQTARITCSGDAVPIKYVYWYQQRSG QAPVLVIYEDDRRPSGISERFSGSSSGTTATLTITGAQVED EGDYCYSTDSSGYQRAFGGGTTLTVL

10

20

30

40

50

EV-D68-150	177	重鎖	RVQLQESAPGLVRPSETLSLTCSVSGGPISNGPYYSWIR QHPGKGLEWIGFIFYSGSTNYPNPSLRGRVTMAVDTSKNQF SLRLNSVTAADTAVYYCARHVVTASGWFDPWGQGLTVV SS
	178	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGTDLAWYQQKP GQAPRVLIYDAFKRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSEPED FAVYYCQQRSRWPPPYTFGQGTKLEIK
EV-D68-151	179	重鎖	RVQLQESAPGLVRPSETLSLTCSVSGGPISNGPYYSWIR QHPGKGLEWIGFIFYSGSTNYPNPSLRGRVTMAVDTSKNQF SLRLNSVTAADTAVYYCARHVVTASGWFDPWGQGLTVV SS
	180	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGTDLAWYQQKP GQAPRVLIYDAFKRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSEPED FAVYYCQQRSRWPPPYTFGQGTKLEIK
EV-D68-152	181	重鎖	QVHLVESGGGVVQGRSLRLSCADSGVTFSDNALYWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSSRYADSVRGRFTISRDNKSDL YLQMNRLRAEDTAIYYCARVTADYESSGKVFVGQGLV VSS
	182	軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGRVSITCRASQSVRSWLAWYQHQP GKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQAD DFATYYCQYQTFSWTFGQGTVEIK
EV-D68-154	183	重鎖	QVQLQESGPALVKPSETLSLTCTVSGGSISDHYWSWIRQP PGKGLEWIGIYITSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKKQFSLNL RSVTAADTAVYYCARSLQETVIRFYHYMDVWGKGTIVIS S
	184	軽鎖	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLQSDGYSYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSRASGVDRFSVIGSGTYFTLKISR VEAEDVGVYFCMQALQTPWTFGQGTKVEIK
EV-D68-155	185	重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVAGGSIGDYHWNWIRQP AGKGLEWIGRIHSSGNTDYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCARQNVFDIWGQGTMTVSS
	186	軽鎖	DIVMTQSPDSLALSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDRFSVIGSGSETDFTLTIS SLQAEDVAVYFCQQFYTTPLTFGGGKVEIK
EV-D68-156	187	重鎖	QVQMQUESGPGLVKASETSLTCSVSGISINNYWSWFRQP PGKGLEWIGYVYSTGSSKYNPSLERRATMSVDTSNNFSL RLTSVTTADTAVYYCARGSMPIHWGQGLLVTVSS
	188	軽鎖	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIEYVYVYQQV PGTAPKPLVYRNDQRPSPGVDRFSVIGSGSGTSASLVISGLR TEDEAAYCAAWDDSLKAPVFGAGTKVAVL
	189	重鎖	EVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGITFSNAWMWVRQA PGKGLEWVGRIESKIDGGTIDYATPVKGRFTISRDDSKNTL

10

20

30

40

50

EV-D68-157			YLQMNSLKTEDTAVYYCTTDQGGYYDRSGYWVVGNHFDYWGQGILVTVSS
	190	軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGLRVTISCTGSSTNIGAGYDVHWYQH LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ ADDAADYYCQSYDRSLSTYVFGTGKVTVL
EV-D68-158	191	重鎖	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQ APGKGLEWVSGISGTTGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTV HLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSHSMIVVDHAFDIWGQGTMTVSS
	192	軽鎖	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGTKSVHWYQQRPG QAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDSYNVHYVFGTGKVTVL
EV-D68-159	193	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYIMTWVRQA PGRGLEWVSSISTSSVYTFYADSLKGRFTISRDN AKNSVYL QMNSLRADDTAVYYCAREEGFRAYNLYWGQGLTVTVSS
	194	軽鎖	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIEYNVYVYQKF PGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEGDYYCAAWDDILSGVFGGGTKLTVL
EV-D68-160	195	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSQKLSCAASGFTFSRFGMHWVR QAPGKGLEWVAVISFDGSNRYADSVKGRFTITRDNSKNT LYLQMNNLRPEDTAVYYCARDWDRLVRSAGVYWGQGTLSVSS
	196	軽鎖	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGGYNFVSWYQ QHPGKAPKLMIFDVIRRP SGVPGRFSGSKSGDTASLIISGL QAEDEADYYCCSYAGTYTWVFGAGTTLTVL
EV-D68-161	197	重鎖	QVHLQESGPRLVKPSETLSLTCTVSGGSVSTATYYWSWIR QSPGRGLEWIGIYSSGNTNYPNPSLKSRTISLDTPNQLS LTLSVTAAADTAIYYCERRLRILSIERNYYAMDVWGQGTPTVTVSS
	198	軽鎖	EVVLTQTPGTLSLSPGEGATLSCRASQRVNNYLAWYQQ RAGQAPRLLIFGASN RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIRKLE PEDFAVYYCQQYGSPWTFGHGKVKEMK
EV-D68-162	199	重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVR QAPGRGLEWVAVISYDASKKYHADSVKGRFTISRDS SKNT LFLQMNSLKPEDTAVYYCARDHVPPKDCSDGNCHSDYGM DVWGQGTTVTVSS
	200	軽鎖	DIQMTQSPSTMSASVGDRTITCRASQSISKWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASTLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPD DFATYYCQQHNSYSYTFGQGKVEIK
	201	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSTNFAVHWVRQ APGQRLEWMGWINPGNRNTKYSHNFQGRVTITRDT SANT

10

20

30

40

50

EV-D68-163			AYMELSSLRSQDTAVYYCARLPIAAAGRGWFDWPWGQGT LTVSS
	202	軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVISTYLAWYQQR PQQAPRVLIVSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYFCHQYGSSPATFGQGKVEIK
EV-D68-164	203	重鎖	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYGMNWVRQ APGKGLEWVSYISSATTTFFYADSVRGRFTISRDNKNSLF LHMKSLRDEDTAVYYCARVYTMRLGASMDVWGHGTTVT VSS
	204	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGYTLAWYQK PQQAPRLLIYDSANRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE LEPEDFAVYYCQLRITWPIFTFGPGTKVDVK
EV-D68-165	205	重鎖	QVHLVQSGAEVKKSGASVKVCKTFGYTFTAYYMHWVRQ APGQGPPEWMGWINPISGGTNYAQKFQGRVSMTRDTSIS TAYMGLSRLRPDDTAVYYCARVKCSSANCYGNFDYWGQ GTLTVSS
	206	軽鎖	QSALTQPPSASGSPGESVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDADYYCCSYAGSNNLVFGGGTKLTVL
EV-D68-166	207	重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTNYRIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGGSDDTRYSPSLQGQVMTSVDKSI STAYLMWSSLKASDTAMYYCARQTTQNSGYDRWFD SWGQGTHTVTVSS
	208	軽鎖	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSTSSIGSNIVN WYQHLPGTAPKLLIYINNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTK LTVL
EV-D68-181	209	重鎖	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRHTMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYHADSVKGRFTISRDSK STLYQMNSLRAEDTAVYYCAISVPLLRFLWFQHPFD FWGQGTLVTVSS
	210	軽鎖	EIVMTQSPASLSVSPGERVTLSCRASQSVGSTLAWYQ HKPQQAPRLLISGASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLT ISLQSEDFAVYYCHQYINWPPWTFGQGKVEIK
EV-D68-183	211	重鎖	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNTYSMSWVRQ APGKGLEWVASISSTGSYIYNADSLKGRFTISRDNKNSLF LQMNSLRVEDTAVYYCVRFTMTTVTNFDSWGQGT LTVSS
	212	軽鎖	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYS YVSWYQQHHPGKAPKLMYDVYRRPSGVPGRFSGSKSGNTASLTVS GLQAEDADYYCCSHAGSHTWVFGGGTKVTVL
	213	重鎖	QLQVVASGGGVVQPGRLRLSCKASGFTFTNYGMHWVR QAPGKGLEWVAFISYDGGNKFYADSVKGRFTISRDN SRNT

10

20

30

40

50

EV-D68-185			VYLQMNSLRVADTAMYYCPKVIHPHYDSSGDDAFDIWQG GTMVAISS
	214	軽鎖	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCWASQSSISRNLAWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPAKFSGSGSGTDFTLTVSSLQSE DLAVYYCQQYSKLPITFGQGTRLEIK
EV-D68-200	215	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYSMSWVRQ APGKGLEWVSYISGSGGDIYYADSVKGRFTISRDNARNLSL LQMNSLRADDTAVYYCARGLVATTGTRYFDYWGQGTLLV TVSS
	216	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQRP GQAPRLLIYDASNRATGIPVRFSGSGSGTDFLTISLLEPED FAVYYCQQRSYWPPFTFGGGTKVEIK
EV-D68-208	217	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFRRFAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPILGRGKYAQKFQGRVRIADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARFISTASYVPGTFEDVWGQGTTLV TVSS
	218	軽鎖	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSETDFTLTISLLEPED VAVYYCQQRSDWPPGTFGQGTNVEIK
EV-D68-210	219	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRNYNINWVRQ APGKGLEWVSSISSTGSYIHYADLVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRVEDTAVYYCARMVRNTVTAFDYWGQGTLLVSVS S
	220	軽鎖	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQQ QPGRAPKLLIYEVIKRPSGVSDRFSGSKSGDTASLTISGLQ AEDEADYYCCSYGGNNSWMFGGGMTLTVL
EV-D68-219	221	重鎖	QVQVVQSGAEMKKPGASVKVCKVSGYRLIDPLHWVRQ APGKGLEWMGLFDPEKAEAIYSQKFQDKVTISEDTSIDTAY MELNSLRSEDTAVYYCATWGVVNGRRDYFDSWGQGT LTVSS
	222	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCYADVLSNQYTYWYQQKPG QAPVLVIYKDTERPSGIPERFAGSSSGTTLVINGVRAED EAYYYCQSADNTRITVFGGGTKLSVL
EV-D68-220	223	重鎖	GVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSFEMNWVRQ APGKGLEWVSYISTSGSTIYYADSVKGRFTISRDNARNLSL LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRDCSALTCPRRGDAFDFWG RGTRVTVSS
	224	軽鎖	DVVMTQSPLSLPVTLGQASISCRSSQSLVYSDGNTYLNW FQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQGTHWPRTFGPGTKVDIK
	225	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSSVYPMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSRYISYADSLRGRITISRDNAKNSLYL

10

20

30

40

50

EV-D68-221			QMNSLRVEDTAVYYCVKVGGSKHQYYFDYWGGSLVTVS S
	226	軽鎖	QSVLTQPPSTSGIPGQTVTISCSGSRNIGSYTVNWYEQLP GTAPKLVIFNNNQRPSPGVPDFRSGSKSGTSASLAISGLQSE GEADYYCAAWDDSLNGVVFVGGGTKLTVL
EV-D68-224	227	重鎖	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVFCKASGYTFTNYDIWVRQA PGQGLEWVGWISTYNGNTNYEQNLQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARERCSTSTCYSRYADYWGQGT LTVSS
	228	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINIYLNWYQQKPG KAPKVLIIYAASSLQSGVPSRFRGSGSGTDFILTISLQPEDF ATYYCQQSYRSPRTFGQGTEVEIK
EV-D68-225	229	重鎖	EVQLVESGGGLAQPGESMRLSCVASGFTLSRYEVNWVRQ APGKGLEWLSYISSGGPSIYYADSVKGRFTISRNSAENSLE LQMSTLRTEDTAVYYCMREGLTYDSTIWGGGTLVAVSS
	230	軽鎖	QNVLTQSPSASASLGASVKLTCTLNSGHSRYAIAWHQHQP QRGPRFLMKINSDGRHIRGDGISDRFSGSASGAERHLTISS LQPEDEADYYCQTWGTGFRVFGGGTKLTVL
EV-D68-227	231	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDEYAMHWVRQ VPGKGLEWVSGISWNGGSKGYADSVKGRFTISRDNARYS LSLQMNSLRTEDTALYYCAKDDYEGAGFDIWGGGTVVTVS S
	232	軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLGWYQQKS GQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGTDFLTISLLEPED FAIYYCQQRSNWPITFGQGRLEIK
EV-D68-228	233	重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYLISNGYYWGWIQR SPGKGLEWIGSIYYTRDTYYNWSLKSRTISVDTSKKQFSLK LYSVTAADTAVYYCVRHEGSCNDGSCYGSFVDNWGGGTL VTVSS
	234	軽鎖	DIQMTQSPSSVSASVGDRTLTLCRASQDISSWLAWYQQK PGKAPKLLIIYAASSLQSGVPSRFRGSGSGTHFTLTISLQPE EDFATYFCQQADSFITFGGGTKVEIK
EV-D68-231	235	重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFTFSSYTMWVRQ APGKGLEWVSSISGDGVSTKNADSVKGRFSVSRDNSKNTL FLQLNSLRAEDTAFYYCARGGTFHNWYFDLWGRGVLTV SS
	236	軽鎖	EIVMTQSPATLSVSPGETATLSCRASQSIGDNLAWYQQKP GQAPRLLIISGASTRATDFPARFRGSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQYKNWPRTFGRGTKVEVR
	237	重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQ APGKGPEWVSGISGSGSTNYADSAKGRFTISRDNKNTL

10

20

30

40

50

EV-D68-234			YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTITYSYYYMAVWGKGTTVTVSS
	238	軽鎖	EIVLTQSPGTLISLSPGERGTLSRASQSVSRSSYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCQYGTSTITFGGGTKVEIK
EV-D68-235	239	重鎖	QVQVVQSGAEMRKPGASVRVSCVKVSGYRLTDLPLHWVRQAPGKGLEWIGFVDLEKREIIYAQKFQGKVTITEDTSADTAYMELNSLRSEDTAVYYCATWGEVVGNGRDEFFDSWGQGTLVSVSS
	240	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCYADVLKQYTYWYQQKPGQAPVLVIYKDERPSGIPERFAGSSSGTTVTIINGVRTEDEAYYYCQSADTRITVFGGGTKLSVL
EV-D68-236	241	重鎖	QVQVVQSGAEMKKPGASVKVSCVKVSGYSLSDLPLHWVRQAPGKGLEWMGLFDPINGEIIYAQTFQGKVTISEDTSIDTAYMELNSLRSEDTAVYYCATWGVAVVSGRRDYFDSWGQGTLVTVSS
	242	軽鎖	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCYAAVLSNQYTYWYQQKPGQAPVLVIYKDERPSGIPERFAGSSSGTTVTIINGVRTEDEAYYYCQTADTKYTVFGGGTKLSVL
EV-D68-241	243	重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITSGDYWNWIRQPPGKGLEWIGYIYHSGTTYNP SLKSRVTISVDTSKNRFSLKSSVTAADTAVYFCARAYAYEFWSGYPNWFDPWGLGLTLTVSS
	244	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISTYVNWYQVKA GTAPKVLIIYAASSLQGTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIVSLQPEDFTTYFCQSSYPWTFGQGTKVEIK
EV-D68-247	245	重鎖	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGIFINRYAMHWVRQAPGKGLEWVALISYDGINKYYADSVKGRFSISRDN SKSTLYLQMNSLRAEDTAIFYCARGLG YCSGTGG SCTPFEYWGQGLTVTVSS
	246	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKYLNWYQQKPGNAPKLLIYGASNLQGTGVPSRFSGSGSGTDFALSISSELEDFATYYCQSDSAPPTFGGGTKVEFK
EV-D68-254	247	重鎖	QVQLQQRGAGLLKPSETLSLTCEIYGASLNDYDWTWIRQPGKRLEWIGVINRRD TVDYNPSL KSRVTLSDTSKNQLSLSLSSVTAADTAVYYCVRVPRRGFEFSFGFCDDTACRYGHTWFD PWGQGT LTVTVSS
	248	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI RDYLNWYQQRP GKAPKVLIFAGSRLESGVPSRFRGRGSGTEFTLTISDLQPEDFATYYCQQSYLTPPTFGQGT TVDIK
	249	重鎖	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLRNGRMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFASDEKSYSTSQRTRLSISRDTSKSQVV

10

20

30

40

50

EV-D68-260			LSMTDMDPVDATATYYCARILKFGTMRAAYYFDYWQQGALVPVSS
	250	輕鎖	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGINIGIRTVHWWYQQKPGQAPMLVIYYDSRPLGIPERFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTAL
EV-D68-266	251	重鎖	QVHLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSMKGRFTISRDNARNSLYLQMNLSLRVEDTAFYYCAGSKVGYTTGRRNWWYFDLWGRGTLVTVSS
	252	輕鎖	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGNNNLVFGGGTKLTVL
EV-D68-269	253	重鎖	QVQLLQSGSEVRKPGASVNIHCKASGFTFTDFYLHWVRQAPGQGLEWMGIINPETGETTYSQKFQGRVTMTRDTSTSVVNLEVRSLRSEDTAIYYCARDLVVVVPVEMSRRAFDIWGQGIMVTVSS
	254	輕鎖	SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIERKSVHWWYQQRPQQAPVLVYYDDTVRPSGIPERFSGSNSGSTATLTISRVGAGDEGDYYCQVWDSTTDHGVFGGGTKLTVL
EV-D68-271	255	重鎖	RVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQTSGYIFSAYYIYWVRQAPGQGLEWMGRMNAKSGGANTAQQFQGRLTMTDRDMSVSTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYRDDYMWGSYRPLDYWGQGTLVTVSS
	256	輕鎖	EVVLTQSPATLSLSPGERASLSCRASQSVSGYLAWYQHKGPGAPRLLIYDASNRAAGIPARFRGSGSGTDFTLTISSELEPDFAVYFCQQRSNGLTFGGGTVKVEIK

【 0 4 2 3 】

(表 3) CDR重鎖配列

10

20

30

40

50

クローン	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
EV- D68-37	GFIFSRYA (257)	ISYDARNS (258)	ARPTLPYSNNWYAPEY (259)
EV- D68-40	GFSFSSYA (260)	ISGNNGNR (261)	AKVVRIAAVLYYFDY (262)
EV- D68-41	GFTFSNYA (263)	ISGSGGLT (264)	ARVKSTTGTTALVFDI (265)
EV- D68-43	GFTFINYG (266)	ISNDGSYN (267)	AKDKHGDYFDYYGVVDV (268)
EV- D68-46	GFTFSSYG (269)	ISYDGSDN (270)	ARRRPGSFPGLCDY (271)
EV- D68-48	GGSF SRLT (272)	HIPIFGTT (273)	ARMYSGHDGVVDV (274)
EV- D68-71	GGSISSGFYY (275)	IYDSGRT (276)	ARHLTHLYGDYVTPDALDI (277)
EV- D68-72	GFTFTTYS (278)	ISSGSSNI (279)	ARAHGRIVNSGVVISRFDP (280)
EV- D68-74	GYTFTAYY (281)	INPSSGGA (282)	ARMGCRSDRCYSTNYNFDQ (283)
EV- D68-75	GFTISPYG (284)	ISSSRYT (285)	ARERGHSTSSSYFDS (286)
EV- D68-76	GFTFSNAW (287)	IQTKTDGGTT (288)	STGPYYYDTSGYPQPFDY (289)
EV- D68-80	GFD FSRYT (290)	ISSTSLYT (291)	ARVVGPAELDY (292)
EV- D68-84	GYTFTDYY (293)	INPKTGGS (294)	ARAGRNGYDY (295)
EV- D68-85	GFKFRNYA (296)	ITSGGST (297)	TVPWGNYN DYVSDY (298)
EV- D68-88	GFIFSRYP (299)	ISYDGNK (300)	ARHFLPYSSSWYQGFNY (301)
EV- D68-89	GFLFSRYG (302)	ISYDGNKK (303)	ARGVPYGD TLTGLVY (304)
EV- D68-95	GFSLRNARMG (305)	IFSNDEK (306)	ARLLVAGTFLPSHYFDY (307)
EV- D68-97	GFTFSTYS (308)	ISSSSTI (309)	TRQVGADFSGRGFDY (310)
EV- D68-98	GFKFSVYA (311)	ISSSGSTI (312)	ATARHITNDGFDI (313)
EV- D68- 105	GYLISNGYY (314)	IYHTRST (315)	ARGPGHCYGD DDCYAYYFDQ (316)
EV- D68- 110	GGTFSRFA (317)	ILPIFGTA (318)	ARSLPYCTNDVCSNQNTFDY (319)
	GGSISSGDYY	IYYSGST	ASRYGDP IGDNWFDP

10

20

30

40

50

EV-D68-111	(320)	(321)	(322)
EV-D68-114	GFRFSFYG	ISGTGATR	VRRFPMTTVTSFDS
	(323)	(324)	(325)
EV-D68-116	GFPFNMFV	IKQDGSEK	VREGVRRVVRSTGYFDF
	(326)	(327)	(328)
EV-D68-150	GGPISNGPYY	IFYSGST	ARHVVTASGWFDV
	(329)	(330)	(331)
EV-D68-151	GGPISNGPYY	IFYSGST	ARHVVTASGWFDV
	(332)	(333)	(334)
EV-D68-152	GVTFSDNA	ISYDGSSR	ARVTADYYESSGKVF
	(335)	(336)	(337)
EV-D68-154	GGISDHY	IYTSGET	ARSLETVIRFYHHYMDV
	(338)	(339)	(340)
EV-D68-155	GGSIGDYH	IHSSGNT	ARQNVFDI
	(341)	(342)	(343)
EV-D68-156	GISINYY	VYSTGSS	ARGSMPI
	(344)	(345)	(346)
EV-D68-157	GITFSNAW	IESKIDGGTI	TTDQGYDRSGYVVGNHFDY
	(347)	(348)	(349)
EV-D68-158	GFTFSSYA	ISGTTGST	AKDSHSMIVVDHAFDI
	(350)	(351)	(352)
EV-D68-159	GFTFSTYI	ISTSSVYT	AREEGFRAYNLY
	(353)	(354)	(355)
EV-D68-160	GFTFSRFG	ISFDGSNR	ARDWDRLVRSVGY
	(356)	(357)	(358)
EV-D68-161	GGSVSTATYY	IYSSGNT	ERRLRILSIERNYYAMDV
	(359)	(360)	(361)
EV-D68-162	GFTFSSYA	ISYDASKK	ARDHVPPKDCSDGNCHSDYGMDV
	(362)	(363)	(364)
EV-D68-163	GYSFTNFA	INPGNRNT	ARLPIAAAGRGWFDP
	(365)	(366)	(367)
EV-D68-164	GFTFNTYG	ISSATTF	ARVYTMLRGASMDV
	(368)	(369)	(370)

10

20

30

40

50

EV-D68-165	GYTFTAYY (371)	INPISGGT (372)	ARVKCSSANCYGNFDY (373)
EV-D68-166	GYRFTNYR (374)	IYPGGSDT (375)	ARQTTQNSGYDRWFDS (376)
EV-D68-181	GITFSRHT (377)	ISGSGGST (378)	AISVPLLRFLEWFQHPFDF (379)
EV-D68-183	GFTFNTYS (380)	ISSTGSYI (381)	VRFTMTTVTNFDS (382)
EV-D68-185	GFTFTNYG (383)	ISYDGGNK (384)	PKVIPHPYYDSSGDDAFDI (385)
EV-D68-200	GFPFSSYS (386)	ISGSGGDI (387)	ARGLVATTGTRYFDY (388)
EV-D68-208	GGTFRRFA (389)	IIPILGRG (390)	ARFISTASYVPGTFEDV (391)
EV-D68-210	GFTFRNYN (392)	ISSTGSYI (393)	ARMVRNTVTAFDY (394)
EV-D68-219	GYRLIDL (395)	FDPEKAEA (396)	ATWGVVVNGRRDYFDS (397)
EV-D68-220	GFTFSSFE (398)	ISTSGSTI (399)	ARDVRDCSALTCPRRGDAFDF (400)
EV-D68-221	GFSFSVYP (401)	ISSSSRYI (402)	VKVGGSKHQYYFDY (403)
EV-D68-224	GYTFTNYD (404)	ISTYNGNT (405)	ARERCSTSTCYSRYADY (406)
EV-D68-225	GFTLSRYE (407)	ISSGGPSI (408)	MREGLTYYDSTI (409)
EV-D68-227	GFTFDEYA (410)	ISWNGGSK (411)	AKDDYEGAGFDI (412)
EV-D68-228	GYLISNGYY (413)	IYYTRDT (414)	VRHEGSCNDGSCYGSFVDN (415)
EV-D68-231	DFTFSSYT (416)	ISGDGVST (417)	ARGGTFHNWYFDL (418)
EV-D68-234	GFTFSTYA (419)	ISGSGGST (420)	AKGTITYSYYMAV (421)

10

20

30

40

50

EV-D68-235	GYRLTDLP	VDLEKREI	ATWGIEVVNGRDEFFDS
	(422)	(423)	(424)
EV-D68-236	GYSLSDLP	FDPINGEI	ATWGVAVVSGRRDYFDS
	(425)	(426)	(427)
EV-D68-241	GGSITSGDYY	IYHSGTT	ARAYAYEFWSGYPNWFDP
	(428)	(429)	(430)
EV-D68-247	GFIFNRYA	ISYDGINK	ARGLGYCSGTGGSCTPFEY
	(431)	(432)	(433)
EV-D68-254	GASLNDYD	INRRDTV	VRVPRRGFEGSFGCDDTACRYGHTWFDP
	(434)	(435)	(436)
EV-D68-260	GFSLRNGRMG	IFASDEK	ARILKFGTMRAAYYFDY
	(437)	(438)	(439)
EV-D68-266	GFTFSDYY	ISSSGSTI	AGSKVGYTTGRRNWFYDL
	(440)	(441)	(442)
EV-D68-269	GFTFTDFY	INPETGET	ARDLVVVPVEMSRRAFDI
	(443)	(444)	(445)
EV-D68-271	GYIFSAYY	MNAKSGGA	ARDYRDDYMWGSYRPLDY
	(446)	(447)	(448)

10

20

【 0 4 2 4 】

(表 4) CDR 輕鎖配列

30

40

50

クローン	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
EV-D68-37	ALPKKY (449)	EDT (450)	SSTDSSGNPVL (451)
EV-D68-40	QSVSTY (452)	EAS (453)	QQRSSWPIT (454)
EV-D68-41	SGSVSSSY (455)	SIN (456)	GLYMGSGIWI (457)
EV-D68-43	QGISSW (458)	AAS (459)	QQADSFPR (460)
EV-D68-46	QSISKW (461)	KAS (462)	QQHNSYSY (463)
EV-D68-48	QSVRSY (464)	DAS (465)	QQRSTWPPGM (466)
EV-D68-71	QSVSSF (467)	GAS (468)	QQYSNSRLT (469)
EV-D68-72	SSDVGGYNY (470)	EVT (471)	SSYTTSNTLVV (472)
EV-D68-74	NIGTKS (473)	NDS (474)	QVWDSDIDVV (475)
EV-D68-75	NIGTKT (476)	YDS (477)	RVWDSDTDHRV (478)
EV-D68-76	KLGDKY (479)	QDT (480)	QAWDSSTVV (481)
EV-D68-80	QDIGVD (482)	GAS (483)	LQDYNYPWT (484)
EV-D68-84	ALPKQY (485)	QDT (486)	QSGDSSGTLYV (487)
EV-D68-85	QRVGNS (488)	DAS (489)	HQHSTWPRGT (490)
EV-D68-88	SGSIATNY (491)	EDS (492)	QSYDNSNRAVV (493)
EV-D68-89	SGTIASNY (494)	EDN (495)	QSYDNSDRV (496)
EV-D68-95	NIGLKS (497)	YDS (498)	QVWDSSRNHPV (499)
EV-D68-97	KLGDKY (500)	QDS (501)	QAWDSSTAV (502)
EV-D68-98	QGISRF (503)	SAS (504)	QQLNSHPRMFT (505)
EV-D68-105	QGISNW (506)	DAS (507)	QQANSFPFT (508)
EV-D68-110	ALPKQY (509)	EDN (510)	QSADSSGTYYV (511)
EV-D68-111	NIGLKS (512)	YDS (513)	QVWDSSRNHPV (514)
EV-D68-114	SSDVGGYNF (515)	DVT (516)	GAYAGFNAL (517)

10

20

30

40

50

EV-D68-116	AVPIKY	EDD	YSTDSSGYQRA
	(518)	(519)	(520)
EV-D68-150	QSVGTD	DAF	QQRSRWPPPYT
	(521)	(522)	(523)
EV-D68-151	QSVGTD	DAF	QQRSRWPPPYT
	(524)	(525)	(526)
EV-D68-152	QSVRSW	KAS	QQYQTFSWT
	(527)	(528)	(529)
EV-D68-154	QSLQSDGYSY	LGS	MQALQTPWT
	(530)	(531)	(532)
EV-D68-155	QSVLFSSNNKNY	WAS	QQFYTTPLT
	(533)	(534)	(535)
EV-D68-156	TSNIETNY	RND	AAWDDSLKAPV
	(536)	(537)	(538)
EV-D68-157	STNIGAGYD	GNS	QSYDRSLSTYV
	(539)	(540)	(541)
EV-D68-158	NIGTKS	DDS	QVWDSYNVHYV
	(542)	(543)	(544)
EV-D68-159	SSNIEYNY	KNN	AAWDDILSGVV
	(545)	(546)	(547)
EV-D68-160	SNDVGGYNF	DVI	CSYAGTYTWV
	(548)	(549)	(550)
EV-D68-161	QRVVNNY	GAS	QQYGGSPWT
	(551)	(552)	(553)
EV-D68-162	QSISKW	KAS	QQHNSYSYT
	(554)	(555)	(556)
EV-D68-163	QSVISTY	DVS	HQYGSSPAT
	(557)	(558)	(559)
EV-D68-164	QSVGTY	DSA	QLRITWPPIFT
	(560)	(561)	(562)
EV-D68-165	SSDVGGYNY	EVS	SSYAGSNNLV
	(563)	(564)	(565)
EV-D68-166	TSSIGSNI	INN	AAWDDSLNGWV
	(566)	(567)	(568)
EV-D68-181	QSVGST	GAS	HQYINWPPWT
	(569)	(570)	(571)
EV-D68-183	SSDVGAYSY	DVY	CSHAGSHTWV
	(572)	(573)	(574)
EV-D68-185	QSIERN	GAS	QQYSKLPIT
	(575)	(576)	(577)
EV-D68-200	QSVRSY	DAS	QQRSYWPPFT
	(578)	(579)	(580)
EV-D68-208	QSVSSY	DAS	QQRSDWPPGT
	(581)	(582)	(583)
EV-D68-210	SSDVGGYNF	EVI	CSYGGNNSWM
	(584)	(585)	(586)
EV-D68-219	VLSNQY	KDT	QSADNTRITV
	(587)	(588)	(589)
EV-D68-220	QSLVYSDGNTY	KVS	MQGTHWPRT
	(590)	(591)	(592)
	RSNIGSYT	NNN	AAWDDSLNGVV

10

20

30

40

50

EV-D68-221	(593)	(594)	(595)
EV-D68-224	QSINIY	AAS	QQSYRSPRT
	(596)	(597)	(598)
EV-D68-225	SGHSRYA	INSDGRH	QTWGTGFRV
	(599)	(600)	(601)
EV-D68-227	QSVSSY	GAS	QQRSNWPIT
	(602)	(603)	(604)
EV-D68-228	QDISSW	AAS	QQADSFIT
	(605)	(606)	(607)
EV-D68-231	QSIGDN	GAS	QQYKNWPRT
	(608)	(609)	(610)
EV-D68-234	QSVRSSY	GAS	QQYGTSIT
	(611)	(612)	(613)
EV-D68-235	VLSKQY	KDT	QSADTRITV
	(614)	(615)	(616)
EV-D68-236	VLSNQY	KDT	QTADTKYTV
	(617)	(618)	(619)
EV-D68-241	QRISTY	AAS	QQSYSPPWT
	(620)	(621)	(622)
EV-D68-247	QSIKKY	GAS	QQSDSAPPT
	(623)	(624)	(625)
EV-D68-254	QSIRDY	AGS	QQSYLTPPT
	(626)	(627)	(628)
EV-D68-260	NIGIRT	YDS	QVWDSSSDHVV
	(629)	(630)	(631)
EV-D68-266	SSDVGAYNY	EVT	SSYAGNNNLV
	(632)	(633)	(634)
EV-D68-269	NIERKS	DDT	QVWDSTTDHGV
	(635)	(636)	(637)
EV-D68-271	QSVSGY	DAS	QQRSNGLT
	(638)	(639)	(640)

【 0 4 2 5 】

本明細書において開示および請求されるすべての組成物および方法は、本開示に照らし、過度の実験をすることなく作製および実行され得る。本開示の組成物および方法は、好ましい態様に関して説明されてきたが、当業者には、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書において説明された組成物および方法、ならびに方法の工程または一連の工程に変形例が適用され得ることが明らかであろう。さらに具体的には、化学的および生理学的に関連する特定の作用物質が、同じまたは同様の結果が達成されながら、本明細書において記載される作用物質の代わりになり得ることが明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の代替物および改変はすべて、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の趣旨、範囲および概念の範囲内にあるとみなされる。

【 0 4 2 6 】

VII. 参考文献

以下の参考文献は、本明細書において記載されるものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

10

20

30

40

50

U.S. Patent 3,817,837	
U.S. Patent 3,850,752	
U.S. Patent 3,939,350	
U.S. Patent 3,996,345	
U.S. Patent 4,196,265	
U.S. Patent 4,275,149	
U.S. Patent 4,277,437	10
U.S. Patent 4,366,241	
U.S. Patent 4,472,509	
U.S. Patent 4,554,101	
U.S. Patent 4,680,338	
U.S. Patent 4,816,567	
U.S. Patent 4,867,973	
U.S. Patent 4,938,948	20
U.S. Patent 5,021,236	
U.S. Patent 5,141,648	
U.S. Patent 5,196,066	
U.S. Patent 5,563,250	
U.S. Patent 5,565,332	
U.S. Patent 5,856,456	
U.S. Patent 5,880,270	
U.S. Patent 6,485,982	30
“Antibodies: A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.	
Abbondanzo <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.</i> , 12(4), 480-489, 1990.	
Allred <i>et al.</i> , <i>Arch. Surg.</i> , 125(1), 107-113, 1990.	
Atherton <i>et al.</i> , <i>Biol. of Reproduction</i> , 32, 155-171, 1985.	
Barzon <i>et al.</i> , <i>Euro Surveill.</i> 2016 Aug 11; 21(32).	
Beltramello <i>et al.</i> , <i>Cell Host Microbe</i> 8, 271-283, 2010.	40

- Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12;130(1), :111-121, 1990.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Diamond *et al.*, *J Virol* 77, 2578-2586, 2003. 10
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- Duffy *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543, 2009.
- Elder *et al.* Infections, infertility and assisted reproduction. Part II: Infections in reproductive medicine & Part III: Infections and the assisted reproductive laboratory. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2005.
- Geftter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gornet *et al.*, *Semin Reprod Med.* 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993. 20
- Halfon *et al.*, *PLoS ONE* 2010; 5 (5) e10569
- Hessell *et al.*, *Nature* 449, 101–4, 2007.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Mansuy *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1106-7.
- Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987. 30
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Persic *et al.*, *Gene* 187:1, 1997
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Purpura *et al.*, *Lancet Infect Dis.* 2016 Oct; 16(10):1107-8. Epub 2016 Sep 19.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.
- Tang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.
- Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987. 40

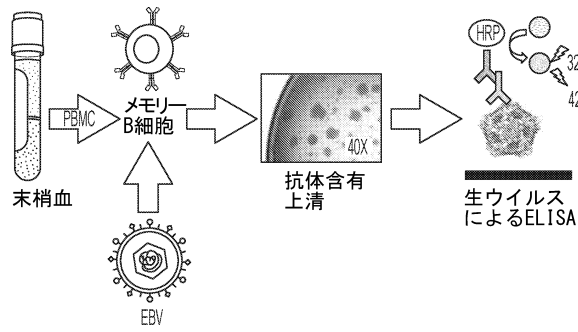
- Zell *et al.*, *J Gen Virol* 2017; 98:2421-2.
- Oberste *et al.*, *J Gen Virol* 2004; 85:2577-84.
- Blomqvist *et al.*, *J Clin Microbiol* 2002; 40:4218-23.
- Schieble *et al.*, *Am J Epidemiol* 1967; 85:297-310.
- Khetsuriani *et al.*, Centers for Disease Control, Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55:1-20.
- Xiang and Wang, *Semin Respir Crit Care Med* 2016; 37:578-85.
- Oermann *et al.*, *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12:775-81. 10
- Biggs *et al.*, *Clin Infect Dis* 2017; 65:315-23.
- Orvedahl *et al.*, *Pediatr Infect Dis J* 2016; 35:481-7.
- Midgley *et al.*, *Lancet Respir Med* 2015; 3:879-87.
- Messacar *et al.*, *Lancet* 2015; 385:1662-71.
- Division of Viral Diseases NCfI, Respiratory Diseases CDC, Division of Vector-Borne Diseases DoH-CP, *et al.* *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 63:1243-4.
- Messacar *et al.*, *Lancet Infect Dis* 2018; 18:e239-e47.
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases DoVD. AFM Investigation. Available at: world-wide-web at cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/afm-surveillance.html. 20
- Annual Review of Diseases Prioritized under the Research and Development Blueprint. 2018 (Geneva, Switzerland).
- Vidor *et al.*, Poliovirus Vaccine-Inactivated. In: Plotkin SA, MD, Orenstein WA, MD, DSc (HON), Offit PA, MD, Edwards KM, MD, eds. *Plotkin's Vaccines*. 7 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc., 2018:841-65.
- Sutter *et al.*, Poliovirus Vaccine-Live. In: Plotkin SA, MD, Orenstein WA, MD, DSc (HON), Offit PA, MD, Edwards KM, MD, eds. *Plotkin's Vaccines*. 7 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc., 2018:866-917. 30
- Howard *et al.*, *Open Forum Infect Dis* 2016; 3:ofw001.
- Zhang *et al.*, *J Clin Virol* 2015; 69:172-75.
- Liu *et al.*, *Science* 2015a; 347:71-4.
- Imamura *et al.*, *J Virol* 2014; 88:2374-84.
- Miao *et al.*, *J Clin Microbiol* 2009; 47:3108-13.
- Lu *et al.*, *Nat Rev Immunol* 2018; 18:46-61.
- Hixon *et al.*, *J Infect Dis* 2017a; 216:1245-53.
- Hixon *et al.*, *PLoS Pathog* 2017b; 13:e1006199.
- Morrey *et al.*, *Viruses* 2018; 10. 40

- Zhang *et al.*, *Viruses* 2018; 10.
- Zheng *et al.*, *Viruses* 2017a; 9.
- Gagneux *et al.*, *J Biol Chem* 2003; 278:48245-50.
- Blanco *et al.*, *J Virol* 2013; 87:2036-45.
- Leigh *et al.*, *Vaccine* 1995; 13:1468-73.
- Walther *et al.*, *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003223.
- Bern *et al.*, *Mol Cell Proteomics* 2013; 12:996-1004.
- Jia *et al.*, *J Biol Chem* 2014; 289:28489-504. 10
- Zhang *et al.*, *Emerg Microbes Infect* 2018a; 7:3.
- Crowe JE, Jr. *Cell Host Microbe* 2017; 22:193-206.
- Karron R, A. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. In: Plotkin SA, MD, Orenstein WA, MD, DSc (HON), Offit PA, MD, Edwards KM, MD, eds. Plotkin's Vaccines. 7 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc., 2018: 943-9.
- Strebel *et al.*, In: Plotkin SA, MD, Orenstein WA, MD, DSc (HON), Offit PA, MD, Edwards KM, MD, eds. Plotkin's Vaccines. 7 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc., 2018: 579-618. 20
- Tan, *et al.*, *J Virol* 90, 1997-2007 (2016).
- Dyrdak *et al.*, *Virus Evol* 5, vez007 (2019).
- Kujawski *et al.*, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 68, 277-280 (2019).
- Zheng *et al.*, *Nat Microbiol* 4, 124-133 (2019).
- Rossmann *et al.*, *Nature* 317, 145-153 (1985).
- Evans *et al.*, *Antiviral Res* 162, 61-70 (2019).
- Hurst *et al.*, *Virology* 526, 146-154 (2019).
- Flyak *et al.*, *Cell Host Microbe* 24, 703-716 e703 (2018).
- Bangaru *et al.*, *Cell* 177, 1136-1152 e1118 (2019). 30
- Liu *et al.*, *Nat Commun* 6, 8865 (2015b).
- Filman *et al.*, *EMBO J* 8, 1567-1579 (1989).
- Dai *et al.*, *Vaccine* 36, 653-659 (2018).
- Patel *et al.*, *PLoS One* 11, e0166336 (2016).
- Messacar *et al.*, *Ann Neurol* 80, 326-338 (2016).
- Posner *et al.*, *Hybridoma* 6, 611-625 (1987).
- Yu *et al.*, *J Immunol Methods* 336, 142-151 (2008).
- M. A. Ramakrishnan, *World J Virol* 5, 85-86 (2016).
- Weldon *et al.*, *Methods Mol Biol* 1387, 145-176 (2016). 40

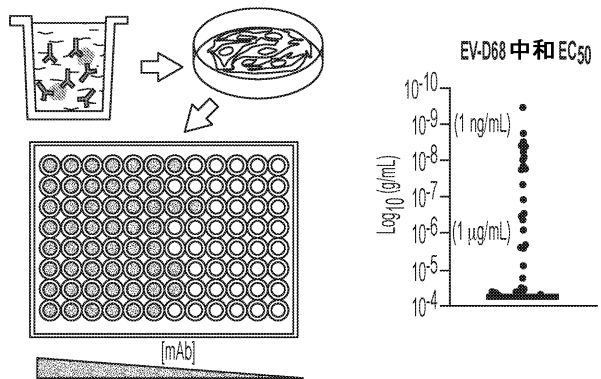
- R. F. Lemanske, Jr., *Pediatr Allergy Immunol* 13, 38-43 (2002).
- Bochkov *et al.*, *J Clin Microbiol* 52, 2461-2471 (2014).
- S. A. Smith, J. E. Crowe, Jr., *Microbiol Spectr* 3, AID-0027-2014 (2015).
- Turchaninova *et al.*, *Nat Protoc* 11, 1599-1616 (2016).
- V. Giudicelli, M. P. Lefranc, *Cold Spring Harb Protoc* 2011, 716-725 (2011).
- McLean *et al.*, *Mol Immunol* 37, 837-845 (2000).
- Suloway *et al.*, *J Struct Biol* 151, 41-60 (2005). 10
- Zheng *et al.*, *Nat Methods* 14, 331-332 (2017b).
- Lander *et al.*, *J Struct Biol* 166, 95-102 (2009).
- A. Rohou, N. Grigorieff, *J Struct Biol* 192, 216-221 (2015).
- Sorzano *et al.*, *J Struct Biol* 148, 194-204 (2004).
- A. M. Roseman, *J Struct Biol* 145, 91-99 (2004).
- S. H. Scheres, *J Struct Biol* 180, 519-530 (2012).
- F. Guo, W. Jiang, *Methods Mol Biol* 1117, 401-443 (2014). 20
- S. H. Scheres, S. Chen, *Nat Methods* 9, 853-854 (2012).
- Pettersen *et al.*, *J Comput Chem* 25, 1605-1612 (2004).
- Emsley *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501 (2010).
- Adams *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221 (2010).
- Potterton *et al.*, *Acta Crystallogr D Struct Biol* 74, 68-84 (2018).
- Chen *et al.*, in *International Tables for Crystallography*. (2012), vol. F, chap. 21.6, pp. 694-701.
- W. McKinney, in *Python in Science Conference*, S. van der Walt, J. Millman, Eds. (Austin, Texas, 2010), pp. 51-56. 30
- I. Letunic, P. Bork, *Nucleic Acids Res* 47, W256-W259 (2019).
- Mishra *et al.*, *MBio* 10, (2019).
- Schubert *et al.*, *Nat Med*, (2019).

【図面】

【図 1】



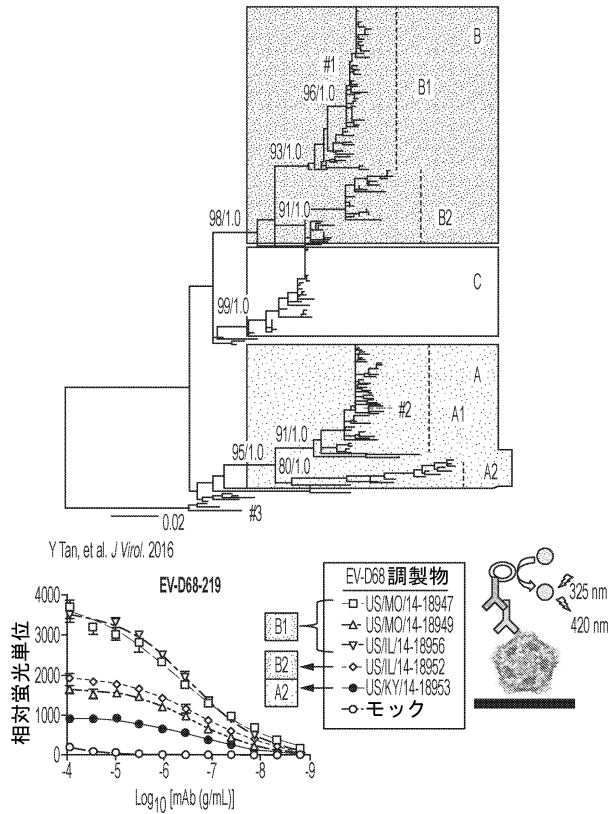
【図 2】



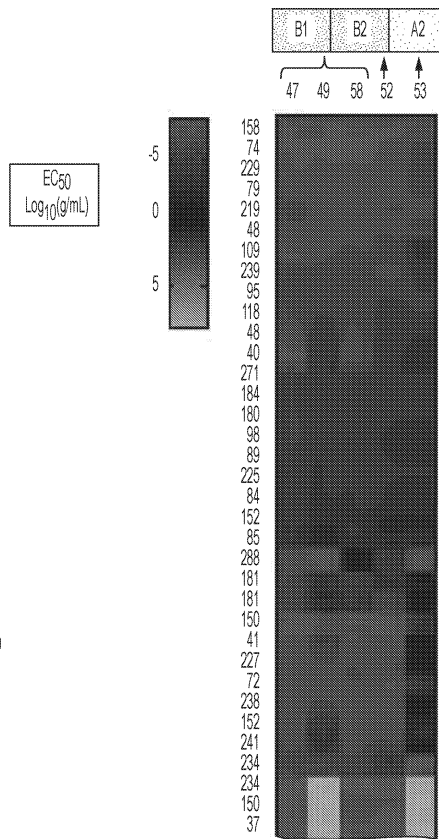
10

【図 3 - 1】

クレード間の交差反応性結合は可変である



【図 3 - 2】



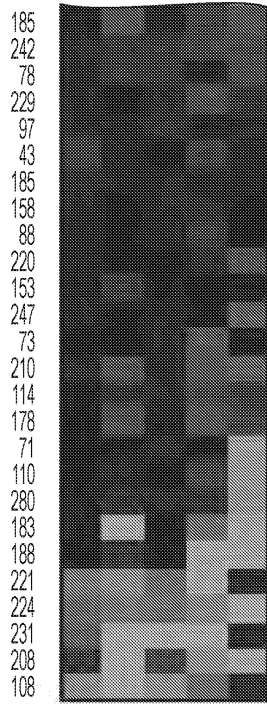
20

30

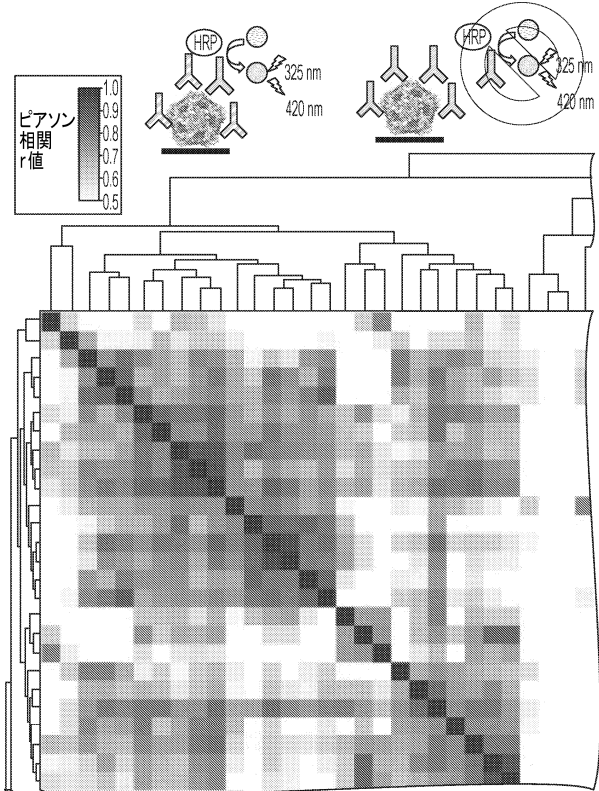
40

50

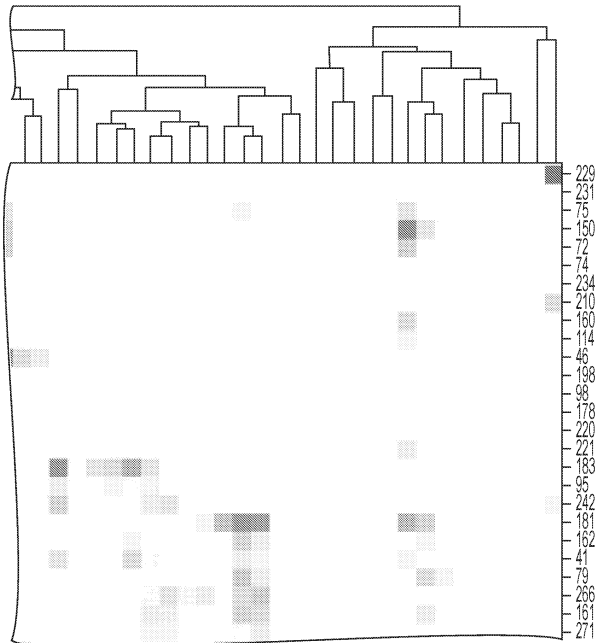
【図 3 - 3】



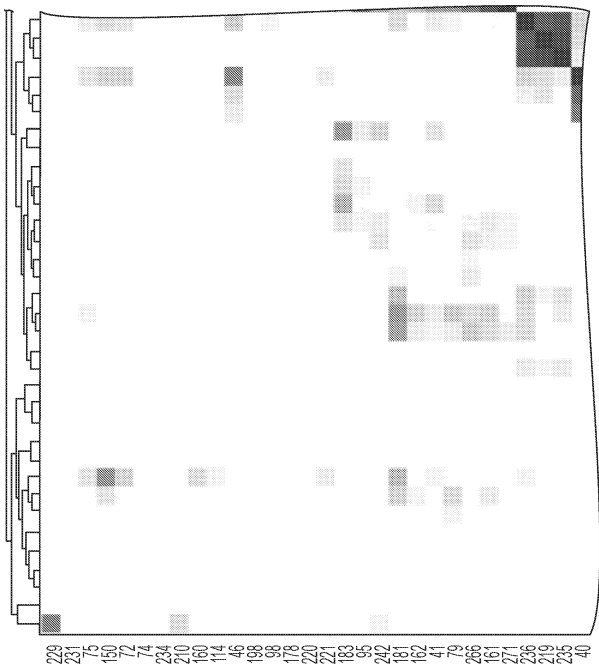
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 4 - 3】



10

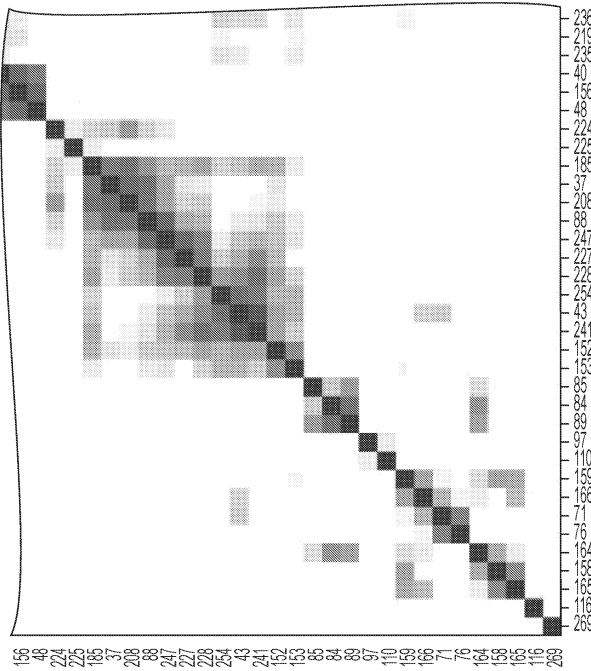
20

30

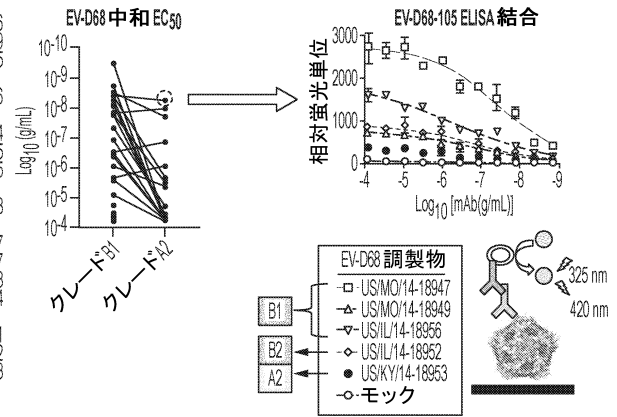
40

50

【図 4 - 4】

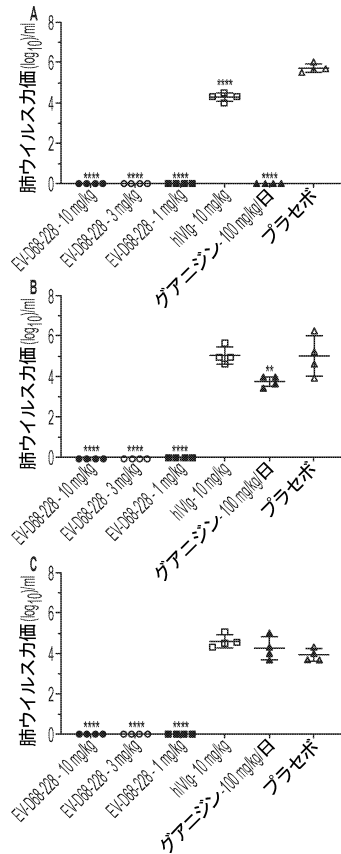


【図 5】

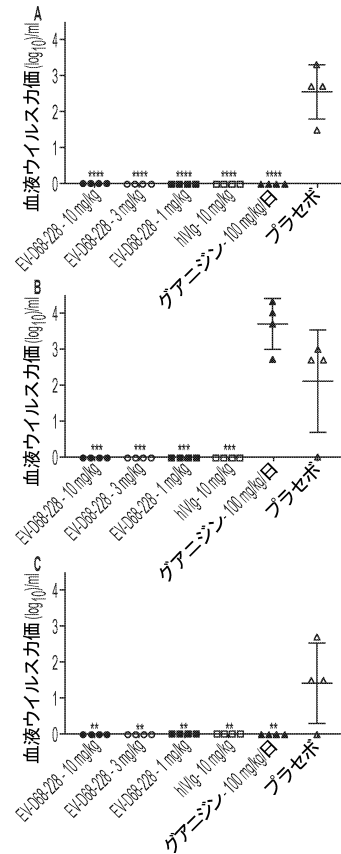


10

【図 6】



【図 7】



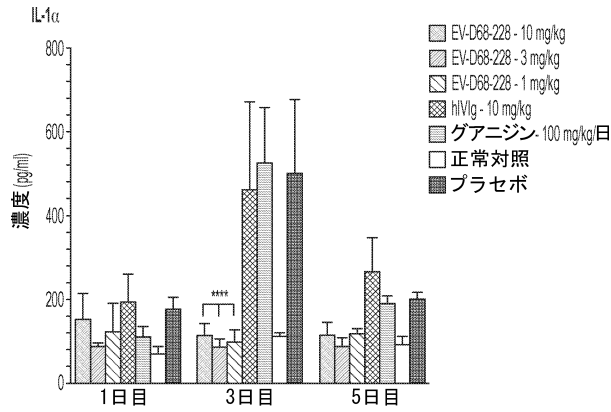
20

30

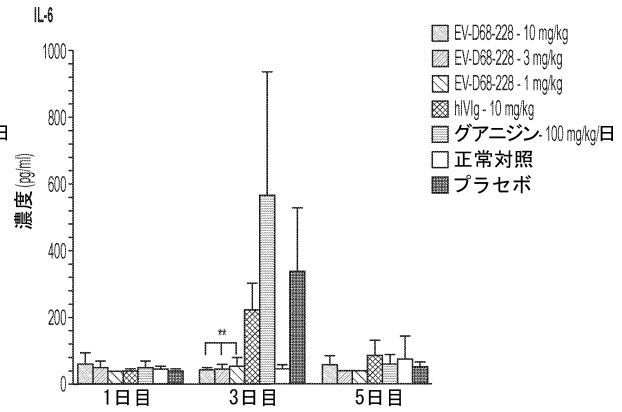
40

50

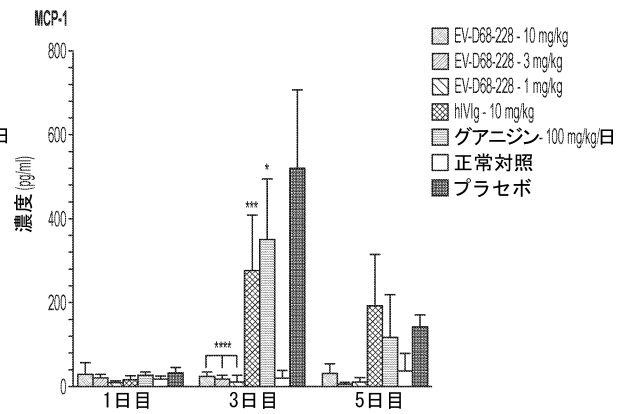
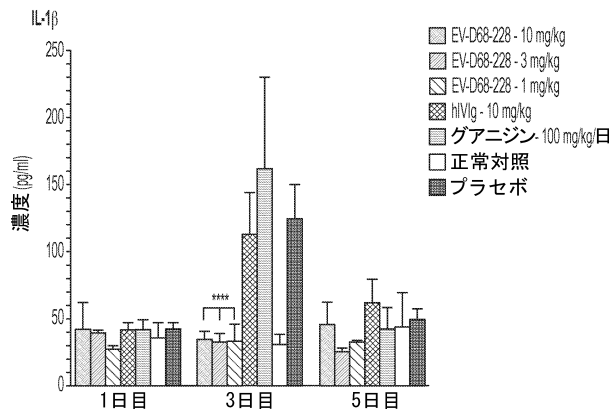
【図 8】



【図 9】

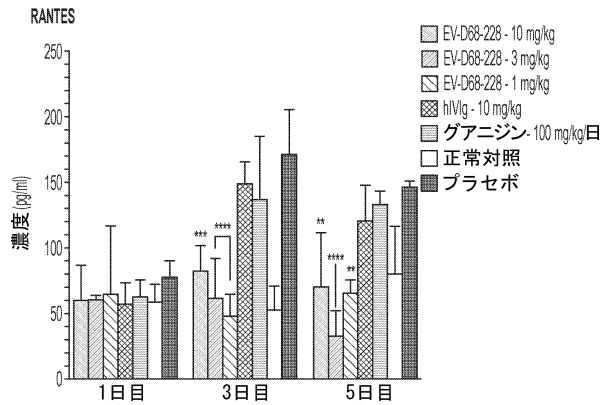


10

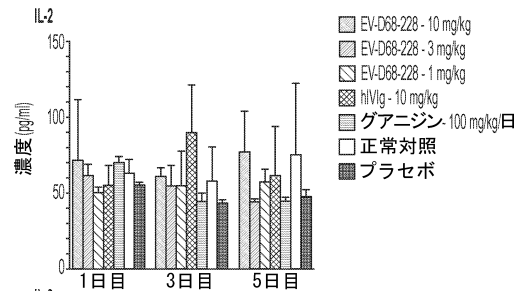


20

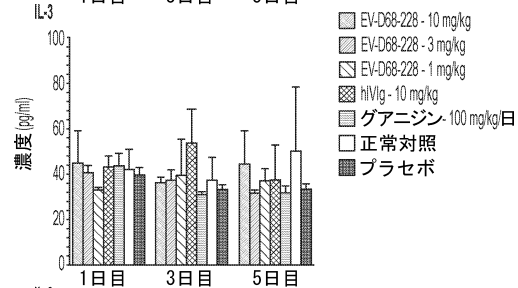
【図 10】



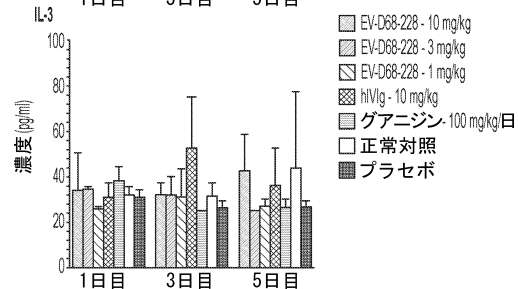
【図 11】



30

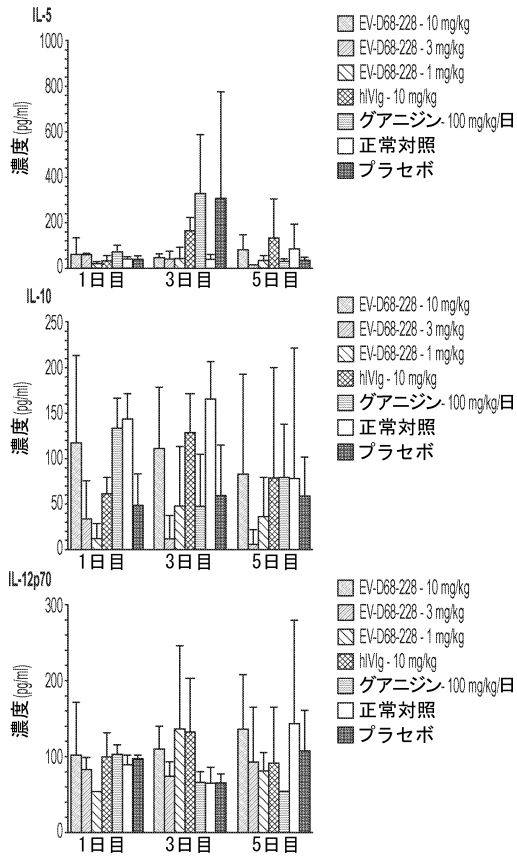


40

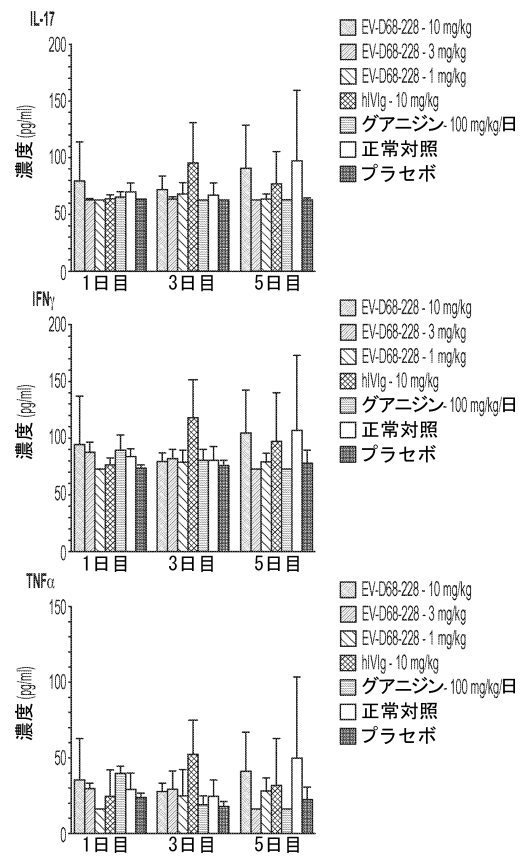


50

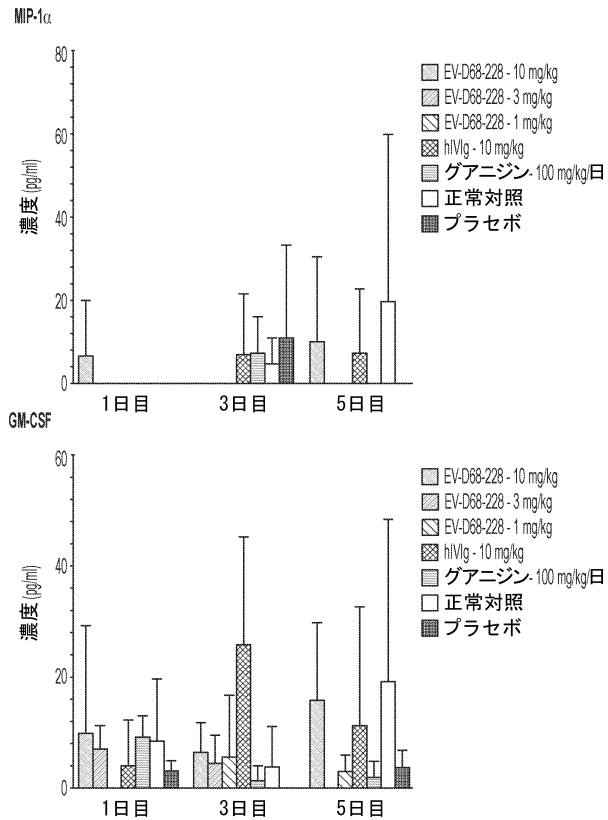
【図 1 2】



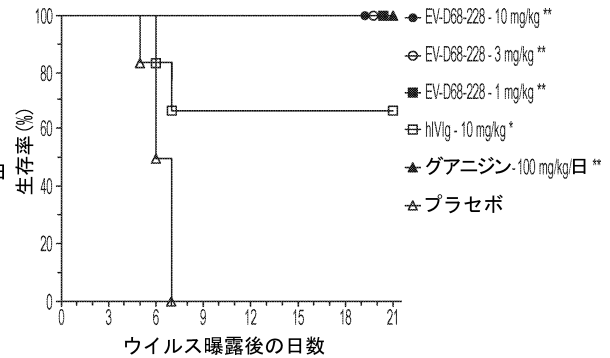
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

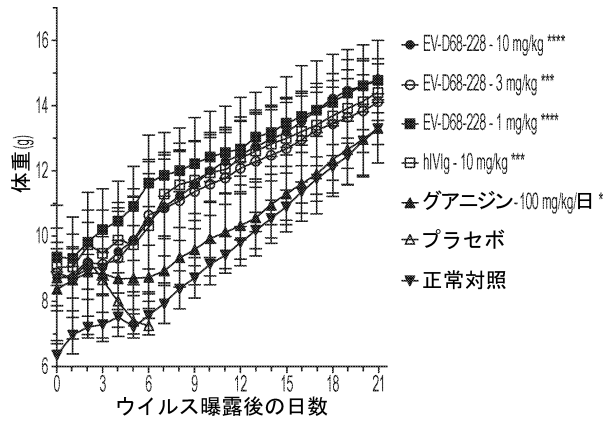
20

30

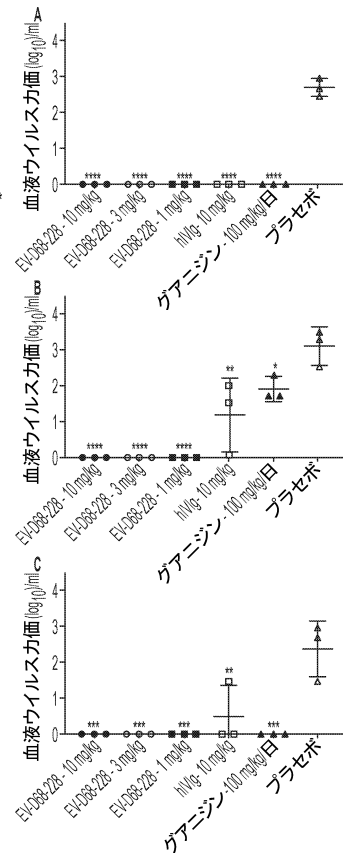
40

50

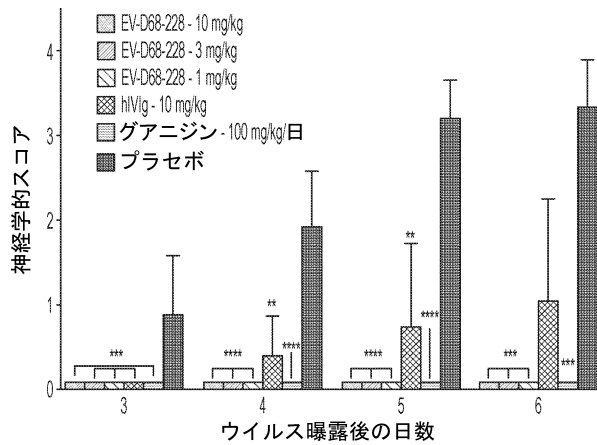
【図 16】



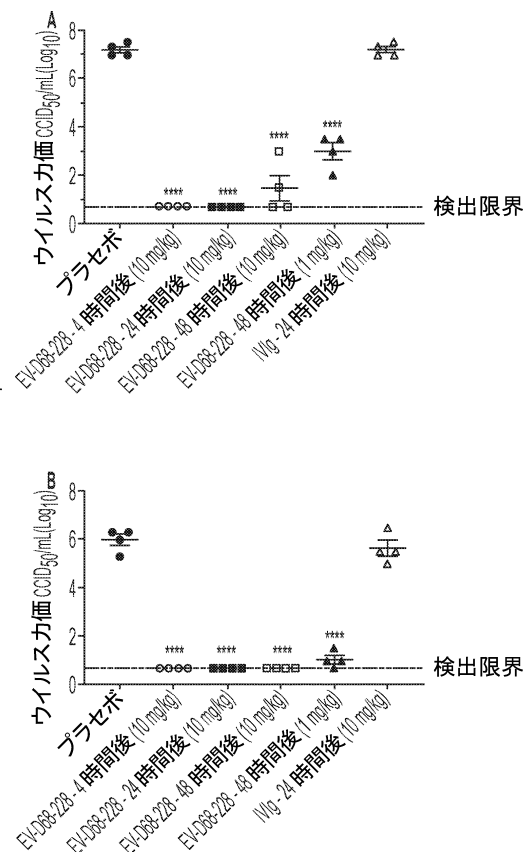
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

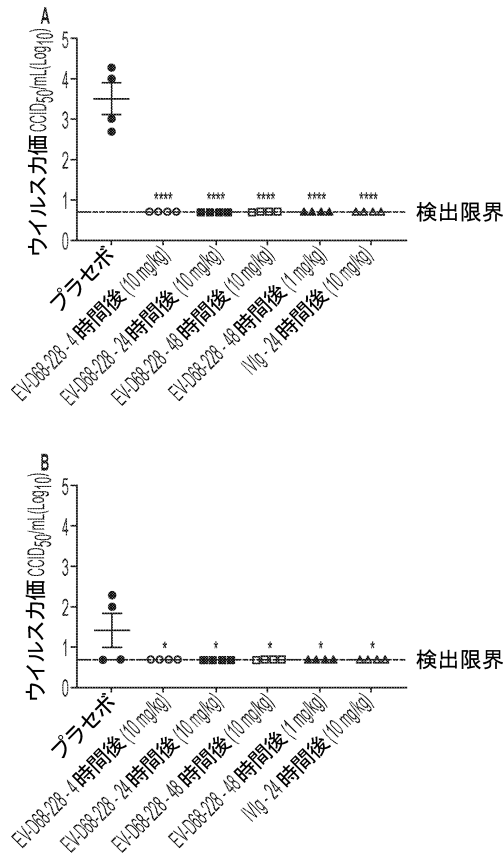
20

30

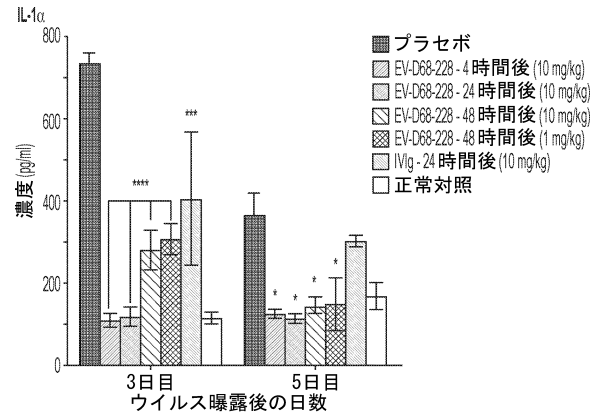
40

50

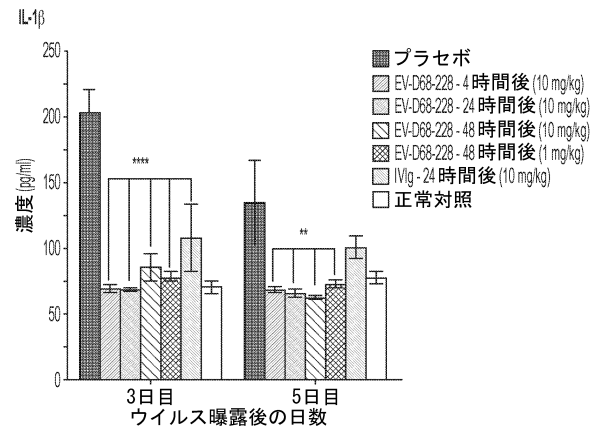
【図 20】



【図 21】

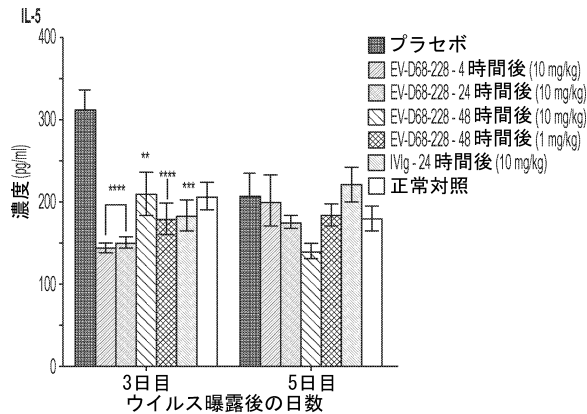


10

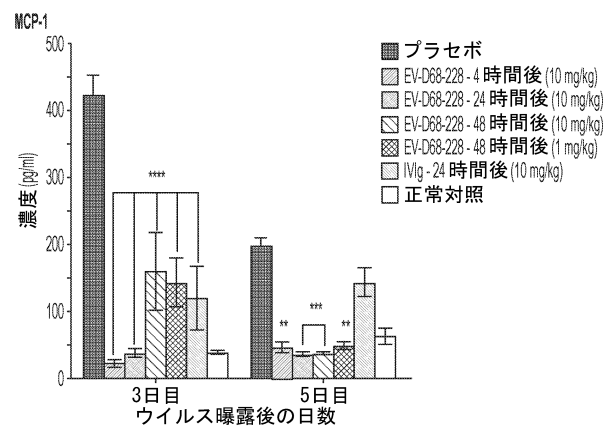


20

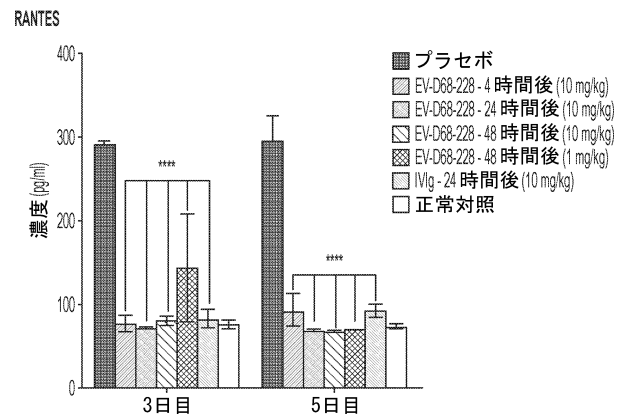
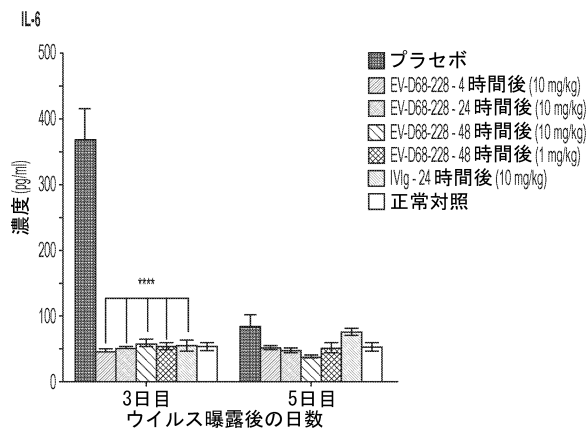
【図 22】



【図 23】



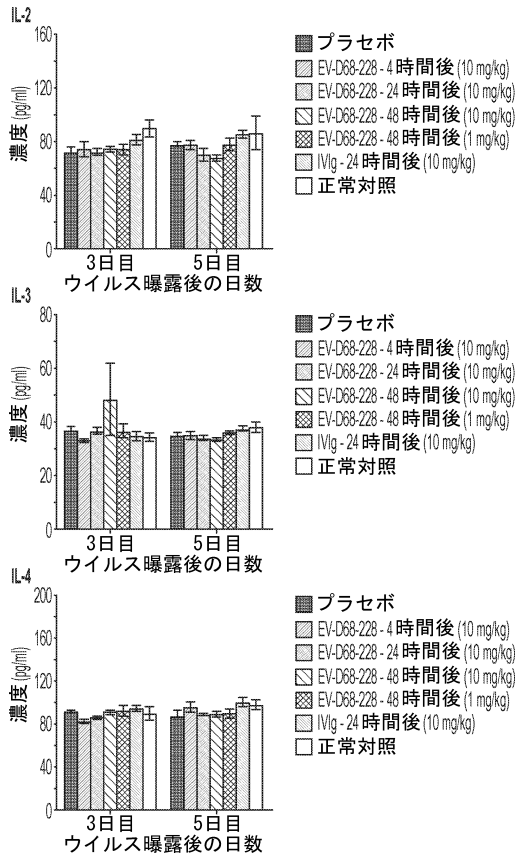
30



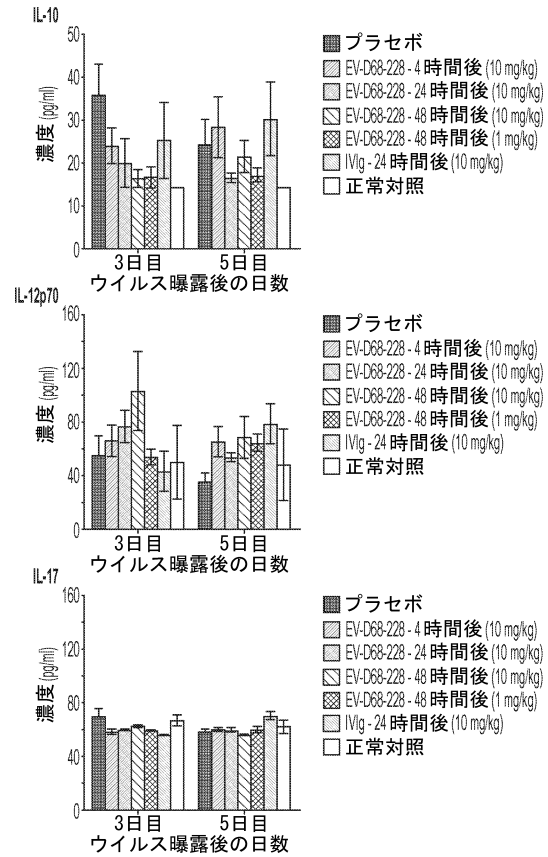
40

50

【図 2 4】



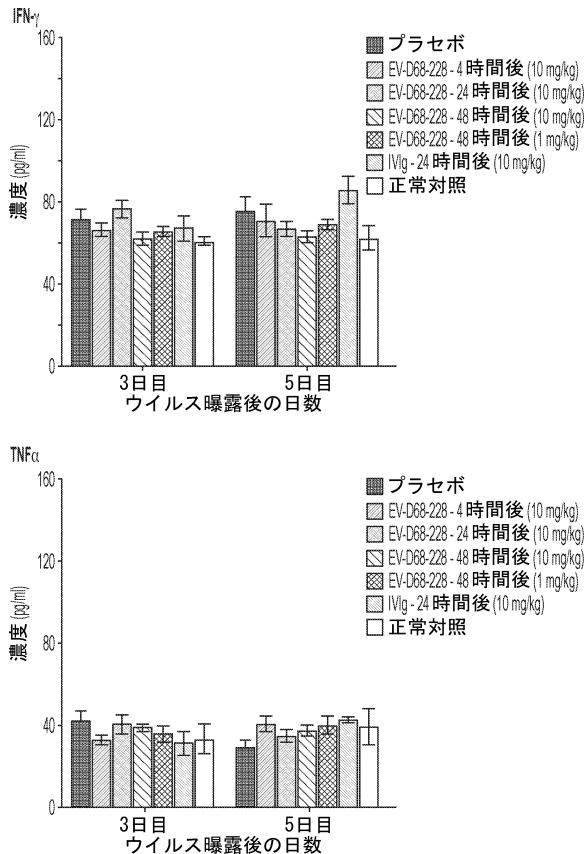
【図 2 5】



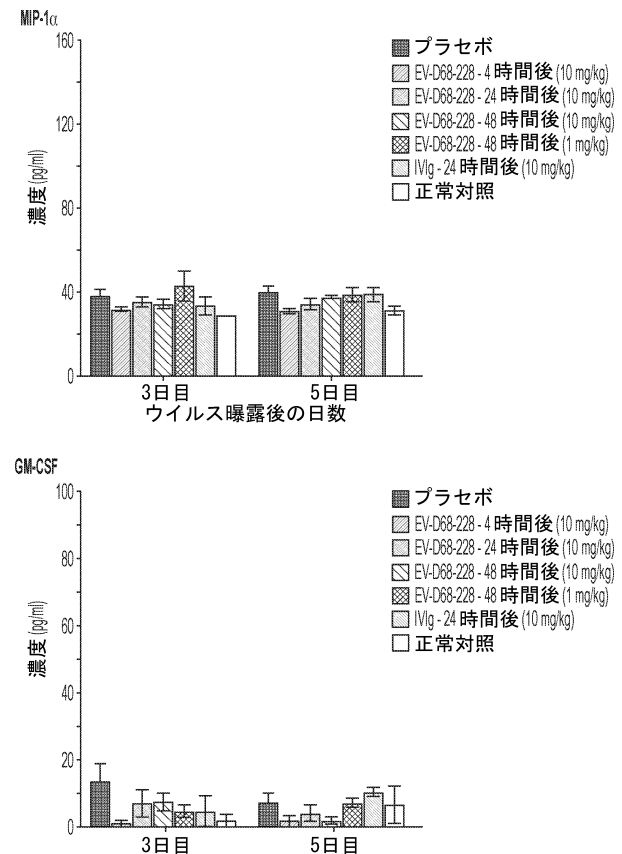
10

20

【図 2 6】



【図 2 7】

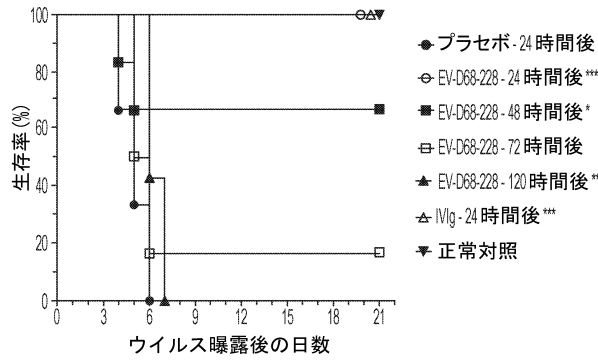


30

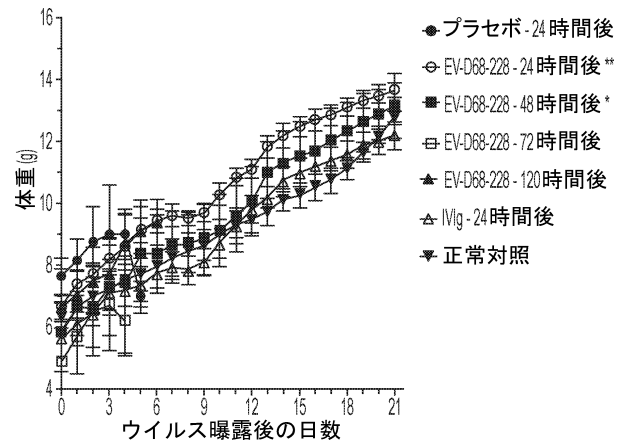
40

50

【図 28】

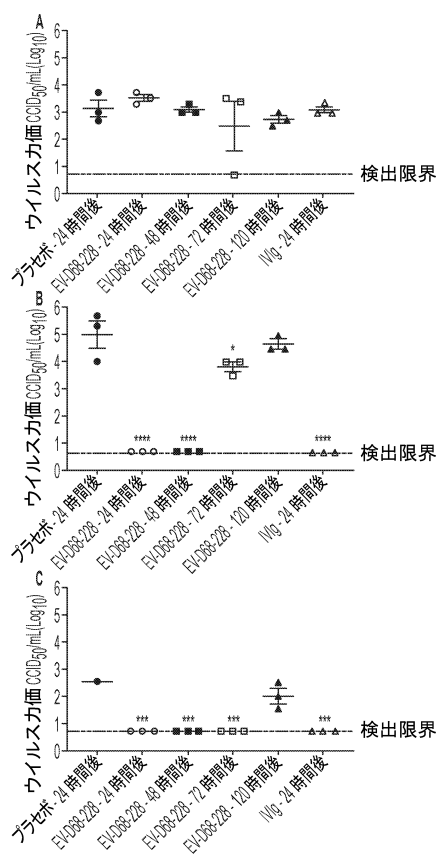


【図 29】

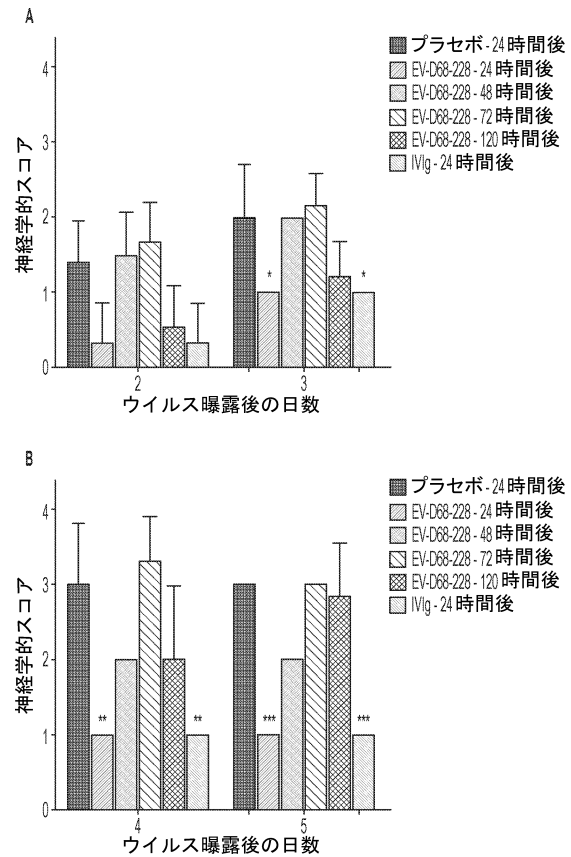


10

【図 30】



【図 31】



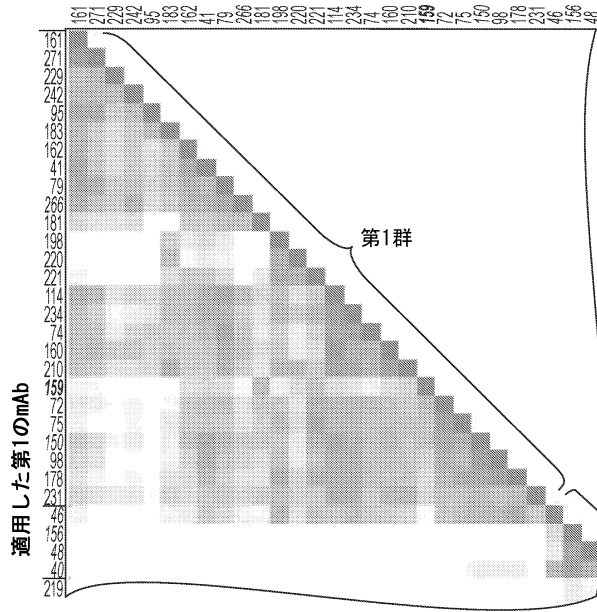
20

30

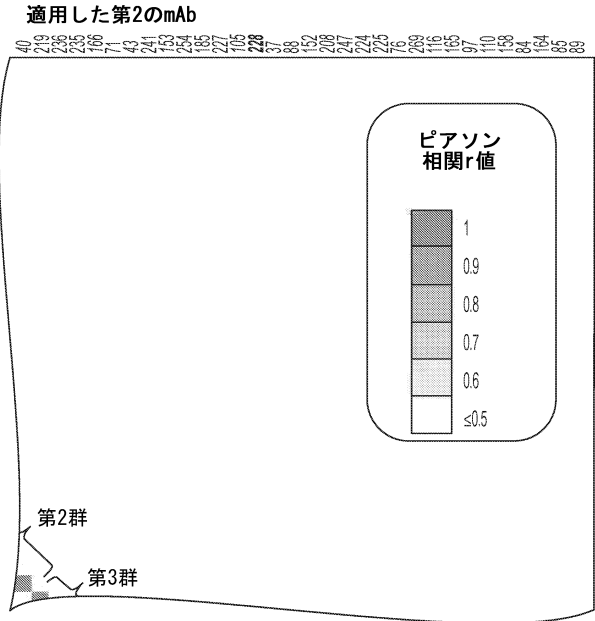
40

50

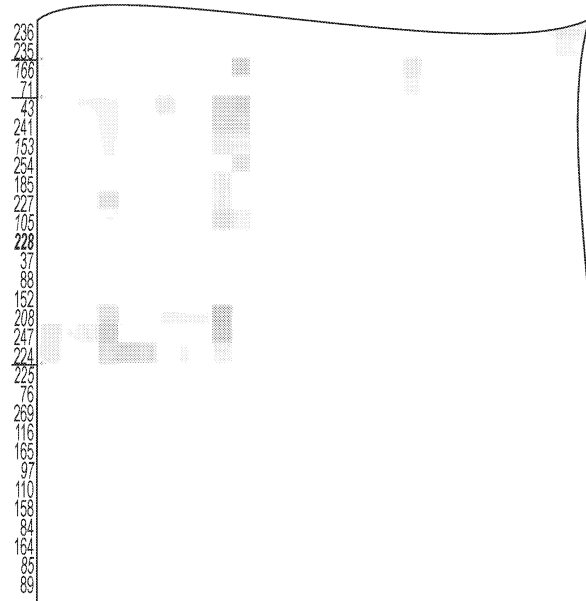
【図 3 2 - 1】



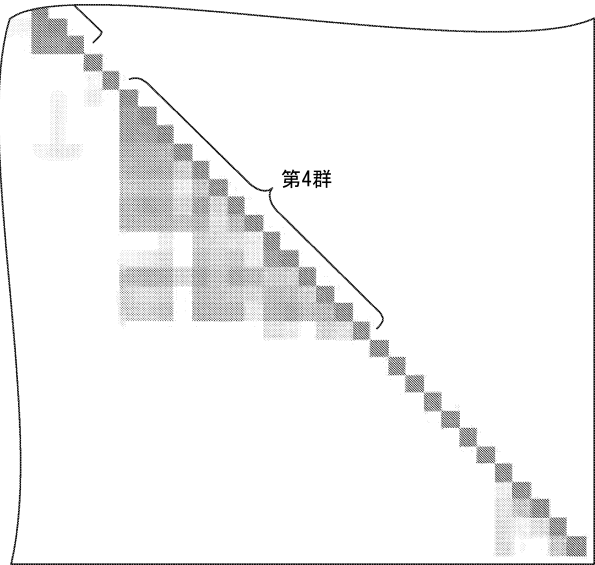
【図 3 2 - 2】



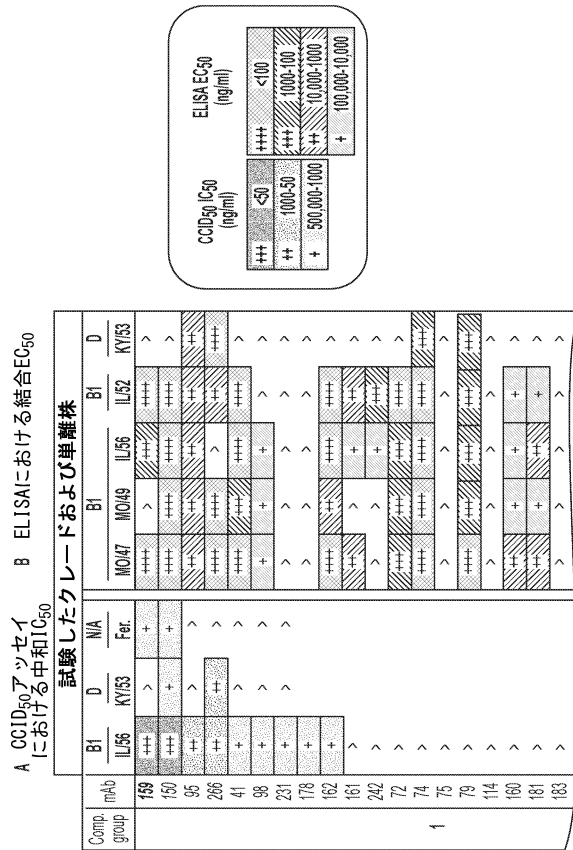
【図 3 2 - 3】



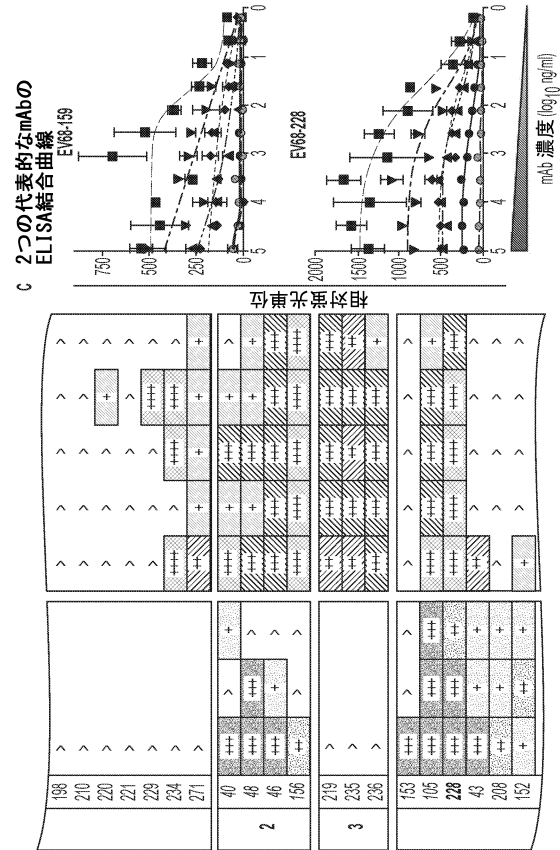
【図 3 2 - 4】



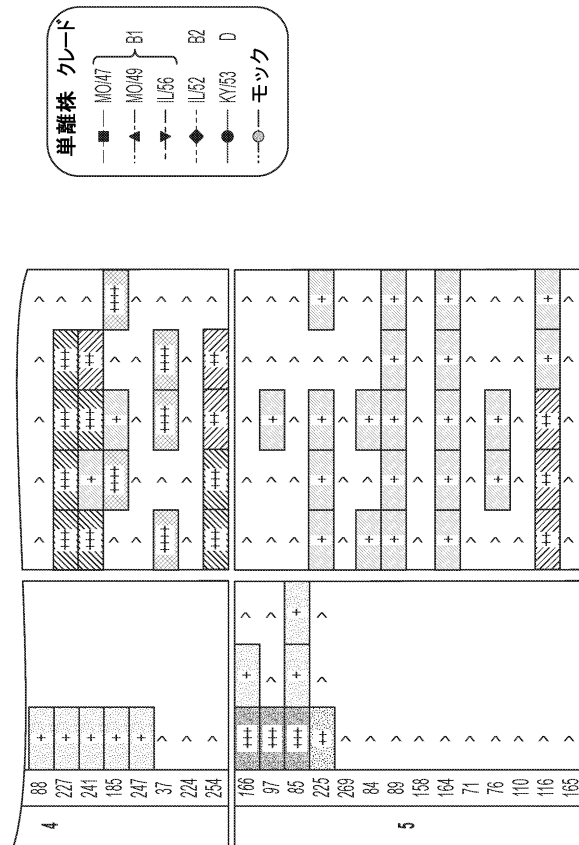
【図 3 3 - 1】



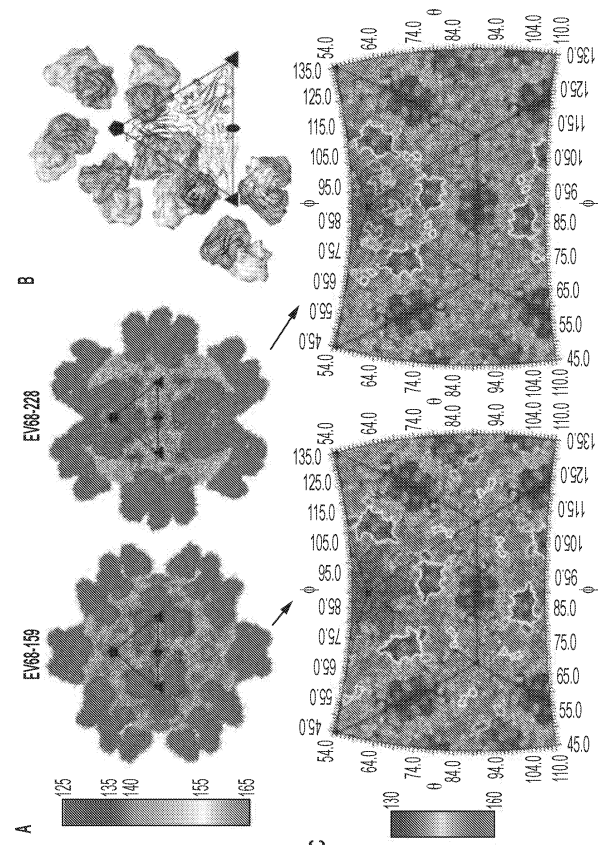
【図 3 3 - 2】



【図 3 3 - 3】



【図 3 4】



10

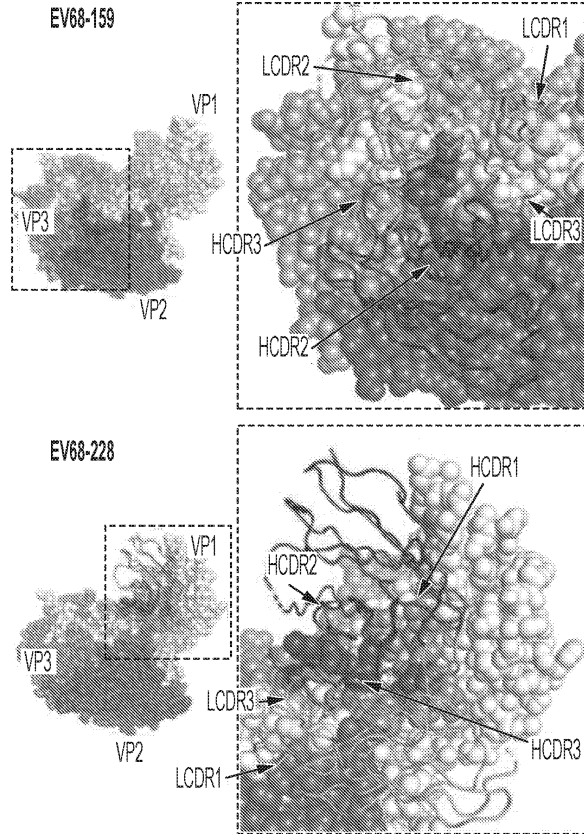
20

30

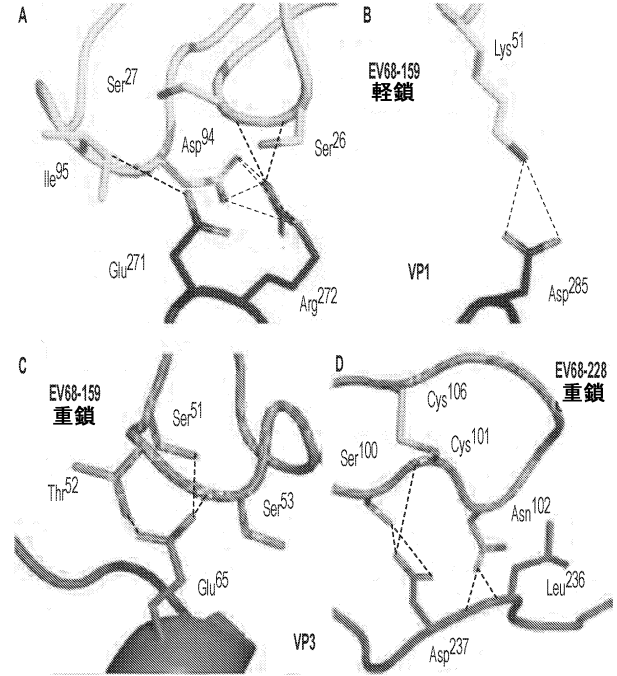
40

50

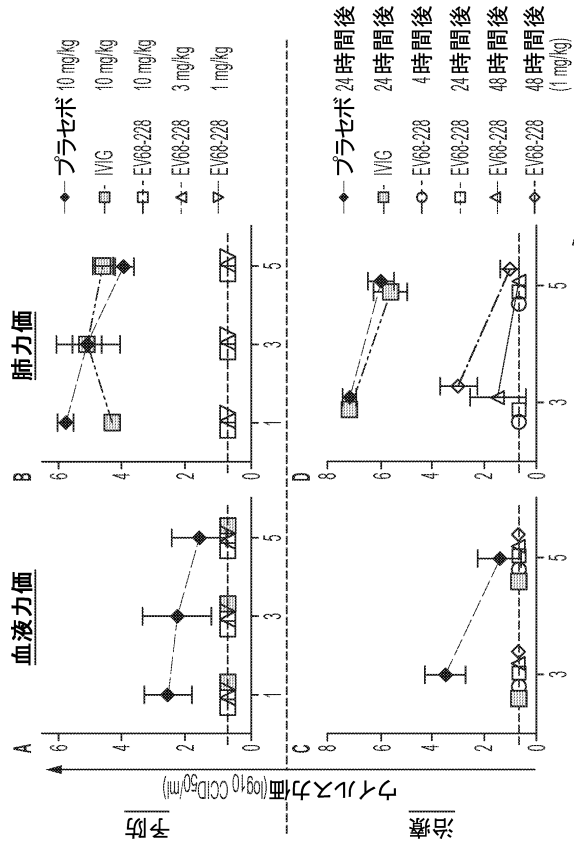
【図 3 5】



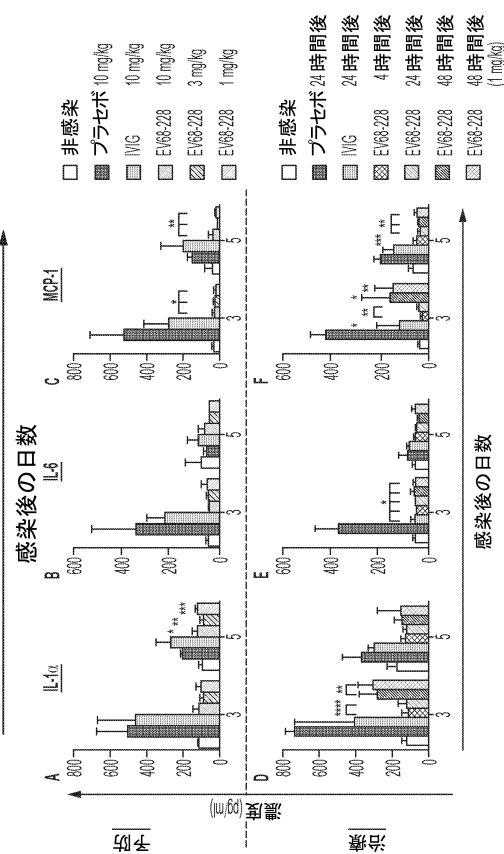
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



10

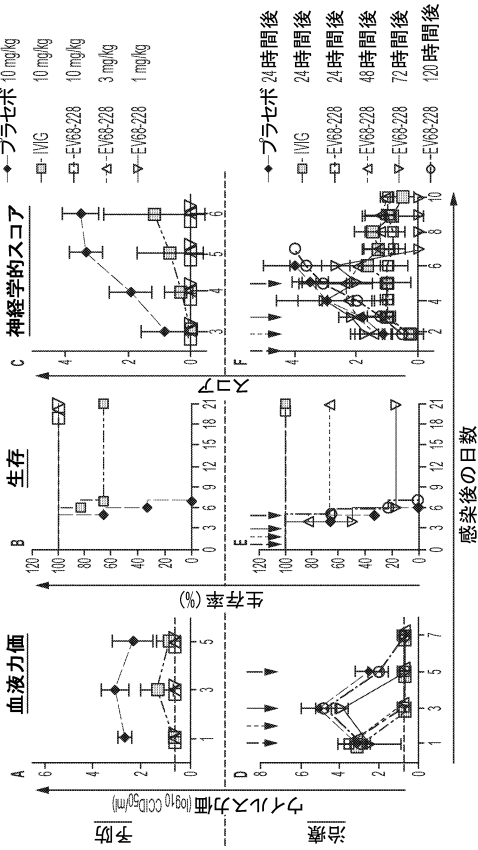
20

30

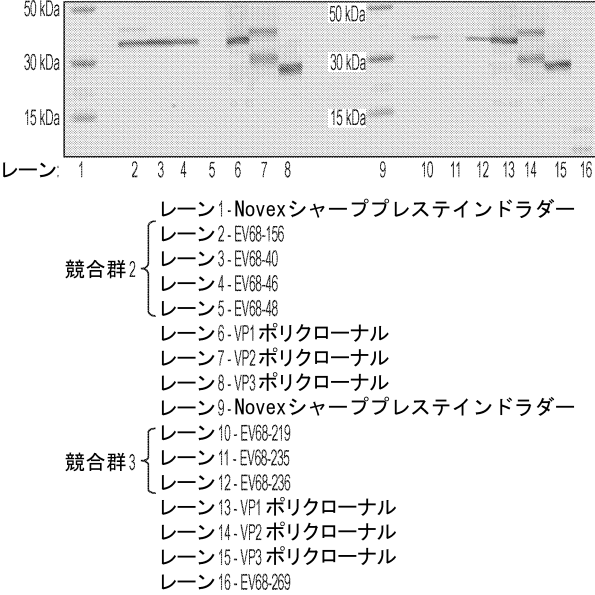
40

50

【図 39】



【図 40】



【図 41-1】

競合群	mAb	中和IC ₅₀				結合EC ₅₀				対象	IgG サブタイプ	軽鎖 重鎖	WB
		B1 IL56	D KV53	NIA Femon		B1 MO47	B1 MO49	B1 IL56	B1 IL52	D KV53			
1	159	0.32	>	38,000		21	>	180	28	>	1	L	
	150	16	28,000	2,800		12	56	36	15		1	K	
	95	100	>	>		4,700	2,700	4,800	4,700	23,200	3	L	
	266	250	70	>		57	14	>	4,200	30	5	L	
	41	2,400	>	>		73	390	59	49	>	3	L	
	98	2,400	>	>		13,000	68,000	52,000		>	3	K	
	231	6,700	>	>		>	>	>	>	>	3	K	
	178	16,000	>	>		>	>	>	>	>	3	K	
	162	27,000	>	>		52	2,300	94	48	>	10	K	
	161	>	>	>		1,700	>	50,000	2,000	>	8	K	
	242	>	>	>		160	150	290	48	>	3	L	
	72	>	>	>		23	16	13	48	140	1	L	
	74	>	>	>		100	180	140	490	300	1	L	
	75	>	>	>		>	>	>	>	>	1	L	
	79	>	>	>		7,500	45,000	16,000	95,000	>	3	L	

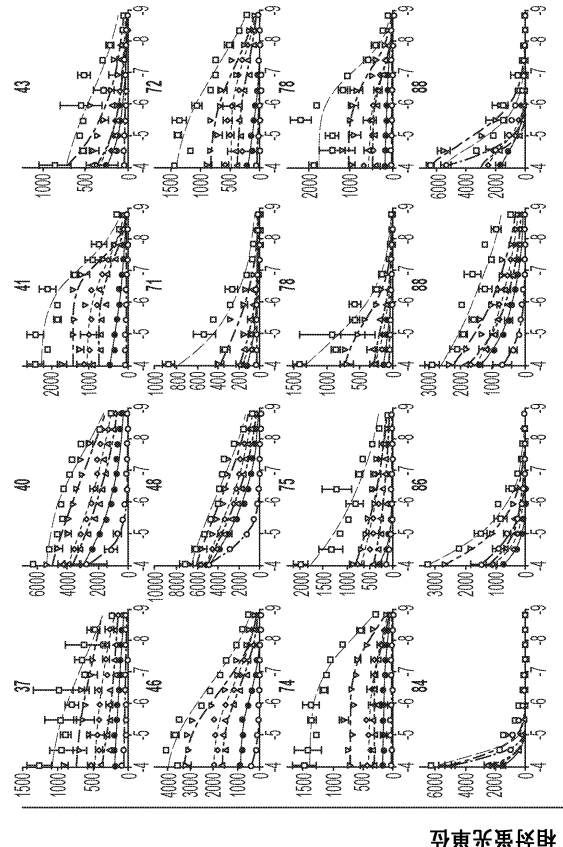
【図 41-2】

競合群	mAb	中和IC ₅₀				結合EC ₅₀				対象	IgG サブタイプ	軽鎖 重鎖	WB
		B1 IL56	D KV53	NIA Femon		B1 MO47	B1 MO49	B1 IL56	B1 IL52	D KV53			
2	198	>	>	>		>	>	>	>	>	1	K	
	210	>	>	>		>	>	>	>	>	1	L	
	220	>	>	>		>	>	>	>	>	1	K	
	221	>	>	>		>	>	>	>	>	3	L	
	229	>	>	>		>	>	>	>	>	3	K	
	234	>	>	>		>	>	>	>	>	3	K	
3	271	>	>	>		6.7	8,600	31,000	13,000	56,000	5	K	
	40	62	>	3,300		26	65,000	170	18,000	>	5	K	
	48	11	5.2	>		210	20,000	940	11,000	46,000	5	K	
	46	42	16,000	>		290	7,500	630	320	640	5	K	
	156	370	>	>		64	40	51	36	31	3	L	
	219	>	>	>		1,100	300	340	370	370	1	K	
4	235	>	>	>		1,400	940	1,100	310	10,000	3	L	
	236	>	>	>		400	550	340	200	64,000	3	L	
	163	1.6	>	>		>	>	>	>	>	2	L	
	105	31	12	11		45	430	320	620	10,000	5	K	
	228	37	52	52		55	62	78	54	>	3	K	
	43	37	1,700	2,200		>	>	>	>	>	5	K	
5	208	790	4,200	36,000		>	>	>	>	>	1	K	
	152	1,700	740	19,000		70,000	>	>	>	>	1	K	

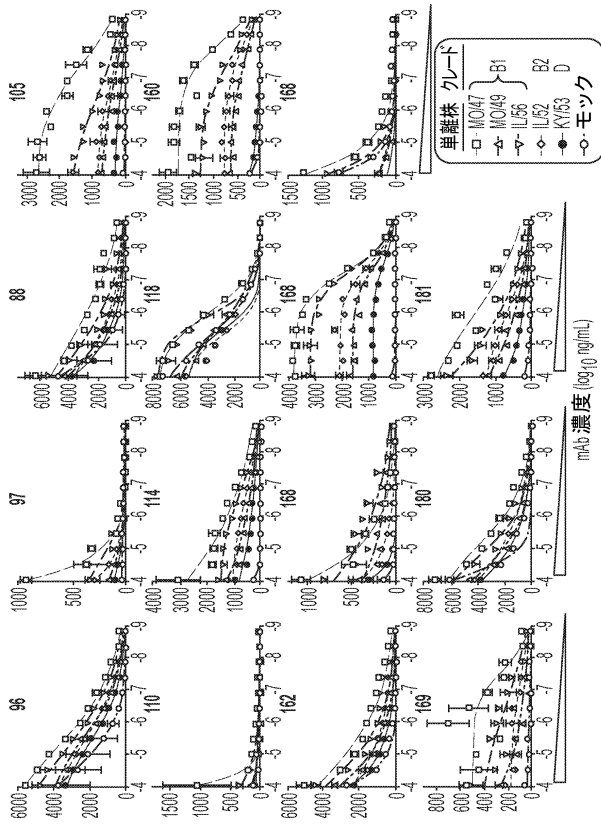
【図 4 1 - 3】

4	88	30,000	>	>	>	>	3	L
	227	32,000	>	>	480	400	3	K
	241	38,000	>	13,000	820	900	3	K
	185	38,000	>	11	28,000	9.2	1	K
5	247	40,000	>	>	17	14	5	L
	37	>	>	>	>	13	5	L
	224	>	>	>	>	>	3	K
	254	>	>	>	>	>	5	K
5	166	55	48,000	>	>	>	1	L
	97	73	>	>	56,000	>	5	L
	85	14	3,000	13,000	>	>	3	K
	225	310	>	>	62,000	73,000	3	L
	269	>	>	>	65,000	>	5	L
	84	>	>	>	55,000	69,000	3	L
	89	>	>	>	40,000	55,000	3	L
	158	>	>	>	27,000	43,000	4	L
	164	>	>	>	30,000	32,000	11	K
	71	>	>	>	>	26,000	1	K
	76	>	>	>	13,000	16,000	1	L
	110	>	>	>	>	>	12	L
5	116	>	>	>	12,000	17,000	1	L
	165	>	>	>	12,000	17,000	3	L
	>	>	>	>	>	>	1	L

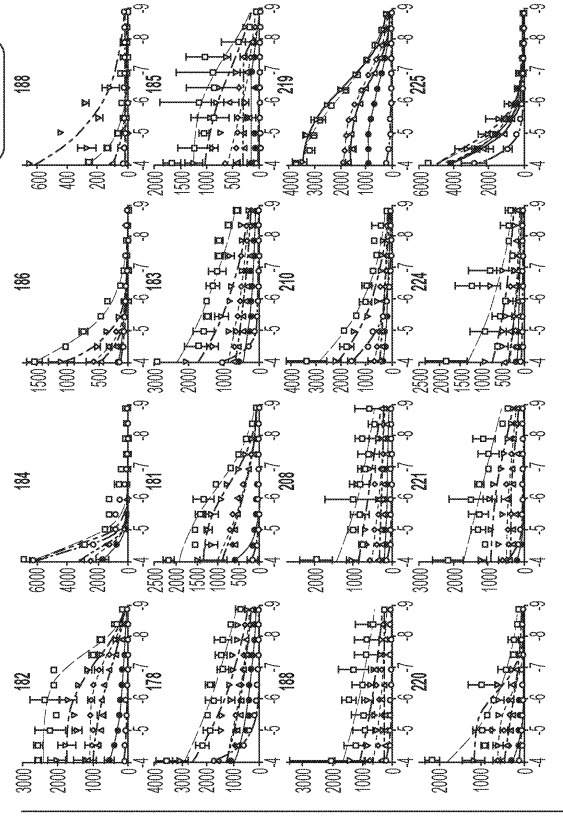
【図 4 2 - 1】



【図 4 2 - 2】



【図 4 2 - 3】



相対蛍光強度

相対蛍光強度

10

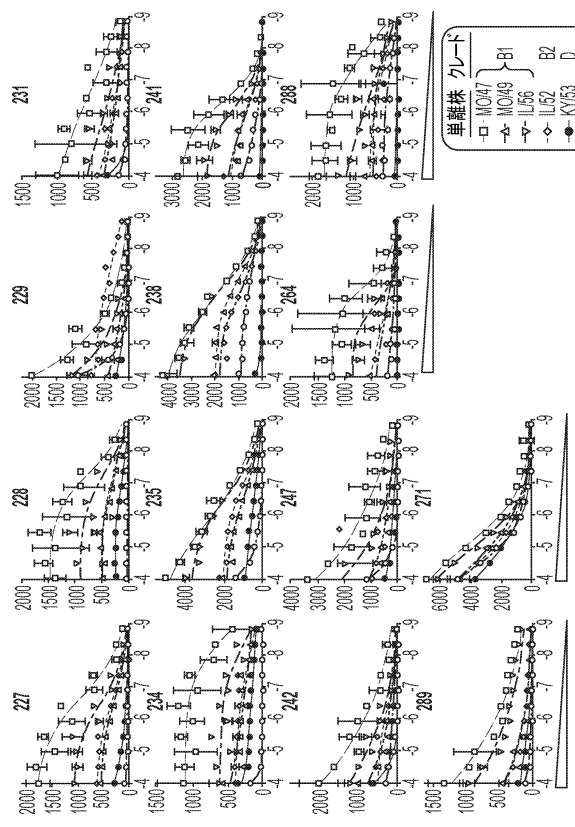
20

30

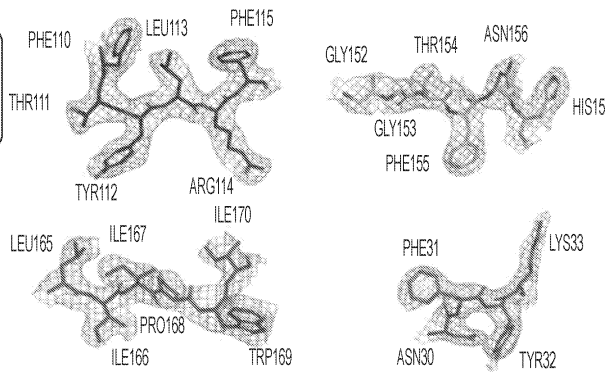
40

50

【図 4 2 - 4】



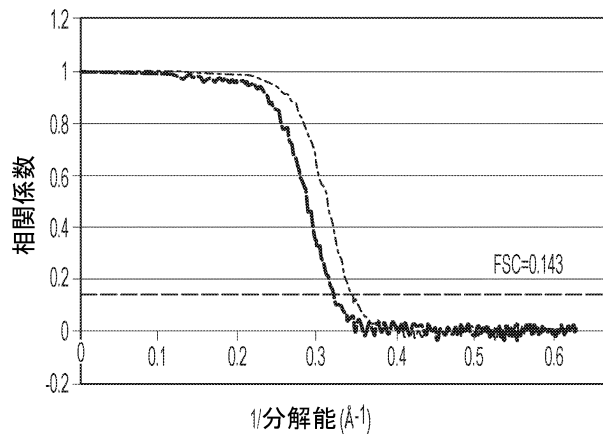
【図 4 3】



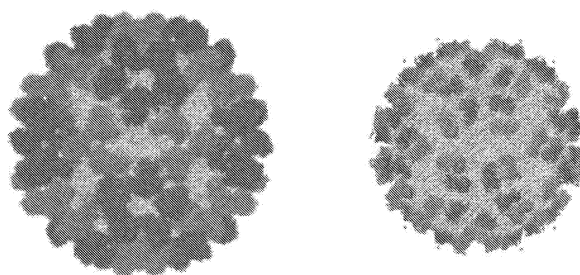
10

20

【図 4 4】



【図 4 5】

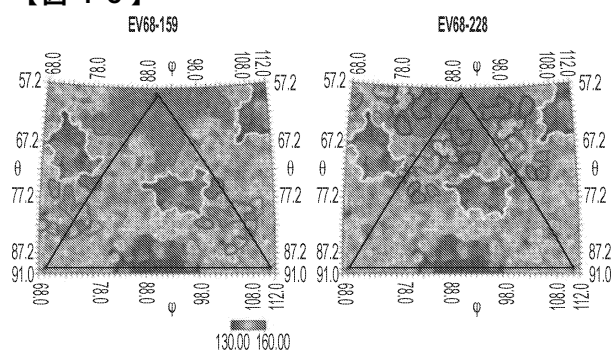


30

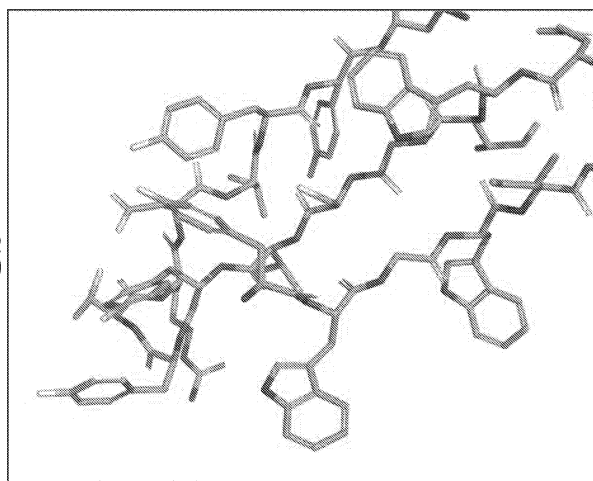
40

50

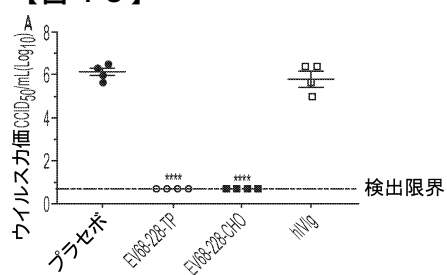
【図 4 6】



【図 47】



【図 48】



【図 49】

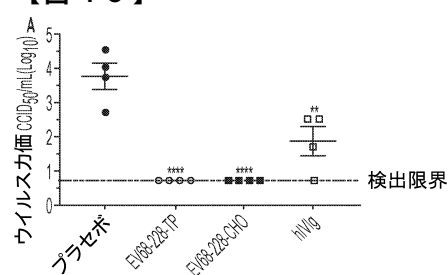


Figure 10: Scatter plot showing the concentration of *Salmonella* in the feces of mice (log10 CFU/g) for each group. The y-axis is labeled "ウイリスカ価 (log10) CFU/g糞" and ranges from 0 to 8. The x-axis shows four groups: プラセボ (Placebo), EV68-228-TP, EV68-228-CHO, and n/wg. A horizontal dashed line at approximately 0.5 log10 CFU/g indicates the detection limit (検出限界). The Placebo group shows high concentrations (around 6.5 log10 CFU/g). The EV68-228-TP and EV68-228-CHO groups show concentrations below the detection limit (around 0.5 log10 CFU/g). The n/wg group shows concentrations around 6.5 log10 CFU/g.

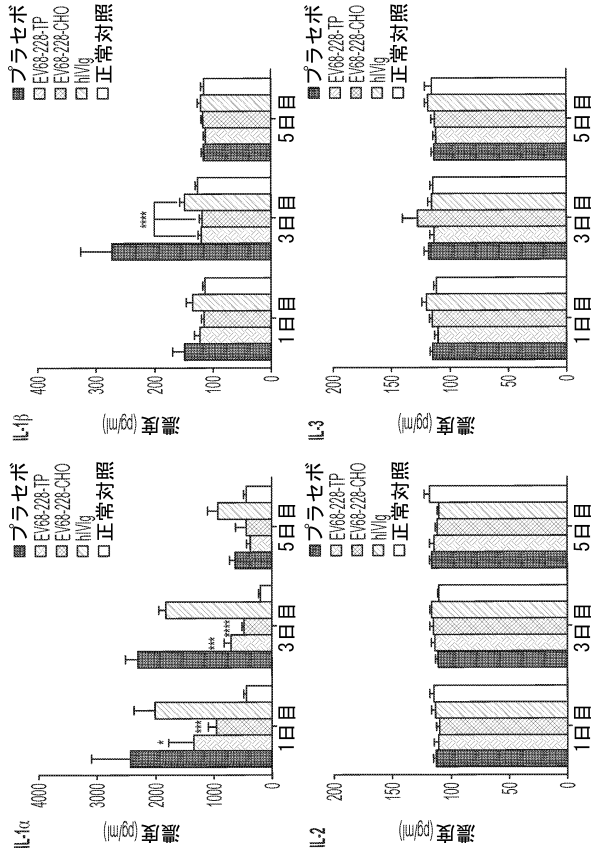
Figure 8 is a scatter plot showing the concentration of collagen in the urine (log10) for each group. The y-axis is labeled 'コラーゲン尿濃度 (log10)' and ranges from 0 to 5. The x-axis shows four groups: プラセボ (Placebo), E168-228-TP, E168-228-CNO, and H11g. A dashed horizontal line at y=1 indicates the '検出限界' (Detection Limit). Individual data points are shown as circles, and the mean with standard deviation is shown as a horizontal line with error bars. The Placebo group has a mean around 3.3. The E168-228-TP and E168-228-CNO groups have means around 0.8, with '***' indicating statistical significance. The H11g group has a mean around 1.8.

Figure 1 is a scatter plot showing the log₁₀ concentration of *C. jejuni* in feces (CFU/g) for various groups. The y-axis is labeled 'ウイルスカ価 (Log10) CFU/g (検出限界)' and ranges from 0 to 8. The x-axis shows four groups: プラセボ (Placebo), E168-228-TP, E168-228-CHO, and HIVg. The Placebo group has a mean around 4.5. The E168-228-TP and E168-228-CHO groups have means around 0.8, with individual data points marked with asterisks (****) indicating statistical significance. The HIVg group has a mean around 4.0, with individual data points marked with double asterisks (**). A horizontal dashed line at approximately 0.5 is labeled '検出限界' (Detection Limit).

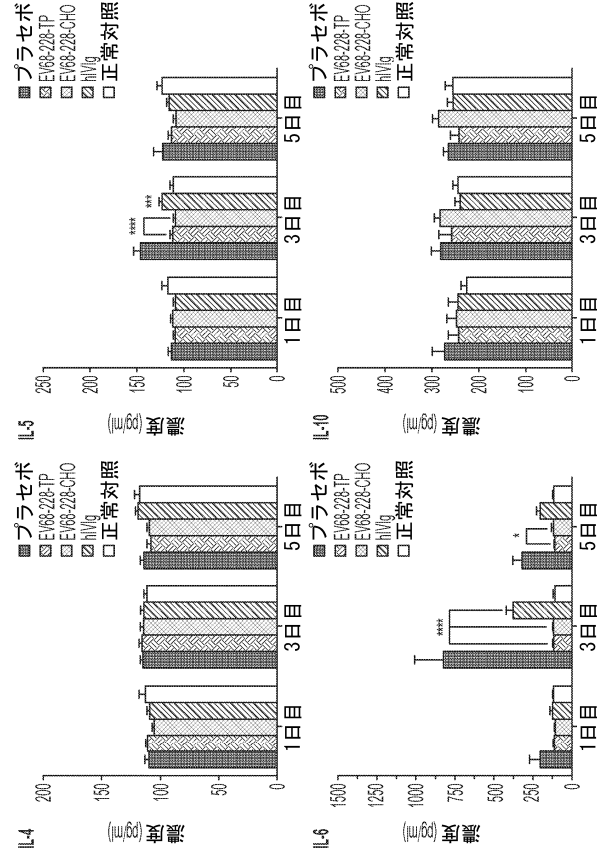
Figure 1 is a scatter plot showing the viral load (log₁₀ copies/mL) of the H5N1 virus in the feces of mice. The y-axis is labeled 'ウイルスカ価 (log₁₀ copies/mL)' and ranges from 0 to 5. The x-axis shows four groups: 'プラセボ' (placebo), 'EV08-228-IP', 'EV08-228-CHO', and 'HIVg'. A horizontal dashed line at log₁₀ 0.8 is labeled '検出限界' (detection limit). Data points are shown as open circles with error bars. The placebo group has a mean viral load around 1.8. The EV08-228-IP group has a mean around 0.8. The EV08-228-CHO group has a mean around 0.8. The HIVg group has a mean around 0.8. Significance markers are present: ** for EV08-228-IP vs placebo, * for EV08-228-CHO vs placebo, and # for HIVg vs placebo.

Group	Mean Viral Load (log ₁₀ copies/mL)	Significance
プラセボ	~1.8	
EV08-228-IP	~0.8	**
EV08-228-CHO	~0.8	*
HIVg	~0.8	#

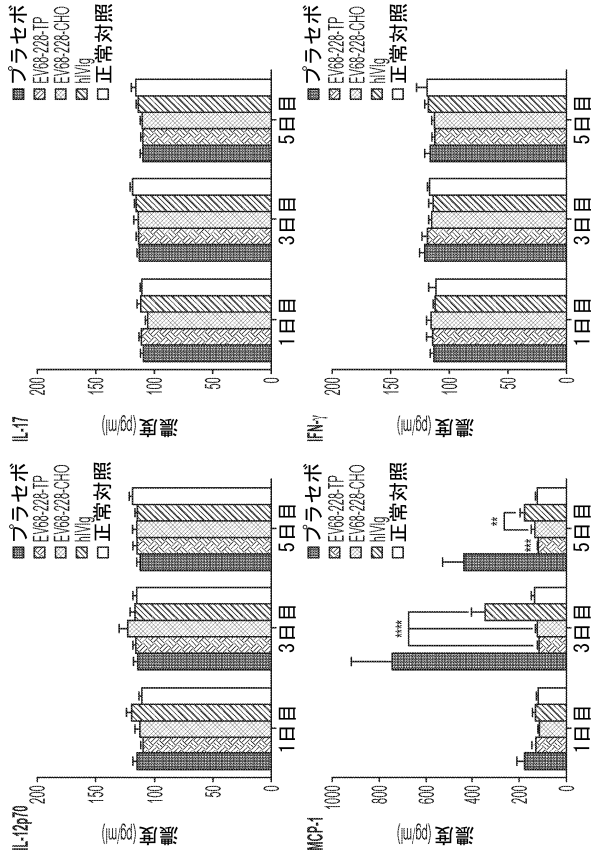
【図 50】



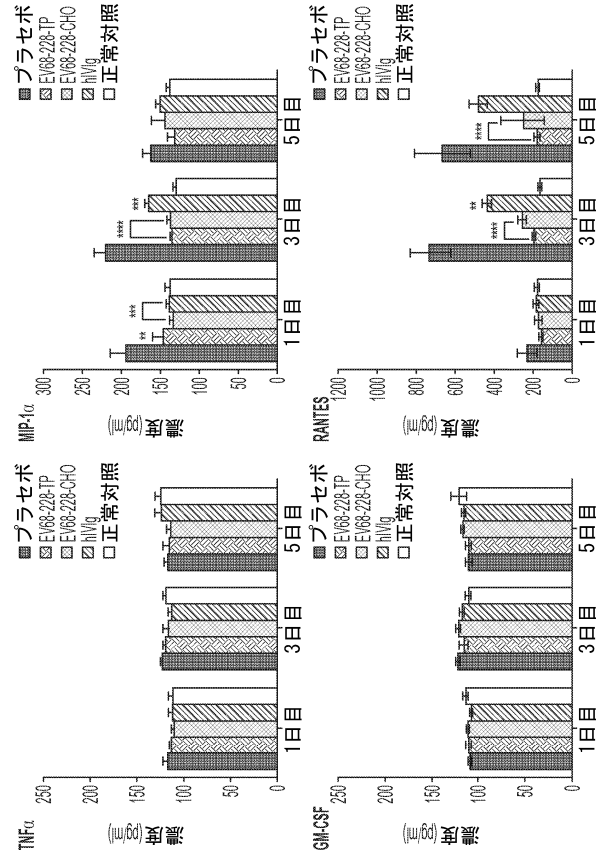
【図 51】



【図 52】



【図 53】



10

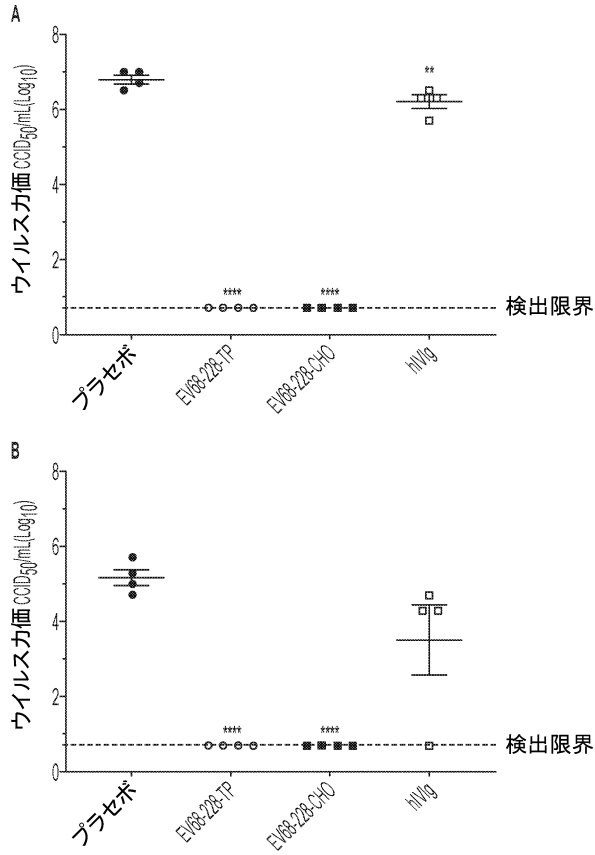
20

30

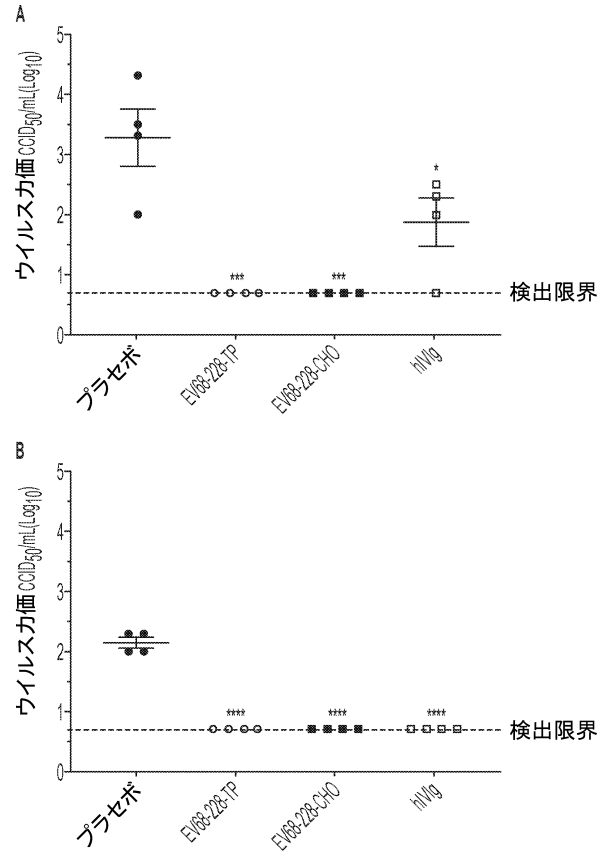
40

50

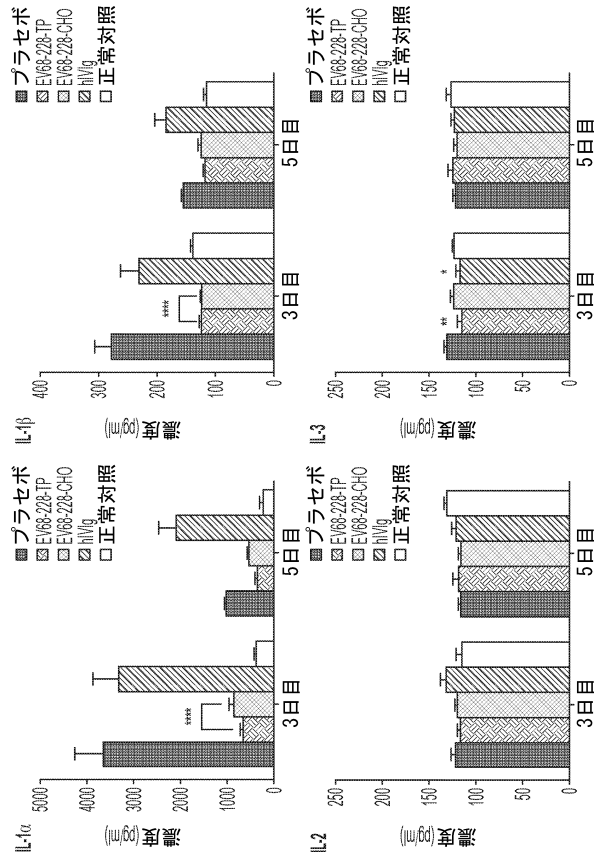
【図 5 4】



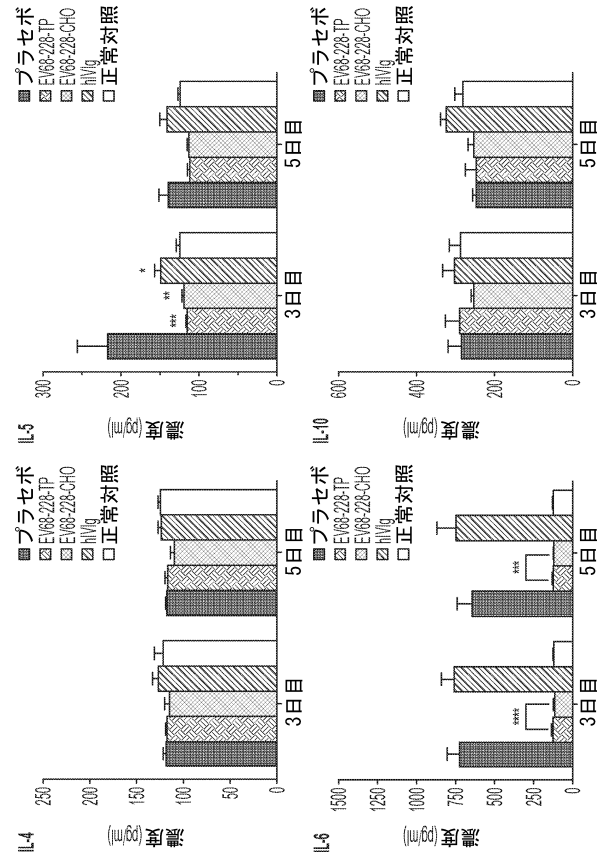
【図 5 5】



【図 5 6】



【図 5 7】



10

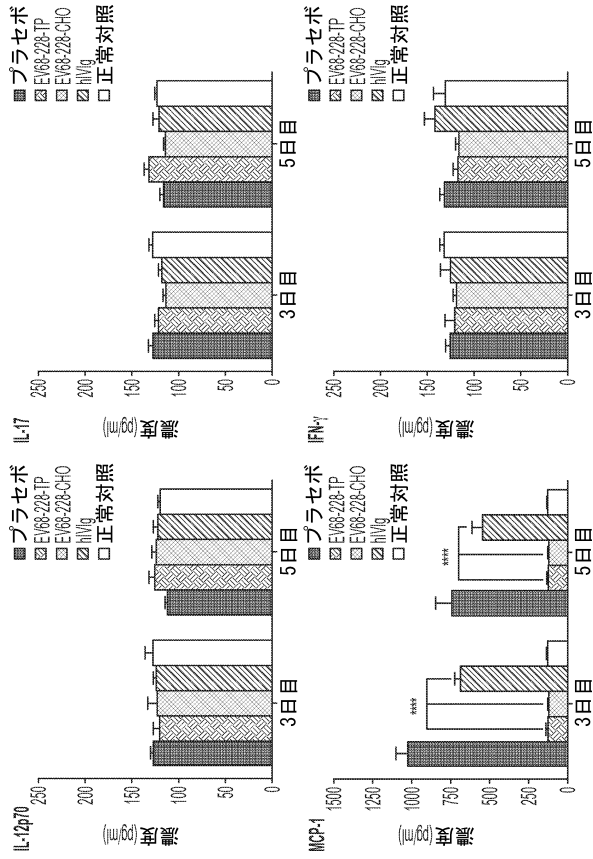
20

30

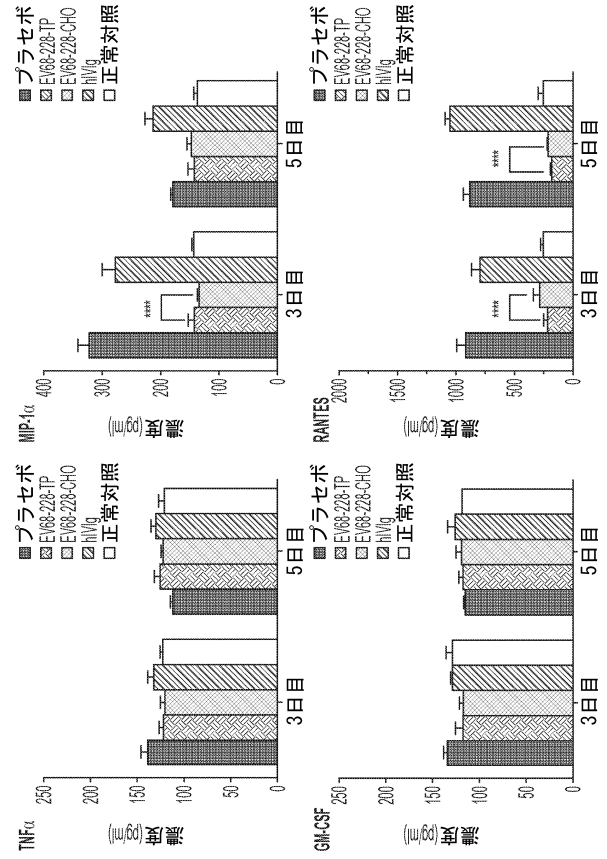
40

50

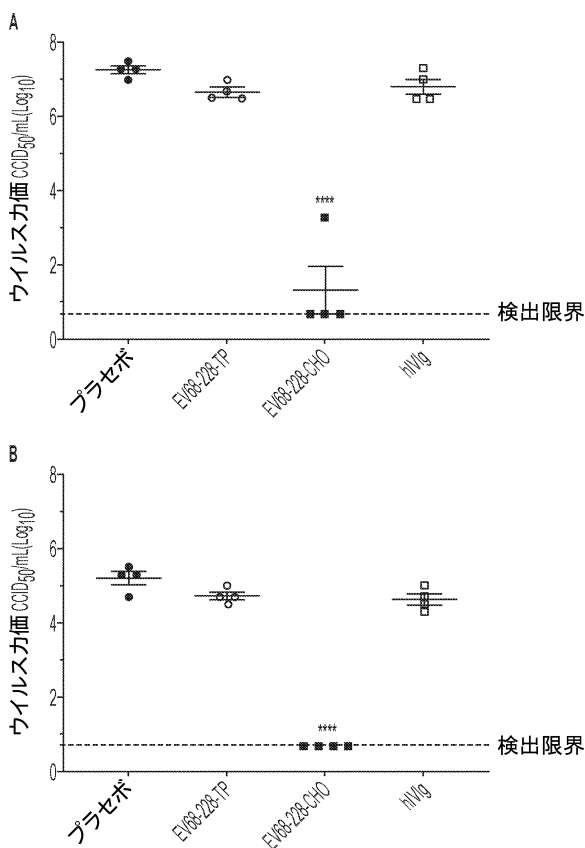
【図 58】



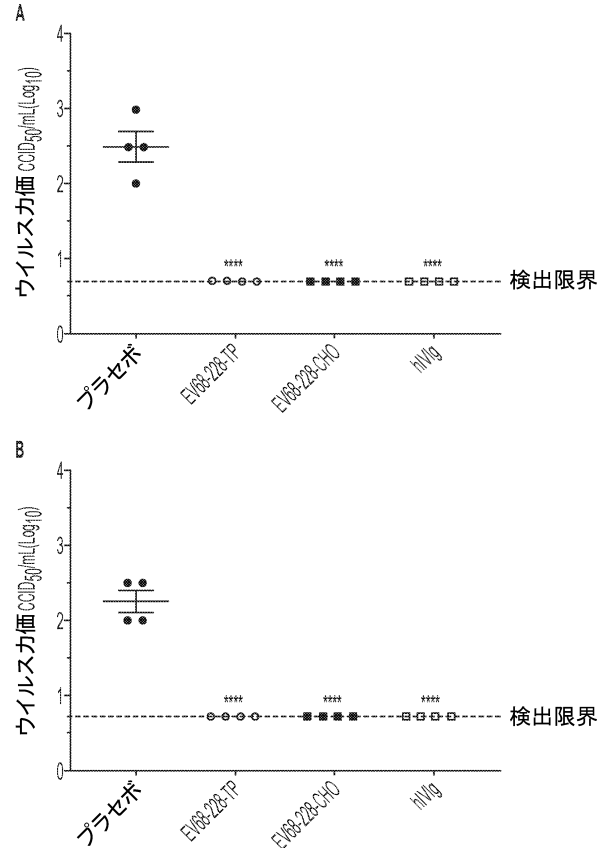
【図 59】



【図 60】



【図 61】



10

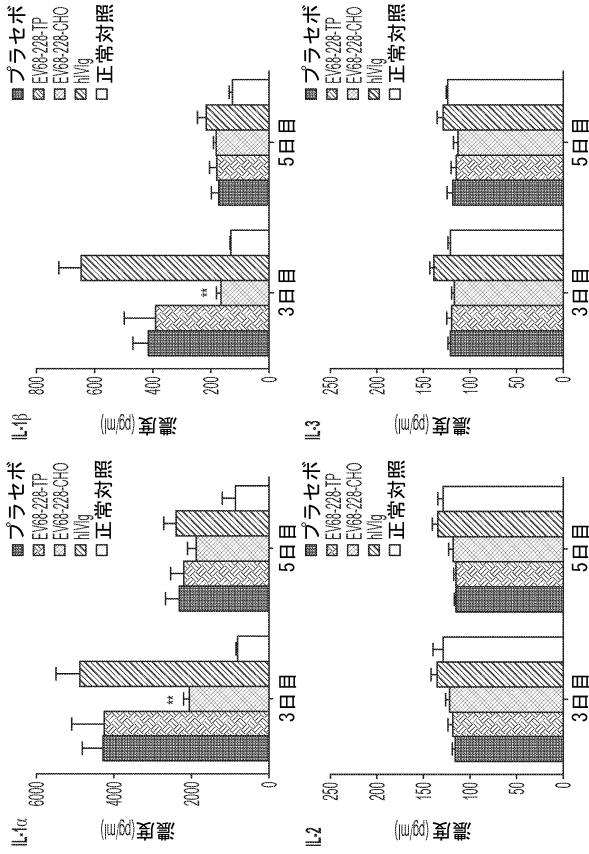
20

30

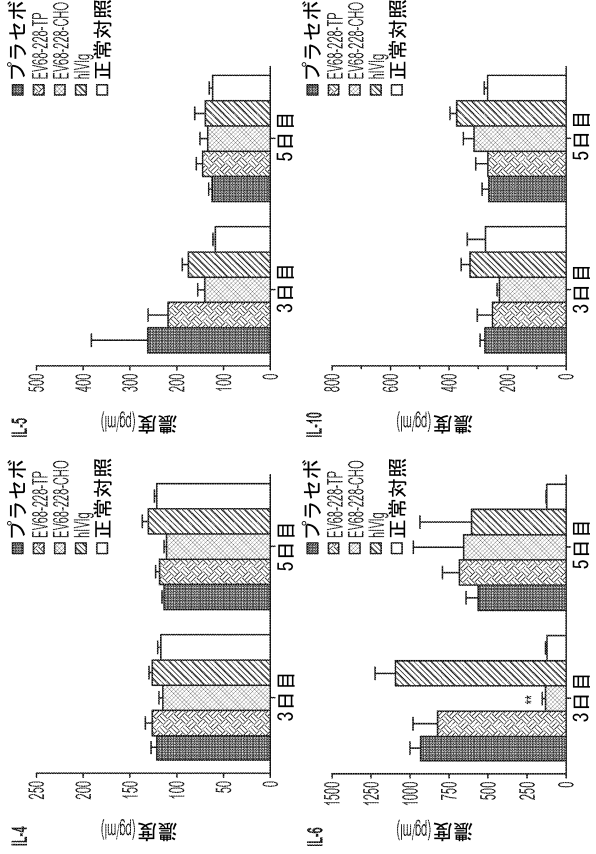
40

50

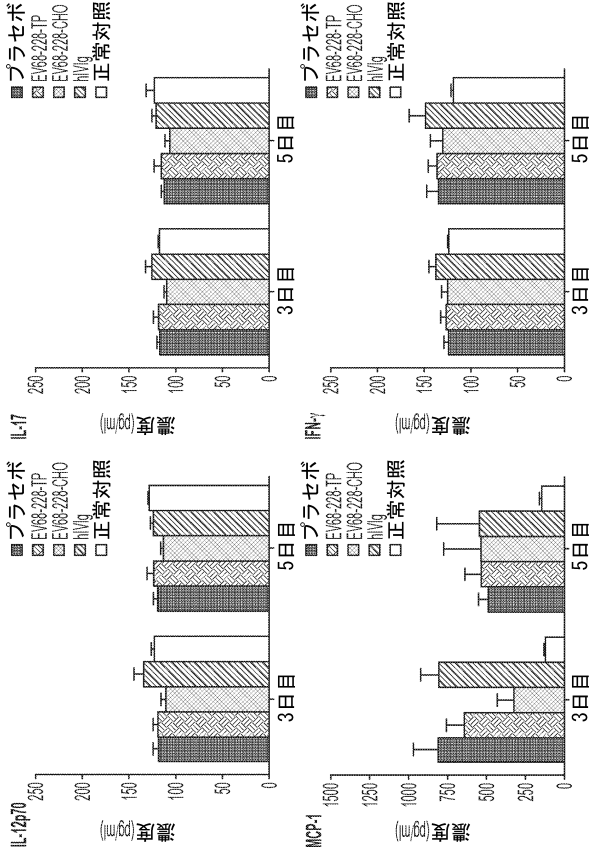
【図 6 2】



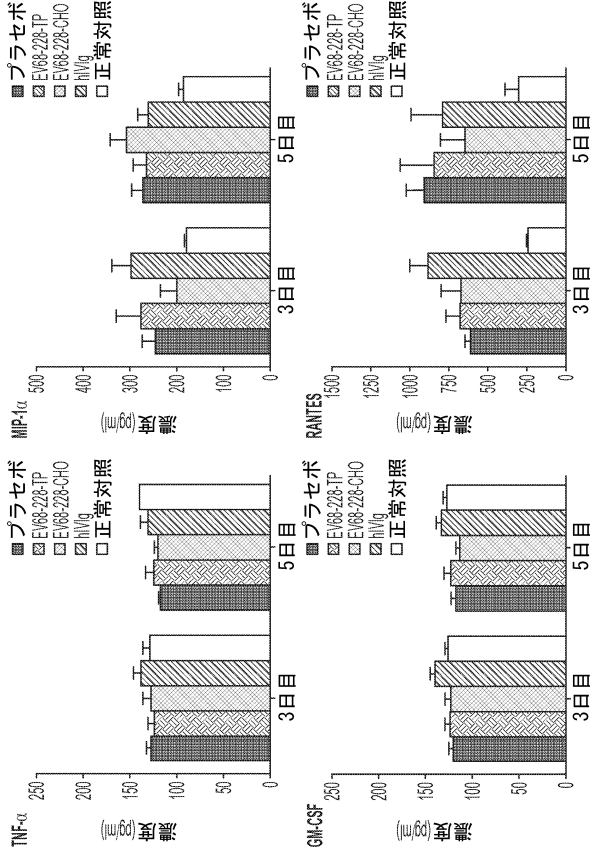
【図 6 3】



【図 6 4】



【図 6 5】



10

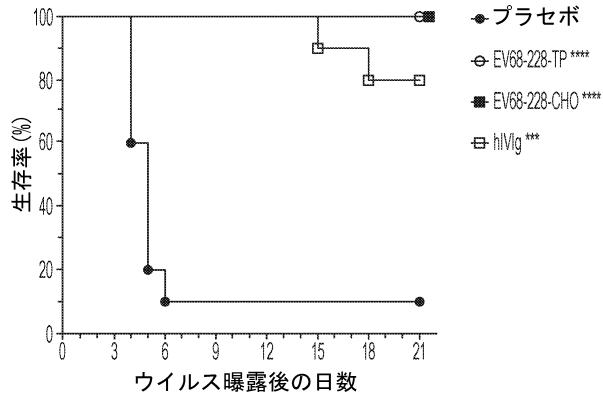
20

30

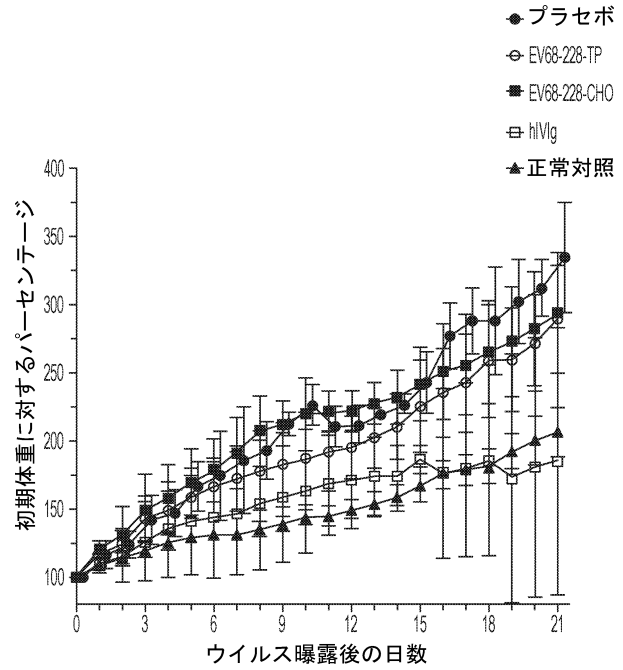
40

50

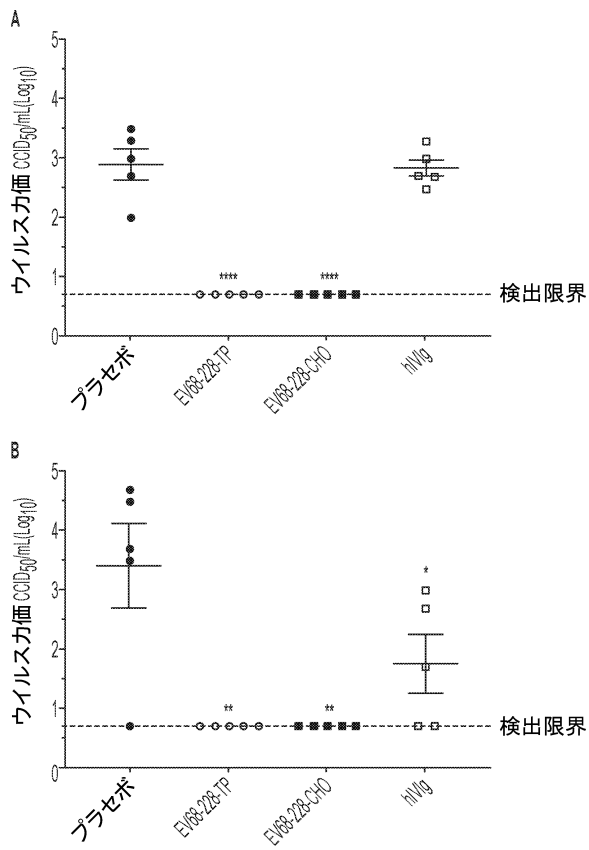
【図 6 6】



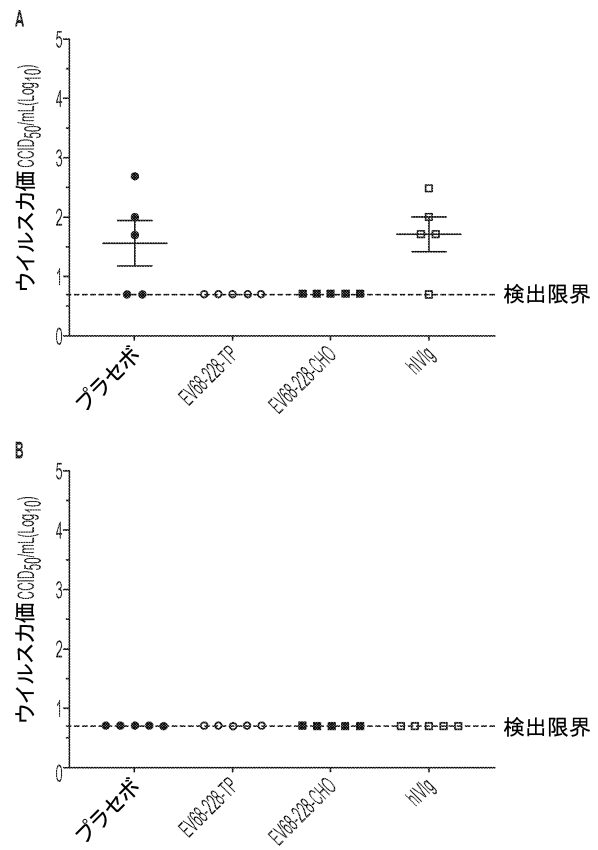
【図 6 7】



【図 6 8】



【図 6 9】



10

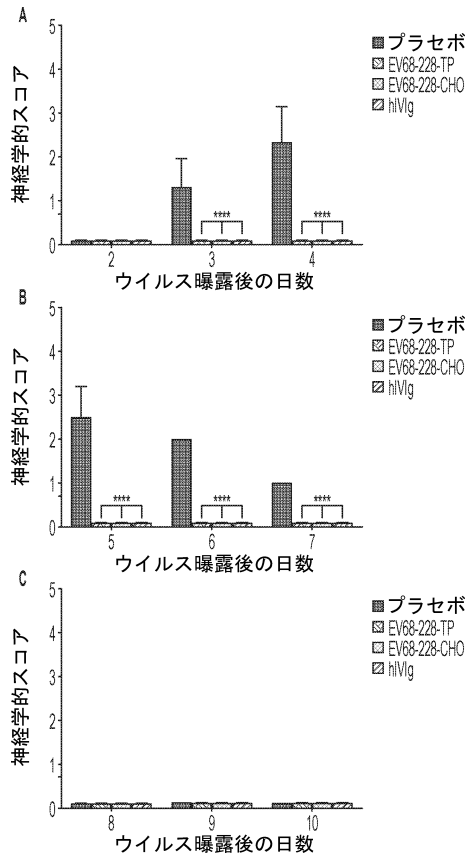
20

30

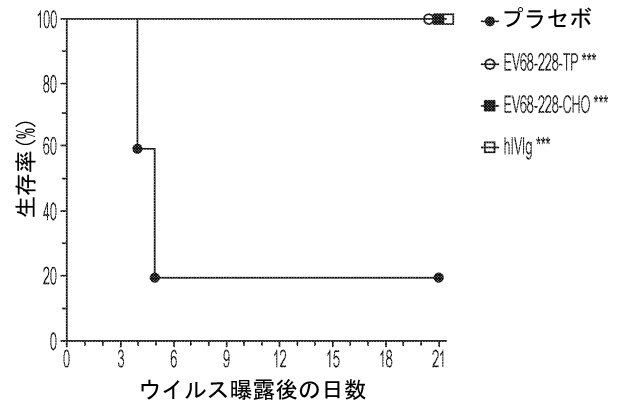
40

50

【図 70】



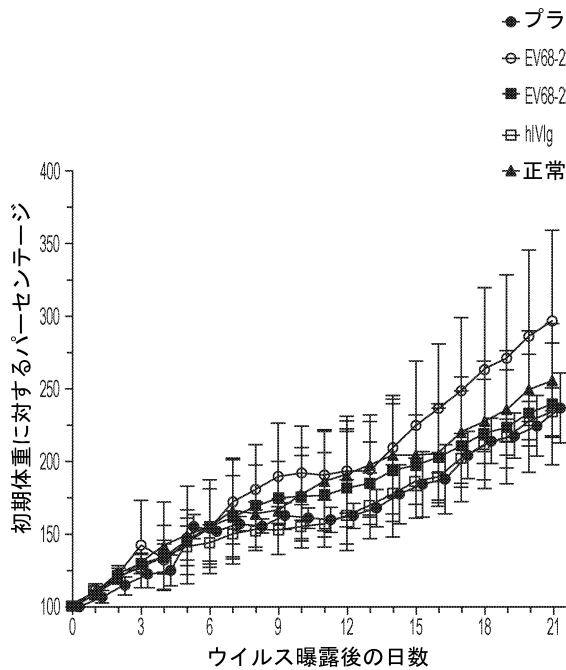
【図 71】



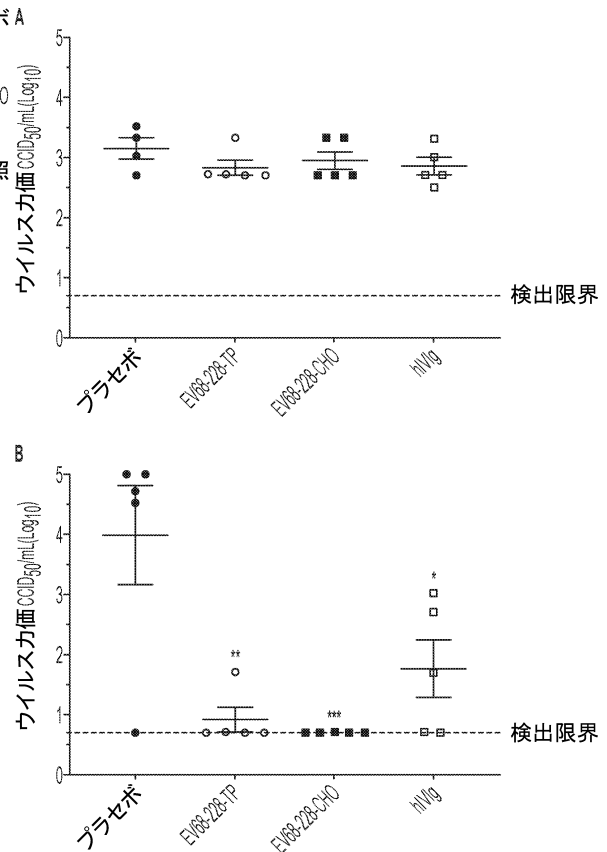
10

20

【図 72】



【図 73】

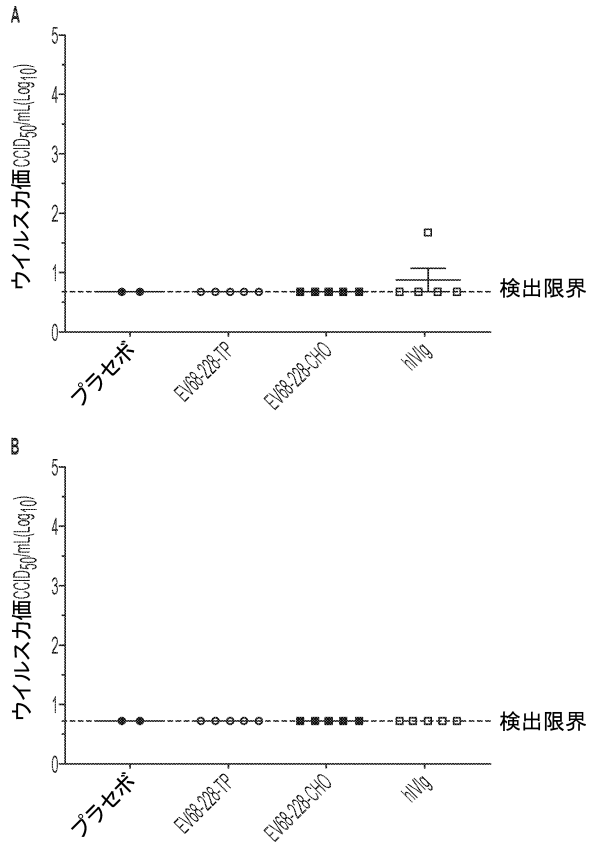


30

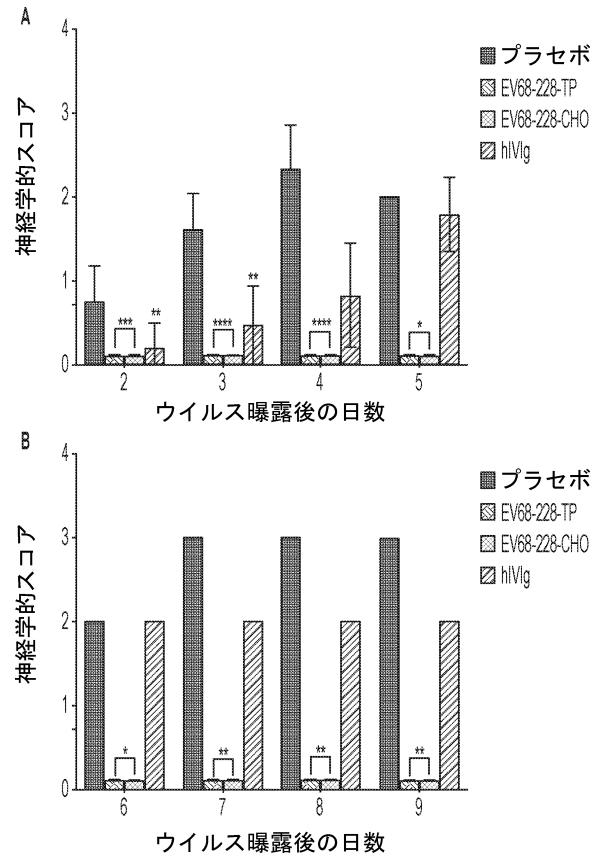
40

50

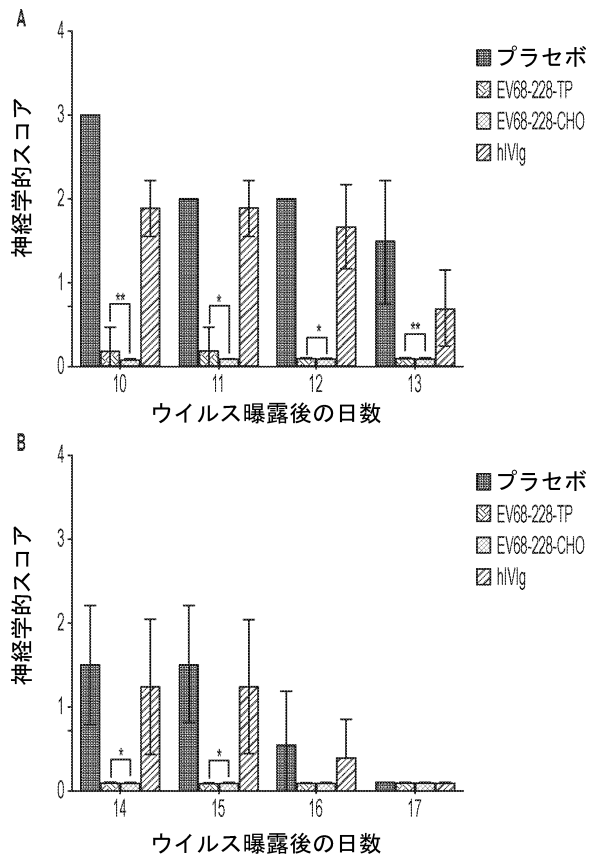
【図 7 4】



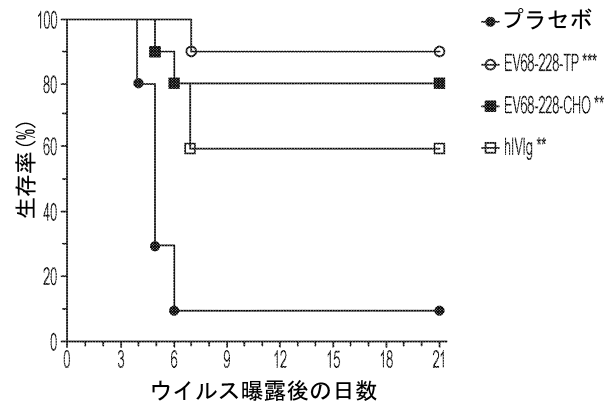
【図 7 5】



【図 7 6】



【図 7 7】



10

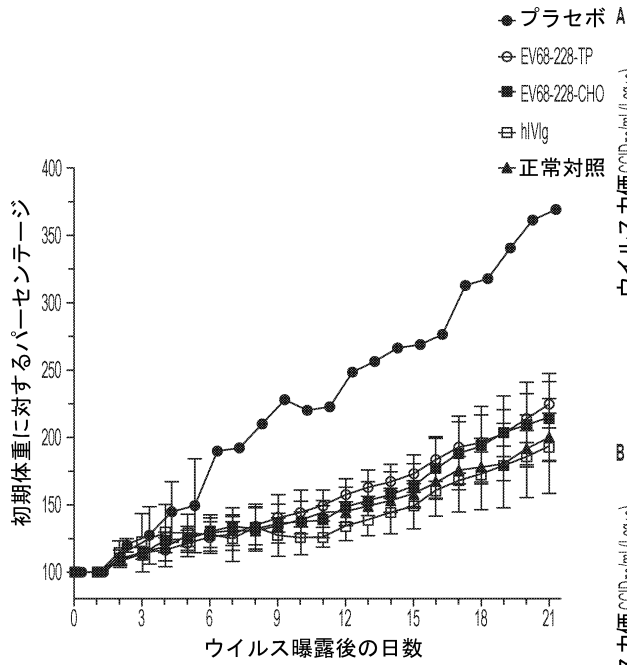
20

30

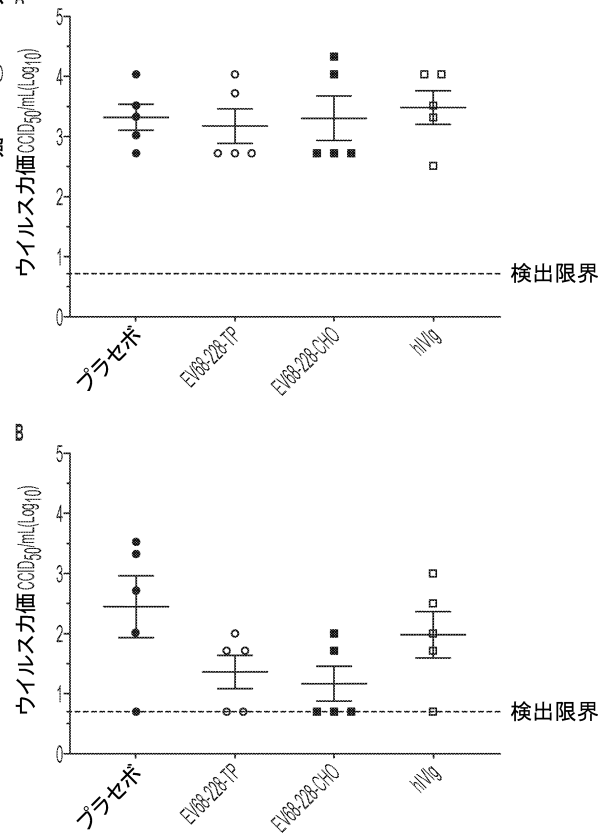
40

50

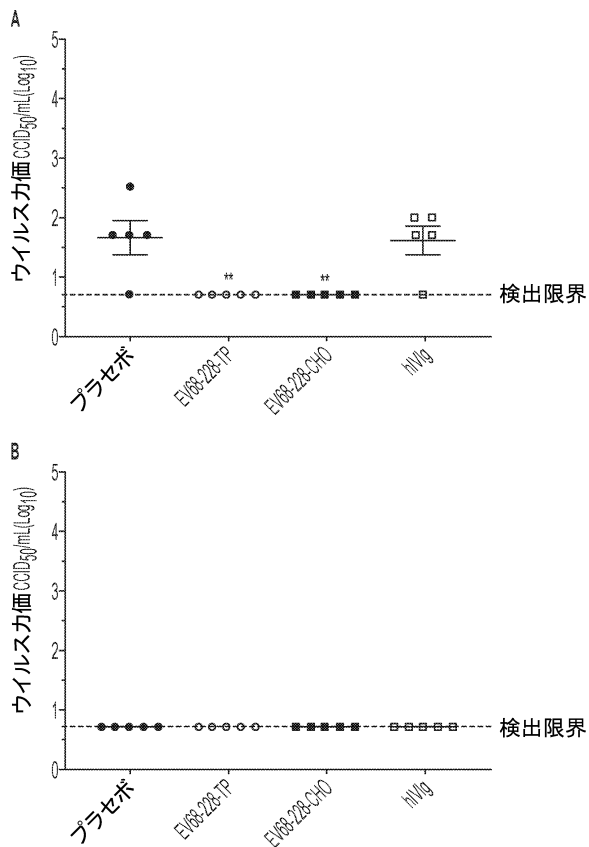
【図 78】



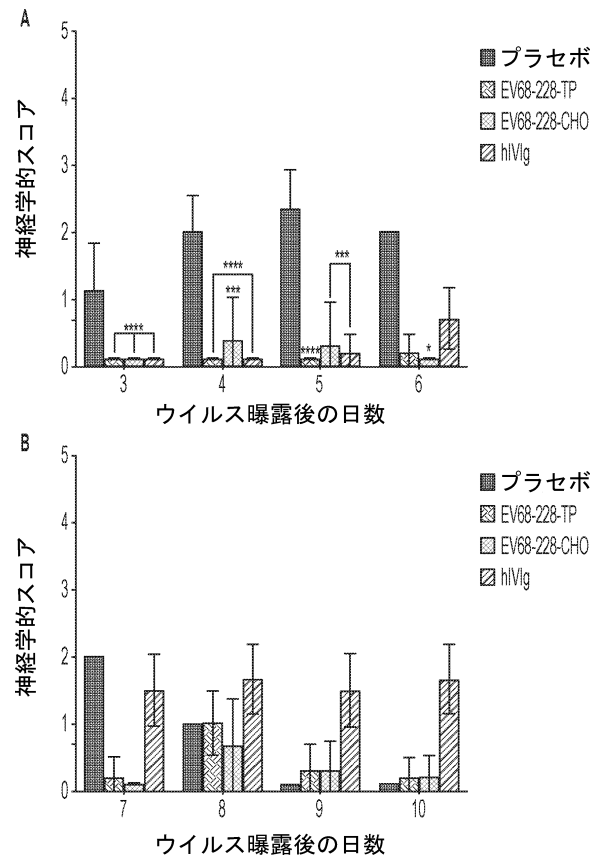
【図 79】



【図 80】



【図 81】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007644087000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 31/4245(2006.01)
 C 0 7 K 16/10 (2006.01)
 C 1 2 N 5/20 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 G 0 1 N 33/569(2006.01)
 C 0 7 D 413/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 0 7 K 14/085(2006.01)

F I

A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 31/711
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 31/4245
 C 0 7 K 16/10
 C 1 2 N 5/20
 C 1 2 N 5/10
 G 0 1 N 33/569
 C 0 7 D 413/12
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/63
 C 0 7 K 14/085

L

Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/899,503

(32)優先日 令和1年9月12日(2019.9.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クロウ ジュニア ジェームズ イー.

アメリカ合衆国 3 7 2 1 2 テネシー州 ナッシュビル トウェンティース アベニュー サウス 2
 1 0 1

(72)発明者 フォークト マシュー アール.

アメリカ合衆国 3 7 2 3 2 テネシー州 ナッシュビル トウェンティファースト アベニュー サ
 ウス 1 1 6 1 ディー 7 2 3 5 エムシーエヌ

審査官 林 康子

(56)参考文献 Nature Microbiology, 2019年, Vol.4, pp.124-133, published online 5 Nov 2018

J Immunol, 2018年, Vol.201, No.9, pp.2557-2569

SCIENCE IMMUNOLOGY, 2020年07月03日, Vol 5, No. 49, pp.1-28

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 3

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