

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6595448号
(P6595448)

(45) 発行日 令和1年10月23日(2019.10.23)

(24) 登録日 令和1年10月4日(2019.10.4)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A S
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y
C O 7 K 16/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
	C O 7 K 16/10

請求項の数 39 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2016-502667 (P2016-502667)	(73) 特許権者	514284475
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014. 3. 14)		コントラフェクト コーポレーション
(65) 公表番号	特表2016-519074 (P2016-519074A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1070
(43) 公表日	平成28年6月30日 (2016. 6. 30)		1, ヨンカーズ, ウェルズ アベニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/027939		ー 28 - 3アールディー フロア
(87) 国際公開番号	W02014/152841	(74) 代理人	100120293
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014. 9. 25)		弁理士 中谷 智子
審査請求日	平成29年3月13日 (2017. 3. 13)	(72) 発明者	ヴィッテキンド, マイケル
(31) 優先権主張番号	61/782, 661		アメリカ合衆国, ニューヨーク州, ヨンカ
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		ーズ, ウェルズ アベニュー 28, サード
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	ヴィジル, アダム
			アメリカ合衆国, ニューヨーク州, ヨンカ
			ーズ, ウェルズ アベニュー 28, サード
			フロア
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療効率の増強のために鼻腔内送達する中和抗体に基づく組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異なる特異性を有する2つ以上のインフルエンザウイルス中和IgGモノクローナル抗体を、1mg/kg以下の単回単位投与量で含む、鼻腔内(IN)または吸入投与用に製剤化されており、かつ哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染の治療または予防に有効な組成物であって、

ここで、少なくとも1つの第一の抗体がインフルエンザAウイルスに対する抗体であり、かつ、

少なくとも1つの抗体が前記第一の抗体が認識するインフルエンザAウイルスとは異なる系統学的なグループのインフルエンザAウイルス若しくはインフルエンザBウイルスに対する抗体であるか、又は、少なくとも2つの前記抗体が前記第一の抗体が認識するインフルエンザAウイルスとは異なるグループのインフルエンザAウイルスに対する抗体及びインフルエンザBウイルスに対する抗体を含む、組成物。

【請求項 2】

前記一または複数のインフルエンザウイルス中和モノクローナル抗体を、各々0.5mg/kg未満の単回単位投与量で含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記一または複数のインフルエンザウイルス中和モノクローナル抗体を、各々0.1mg/kg未満の単回単位投与量で含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記—または複数のインフルエンザウイルス中和モノクローナル抗体を、各々0.05 mg/kg未満の単回単位投与量で含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記—または複数のインフルエンザウイルス中和モノクローナル抗体は、中和の能力があり、かつFab、Fab'、およびF(ab')₂から選択される抗体フラグメントである、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

薬学的に許容される賦形剤、担体もしくは希釈剤、経鼻もしくは肺送達用の添加剤、または免疫学的メディエータもしくは免疫応答刺激剤をさらに含む、請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項7】

インフルエンザA H1ウイルスを中和する能力がある抗体、インフルエンザA H3ウイルスを中和する能力がある抗体、およびインフルエンザBウイルスを中和する能力がある抗体を含む、インフルエンザ中和抗体の組合せを含む、請求項1～請求項6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

インフルエンザウイルスに暴露された、もしくは暴露の危険性がある、または呼吸器ウイルス感染の臨床症状が出現している、哺乳動物におけるインフルエンザウイルスの治療または予防に用いられる、請求項1～請求項7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】

20

前記抗体は、感染後24時間までの期間に投与されるためのものである、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項10】

前記抗体は、感染後48時間までの期間に投与されるためのものである、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】

前記抗体は、感染後72時間までの期間に投与されるためのものである、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項12】

前記抗体は、ウイルスへの感染もしくは暴露の前に、またはウイルス疾患もしくはウイルス疾患に付随する症状の臨床的な出現の前に、—または複数の投与で投与されるためのものである、請求項1～請求項8のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項13】

前記抗体は、各々1 mg/kg体重未満の単回投与量で投与される、請求項1～請求項12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

前記抗体は、1投与量あたり1 mg/kg未満の複数回投与で鼻腔内または吸入投与されるものであり、前記複数回投与は、少なくとも2時間の間をおいて行われるものであり、1回目の投与は、推定される感染、暴露、または臨床症状の出現の72時間後までに行われるものである、請求項1～請求項13のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項15】

腹腔内(IP)または静脈内(IV)に投与されるための追加のインフルエンザウイルス特異的なモノクローナル抗体と同じ抗体をさらに含み、ここで、前記追加の抗体は、中和抗体または非中和抗体である、請求項1～請求項14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

前記追加の抗体は、鼻腔内(IN)または吸入投与される抗体と同一である、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記追加の抗体が、鼻腔内(IN)または吸入投与される抗体の前に、同時に、逐次的に、または後に投与される、請求項15又は請求項16に記載の組成物。

50

【請求項 18】

異なる特異性を有する2つ以上のインフルエンザウイルスに対する中和IgGモノクローナル抗体を含有する第一の組成物、ここで、前記第一の組成物は1mg/kg以下の投与量で投与され鼻腔内(IN)または吸入投与用である；及び

腹腔内(IP)または静脈内(IV)投与用の第二の組成物、ここで、前記第二の組成物は、1mg/kg以上の投与量で投与される1つ以上の腹腔内(IP)または静脈内(IV)投与用の抗インフルエンザ抗体を含有する、

を含む予防用又は治療用の組成物の組み合わせであって、

ここで、前記第二の組成物の抗体が前記第一の組成物の抗体と同一または異なる抗体である、予防用又は治療用の組成物の組み合わせ組成物。

10

【請求項 19】

前記第二の組成物の抗体は、非中和抗体である、請求項18に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 20】

前記第二の組成物の投与量が、少なくとも5mg/kgである、請求項18又は請求項19に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 21】

前記第二の組成物の投与量が、前記第一の組成物の投与量よりmg/kgにおいて少なくとも10倍高い、請求項18又は請求項19に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 22】

前記第一の組成物の単回単位投与量は、0.5mg/kg未満である、請求項18～請求項21のいずれか1項に記載の組み合わせ組成物。

20

【請求項 23】

前記第一の組成物が、推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後24時間以内に投与されるためのものである、請求項18～請求項22のいずれか1項に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 24】

前記第一の組成物が、推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後48時間以内に投与されるためのものである、請求項18～請求項22のいずれか1項に記載の組み合わせ組成物。

30

【請求項 25】

前記ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後48時間以内に投与されるためのものである、請求項18に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 26】

前記ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後24時間以内に投与されるためのものである、請求項18に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 27】

前記ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後24時間より後で72時間以内に投与されるためのものである、請求項18に記載の組み合わせ組成物。

40

【請求項 28】

前記ウイルス中和抗体は、暴露、または臨床症状出現の前に、一または複数の投与で投与されるためのものである、請求項18に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 29】

前記第一の組成物は、0.1mg/kg未満の投与量で投与されるためのものである、請求項18～請求項28のいずれか1項に記載の組み合わせ組成物。

【請求項 30】

鼻腔内(IN)または吸入投与用に製剤化されており、かつ哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染の治療または予防に有効な組成物であって、

インフルエンザA H1ウイルス及びインフルエンザA H3ウイルスのいずれか一方

50

又は両方を中和する能力を有する抗体を少なくとも1つ含み、かつ、山形及び/又はピクトリア系列を含むインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する抗体を1つ以上を含む二つ以上の抗体を単回単位投与量1mg/kgで含み、かつ、薬学的に許容される賦形剤、担体もしくは希釈剤を含み、

ここで、前記二つ以上の抗体は以下の組み合わせのいずれか1つを含む：

インフルエンザA H1ウイルスを中和する能力を有する抗体、インフルエンザA H3ウイルスを中和する能力を有する抗体、及び山形及び/又はピクトリア系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する1つ以上の抗体；

インフルエンザA H1ウイルスを中和する能力を有する抗体、及び山形及び/又はピクトリア系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する1つ以上の抗体；

インフルエンザA H3ウイルスを中和する能力を有する抗体、及び山形及び/又はピクトリア系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する1つ以上の抗体；

インフルエンザA H1ウイルスを中和する能力を有する抗体、山形系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する抗体、及びピクトリア系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する抗体；並びに

インフルエンザA H3ウイルスを中和する能力を有する抗体、山形系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する抗体、及びピクトリア系列のインフルエンザBウイルスを中和する能力を有する抗体。

【請求項31】

前記二つ以上の抗体がIgG抗体である、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後48時間以内に投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項33】

推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後24時間以内に投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項34】

推定される感染、暴露、または臨床症状出現の後24時間より後で72時間以内に投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項35】

暴露、または臨床症状出現の前に、一または複数の投与で投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項36】

該組成物が単回単位投与量0.5mg/kg未満で投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項37】

該組成物が単回単位投与量0.1mg/kg未満で投与されるためのものである、請求項30に記載の組成物。

【請求項38】

前記単回単位投与量が25~200μLの容量である、請求項30に記載の組成物。

【請求項39】

前記インフルエンザAウイルスに対する第一の抗体と、前記第一の抗体が認識するインフルエンザAウイルスとは異なるグループのインフルエンザAウイルスに対する第二の抗体とが、少なくとも二つのHAサブタイプのインフルエンザAウイルスを中和可能である、請求項1に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001] 本発明は、概して、薬剤、特に抗体または抗体の活性化フラグメント、特に中和抗体を、鼻腔内または吸入投与などによって呼吸器に直接投与することによる、呼吸器感

10

20

30

40

50

染体、特にウイルス、特にインフルエンザウイルスの治療または予防のための方法に関する。本発明は、鼻腔内もしくは吸入治療および鼻腔内もしくは吸入処投与に適する組成物、ならびに抗体（複数可）の鼻腔内もしくは吸入投与による、または鼻腔内もしくは吸入投与を抗体の腹腔内もしくは静脈内投与と組み合わせることによる、治療もしくは予防のためのプロトコールおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

[0002] インフルエンザは、主な死亡および疾患の原因であり、上気道および下気道を冒す。インフルエンザウイルスは非常に感染性の強い呼吸器疾患を引き起こし、その結果、米国では過酷な季節の間の入院患者は200000人を超え、死者は36000人を超える。地球規模では、毎年、小児の20%および成人の5%が症候性のインフルエンザを発症する（Nicholson, K. G.ら（2003）Lancet 362: 1733-1745）。罹患率および死亡率は、インフルエンザ株の毒力および宿主の暴露歴、年齢、および免疫状態によって変動する。季節的な流行に加えて、パンデミックインフルエンザ株がある規則性で出現する。主なウイルス抗原に対する既存の免疫性がないため、パンデミックインフルエンザは急速に広まり、しばしば季節性インフルエンザよりも重篤な疾病になり得る（Swartz, K. A. & Luby, J. P.（2007）Tex Med 103: 31-34）。例えば、1918年から1919年までの「スペイン風邪」のパンデミック株は20世紀で最も致死性の高い疫病であり、地球人口の32%に感染し、2000万人を超える死者をもたらした（Webster, R. G.（1999）Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1164-1166）。最近では、2009 H1N1ウイルスは、米国で6100万人に広がり、2009年4月から2010年4月までに推定274000人が入院した（Lagace-Wiens, P. R.ら（2010）Crit Care Med 38:e1-9）。このパンデミックでは、脅威にいかんして対応するかが不確かであったため、学校および商業施設は閉鎖された。

10

20

【0003】

[0003] インフルエンザウイルスには、インフルエンザA、B、およびCの3つの型がある。ヒトインフルエンザAおよびBウイルスは、疾患の季節的流行を起こす。インフルエンザC型の感染は、軽度の呼吸器疾患を起こし、流行を起こすとは考えられていない。インフルエンザAウイルスは、ウイルスの表面上の2つのタンパク質であるヘマグルチニン（H）およびノイラミニダーゼ（N）に基づいて亜型に分けられる。ヘマグルチニンには17の異なる亜型があり、ノイラミニダーゼには10の異なる亜型がある。インフルエンザAウイルスは、異なる株にさらに細分することができる。ヒトに見出されるインフルエンザAウイルスの現在の亜型は、インフルエンザA（H1N1）およびインフルエンザA（H3N2）ウイルスである。インフルエンザBウイルスは亜型に分けられないが、2つの異なる系列にさらに細分することができる。各年のインフルエンザワクチンには、インフルエンザA（H1N1）、A（H3N2）、およびインフルエンザBウイルスが含まれる。

30

【0004】

[0004] ヒト集団には、現時点で、5種類の臨床的に関連のあるインフルエンザウイルスが循環しており、そのうち3種はインフルエンザAであり、2種はインフルエンザBである。インフルエンザA型ウイルスは、2つの異なる系統学的なグループ1とグループ2とに分けられる。グループ1にはヘマグルチニン亜型H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H13、およびH16が含まれる。グループ2には、H3、H4、H7、H10、H15、およびH14が含まれる。現在関連のある循環性のグループ1のインフルエンザAウイルスは亜型H1のものであり、これはヒト起源およびブタ起源のものにさらに分けられ、グループ2の関連のある循環性のウイルスは現在亜型H3のものである。インフルエンザAウイルスは、季節的疾患のほとんどの原因であり、H3ウイルスは、米国における過去の12のインフルエンザ流行期うち8つを占める（CDC季節性インフルエンザ；米国サーベイランスデータ）。1968年に、H3ウイルスが、インフルエンザの20世紀の主な3つのパンデミックのうちの1つを引き起こし、H3ウイルスはそのとき以

40

50

来、ヒト疾病の重大な薬剤として存続している。H3インフルエンザウイルスは、ヒトに加えて、トリ、ブタ、およびウマに共通して感染する。インフルエンザBウイルスは、100年を超えてヒトに循環しており、現在の株は、山形系列およびビクトリア系列の2つの系列に分けられる。現在、3価のインフルエンザワクチンは、インフルエンザBの両系列、ならびにH1ウイルスおよびH3ウイルスを網羅する4価のワクチンに拡張している。

【0005】

[0005] インフルエンザに対する現在の治療は十分ではなく、無効であることがある。広範にわたるワクチン接種にもかかわらず、インフルエンザに対する感受性は依然としてある。感受性に寄与する要因には以下(1)2009H1N1パンデミックなど、ワクチン不足が広範にわたる場合、ワクチン接種の適用範囲が不十分であったこと、(2)例えば2008年のような年には、ワクチン製剤が循環中の株を十分反映していなかったこと、(3)有効性の平均が65歳で40~50%、70歳を過ぎるとわずか15~30%の範囲であるなど、高齢者ではワクチン接種の有効性が低いこと、(4)季節性ワクチンに代表されないパンデミック株の出現などが含まれる。さらに、インフルエンザの治療に現在入手できる抗ウイルス治療に対する薬物抵抗性が重大な問題となっている。M2タンパク質に対して作用し、ウイルスの融合を阻害する薬物である、アダマンタン(アマンタジン(amantidine)およびリマンタジン)に対する抵抗性は、2004年の1.9%から、2004~2005年のインフルエンザ流行期の最初の6か月の間の14.5%に上昇し、現在90%を超える(Sheu, T. G.ら(2011) *J Infect Dis* 203:13-17)。インフルエンザのノイラミニダーゼタンパク質を阻害する抗ウイルス薬であるタミフルに対する耐性は、2006年から2007年までのインフルエンザ流行期中のH1N1ウイルスの1~2%から、2007年から2008年までには12%に劇的に上昇し、2009年には季節性H1N1ウイルスの99%を超えている。幸運にも、2009年のパンデミックH1N1株はタミフル感受性であり、パンデミック中に死に至る可能性はあまりなかった。したがって、新たなインフルエンザの治療が圧倒的に必要とされている。

【0006】

[0006] インフルエンザに対する治療用抗体の開発は、ヘマグルチニン(HA)分子内に保存されているエピトープが最近発見されたことから注目を集めている。多様な数のインフルエンザAウイルス亜型を認識し、中和する能力があるヒトモノクローナル抗体(MAb)の単離および特徴付けの報告がいくつかある。その多くは、ワクチン接種または自然感染の間、最も頑強な中和抗体を誘発する、ヘマグルチニン(HA)糖タンパク質を標的にするものである。HAは、ウイルス感染における決定的な構成成分であるHA1およびHA2の2つのサブユニットからなる。HA1は、宿主細胞の受容体のシアル酸に対する付着に関与し、HA2は、ウイルスおよびエンドソーム膜の融合を媒介する。MAb CR6261は、H1ウイルスおよびグループ1内の他の亜型(H5)に結合し、HA2サブユニット上に結合する、十分に特徴付けられている抗体である(Throsby Mら(2008) *PLoS ONE* 3:e3942; Eckert DCら(2009) *Science* 324:246-251; Friesen RHEら(2010) *PLoS ONE* 5(2):e1906; 米国特許第8,192,927号)。MAb CR8020は、グループ2のウイルスであるH3および別の亜型(H7)のウイルスの両方の上のHA2の膜近位領域に結合する(Eckert DCら(2011) *Science* 333:843-850)。スイスの研究者からの抗体FI6v3は、グループ1(H1)および2(H3)両方のウイルス上に存在するエピトープに結合することができるが、FI6はマウスにおける限られた有効性しか示されていない(Corti Dら(2011) *Science* 333:850-856)。Paleseらは、様々なヘマグルチニンでのマウスにおける逐次的な免疫化を用いて、H3インフルエンザウイルスに対する、広範に保護的なモノクローナル抗体を報告している(Wang TTら(2010) *PLoS Pathog* 6(2):e1000796; 米国出願第20110027270号)。この取組みを用いて、広範に反応性のH1抗体が単離された(Tan GSら(2012) *J Virol* 86(11):6179-6188)。

【0007】

[0007] 現在、米国で臨床的に認可されている20を超えるモノクローナル抗体を含めた、多数の組換え抗体での現在までの調査および臨床実験に基づいて、通常の抗体治療の投与量は、複数の1投与量あたりのmg/kgであることが十分に確立されている (Newsome BW and Ernststoff MS (2008) Br J Clin Pharmacol 66(1):6-19)。例えば、直腸結腸癌に認可されている抗EGFR完全ヒト抗体であるパニツムマブは、2週ごとに1~1.5時間にわたって6mg/kgが静脈内投与される。ヒトの平均体重70kgを用いると、これは1投与量あたり抗体420mgとなる。

【0008】

[0008] インフルエンザには、モノクローナル抗体は未だ臨床的に認可されていない。動物におけるインフルエンザ抗体での試験結果は、これらの抗体の有効な投与量範囲は、治療または予防目的で静脈内または腹腔内投与する場合、1mg/kg~100mg/kgの範囲を必要とすることを実証している。これらの抗体のうちいくつか(CR6261、CR8020、TCN-032)での米国におけるフェーズI臨床試験は、安全性および認容性の試験において、2mg/kgから50mg/kgまでの投与量の増加を用いている (clinicaltrials.gov; NCT01390025、NCT01406418、NCT01756950)。このように材料が大量であることは、この新しい路線の抗体治療の開発において大きな障害となっている。具体的には、この範囲で全身投与すると、材料のコストが相当かさみ、さらには注入に伴う時間と人的コストもかかる。したがって、有効性は向上させ、かつ/またはインフルエンザに対する抗体治療もしくは予防に必要とされる材料の量は実行可能な選択肢まで減少させようとする不可避の必要性がある。

【0009】

[0009] 本明細書における参考文献の引用は、これらが本発明にとって先行技術であることを認めるものと解釈されないものとする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

【課題を解決するための手段】

【0011】

[0010] 本発明は、中和抗体(複数可)を、鼻腔内または吸入投与などによって呼吸器または気道に直接投与することによる、特にインフルエンザウイルスを含めた、ウイルス感染の有効な治療および予防のための新規な方法および手段を提供する。本発明は、吸入(IH)および/または鼻腔内(IN)送達および投与などによる中和抗体の呼吸器への直接送達は、同じ量の同じ抗体を全身投与(IVまたはIP)するよりも低投与量で、優れており、より効果的であり、有効であることを実証するものである。INまたはIH送達される抗体での治療または予防は、ウイルス曝露または感染の前または後でも有効である。

【0012】

[0011] 本発明は、一または複数のウイルス中和モノクローナル抗体を含む、哺乳動物におけるウイルス感染を治療または予防するのに有効な、吸入または鼻腔内の組成物を提供する。第1の態様において、本発明は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、1mg/kg以下の単回単位投与量で含む、哺乳動物におけるウイルス感染の治療または予防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。本発明は、一または複数のウイルス中和モノクローナル抗体を、10mg/kg以下の単回単位投与量で含む、哺乳動物におけるウイルス感染の治療または予防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。本発明は、一または複数のウイルス中和モノクローナル抗体を、1mg/kg未満の単回単位投与量で含む、哺乳動物におけるウイルス感染の治療または予防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。本発明は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.5mg/kg未満の単回単位投与量で含む、哺乳動物におけるウイルス感染の治療または予防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。本発明は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.1mg/kg未満の単回単位投与量で含む、哺乳動物におけるウイルス感染の治療または予

防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。

【0013】

[00012] 特定の一態様において、本発明は、一または複数のインフルエンザウイルス中和モノクローナル抗体を含む、哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染を含むインフルエンザウイルスの治療または予防に有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。さらなる一態様において、本発明は、循環性のインフルエンザウイルス株に対する、インフルエンザ中和抗体の組合せを含む、哺乳動物におけるインフルエンザウイルスの伝染を治療、予防、または低減するのに有効な、吸入または鼻腔内組成物を提供する。一態様において、本発明は、特に、インフルエンザA抗H1抗体、インフルエンザA抗H3抗体、および抗インフルエンザB抗体からなる、循環性のインフルエンザウイルス株に対するインフルエンザ中和抗体の組合せからなる、鼻腔内投与のための組成物を提供する。一態様において、組成物は、それだけには限定されないが、H2、H5、およびH7株を含めた、他のインフルエンザ株に対して有効であり、またはさらに有効である、インフルエンザA抗体を含む。

10

【0014】

[00013] 組成物は、使用に、およびインフルエンザウイルスの治療または予防に、適しており、適用できる。特定の一態様において、組成物は、呼吸器ウイルスの伝染を減少させるのに適する。組成物は、インフルエンザウイルスの伝染を減少させるのに適する。

【0015】

[00014] 一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.5mg/kg以下の単回単位投与量で含む。一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.1mg/kg以下の単回単位投与量で含む。さらなる一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.05mg/kg以下の単回単位投与量で含む。

20

【0016】

[00015] 一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.5mg/kg未満の単回単位投与量で含む。一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.1mg/kg未満の単回単位投与量で含む。さらなる一態様において、組成物（複数可）は、ウイルス中和モノクローナル抗体を、0.05mg/kg未満の単回単位投与量で含む。

30

【0017】

[00016] 例示的な一態様において、組成物は、インフルエンザウイルス中和抗体である、ウイルス中和抗体を1つまたは複数含むことができる。組成物は、特に、インフルエンザAに対する、特にインフルエンザAグループ1および/またはインフルエンザAグループ2に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を含むことができる。組成物は、特に、インフルエンザBに対する、特に山形系列および/またはビクトリア系列に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を含むことができる。組成物は、インフルエンザAウイルスに対する、特に、H1ウイルスおよび/もしくはH3ウイルスを含めたグループ1およびグループ2のインフルエンザAウイルスに対する、ならびに/または山形系列および/もしくはビクトリア系列を含めたインフルエンザBウイルスに対する、一または複数のインフルエンザウイルス抗体を含むことができる。特定の一態様において、組成物は、インフルエンザAウイルスに対する、特に、H1ウイルスおよび/またはH3ウイルスを含めたグループ1およびグループ2のインフルエンザAウイルスに対する一または複数のインフルエンザウイルス抗体、ならびに山形系列および/またはビクトリア系列を含めたインフルエンザBウイルスに対する一または複数のインフルエンザ抗体を含むことができる。組成物は、インフルエンザAウイルスに対する、特に、H1ウイルスおよび/またはH3ウイルスを含めたグループ1およびグループ2のインフルエンザAウイルスに対する一または複数の抗体、ならびにインフルエンザBウイルスに対する一または複数のインフルエンザ抗体を含む、組合せの抗体を含むことができる。

40

【0018】

50

[00017] 本発明にしたがって、本明細書に提供する試験に例示するものを含めて、気道または呼吸器に、鼻腔内または吸入投与などによって投与した場合、低投与量の多数かつ多様な中和抗体が有効性を増強した。したがって、本発明の組成物は、インフルエンザウイルスを中和する能力があり、インフルエンザAおよび/またはインフルエンザBウイルスに対するものであってよい、中和抗体、またはFabフラグメントを含めたそのフラグメントを含むことができる。本発明の組成物は、CR6261、CR8020、CR9114、6F12、GG3、5A7、Mab53、およびMab579から選択される、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体、これらのフラグメント、これらの合成もしくは組換えの誘導体、これらのヒト化もしくはキメラ化されたバージョン、およびこれらの重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を含むことができる。

10

【0019】

[00018] 組成物は、インフルエンザ中和抗体6F12、そのフラグメント、その合成または組換えの誘導体、そのヒト化またはキメラ化されたバージョン、およびその重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を特に含むことができる。組成物は、インフルエンザ中和抗体GG3、そのフラグメント、その合成または組換えの誘導体、そのヒト化またはキメラ化されたバージョン、およびその重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を特に含むことができる。組成物は、インフルエンザ中和抗体5A7、そのフラグメント、その合成または組換えの誘導体、そのヒト化またはキメラ化されたバージョン、およびその重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を特に含むことができる。組成物は、インフルエンザ中和抗体Mab53、そのフラグメント、その合成または組換えの誘導体、そのヒト化またはキメラ化されたバージョン、およびその重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を特に含むことができる。組成物は、インフルエンザ中和抗体Mab579、そのフラグメント、その合成または組換えの誘導体、そのヒト化またはキメラ化されたバージョン、およびその重鎖および軽鎖CDRを有する抗体を特に含むことができる。

20

【0020】

[00019] 組成物は、インフルエンザAに対する、特にインフルエンザAグループ1および/またはインフルエンザAグループ2に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を特に含むことができる。例示的な一態様において、組成物は、インフルエンザAに対する、特にインフルエンザAグループ1に対する、特にH1ウイルス亜型に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を含むことができ、一または複数の抗体は、CR6261もしくはCA6261、6F12、GG3、mAb53、またはこれらの活性なフラグメントから選択される。組成物は、インフルエンザAに対する、特にインフルエンザAグループ2に対する、特にH3ウイルス亜型に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を含むことができ、一または複数の抗体は、CR8020もしくはCA8020、mAb579、またはこれらの活性なフラグメントから選択される。一態様において、組成物は、インフルエンザウイルス中和抗体CR9114もしくはCA9114、またはこれらの活性なフラグメントを含むことができ、前記抗体は、インフルエンザAおよび/またはインフルエンザBに対するインフルエンザウイルス中和抗体を提供する。組成物は、インフルエンザBに対する、特に山形系列および/またはビクトリア系列に対する、一または複数のインフルエンザウイルス中和抗体を含むことができ、一または複数の抗体は、5A7、CR9114、CA9114、またはこれらの活性なフラグメントから選択される。

30

40

【0021】

[00020] ウイルス中和抗体は、特に、中和する能力がある抗体フラグメントであってよい。一態様において、抗体フラグメントはFcを欠き、および/またはエフェクター機能を欠き、もしくはエフェクター機能が低減している。抗体フラグメントは、Fab、Fab'、およびF(ab')₂から選択することができる。ウイルス中和抗体またはフラグメントは、組換えタンパク質に由来してもよく、活性フラグメントなどとして組換え発現させてもよく、または、気道もしくは呼吸器内に中和抗体もしくはフラグメント(複数可)を提供する手段もしくは方法を含めて、DNAもしくはRNAをコードする中和抗体も

50

しくはそのフラグメント（複数可）の送達などによる遺伝子材料もしくはDNAもしくはDNAベクター発現によるものを含めて、他の手段もしくは方法に由来しても、もしくは産生されてもよい。

【0022】

[00021] 本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤をさらに含むことができる。組成物は、経鼻または肺の送達に、および鼻腔内または吸入投与に適し、または好適である、賦形剤、担体、希釈剤、または添加剤を含むことができる。組成物は、免疫学的応答および/または抗体媒介性の細胞もしくは全身性の効果を刺激または増強するのに適し、または好適である、賦形剤、担体、希釈剤、または添加剤を含むことができる。組成物は、免疫学的メディエータ、または免疫応答刺激剤を含むことができる。

10

【0023】

[00022] 本発明は、ウイルス、特に呼吸器ウイルス、特にインフルエンザウイルスの伝染を治療し、予防し、または低減し、または阻害するための方法を提供する。本発明は、呼吸器ウイルスに暴露された、罹患した、または苦しんでいる哺乳動物におけるウイルス感染を治療または予防するための方法であって、前記哺乳動物に、呼吸器ウイルスを中和する能力がある一または複数のモノクローナル抗体を鼻腔内（IN）または吸入投与することを含む、方法を提供する。

【0024】

[00023] 方法の一態様において、モノクローナル抗体はIgG抗体である。方法の一態様において、呼吸器ウイルスはインフルエンザウイルスである。呼吸器ウイルスは、インフルエンザA型もしくはB型ウイルスであってよく、または未知もしくは未決定の型でもよい。一態様において、抗体は、インフルエンザAまたはBを中和する能力があり、またはインフルエンザAまたはBに対する、中和抗体である。一態様において、抗体は、インフルエンザAおよびBウイルスを中和する能力があり、またはインフルエンザAまたはBウイルスに対する、モノクローナル抗体の組合せである。

20

【0025】

[00024] 方法にしたがって、抗体は、感染後に、または推定される感染、暴露、もしくは臨床症状出現の後に投与することができる。この一態様において、抗体は、感染後8時間までの期間に投与することができる。あるいは、抗体は、感染後24時間までの期間に投与される。さらなる一代替において、抗体は、感染後48時間までの期間に投与される。なおさらなる一代替において、抗体は、感染後72時間の期間までに投与される。抗体は、単回投与量または複数の逐次的な投与量としてなど、感染後最高8時間（8hpi）、12hpi、18hpi、24hpi、36hpi、48hpi、72hpi、感染1日後、感染2日後、感染3日後、感染4日後、感染5日後、感染6日後、感染7日後、感染1週間後、感染10日後、感染2週間後、感染3週間後、感染4週間後、感染1か月後、感染数か月後に投与してもよい。

30

【0026】

[00025] 抗体を、単回投与量で投与してもよい。単回投与量は、10mg/kg体重未満、5mg/kg体重未満、2mg/kg体重未満、1mg/kg体重以下であってよい。単回投与量は、1mg/kg体重未満、0.5mg/kg未満、0.1mg/kg未満、0.05mg/kg未満であってよい。抗体を、複数回投与量で投与してもよい。投与量は、同じ各投与量であってよく、または投与量ごとに異なっていてもよく、または最初はより高い投与量でその後はより低い投与量であってよく、単回投与量（単数もしくは複数）またはあらゆる投与量は、1mg/kg体重未満、0.5mg/kg未満、0.1mg/kg未満、0.05mg/kg未満であってよい。最初の投与量は、1mg/kgを超えてもよく、追加のまたはそれに続く投与量は、1mg/kgより低くてもよいし、または1mg/kg未満でもよい。

40

【0027】

[00026] 抗体は、1投与量あたり1mg/kg未満の複数回投与量で気道または呼吸器

50

に投与してもよい。抗体は、1投与量あたり1mg/kg未満の複数回投与量で鼻腔内または吸入投与してもよい。このような一態様において、複数回投与量は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後、少なくとも2時間離して、72時間までまたはそれ以降に投与されてもよい。したがって、抗体の投与量は、数分または数時間または数日離して投与されてもよい。抗体の投与量は、感染後、または推定される感染または曝露後に、数時間または数日離して投与されてもよい。抗体の投与量は、感染後、または推定される感染または曝露後に、2、4、6、8、12、24、36、48、または72時間後まで投与されてもよい。

【0028】

[00027] 本発明の投与プロトコールまたは方法は、特に、気道または呼吸器に対する、特に抗体の吸入または鼻腔内投与による抗体の第1の投与、それと組み合わせて、あるいはそれに続けて、吸入または鼻腔内の経路によらない、IPもしくはIV投与（複数可）などの全身送達などの第2の投与または1つもしくは複数の追加投与（複数可）を含むことができる。したがって、方法は、ウイルス特異的なモノクローナル抗体の追加のIPまたはIV投与を含むことができ、追加投与される抗体は、中和抗体または非中和抗体である。追加のIPもしくはIV投与される抗体は、INもしくは吸入投与されるのと同じ抗体でもよく、またはINもしくは吸入投与されるのと異なり、もしくは変更された抗体でもよい。IPまたはIVなどにより追加投与される抗体は、INまたは吸入投与される抗体と同時に、逐次的に、または引き続き投与してもよい。あらゆるこのような後続の投与は、数時間後でもよく、2、4、6、8、12、または最高24時間後でもよい。後続の投与は、数日後でもよく、1日、2日、または3日後でもよい。後続の投与は、数日後でもよく、最高7日後、1週間後、または数週間後でもよい。後続の投与は、単回投与量または複数回投与量を、数時間および/または数日および/または数週後でもよい。

【0029】

[00028] さらに一態様において、本発明は、第1の鼻腔内または吸入投与量の中和抗体を投与し、引き続きまたは同時に、呼吸器に投与せず、腹腔内または静脈内に投与することができる、第2の投与量の、または1つもしくは複数の追加の投与量（複数可）の抗体を投与することを含む、呼吸器ウイルス、特にインフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体を投与するためのプロトコールを提供し、第2の投与量または追加の投与量（複数可）の抗体は、第1の投与量の抗体と同じまたは異なる抗体である。第2の投与量のまたは追加の投与量（複数可）の抗体は、より有効または効果的なIVまたはIPであるように変更または修飾されている、変更または修飾されている抗体であってよい。一態様において、第1の投与量の抗体は、Fab抗体など、エフェクター機能を欠いていてもよく、第2の投与量の抗体はエフェクター機能を有し、Fcを有していてもよく、または増強されたエフェクター機能を有するように修飾されていてもよい。

【0030】

[00029] プロトコールは、吸入または鼻腔内の経路による、複数回投与量の抗体を含んでいてもよく、IPまたはIVの経路による、複数回投与量の同じまたは代替的な抗体を含んでいてもよい。プロトコールの一態様において、抗体が投与されている対象または患者を、疾病またはウイルス感染の臨床的な出現などに対してモニタリングしてもよく、投与量（単数もしくは複数）を、患者または対象の、および感染または疾患の状態に応じて、変更し、低減し、または増強し、または接近し、もしくはさらに離して投与してもよい。

【0031】

[00030] プロトコールの一態様において、呼吸器ウイルスはインフルエンザウイルスでもよく、インフルエンザA、またはインフルエンザB、または未知の、もしくは未決定のインフルエンザウイルスでもよい。呼吸器に投与しない第2の投与量の抗体は、中和抗体でも、または非中和抗体でもよく、エフェクター機能もしくは増強されたエフェクター機能があってもよい。

【0032】

10

20

30

40

50

[00031] プロトコールの一態様において、第1の鼻腔内または吸入投与量は、1 mg / kg未満、0.5 mg / kg未満、0.1 mg / kg未満であってよい。第2のまたは追加のIPまたはIV投与量は、特に、第1の鼻腔内または吸入投与量よりも高い投与量を投与する。第2のまたは追加のIPまたはIV投与量は、特に、第1の鼻腔内または吸入投与量よりも少なくとも10倍高い量の抗体の投与量を投与する。第2のまたは追加のIPまたはIV投与量は、少なくとも1 mg / kg、少なくとも5 mg / kg、少なくとも10 mg / kg、少なくとも15 mg / kgであってもよく、または10 mg / kgを超え、または20 mg / kgを超え、または50 mg / kgを超えてもよい。

【0033】

[00032] プロトコールのさらなる一態様において、第1の鼻腔内または吸入投与量は1 mg / kg未満であってよく、第2のIPまたはIV投与量は、第1の鼻腔内投与量よりもmg / kgにおいて少なくとも10倍高い。プロトコールのさらなる一態様において、第1の鼻腔内または吸入投与量は1 mg / kg未満であってよく、第2のIPまたはIV投与量は、第1の鼻腔内投与量よりもmg / kgにおいて少なくとも50倍高い。捕捉的な一態様において、第1の鼻腔内または吸入投与量は0.5 mg / kg未満であってよく、第2のIPまたはIV投与量は少なくとも5 mg / kgであってよい。

10

【0034】

[00033] 第1の鼻腔内または吸入投与量は1 mg / kg未満であってよく、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後24時間以内に投与することができる。第1の鼻腔内または吸入投与量は1 mg / kg未満であってよく、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後48時間以内に投与することができる。第1の鼻腔内または吸入投与量は1 mg / kg未満であってよく、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後72時間以内に投与することができる。

20

【0035】

[00034] 本発明の別の一態様は、呼吸器ウイルスに暴露された、暴露される危険性がある、または呼吸器ウイルス感染の臨床徴候を示す対象に、ウイルス中和抗体を、1 mg / kg以下の単回単位投与量で鼻腔内または吸入投与することを含む、呼吸器ウイルスの伝染を阻害するための方法である。単回単位投与量は、10 mg / kg未満または1 mg / kg未満であってよい。方法の単回単位投与量は、0.5 mg / kg未満または0.1 mg / kg未満または0.05 mg / kg未満であってよい。

30

【0036】

[00035] ウイルスは、特にインフルエンザウイルスであってよく、インフルエンザAもしくはBウイルスであってよく、または未知もしくは未決定のインフルエンザウイルスであってよく、抗体はIgG抗体であってよい。

【0037】

[00036] 上記の方法のウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後48時間以内に投与することができる。ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後24時間以内に投与することができる。ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後12時間以内に投与することができる。ウイルス中和抗体は、推定される感染、暴露、または臨床症状出現後24時間を超え72時間以内に投与することができる。ウイルス中和抗体は、臨床症状の最初の出現時、または出現後に投与することができる。

40

【0038】

[00037] 伝染を阻害するための方法にしたがって、抗体は、0.5 mg / kg未満の投与量、0.1 mg / kg未満の投与量、0.05 mg / kg未満の投与量で投与することができる。

【0039】

[00038] 当業者であれば、以下の説明的な図面を参考にして進行する、以下の記載を見直すことから他の目的および利点は明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 4 0 】

【図1】[00039]中和M A bおよび非中和M A bは感染後、I Pで有効であることを示す図である。動物に、 $10 \times LD50$ のH3インフルエンザウイルス（マウスに適合させたA / ビクトリア / 361 / 2011、本明細書においてV i c / 11MAと呼ぶ）を接種し、感染24時間後（24 h p i）に様々な記載する抗体である6 P 15、1 P 19、1 K 17（全て非中和）、およびC A 8020（中和）、ならびに対照としてP B Sまたはウイルスなし $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でI P治療した。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図2】[00040]中和M A bおよび非中和M A bのI P送達は予防的に有効であることを示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルスV I C / 11MAを $10 \times LD50$ 接種し、感染1時間前（- 1 h p i）に様々な記載する抗体である1 K 17、1 P 19、1 H 16（全て非中和）、およびC A 8020（中和）、ならびにP B Sまたはアイソタイプ対照の抗体の対照 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でI P治療した。動物（各群10匹）を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図3】[00041]I VまたはI P投与した抗体は同様の有効性を示したことを示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルスV I C / 11MAを $10 \times LD50$ 接種し、感染1時間後（1 h p i）に、抗体C A 8020 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でI PまたはI V治療し、P B Sを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図4】[00042]中和抗体および非中和抗体の鼻腔内（I N）投与対腹腔内（I P）投与の比較を示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルスV I C / 11MAを $10 \times LD50$ 接種し、24 h p iに中和抗体C A 8020 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でI NもしくはI P治療し、または非中和抗体6 P 15でI NもしくはI P治療し、P B Sを対照とした。中和M a bをI N投与した場合、治療有効性は、同じ投与量の同じ抗体をI P投与したものに比べて上昇した。それとは対照的に、非中和M a bをI N投与した場合、治療有効性は同じ投与量のI Pに比べて低下する。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図5】[00043]H1ウイルスに対する治療有効性における、C A 6261抗体の抗体フラグメントF a bのI N投与対I P投与を比較した結果を示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、24 h p iに、C A 6261中和F a bを $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、および $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ I NまたはI P投与して治療し、P B S治療およびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。I N投与したF a b C A 6261抗体の全ての投与量が、あらゆるI P投与量よりも大きな有効性を実証した。中和F a bのI P投与は、最高投与量である $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でも、検出できる有効性を実証しなかった。

【図6】[00044]H3ウイルスに対する治療有効性における、C A 8020抗体のF a b対非中和6 P 15 F a bのI N投与を比較した結果を示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、24 h p iに、中和C A 8020 F a b、非中和6 P 15 F a b、またはH1ウイルスに対するF a b $10 \text{ mg} / \text{kg}$ でI N治療し、ウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。I N投与したF a b C A 8020抗体は有効性を実証したが、F a b 6 P 15は実証しなかった。

【図7】[00045]匹敵する投与量のI NおよびI Pの比較、ならびにM a bのI Nは、I P投与した同じM a bよりも10倍～100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス（A / プエルトリコ / 8 / 1934） $10 \times LD50$ を接種し、24 h p iに、中和C A 6261 M a b $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、および $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ でI NまたはI P治療し、P B Sおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する

10

20

30

40

50

体重のパーセントをプロットする。

【図8】[00046]匹敵する投与量のINおよびIPの比較、ならびにMabのINは、IP投与した同じMabよりも10倍～100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、24hpiに、中和CA8020 Mab 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgでINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図9】[00047]匹敵する投与量のIN対IPの比較、およびMabのINは、48hpiに投与した場合、IP投与した同じMabよりも、やはり10倍～100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、48hpiに、中和CA6261 Mab 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgでINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図10】[00048]超低投与量はINで保護をもたらす能力があることを示す図である。CA8020抗体を8hpiにIN投与すると、0.005mg/kgほどの低投与量で $10 \times LD50$ のH3ウイルスに対して保護的である。動物に、H3インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、8hpiに中和CA8020 Mab 0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.01mg/kg、および0.005mg/kgでIN治療し、8hpiにCA8020 Mab 0.1mg/kgでIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。0.1mg/kgのIP投薬はPBSと等価であり、効果を示さなかった。INは全ての投与量で有効性を示した。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図11】[00049]反復性の超低投薬の中和抗体の有効性試験を示す図である。動物に、H3インフルエンザウイルス $10 \times LD50$ を接種し、8hpi、32hpi、および再び56hpiに反復性のCA8020 MabのIN投薬で治療した。中和CA8020 Mabの1投与量あたり0.005mg/kgおよび0.001mg/kgの反復性の投薬を行い、PBSおよびウイルスなしを対照とした。反復性の投与レジメンは両方とも有効性を示した。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図12】[00050]鼻腔内投与対全身投与の方法のモデルを示す図である。ウイルスのクリアランスは、全身投与（IPおよびIP投与を含む）の場合は、主に基底面側上のエフェクター機能（EF）により、気道への投与（鼻腔内および吸入の投与を含む）の場合は、気道に暴露される頂端側上の中和により媒介される。

【図13A】[00051]例示的な抗体であるCA6261を用いた、INまたはIP投与単独対INおよびIP経路による組合せの投与の抗体投与試験を示す図である。合計抗体投与量2mg/kgを図示し、INのベースラインは0.3mg/kgである。INおよびIP投与はIP単独よりはるかに優れており、IN単独に対して改善されていた。CA6261 0.3mg/kg INおよび1.7mg/kg IPの投与は、本質的にウイルス感染なしの効果を示し、ウイルスなしに等しかった。

【図13B】例示的な抗体であるCA6261を用いた、INまたはIP投与単独対INおよびIP経路による組合せの投与の抗体投与試験を示す図である。合計抗体投与量2mg/kgを図示し、IN投与は0.1mg/kgである。INおよびIP投与はIP単独よりはるかに優れており、IN単独に対して改善されていた。

【図13C】例示的な抗体であるCA6261を用いた、INまたはIP投与単独対INおよびIP経路による組合せの投与の抗体投与試験を示す図である。合計投与量5mg/kgを図示し、INのベースラインは0.3mg/kgである。INおよびIP投与はIP単独よりはるかに優れており、IN単独に対して改善されていた。CA6261 0.3mg/kgおよび4.7mg/kg IPの投与は、本質的にウイルス感染なしの効果を示し、ウイルスなしに等しかった。

10

20

30

40

50

【図13D】例示的な抗体であるCA6261を用いた、INまたはIP投与単独対INおよびIP経路による組合せの投与の抗体投与試験を示す図である。合計投与量5mg/kgを図示し、IN投与は0.1mg/kgである。INおよびIP投与はIP単独よりはるかに優れており、IN単独に対して改善されていた。

【図14】[00052]H1ウイルスに対する治療有効性における、6F12抗体のIN投与対IP投与を比較した結果を示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルスPR810×LD50を接種し、24hpiに6F12 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgをINまたはIP投与して治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。IN投与した等価の投与量のMab 6F12抗体は、IP投与量に匹敵する優れた有効性を実証した。投与量1mg/kgの6F12を24hpiにIN投与したものは、動物を感染から完全に保護した。

10

【図15】[00053]匹敵する投与量のINおよびIPの比較、およびMabのINは、IP投与した同じMabよりも10~100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス(A/プエルトリコ/8/1934)10×LD50を接種し、24hpiに中和GG3 Mab 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgでINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図16】[00054]匹敵する投与量のINおよびIPの比較、およびMabのINは、IP投与した同じMabよりも10~100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス(A/プエルトリコ/8/1934)10×LD50を接種し、24hpiに中和CA9114 Mab 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgでINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

20

【図17】[00055]匹敵する投与量のINおよびIPの比較、およびMabのINは、IP投与した同じMabよりも10~100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス(マウス適合したA/California/07/09)10×LD50を接種し、24hpiに中和CA6261 Mab 10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgでINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

30

【図18】[00056]匹敵する投与量のINおよびIPの比較、およびMabのINは、IP投与した同じMabよりも10~100倍の間強力であることを示す図である。動物に、H1インフルエンザウイルス(A/プエルトリコ/8/1934)10×LD50を接種し、72hpiに中和CA6261 Mab 20mg/kg、10mg/kg、および5mg/kgをINまたはIP治療し、PBSおよびウイルスなしを対照とした。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

40

【図19】[00057]H3ウイルス(ビクトリア/11)10×LD50、24hpiの、INまたはIP投与単独の組合せ投与試験対、INおよびIP経路による抗体CA8020または6P15の組合せ投与を示す図である。IP 0.5mg/kgおよびIN 0.1mg/kgの、合計投与量0.6mg/kgを投与する。両方の場合とも、中和抗体でのIN投与は、非中和抗体のIN投与より優れていた。

【図20】[00058]インフルエンザBウイルス(B/マレーシア)24hpiの、様々な投与量のCA9114抗体のINおよびIP投与を示す図である。CA9114抗体10mg/kg、1mg/kg、または0.1mg/kgをINまたはIP投与した。抗体CA8020およびウイルスなしを対照として示す。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

50

【図 2 1】[00059]インフルエンザ B に対する一連の抗体の有効性を評価するための、インフルエンザ B ウイルス (B / フロリダ) でのマウスにおける試験を示す図である。抗体は全て 1 m g / k g を、B ウイルス 1 0 × L D 5 0、2 4 h p i に I N 投与した。試験した抗体は、示す通り、4 3 K 1 6、5 9 G 1、1 1 2 A 2 2、1 1 G 2 3、1 1 4 O 2 2、C A 9 1 1 4、および 4 0 J 7 であった。P B S およびウイルスなしを対照として示す。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図 2 2】[00060]インフルエンザ B に対する様々な抗体を、B / マレーシアウイルスに対する有効性に対して試験したことを示す図である。抗体は全て 1 m g / k g を、B ウイルス 1 0 × L D 5 0、2 4 h p i に I N 投与した。試験した抗体は、4 3 K 1 6、5 9 G 1、1 1 2 A 2 2、1 1 4 G 2 3、1 1 4 O 2 2、および C A 9 1 1 4 であった。対照は、アイソタイプ対照 M a b、P B S、およびウイルスなしであった。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

10

【図 2 3】[00061] B / マレーシアウイルス 8 h p i に様々なインフルエンザ B 抗体を投与した、動物有効性試験を示す図である。抗体は全て 1 m g / k g を、ウイルス 1 0 × L D 5 0、8 h p i に投与した。試験した抗体は、C A 9 1 1 4、5 4 H 5、1 1 0 C 1 6、4 3 K 1 6、5 9 G 1、1 1 4 G 2 3、4 3 J 2 3、1 1 2 A 2 2、5 8 O 8、5 5 K 6、1 1 4 D 2 2、および 4 0 J 7 であった。対照は P B S およびウイルスなしであった。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

20

【図 2 4】[00062] H 1 抗体、H 3 抗体、およびインフルエンザ B ウイルス抗体を含む抗体カクテルを用いた動物有効性試験を示す図である。抗体のカクテルは、H 1 抗体 G G 3、H 3 抗体 C A 8 0 2 0、および B 抗体 4 3 J 2 3 を用いる。カクテルでは、B / フロリダ (山形 B ウイルス) 1 0 × L D 5 0、2 4 h p i に、各抗体を 1 m g / k g 単一の 5 0 μ l 体積の投与量において I N 投与する。比較には、B / フロリダウイルスに対する B 抗体 4 3 J 2 3 を単独で、4 3 J 2 3 1 m g / k g を 2 4 h p i に I N 投与し、試験した。B / フロリダ 1 m g / k g、2 4 h p i に、C A 9 1 1 4 抗体を I P 投与した。P B S およびウイルスなしを対照として用いた。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

30

【図 2 5】[00063] H 1 抗体 G G 3、H 3 抗体 C A 8 0 2 0、およびインフルエンザ B ウイルス抗体 4 3 J 2 3 の抗体カクテルを用いた、動物有効性試験を示す図である。各抗体 1 m g / k g を、B / マレーシアウイルスに感染させ、感染 2 4 時間後 (2 4 h p i) に I N 投与した。比較には、B / マレーシアウイルスに対する B 抗体 4 3 J 2 3 を単独で試験し、4 3 J 2 3 1 m g / k g を 2 4 h p i に I N 投与し、B / マレーシアの 2 4 h p i に C A 9 1 1 4 抗体 1 m g / k g を I P 投与した。P B S およびウイルスなしを対照として用いた。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図 2 6】[00064]インフルエンザ A H 1 ウイルス P R 8、2 4 h p i に、5 0 μ l 中各 1 m g / k g を組み合わせた、抗体合計 3 m g / k g の抗体カクテル (H 1 抗体 G G 3、H 3 抗体 C A 8 0 2 0、およびインフルエンザ B ウイルス抗体 4 3 J 2 3) を鼻腔内投与した有効性を示す図である。カクテルを、G G 3 抗体単独 I N、I P 投与した抗体 C A 6 2 6 1、および P B S と比較する。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

40

【図 2 7】[00065] H 3 ウイルス V i c / 1 1 に対する組合せ抗体カクテル試験を示す図である。抗体 G G 3、C A 8 0 2 0、および 4 3 J 2 3 を、カクテル中各 1 m g / k g、2 4 h p i に投与した。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。この試験では、抗体 C A 8 0 2 0 単独 1 m g / k g の I N または I P いずれか、および P B S を比較した。

【図 2 8】[00066]インフルエンザ A H 1 亜型ウイルス、インフルエンザ A H 3 亜型

50

ウイルス、B（山形）ウイルス、およびB（ビクトリア）ウイルス各々を感染させた後、24 h p i に、インフルエンザ抗体 G G 3、C A 8 0 2 0、および 4 3 J 2 3 のカクテル（カクテル中各抗体 1 m g / k g、全ての抗体の合計 3 m g / k g）対 P B S を投与した結果を示す図である。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。3 つの抗体のカクテルは、試験したウイルス全てに対して、特に H 1、H 3、B（Y a m）、および B（V i c）ウイルスの各々および全てに対して有効であった。

【図 2 9】[00067]死亡の代わりとして体重を用いた、インフルエンザ亜型からのマウスにおける保護に対する 3 つの抗体のカクテルの評価を示す図である。マウスを、インフルエンザ A H 1 もしくは H 3 亜型、または山形もしくはビクトリア系列からのインフルエンザ B ウイルス 1 0 × L D 5 0 で治療し、2 4 時間後（2 4 h p i）に、抗体 5 A 7、C A 6 2 6 1、および C A 8 0 2 0 各 1 m g / k g の 3 つの抗体からなるユニバーサルインフルエンザカクテルで治療した。3 つの抗体のカクテルは、試験したあらゆるウイルスである H 1、H 3、B（Y a m）、および B（V i c）ウイルス感染での感染に対して有効であった。

10

【図 3 0】[00068] H 3 亜型インフルエンザウイルス感染 2 4 時間後の、抗体 T R L 5 7 9（M a b 5 7 9）での治療を示す図である。H 3 V i c 1 1 ウイルス 1 0 × L D 5 0 D に感染させた後、2 4 h p i に抗体 5 7 9 1 m g / k g を I N 投与し、または感染 2 4 時間後に 1 0 m g / k g を I P 投与した。対照は P B S およびウイルスなしであった。動物（1 群あたりマウス 5 匹）を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

20

【図 3 1】[00069] H 1 インフルエンザウイルス感染 2 4 時間後の、抗体 T R L 5 3（M a b 5 3）での治療を示す図である。H 1 C a l 0 9 ウイルス 1 0 × L D 5 0 に感染させた後、2 4 h p i に抗体 5 3 1 m g / k g を I N 投与し、または 2 4 時間後に 1 0 m g / k g を I P 投与した。対照は、P B S およびウイルスなしであった。動物（1 群あたりマウス 5 匹）を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図 3 2】[00070] ウイルス感染の 3 日または 4 日前に、予防的に I N および I P 投与した試験を示す図である。H 1 インフルエンザウイルス A / プエルトリコ / 8 / 1 9 3 4（P R 8 と表す）3 × L D 5 0 で誘発する 3 または 4 日前に、抗体 C A 6 2 6 1 を I N または I P 投与した。感染 3 日前（- 3 d p i）または感染 4 日前（- 4 d p i）に C A 6 2 6 1 抗体を I N 投与（0 . 1 m g / k g）または I P 投与（0 . 1 m g / k g および 1 m g / k g）し、H 1 インフルエンザウイルスで誘発した。対照はウイルスなしおよび治療なしであった。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

30

【図 3 3】[00071] ウイルス感染の 5、6、または 7 日前に、予防的に I N および I P 投与した試験を示す図である。H 1 インフルエンザウイルス P R 8 3 × L D 5 0 で誘発する 5、6、または 7 日前のいずれかに、抗体 C A 6 2 6 1 を I P 投与（1 m g / k g）または I N 投与（0 . 1 m g / k g）した。対照は、タミフル（1 日 2 回 5 日間、1 0 m g / k g 経口投与）、治療なし、およびウイルスなしであった。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

40

【図 3 4】[00072] ウイルス感染の 5、6、または 7 日前に、予防的に I N および I P 投与した試験を示す図である。H 1 インフルエンザウイルス P R 8 3 × L D 5 0 で誘発する 5、6、または 7 日前のいずれかに、抗体 C A 6 2 6 1 を I P 投与（1 m g / k g）または I N 投与（0 . 1 m g / k g）した。対照は、タミフル（1 日 2 回 5 日間、1 0 m g / k g 経口投与）、治療なし、およびウイルスなしであった。動物を、感染後 1 4 日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の 0 日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図 3 5】[00073] ウイルス感染の 3 または 4 日前に、予防的に I N および I P 投与し、

50

ウイルス誘発は10×LD50の高投与量であった試験を示す図である。H1ウイルスPR8 10×LD50で誘発する3または4日前に、抗体CA6261 0.1mg/kgをIPまたはIN投与した。対照はウイルスなしおよび治療なしであった。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図36】[00074]ウイルス感染の5、6、または7日前に、予防的にINおよびIP投与し、ウイルス誘発は10×LD50の高投与量であった試験を示す図である。H1インフルエンザウイルスPR8 10×LD50で誘発する5、6、または7日前に、抗体CA6261をIP(1mg/kg)またはIN(0.1mg/kg)投与した。対照は、タミフル(1日2回5日間、10mg/kg経口投与)、治療なし、およびウイルスなしであった。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

10

【図37】[00075]インフルエンザBウイルス(B/マレーシア/2506/2004)10×LD50、24hpiに、抗体5A7、CR8033、およびmAb809のIN投与を示す図である。各インフルエンザB抗体を1mg/kg、IN投与した。PBSを対照として示す。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

【図38】[00076]インフルエンザBウイルス(B/フロリダ/05/2006)10×LD50、24hpiに、抗体5A7、CR8033、およびmAb809のIN投与を示す図である。各インフルエンザB抗体を1mg/kg、IN投与した。PBSを対照として示す。動物を、感染後14日間毎日、体重に対してモニタリングし、元の0日目の体重に対する体重のパーセントをプロットする。

20

【発明を実施するための形態】

【0041】

[00077] 本発明にしたがって、従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術を、当業者の範囲内で用いることができる。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I-III巻[Ausubel, R. M.編集(1994)]；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I-III巻[J. E. Celis,編集(1994)]；「Current Protocols in Immunology」I-III巻[Coligan, J. E.,編集(1994)]；「Oligonucleotide Synthesis」(M.J. Gait編集1984)；「Nucleic Acid Hybridization」[B.D. Hames & S.J. Higgins編集(1985)]；「Transcription And Translation」[B.D. Hames & S.J. Higgins編集(1984)]；「Animal Cell Culture」[R.I. Freshney編集(1986)]；「Immobilized Cells And Enzymes」[IRL Press, (1986)]；B. Perbal, 「A Practical Guide To Molecular Cloning」(1984)を参照されたい。

30

【0042】

[00078] したがって、本明細書に出現する場合、以下の語は下記に記載する定義を有する。

【0043】

[00079] 本明細書において用い、言及する抗体は、報告されており、公に知られているアミノ酸配列を有するものを含み、既知のまたは公的なアミノ酸配列に対する修飾を有し、目標の中和または認識および結合活性を含めた、実質的に等価な活性を保持し、または示す、抗体、タンパク質、ポリペプチドを含む。したがって、実質的に等価な、または変更された活性を表すタンパク質が同様に企図される。これらの修飾は、例えば、部位特異的変異誘発によって得た修飾など、意図的であってもよく、または複合体または指定されたそのサブユニットの生産者である宿主における変異によって得られたものなど、偶発的であってもよい。抗体は、本明細書に特に列挙する本明細書の範囲内のタンパク質、ならびに全ての実質的に均一な類似体および対立遺伝子変異に含まれるものとされる。

40

【0044】

[00080] 以下は、アミノ酸の様々な分類の例である：無極性のR基を有するアミノ酸：

50

アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；非荷電の極性R基を有するアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；荷電の極性R基を有するアミノ酸（ $\text{pH} 6.0$ で負に荷電）：アスパラギン酸、グルタミン酸；塩基性アミノ酸（ $\text{pH} 6.0$ で正に荷電）：リジン、アルギニン、ヒスチジン（ $\text{pH} 6.0$ ）；別の分類はフェニル基を有するアミノ酸であり得る：フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン。

【0045】

[00081] 別の分類は、分子量（すなわち、R基のサイズ）によるものであり得る：

グリシン 75	グルタミン 146	
アラニン 89	リジン 146	10
セリン 105	グルタミン酸 147	
プロリン 115	メチオニン 149	
バリン 117	ヒスチジン（ $\text{pH} 6.0$ ） 155	
スレオニン 119	フェニルアラニン 165	
システイン 121	アルギニン 174	
ロイシン 131	チロシン 181	
イソロイシン 131	トリプトファン 204	
アスパラギン 132		
アスパラギン酸 133		20

【0046】

[00082] 特に好ましい置換は：

- 正の荷電が維持され得るような、Argに対するLys、およびその反対；
- 負の荷電が維持され得るような、Aspに対するGlu、およびその反対；
- 遊離の-OHが維持され得るような、Thyに対するSer；および
- 遊離のNH₂が維持され得るような、Asnに対するGln。

【0047】

[00083] アミノ酸置換はまた、特に好ましい性質を有するアミノ酸を置換するように導入され得る。例えば、Cysは、別のCysを有するジスルフィド架橋に可能な部位に導入され得る。Hisは、特に「触媒作用的な」部位として導入され得る（すなわち、Hisは、酸または塩基として作用することができ、生化学的触媒では最も一般的なアミノ酸である）。Proは、タンパク質の構造に回転（-turns）を誘発する、特に平面状の構造のために導入され得る。

【0048】

[00084] アミノ酸残基の少なくとも約70%（好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90または95%）が同一であり、または保存的な置換を表す場合、2つのアミノ酸配列は「実質的に相同」である。

【0049】

[00085] 本出願にしたがって用いる、および本発明において用いる抗体をコードする核酸は、本発明において用いる抗体またはその活性なフラグメントの調製および/または生成において用いることができる。このような核酸を含むベクターは、本明細書に提供し、または本明細書で用いる抗体の発現または単離において用いることができる。

【0050】

[00086] 「レプリコン」は、*in vivo*でDNA複製の自律的な単位として機能する、すなわち自身の制御下で複製することができる、あらゆる遺伝因子（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である。

【0051】

[00087] 「ベクター」は、付着したセグメントの複製をもたらすために、それに対して別のDNAセグメントが付着することができる、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンである。

【0052】

[00088] 「DNA分子」は、一本鎖型または二重らせんのいずれかにおける、ポリマー型のデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）を意味する。この語は、分子の一次構造および二次構造のみを意味するものであり、あらゆる特定の三次形態に限定するものではない。したがって、この語は、とりわけ直線状のDNA分子（例えば、制限酵素断片）、ウイルス、プラスミド、および染色体において見出される二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造を論じるうえで、配列は、本明細書において、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAに相同の配列を有する鎖）に沿って5'から3'方向の配列のみを与える正常の慣習にしたがって記載され得る。

【0053】

[00089] 「複製開始点」は、DNA合成に関与するDNA配列を意味する。

10

【0054】

[00090] DNAの「コード配列」は、適切な制御配列の制御下に配置した場合、*in vivo*でポリペプチドに転写および翻訳される、二本鎖DNA配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシル）末端の翻訳終結コドンによって決定される。コード配列は、それだけには限定されないが、原核生物の配列、真核生物のmRNAからのcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）のDNAからのゲノムDNA配列、および合成のDNA配列も含むことができる。ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は通常、コード配列に対して3'に位置する。

【0055】

[00091] 転写および翻訳の制御配列は、宿主細胞においてコード配列の発現を提供する、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどのDNA制御配列である。

20

【0056】

[00092] 「プロモーター配列」は、細胞中でRNAポリメラーゼに結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始させる能力があるDNA制御領域である。本発明を規定する目的で、プロモーター配列は、その3'末端に転写開始部位が結合し、上流（5'方向）に伸長して、バックグラウンドを超えて検出できるレベルで転写を開始させるのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内には、転写開始部位（ヌクレアーゼS1でマッピングすることにより規定すると便利である）、およびRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出される。真核生物のプロモーターは、常にではないがしばしば、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。真核生物のプロモーターは、-10および-35のコンセンサス配列に加えてシャイン-ダルガノ配列を含む。

30

【0057】

[00093] 「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写および翻訳を制御および調節するDNA配列である。コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、次いで、コード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される場合、細胞中の転写および翻訳の制御配列の「制御下」にある。

【0058】

[00094] 外因性または異種性のDNAが細胞の内部に導入される場合、細胞は、外因性または異種性のDNAにより「形質転換」されている。形質転換性のDNAは、細胞のゲノムを作り上げる染色体DNA中に組み入れられ（共有結合性に連結され）てもよく、または組み入れられなくてもよい。例えば、原核生物、酵母菌、および哺乳動物細胞では、形質転換性のDNAは、プラスミドなどのエピソームのエレメント上に維持され得る。真核細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、その中で形質転換性のDNAが染色体中に組み入れられ、その結果染色体の複製によって娘細胞によって受け継がれるものである。この安定性は、真核細胞が、形質転換性のDNAを含む娘細胞の集団からなる細胞系またはクローンを確立する性能により実証される。「クローン」は、有糸分裂により単一の細胞または共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞系」は、多くの世代の間*in vitro*で安定に増殖する能力がある一次細胞のクローンである。

40

50

【 0 0 5 9 】

[00095] 少なくとも約75%（好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90または95%）のヌクレオチドが、規定された長さのDNA配列を上回って適合する場合、2つのDNA配列は「実質的に相同」である。実質的に相同である配列は、配列を、配列データバンクにおいて入手できる標準的なソフトウェアを用いて、または、例えば、特定のシステムに規定されるストリンジェントな条件下で、サザンハイブリダイゼーション実験において比較することにより同定することができる。適切なハイブリダイゼーション条件の規定は、当業者の範囲内である。例えば、Maniatisら、上述；DNA Cloning、IおよびII巻、上述；Nucleic Acid Hybridization、上述を参照されたい。

10

【 0 0 6 0 】

[00096] 抗体、ポリペプチド、または同じアミノ酸配列を有するこれらの活性なフラグメントをコードするが、オリジナルまたは知られているコード配列に分解される、本発明の、または本発明で用いられる抗体をコードするDNA配列も、本発明の範囲内であることを理解されたい。「に分解される」は、異なる3文字コドンを用いて特定のアミノ酸を特定することを意味する。各特定のアミノ酸をコードするのに、以下のコドンを交換可能に用いることができることは当業界周知である：

フェニルアラニン（PheまたはF） UUUまたはUUC

ロイシン（LeuまたはL） UUAまたはUUGまたはCUUまたはCUCまたはCUAまたはCUG

20

イソロイシン（HeまたはI） AUUまたはAUCまたはAUA

メチオニン（MetまたはM） AUG

バリン（ValまたはV） GUUまたはGUCまたはGUAまたはGUG

セリン（SerまたはS） UCUまたはUCCまたはUCAまたはUCGまたはAGUまたはAGC

プロリン（ProまたはP） CCUまたはCCCまたはCCAまたはCCG

スレオニン（ThrまたはT） ACUまたはACCまたはACAまたはACG

アラニン（AlaまたはA） GCUまたはGCGまたはGCAまたはGCG

チロシン（TyrまたはY） UAUまたはUAC

ヒスチジン（HisまたはH） CAUまたはCAC

30

グルタミン（GlnまたはQ） CAAまたはCAG

アスパラギン（AsnまたはN） AAUまたはAAC

リジン（LysまたはK） AAAまたはAAG

アスパラギン酸（AspまたはD） GAUまたはGAC

グルタミン酸（GluまたはE） GAAまたはGAG

システイン（CysまたはC） UGUまたはUGC

アルギニン（ArgまたはR） CGUまたはCGCまたはCGAまたはCGGまたはAGAまたはAGG

グリシン（GlyまたはG） GGUまたはGGCまたはGGAまたはGGG

トリプトファン（TrpまたはW） UGG

40

終結コドン UAA（オーカー）またはUAG（アンバー）またはUGA（オパール）

【 0 0 6 1 】

[00097] 上記に規定するコドンはRNA配列に対するものであることを理解されたい。DNAに対する対応するコドンはUにTが置換している。

【 0 0 6 2 】

[00098] 特定のコドンが、異なるアミノ酸をコードするコドンに変化するように、配列をコードする抗体または活性なフラグメントに変異を行ってもよい。このような変異は、可能な最小のヌクレオチドの変化を行うことによってなされるのが一般的である。この種類の置換変異は、結果として生じるタンパク質におけるアミノ酸を変化させるように、非保存的に（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸

50

からのコドンを、別の分類に属するアミノ酸に変更することにより)、または保存的に(すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸からのコドンを、同じグループに属するアミノ酸に変更することにより)行うことができる。このような保存的な変化は一般的に、結果として生じるタンパク質の構造および機能における変化をあまりもたらさない。非保存的な変化は、結果として生じるタンパク質の構造、活性、または機能を変更する可能性が高い。本発明は、結果として生じるタンパク質の活性または結合の特徴を大幅に変更しない、保存的な変化を含む配列を含むと考えるべきである。

【0063】

[00099] 上記に言及した通り、抗体、ポリペプチド、またはこれらの活性なフラグメントをコードするDNA配列は、クローニングよりむしろ合成的に調製され得る。DNA配列は、抗体またはフラグメントのアミノ酸配列に適するコドンでデザインされ得る。一般的に、配列を発現に用いる場合、意図する宿主に好ましいコドンが選択される。完全な配列を、標準方法によって調製される重複するオリゴヌクレオチドから構築し、完全なコード配列に構築する。例えば、Edge, Nature, 292:756(1981); Nambairら, Science, 223:1299(1984); Jayら, J. Biol. Chem., 259:6311(1984)を参照されたい。合成のDNA配列により、類似体または「ムテイン」を発現する遺伝子を簡便に構築できるようになる。あるいは、ムテインをコードするDNAは、天然の遺伝子またはcDNAの部位特異的変異誘発により作成することができ、ムテインは、従来のポリペプチド合成を用いて直接作成することができる。

【0064】

[00100] DNA構築物の「非相同」領域は、天然では大型の分子に付随して見出されない、大型のDNA分子内の同定可能なDNAのセグメントである。したがって、非相同領域が哺乳動物の遺伝子をコードする場合、遺伝子には、通常、源の生物体のゲノムにおいて哺乳動物のゲノムDNAに隣接しないDNAが隣接する。非相同コード配列の別の一例は、コード配列自体が天然では見出されない構築物である(例えば、ゲノムのコード配列がイントロンを含むcDNA、または天然の遺伝子と異なるコドンを有する合成の配列)。対立遺伝子変異または天然に存在する変異性の事象では、本明細書に規定するDNAの非相同領域は生じない。

【0065】

[000101] 発現制御配列が、そのDNA配列の転写および翻訳を制御および調節する場合、DNA配列は発現制御配列に「作動可能に連結している」。「作動可能に連結している」という語は、発現させようとするDNA配列の前に適切な開始シグナル(例えば、ATG)があり、発現制御配列の制御下でDNA配列の発現およびDNA配列によりコードされる所望の生成物の生成を可能にする正しい読み枠を維持することを含む。組換えDNA分子中に挿入させたい遺伝子が適切な開始シグナルを含んでいない場合、このような開始シグナルを遺伝子の前に挿入してもよい。

【0066】

[000102] 「標準のハイブリダイゼーション条件」という語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の両方に対して、 $5 \times SSC$ および $65^\circ C$ に実質的に等しい塩および温度の条件を意味する。しかし、当業者であれば、このような「標準のハイブリダイゼーション条件」は、バッファー中のナトリウムおよびマグネシウムの濃度、ヌクレオチド配列の長さおよび濃度、ミスマッチのパーセント、ホルムアルデヒドのパーセントなどを含めた特定の条件に依存することを理解されよう。「標準のハイブリダイゼーション条件」の決定においてやはり重要なことは、ハイブリダイズする2つの配列が、RNA-RNAであるか、DNA-DNAであるか、またはRNA-DNAであるかということである。このような標準のハイブリダイゼーション条件は、当業者によって、よく知られている処方にしたがって容易に決定され、この場合ハイブリダイゼーションは典型的に、所望により、より高いストリンジェンシーの洗浄を伴う、予想または決定される T_m を $10 \sim 20^\circ C$ 下回

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 6 7 】

[000103] 本発明の主要な態様において、本発明は、気道または呼吸器に中和抗体を投与することによる、例えば中和抗体（複数可）の鼻腔内または吸入投与による、特にインフルエンザウイルスを含めたウイルス感染の有効な治療および予防のための、新規な方法、プロトコル、および手段の同定に関する。中和抗体（複数可）、特にインフルエンザウイルス中和抗体の鼻腔内または吸入投与は、I P投与などの投与の代替的な投与手段よりも、治療的または予防的にウイルスを治療または阻止するのに有効である。本発明の主要な態様において、本発明は、中和抗体（複数可）の鼻腔内投与による、特にインフルエンザウイルスを含めたウイルス感染の有効な治療および予防のための新規な方法および手段の同定に関する。吸入および/または鼻腔内の送達および投与は、同じ量の同じ抗体の全身投与（I VまたはI P）よりも低投与量で、より優れており、効果的であり、有効である。ウイルス曝露または感染の前、または後でさえも、I N送達する抗体での治療または予防は有効である。

10

【 0 0 6 8 】

[000104] 鼻腔内投与量の抗体をI P投与量の抗体と組み合わせる方法またはプロトコルは、ウイルス、特にインフルエンザウイルスに対して治療的または予防的に特に有効である。このような方法またはプロトコルは、抗体の1つまたは複数の鼻腔内または吸入投与量を、抗体の1つまたは複数のI PまたはI V投与量と組み合わせることを含む。鼻腔内または吸入投与量を、I PまたはI V投与量の前に、後に、同時に、または順番に投与してもよい。1つまたは複数の鼻腔内、吸入、I P、またはI V投与量（複数可）を投与することができる。鼻腔内投与される抗体は、F a bなど、F cまたはエフェクター機能のない抗体フラグメントであってよく、I P投与される抗体は、エフェクター機能または増強されたエフェクター機能があってもよい。

20

【 0 0 6 9 】

[000105] 本発明にしたがって、ウイルス、特にインフルエンザウイルスに対する有効性の増強のために、中和抗体を気道または呼吸器に投与する。気道または呼吸器への投与は、あらゆる認められた、または知られている手段によるものであってよく、吸入投与または鼻腔内投与を含むことができる。有効性の増強のために、中和抗体を上気道および下気道の1つまたは複数に送達し、上気道および下気道には、鼻腔、鼻、洞、喉、咽頭、喉頭、気管、気管支、および肺が含まれ得る。

30

【 0 0 7 0 】

[000106] 吸入は、特に、抗体または活性なそのフラグメントを含めた薬剤もしくは化合物、またはこのようなものを含む組成物を、取り込み、または投与し/投与される文脈において、取り込み、それによって組成物中に含まれるものも含めて、薬剤、化合物、抗体、フラグメントを呼吸器に送達することを意味する。呼吸器は、上気道および/または下気道を含むことができる。上気道は、鼻、鼻腔、洞、喉頭、気管を含む。下気道は、肺、気道（気管支および細気管支）、ならびに気嚢（air sacs）（肺胞）を含む。吸入は、鼻により、もしくは口により、または気管内投与として下気道への直接投与により生じてよい。したがって、吸入は、鼻のみ、または主に、鼻腔内、口による吸入、経口吸入、気管内吸入、気管内滴下注入を含むことができる。したがって、吸入は、それにより、薬物、薬剤、組成物、抗体、フラグメントが、独占的に、特異的に、または優先的に、上気道および/または下気道を含めた呼吸器に到達し、または呼吸器もしくは呼吸器中に堆積する、あらゆる投与手段を提供および企図するものである。

40

【 0 0 7 1 】

[000107] 本明細書で用いる鼻腔内の語は、それだけには限定されないが、鼻もしくは鼻構造内に、または鼻もしくは鼻構造によって、投与し、投与、または生じることを含む。本明細書で用い、実施例において実施形態として説明する鼻腔内の語は、それにより薬物、薬剤、抗体、フラグメント、組成物が、呼吸器に送達され、またはそうでなければ呼吸器に提供され、呼吸器中もしくは呼吸器に堆積し、またはそうでなければ呼吸器に分配さ

50

れる他の投与手段を排除するのに、特に役立つ点で、鼻または鼻腔によって直接、または特異的に、または単独に投与することに限定され、または限定をほのめかそうとするものではない。

【 0 0 7 2 】

[000108] 呼吸器または気道（複数可）に投与または送達するための装置は、当業者に、および臨床または医薬の実践において、知られ、認められており、本発明の方法、プロトコール、および組成物に適用できる。装置には、計量吸入器、計量噴霧ポンプ、ハンドバルブアトマイザ、小体積または大体積のネブライザ、超音波ネブライザ、および乾燥粉末吸入器が含まれる。

【 0 0 7 3 】

[000109] 本発明は、呼吸器を標的化し、感染し、または罹患する、特に薬剤または病原体の、治療または予防における適用および使用がある。したがって、本発明は、呼吸器感染症の、特に呼吸器ウイルスの、および呼吸器疾患に付随し、または必然的に関連する薬剤の、治療または予防における適用および使用がある。通常のウイルス呼吸器疾病は、同様の形質を有し、上気道に影響を及ぼす多様なウイルスによって引き起こされる疾患である。関与するウイルスは、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、パラインフルエンザウイルス、および呼吸器アデノウイルスであってよい。パラインフルエンザウイルスは、幼児のクループの主な原因であり、気管支炎、肺炎、および細気管支炎を引き起こし得る。アデノウイルスは主に呼吸器および消化器、ならびに目の結膜に侵入する。アデノウイルスは、咽頭炎から肺炎まで、結膜炎、および下痢の様々な疾患を引き起こし得る。ウイルスに曝露された1～10日後に症状が出現し得る。

【 0 0 7 4 】

[000110] 状態（癌、炎症状態、抗ウイルス薬、抗感染薬）を治療または軽減するための抗体の臨床的投与は、独占的に全身的投与を、および一般的にIV投与を用いるが、これらは大量および高価な量の抗体、医療関係者の補助、および投与するのにかなりの時間（典型的なIV投与は2時間である）を必要とする。特に、これらの抗体を網羅する特許または適用において、鼻腔内などの他の投与手段に言及してもよいが、鼻腔内投与は、おそらくあまり理解されておらず、あまり魅力的でなく、またはあまり効果的でないと考えられており、IPまたはIVの投与経路よりも間接的に、またはあまり直接的ではなく免疫系を呼び起こすとみなされているため、よくても等価な代替と思われ、完全に無視され、または追及されていない。しかし、本発明、および本明細書に提供する注目すべき研究は、鼻腔内投与は、特に中和抗体には、実際好ましく、より効果的な代替であることを実証している。特に、最初の病原体の侵襲の、または曝露の部位または位置で鼻腔内に作用し得る中和抗体は、代替の投与様式よりも有効である。

【 0 0 7 5 】

[000111] したがって、本発明によれば、抗体の鼻腔内送達は、IVまたはIP経路などの全身的な経路に比べて、有効性における顕著かつ著しい改善が提供される。さらに、鼻腔内の有効性の増強は、中和性である抗体によって実証される。非中和抗体、特に、呼吸器の薬剤またはウイルスの、特にインフルエンザウイルスの直接的な阻害または阻止を実証しない抗体は、中和またはウイルス阻止の、認められ、または知られているアッセイを用いると、全身的またはIP投与に対して鼻腔内送達された場合に有効性の障害を表す。本研究は、認められ、知られているインフルエンザマウスモデルを用いて、中和抗体の鼻腔内（IN）送達は、腹腔内（IP）または静脈内（IV）の送達経路に比べて、治療的および予防的な有効性を10倍を超えて劇的に上昇させることができることを実証する。匹敵する有効性は、IVまたはIPの経路の代わりにIN投与した場合、同じ投与量の10分の1未満を用いて実現することができる。鼻腔内投与した中和抗体は、治療有効性を数桁も劇的に上昇させることができる。鼻腔内投与した中和抗体は、治療有効性を最小で10～100倍、劇的に上昇させることができる。鼻腔内投与した中和抗体は、同様の条件下の同じ抗体の腹腔内（IP）投与に比べて、治療有効性を少なくとも10倍、少なくとも50倍、10倍を超え、50倍を超え、100倍を超え、最高100倍、劇的に上昇

10

20

30

40

50

させることができる。中和抗体の鼻腔内投与は、特にインフルエンザ感染を含めた、感染症の予防および治療に対する新規かつ意外な取組みを提供する。I N投与は現在、効果的に実行することができ、他の形態の投与と組み合わせるとより有効で費用のかからない治療および予防の取組みを提供している。

【 0 0 7 6 】

[000112] 当業界において規定され、または認められ、かつ本明細書で言及し、利用する、抗体媒介性のウイルスの中和は、様々なアッセイにおいて試験することができる。中和アッセイの例には、培養中の細胞に対するウイルスの細胞変性効果（C P E）の阻害に基づく従来の中和アッセイが含まれる。例えば、インフルエンザの中和は、インフルエンザに感染させたM D C K細胞中のC P Eの形成を低減または阻止することにより試験することができる。ウイルスおよび中和剤を、細胞に加える前にあらかじめ混合した後、ウイルス侵入の阻止を測定してもよい。ヘマグルチニン阻害（H 1）は*i n v i t r o*で試験され得、ウイルスが赤血球に結合する性能の阻止が検出され得る。知られており、認められている例示的な中和アッセイは、動物のインフルエンザに対するW H Oマニュアル（W H O Manual on Animal Influenza）（who/cds/csr/ncs/2002.5、48-54頁）に提供される。シアル酸受容体結合部位を阻止する抗体は、細胞に対するウイルスの結合を中和し、それにより感染を阻止する。逆に、中和アッセイは、タミフルなどのノイラミニダーゼ阻害薬の場合同様、ウイルスの放出の阻止を検出することができる。最近、ウイルスの放出を妨げることで同様に機能する中和抗体が同定されており、中和のこの例には、インフルエンザBウイルスに対するC R 9 1 1 4抗体が含まれる（Dreyfusら（2012）Science 337: 1343-1348）。また、E L I S Aと組み合わせたマイクロタイタープレートを用いて、ウイルスの核タンパク質（N P）を感染細胞中で検出する、マイクロ中和アッセイが利用されている。ウイルスタンパク質を測定するための定量的P C Rアッセイが記載されている（Dreyfus Cら（2012）Emerging Inf Diseases 19（10）: 1685-1687）。

【 0 0 7 7 】

[000113] 非中和抗体は、ウイルスとのいかなる直接的な相互作用もしくは結合を実証することができない抗体であり、またはウイルスが感染する細胞上のウイルスの標的が非中和性であると解釈されることがある。非中和抗体はウイルスに結合し得るが、あらゆる上記に記述し、または認められている中和アッセイにおいて、ウイルスまたはウイルス複製を中和せず、または阻害しない。非中和抗体は、ウイルスにおける保存されているタンパク質またはタンパク質上のエピトープに結合し得る。例えば、臨床試験T C N - 0 3 2におけるM 2抗体は、広範囲のインフルエンザAウイルスに結合することができるが、従来の中和アッセイでは中和が実証されない。同様に、中和しない抗体は、それがH Aに結合すると同定することができる。

【 0 0 7 8 】

[000114] 本発明者らは、非中和性であるが、H Aに対して広範囲に反応性の抗体を同定した。これらには、C P E阻害、H I、マイクロ中和、およびプラーク減少アッセイを含めた中和アッセイで陰性であった、抗体6 P 1 5、1 P 1 9、および1 K 1 7が含まれる。本明細書の実施例において実証する通り、これらの抗体は、鼻腔内投与対腹腔内投与で改善された治療有効性を表さない。

【 0 0 7 9 】

[000115] 本発明の一態様において、特に、抗体またはフラグメントが中和性である、ウイルス結合抗体またはその結合フラグメントを、薬剤または薬物と組み合わせ、本発明で用いるための、吸入または鼻腔内投与を含めた、呼吸器または気道投与のための、抗体-薬物または抗体-薬剤コンジュゲートを形成してもよい。抗体またはフラグメントと組み合わせられ、またはコンジュゲートされた薬物または薬剤は、ウイルス中和性の薬物または薬剤であってよい。

【 0 0 8 0 】

[000116] 特定の、さらなる一態様において、中和抗体の組合せの、または連続的なI N投与は、抗体のI PまたはI V投与と一緒に、ウイルス感染を治療および/または予防す

10

20

30

40

50

るための有効で増強された相乗的な手段を提供する。I PまたはI Vを含めて全身投与される抗体は、中和でも、または非中和でもよく、それによりI N投与するものと同じ抗体でもよく、または修飾された抗体でも、もしくは別個の抗体でもよい。したがって、鼻腔内送達するための抗体である中和抗体は、別の手段による送達、特にI PまたはI V送達を含めた全身送達のために、それと組み合わせ用いられる抗体とは別個の、または異なる抗体でもよい。

【0081】

[000117] 本発明は、中和抗体のFc機能およびFcポーションを実証するものであり、よってエフェクター機能は、鼻腔内の有効性の増強に必要とされない。したがって、抗体、およびFabフラグメントなどのフラグメント、またはFcのない、もしくはエフェクター機能のない抗体は、鼻腔内で有効である。対照的に、抗体のFabフラグメント（中和もしくは非中和）、またはFcのない、もしくはエフェクター機能のない抗体は、I PまたはI Vで有効ではない。

10

【0082】

抗体

[000118] 「抗体」という語は、天然でも、部分的もしくは全体的に合成で生成されていても、免疫グロブリンを記述するものである。この語はまた、抗体の結合ドメインであり、または結合ドメインに相同である、結合ドメインを有するあらゆるポリペプチドまたはタンパク質を網羅する。CDRグラフト化抗体も、この語によって企図される。「抗体」は、特異的なエピトープに結合する、抗体およびそのフラグメントを含めた、あらゆる免疫グロブリンである。この語は、ポリクローナル、モノクローナル、およびキメラの抗体を包含し、キメラ抗体は米国特許第4,816,397号および第4,816,567号にさらに詳しく記載されている。「抗体（複数可）」という語には、2本の重鎖（H）および2本の軽鎖（L）である4本の全長のポリペプチド鎖を一般的に含む、野生型免疫グロブリン（Ig）分子、またはその等価のIgホモログ（例えば、重鎖だけを含むラグダのナノボディ）が含まれ；Ig分子の本質的なエピトープ結合の特徴を保持する、全長の機能的な変異体、バリエーション、またはその誘導体が含まれ、二重特異的な、二特異的な、多特異的な、および二重の可変ドメインの抗体が含まれる。免疫グロブリン分子は、あらゆるクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）のものであってよい。好ましい抗体は、IgGクラスのものである。「抗体」という語の意味の内には、あらゆる「抗体フラグメント」も含まれる。

20

30

【0083】

[000119] 「抗体結合部位」は、重鎖および軽鎖の可変領域、ならびに抗原に特異的に結合する超可変領域からなる抗体分子の構造上のポーションである。

【0084】

[000120] 本明細書で用いられる様々な文法上の形態における「抗体分子」の句は、インタクトな免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なポーションの両方を企図するものである。

【0085】

[000121] 本明細書で用いる「モノクローナル抗体」という語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわちこのような集団を構成する個々の抗体は、同一であるか、かつ/または同じエピトープに結合するものであり、ただし存在し得るバリエーション抗体、例えば天然に存在する変異を含んでいたり、もしくはモノクローナル抗体の調製物を生成する間に生じたりする抗体は除外されるが、一般的にはこのようなバリエーションがわずかな量で存在する。モノクローナル抗体は、特定の抗原と免疫反応する能力がある、一の抗体結合部位を有する抗体である。モノクローナル抗体は、よって、それが免疫反応するあらゆる抗原に単一の結合親和性を表すのが典型的である。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むのが典型的であるポリクローナル抗体の調製物とは対照的に、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に

40

50

対するものである。モノクローナル抗体は、各々が異なる抗原に免疫特異的である複数の抗体結合部位を有する抗体分子を含む場合は、多特異的になる可能性があり、例えば二特異的（キメラ）モノクローナル抗体などがある。「モノクローナル」の修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示すものであり、あらゆる特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈してはならない。例えば、本発明にしたがって用いようとするモノクローナル抗体は、それだけには限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含めた様々な技術によって作成してもよく、モノクローナル抗体を作成するためのこのような方法および他の例示的な方法を本明細書に記載する。

10

【0086】

[000122] 「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体がそれに対して結合する抗原に結合する、インタクトな抗体のポーションを含む、インタクトな抗体以外の分子を意味する。抗体フラグメントの例には、それだけには限定されないが、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体フラグメントから形成される多特異的抗体が含まれる。さらに、抗体フラグメントは、VHドメインの特徴を有する、すなわちVLドメインと一緒に集合することができる単鎖ポリペプチド、またはVLドメインの特徴を有する、すなわちVHドメインと一緒に機能的な抗原結合部位に集合し、それにより全長の抗体の抗原結合の性質を提供することができる単鎖ポリペプチドを含む。「抗体フラグメント」は、全長ではないポリペプチド鎖を少なくとも1本含む分子を含み、(i) 可変軽鎖(VL)、可変重鎖(VH)、定常軽鎖(CL)、および定常重鎖1(CH1)ドメインからなる1価のフラグメントである、Fabフラグメント；(ii) ジスルフィド架橋によりヒンジ領域で連結している2本のFabフラグメントを含む2価のフラグメントである、F(ab')₂フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインからなる、Fab(Fd)フラグメントの重鎖ポーション；(iv) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなる、可変フラグメント(Fv)フラグメント、(v) 単一の可変ドメインを含む、ドメイン抗体(dAv)フラグメント(Ward, E.S.ら Nature 341, 544-546 (1989))；(vi) ラクダ抗体；(vii) 単離された相補性決定領域(CDR)；(viii) VHドメインおよびVLドメインが、2つのドメインを会合させて抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーにより連結されている、単鎖Fvフラグメント(Birdら Science, 242, 423-426, 1988; Hustonら PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988)；(ix) VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、非常に短い間隔のため同じ鎖上の2つのドメイン間に対形成させることのできないリンカーを用い、それによりドメインに、別の鎖の相補的なドメインとの対形成を強い、2つの抗原結合部位を作り出す、2価の、二特異的抗体であるダイアボディ(WO 94/13804; P. Holligerら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993))；ならびに(x) 相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒に一对の抗原結合領域を形成する、直列のFvセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む、直鎖状抗体；(xi) 多価の抗体フラグメント(scFvダイマー、トリマー、および/またはテトラマー)(Power and Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 (2000))；(xii) 免疫グロブリン定常ドメインCH3またはCH4に融合しているscFvからなる2価の分子であり、CH3またはCH4定常ドメインは2量体化ドメインとして働く、ミニボディ(Olafsen トラ (2004) Prot Eng Des Sel 17(4):315-323; Hollinger P and Hudson PJ (2005) Nature Biotech 23(9): 1126-1136)；ならびに(xiii) 他の全長ではない重鎖および/または軽鎖のポーション、または変異体、バリエーション、またはその誘導体の単独もしくはあらゆる組合せ。単鎖Fab(scFab)は知られており、US 20070274985におけるものを含めて記載されている。

20

30

40

【0087】

[000123] 抗体は数々の方法で修飾することができるが、「抗体」という語は、必要とされる特異性を有する結合ドメインを有し、本明細書にしたがって適用できる場合は、中和

50

能力を有する、あらゆる特異的な結合メンバーまたは物質を網羅すると解釈されたい。したがって、この語は、天然でも、または完全もしくは部分的に合成でも、免疫グロブリン結合ドメインを含むあらゆるポリペプチドを含む、抗体フラグメント、誘導体、機能的な等価物、および抗体のホモログを網羅する。別のポリペプチドに融合している、免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、または等価物が、ゆえに含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、E P - A - 0 1 2 0 6 9 4 および E P - A - 0 1 2 5 0 2 3、ならびに米国特許第 4, 8 1 6, 3 9 7 号および第 4, 8 1 6, 5 6 7 号に記載されている。

【 0 0 8 8 】

[000124] 本明細書で用いる「F a b フラグメント」は、V L ドメインおよび軽鎖の定常ドメイン (C L) を含む軽鎖フラグメント、ならびに重鎖の V H ドメインおよび第 1 の定常ドメイン (C H 1) を含む抗体フラグメントを意味する。抗体分子の F a b および F (a b ') ₂ ポーションは、実質的にインタクトな抗体分子上で、よく知られている方法によって、それぞれパインおよびペプシンのタンパク質分解反応によって調製してもよく、または合成もしくは組換えで調製してもよい。F a b ' 抗体分子ポーションもよく知られており、F (a b ') ₂ ポーションから生成し、引き続き 2 本の重鎖ポーションをメルカプトエタノールでジスルフィド結合連結を還元し、引き続き結果として生じたタンパク質のメルカプタンをヨードアセトアミドなどの試薬でアルキル化してもよい。

10

【 0 0 8 9 】

[000125] 本明細書における「F c ドメイン」という語は、定常領域の少なくともポーションを含む、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を規定するのに用いられる。例えば、天然の抗体では、F c ドメインは、I g G、I g A、および I g D アイソタイプにおける抗体の 2 本の重鎖の第 2 および第 3 の定常ドメインに由来する 2 つの同一のタンパク質フラグメントから構成され、I g M および I g E の F c ドメインは、各ポリペプチド鎖に 3 つの重鎖定常ドメイン (C_H ドメイン 2 ~ 4) を含んでいる。

20

【 0 0 9 0 】

[000126] 例示的な抗体分子は、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グロブリン分子、およびパラトープを含む免疫グロブリン分子のポーションであり、当業界では F a b、F a b '、F (a b ') ₂、および F (v) として知られているポーションを含み、これらのポーションは、本明細書に記載する治療方法において用いるのに好ましい。

30

【 0 0 9 1 】

[00127] 本発明において教示するある場合には、あるレベルまたはある量の中和活性が必要とされ、特に鼻腔内または吸入投与に用いるのに必要な抗体の特徴である。したがって、本発明にしたがって鼻腔内使用するための、あらゆるフラグメント、バリエーション、誘導体、合成の、または抗体のポーションは、一側面のインフルエンザウイルスでは、中和能力、および標的のウイルスまたは病原体に対する活性を保持する必要がある。一方、腹腔内または静脈内を含めた代替的な全身的な経路によって投与される抗体は、一側面のインフルエンザウイルスでは、標的のウイルスまたは病原体に結合し、または認識しなければならないが、中和は必要とされない。したがって、一例として、中和を保持する抗体 (複数可) の F a b フラグメントは、鼻腔内利用することができる。エフェクター機能は F c によって媒介され、鼻腔内の有効性および中和に必要とされない。逆に、全身送達される抗体は、エフェクター機能によって抗体の有効性を著しく媒介する。

40

【 0 0 9 2 】

[000128] 「抗原結合ドメイン」という語は、抗原の部分または全部に特異的に結合し、相補的である領域を含む、抗原結合分子の部分の意味する。抗原が大型である場合、抗原結合分子は、抗原の特定の部分のみに結合し得、この部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、例えば、一または複数の抗体可変ドメイン (抗体可変領域とも呼ばれる) などによって提供され得る。抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変領域 (V L) および抗体重鎖可変領域 (V H) を含むのが好ましい。

50

【 0 0 9 3 】

[00129] 「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の抗原に対する結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを意味する。天然の抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は、一般的に類似した構造であり、各ドメインは、保存されているフレームワーク領域（FR）を4つ、および超可変領域（HVR）を3つ含む。（例えば、Kindtら *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 91頁（2007）を参照されたい）。単一のVHまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合して相補的なVLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングする抗体から、それぞれVHまたはVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolanoら、*J. Immunol.*, 150:880-887（1993）；Clarksonら、*Nature* 352:624-628（1991）を参照されたい。

10

【 0 0 9 4 】

[000130] 「抗体の抗原結合部位」という語は、本明細書で用いる場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を意味する。抗体の抗原結合ポジションは、「相補性決定領域」すなわち「CDR」からのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」すなわち「FR」領域は、本明細書に規定する超可変領域の残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインは、N末端からC末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4ドメインを含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原結合に最も寄与する領域であり、抗体の性質を規定する。抗体は、抗体の重鎖および軽鎖のCDRにしたがって、アミノ酸配列において十分に規定され得、抗体の重鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3の配列、および抗体の軽鎖可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3の配列にしたがって特に記載し、特徴付けられ得る。抗体は、重鎖および軽鎖を含む抗体またはフラグメントとして規定され、または特徴付けられ得、重鎖可変領域は特定のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含み、軽鎖可変領域は特定のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む。抗体のCDRおよびFR領域は、当業者であれば入手でき、知っている標準的な方法および分析にしたがって決定することができる。したがって、CDRおよびFR領域は、Kabataら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.（1991）の標準的な定義にしたがって、または国際免疫遺伝情報システム（IMGT）（imgt.org; LeFranc, M-P（1999）*Nucl Acids Res* 27:209-212; LeFranc, M-P（2005）*Nucl Acids Res* 33:D539-D579）にしたがって決定することができる。

20

30

【 0 0 9 5 】

[000131] 「エピトープ」という語は、抗体に特異的に結合する能力がある、あらゆるポリペプチド決定基を含む。ある実施形態において、エピトープ決定基は、化学的に活性化表面の分子の分類、例えば、アミノ酸、糖の側鎖、ホスホリル、またはスルホニルを含み、ある実施形態では、特異的な3次元構造の特徴、および/または特異的な荷電の特徴を有し得る。エピトープは、抗体が結合する抗原の領域である。

40

【 0 0 9 6 】

[000132] ハイブリドーマまたは他の手段によりモノクローナル抗体を作成するための方法および方法論、ならびに取組みはよく知られている。病原体、ウイルスまたはインフルエンザのペプチドに対して生成されるモノクローナル抗体のパネルを、様々な性質、すなわち、中和、アイソタイプ、エピトープ、親和性などに対してスクリーニングすることができる。特に興味深いのは、ウイルスまたはウイルスのサブユニットの活性を中和するモノクローナル抗体である。このようなモノクローナル抗体は、中和活性アッセイにおいて容易に同定することができる。高親和性の抗体も、有効な結合および/もしくは中和に、または天然もしくは組換えのウイルスの免疫親和性精製が望ましく、もしくは興味深い場合に有用である。

50

【 0 0 9 7 】

[000133] 本発明を實踐する上で有用なモノクローナル抗体は、適切な抗原特異性の抗体分子を分泌する、ハイブリドーマを含む培養培地を含むモノクローナルハイブリドーマ培養を開始することにより、生成することができる。ハイブリドーマが抗体分子を培地中に分泌するのに十分な条件下、および十分な期間、培養物を維持する。次いで、抗体含有培地を回収する。次いで、抗体分子を、よく知られている技術によってさらに単離することができる。

【 0 0 9 8 】

[000134] これらの組成物を調製するのに有用な培地は、当業界周知であり、かつ市販されており、合成の培養培地、近交系のマウスなどを含む。例示的な合成培地は、グルコース 4.5 g m / l、グルタミン 20 mm、および 20 % ウシ胎児血清を補ったダルベッコの最小必須培地 (D M E M ; Dulbeccoら Virol. 8:396 (1959)) である。例示的な近交系マウス系統は B a l b / c である。

10

【 0 0 9 9 】

[000135] モノクローナル抗ウイルス抗体を生成するための方法も、当業界周知である。Nimanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:4949-4953 (1983) を参照されたい。ウイルス、ウイルスタンパク質、またはペプチド類似体を、モノクローナル抗体を生成させるための免疫源として、単独で、または免疫原性の担体にコンジュゲートさせてのいずれかで用いるのが典型的である。ハイブリドーマを、ウイルス、タンパク質、またはペプチド類似体と免疫反応する抗体を生成する性能に対してスクリーニングする。

20

【 0 1 0 0 】

[000136] 抗体は二特異的であってもよく、例えば、抗体の結合ドメインの1つが、本発明で用いるウイルス中和抗体であり、他の結合ドメインが異なる特異性を有して、例えば、細胞の頂端表面に結合または会合し、気道の上皮細胞などに結合する。本発明の二特異的抗体は、抗体の結合ドメインの1つが本発明で用いる中和剤であり、そのフラグメントが含まれ、他の結合ドメインが別個の抗体またはそのフラグメントであり、別個の抗ウイルス特異的抗体のフラグメントが含まれ、代替の中和抗体または非中和抗体が含まれる。他の結合ドメインは、肺の上皮などにおける特定の細胞型、肺胞マクロファージ、神経細胞またはグリア細胞特異的な抗体を認識または標的化する抗体であってよい。本発明の二特異的抗体では、本発明の抗体の結合ドメインの1つが、特定の細胞受容体を認識し、かつ/または特定の様式で細胞を変調する、他の結合ドメインまたは分子、例えば、免疫モジュレーター (例えば、インターロイキン (複数可))、増殖モジュレーターまたはサイトカインまたは毒素 (例えば、リシン)、または抗有糸分裂剤もしくはアポトーシス剤もしくは因子と組み合わされていてよい。したがって、本発明の抗体は、感染、炎症などの適応症において、薬剤、標識、他の分子もしくは化合物もしくは抗体を、指示または標的化するのに利用することができる。

30

【 0 1 0 1 】

[000137] 本発明において用いる二特異的抗体は、少なくとも2つの F a b フラグメントを含んでいてよく、一例では、第2の F a b フラグメントの重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されている。可変領域または定常領域のいずれかの交換により、前記第2の F a b フラグメントは、「クロス F a b フラグメント (cross-Fab fragment) 」または「 x F a b フラグメント 」または「クロスオーバー F a b フラグメント 」とも呼ばれる。このような二特異的抗体は、U S 2 0 1 3 0 0 6 0 1 1 に記載されている。

40

【 0 1 0 2 】

[000138] 本発明において用いる、抗体、抗体分子、またはこれらのフラグメントが、他の分子または薬剤にコンジュゲートし、または付着している、本発明の免疫複合体または抗体融合タンパク質には、それだけには限定されないが、化学的切断薬 (chemical ablation agent)、毒素、免疫調節物質、サイトカイン、細胞毒性薬、化学療法薬、抗ウイル

50

ス薬、抗微生物薬もしくはペプチド、細胞壁および/もしくは細胞膜破壊薬、または薬物にコンジュゲートしている、このような抗体、分子、またはフラグメントがさらに含まれる。一態様において、免疫複合体または抗体融合物は、抗ウイルス薬、特に抗インフルエンザ薬にコンジュゲートしている、抗体、分子、またはフラグメントを含むことができる。抗インフルエンザ薬はノイラミニダーゼ阻害薬であってよい。抗インフルエンザ薬は、タミフルおよびリレンザから選択することができる。抗インフルエンザ薬は、アマンタジンまたはリマンタジンなどのM2阻害薬であってよい。抗インフルエンザ薬は、ウイルス複製阻害薬であってよい。

【0103】

[000139] あらゆるこのような抗インフルエンザ薬を、本明細書に提供する組成物の一部として配合しても、もしくは組み合わせてもよく、または抗体もしくはその活性なフラグメントと協同して、もしくは別々に、投与してもよい。抗インフルエンザ薬は、抗体またはそのフラグメントと同じまたは代替的な手段によって（例えば、吸入によって、もしくは経口の（例えば丸剤）手段によって）、あるいは本発明の吸入または鼻腔内組成物によって投与してもよい。したがって、本発明の抗体、および本発明の吸入または鼻腔内組成物は、例えば、タミフルおよびリレンザから選択される薬剤を含めたノイラミニダーゼ阻害薬などの抗インフルエンザ薬または抗ウイルス薬をさらに含むことができ、またはこれらと組み合わせて、もしくは逐次的に、もしくは前に投与してもよい。ウイルスの保存されているエピトープをベースとするものを含めた多数の抗体が、インフルエンザに対する治療用抗体として特徴付けられており、開発中である。交差反応性抗体の中には、ワクチン接種または自然感染の間に最も頑強な中和抗体を誘発する、ヘマグルチニン（HA）糖タンパク質を標的化するものもある。HAは、ウイルス感染における決定的な構成成分であるHA1およびHA2の2つのサブユニットから構成される。MAb CR6261は、グループ1内のH1ウイルスおよび他の亜型（H5）に結合し、HA2サブユニット上に結合する、十分に特徴付けられた抗体である（Throsby Mら（2008）PLOS ONE3:e3942; Eckert DCら（2009）Science 324:246-251; Friesen RHEら（2010）PLoS ONE5(2):e1906; 米国特許第8,192,927号）。MAb CR8020は、グループ2のウイルスであるH3および別の亜型（H7）両方のウイルス上の、HA2の膜近接領域に結合する（Eckert DCら（2011）Science 333:843-850）。スイスの研究者からの抗体FI6v3は、グループ1（H1）および2（H3）両方のウイルス上に存在するエピトープに結合することができるが、FI6は、マウスでは限られた有効性しか示さない（Corti Dら（2011）Science 333:850-856）。Paleseらは、異なるヘマグルチニンでのマウスにおける連続的な免疫化を用いて、H3インフルエンザウイルスに対する広範な保護的モノクローナル抗体を報告した（Wang TTら（2010）PLoS Pathog6(2):e1000796; 米国出願第20110027270号）。この取組みを用いて、広範に反応性のH1抗体が単離された（Tan GSら（2012）J Virol 86(11):6179-6188）。

【0104】

[000140] 知られている様々なインフルエンザ抗体のリストを以下の表1に提供する。本発明の方法および組成物において、特に鼻腔内または吸入投与による有効性の増強に対する、表1の様々な抗体を評価する例示的な試験を、本明細書に提供する。表1に列挙するものを含めた、知られている抗体は、本発明の方法および組成物における評価および適用に適している。中和が知られておらず、または評価されない場合、中和は、本明細書に記載し、参考にするものを含めて、当業者に知られており、入手できる方法を用いて評価することができる。

【0105】

[000141] 表2は、例示的な抗体の配列の説明的な表を提供し、本明細書において本発明で適用できることが実証されるいくつかの抗体に対する重鎖および軽鎖のCDR配列を提供する。CDR配列は、表1に記載する出版物を含め、公開され、または入手できる配列に基づくものであり、由来するものである。

【0106】

10

20

30

40

50

[000142] 本発明は、知られている抗体および新たに単離された抗体を含めた、多数の別個の中和抗体に対する、低投与量の鼻腔内有効性を実証するものである。特に、例示的な鼻腔内の有効性を、抗体CR6261、CR8020、CR9114、6F12、GG3、5A7、mAb53、およびmAb579を含めた、例示的な抗体として、多数の別個の知られている抗体に対して提供する。前臨床試験を含めたCR6261およびCR8020などの多数の試験に関わらず、このような活性および有効性は、これら特定の抗体に対して実証されていない。知られており、新たに単離された抗体を含めた多数の別個の抗体が、本明細書において評価され、同様に効果的である。本発明にしたがって活性であり、有効である抗体は、多様なエピトープに向けられ、インフルエンザAウイルスの亜型H1、H3、H5、およびインフルエンザBも含めた別個の亜型を認識する。したがって、本発明は一般に適用できる現象を提供するものであり、ウイルスに対する一または複数の抗体、特にインフルエンザウイルスに対する、特に一または複数のモノクローナル抗体を鼻腔内投与することによって、ウイルスを中和する能力がある抗体を、ウイルス、感染、および/または伝染の、鼻腔内投与および治療または防止のための方法および組成物において利用することができる。抗体が中和する能力があるのであれば、抗体の標的またはエピトープ、および抗体のアイソタイプ(IgGアイソタイプ)は関連がないと思われる。同様の、または匹敵する能力および中和性能を有するさらなる抗体が、したがって、本発明で有用である。抗体のフラグメント、誘導體、またはバリエーションが企図される。Fabを含めた抗体フラグメントが、本発明にしたがって有効であることが、本明細書において実証される。本発明の一態様において、抗体Fabフラグメントは、鼻腔内または吸入投与する場合は、活性で効果的であり、IPまたはIV投与する場合は無効である。

10

20

【0107】

【 表 1 - 1 】

表 1

Mab 名称	起源	亜型	標的のエピトープ	サブクラス	参考文献	示される治療幅	治療投与量*
C179	マウス	H1 および H2	柄	IgG2a	Okuno et al (1993) J Virol 67:2552-2558 Okuno et al (1994) J Virol 68:517-520		i.p. 約 10mg/kg
F49	マウス	H3					
VN04-2	マウス	H5 (および H1)	柄	IgG1	Hanson et al (2006) Resp Res 7:1465 Lim et al (2008) Virology 5:1743 Prabhu et al (2009) Antiviral Ther 14:911-921		
FLA3.14	ヒト	H5 単独	不明	IgG1	Simmons et al (2007) PLoS Med 4:e178	H5	i.p/50mg/kg
mAb1(別 名 A06)	ヒト	H5 (および H1)	柄		Kashyap et al (2008) PNAS 105:5986-5991 Kashyap et al (2010) PLoS Path 6:e1000990	VN/04 (H5) および CA09 2:6 (H1)	i.p. 15mg/kg [2dpi]
CR6261	ヒト	グループ 1	柄	IgG1	Throsby et al (2008) PLoS One 3:e3942	H5 および WSN	i.v. 15mg/kg [4dpi]
CR8020	ヒト	グループ 2	柄		Ekiert et al (2009) Science 324:246-251 Koudstaal et al (2009) JID 200:1870-1873	H5 および WSN H5	i.v. 15mg/kg [4dpi]
CR9114	ヒト	A 型であり B と 反応する	柄		Friesen et al (2010) PLoS One 5:e9106		
CR8033	ヒト	B	頭部		Ekiert et al (2011) Science 333:843-850		
CR8071	ヒト	B	頭部		Dreyfus et al (2012) Science 337:1343-1348 Dreyfus et al (2012) Science 337:1343-1348 Dreyfus et al (2012) Science 337:1343-1348	示さず 示さず 示さず	
F10	ヒト	グループ 1	柄	IgG1	Sui et al (2009) Nat Struct Mol Bio 16:26-273 Hashem et al (2010) Biochem and Biophys 403:247-251	H5	i.p. 15mg/kg
S139/1	マウス	H1, 2, 3, 5, 9, 13	頭部		Yoshida et al (2009) PLoS Path 5:e1000350	示さず	

10

20

30

40

【表 1 - 2】

FE17またはFE41	ヒト	H5 (および H1)	頭部	Corti et al (2010) JCI 120:1663-1673		
12D1	マウス	H3	柄	Wang et al (2010) PLoS Path 6:e1000796		i.p. 30mg/kg (4dpi)
6F12	マウス	H1	柄	Tan et al (2012) J Virology 86, 6179-6188		HI Neth/ 09
GG3	マウス	H1	柄			
複数	ヒト	HI および H5	柄	Wrammert et al (2011) JEM 208:181-193		
F16v3	ヒト	A 型	柄	Corti et al (2011) Science 333:850-856		i.v. 15mg/kg [2dpi]
PN-SIA28	ヒト	H1	不明	Burioni et al (2009) New Microbiologica 32:319-324		
PN-SIA49	ヒト	グループ 1		Burioni et al (2010) Virology 399:144-152		示さず
CH65	ヒト	ほとんど HI	頭部	Burioni et al (2010) Virology 399:144-152		示さず
mAb 486	ヒト	A 型	柄	Whittle et al (2011) PNAS 108:14216-14221		
maAb 53	ヒト	グループ 1	柄	WO2013/086052		
mAb 579	ヒト	グループ 2	柄	WO2011/160083		
TCN-032 (抗 M2)		A 型単独	n/a	WO2013/086052		
VIS410		A 型	柄	Grande et al (2010) PNAS 107 (28):12658-12663		
5A7	ヒト	B 型	柄	US2013/0302349		
				Yasugi et al (2013) PLoS Pathogens 9 (2):e1003150; WO2013/114885		

*は、マウスにおいて感染後最後の時間に 100%生存を達成するのに必要とされる最小投与量を示す。

【表 2】

表 2

mAb 名称	特異性	重鎖					軽鎖				
		重鎖遺伝子	IMGT CDR1	IMGT CDR2	IMGT CDR3	軽鎖遺伝子	IMGT CDR1	IMGT CDR2	IMGT CDR3	IMGT CDR3	
CR6261	A グループ 1	IGHV1-69*12	GGPFRSYA	IIPIFGTT	AKHMGYQVRETMDV	IGLV1-51*01	SSNIGNDY	DNN	ATWDRRPTAYVV		
GG3	A グループ 1	IGHV9-1*02	GYTFTNYG	INIYSGES	ARSGDTMITAGRSFFAMDY	IGLV9-124*01	QEISGY	AAS	LQYANYPWS		
TRL053	A グループ 1	IGHV1-69*12	GGIIRKYA	IIAIFNTA	ARGMNYYSDFDY	IGLV3-20*01	QSVRSNN	GAS	QQYGSSPALT		
CR8020	A グループ 2	IGHV1-18*01	GYTFTSFG	ISAYNGDI	AREPPLFYSSWSLDN	IGLV3-20*01	QSVSMNY	GAS	QQYGTSPRT		
TRL579	A グループ 2	IGHV1-3*01	GYTFTAYT	INAGNGIIT	ARGPETYYYDKTNWLNLSIIPDEYFQII	IGLV1-5*03	QTINNY	KAS	QEYNNDSPLT		
5A7	B	IGHV3-33*01	GFTFNNGY	VWYDGLIK	ARDI.QPPHSPYGM DV	IGLV1-47*02	SSNIGSND	NNN	AAWDDSI.TVS		
CR8033	B	IGHV3-9*01	GFSFDEYT	INWKGNFM	AKDRLESSAMDILEGGTFDI	IGLV3-20*01	QSVSSSY	GAS	QQYGSPPWT		
CR8071	B	IGHV1-18*01	GYIFTESG	ISGYSGDT	ARDVQYSGSYLGAYY	IGLV1-47*01	SSNIGTNY	RSY	ATWDDSLDGVV		
CR9114	A および B	IGHV1-69*06	GGTSNNTYA	ISPIFGST	ARHGNYYYYSGMDV	IGLV1-44*01	DSNIGRRS	SND	AAWDDSLKGVV		

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

[000143] IN送達および投与に有用な中和抗体を、非中和抗体と組み合わせてもよい。本出願は、IN投与をIPまたはIV投与を含めた代替的な投与経路と組み合わせ、全体および組合せの有効性の増強をもたらすことができることを実証する。本明細書に提供する通り、抗体のINおよびIPの組合せ投与により、INおよびIPいずれかの単独に対して、相乗的な活性および有効性の増強をもたらされる。置き換えまたは代替の投与または治療の方法を提供するほかに、本発明は、最高の有効性のために、IN投与を、IP投与を含めた全身投与と組み合わせ、抗体媒介性の治療および予防に対する増強された組合せの取組みを提供する。

【0110】

[000144] 本発明は、投薬、低投薬、低投与量の処方、および新規な投与方法の代替的手段を提供する。

【0111】

組成物

[000145] 本発明にしたがって、鼻腔内の使用および投与のための組成物を提供する。組成物は特に、中和抗体、特にモノクローナル抗体または活性なそのフラグメント、特に抗ウイルス抗体、特にインフルエンザ抗体を含む。組成物は、一または複数の中和抗体、特に一または複数のモノクローナル抗体または活性なそのフラグメント、特に抗ウイルス抗体、特にインフルエンザ抗体を含むことができる。組成物は、特に、1つを超える中和抗体、特にモノクローナル抗体または活性なそのフラグメント、特に抗ウイルス抗体、特にインフルエンザ抗体を含む。中和抗体は、1つを超える型または亜型のインフルエンザを中和し得、または個々の型またはグループのインフルエンザを中和する抗体と組み合わせてもよい。本発明の組成物は、特に、循環性のインフルエンザウイルス株に対するインフルエンザ中和抗体の組合せを含む。組成物（複数可）は、特に、循環性のインフルエンザウイルス株に対するインフルエンザ中和抗体の組合せ、特に抗インフルエンザAおよび抗インフルエンザB抗体を含むことができる。組成物（複数可）は、特に、循環性のインフルエンザウイルス株、特に、一または複数の抗インフルエンザAウイルスおよび1つまたは複数の抗インフルエンザB抗体に対するインフルエンザ中和抗体の組み合わせを含むことができる。組成物（複数可）は、特に、インフルエンザ中和抗体の組合せを含むことができ、インフルエンザ中和抗体の組合せは集合的に、適切な、かつ関連の循環性インフルエンザウイルス株に対するものであり、特に、集合的に、インフルエンザA H1およびH3亜型に対し、インフルエンザBの山形系列およびビクトリア系列に対するものである。インフルエンザウイルスAおよびBが組合せまたは抗体により中和されるのであれば、組成物（複数可）は、中和抗体を1、2、3、またはそれを超えて含むことができる。

【0112】

[000146] 組成物（複数可）は、特にインフルエンザA抗H1抗体、インフルエンザA抗H3抗体、および抗インフルエンザB抗体である、循環性インフルエンザウイルス株に対するインフルエンザ中和抗体の組合せを含むことができる。組成物（複数可）は、インフルエンザH5およびH7株に対して有効な、またはさらに有効な、インフルエンザA抗体を含むことができる。インフルエンザ抗体は、株特異的でも、または非特異的でも、または汎特異的（pan-specific）でもよく、H1亜型および/もしくはH3亜型および/もしくはH5および/もしくはH7もしくは他のインフルエンザA株もしくは亜型を含めたインフルエンザAを中和し得、かつ/または山形系列および/もしくはビクトリア系列を含めたインフルエンザBを中和し得る。組成物は、抗体の、IVまたはIPなどの代替的な投与の組成物と、同一の組成物、または個々のもしくは付加的な成分を有することができる。

【0113】

[000147] 本発明は、鼻腔内抗体組合せ組成物、または鼻腔内投与に適し、もしくは鼻腔内投与に選択される、抗体の組合せ、特にインフルエンザ抗体、特にモノクローナルインフルエンザ抗体の組成物を提供し、抗体の組合せは、循環性ウイルス株に対する抗体を含む、抗体を包含する、または抗体からなる。したがって、インフルエンザの循環性株は現

10

20

30

40

50

在、インフルエンザB（山形）、インフルエンザB（ビクトリア）、インフルエンザA H1亜型、およびインフルエンザA H3亜型であるので、インフルエンザB（山形）、インフルエンザB（ビクトリア）、インフルエンザA H1亜型、およびインフルエンザA H3亜型の各々に対する抗体（複数可）を有し、または含む本発明の組合せ組成物を提供する。

【0114】

[000148] 組合せの抗体が、表1に指摘し、本明細書に実証するものなど、1つを超えるインフルエンザ株または亜型に向けられ得るのは注目に値する。したがって、本明細書に実証する通り、本明細書で利用する抗体CR9114またはCA9114は、インフルエンザAおよびインフルエンザB株に対して有効である。本明細書で利用する抗体CR6261またはCA6261は、H1、H5などを含む、様々なグループ1のインフルエンザA亜型に対して有効である。本明細書で利用する抗体CR8020またはCA8020は、H3およびH7を含む、様々なグループ2のインフルエンザA亜型に対して有効である。抗体Mab53は、グループ1および2のインフルエンザAのH1、H9、H7、およびH5亜型に対して有効である。抗体Mab579は、H3およびH7の亜型に対して有効である。したがって、現在、循環性のインフルエンザ株はH1、H3、およびB型であり、新たなまたは単一のインフルエンザの流行期に生じ、出現し得る亜型を含めて、さらなる株および亜型に対して有効性を有する組合せを産生することができ、本明細書に提供される。

10

【0115】

[000149] 組成物は、特に、IPまたはIVなどのあらゆる代替の投与量または投与形態よりも低い投与量または量の抗体を含むように調合してもよい。したがって、本発明で用いる組成物は、代替の投与、特にIPまたはIV投与のための組成物に対して、またはその組成物に比べて、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、100倍を超え、100倍を超えて低減した量の中和抗体を含むことができる。

20

【0116】

[000150] 本発明の組成物は、哺乳動物の体重ベースで1mg/kg未満の量の、特に鼻腔内投与を意図する投与量の抗体を特に含むことができる。特定の一態様において、この組成物は、ヒトの体重ベースで1mg/kg未満の投与に達する抗体を含む。本発明の組成物は、マウス、イヌ、ウマ、ネコ、またはヒトなど、臨床的に関連のある哺乳動物を含めた、哺乳動物の体重ベースで、1mg/kg未満の、0.5mg/kg未満の、0.1mg/kg未満の、0.05mg/kg未満の、0.01mg/kg未満の、0.005mg/kg未満の、0.0025mg/kg未満の、0.001mg/kg未満の量の投与、特に鼻腔内投与を意図する投与量の抗体を特に含むことができる。

30

【0117】

[000151] 当業者であれば、動物モデルにおける有効性に基づいて、ならびに臨床的および生理的な応答を考慮してなど、ウイルス量、およびウイルス伝染速度、ヒトを含めた哺乳動物における適切で効果的な投与量を決定することができる。したがって、本発明および投薬パラメータは、本明細書に提供する実施例または例示する特定の投与量によって限定されない。本発明は、吸入または鼻腔内の投薬が、有効性の点で、ならびにインフルエンザウイルス感染を含めたウイルス感染の臨床的に出現した効果を低減、限定、または阻止する上で、好ましい代替であることを実証するものである。中和抗体の吸入または鼻腔内投与は、IPまたはIVを含めた他の投与経路に対して、改善され、増強された有効性をもたらし、これは期待または予想されていなかったものである。INまたは吸入の経路による投薬の量およびタイミングを、当業者はさらに評価し、決定することができる。本明細書に提供する試験は、INまたは吸入の投与は、IPまたはIVに対して、より低投与量でより効果的であり、投与は感染の数日後に生じ得、有効性を依然として保持し得ることを実証するものである。

40

【0118】

[000152] マウスモデルにおいて本明細書に適用され、実証される投与量および投与量範

50

困を、適宜、当業者、または臨床もしくは医薬の専門家によって、当業界公知のパラメータを用いて変換し、または適用することができる。したがって、マウスにおけるmg/kgの投薬は、ヒトまたは他の動物に匹敵し、または合理的に等価な投薬に外挿することができる。例えば、実験用マウスの平均体重は20gであるが、ヒトの平均体重は70kgである。

【0119】

[000153] 動物の投与量をヒトの投与量に変換するのは、臨床研究における日常的な作業であり、当業者であれば、このような変換された投与量（複数可）はヒトではうまくいくという強い期待をもつ。種間のスケールリングおよびヒトにおける薬物動態学的パラメータの予想は記載されている（例えば、Mahmoodら（2003）J Clin Pharmacol 43：692-697；Mordenti（1986）Journal of Pharmaceutical Sciences, 75: 1028-1040）。例えば、治療レベルは毒性と並行することがしばしば想定され、したがって動物の毒性をヒトの毒性に変換するために適用される変換係数は、動物における最小有効量をヒトにおける最小有効量に変換するのに通常用いられる。さらに、FDAは「産業用指針（Guidance for Industry）」を提供しており、これは動物（マウス）の投与量をヒトの投与量に変換するのに用いるファクターを含めた（一例では、マウスの投与量に0.08を乗じるなど）、臨床試験における治療に対する最大安全開始投与量を推定するための変換ファクターを提供している。

10

【0120】

[000154] 「薬学的に許容される」の句は、生理学的に認容でき、ヒトに投与した場合に、アレルギー反応または同様の有害反応、例えば、急性胃蠕動、めまいなどを典型的に引き起こさない、分子実体および組成物を意味する。

20

【0121】

[000155] 「治療有効量」は、医師または他の臨床家が求めている対象の、生物学的または医薬上の応答を誘発する薬物、化合物、抗微生物、抗体、または医薬品の量を意味する。特に、ウイルス感染およびウイルスの増殖に関して、「有効量」という語は、ウイルス複製もしくは病原性の量もしくは程度における生物学的に有意義な低下、および/または対象における疾患（発熱、関節痛、不快感）の長さの短縮、または感染した個体における体重減少の低減をもたらす、化合物または薬剤の有効量を含むものとされる。「治療有効量」の句は、本明細書で用いて、体重、ウイルス量、ウイルス複製、ウイルス伝染、またはウイルスの存在および活性に付随し得る発熱もしくは白血球数などの病理学の特徴における臨床上意義深い変化を、少なくとも約30パーセント、より好ましくは少なくとも50パーセント、最も好ましくは少なくとも90パーセント、防止し、好ましくは低下させるのに十分な量を意味する。

30

【0122】

[000156] ある実施形態において、対象に治療を投与する状況における「有効量」は、以下の効果の1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれを超えて実現するのに十分である治療の量を意味する：（i）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の重症度の低減または回復、（ii）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の期間の短縮、（iii）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の進行の防止、（iv）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の退行、（v）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の発症または発病の防止、（vi）インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾病、またはこれらに付随する症状の再発の防止、（vii）インフルエンザウイルスの一細胞から別の一細胞へ、一組織から別の一組織へ、または一器官から別の一器官への伝播の低減または防止、（viii）インフルエンザウイルスの一対象から別の一対象への伝播/伝染の防止または低減、（ix）インフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス疾病に付随する臓器不全の低減、（x）対象の入院の低減、（xi）入院の長さの短縮、（xii）インフルエンザ

40

50

ウイルス感染またはそれに付随する疾病を有する対象の生存の向上、(x i i i) インフルエンザウイルス感染またはそれに付随する疾病の排除、(x i v) インフルエンザウイルス複製の阻害または低減、(x v) インフルエンザウイルスの宿主細胞 (複数可) に対する結合または融合の阻害または低減、(x v i) インフルエンザウイルスの宿主細胞 (複数可) 中への侵入の阻害または低減、(x v i i) インフルエンザウイルスゲノムの複製の阻害または低減、(x v i i i) インフルエンザウイルスタンパク質の合成の阻害または低減、(x i x) インフルエンザウイルス粒子の構築の阻害または低減、(x x) インフルエンザウイルス粒子の宿主細胞 (複数可) からの放出の阻害または低減、(x x i) インフルエンザウイルスの力価の低下、(x x i i) インフルエンザウイルス感染またはインフルエンザウイルス疾病に付随する症状の数の減少、(x x i i i) 別の治療の予防または治療効果 (複数可) の増強、改善、補充、補完、または拡大、(x x i v) インフルエンザウイルス感染に付随する二次感染の発病または進行の防止、ならびに / または (x x v) インフルエンザウイルス感染に二次的に生じる細菌性肺炎の発病の防止もしくは疾病重症度の低減。いくつかの実施形態において、治療の「有効量」には有益な効果があるが、インフルエンザウイルス感染またはそれに付随する疾病を治癒するわけではない。ある実施形態において、治療の「有効量」は、治療の複数の投与量のある頻度で投与して、予防効果および / または治療効果を有する量の治療を実現することを包含し得る。他の場合では、治療の「有効量」は、ある量の治療の単回投与量の投与を包含し得る。

10

【 0 1 2 3 】

[000157] 特にインフルエンザ感染、疾病、または曝露を含めたウイルス感染に付随する症状 (単数または複数) には、それだけには限定されないが、100 ° F (37 . 8) 以上の発熱、熱感、咳嗽、および / または咽頭痛、鼻水または鼻づまり、頭痛および / または身体痛、悪寒、疲労、全身衰弱、悪心、嘔吐および / または下痢、関節および筋肉および / または眼の周囲の痛みおよび疼痛が含まれ得る。

20

【 0 1 2 4 】

[000158] 「防ぐ」または「防止」という語は、疾病を引き起こす薬剤に暴露された、または疾病の発病の前に疾病にかかりやすい素因を有していた可能性のある対象における、疾病または障害を獲得または発症する危険性を低下させる (すなわち、疾病の少なくとも1つの症状を発症させない) ことを意味する。

【 0 1 2 5 】

[000159] 「予防」という語は、「防止」という語に関連し、包含され、その目的が疾病を治療または治癒するよりむしろ防止する、措置または手順を意味する。予防的措置の非限定的な例には、抗感染薬またはワクチンの投与 ; 拘束などのため、血栓症の危険性のある入院患者への低分子量のヘパリンの投与 ; およびマラリアが風土病であり、またはマラリアに罹患する危険性が高い地理的領域を訪れる前の、クロロキンなどの抗マラリア薬の投与が含まれ得る。

30

【 0 1 2 6 】

[000160] あらゆる疾病または感染症の「治療する」または「治療」という語は、一実施形態において、疾病または感染を回復させる (すなわち、疾病または感染性薬剤もしくはウイルスの成長を停止させ、またはその少なくとも1つの臨床症状の出現、程度、または重症度を低減する) ことを意味する。別の実施形態において、「治療する」または「治療」は、対象が識別できないことがある、少なくとも1つの身体的なパラメータを回復させることを意味する。さらに別の一実施形態において、「治療する」または「治療」は、身体的に、(例えば、識別できる症状の安定化)、生理学的に、(例えば、身体的なパラメータの安定化)、またはその両方のいずれかで、疾病または感染を変調することを意味する。さらなる一実施形態において、「治療する」または「治療」は、疾病の進行、疾病の伝染を遅くし、または感染を低減することに関する。

40

【 0 1 2 7 】

[000161] 本明細書で用いる「p g」はピコグラムを意味し、「n g」はナノグラムを意味し、「u g」または「μ g」はマイクログラムを意味し、「m g」はミリグラムを意味

50

し、「 μl 」または「 ml 」はマイクロリットルを意味し、「 ml 」はミリリットルを意味し、「 l 」はリットルを意味する。

【0128】

[000162] 本発明は、本発明の治療方法を実践する上で有用な治療用組成物をさらに企図するものである。対象の治療用組成物には、混合物における、薬学的に許容される賦形剤（担体）、および有効成分として本明細書に記載する、一または複数の抗体または活性なそのフラグメント、特に中和抗体、そのポリペプチド類似体、またはそのフラグメントが含まれる。好ましい一実施形態において、組成物は、標的細胞内で、または対象もしくは患者において、ウイルス、特にインフルエンザウイルスを中和する能力がある抗体またはフラグメントを含む。

10

【0129】

[000163] 有効成分として抗体、ポリペプチド、類似体、または活性なフラグメントを含む治療用組成物の調製は、当業界において十分に理解されている。そのような組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして投与するために調製するのが典型的であるが、投与前の液体中の溶液または懸濁液に適する固体形態も調製することができる。調製は乳化であってもよい。治療用の有効成分を、薬学的に許容され、有効成分と適合性である賦形剤としばしば混合する。適切な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。加えて、所望により、組成物は、有効成分の有効度（effectiveness）を増強する、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの微量の補助物質を含むことができる。

20

【0130】

[000164] 抗体、ポリペプチド、類似体、または活性なフラグメントは、中和されている薬学的に許容される塩の形態として治療用組成物中に調製することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離のアミノ基と形成される）が含まれ、これらは塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される。遊離のカルボキシル基と形成された塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、および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、プロカインなどの有機塩基に由来してもよい。

【0131】

[000165] 治療用抗体、ポリペプチド、類似体、または活性なフラグメントを含有する組成物は、例えば単位投与量の投与によって、慣例的に投与される。「単位投与量」という語は、本発明の治療用組成物に関して用いられる場合、単一の投与量としてヒトに適する、物理的に別個の単位を意味し、各単位は所望の治療効果を生成するように計算された、必要とされる希釈剤、すなわち担体、またはビヒクルと会合している、あらかじめ決定された量の有効材料を含む。

30

【0132】

[000166] 本明細書に提供する、ウイルス、特にインフルエンザウイルスの治療または予防に有効で有用な鼻腔内投与のための中和抗体の単位投与量は、IPまたはIV投与に必要とされるものなど、代替の投与に指摘され、または必要とされるものに対して比較的低い。したがって、本明細書の一態様において、投与、特に鼻腔内投与のための抗体組成物を提供し、単位投与量は、IPまたはIV投与に必要とされるものなど、代替の投与に指摘され、または必要とされるものに対して、桁、特に数桁または多数の桁、減少している。したがって、本発明の一態様において、投与、特に鼻腔内投与のための抗体組成物を提供し、単位投与量は、少なくとも10倍、10倍、20倍、25倍、50倍、少なくとも100倍、100倍、500倍、最高1000倍減少している。特に、組成物は、よって、IPまたはIV投与に対して等価の単位投与量に比べて、特に、同じもしくは匹敵する適応症もしくは効果、および/または活性に対して減少している。INの単位投与量は、有効性を改善するために、IPまたはIV投与量と組み合わせてもよい。

40

【0133】

50

[000167] 組成物は、投与量の処方に匹敵する方法で、治療上有効な量を投与する。投与しようとする量は、治療しようとする対象、対象の免疫系が有効成分を利用する能力、および所望のウイルスの阻害または中和の程度に依存する。投与に必要とされる有効成分の正確な量は、開業医の判断によるものであり、各個体に特有である。しかし、適切な投与量は、鼻腔内投与に対して、1投与量あたり個体の体重1キログラムあたり、有効成分約0.001~10ミリグラム、好ましくは約0.005~約1ミリグラム、1ミリグラム未満、0.5ミリグラム未満、0.1ミリグラム未満、0.05ミリグラム未満、0.01ミリグラム未満の範囲であってよく、より好ましくは、1ミリグラム未満、0.5ミリグラム未満、0.1ミリグラム未満であってよい。最初の投与およびその後の投与に適する投与計画も変動する。一投与計画では、最初の投与の後、単一または複数の後続の投与量の後続の投与量（複数可）が、1つまたは複数の時間間隔の後続の注射または他の投与により繰り返される。

10

【0134】

[000168] 最初のIN投与の後、IPもしくはIV、または他の適切な経路による高投与量の抗体の投与が続いてもよい。本発明の一態様において、新規な投薬の取組みまたはパラメータを提供し、患者または対象に中和抗体を鼻腔内投与し、同時、引き続き、または後のいずれかに中和抗体または非中和抗体をIPまたはIV投与により投与する。

【0135】

[000169] 治療用組成物、特に鼻腔内組成物は、有効量の中和抗体またはそのフラグメント、および1つまたは複数の以下の有効成分をさらに含むことができる：抗生物質、抗ウイルス薬、ステロイド、抗炎症薬。特定の一態様において、組成物は抗ウイルス薬を含む。組成物は抗インフルエンザ薬を含むことができる。抗インフルエンザ薬は、タミフルおよびリレンザから選択される薬剤を含めたノイラミニダーゼ阻害薬であってよい。

20

【0136】

[000170] 本明細書で用いる「pg」はピコグラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「ug」または「μg」はマイクログラムを意味し、「mg」はミリグラムを意味し、「ul」または「μl」はマイクロリットルを意味し、「ml」はミリリットルを意味し、「l」はリットルを意味する。

【0137】

[000171] 組成物は、当業界および医薬分野および臨床治療において知られており、許容される取組みを用いて、経鼻スプレー、または吸入の溶液もしくは懸濁液中に調合することができる。FDAは、このようなスプレー、溶液、および懸濁液、ならびにスプレー製剤に関して、fda.govで入手できる業界向けガイダンス文書（Guidance for Industry documents）を含めた、ガイドラインおよびガイダンスを提供している。例示的な、2002年7月の業界向けガイダンスは、経鼻スプレーおよび吸入溶液、懸濁液、およびスプレー製剤 - 化学、製造、および制御の文書化（Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension and Spray Drug Products -Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation）というタイトルであり、処方の構成成分および組成、それらの規格、製造、および容器施栓系に関する詳細を含んでいる。

30

【0138】

[000172] 経鼻スプレーは、典型的に水性ベースの、処方中に溶解または懸濁されている有効成分を含む製剤であり、他の賦形剤を含むことができ、経鼻吸入による使用を意図したものである。経鼻スプレー用の容器施栓系には、容器、ならびに処方を計量し、霧化し、患者に送達するのを担う全ての成分が含まれる。経鼻スプレー製剤は、計量した投与量の有効成分を含むスプレーを送達する非加圧のディスペンサ中に、賦形剤の溶液または混合物（例えば、保存剤、粘度調整剤、乳化剤、緩衝化剤）中に溶解または懸濁した治療上の有効成分（原薬）を含んでいる。投与量は、スプレーポンプにより計量することができ、または製造の間に予め計量されていてもよい。経鼻スプレーの単位は、単位投薬用にデザインすることができ、または多数の計量された原薬を含む製剤のスプレーを発射することができる。経鼻スプレーは、局所および/または全身的な効果のために鼻腔に適用する

40

50

。

【 0 1 3 9 】

[000173] 吸入溶液および懸濁液の製剤は、治療上の有効成分を含む水性ベースの処方であるのが典型的であり、付加的な賦形剤も含むことができる。水性ベースの経口吸入溶液および懸濁液は無菌でなければならない(21CFR200.51)。吸入溶液および懸濁液は、局所および/または全身的な効果のために経口吸入によって肺に送達することが意図され、特定されたネブライザとともに用いなければならない。吸入スプレー製剤は、処方および容器施栓系からなる。処方典型的に水性ベースであり、いかなる噴射剤も含まない。

【 0 1 4 0 】

[000174] 吸入スプレー製剤用の現在の容器施栓系のデザインには、機械的もしくは動力の補助、および/またはスプレーブルームを生成するための患者の吸気からのエネルギーを用いた、予め計量された提示、および装置が計量する提示の両方が含まれる。予め計量された提示は、製造の間に、もしくは使用前に患者によって引き続き装置中に挿入される、いくつかのタイプの単位(例えば、単一もしくは複数のプリスタもしくは他の孔)の、予め計測された投与量または投与量の分画を含んでいる。典型的な装置計量単位は、患者が駆動すると装置自体によって計量されたスプレーとして送達される、複数の投与量に十分な製剤を含むレザバーを有する。

【 0 1 4 1 】

[000175] 鼻腔における滞在時間の延長はまた、生体接着性のポリマー、微粒子、キトサンを使用することにより、または処方の粘度を増大することにより実現してもよい。鼻の粘液線毛のクリアランスは、薬物、賦形剤、保存剤、および/または吸収増強剤によっても刺激され、または阻害され得、よって吸収部位への薬物送達に影響を及ぼし得る。

【 0 1 4 2 】

[000176] 微粒子の技術は、経鼻製品をデザインするのに利用されている特殊化されたシステムの一つである。微粒子は、鼻粘膜との接触のさらなる延長をもたらし得、よって吸収または有効性を増強し得る。鼻に適用するための微粒子は、デンプン、アルブミン、デキストラン、およびゼラチンなどの生体適合性の材料を用いて調製されている(Bjork E, Edman P (1990) Int J Pharm 62: 187-192)。

【 0 1 4 3 】

[000177] 経鼻処方のpHは、鼻粘膜の刺激作用を避けるのに、吸収のために非イオン化形態の薬物を利用可能にするのに、病原性細菌の鼻道中の増殖を防ぐのに、保存剤などの賦形剤の機能を維持するのに、正常な生理学的絨毛運動を維持するのに重要である。薬物または有効成分の物理学的性質を心に留めて、処方のpHを4.5から6.5に維持するのが好ましい。経鼻処方一般的に、25~200 μ Lの範囲の小体積において投与され、100 μ Lが最も一般的な投与量の体積である。

【 0 1 4 4 】

[000178] 薬物の水溶解性は、溶液における経鼻薬物送達に関連のあるパラメータ限界であり得る。従来の溶媒または共溶媒、例えば、グリコール、少量のアルコール、Transcutol(ジエチレングリコールモノエチルエーテル)、中鎖グリセリド、およびLabrasol(飽和ポリグリコール化(polyglycolyzed)C₈~C₁₀グリセリド)を用いて、薬物の溶解性を増強することができる。他の選択肢には、例えば、親油性の吸収促進剤と組み合わせた生体適合性の可溶化剤および安定化剤として働くHP-シクロデキストリンなどの界面活性剤またはシクロデキストリンの使用が含まれる。このような場合、これらの鼻の刺激に対する影響を考慮しなければならない。

【 0 1 4 5 】

[000179] 殆どの経鼻製剤は水性ベースであり、微生物の増殖を防ぐために保存剤を必要とする。経鼻製剤で一般的に用いられる保存剤には、パラベン、塩化ベンザルコニウム、フェニルエチルアルコール、EDTA、およびベンゾイルアルコール(benzoyl alcohol)がある。水銀含有の保存剤は絨毛運動に対して速やかかつ不可逆性の効果があるが、鼻

10

20

30

40

50

系の使用には推奨されない。

【0146】

[000180] 薬物の酸化を防ぐために、少量の抗酸化剤が必要とされることがある。一般的に用いられる抗酸化剤には、メタ亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシトルエン、およびトコフェロールがある。通常、抗酸化剤は、薬物の吸収に影響を及ぼさず、または鼻の刺激を引き起こさない。抗酸化剤および保存剤の、薬物、賦形剤、製造装置、および包装成分との化学的/物理的相互作用は、処方開発プログラムの部分として考慮しなければならない。

【0147】

[000181] アレルギー疾病および慢性疾病の多くは、しばしば痂皮および粘膜の乾燥に関連付けられる。他の賦形剤の中で、ある種の保存剤/抗酸化剤も、特に大量に用いた場合、鼻の刺激を引き起こす可能性がある。十分な鼻腔内の水分が、脱水を防ぐのに不可欠である。したがって、特にゲルベースの経鼻製品では、湿潤剤を加えることができる。湿潤剤は鼻の刺激を避け、薬物の吸収に影響を及ぼす可能性がない。一般的な例として、グリセリン、ソルビトール、およびマンニトールが含まれる。

10

【0148】

[000182] 送達系の選択は、使用中の薬物、提唱される適応症、患者集団、そして最後に挙げるが決して重要度が低いというわけではないものとして、市場の優先度に依存する。これらの送達系の中には、点鼻薬、経鼻スプレー、経鼻ゲル、および経鼻粉末が含まれる。

20

【0149】

投与

[000183] 正常の、および合理的に予想される抗体治療の投与量は、mg範囲のIVまたはIP投与量であることが十分に確立されていることを再び記載する。これは、今日までの多数の組換え抗体での調査および臨床経験に基づくものである。今日まで、米国では20を超えるモノクローナル抗体が臨床的に認可されている(例えば、Newsome BW and Ernstoff MS (2008) Br J Clin Pharmacol 66(1):6-19を参照されたい)。現在用いられている臨床的に認可された抗体は、全て、mg/kg範囲のIPまたはIVで利用され、投与されている。

【0150】

[000184] 今日まで、インフルエンザのモノクローナル抗体は臨床的に認可されていない。進行中の、または報告されている試験は全て、現在、標準として静脈内送達を利用するものである。特に、TheraClone Sciencesの抗体TCN-023は、1~40mg/kgの範囲の単一の投与量増加において評価された(NCT01390025、clinicaltrials.gov)。TCN-032抗体は、インフルエンザマトリクスタンパク質(M2)のアミノ末端細胞外ドメイン(M2e)の保存されているエピトープに結合するヒト抗体である(Grande AGら(2010) PNAS USA 107(28):12658-12663; Epub 2010 Jul 1)。抗体CR6261およびCR8020は、2mg/kgから50mg/kgまでの増加性の投与量を用いて2時間にわたってIV投与した、安全性および認容性試験で同様に評価されている(Crucell Holland BV臨床試験、それぞれNCT01406418およびNCT01756950)。

30

40

【0151】

[000185] インフルエンザワクチンは注射により投与する。インフルエンザワクチンの一例外は、鼻腔内投与されるFluMist生インフルエンザワクチン(MedImmune)である。FluMistは、A/H1N1株、A/H3N2株、およびB株の3つの生のインフルエンザ株の組合せであり、単回投与量を予め充填した鼻腔内噴霧器中に提供される懸濁液を用いて0.2mlの投与量を投与する。ウイルス株に加えて、各投与量はまた、グルタミン酸ナトリウム、加水分解したブタゼラチン、アルギニン、ショ糖、リン酸水素二カリウム、およびリン酸二水素カリウムを含み、保存剤は含まない(FluMist highlights of Prescribing Information, 2012-2013 Formula, MedImmune, RAL-FLUV12,

50

Component No. : 11294)。

【 0 1 5 2 】

[000186] 本発明は、抗体（複数可）の新規かつ効果的な投与様式、およびウイルスの、特にインフルエンザウイルスを含めた、特に呼吸経路によって感染または伝染するウイルスの、ウイルス感染を治療および予防するための抗体投与のプロトコールを提供する。したがって、本発明は、ウイルスを中和する能力がある抗体の鼻腔内投与による、ウイルス感染、特にインフルエンザウイルス感染の、治療、予防、または軽減を提供する。一または複数の中和抗体を、同時に、組み合わせ、または逐次的もしくは別々に、を含めて、鼻腔内投与することができる。抗体は、単一のIN投与量によって投与してもよく、または複数の個々の投与量を投与してもよい。各投与が数分、数時間、または数日離れている、個々の投与量を次々投与してもよい。

10

【 0 1 5 3 】

[000187] 特定の一態様において、本発明は、循環性のインフルエンザ株に対する抗体の組合せを鼻腔内投与することによる、ウイルス感染、特にインフルエンザウイルス感染の、治療、予防、または軽減を提供する。したがって、ウイルス感染、特にインフルエンザウイルス感染の、治療、予防、または軽減は、インフルエンザBおよび循環性のインフルエンザAウイルス、特にその一態様において、抗インフルエンザB抗体、抗H1抗体などの抗グループ1インフルエンザA抗体、および抗H3抗体などの抗グループ2インフルエンザA抗体の組合せに対する抗体の組合せの鼻腔内投与によって、本発明にしたがって提供され、実現される。本発明によると、抗インフルエンザB抗体、抗H1抗体などの抗グループ1インフルエンザA抗体、および抗H3抗体などの抗グループ2インフルエンザA抗体の組合せの鼻腔内投与は、インフルエンザBまたはインフルエンザAウイルスによるインフルエンザ感染を防止し、または感染を治療するのに有効である。抗体が利用可能である程度まで、および本明細書において試験および実証される程度まで、ウイルスの1つを超える亜型または株に有効であり、株に対して向けられるために、本明細書に提供し、企図する組合せは、ウイルスの、特にインフルエンザウイルスの、知られているおよび循環性の株または亜型、新興の株または亜型、および未知の、予期しない、変異型の株または亜型を含めた、多数の株および/または亜型に対して有効な、普遍的なカクテルまたは組合せとして働く。

20

【 0 1 5 4 】

[000188] 本発明において用いる抗体を、鼻腔内または吸入投与し、その後、またはそれと一緒に、同時に、組み合わせ、または逐次的もしくは別々に、を含めて、別のまたは同じ抗体を全身投与、特にIPまたはIV投与してもよい。したがって、組合せ投与のプロトコールまたは方法が本明細書に企図され、提供され、鼻腔内およびIP（またはIV）投与が、薬剤、特にウイルス、特にインフルエンザウイルスに対する有効性を増大するために組み合わせられる。実際、本明細書に提供する試験は、代替的な投与（IPまたはIV）と組み合わせた鼻腔内の投薬を用いて、組合せの有効性が相乗的であり、INおよびIP両方での低投与量を一例として利用することができることを実証するものである。

30

【 0 1 5 5 】

[000189] 本発明は、呼吸器ウイルスを中和する能力があるモノクローナル抗体を哺乳動物に鼻腔内（IN）または吸入投与することを含む、呼吸器ウイルスに暴露された、暴露の危険性がある、罹患した、臨床症状が出現した、または苦しんでいる哺乳動物における、ウイルス感染を治療または予防するための方法を提供する。モノクローナル抗体は特にIgG抗体であってよい。呼吸器ウイルスは、インフルエンザウイルスでも、または疑われるインフルエンザウイルスでも、または未知の呼吸器ウイルスでもよい。

40

【 0 1 5 6 】

[000190] 抗体は、感染後、または推定される感染後に投与することができる。本発明の一態様において、抗体は、2 h p i、4 h p i、6 h p i、8 h p iを含めた、感染後8時間（h p i）までの期間に投与することができる。あるいは、抗体は、4 h p i、8 h p i、12 h p i、18 h p i、24 h p iを含めた、感染後24時間（h p i）までの

50

期間に投与される。さらなる一代替において、抗体は、12 h p i、24 h p i、36 h p i、48 h p iを含めた、感染後48時間までの期間に投与される。なおさらなる一代替において、抗体は、24 h p i、36 h p i、48 h p i、60 h p i、72 h p iを含めた、感染後72時間までの期間に投与される。抗体は、感染後、または推定される感染の、または発熱、疼痛、関節痛、嗜眠などの臨床症状が現れた数日後に投与してもよい。抗体は、感染1日後、感染2日後、感染3日後、感染4日後、感染5日後、感染6日後、感染7日後、感染10日後、感染12日後、感染14日後に投与してもよい。抗体を、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、1か月後を含めた、感染または推定される感染の数週間後に投与してもよい。

【0157】

[000191] 抗体は、感染前に、または伝染を低減もしくは防止するために、または疾病、疾患、もしくは感染のあらゆる臨床徴候の前に投与することができる。本発明の一態様において、抗体は、感染数日前、または可能なもしくは推定される暴露、もしくは暴露の危険の前に、予防として投与することができる。抗体は、1日先立ってまたは1日前に、2日前にまたは2日先立って、3日先立ってまたは3日前に、4日先立ってまたは4日前に、5日先立ってまたは5日前に、6日先立ってまたは6日前に、7日先立ってまたは7日前に、1週間先立ってまたは1週間前に、7日を超えて先立ってまたは7日を超えて前に、1週間を超えて先立ってまたは1週間を超えて前に、最高9日先立ってまたは最高9日前に、最高10日先立ってまたは最高10日前に投与してもよい。抗体を、数時間、数日、または数週間離した1つもしくは複数の投与量に先立ってまたは1つもしくは複数の投与量の前に、1回または複数回投与してもよい。

【0158】

[000192] 抗体は、単回投与量または複数回投与量において投与してもよい。各投与量は、単位もしくはmg/kg量が同一であってもよく、または量が異なってもよい。例えば、開始の投与量は、投与中の哺乳動物に対して、高いほうの相対的投与量、例えば、限定によるものではないが、約1mg/kg、1mg/kgを超えて、1mg/kg未満、または最大のもしくはほぼ最大のおよそ認容される投与量、または最大の認容される投与量の半分であってよい。後続の投与量は、開始の投与量と同じでもよく、または開始の投与量未満でも、もしくは開始の投与量を超えてもよく、対象もしくは患者における反応もしくは応答、または臨床症状の程度の軽減に依存してもよい。

【0159】

[000193] 同じまたは異なる量の各投与量またはあらゆる投与量の複数投与量を、数時間、数分、数日、または数週間離して投与してもよい。タイミングは変動してもよく、応答および症状に応じて短縮しても、または延長してもよい。投与量は、例えば、限定によるものでなく、少なくとも2時間離れ、少なくとも4時間離れ、少なくとも6時間離れ、少なくとも8時間離れ、少なくとも24時間離れ、少なくとも48時間離れ、少なくとも72時間離れていてよい。抗体の投与量(単数または複数)を、感染後、または推定される感染後、2、4、6、8、12、24、36、48、72時間後まで、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月以上までに投与してもよい。

【0160】

[000194] 方法は、ウイルス特異的モノクローナル抗体の追加のIPまたはIV投与を含むことができ、追加投与される抗体は中和抗体または非中和抗体である。追加のIPまたはIV投与される抗体は、INまたは吸入投与されるのと同じ抗体であってよい。追加のIPまたはIV投与される抗体は、抗体のINまたは吸入の投与の、同時、逐次、または後に投与してもよい。あらゆるこのような後続の投与は、数時間後であってよく、2、4、6、8、12、24、36、48、72時間以上後でもよい。後続の投与は、数日後であってよく、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日後でもよい。後続の投与は、数週間後であってよく、1週間、2週間、3週間、4週間、または5週間後でもよい。

【0161】

[000195] 吸入または鼻腔内投与量を、特に具合の悪い、または開始のINもしくはIP、またはIVもしくは組合せ投与量の後に感染または病気の症状を引き続き実証する患者または対象における応答または有効性を後押しする(boost)のに用いてもよい。

【0162】

[000196] さらに一態様において、本発明は、中和抗体の第1の鼻腔内もしくは吸入投与量を投与し、引き続きもしくは同時に第2の投与量の抗体を腹腔内もしくは静脈内投与し、または再び鼻腔内もしくは吸入投与することを含む、呼吸器ウイルスに対するモノクローナル抗体を投与するためのプロトコルを提供し、第2の投与量の抗体は、第1の投与量の抗体と同じまたは異なる。第2の投与量、またはあらゆる追加の投与量の抗体は、中和抗体または非中和抗体であってよい。

10

【0163】

[000197] 本発明は、以下の非限定的な実施例を参照することによってより理解され得るが、実施例は本発明の例示として提供するものである。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより十分に説明するために示すものであるが、本発明の広い範囲を限定するものと決して解釈してはならない。

【実施例】

【0164】

実施例1

[000198] インフルエンザの、HAに対するモノクローナル抗体での治療的治療は投与量依存적であり、感染後の時間が後になるほど高い投与量が必要とされる。致死的な誘発からの保護を見るために、広範囲に反応性のHA特異的抗体をIPまたはIV投与する典型的な治療投与量は2mg/kg~50mg/kgの範囲の投与量を必要とする。感染後の時間が後になると、同じ効果に、>10mg/kgを上回る範囲の投薬が必要となる。北米における成人の平均体重はおよそ80.7kgであり、10mg/kgを投与する場合は抗体807mgが必要である。Crucell Holland BVによるインフルエンザモノクローナル抗体CR6261およびCR8020の現在の2つのフェーズ1試験は、1mg/kgから50mg/kgまで増加する単回投与量の安全性および認容性を評価するものである(それぞれNCT01406418およびNCT01756950試験; clinicaltrials.gov)。マウスでは、これらの抗体は、マウスを死から保護するのに15mg/kgが必要であった(Friesen, RHEら(2010) PLoS ONE 5(2):e1906); Ekiert DCら(2011) Science 333:843-850)。したがって、本発明の適用可能な取組みを用いると、ヒトの体重(約70kg)に基づいて、患者1人あたりグラム量付近またはグラム量の抗体が必要となる。これは、複数のインフルエンザ亜型に対するあらゆる治療において、循環中の3つの異なる亜型のインフルエンザ(インフルエンザA H3、インフルエンザA H1、およびインフルエンザB)を治療するために1つを超える抗体が必要であることによって配合されるものであり、よって各抗体約1グラムを推定して合計3グラム規模の抗体を必要とし得る。この大量の抗体は法外に高い費用がかかり、インフルエンザに対する治療用抗体の開発に大きな障害を生じる。

20

30

【0165】

[000199] 本発明者らは、抗体の量を、10倍を超えて大幅に減らしつつ、有効性を著しく維持し、改善さえする解決法を突き止めた。本発明者らは、抗体の鼻腔内送達は、IVまたはIPの経路に比べて、有効性の顕著で大幅な改善をもたらすことを見出した。さらに、非中和抗体はこの経路により送達すると有効性の障害を表すため、この鼻腔内の有効性の現象は、中和性である抗体に特異的である。

40

【0166】

[000200] 本発明者らの試験は、認可され、知られているインフルエンザマウスモデルを用いると、中和抗体の鼻腔内(IN)送達は、腹腔内(IP)または静脈内(IV)の経路の送達に比べて、治療有効性を10倍を超えて劇的に増大し得ることを実証するものである。匹敵する有効性は、IVまたはIPの経路による代わりにIN投与した場合、同じ投与量の10分の1未満を用いて実現することができる。インフルエンザを治療するため

50

の現在の治療デザインは、標準として静脈内送達を利用するものである (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01390025、NCT01756950、NCT01406418)。抗体の中和の特徴を活用する性能は知られていないため、この送達の取組みは当業界では標準的である。抗体治療に対する調査の大半はIVまたはIPの送達を利用するものであり、中和抗体の呼吸器病原体へのIN送達は、IVまたはIPの送達に比べて有効性を改善することを認めることができない。逆に、HAに対する非中和抗体は中和抗体と同様に有効であるため、中和は全身送達される抗体にとって必要ではあり得ないことを、当業界は認めることができない。これに関して、より広く反応性である能力がある抗体は、抗体の中和能力よりも臨床上関連がある。

【0167】

[000201] IN送達の以前の報告は、ポリクローナル血清ガンマグロブリンIVI GまたはIgAクラスの抗体を評価するものであった (IgA抗体は生まれつき肺に一般的である) (Akerfeldt Sら (1973) Biochem Pharmacol 22:2911-2917; Ramisse Fら (1998) Clin Exp Immunol 111 :583-587; Ye Jら (2010) Clin Vaccine Immunol 17(9): 1363)。一グループが、IN経路による抗体(CI79)の腹水調製物を試験し、保護的なIN送達(誘発前)はIPに匹敵すると記載した (Sakabe Sら (2010) Antiviral Res 88(3):249-255)。CI79は、2009パンデミックのH1N1ウイルスに対して低い中和活性を表すが、マウスを感染から保護し得る。

【0168】

[000202] これとは対照的に、本発明者らは、重要なことに、有効性の増大は、交差反応性抗HA抗体などの交差反応性の抗インフルエンザ抗体には簡単に生じず、実際、IN投与した場合に中和しない抗体はインフルエンザに対して有効性を表さないことを見出した。従来技術および以前の試験は、*in vitro*で中和活性を表す抗体には、ウイルスのエピトープまたはタンパク質の標的に関係なく、この効果をより広く適用することができることを認めることができなかった。さらに、中和することができる株特異的抗体は、IN投与した場合に有効性の増大を表すため、抗体はHAに対して交差反応性である必要がない。本発明者らは、中和抗体(そして単に交差反応性の抗HA抗体ではない)は、投与経路に応じて匹敵する有効性を実現するのに必要とされる抗体の量を大幅に低減するのに不可欠であることを見出した。実際、本発明者らは、中和性ではない、交差反応性の抗HA抗体を用いた場合は逆のことが生じることを見出した。これらの交差反応性の、非中和抗HA抗体を治療使用すると、IPまたはIVの送達経路を用いたこれらの抗体に比べた場合は同様の有効性を表すのにかかわらず、マウスを鼻腔内治療した場合は治療有効性に顕著な低下がもたらされる。

【0169】

[000203] 本発明者らは、この現象の背後にあるメカニズムは、鼻腔内送達は、抗体の中和能力を利用することができる気道ではあるレベルのIgG抗体を実現するが、抗体のIVまたはIP送達はFc依存的事実であると結論付ける。説明を図12に示す。気道では、阻害のメカニズムは、抗体の中和性の特徴に頼っており、Fc依存的な効果は嚴重に制限される。IgG抗体をIPまたはIV投与する場合、気道におけるこの空間に到達する抗体の量は非常に低いため、抗体の中和効果を利用することができない。例えば、中和抗体をIPまたはIV投与する場合、観察される治療効果は主に抗体のエフェクター機能からくるものである。本発明者らは、INによらず、IPまたはIV投与した場合の中和抗体または非中和抗体の、匹敵するレベルの有効性を見出した。この効果が中和に依存的事実であることをさらに説明するために、M2タンパク質に対する抗体は*in vitro*で中和を表さず、Fc媒介性の効果を表す能力があるにすぎない。M2イオンチャネル(HAよりも遺伝的に保存されている分子)に対する抗体を用いた以前の実験は前臨床モデルにおける見込みを示しており、フェーズ1試験は完了した (TN-032 from Theraclone; NCT01390025, NCT01719874; Grandea AGら (2010) Proc Natl Acad Sci USA 107(28): 12658-12663)。M2タンパク質に対する抗体は、ウイルスを中和することができないが、エフェクター機能により媒介される十分な証拠のある治療有効性を有し得る (Wang, R.

10

20

30

40

50

ら (2008) *Antiviral research* 80: 168-177; Granda, A. G, 3rdら (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (28): 12658-12663)。本発明者らは、中和抗体および非中和抗体の両方とも、IPまたはIV投与した場合、M2標的化抗体に同様のエフェクター機能によって主に機能すると考える。本発明者らは、M2タンパク質はHAほど著しく大量になく、表面から突出してもいないことが知られていることに留意する。HAに対する抗体はウイルスを中和することができ、さらに改善された有効性に対する潜在性をもたらす。したがって、H

Aに対する抗体は、抗M2抗体よりも治療上有効であるのが典型的である。それにもかかわらず、中和剤ではなく、依然としてHAを標的化する抗体は、IP投与した場合に中和抗体として匹敵するレベルの有効性を表し得、この送達経路は、IN投与した場合に利用することができる強力な効果を利用することができないことが示唆される。さらに、中和Fabを、IPではなくINにより送達すると、治療有効性がもたらされる。非中和FabはIN投与しても、治療有効性を表さない。まとめると、IN投与した中和抗体だけが、この有効性の増大を表す。この観察を拡張すると、この現象は、他のタンパク質（例えば、ノイラミニダーゼ）を標的化する中和抗体に、および他の呼吸器病原体に対する中和抗体（例えば、RSVに対するパリピズマブ）に生じる。INおよびIP/IVの両方の経路による抗体の送達は、それ自体様々な方法で有効であり得るため、本発明者らは、両方の経路を組み合わせれば、中和抗体の最大の治療潜在性を利用するであろうと考えている。この取り組みは、IN経路による中和活性の増大、およびIP/IV経路によるFc依存的活性の増大を利用することによって、最大の有効性を可能にするであろう。

【0170】

[000204] 材料と方法

以下に、本明細書に提供する実施例のための材料と方法を示す。

【0171】

[000205] 抗体：Mab 6P15、IP19、および1K17を、以下に記載するファージディスプレイを用いて単離したが、これらは広く反応性の抗H3抗体であり、マイクロ中和アッセイ、プラーク減少アッセイ、またはH1によりウイルスを中和しない。Mab CR8020およびCRR6261は十分に特徴付けられた、それぞれグループ2およびグループ1のウイルスに対する広く反応性の抗体である (Throsby Mら (2008) *PLoS ONE* 3:e3942; Eckert DCら (2009) *Science* 324:246-251; Friesen RHEら (2010) *PLoS ONE* 5(2):e1906; 米国特許第8,192,927号; Eckert DCら (2011) *Science* 333:843-850)。抗体CR9114は、HAの幹における保存されているエピトープに結合し、IV投与した場合、インフルエンザAおよびBウイルスでの致命的な誘発から保護する (Dreyfus Cら (2012) *Science Express* 9 August 2012 10.1126/science.1222908)。これらの中和抗体を、可変領域を合成し、マウスIgG2a発現ベクター中にサブクローニングすることにより、本発明らの手でクローニングした。CR8020の可変領域を、公開されている重鎖GI:339779688および軽鎖GI:339832448を用いてクローニングした。CR6261の可変領域を、公開されている重鎖GI:313742594および軽鎖GI:313742595を用いてクローニングした。CR9114の可変領域を、Genbank配列重鎖受諾番号JX213639および軽鎖受諾番号JX213640を用いてクローニングした。これらの試験で利用したMabは全て、マウスIgG2aに融合しているヒト可変領域を含むIgG発現ベクター中にクローニングした。マウス抗体CR6261、CR8020およびCR9114に対するキメラ抗体を、本明細書においてそれぞれCA6261、CA8020およびCA9114と呼ぶ。Mab 6F12およびGG3は、グループ1および抗H1ウイルスに結合し、中和するマウスハイブリドーマ由来である (Wang TTら (2010) *PLoS Pathog* 6(2):e1000796; Tan GSら (2012) *J Virol* 86(11):6179-6188; 米国出願第20110027270号)。Mab 5A7は、IP投与した場合、BウイルスHA上の共通のエピトープに結合し、ウイルスを中和し、マウスを致命的な誘発から保護する (Yasugi Mら (2013) *PLoS Pathog* 9(2):e1003150, doi: 10.1371/journal.ppat.1003150)。ヒト抗体Ma

b 5 3 (T R L 5 3 と表される) は、 U S 2 0 1 2 / 0 0 2 0 9 7 1 および W O 2 0 1 1 / 1 6 0 0 8 3 に記載されており、グループ 1 および 2 の H 1、H 9、H 7 および H 5 亜型を中和するのに有効である。抗体 M a b 5 7 9 (T R L 5 7 9 と表される) は、 W O 2 0 1 3 / 0 8 6 0 5 2 に記載されており、H 3 および H 7 を中和するのに有効である。抗体重鎖および軽鎖可変領域配列、特に、上記に記載する重鎖および軽鎖の C D R ドメイン (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) 配列を含む、公開されている配列、および特に C R 6 2 6 1、C R 8 0 2 0、C R 9 1 1 4、5 A 7、M a b 5 3、および M a b 5 7 9 を含む本明細書に例示する抗体は、上記の参考文献に記載し、参照により本明細書に組み入れられる参考文献を含めて、知られており、公に入手できる。

【 0 1 7 2 】

[000206] ファージディスプレイ：抗体フラグメントを、インフルエンザまたはショ糖クッション精製した (sucrose cushion purified) インフルエンザウイルスの、組換えヘマグルチニン (H A) (Immune Technologies Corp、New York) に対する複数ラウンドのパニングによって選択した。簡潔に述べると、抗原を P B S 中で希釈し、M a x i S o r p N u n c - I m m u n o p l a t e s (N u n c) 上 4 で一夜インキュベートした。プレートを P B S で 2 回洗浄した。プレートを、絶えず振盪しながら、P B S 中 5 % ミルクと、室温で 2 時間インキュベートした。ファージライブラリーを、2 . 5 % ウシ胎児血清および 0 . 0 0 5 % t w e e n を含む P B S 中 2 . 5 % ミルク中でブロックした。ブロックしたファージを、およそ 4 0 0 r p m で振盪しているプラットホーム上、ブロックしたプレートに室温で 2 時間加えた。プレートを P B S T で洗浄し、結合しているファージを D T T 溶出バッファー中に溶出した。溶出したファージを T G 1 細胞と、3 7 で 4 5 分間インキュベートした。細胞を、L B、クロラムフェニコール (C a m)、およびグルコース (G l c) を含む 1 5 c m 培養プレート上に塗抹し、3 0 で一夜インキュベートした。コロニーをプレートから掻き取り、後続のパニングのラウンドの間ポリエチレングリコールで沈殿させた。同じ株からの H A 抗原または異なる株の H A 上のいずれかを用いて、パニングを 3 または 4 ラウンド行った。最終のラウンドのパニングを、Q - p i x コロニー用のより大きい Q トレイ上に塗抹し、3 8 4 ウエルプレート中に拾って入れた。

【 0 1 7 3 】

[000207] F a b 確証：ファージ可溶化液をコードする F a b を、E L I S A によって組換え H A に対してスクリーニングした。単一のコロニーを拾って、2 X Y T / C a m / G l c 培地を含む 3 8 4 ウエルプレート中に入れたものを 3 0 で一夜増殖させた。3 8 4 ウエルプレート中の T G 1 細胞を、低グルコースと一緒に 2 X Y T / C a m を含む 3 8 4 ウエル発現プレート中に、Q p i x を用いて複製させた。プレートを 3 0 および 4 0 0 r p m で 2 ~ 4 時間増殖させた。F a b 発現を 0 . 5 m M I P T G で誘発し、2 2 および 4 0 0 r p m で一夜増殖させた。F a b 含有細胞を、B e n z o n a s e を含む B E L バッファーで、2 2 および 4 0 0 r p m で 1 時間溶解させた。F a b 含有可溶化物を、1 2 . 5 % M P B S T で 3 0 分間、4 0 0 r p m および 2 2 でブロックした。可溶化物を、H A でコーティングした E L I S A プレートに R T で 1 時間加えた。プレートを P B S T で 5 回洗浄し、次いで、アルカリ性ホスファターゼにコンジュゲートさせた抗 F a b I g G と、R T で 1 時間インキュベートした。プレートを T B S T で 5 回洗浄し、A u t o P h o s (R o c h e、New Jersey) で展開した。プレートを、I n f i n i t e P r o F 2 0 0 を用いて読み取った。ポジティブのファージ可溶化物を配列決定し、独特の F a b を、さらなる特徴付けのために、c - m y c および H i s タグを含む F a b 発現構築物中にサブクローニングした。

【 0 1 7 4 】

[000208] F a b 発現：F a b 発現プラスミドを、T G I F 細胞中に電気穿孔し、L B / C a m 寒天平板上に塗抹した。プレートを 3 7 で一夜インキュベートした。2 X Y T / C a m / G l c 5 m l に単一のコロニーを接種し、3 0 および 3 5 0 r p m で一夜増殖させた。2 X Y T / C a m / 低 G l c 5 0 0 m l に、一夜培養物 2 m l を接種し、O D 6 0 0 n m が 0 . 5 に到達するまで 3 0 および 1 8 0 r p m で振盪した。最終濃度 0 .

10

20

30

40

50

75 mMのIPTGを添加することによりFab発現を誘発した。培養物を30 および160 rpmで一晩振盪した。培養物を5000 gおよび4 で30分間遠心分離した。細菌のペレットを-80 で少なくとも2時間凍結した。細胞を溶解し、0.22 μmフィルタ上にろ過し、IMAC精製およびサイズ排除の工程にかけた。

【0175】

[000209] 抗体のクローニングおよび発現：ファージをコードするFabを配列決定し、それぞれ重鎖および軽鎖用にIgG発現プラスミド中にサブクローニングした。振盪フラスコ中Invitrogen 293FまたはInvitrogen 293Exp1細胞中にIgGが生成された。細胞を、重鎖および軽鎖に対して発現プラスミドでトランスフェクトした。培養上清を、トランスフェクト6日後に収集し、プロテインAアフィニティクロマトグラフィおよびバッファー交換工程を用いて精製した。

10

【0176】

[000210] マウスにおける治療有効性試験：6～7週齢のBALB/cメスマウスを全ての実験において用いた。マウスを全て気候順化させ、少なくとも3日の期間維持した後、実験を開始した。ウイルス誘発の日、次いで2週間の間毎日、マウスを体重測定した。臨床的エンドポイントおよび試験からの排除のための基準として臨床スコア付けシステムを用いた。臨床徴候を以下の通りにスコア付けした：背を丸める姿勢=3、立毛=3、飲食せず=2、30%の体重減少=10、神経学的症状=10。スコアが16以上に到達したら、マウスを試験から排除し、安楽死させた。動物試験は、認可された動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) のプロトコールにしたがって行った。マウスの治療の経過を、感染後、指摘した日に行った。マウスを、ケタミン/キシラジン混合液で最初に麻酔した後、マウス1匹あたり体積50 μl中のウイルス、Mab、またはFabを鼻腔内投与した。100 μl体積のMabまたはFabを腹腔内投与した。14日の試験期間の間、毎日、平均体重を決定し、0日目の平均体重に対して示した。

20

【0177】

[000211] ウイルス：インフルエンザウイルスの株 (A/California/7/09、A/ビクトリア/11を含む) を、Cottey、Rowe、およびBender (Current Protocols in Immunology, 2001) にしたがってマウスに適応させた。マウスの適応を3ラウンド行った後、孵化卵中のウイルスの増殖を1ラウンド行った。簡潔に述べると、6～8週齢のマウスに麻酔し、ウイルス20 μlを鼻腔内感染させた。感染3日後、マウスを安楽死させ、肺を除去した。肺を機械的にホモジナイズし、清澄にし、遠心分離して大型片のデブリを除去した。肺ホモジネート20 μlのナイーブマウス中へのさらなる継代を3ラウンド行った。

30

【0178】

[000212] 参考文献

Huber VC, Lynch JM, Bucher DJ, Le J, Metzger DW: Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *J Immunol* 2001, 166 :7381-7388.

Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF: Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* 2004, 172 :5598-5605.

40

Feng J, Mozdzanowska K, Gerhard W: Complement component C1q enhances the biological activity of influenza virus hemagglutinin-specific antibodies depending on their fine antigen specificity and heavy chain isotype. *J Virol* 2002, 76: 1369-1378.

Mozdzanowska K, Feng J, Eid M, Zharikova D, Gerhard W: Enhancement of neutralizing activity of influenza virus-specific antibodies by serum components. *Virology* 2006, 352:418-426.

【0179】

実施例 2

50

中和抗体は鼻腔内実験試験で有効である

[000213] 中和抗体および非中和抗体の両方をIP経路により投与すると、致死的な感染を治療および防止する上で同様の効果を表すことから、全身送達される抗体の治療有効性は、中和能力にもっぱら依存するわけではない。中和抗体および非中和抗体10mg/kgを、感染24時間後(24hpi)にIP投与した場合、同様に有効であった(図1)。いくつかの非中和抗体(6P15、IP19、および1K17)は、中和抗体CA8020と同様の程度に致死的な誘発からマウスを保護することから、図1に示す結果は、全身送達されるHAに対する抗体は、エフェクター機能によって頑強な治療有効性を発揮することができることを実証する。中和抗体および非中和抗体は、ウイルスでの感染1時間前(-1hpi)にIP投与すると、同様に予防的に有効である(図2)。同様の結果が1hpiに、および異なるウイルスを用いて見られた(データは示さず)。これらの結果により、中和は、全身送達の間の治療有効性に著しく貢献するか否かという疑問がもたらされる。抗体のIVまたはIP経路による送達は著しい有効性の差をもたらさなかった(図3、データは示さず)。

【0180】

[000214] 対照的に、中和抗体のIN送達は、全身送達に比べてその治療有効性を著しく増強した(図4)。非中和抗体は治療有効性の同様の増強を表さないため、治療有効性におけるこの後押しは中和抗体に特異的である。図4は、Mab(CA8020)がIN送達により有効性の増強を表す性能は、その中和性能に依存することを示す。H3ウイルスに特異的な中和Mabは、IN経路による有効性の増大を表すが、非中和Mabはそのような有効性は示さない。図1に見られるIP送達と異なり、中和抗体のIN送達は、非中和抗体に比べて著しい治療上の利点を提供する。6P15、1K17、およびIP19などの非中和抗体はINで治療有効性の改善を表さないため、IN治療の抗体の有効性の増強は、抗体が中和する性能に相関する。逆に、非中和Mabは、INにより投与した場合、IPに比べて際立って低減した有効性を表す。図4に見られる通り、非中和抗体(例示的な抗体6P15)10mg/kgをIP投与すると、同様の投与量の中和抗体同様、24hpiに、マウスを10xLD50から保護することができる。しかし、非中和抗体は、IN経路により投与した場合、治療有効性の増大を実証しない。非中和抗体6P15の代表的なデータを一例として示す。同様の結果が、抗体1K17およびIP19を含めた他の非中和抗体に見られた(データは示さず)。

【0181】

[000215] INが増強する有効性は、H1ウイルスCA6261に対する抗体を広く認識することにより(IgG2a抗体はHA2サブユニットの短いヘリックスに結合する)(図7)、抗体6F12により(IgG2b抗体はHAの柄の領域を標的化する)(図14)、およびGG3抗体(図15)によっても実証され、多数の別個の抗体に対する効果が確認され、INの有効性は複数のインフルエンザウイルスの標的および亜型に対する中和抗体にわたって一貫することが確立される。INの有効性の効果をさらに確認するために、本発明者らは、別の交差保護的な抗体CR9114を評価し、これがINで極めて効果的であることを示した(図16)。CR9114は、HAの幹に保存されているエピトープに結合し、IV投与した場合、インフルエンザAおよびBウイルスでの致死的な誘発から保護する(Dreyfus Cら(2012) Science Express 9 August 2012 10.1126/science.1222908)。

【0182】

[000216] 本発明者らは、鼻腔内投与に関する限り、別個の抗体アイソタイプを有する抗体に関して著しい違いを観察しなかった。アイソタイプの違いは、IP投薬では観察され、エフェクター機能が関連し得ることが示唆される。また、単一の中和抗体が、標的のH1またはH3ウイルスの複数の株に対する感染を阻止する上で有効であり、有効性は株特異的または株限定的でないことが指摘された。本発明者らは、中和抗体CR6261は2つの別個のH1ウイルス、具体的にはPR8(図5、7、および9)ならびにマウスに適應させたCal/09(図17)に対して、IPよりもINによって10倍を超えて強力

10

20

30

40

50

であることを実証した。したがって、IN投与は、インフルエンザウイルスに対する中和抗体に対して、重要で、実際より効果的な代替を提供する。

【0183】

実施例3

中和Fabは鼻腔内で有効である

[000217] 本発明者らは、次に、Fcを除去することで、IPまたはIN投与した中和Fabおよび非中和Fabの治療有効性が抑止されるか否かを調べた。図5に見られる通り、10mg/kg以下のFab(CA6261抗体Fab)をIP投与しても、H1ウイルスに対する治療有効性をもたらさない。FabでIP治療したマウスは全て、PBS治療したマウス同様、感染で死亡した。対照的に、投与量10mg/kgおよび1mg/kgの中和FabでIN治療したマウスは、致死的な感染を生き延びることができた(図5)。IN投与した投与量は全て(0.1mg/kgまででも)、投与したいかなるIP投与よりも優れた有効性を示した。同じ実験において、CA6261 Fab INをIPまたはIVに対して比べて匹敵する結果が観察され、Fab CA6261をIPまたはIVいずれかで投与した場合は保護的でも、または効果的でもなかったが、同じ投与量(5mg/kg)をIN投与した場合は、著しい有効性を示した(動物は95%以上の体重を保持した)(データは示さず)。これらのデータは、Fabは、中和抗体に対して、鼻腔内でウイルス感染を阻止または治療するのに効果的であることを実証している。Fabが無効であったため、データはさらに、Mabの全身送達は、治療有効性にFcエフェクター機能を必要とすることを指摘している。

10

20

【0184】

[000218] 非中和抗体からのFabは、INまたはIPいずれかの経路により投与した場合、治療有効性を保持しない。図6では、H3ウイルスに感染したマウスを、例示的な抗体CA8020および6P15の精製されたFabのIN送達により治療する。中和Fabは治療有効性を示すことができ、非中和Fabは、マウスを致死的な誘発から保護することができない。これらのデータは、非中和抗体からのFabは、IN投与した場合、治療有効性を表さないことを実証するものである。

【0185】

実施例4

IN送達はIPよりも10~100倍強力である

[000219] 本発明者らは、注目すべきことに、中和抗体の鼻腔内(IN)送達は、腹腔内(IP)送達よりも10~100倍の間強力であることを発見した。マウスにPR8ウイルス(H1ウイルス)10xLD50を感染させ、24hpiに抗体で治療した(図7)。中和抗体CA6261を10倍段階希釈し、INまたはIPいずれかの経路によって投与した(図7A)。IN経路により治療したマウスは、体重減少によって指摘される通り、疾患の重症度をあまり表さず、全ての希釈で致死的な感染から100%保護された。比較上、最高投与量(10mg/kg)でIP治療したマウスだけが、一過性の体重減少および致死的な感染からの保護を表した。低希釈は全て、IP投与した場合、マウスを保護しなかった。対照的に、0.1mg/kgの投与量のIN治療は、全てのマウスに一過性の体重減少および生存をもたらした。投与量10mg/kgおよび1mg/kgのIN送達によって治療したマウスは、感染後全ての時間に、検出可能な体重減少から保護された。IP経路によって投与した抗体は、全投与量である程度の体重減少を表し、最高投与量の10mg/kgで治療したマウスだけが感染を生き延びた。

30

40

【0186】

[000220] 本発明者らは、中和抗体を鼻腔内送達すると、H3ウイルスに対する治療有効性の増強が同様にもたらされることを確認した。マウスにH3ウイルスを感染させ、24hpiに治療した(図8)。中和抗体CA8020を10倍段階希釈し、INまたはIPによって投与した。本発明者らの試験でH1ウイルスに観察された通り、IN経路により投与した抗体はH3ウイルスに対して全ての希釈で100%生存をもたらし、IP経路により投与した抗体よりも体重減少を表さなかった。

50

【 0 1 8 7 】

[000221] 総合して、これらのデータは、IN送達した場合、中和は治療有効性の増強に不可欠であることを実証している。さらに、同様のレベルの有効性を、中和抗体および非中和抗体の両方に観察することができることから、全身送達した抗体の治療有効性は中和に依存的ではない。この観察を支持して、IP投与した場合、中和Fabの治療有効性は消滅するが、IN送達した場合、中和Fabは有効性を表す。中和FabはIN投与すると、IP投与に比べて、完全なMabの対応物のIN送達と同様の有効性の改善を表す。

【 0 1 8 8 】

実施例 5

鼻腔内の有効性は感染後も維持される

10

[000222] IN送達した中和抗体の有効性の増強は、感染後、後々維持される。図8では、マウスを48hpiにINまたはIPのいずれかにより治療する。繰り返すが、中和抗体のIN送達は、IP送達よりも治療上有効である。IN経路によって投与した場合、致死的な誘発からの完全な保護が1mg/kgで実現されるが、IP送達は、投与量10mg/kgで致死的な誘発に対して完全な保護をもたらす。IN投薬は、72hpiに比較的低減した有効性を示したが、72hpiの同量のIP投薬に対して依然として大幅に改善されていた。72hpiにIN投与した場合のCA6261の有効性、および同投与量のIPに比べて非常に著しく増強された生存を実証する生存チャートを図18に提供する。

【 0 1 8 9 】

20

実施例 6

低投与量のIN投与は有効である

[000223] 中和抗体の鼻腔内送達は、感染後に投与した場合、非常に低い投与量で、致死的な誘発に対する完全な保護をもたらすことができる。図10に実証する通り、0.005mg/kgほどに低いIN投与量のCA8020抗体を8hpiに投与すると、10xLD50のウイルスに対して100%の生存をもたらす。これらの投与量は、感染後のIVまたはIP治療に対する標準の投与量よりも1000倍低い。これらの結果は、驚くほど低い投与量は、IN投与した場合に治療有効性を実現することができることを指摘する。

【 0 1 9 0 】

30

[000224] 反復性のIN投薬の有効性を評価した。8hpi、32hpi、および再び56hpiにCA8020Mabを反復性にIN投薬すると、1投与量あたり0.005mg/kgの反復性の低投薬を用いて、および0.001mg/kgの反復性の投薬でも、有効性がもたらされた(図11)。有効性は、単一の8hpi投薬に対して幾分改善された。付加的な試験により、8hpiに投与した抗体CA6261を用いた保護は、0.045mg/kgで保護的であることが示され、より低い投与量が評価中である(データは示さず)。

【 0 1 9 1 】

[000225] 非中和剤は有効性の増大を表さないことから、総合して、これらの結果は、INの有効性の増大に中和は不可欠であることを示している。したがって、中和抗体のFabをIN経路によって投与した場合は有効性の増強を保持するが、非中和抗体からのFabは注目すべき有効性を表さない。逆に、中和Fabも非中和FabもIPにより投与した場合は有効性を表さず、中和Mabおよび非中和Mabは両方とも、IP投与した場合はFc領域のエフェクター機能に依存的であることが示唆される。図12に示す感染モデルは、IN投与による有効性の増強は、抗体の中和に依存的であり、全身送達は明確にエフェクター機能に頼ることを示す。

40

【 0 1 9 2 】

実施例 7

IN/IPの組合せプロトコールにより有効性の増強がもたらされる

[000226] モデルに基づき、図12に示す通り、本発明者らは、INおよびIP送達した

50

抗体は別々の、非重複性の機能を表すという仮説を調査した。正しければ、INおよびIPの組合せ経路により投与した抗体は、単一の投与経路単独に比べて有効性の増大を表す。図13A~13Dにおいて、本発明者らは、INおよびIPの組合せ送達は、様々な組合せ投薬レジメン下で（これらの試験における抗体の合計投与量は5mg/kgまたは2mg/kgであった）IP送達単独よりも有効であることを示す。IPまたはINの群に比べて、INおよびIPの組合せ投与を用いてもたらされる有効性の改善は、INおよびIPによるMab投与の作用機序および必要要件が明確であり、非重複であり得ることを確認するものである。INおよびIPの組合せ投与レジメンを用いて、INのための中和抗体、ならびに組合せIP投与様式のための中和抗体または非中和抗体を用いて、抗ウイルス有効性の増強がもたらされる。さらなる試験により、中和抗体（例示的なCA8020抗体）のIN投与を、同じ中和抗体または別個の非中和抗体（例示的な6P15）のIP投与と組み合わせると、IN 0.1mg/kgおよびIP 0.5mg/kgの低投与量を合計0.6mg/kgのみの抗体投与に用いても、同様に効果的であることが実証される（図19）。IN投与を実行することで、抗体IPの比較的low投与量と組み合わせても、有効性に必要とされる全体の抗体を低減することができる。IN投与した抗体の作用機序は、ウイルスの拡散を主に制限することができ、IP投与した抗体は、エフェクター機能によってウイルスを生成する感染細胞の数を主に低下させ得る。

【0193】

[000227] INまたはIPによって投与した中和抗体のアイソタイプ転換（isotype switching）により作用機序を探索した。マウスIgG1は、マウスIgG2aに比べてエフェクター機能が低い。IN送達された抗体は、CA6261およびCA8020に見られる通り、アイソタイプに非依存的な同様のレベルの有効性を表した。IP投与された抗体は、アイソタイプに依存的な治療有効性における顕著な差を表した。IgG2aアイソタイプの抗体は、CA6261およびCA8020の両方に対して、マウスIgG1抗体よりも著しく有効であった（データは示さず）。これは、全身送達された抗体の主な作用機序は、エフェクター機能によることを示唆するものである。したがって、様々な手段（例えば、それだけには限定されないがFc修飾またはa-フコシル化）によってエフェクター機能を増強するための公知の方法は、全身送達される抗体の有効性を改善し、鼻腔内または吸入の方法によって送達される抗体に含まれ得る。鼻腔内または吸入の経路によって送達される抗体は、補体（complement）を活性化し得、肺のマクロファージに關与し得、および/またはエフェクター機能の關与が有効性の改善をもたらし得る基底面への限定された拡散を有し得る。

【0194】

実施例8

インフルエンザBウイルスに対する抗体の有効性

[000228] 上記に示し、表1に記載し、先に報告されている通り（Dreyfus Cら（2012）Science 337（6100）：1343-1348）、抗体CR9114は、インフルエンザA型およびB型のウイルスに対しても結合し、有効である。キメラ抗体CA9114（マウスIgG2aに融合しているヒト可変領域を有すると先に記載されている）を、インフルエンザB/マレーシア株に対する有効性に対して、マウスモデルで試験した。B/マレーシア（B/Malと示す）10×LD50に対する有効性に対して、24hpiに、10mg/kg、1mg/kg、および0.1mg/kgのINおよびIP投薬を試験した。結果を図20に示す。試験した全投与量で、IN投与はIPよりも有効であった。インフルエンザBウイルス感染1日後に、CA9114抗体を鼻腔内送達すると動物を治療するのに有効であり、インフルエンザウイルスによる体重減少を排除した。

【0195】

[000229] 先に記載したファージディスプレイを用いて単離した多数のB抗体、および抗体CA9114も含む、in vitroでインフルエンザB型ウイルスに結合し、中和する性能が実証されている一連のモノクローナル抗体を、B/フロリダおよびB/マレーシアウイルスに対して鼻腔内で試験した。インフルエンザBウイルス10×LD50、2

4 h p i に、各抗体 1 m g / k g を I N 投与した。結果を図 2 1 および 2 2 に示し、C A 9 1 1 4 抗体と比べて、インフルエンザ B の B / フロリダおよび B / マレーシアに対する様々なモノクローナル抗体を鼻腔内投与した有効性が示される。C A 9 1 1 4、および B / M a l に対する様々な抗体を 1 m g / k g、8 h p i に投与して、同様の試験を行った (図 2 3)。試験した抗体は全て、B ウイルスの両方の型に対して有効であった。これらの試験により、感染 8 時間後または 2 4 時間後を含めて、インフルエンザ B ウイルスに対して鼻腔内投与した抗インフルエンザ抗体の有効性が確認される。

【 0 1 9 6 】

[000230] 追加のインフルエンザ B 抗体を、B / フロリダまたは B / マレーシアウイルスを感染させた動物における有効性に対して試験した。抗体 5 A 7、C R 8 0 3 3、および m A b 8 0 9 を、B / マレーシアウイルスまたは B / フロリダウイルスいずれかの B ウイルス 1 0 × L D 5 0 1 m g / k g を 2 4 h p i に I N 投与することにより評価した (それぞれ図 3 7 および図 3 8)。1 0 × L D 5 0 投与量を I N 投与した抗インフルエンザ B 抗体は全て、いずれかの B 系列のウイルスでの感染に対して完全に効果的であり、抗体治療した感染動物は体重を 1 0 0 % 保持した。

【 0 1 9 7 】

実施例 9

組合せ抗体試験

[000231] 現在のインフルエンザワクチンは、ヒト集団における循環性インフルエンザウイルス株に対する免疫を誘発するための抗原を含んでいる。4 価のインフルエンザワクチンは、インフルエンザ A ウイルス、特に亜型 H 1 ウイルスおよび H 3 ウイルス、およびインフルエンザ B ウイルスの山形系列およびビクトリア系列も網羅する。インフルエンザ A 亜型およびインフルエンザ B にも対する鼻腔内投与した抗体に実証される上記の有効性、ならびに複数の抗体を組み合わせると効果的であることを考慮して、抗体を組み合わせて試験を行った。これらの組合せには、現在使用中の確立されている 3 価および 4 価のワクチンを擬し、これらに匹敵し得る組合せが含まれていた。したがって、インフルエンザを治療し、感染を防ぎ、または伝染を防ごうと、組合せの鼻腔内抗体組成物を i n v i v o で動物モデルにおいて評定し、インフルエンザ A およびインフルエンザ B ウイルスに対して評価した。

【 0 1 9 8 】

[000232] 2 つのインフルエンザ A 抗体とインフルエンザ B 抗体とのカクテル、特に抗体 4 3 J 2 3 (フェージディスプレイによって単離した抗インフルエンザ B モノクローナル抗体)、抗体 G G 3 (インフルエンザ A 抗 H 1 抗体)、および C A 8 0 2 0 (インフルエンザ A 抗 H 3 抗体) を組み合わせ、インフルエンザ A の H 1、H 3、およびインフルエンザ B の感染に対する有効性に対して評価した。抗体 4 3 J 2 3、G G 3、および C A 8 0 2 0 各 1 m g / k g の、合計体積 5 0 μ l 中、抗体合計 3 m g / k g のカクテルを、インフルエンザウイルス感染 2 4 時間後 (2 4 h p i) に鼻腔内投与した。図 2 4 に、インフルエンザ B / フロリダ (山形系列) ウイルスの感染後にカクテルを用いた有効性試験の結果を示す。B ウイルス感染に対するカクテルの有効性は、B 抗体 4 3 J 2 3 単独 1 m g / k g の有効性に匹敵した。抗体 C A 9 1 1 4 1 m g / k g を I P 投与しても、パーセント体重によって評価して、動物を B ウイルス感染から保護しなかった。先の実施例が、C A 9 1 1 4 抗体を 1 m g / k g を鼻腔内 (I N) 投与すると B ウイルスに対して効果的であることを実証したことに注目すべきである。図 2 5 は、B / マレーシアウイルスに対する抗体 4 3 J 2 3、G G 3、および C A 8 0 2 0 のカクテルでの同様の試験の結果を示す。同じカクテルがインフルエンザ A ウイルスに対して同様に効果的であることが確立され、カクテルは、H 1 ウイルスに感染後の動物の体重を保持した (図 2 6)。この試験におけるカクテルの有効性 (図 2 6) は、単独 1 m g / k g を I N 投与した抗 H 1 抗体 G G 3 に対する結果と同様であった。抗体のカクテルは、インフルエンザ A H 3 亜型ウイルスに対して同様に有効であり (図 2 7)、同じ投与量の C A 8 0 2 0 の I P 投与が有効ではなかった状態下、単一の抗 H 1 抗体 (C A 8 0 2 0 単独) の鼻腔内投薬に対してカクテ

10

20

30

40

50

ルはやはり有効であった。図 28 は、循環性のインフルエンザウイルスの 4 つの各亜型に対する、鼻腔内抗体カクテル（抗 B 抗体 43J23、抗 A H1 抗体 GG3、および抗インフルエンザ A H3 抗体 CA8020）の試験を示すものであり、単一の実験における、H1、H3、B（山形）、および B（ピクトリア）に対する有効性が示される。

【0199】

[000233] 様々な組合せの抗インフルエンザ B および抗インフルエンザ A 抗体を用いた匹敵する試験において、別の鼻腔内カクテルを評価した。この試験では、CA8020 抗 H3 抗体を、抗 H1 抗体 CA6261 および抗 B 抗体 5A7 と組み合わせて利用した。5A7 抗体は、1985 ~ 2006 年に山形およびピクトリア両方に属する系列から単離されたインフルエンザ B 株を広範に中和すると、最近報告された（Yasugi Mら（2013）PLoS Pathog 9（2）：e1003150, doi: 10.1371/journal.ppat.1003150）。報告された通り、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を、マウス IgG2a に融合された可変領域を含む IgG 発現ベクター中にクローニングした（上記および実施例 1 に記載したのと同様に）。5A7、CA6261、および CA8020 の抗体各 1 mg / kg、合計 3 mg / kg の抗体投与量を、インフルエンザウイルスに感染させ 24 時間後の動物に鼻腔内投与した。このカクテルを、H1 ウイルス、H3 ウイルス、B（山形）、および B（ピクトリア）系列のウイルスに対して試験し、試験したあらゆる全てのウイルスに対して効果的であった（図 29）。

【0200】

実施例 10

インフルエンザ H1 および H3 ウイルスに対する代替的な抗体の有効性

[000234] 気道に対する投与の有効性を、鼻腔内投与を用いて、さらなる代替のインフルエンザ抗体で評価した。インフルエンザ A ウイルスのグループ 1 およびグループ 2 の両方を中和し、これらに対する有効性を有するヒトモノクローナル抗体を、ヒト対象から直接単離した。ヒト抗体 Mab53（TRL53 とも示す）は、US2012/0020971 および WO2011/160083 に記載されており、グループ 1 および 2 の H1、H9、H7、および H5 亜型を中和するのに有効である。抗体 Mab579（TRL579 とも示す）は、WO2013/086052 に記載されており、H3 および H7 を中和するのに有効である。Mab579 および 53 抗体を、インフルエンザ A ウイルス感染に対する治療有効性に対してマウスモデルにおいて試験した。Mab579 を H3 インフルエンザに対して試験し、Mab53 を H1 インフルエンザに対して試験した。IN および IP の投薬を比較し、IN 投薬は 1 mg / kg であり、IP 投薬は 10 倍高い 10 mg / kg であった。抗体 Mab579 を、H3 インフルエンザウイルス Vic11 10 x LD50 に対する治療の有効性に対して、感染 24 時間後（24 hpi）に投与した（図 30）。抗体 Mab53 を、H1 インフルエンザウイルス Cal09 10 x LD50 に対する治療の有効性に対して、感染 24 時間後（24 hpi）に投与した（図 31）。同実験において IP 投与は 10 倍高い投与量であっても、IN 投与は IP 投与よりも有効であった。

【0201】

実施例 11

鼻腔内投与した抗体での予防試験

[000235] 感染後の中和抗体の鼻腔内投与の注目すべき有効性を考慮して、予防的な、およびウイルス感染前の、鼻腔内投与の有効性を評価する試験を行った。これらの試験は、個体がインフルエンザウイルスに暴露された場合の鼻腔内投与の適用性の評価および実証となり、また、感染もしくは疾患が全体的に大きな健康上の危険性となる患者では、暴露され、もしくは危険性のある集団内で、または臨床的に、伝染を防止または低減する有効な取組みとなる。マウス動物モデルにおけるインフルエンザウイルス感染の数日前に、グループ 1（H1）の抗体 CA6261 を投与に対して評価した。感染誘発の 3、4、5、6、および 7 日前に CA6261 の投与を評価し、異なる投与量の IN および IP 投薬を直接比較した。

【 0 2 0 2 】

[000236] 第1の試験では、抗体CA6261をINまたはIP投与し、次いで、マウスに3×LD50投与量のH1PR8ウイルスで誘発した。図32は、ウイルス感染の3日または4日前に予防的にINおよびIP投与した試験を表す。PR8 3×LD50で誘発する3または4日前に、抗体CA6261をINまたはIP投与した。CA6261抗体をIN(0.1mg/kg)またはIP(0.1mg/kgおよび1mg/kg)投与した。感染4日前(-4dpi)までにIN投与すると(0.1mg/kgで評価)、マウスをウイルスの誘発から保護した。感染3日または4日前の同じ投与量(0.1mg/kg)のIP投与は、完全に無効であった。感染3日または4日前の1mg/kgのIP投与は有効であった。-3dpiおよび-4dpiのIN(0.1mg/kg)およびIP(1mg/kg)投与を比べると、両方の場合とも、IN投与量は10倍低くてもIPよりも有効であった。

10

【 0 2 0 3 】

[000237] 次いで、予防的有効性を、ウイルス感染の5、6、および7日前に評価し、結果を図33に示す。10倍高い投与量のIPを、IN投与に対して評価した。H1インフルエンザウイルスPR8 3×LD50で誘発する5、6、または7日前のいずれかに、抗体CA6261をIP(1mg/kg)またはIN(0.1mg/kg)投与した。タミフル投与(1日2回5日間10mg/kg経口)も比較のため評価した。-5dpiに0.1mg/kgをIN投与した有効性が実証された。全てのマウスが、ウイルス誘発6日または7日前の0.1mg/kg IN投与を生き延びたわけではなかった。誘発5、6、および7日前の10倍高いIP投与量(10mg/kg)が有効であった。誘発5日前に抗体0.1mg/kgをIN投与すると、誘発7日前に10倍高い1mg/kgをIP投与したものと少なくとも同じくらい有効であった。

20

【 0 2 0 4 】

[000238] 次いで、ウイルス誘発の5、6、および7日前に、1mg/kgのIN高投与量の評価した。図34は、ウイルスPR8 3×LD50で誘発する5、6、および7日前に1mg/kgの抗体CA6261をIPまたはIN投与した、IN対IP投与の試験を示す。ウイルス誘発7日前までの抗体1mg/kgのIN投与は、予防的に有効であり、各場合においてINは、同量の抗体のIP投与よりも有効であった。実際、IN投与はあらゆる時間に(誘発5、6、または7日前)、IP投与がウイルス誘発により近かったとしても、いかなるIP投与よりも有効であった。どの場合も、抗体はタミフルよりも有効であった。

30

【 0 2 0 5 】

[000239] 上記の試験は、IN投与は実際に、予防的保護に対してIP投与よりも優れていることを実証するものである。抗体0.1mg/kgのIN投与は、感染前5日(-5dpi)まで、誘発(3×LD50)に対して保護的である。ウイルス感染3~7日前のいずれかに同じ投与量の0.1mg/kgをIP投与しても、動物を保護しない(3×LD50の同じ投与量のウイルスに対して)。より高投与量の抗体のIN投与では(1mg/kgを評価した)、IN投与した抗体は、少なくとも7日前までに投与すると、誘発に対して保護することができる。7日前を超えたIN投与は評価しなかったが、効果的であり得る。

40

【 0 2 0 6 】

[000240] さらに、誘発前のIN投与による複数の投薬は、潜在的により効果的であると予想される(上記の実施例および図11を参照されたい)。図11に示す通り、感染後の繰返し投薬は効果的であり、数時間(8時間、32時間、52時間)離して複数回投薬した場合は、鼻腔内の低投与量が有効である。同様に、ウイルス感染または曝露の前の繰返し投薬は効果的であることが予想され、低投与量のINの予防的投薬を許容し得る。

【 0 2 0 7 】

[000241] 高投与量のウイルス誘発の予防有効性を評価し、特にH1ウイルスPR8 10×LD50で誘発する数日前にCA2621抗体を投与した。PR8 H1亜型ウイル

50

ス10×LD50で誘発する3日および4日前、動物にCA6261抗体0.1mg/kgをINまたはIPのいずれかで投与した(図35)。ウイルス誘発の3日または4日前に抗体0.1mg/kgをIP投与しても完全に無効であり、IP治療した動物は、治療を受けなかった動物同様、ウイルス感染で死亡した。対照的に、高力価のウイルス誘発の3日または4日前のいずれかに、抗体0.1mg/kgを鼻腔内投与した動物は感染から保護された。

【0208】

[000242] 高力価誘発の5、6、および7日前の抗体投与を評価し、抗体1mg/kgをINまたはIPいずれかで投与した(図36)。この試験では、抗体を気道に投与した(鼻腔内投与による)動物だけが、ウイルス誘発を完全に生き延びた。ウイルス誘発の5、6、または7日前に抗体1mg/kgを投与して治療したマウスは十分に保護されず、マウスは感染で死亡した。タミフルは、保護において完全に無効であった。ウイルス感染5日前または6日前いずれかに抗体0.1mg/kgで鼻腔内治療したマウスは、ウイルス誘発を、感染しなかった対照動物と殆ど同様に生き延びた。

10

【0209】

[000243] したがって、抗インフルエンザ抗体の鼻腔内投与は、抗体感染に対する予防のための有効なプロトコールおよび方法である。ウイルス感染の少なくとも7日前までに鼻腔内投与したインフルエンザ中和抗体は、ウイルス誘発に対して保護的であった。少なくとも7日ほど前の鼻腔内投与による保護が、ウイルスに対するヒトの暴露を表すと合理的に予想され得るよりも高い、高力価のウイルスに実証された。したがって、これらの試験で観察された保護のレベルは、抗体の鼻腔内投与は、ヒト対象をウイルス誘発に対して保護し、ウイルス伝染を阻止または低減するのに有効であることを指摘するものである。鼻腔内投与した抗体は、IP投与が無効である条件下、およびIP投与が無効である場合に保護的である。

20

【0210】

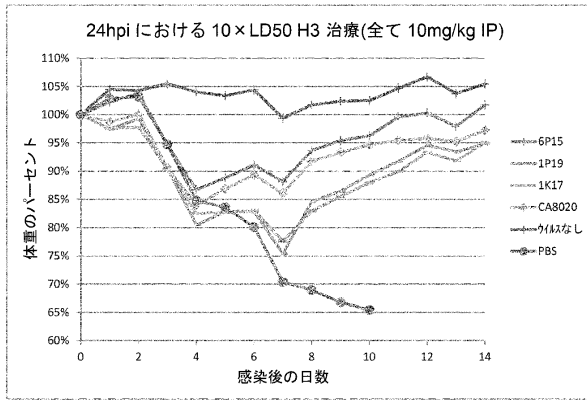
[000244] 本発明は、本発明の精神または本質的な特徴から逸脱せずに、他の形態において具体化し、または他の方法で行ってもよい。したがって、本開示は、全態様において説明する通り、限定的ではないと解釈すべきであり、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲が指摘するものであり、等価の意味内および範囲内に入る変更は全て特許請求の範囲に含まれるものとされる。

30

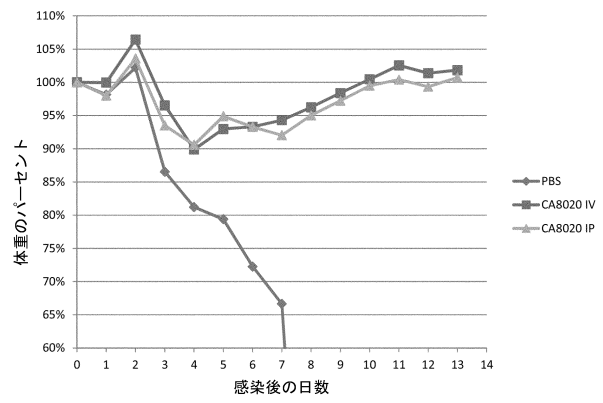
【0211】

[000245] 本明細書を通して様々な参考文献を引用し、その各々は全文が参照によって本明細書に援用される。

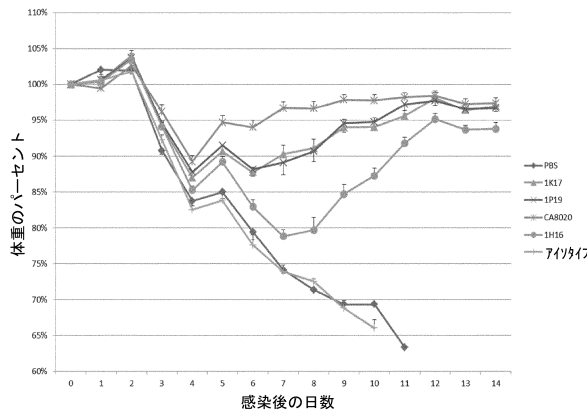
【 図 1 】



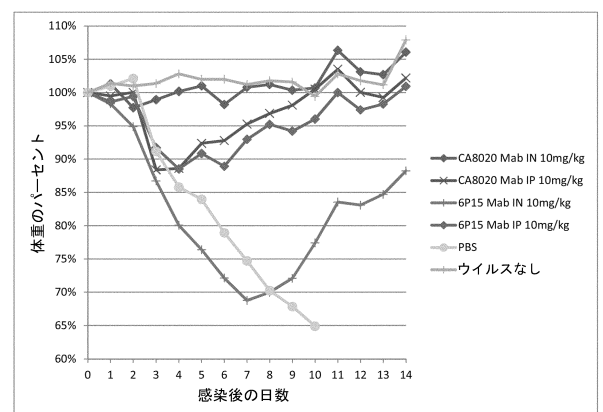
【 図 3 】



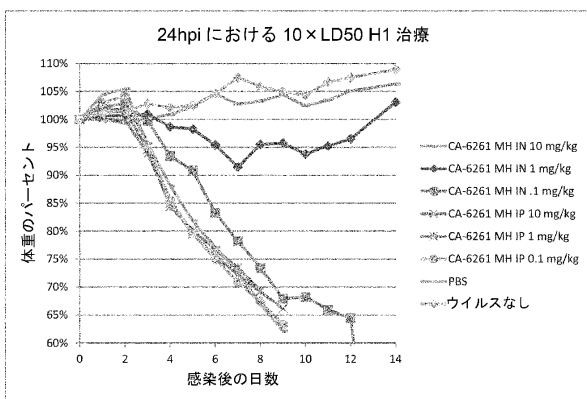
【 図 2 】



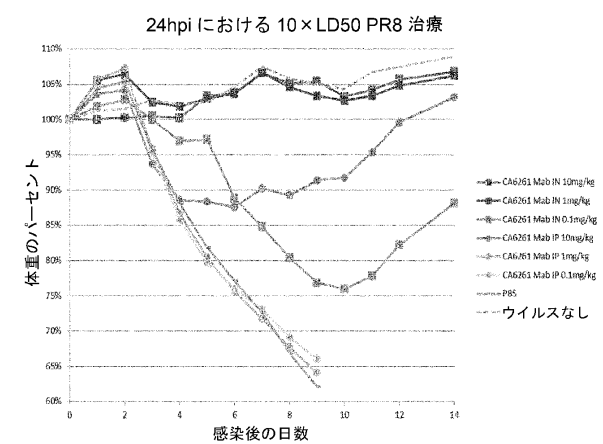
【 図 4 】



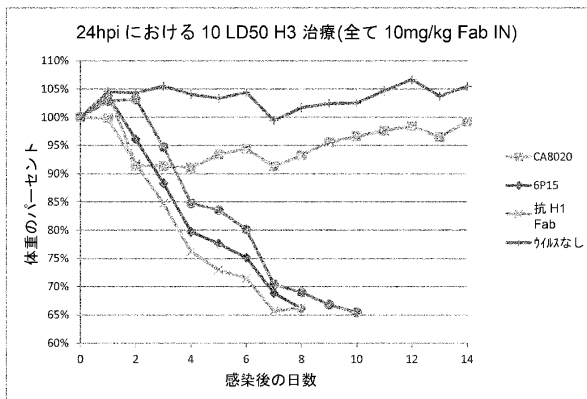
【 図 5 】



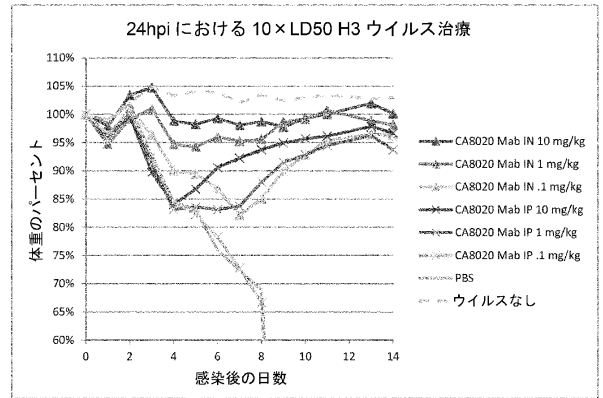
【 図 7 】



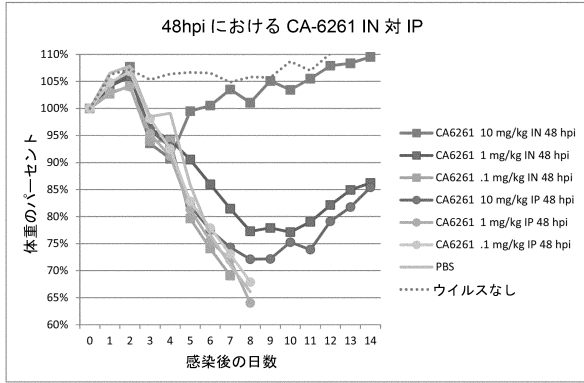
【 図 6 】



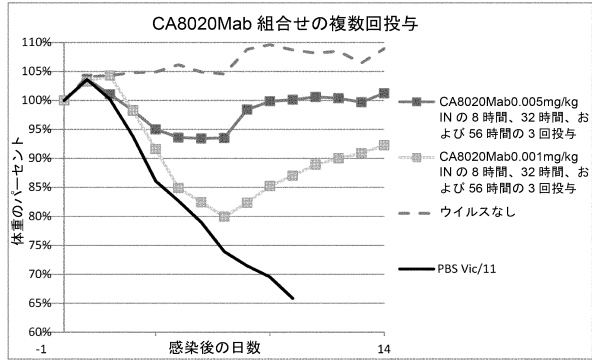
【 図 8 】



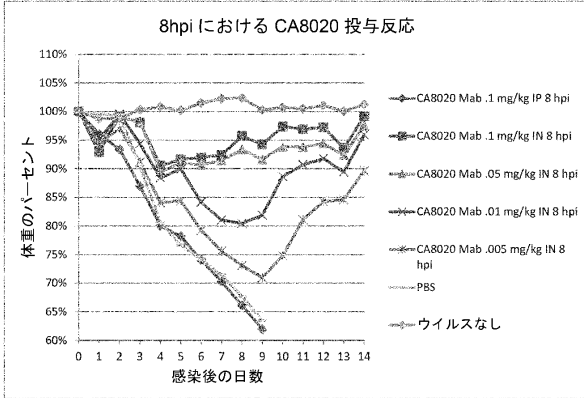
【 図 9 】



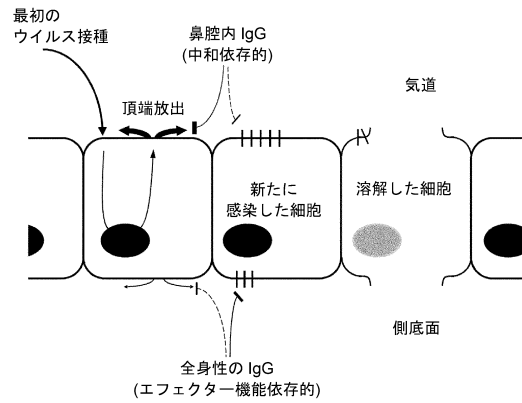
【 図 1 1 】



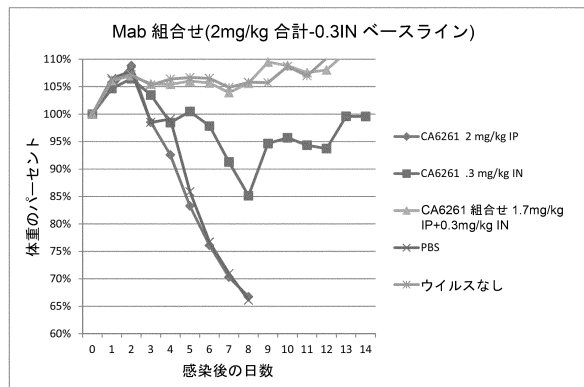
【 図 1 0 】



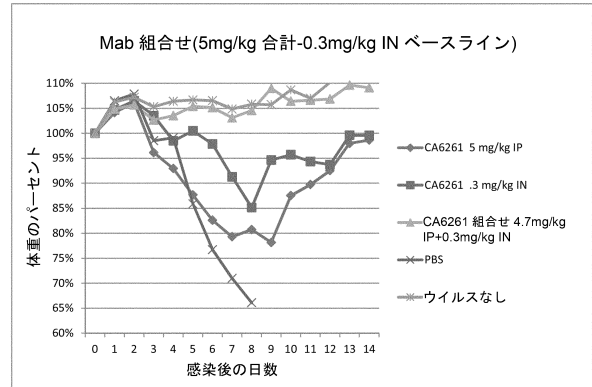
【 図 1 2 】



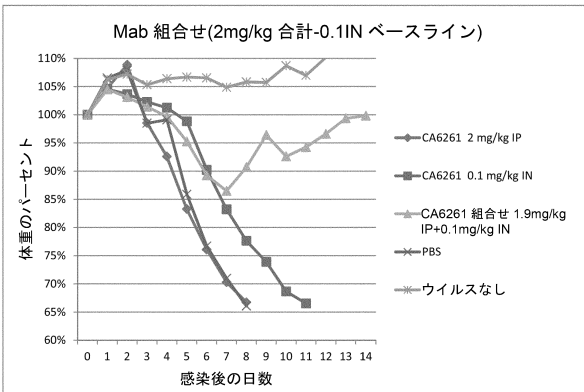
【 図 1 3 A 】



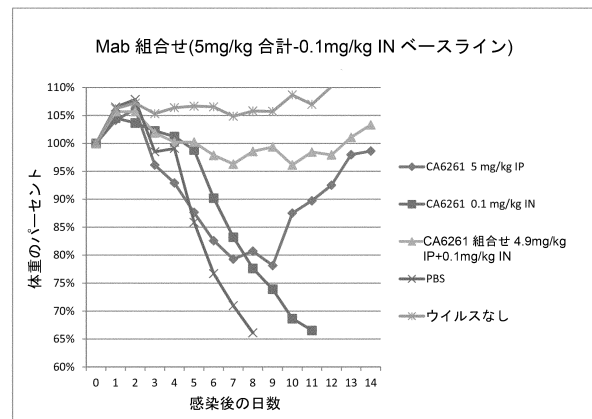
【 図 1 3 C 】



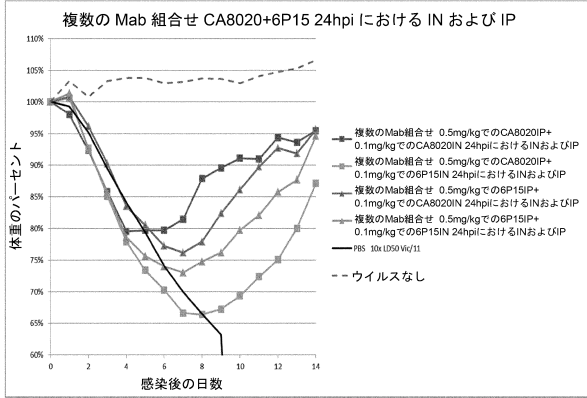
【 図 1 3 B 】



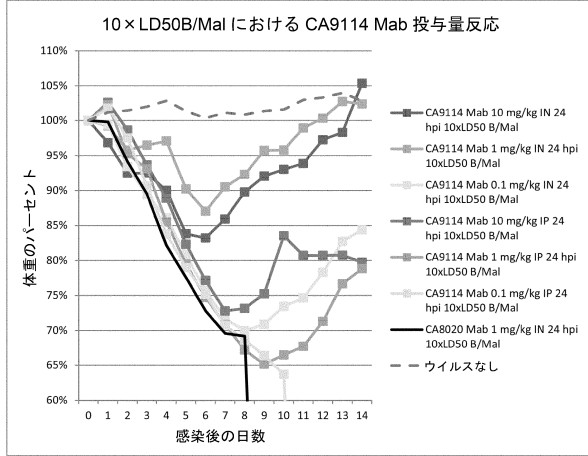
【 図 1 3 D 】



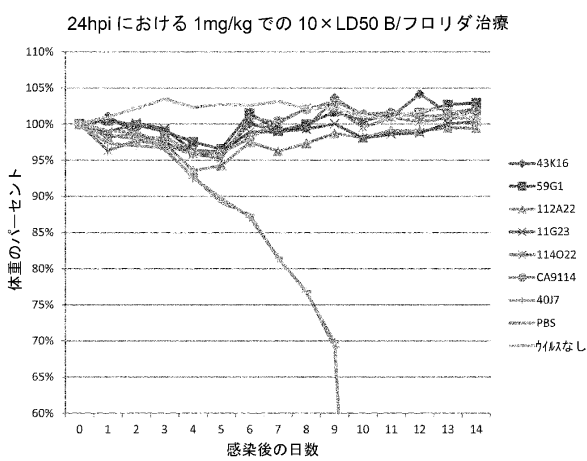
【図19】



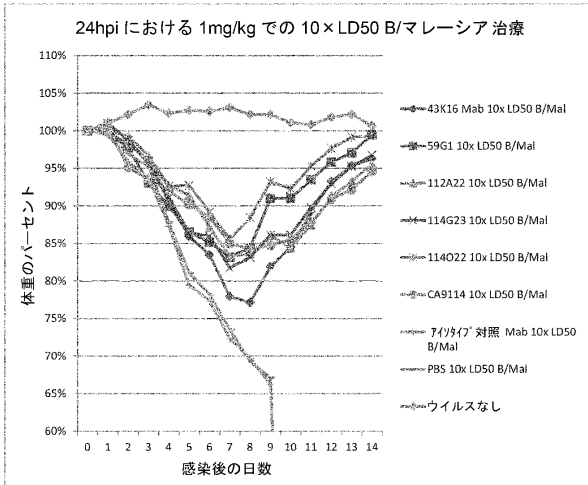
【図20】



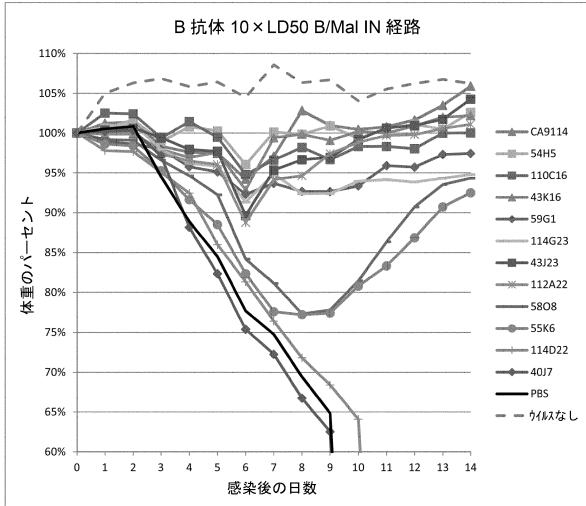
【図21】



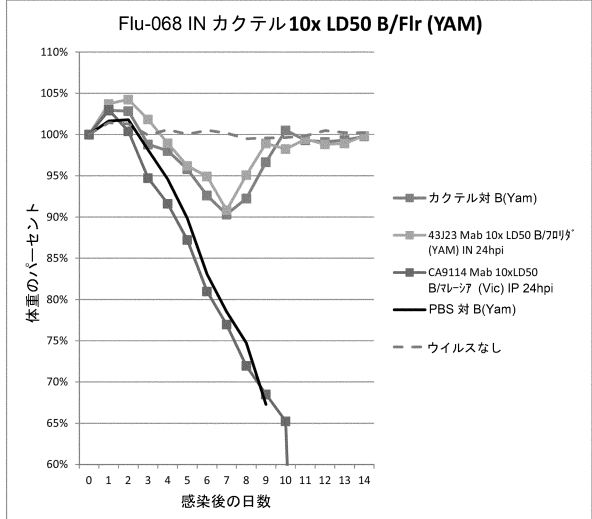
【図22】



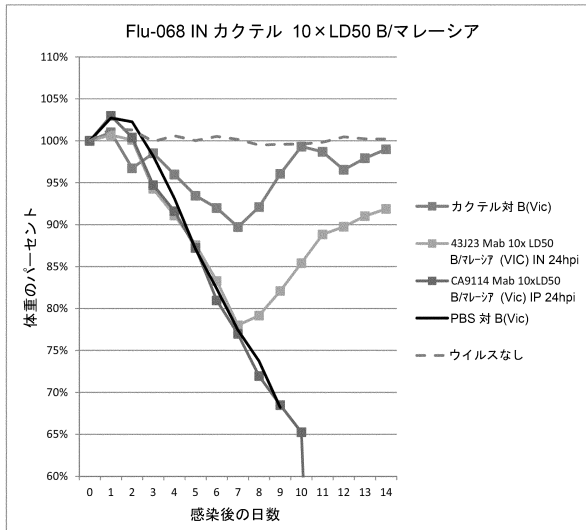
【図 2 3】



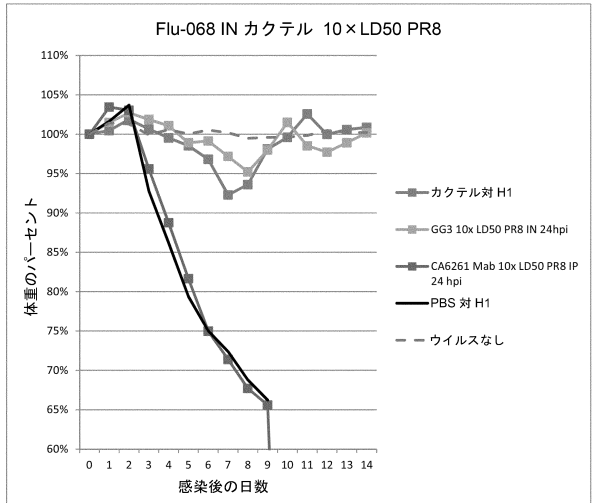
【図 2 4】



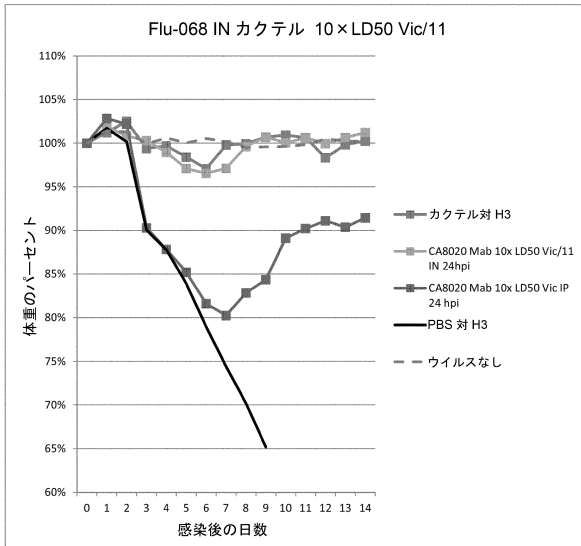
【図 2 5】



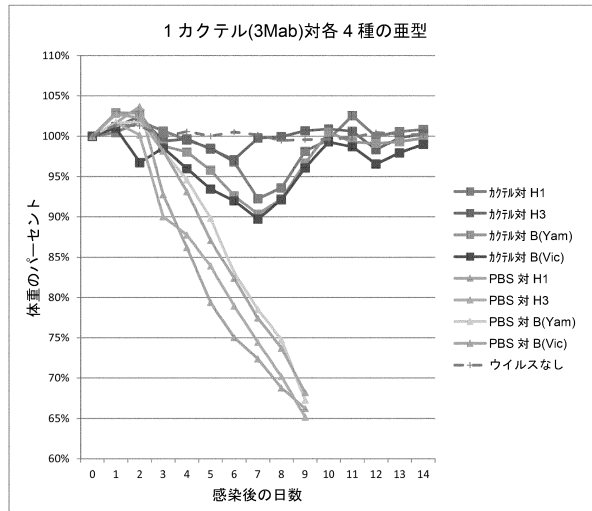
【図 2 6】



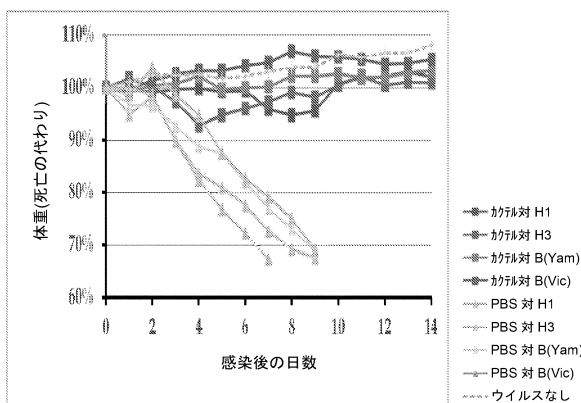
【 図 2 7 】



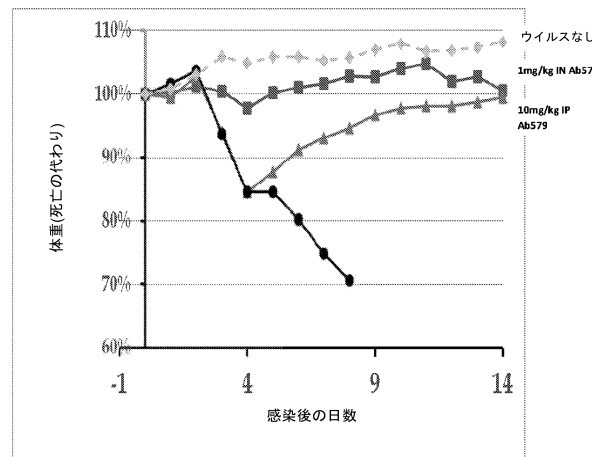
【 図 2 8 】



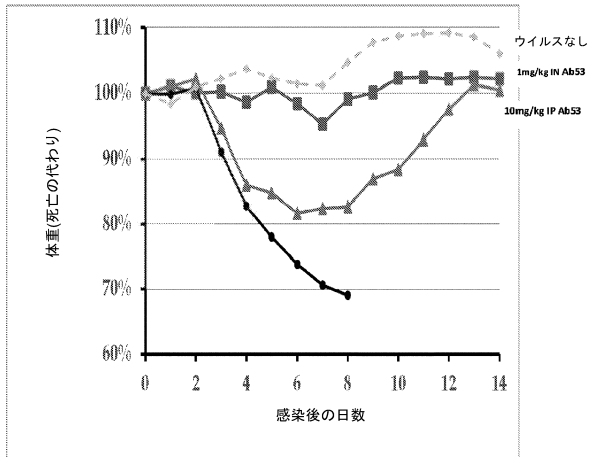
【 図 2 9 】



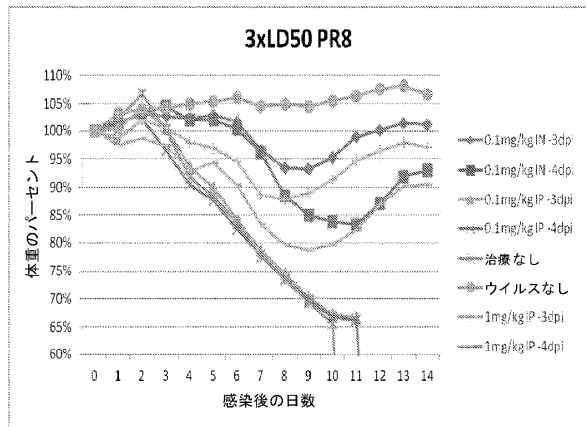
【 図 3 0 】



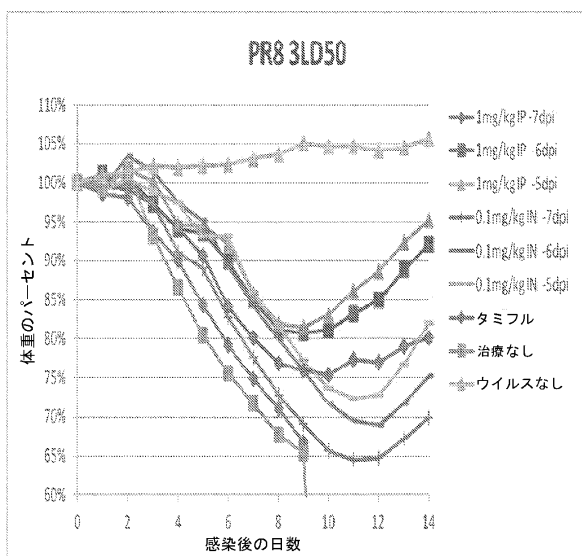
【 図 3 1 】



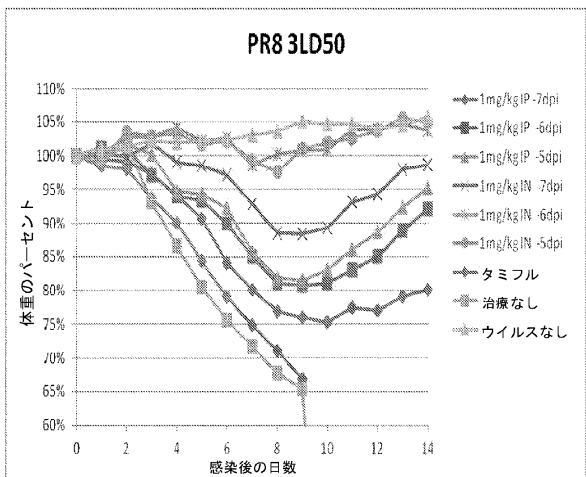
【 図 3 2 】



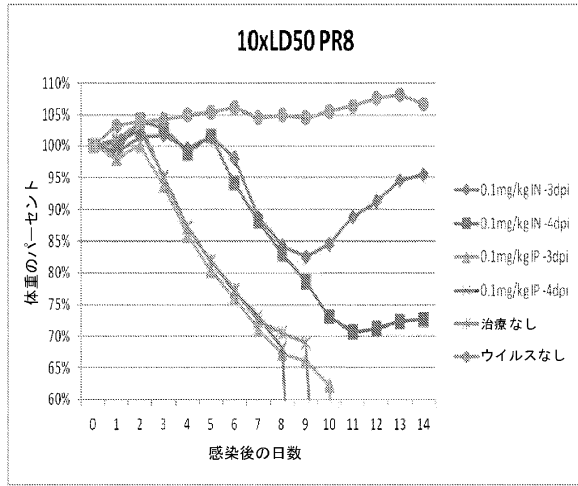
【 図 3 3 】



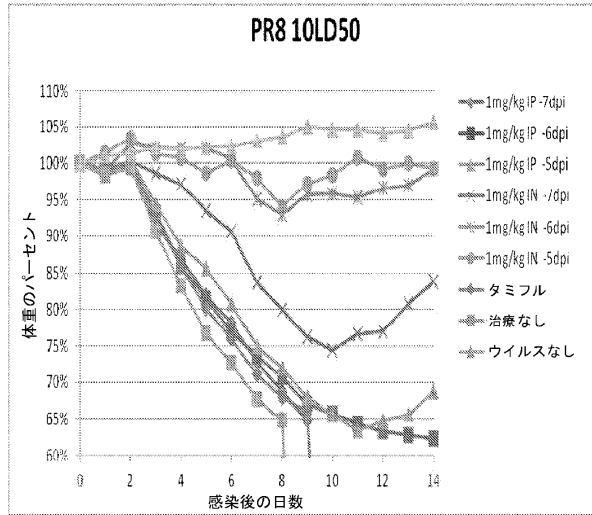
【 図 3 4 】



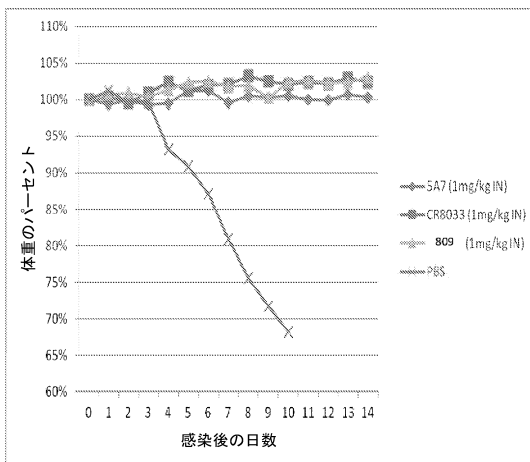
【 図 3 5 】



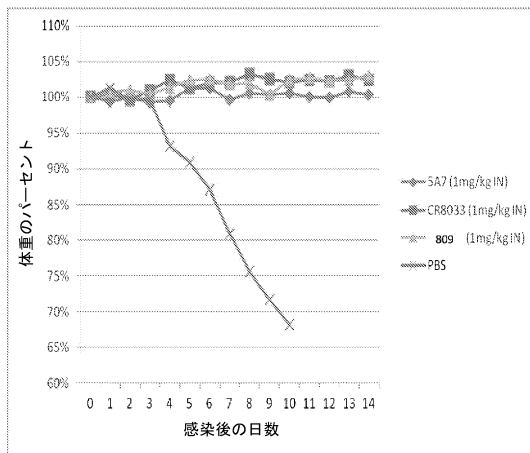
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



【配列表】

0006595448000001.app

フロントページの続き

審査官 佐々木 大輔

- (56)参考文献 特開昭62-175426(JP,A)
特表2010-521147(JP,A)
米国特許出願公開第2008/0299151(US,A1)
特表2011-506344(JP,A)
国際公開第2013/007770(WO,A1)
Clin. Microbiol. Reviews, 1999, Vol.12, No.3, pp.383-393
Clinical and Vaccine Immunology, 2010, Vol.17, No.9, pp.1363-1370

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00-39/44
C07K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)