

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-526526

(P2012-526526A)

(43) 公表日 平成24年11月1日(2012.11.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 110 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-510222 (P2012-510222)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月6日 (2010.5.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年1月10日 (2012.1.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/056217
 (87) 国際公開番号 W02010/130636
 (87) 国際公開日 平成22年11月18日 (2010.11.18)
 (31) 優先権主張番号 09159947.2
 (32) 優先日 平成21年5月11日 (2009.5.11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/215,890
 (32) 優先日 平成21年5月11日 (2009.5.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10151155.8
 (32) 優先日 平成22年1月20日 (2010.1.20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 301055549
 クルセル ホランド ベー ヴェー
 オランダ国 2333 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100153017
 弁理士 大倉 昭人
 (74) 代理人 100175606
 弁理士 井土 美由紀
 (72) 発明者 マーク スロスビー
 オランダ国 2333 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4-6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスH3N2を中和可能なヒト結合分子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒト単クローン性抗体（ヒトモノクローナル）のような結合分子に関し、それらはH3N2のようなH3サブタイプのHAを含み、そしてそのようなインフルエンザウイルスに対して広い中和活性を有する。この開示はこれらの抗体をコード化する核酸分子、それらの配列および抗体を含む組成物および抗体を識別、または生産する方法を提供する。これらの抗体はインフルエンザウイルスH3N2感染の診断、防止および/または処置において用いることができる。好適な具体化において、これらの抗体は、H3、H7、および/またはH10-系インフルエンザサブタイプでの感染を防止および/または処置することができるように交差サブタイプ防御（cross-subtype protection）を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インフルエンザの血球凝集素タンパク質（HA）におけるエピトープを特異的に認識し、かつそれに結合することが可能であり、H3N2のような、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有し、および少なくとも、H7サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスおよび/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する交差中和活性を有する、分離したヒト結合分子。

【請求項 2】

インフルエンザの血球凝集素タンパク質（HA）におけるエピトープを特異的に認識し、かつそれに結合することが可能であり、H3N2のような、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有する分離したヒト結合分子であって、前記結合分子は、少なくとも、A/ウィスコンシン/67/2005、A/広島/52/2005、A/パナマ/2007/99、およびA/ヨハネスバーグ/33/94からなる群より選ばれるH3N2株の一つまたはそれよりも多くに対して中和活性を有する、請求項1に従う分離した結合分子。

10

【請求項 3】

前記結合分子はさらに、H3N2株A/香港/1/68に対する中和活性を有する、請求項2に従う結合分子。

【請求項 4】

前記結合分子は2010年1月20日前に知られているインフルエンザウイルスH3N2のすべての自然に生じる分離体に対して中和活性を有する、請求項2または3に従う結合分子。

20

【請求項 5】

前記結合分子は、H3HAタンパク質のHA2ポリペプチドの位置19、25、27、33および/または34でのアミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項1～4のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 6】

結合分子は、位置19上のアミノ酸がアスパラギン酸(D)、位置25上のアミノ酸がグルタミン(Q)、位置27上のアミノ酸がグリシン(G)、位置33でのアミノ酸がグリシン(G)および/または位置34でのアミノ酸がグルタミンであるとき、HA2上の前記エピトープと結合する、請求項5に従う結合分子。

【請求項 7】

結合分子は一つまたはそれよりも多くの前記アミノ酸が変わったHA2上での前記エピトープと結合しない、請求項6に従う結合分子。

30

【請求項 8】

結合分子は、HA1およびHA2でのH3 HA前駆体分子HA0の試験管内でのトリプシン開裂を防ぐことが可能である、請求項1～7のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 9】

結合分子は、ウイルス膜と感染した細胞のエンドソーム膜との融合のために必要とされるH3 HAタンパク質の立体構造変化を防ぐことが可能である、請求項1～8のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 10】

結合分子は、H1N1のようなH1サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスAに結合し、かつそれを中和することが可能でない、請求項1～9のいずれか一項に従う結合分子。

40

【請求項 11】

前記結合分子は、少なくともH7サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスおよび/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対して、交差中和活性を有する、請求項1～10のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 12】

前記結合分子は、系統学上のグループ2のすべてのインフルエンザウイルスサブタイプに対して交差中和活性を有する、先行する請求項1～11のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 13】

50

結合分子は、次の

- a) 配列番号81の重鎖CDR1領域、配列番号82の重鎖CDR2領域、および配列番号83の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - b) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - c) 配列番号103の重鎖CDR1領域、配列番号104の重鎖CDR2領域、および配列番号105の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - d) 配列番号109の重鎖CDR1領域、配列番号110の重鎖CDR2領域、および配列番号111の重鎖CDR3領域、
 - e) 配列番号115の軽鎖CDR1領域、配列番号116の軽鎖CDR2領域、および配列番号117の軽鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - f) 配列番号121の重鎖CDR1領域、配列番号122の重鎖CDR2領域、および配列番号123の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - g) 配列番号126の重鎖CDR1領域、配列番号127の重鎖CDR2領域、および配列番号128の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - h) 配列番号132の重鎖CDR1領域、配列番号133の重鎖CDR2領域、および配列番号134の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - i) 配列番号138の重鎖CDR1領域、配列番号139の重鎖CDR2領域、および配列番号140の重鎖CDR3領域、
 - j) 配列番号144の重鎖CDR1領域、配列番号145の重鎖CDR2領域、および配列番号146の重鎖CDR3領域、
 - k) 配列番号150の重鎖CDR1領域、配列番号151の重鎖CDR2領域、および配列番号152の重鎖CDR3領域を含む結合分子
 - l) 配列番号156の重鎖CDR1領域、配列番号157の重鎖CDR2領域、および配列番号158の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - m) 配列番号162の重鎖CDR1領域、配列番号163の重鎖CDR2領域、および配列番号164の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - n) 配列番号168の重鎖CDR1領域、配列番号169の重鎖CDR2領域、および配列番号170の重鎖CDR3領域、
 - o) 配列番号173の重鎖CDR1領域、配列番号174の重鎖CDR2領域、および配列番号175の重鎖CDR3領域、および
 - p) 配列番号179の重鎖CDR1領域、配列番号180の重鎖CDR2領域、および配列番号181の重鎖CDR3領域を含む結合分子
- からなる群より選ばれる、先行する請求項1～12のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項14】

結合分子は、次の

- a) 配列番号81の重鎖CDR1領域、配列番号82の重鎖CDR2領域、および配列番号83の重鎖CDR3領域を含む結合分子、
 - b) 配列番号109の重鎖CDR1領域、配列番号110の重鎖CDR2領域、および配列番号111の重鎖CDR3領域、
 - c) 配列番号138の重鎖CDR1領域、配列番号139の重鎖CDR2領域、および配列番号140の重鎖CDR3領域、
 - d) 配列番号144の重鎖CDR1領域、配列番号145の重鎖CDR2領域、および配列番号146の重鎖CDR3領域、および
 - e) 配列番号173の重鎖CDR1領域、配列番号174の重鎖CDR2領域、および配列番号175の重鎖CDR3領域
- からなる群より選ばれる、先行する請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項15】

前記結合分子はヒトモノクローナル抗体である、請求項1～14のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 16】

薬としての使用のための請求項1～15のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 17】

H3N2のようなH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスによって引き起こされるインフルエンザ感染の診断、治療および/または予防上の処置における薬としての使用のための、請求項1～16のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 18】

結合分子の機能しうる異形体であって、H3N2のようなH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有することを特徴とする、請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子の機能しうる異形体。

10

【請求項 19】

請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子、または請求項18に従う機能しうる異形体を含む免疫複合体であって、さらに少なくとも1つのタグを含む、免疫複合体。

【請求項 20】

請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子、および/または請求項18に従う機能しうる異形体、および/または請求項19に従う免疫複合体、および薬剤的に許容可能な賦形剤を含む製薬上の組成物。

【請求項 21】

請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子、および/または請求項18に従う機能しうる異形体、および/または請求項19に従う免疫複合体の、インフルエンザウイルス感染の診断、予防、および/または処置のための薬の調製においての使用。

20

【請求項 22】

インフルエンザ感染は、H3N2のようなH3サブタイプH3のHAを含むインフルエンザウイルスによって引き起こされることを特徴とする、請求項21に従う使用。

【請求項 23】

少なくとも1種の追加の結合分子を含む、請求項20に従う製薬上の組成物。

【請求項 24】

追加の結合分子は、H1N1およびH5N1のようなH1およびH5サブタイプ、またはその機能しうる異形体のHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能なことを特徴とする、請求項23に従う製薬上の組成物。

30

【請求項 25】

少なくとも2つのインフルエンザウイルスの中和結合分子を含む製薬上の組成物であって、少なくとも1つの結合分子は系統学上のグループ1の一つまたはそれよりも多くのインフルエンザウイルスサブタイプを中和することが可能であること、および少なくとも1つの結合分子は系統学上のグループ2の一つまたはそれよりも多くのインフルエンザウイルスサブタイプを中和することが可能であることを特徴とする、製薬上の組成物。

【請求項 26】

少なくとも2つのインフルエンザウイルスの中和結合分子を含む製薬上の組成物であって、少なくとも1つの結合分子はH1および/またはH5サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能であること、および少なくとも1つの結合分子はH3、H7および/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能であることを特徴とする、製薬上の組成物。

40

【請求項 27】

請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子または請求項18に従う機能しうる異形体をコードする核酸分子。

【請求項 28】

請求項27に従う少なくとも1つの核酸分子を含むベクター。

【請求項 29】

請求項28に従う少なくとも1つのベクターを含む宿主。

【請求項 30】

50

宿主はヒト細胞である、請求項29に従う宿主。

【請求項31】

請求項1～17のいずれか一項に従う結合分子、または請求項18に従う機能しうる異形体を生産する方法であって、次のステップ

a) 請求項29または30に従う宿主を結合分子または機能しうる異形体の発現の助けになる状況の下で培養すること、

b) 発現された結合分子または機能しうる異形体を回収することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明の分野を記載する。本発明は薬に関する。本発明は特に、インフルエンザウイルスH3N2のようなH3サブタイプのHAを含む、インフルエンザウイルスに対する中和結合分子を包含する、種々のインフルエンザA型サブタイプを中和することが可能なヒト結合分子に関する。特に、本発明は、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルス、とりわけインフルエンザウイルスH3N2による感染の診断、予防および/または処置に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の背景を記載する。インフルエンザウイルスはRNAオルソミクソウイルスであり、3つのタイプ、A、BおよびCからなる。ただし、タイプBおよびCのインフルエンザウイルスは主にヒト病原体であり、インフルエンザA型ウイルスは、ヒト、ウマ、海洋哺乳類、ブタ、フェレット、およびニワトリ（チキン）を含む、多種多様な鳥類および哺乳類に感染する。動物において、ほとんどのインフルエンザA型ウイルスは、呼吸器および腸管の軽い限局性感染を引き起こす。しかし、また、H5N1のような高病原性のインフルエンザA型サブタイプが存在し、それは家禽（食用飼鳥類）において、全身性感染を引き起こし、中には死亡率が100%に達することがある。また、インフルエンザA型ウイルスのいくつかのサブタイプ（亜型）は、人間で大病を引き起こす場合もある。

20

【0003】

インフルエンザA型ウイルスは、表面のグリコプロテイン（糖タンパク質）、すなわち、ウイルス付着および細胞放出のために必要とされる血球凝集素（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）をコード化する2つの遺伝子の抗原性領域における対立遺伝子の変化に基づくサブタイプに分類することができる。他の主要なウイルスタンパク質には、核タンパク質、ヌクレオカプシド構造タンパク質、膜タンパク質（M1およびM2）、ポリメラーゼ（PA、PBおよびPB2）および非構造的タンパク質（non-structural protein）（NS1およびNS2）が含まれる。目下のところ、HAの16のサブタイプ（H1-H16）、そして、9つのNA（N1-N9）の抗原異形体（antigenic variants）がインフルエンザA型ウイルスで知られている。インフルエンザウイルスサブタイプはさらに、それらの系統学上のグループを参照することによって分類することができる。系統学上の分析〔Fouchier（フーシャー）ら、2005〕は、2つの主要なグループ〔Air（エアー）、1981〕に入るHAの下位区分（サブディビジョン、亜門）を示し、中でも、H1、H2、H5およびH9サブタイプは系統学上のグループ1に、および中でも、H3、H4およびH7サブタイプは系統学上のグループ2に入る（図1）。

30

40

【0004】

インフルエンザA型サブタイプ（即ち、H1N1、H1N2およびH3N2）の若干だけは人々の間に広まるが、しかし、16のHAおよび9つのNAサブタイプのすべての組合せは鳥類の種で確認された。インフルエンザA型に感染した動物はそれらのインフルエンザウイルスのための保有宿主の働きをすることが多く、そして、高病原性インフルエンザA型株のH5N1のような特定のサブタイプは種の壁を横切ってヒトへ渡ることが示された。

【0005】

インフルエンザ感染は、人間に世界中で毎年3および5百万の間の大病の症例および250,000および500,000の死亡を引き起こすことで知られている最も普通の病気の1つである。

50

インフルエンザは人口の5-15%に影響を及ぼす季節性流行 (seasonal epidemics) において急速に広まり、そして、医療費上の負担および生産性の損失が広範囲に及ぶ〔世界保健 (Healthcare) 機構 (WHO)〕。入院および死亡は、主に高リスクのグループで生じる〔年配の、慢性的疾患 (chronically ill)〕。

【0006】

ウイルス表面のタンパク質HAおよびNAの抗原特性が変えられるとき、インフルエンザのその年の流行が起こる。変えられた抗原性のメカニズムは、2要素からなり、抗原性シフトであり、宿主細胞の二重感染の後、ヒトおよび動物のウイルスの間で遺伝子の再編成 (genetic rearrangement) に起因し、世界的流行病を引き起こすことがあり、そして、抗原ドリフトであり、ウイルス表面でのHAおよびNAタンパク質における小さな変化に起因し、インフルエンザの流行 (エピデミック) を引き起こすことがある。これらの2つのメカニズムによる変異体ウイルス株の出現は、インフルエンザの流行の原因である。前世紀において3回、インフルエンザA型ウイルスは、主にそれらのHA-構成要素における主な遺伝子変化を受け、病気および死亡に関して世界的大流行および大きな犠牲 (large tolls) をもたらした。最も評判の悪い世界的大流行は、「スペイン風邪」であり、そして、インフルエンザウイルスH1N1によって引き起こされ、それは世界人口の大部分に影響を及ぼし、1918-1919年に少なくとも4000万の人々を殺したと考えられる。最近では、2つの他のインフルエンザA型の大流行が、1957年 (「アジアインフルエンザ」、インフルエンザウイルスH2N2によって引き起こされ) および1968年 (「香港インフルエンザ」、インフルエンザウイルスH3N2によって引き起こされる) に発生して、著しい罹患率および死亡率を世界的に引き起こした。目下の季節性インフルエンザの流行と対照的に、また、これらの大流行は、健康なより一層若い人々の間でも重度な治療成績 (outcomes) と関係した。

10

20

【0007】

毎年のインフルエンザの流行に対処する目下の取り組みには、毎年のワクチン接種、なるべくならヘテロタイプ (異型) 交差防御を生成することが含まれる。しかし、上記のように、ヒトでのインフルエンザウイルスの循環は、インフルエンザワクチン株および循環インフルエンザ株との間の最も近い可能性のある一致を確実にするために、インフルエンザのワクチン調剤物 (製剤) の年間の適応 (annual adaptation) を必要とする永続的な抗原性の変化の支配下にある。

【0008】

インフルエンザワクチンによる毎年の予防接種はインフルエンザを予防する最良の方法ではあるが、オセルタミビル [Tamiflu(R) (タミフル商標)] のような抗ウイルス薬物は、インフルエンザの予防および処置に有効でありうる。しかし、そのようなオセルタミビルに対して耐性を示すインフルエンザウイルス株の数は増加している。

30

【0009】

別のアプローチは様々な季節性インフルエンザウイルスを中和する抗体 (系) ベースの予防または治療の手段の開発である。インフルエンザウイルスの感染に対して保護する中和抗体の初期標的は、受容体結合部位を含むウイルスのHAタンパク質の球状頭部 (HA1部分) であるが、これは抗体結合部位でのアミノ酸置換での継続的な遺伝的進化の対象となる (抗原ドリフト)。系統学上のグループ1 (例は、H1およびH5) のインフルエンザA型ウイルスのHAのより一層保存されたステム領域を認識する交差中和抗体が、最近識別された (例は、国際公開第WO2008/028946号)。しかしながら、H3ウイルスのような系統学上のグループ2の一つまたはそれよりも多くのインフルエンザA型ウイルスサブタイプを中和する抗体を識別する際に成功するのは限られており、そして中和のそれらの幅は狭く、かつそれらの有効性は低い。

40

【0010】

H3N2インフルエンザウイルス株を特異的に認識する抗体が説明されている。このようにして、1968年および1980年の間の年からいくつかの (5または6つの) H3N2インフルエンザウイルス株に結合し、そしてそれを中和可能なヒトモノクローナル抗体、C28は、Ostberg (エストベリ) およびPursch (パーシュ) (1983年) によって記載されている。Wang (ワ

50

ン)ら(2010年)は、数十年(5、60年)にわたりH3ウイルスを中和する抗HA2ネズミ抗体を記載しているが、これはいずれの非H3サブタイプのウイルスを中和しないことが示された。

【0011】

H3サブタイプのほか、H4およびH7サブタイプのHAを認識し、およびH3およびH4インフルエンザウイルスのインビトロ(試験管内)でのインフルエンザウイルス複製の減少が可能な交差反応性の抗HA2ネズミ抗体は、Stropkowska(シュトロクフスカ)らによって記載されている(2009年)。天然ウイルスでのこれらの抗体に対するHA2エピトープのアクセシビリティ(到達性)が低いこと、および抗体が、そのトリプシン切断およびpH5処理後にHAとの高い反応性を有していることが示され[Vareckova(バレコバ)ら、2003A]、それらがウイルス複製のインビトロ抑制(Vareckovaら、2003b)、ならびにこれらの抗体のインビボ効力が比較的低いという観察結果を説明することができる[Gocnik(ゴクニク)ら、2007年]。

10

【0012】

WO2009/115972には、ヒトモノクローナル抗体、Fab28が開示されており、それはHAのステム領域上のエピトープを認識し、そしてH1N1に対する中和活性を表示するが、H3N2に対する中和の活性(acitivity、activity)はほとんど示さない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】WO2008/028946

【特許文献2】WO2009/115972

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Ostberg(エストベリ)およびPursch(パーシュ)(1983年)

【非特許文献2】Wang(ワン)ら(2010年)

【非特許文献3】Stropkowska(シュトロクフスカ)(2009年)

【非特許文献4】Vareckova(バレコバ)ら、2003A

【非特許文献5】Vareckovaら、2003b

【非特許文献6】Gocnik(ゴクニク)ら、2007年

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

一定のインフルエンザA型ウイルスによって引き起こされる呼吸器疾患の重症度、および潜在的な大流行の常に存在する脅威、ならびに(as well has)季節的流行の高い経済的影響を考慮して、種々のインフルエンザA型サブタイプの予防および処置に有効な手段のための継続的な必要性がある。このようにして、H3サブタイプ、好ましくはH3N2のHAを含むインフルエンザウイルスを包含する季節性インフルエンザウイルスサブタイプを中和することが可能な、結合分子、好ましくは広範な中和性のヒト結合分子を、先行技術において既知の抗体の欠点がないか、あるいは少ない欠点しか有さないものの必要性が存在する。

40

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、これらの結合分子を提供し、それらは、特にH3サブタイプ、好ましくはH3N2のHAを含むインフルエンザウイルスでの感染の診断、防止および/または処置のために、薬において用いることができる。本発明の結合分子の若干は、H3サブタイプ内で活性を中和することでのそれらの幅において独特である。このように、原因となるインフルエンザH3N2株にかかわりなく、ここで識別される結合分子の若干は、H3N2サブタイプ内の少なくとも一つまたはそれよりも多くの最近の株を含むいくつかを中和可能であり、そして季節性インフルエンザのための普遍的な予防および/または処置の薬剤として用いられる。少な

50

くとも、結合分子の若干は、トリプシンによってインビトロ（試験管内）でHA前駆体分子HA0の開裂を防ぐことが可能である。さらにまた、少なくとも、本発明の結合分子の若干はHAタンパク質の立体構造的な変化（conformational change）を妨げることが可能であるが、インフルエンザウイルス膜の膜融合および感染した細胞のエンドソームの膜（endosomal membrane）に関係していると思われる。さらにまた、本発明の少なくとも若干の結合分子は、それらがまたH7および/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスが包含される、少なくとも1つの他のサブタイプのインフルエンザウイルスを交差中和することが可能であり、このように原因となるインフルエンザサブタイプにかかわらず、インフルエンザウイルスのための普遍的な予防、診断および/または処置の薬剤として用いることができるという点で独特である。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】サブタイプレベルでのアミノ酸配列の系統樹を示す。グループによるサブタイプの分枝が示される。H1クレードは、とりわけH1サブタイプを含み、そしてH9クレードは、H9サブタイプを含み、系統学上のグループ1を形成し、およびH7は、とりわけH7サブタイプを含み、そしてH3クレードは特にH3サブタイプを含み、系統学上のグループ2を形成する。

【図2】FACS分析により測定された、表面発現されたH3 rHAへのIgG1の結合を示す棒グラフであり、トリプシンでの連続処理後（縞模様のバー）、pH4.9の緩衝化した媒体（中実白色バー）およびDTT（交差したバー）および未処置のrHAへの結合割合として表される（中実黒色バー）である。

20

【図3】インビトロでのプロテアーゼ感受性アッセイの結果を示す。試料は、1×MOPS緩衝液での4-12%ピストリス（BisTris）ゲル上で実行された。タンパク質バンドは、コロイドブルー染色により可視化した。

【図4】感染のプロセスの間のHAタンパク質の異なる立体構造（コンフォメーション）の概略図である。

【図5】FACS分析により測定された異なる処理後のHA発現細胞へのH3 mAbs（モノクローナル抗体）の結合を示す棒グラフであり、トリプシンでの連続処理後（縞模様のバー）、pH4.9緩衝化した媒体（中実白色バー）、およびDTT（交差したバー）および未処置のrHAへの結合割合として表わした（中実黒色バー）である。

30

【図6】H3 HAの開裂を達成するためにトリプシンとのHAのインキュベーション時間を定めるために、例11に記載の経時変化実験の結果を示す。

【図7】例11に記載のように、mAbとブレインキュベーションしたH3 HA試料のトリプシン消化の結果を示す。

【図8】CR8043がH3 HAにおけるpH誘発された立体構造変化を抑制することを実証する棒グラフである。

【図9】CR8020およびCR8041がまたHAのpH誘発された立体構造変化をブロック（遮断）することが可能であることを示し、AはmAbsがトリプシン開裂前に添加され、BはmAbsがトリプシン開裂後に添加され、CはmAbsがすべての処置後に添加された。

【図10】Kaplan-Meier（カプラン-マイヤー）残存確率曲線を示す。抗体は、30から1mg/kgに至るまでの用量範囲を用いる負荷試験（challenge）前の日-1に静脈内投与した。コントロールAbは、30mg/kgで投与し（灰色）、次いで25 LD50 A/HK/1/68-MA20（H3N2）と共に0日で致死的な負荷試験を続けた。CR8020（A）は、CR8041（B）とCR8043（C）から別々の調査で試験し、それらを1つの実験において評価した。したがって、同じコントロール抗体グループを、BおよびCのために用いる。

40

【図11】日0に関連した平均体重変化（%）を示す。抗体は、30から1mg/kgに至るまでの用量範囲を用いて負荷試験前の日-1に静脈内投与した。コントロールAbは、30 mg/kgで投与し（灰色）、次いで25 LD50 A/HK/1/68-MA20（H3N2）と共に0日で致死的な負荷試験を続けた。バーは平均の95%CIを表す。マウスが死亡/フォローアップ調査の中に安楽死された場合は、最後に観察された体重が繰り越された（carried forward）。CR8020（A）

50

は、CR8041 (B) およびCR8043 (C) からは別々の調査において試験され、1つの実験で評価した。したがって、同じコントロール抗体グループがBおよびCのために用いられる。

【図12】中央臨床スコアを示す。抗体は、30から1mg/kgに至るまでの用量範囲を用いて負荷試験前日-1に静脈内投与した。コントロールAbは、30mg/kgで投与し(灰色)、次いで25 LD₅₀ A/HK/1/68-MA20 (H3N2) と共に0日で致死的な負荷試験を続けた。バーは、四分位範囲を表す。CR8020 (A) は、CR8041 (B) およびCR8043 (C) から分けた調査において試験され、1つの実験において評価した。したがって、同じコントロール抗体グループがBおよびCのために用いられる。臨床スコアの説明は、0=臨床徴候なし、1=ラフコート、2=ラフコート、低い反応性、取扱いの間受動的、3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難 (laboured breathing)、取扱いの間受動的、4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバック(後退)されない。臨床スコア4を伴って観察されたマウスは同じ日に安楽死させた。

【図13】インフルエンザA/HK/1/68-MA20 (H3N2) によるマウス致死負荷試験モデルにおけるmAb CR8020の治療上の効果を示す。mAbのCR8020の単一用量(15mg/kg)日-1プレ負荷試験で、または129X1/SvJマウスでの日1、2、3、4、5、または6でのポスト負荷試験でのいずれかで静脈内に投与した(n=10/グループ)。コントロールmAb(15mg/kg)を日1のポスト負荷試験で投与した。マウスを、25 LD₅₀ A/HK/1/68-MA20 (H3N2) と共に日0で負荷試験し、そして21日間監視した。パネルA:カプラン-マイヤー残存確率曲線。パネルB:日0に関連する平均体重変化(%)。バーは平均の95%CIを表す。マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合は、最後に観察された体重が繰り越された。パネルC:中央臨床スコア。バーは四分位範囲を表す。0=臨床徴候なし、1=ラフコート、2=ラフコート、低い反応性、取扱いの間受動的、3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、取扱いの間受動的、4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバックされない。臨床スコア4を伴って観察されたマウスは同じ日に安楽死させた。

【図14】マウス適応インフルエンザA/CH/NL/621557/03 (H7N7) によるマウス致死負荷試験モデルにおけるmAb CR8020の予防効果を示す。A:カプラン-マイヤー残存確率曲線。パネルB:日0に関連した平均体重変化(%)。バーは平均の95%CIを表す。マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合は、最後に観察された体重が繰り越された。パネルC:中央臨床スコア。バーは四分位範囲を表す。0=臨床徴候なし、1=ラフコート、2=ラフコート、低い反応性、取扱いの間受動的、3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、取扱いの間受動的、4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバックされない。臨床スコア4を伴い観察されたマウスは、同じ日に安楽死させた。

【図15】マウス適応インフルエンザA/CH/NL/621557/03 (H7N7) でのマウス致死負荷試験モデルにおけるmAbのCR8020、CR8041およびCR8043の予防効果を示す。MAbs(モノクローナル抗体)を雌性のBalb/cマウス(N=8/グループ)での負荷試験前日-1で10から1mg/kgに至るまでの(CR8020)または30から1mg/kgに至るまでの(CR8041およびCR8043)の用量範囲を用い静脈内に投与した。コントロールmAbは、30mg/kgで日-1に投与した(灰色)。日0に致死的な負荷試験を、25 LD₅₀ マウス適応A/CH/NL/621557/03 (H7N7) での鼻腔内接種によって与え、そしてマウスはその後21日間監視した。パネルA:カプラン-マイヤー残存確率曲線。パネルB:日0に関連した平均体重変化(%)。バーは平均の95%CIを表す。マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合は、最後に観察された体重が繰り越された。パネルC:中央臨床スコア。バーは四分位範囲を表す。0=臨床徴候なし、1=ラフコート、2=ラフコート、低い反応性、取扱いの間受動的、3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、取扱いの間受動的、4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバックされない。臨床スコア4を伴って観察されたマウスは、同じ日に安楽死させた。

【図16-1】マウス適応インフルエンザA/CH/NL/621557/03 (H7N7) でのマウス致死負荷試験モデルにおけるmAb CR8020の治療上の効果を示す。mAb CR8020の単一用量(15mg/kg)を、日-1プレ負荷試験で、または雌性BALB/cマウス(N=8/グループ)において日1、2、3、4、5、または6のポスト負荷試験で静脈内に投与した。コントロールmAb(15mg/kg)

を日1ポスト負荷試験で投与した。マウスは、25 LD₅₀ マウス適応A/CH/NL/621557/03 (H7N7) で日0に負荷試験し、および21日間監視した。パネルA: カプラン-マイヤーの残存確率曲線。パネルB: 日0に関連した平均体重変化(%)。バーは平均の95%CIを表す。マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合は、最後に観察された体重が繰り越された。

【図16-2】パネルC: 中央臨床スコア。バーは四分位範囲を表す。0=臨床徴候、1=ラフコート、2=ラフコート、反応性の低い、取扱いの間受動的、3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、取扱いの間受動的、4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバックされない。臨床スコア4を伴って観察されたマウスは、同じ日に安楽死させた。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の説明を記載する。本発明で用いられる条件の定義を下記に与える。

ここで用いられる「含まれる」または「含む」という語は、続いてその語に「限定されずに」とみなされる。

【0019】

ここで用いるように、「結合分子」という語は、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体のようなモノクローナル抗体に、または免疫グロブリンの結合相手(パートナー)、例は、H3に対する特異的結合のための無傷の免疫グロブリンと競合する免疫グロブリンのフラグメント(断片)を含む抗原結合および/または可変領域に言及する。構造に
関係なく、抗原結合フラグメントは無傷の免疫グロブリンによって認識される同じ抗原と結合する。抗原結合フラグメントは、結合分子のアミノ酸配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、または250の近接(contiguous、隣接)するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを包含することができる。

【0020】

ここで用いる「結合分子」という語は、この技術で知られるすべての免疫グロブリンクラスおよびサブクラスを含む。それらの重鎖の定常ドメイン(領域)のアミノ酸配列に従い、結合分子は無傷の抗体の5つの主要な種類に分けることができる。すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、そしてこれらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例は、IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4にさらに分けられることができる。

【0021】

抗原結合フラグメントは、とりわけ、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域(CDR)フラグメント、単鎖抗体(scFv)、二価単鎖抗体、単鎖ファージ抗体、二重特異性抗体(diabodies)、三重特異性抗体(triabodies)、四重特異性抗体(tetrabodies)、(ポリ)ペプチド、その他に対する特異的抗原結合を与えるのに十分な免疫グロブリンフラグメントを少なくとも含む(ポリ)ペプチドが含まれる。上記フラグメントは、合成によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素的または化学的な開裂によって生産することができ、あるいはそれらを組換えDNA技術によって遺伝子改変することができる。生産の方法は、この技術においてよく知られ、そしてたとえば、Antibodies(アンティボディズ)において、A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York [ラボラトリーマニュアル、E. ハーローおよびD. レーンにより編集(1988年)、コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク]に記載され、それを参照することによってここに組み込む。結合分子またはその抗原結合フラグメントは、一つまたはそれよりも多くの結合部位を有することができる。1より多く(複数)の結合部位があるならば、結合部位は互いに同一である場合があり、あるいはそれらは異なる場合がある。

【0022】

結合分子はネイキッド(裸)または共役でない結合分子であることができるが、免疫複

10

20

30

40

50

合体の一部でもあることができる。裸であるか共役でない結合分子は、共役されない、動作可能に連結し、またはさもなければ物理的に、または機能的にエフェクター（効果器）モエティ（構成部分）またはタグ、例えばとりわけ、有害物質、放射性物質、リボソーム、酵素のようなものに関係する結合分子に言及することを目的とする。裸または共役でない結合分子は、安定化、多量体化（multimerized）、ヒト化または他のどの方法でも、効果器構成部分またはタグの付着による以外で操作された結合分子を除外しないことが理解される。したがって、すべてのポスト翻訳的（翻訳後）に修飾された裸の、および共役でない結合分子は、修飾が、組換え結合分子生成細胞によって、自然の結合分子を生成する細胞環境において作成され、そして初期の結合分子の調製後に人間の手によって導入される場合を含み、これと共に含まれる。もちろん、そのような相互作用（インタラクション）の若干が生物学的効果を及ぼすために必要であるので、裸のまたは共役でない結合分子という語は、体への投与後に効果器細胞および/または分子との機能的な関係を形成する結合分子の能力を除外しない。したがって、関係する効果器グループまたはタグの不足は、インビボ（生体内）でなく、インビトロ（試験管内）で裸または共役でない結合分子に対して、定義で適用される。

10

20

30

40

50

【0023】

ここで用いるように、用語「生物学的サンプル（生物試料）」は、血液および生物起源の他の液状試料、生検標本または組織培養物などのような固形組織試料、またはそこから導き出される細胞およびその子孫を含む多種多様な試料タイプを包含する。この用語はまた、試料で、試薬での処理、可溶化、またはタンパク質またはポリヌクレオチドのような一定の成分に対する濃縮によるように、それらの調達後に何らかの方法で操作された試料が含まれる。この用語は、任意の種から得られた臨床試料の種々の種類を包含し、そしてまた培養での細胞、細胞上清および細胞溶解物が含まれる。

【0024】

ここで用いる「相補性決定領域」（CDR）の語は、免疫グロブリンのような結合分子の可変領域内の配列を意味し、それは通常、抗原上で認識されるエピトープに対する形状および電荷分布に相補的な抗原結合部位に対する大きな範囲に寄与する。CDR領域は、線状エピトープ、不連続エピトープ、またはタンパク質またはタンパク質フラグメントの立体構造エピトープであり、その本来の立体構造のタンパク質上に存在するようなものか、または若干のケースでは、タンパク質上に存在する変性、例は、SDSにおける可溶化によるようなもののどちらかについて特異的であることができる。エピトープはまた、タンパク質の翻訳後修飾からなる場合がある。

【0025】

ここで用いるように、「欠失」の語は、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化を表し、その中では、自然に発生することが多い、分子と比較し、それぞれ、一つまたはそれよりも多くのアミノ酸またはヌクレオチド残基が不存在である。

【0026】

ここで用いるように、「発現調節核酸配列」は、特定の宿主生物において動作可能に連結したコード配列の発現に必要なおよび/またはそれに影響を与えるポリヌクレオチド配列に言及する。とりわけ適切な転写開始、終結、プロモーター、エンハンサー配列のような発現調節核酸配列；リプレッサーまたはアクチベーター配列；スプライシングおよびポリアダニル化シグナルのような効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を高める配列（例は、リボソーム結合部位）、タンパク質の安定性を高める配列；および所望の場合、タンパク質の分泌を高める配列は、一般に好まれる（of choice）宿主生物で活性を示す任意の核酸配列であってよく、そしてタンパク質をコードする遺伝子から導き出すことができ、それらタンパク質は宿主生物に対し同種または異種のどちらかでもある。発現調節配列の識別および採用は、この技術における熟練者に対して日常的な作業である。

【0027】

ここに用いるように、「機能しうる異形体（functional variant）」は、参照のヌクレ

オチドおよび/またはアミノ酸配列と比較して一つまたはそれよりも多くのヌクレオチド
および/またはアミノ酸によって変えられるヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列を含
み、そしてまだ結合相手、例は、H3N2で、参照結合分子と共に結合について競合との結合
について競合することが可能である結合分子に言及する。言い換えれば、参照結合分子の
アミノ酸および/またはヌクレオチドの配列の修飾がヌクレオチド配列によってコード化
されたか、またはアミノ酸配列を含む結合分子の結合特性に著しく影響を及ぼさず、また
はそれを変えず、即ち、結合分子がまだその標的を認識し、およびそれを結合することが
できる。機能しうる異形体は、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加および欠失を含
む保存的な配列の修飾を有することができる。これらの修飾は、部位特異的変異誘発およ
びランダムPCR媒介変異誘発のようなこの技術において既知の標準的な技術によって導入
することができ、および自然だけでなく、非天然のヌクレオチドおよびアミノ酸を含ん
でもよい。

10

20

30

40

50

【0028】

保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が類似の構造的または化学的な特性を有するア
ミノ酸残基に置換されているものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基の族（フ
ァミリー）は、この技術において定義されている。これらのファミリーには、以下の側鎖
を有するアミノ酸が含まれ、それらは、塩基性側鎖（例は、リジン、アルギニン、ヒスチ
ジン）、酸性側鎖（例は、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例は、ア
スパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン
）、非極性側鎖（例は、グリシン、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、メチオニン）、ベーター-分枝側鎖（例は、スレオニン、バリン
、イソロイシン）および芳香族側鎖（例は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファ
ン）である。上記で用いられるもの以外のアミノ酸残基のファミリーの他の分類もまた用
いることができることは当業者には明らかであろう。さらに、異形体は、非保存的アミノ
酸置換、例は、異なる構造的または化学的な特性を有するアミノ酸残基とのアミノ酸の置
換があるかもしれない。また、同様な軽微な変動（バリエーション）は、アミノ酸の欠失
または挿入、あるいはその双方を含むことができる。アミノ酸残基が、置換、挿入、また
は免疫学的活性を消滅させる（abolishing）ことなく削除されうるかを決定するガイド
スは、この技術においてよく知られたコンピュータープログラムを用いて見出すことが
できる。

【0029】

ヌクレオチド配列における変異は、トランジション（移行）またはトランスバージョン
（塩基転換）の変異のような、遺伝子座で作られる単一変質（点変異）であることができ
、あるいはまた、複数のヌクレオチドは、単一の遺伝子座で、挿入、欠失または変化す
る場合がある。加えて、一つまたはそれよりも多くの変質（alterations）はヌクレオチド
配列内の遺伝子座の任意の数で作られうる。変異は、この技術において既知の任意の適
した方法によって実行することができる。

【0030】

ここに用いるように、「インフルエンザウイルスのサブタイプ」という語は、血球凝集
素（H）およびノイラミニダーゼ（neuramidase）（N）のウイルス表面タンパク質のさま
ざまな組合せによって特徴付けられるインフルエンザA型ウイルスの異形体に言及する。
本発明によれば、インフルエンザウイルスのサブタイプは、たとえば、「H3サブタイプの
HAを含むインフルエンザウイルス」、または「H3インフルエンザ」のようなそれらのHの
番号によって、またはたとえば、「インフルエンザウイルスサブタイプH3N2」または「H3
N2」のようなHの番号およびNの番号の組合せによって参照することができる。用語「亜型
（サブタイプ）」は、具体的には通常、変異に起因し、および別の病原性プロファイルを
示す各サブタイプ内のすべての個々の「株」が含まれる。このような株は、ウイルスのサ
ブタイプの種々の「単離（分離）株」として称することができる。したがって、ここで用
いるように、用語「株」および「単離体（分離体、isolates）」は、互換的に用いることが
ある。ヒトインフルエンザウイルス株または分離株の目下の命名法は、最初の分離の地理

的な場所、分離の株番号および年を含み、通常は括弧内に与えられるHAおよびNAの抗原性の説明を伴い、例は、A/モスクワ (Moscow) /10/00 (H3N2) である。非ヒトの株はまた、命名において起源の宿主も含まれる。

【0031】

インフルエンザウイルスのサブタイプは、さらにそれらの系統学上のグループへの参照によって分類することができる。系統学上の分析〔Fouchier (フーシェ) ら、2005年〕は、2つの主要なグループに入るHAの下位区分を実証した(エア、1981年)。すなわち、とりわけ系統学上のグループ1においてH1、H2、H5およびH9のサブタイプおよびとりわけ系統学上のグループ2においてH3、H4およびH7のサブタイプ(図1)。

【0032】

ここで用いるように、「中和する」という用語は、本発明の結合分子に関して、中和が達成される機構に関係なく、インフルエンザウイルスが標的細胞に複製的に感染するのを抑制する結合分子に言及する。このようにして、中和は、例えば、細胞表面へのウイルスの付着または接着を妨げることによって、または標的細胞、および同様の他のものに対するウイルスの付着に続くウイルスおよび細胞膜の融合の抑制によって達成することができる。

【0033】

ここで用いるように、「交差中和する」または「交差中和」という用語は、本発明の結合分子に関して、たとえば、H3、H7および/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスのような異なるサブタイプのインフルエンザA型ウイルスを中和するために、本発明の結合分子の能力に言及する。

【0034】

ここで用いるように、「宿主」という語は、生物または細胞に言及することを目的とし、それには、クローニングベクターまたは発現ベクターのようなベクターが導入されているものである。生物または細胞は原核生物または真核生物であることができる。なるべくなら、宿主は分離された宿主細胞、例は、培養物中の宿主細胞である。「宿主細胞」という用語は、細胞が本発明の結合分子の(過剰な)-発現のために修飾され、そして元々これらの結合分子を発現するB細胞を含み、そしてその細胞は結合分子を不死化、増幅、発現の強化、その他によって過剰発現させるために修飾されることを単に示すだけである。宿主という用語が、同様に特定の対象の生物または細胞にだけでなく、そのような生物または細胞の子孫にも言及することを目的とすることは理解されなければならない。一定の修飾が変異または環境の影響のいずれかのために、次の世代に起こる場合があるので、そのような子孫は、実際、親生物または細胞と同一でない場合があるが、まだここで用いる「宿主」という語の範囲内に含まれる。

【0035】

ここに定めるように、「ヒト」という語は、結合分子に適用されるとき、直接的にヒトからの由来、またはヒトの配列に基づく分子に言及する。結合分子がヒト配列に由来するか、またはそれに基づき、そしてその後修飾されたとき、まだ、本明細書を通して用いるように、それはヒトであると考えられる。言い換えると、ヒトという用語は、結合分子に適用されるとき、ヒトの生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変的および定常的な領域を有するか、またはヒトにおいて発生するか、またはヒトリンパ球に基づき、そして若干の形態において修飾される結合分子が含まれることを目的とする。このように、ヒト結合分子はヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコード化されないアミノ酸残基を含むことができ、置換および/または欠失(例は、例としてランダムまたはインビトロでの部位特異的変異によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異)を含む。ここで用いるように、「基づく(based on)」は、核酸配列が正確に鋳型から、または軽微な変異を伴い複製されるかもしれない状況、たとえば、エラーを起こしやすいPCR方法によるように、または正確に鋳型に適合して合成により作成され、または軽微な修飾を伴ったようなものに言及する。ヒト配列に基づく半合成分子はまた、ここで用いるように、ヒトであるとも考えられる。

10

20

30

40

50

【0036】

「挿入」という語は、また「付加」という語としても知られ、アミノ酸における変化または親配列と比較して一つまたはそれよりも多くのアミノ酸またはヌクレオチド残基の付加を、それぞれもたらすヌクレオチド配列を意味する。

【0037】

ここに定めるように、「分離した」という語は結合分子に適用されるとき、他のタンパク質またはポリペプチドを実質含まず、異なる抗原特性を有する他の結合分子を特に含まず、そして他の細胞物質および/または化学物質も実質含まない結合分子に言及する。たとえば、結合分子が組換え的に生産されるとき、それらはなるべくなら、培養媒体成分を実質含まず、そして結合分子が化学合成によって生産されるとき、それらはなるべくなら、化学的な前駆体または他の化学物質を実質含まず、即ち、それらはタンパク質の合成に
10
関与している化学的な前駆体または他の化学物質から分けられる。「分離した」という語は、ここに定めるように、結合分子をコード化する核酸分子に適用されるとき、結合分子をコード化するヌクレオチド配列が他のヌクレオチド配列を含まず、特にヌクレオチド配列がH5N1以外の結合相手を結合する結合分子をコード化する核酸分子に言及することを目的とする。さらにまた、「分離した」という語は、他の細胞構成要素から実質分けられる核酸分子に言及し、それらはその自然宿主、例は、リボソーム、ポリメラーゼ、またはそれが自然に関連するゲノム配列において、天然核酸分子を自然に伴う。さらに、cDNA分子のような「分離した」核酸分子は、他の細胞物質、または組換え技術によって生産されるとき培養媒体を実質含まないことができ、または化学的に合成されるとき化学的な前駆体
20
または他の化学物質を実質含まない。

【0038】

「モノクローナル抗体（単クローン性抗体）」という語は、ここで用いるように、単独の特異性の抗体分子の準備に言及する。モノクローナル抗体は、特定のエピトープのための単独の結合特異性および親和性を表示する。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から導き出されるか、またはそれに基づき、または完全に合成配列から導き出される可変および定常領域を有する単独の結合特性を表示する抗体に言及する。モノクローナル抗体を調製する方法は、結合特性に関連しない。

【0039】

「自然に生じる」という語は、ここに用いるように、対象物に適用するとき、対象物を本来的に見出すことができるという事実
30
に言及する。たとえば、本来、供給源から分離することができる生物において存在し、そして実験室において人間によって故意に修飾されなかったポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然に生じる。

【0040】

「核酸分子」という語は、本発明で用いるように、ヌクレオチドの重合形に言及し、そしてRNA、cDNA、ゲノムDNA、および合形成態のセンスおよびアンチセンス鎖の双方および上記の混合したポリマーを含む。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチドまたはどちらの種類のヌクレオチドの修飾された形態にでも言及する。また、この語は、DNAの一本鎖で二本鎖形態を含む。そのうえ、ポリヌクレオチドは、自然に生じるお
40
よび/または非自然的に生じるヌクレオチド連結によって互いに連結される自然に生じて修飾されたヌクレオチドのいずれかでもまたは双方を含むことができる。核酸分子は、化学的に、または生化学的に修飾することができ、またはこの技術において熟練者によってすぐに認められるように、非自然的であるか、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むことができる。そのような修飾には、たとえば、アナログ、非電荷連結（例は、メチルホスホナート類、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート（phosphoramidates）、カルバメート、など）、荷電連結（例は、ホスホロチオエート、ホスホロチオエート（phosphorodithioates）、など）、懸垂構成部分（pendent moieties）（例は、ポリペプチド）、挿入剤（intercalators）（例は、アクリジン、ソラレン、など）、キレート化剤、アルキル化剤、および修飾された連結（例は、アルファアノマー核酸、など）のようなヌ
50

クレオチド間修飾を有する自然に生じるヌクレオチドの一つまたはそれよりも多くのラベル、メチル化、置換を含む。また、上記の語は、一本鎖、二本鎖、部分的な二重、三重、ヘアピン化 (hairpinned)、環状、パドロック化 (padlocked) 立体構造を含む任意の位相的な形態を包含することも目的とする。水素結合および他の化学的相互作用を介して指定された配列に結合するそれらの能力においてポリヌクレオチドに似た合成分子も含まれる。そのような分子は、この技術において知られており、そしてたとえば、ペプチド連結が分子の骨格 (主鎖) においてホスフェート連結の代わりになるものを含む。核酸配列への参照は、特に明記しない限りその補足物を含む。このように、特定の配列を有する核酸分子への参照は、その補足的なストランドを、その補足的な配列と共に含むために理解されなければならない。補足的なストランドは、例は、アンチセンス療法、ハイブリダイゼーション (交雑) のプローブおよびPCRプライマーにも役立つ。

10

【0041】

「動作可能に連結した」という語は通常、物理的に連結され、そして相互に機能的な関係にある二つまたはそれよりも多くの核酸配列の要素に言及する。例として、プロモーターはコード配列に、プロモーターがコード配列の転写または発現を開始するか、または調節することができる場合に連結され、その場合に、コード配列はプロモーター「の調節下」にあると理解されるべきである。

【0042】

「薬剤的に許容可能な賦形剤」によって、薬物、薬剤、または快適なまたは便利な剤形を調製するための結合分子のような活性分子と組み合わせられる任意の不活性物質を意味する。「薬剤的に許容可能な賦形剤」は採用する投薬量および濃度でレシピエントに対して非毒性である賦形剤であり、そして薬物、薬剤または結合分子を含む調剤物の他の原材料と適合性である。薬剤的に許容可能な賦形剤は、この技術において広く適用される。

20

【0043】

「特異的に結合する」という語は、ここで用いるように、結合分子、例は、抗体、およびその結合相手、例は、抗原の相互作用に関連し、相互作用が、特定の構造、例は、抗原決定基またはエピトープの、結合相手上での存在に依存していることを意味する。言い換えると、抗体は、結合相手が他の分子または生物の混合物中に存在する場合でも、結合相手を優先的に結合または認識する。結合は共有結合または非共有結合性相互作用またはその双方の組合せによって媒介されることがある。さらに言い換えれば、「特異的に結合する」という語は、抗原決定基またはエピトープに対する免疫特異的結合を意味し、および他の抗原決定基またはエピトープに対して免疫特異的結合しはしないことを意味する。抗原に免疫特異的に結合する結合分子は、例は、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、BIACORE、またはその技術において知られた他のアッセイによって定められるように、低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドに結合することができる。結合分子または抗原に免疫特異的に結合するそれらのフラグメントは、関連し、同じエピトープを携える、抗原と交差反応性であることができる。好ましくは、結合分子または抗原に免疫特異的に結合するそのフラグメントは、他の抗原と交差反応しない。

30

【0044】

「置換」は、ここで用いるように、それぞれ、異なるアミノ酸またはヌクレオチドによる一つまたはそれよりも多くのアミノ酸またはヌクレオチドの置換を表す。

40

【0045】

「治療上有効な量」という語は、ここで定めるように、H3サブタイプのインフルエンザによる感染に起因する状態を、予防、改善および/または治療するのに有効である結合分子の量を意味する。ここで用いるように、改善 (Amelioration) は可視または知覚可能な疾患の症状、ウイルス血症 (viremia)、またはインフルエンザの感染の他の測定可能な所見 (manifestation) の軽減に言及することができる。

【0046】

「処置」という語は、治療上の処置ならびに治癒または停止または病気の進行を少なくとも遅らせる予防的または防止的な措置に言及する。処置が必要な者は、H3サブタイプの

50

HAを含むインフルエンザウイルスでの感染がもたらす状態で苦しめられたもの、ならびにH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスでの感染が防止されるべきものが含まれる。H3インフルエンザの感染から部分的または完全に回復した対象体はまた、処置を必要とすることがある。防止は、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスの広がりを抑制または減らすこと、またはH3インフルエンザによる感染に関係する症状の一つまたはそれよりも多くの発症、発達または進行を抑制または減らすことを包含する。

【0047】

「ベクター」という語は、核酸分子を意味し、それには第2の核酸分子が、それが複製される宿主に導入するために挿入し、場合によっては発現されることができる。言い換えると、ベクターは、核酸分子を輸送することができ、それにはそれが連結される。クローニングならびに発現ベクターは、ここで用いるように、「ベクター」という語によって考慮される。ベクターは、制限されないが、プラスミド、コスミド、バクテリア人工染色体(BAC)および酵母人工染色体(YAC)およびバクテリオファージまたは植物または動物(ヒトを含む)のウイルスから導き出されたベクターが含まれる。ベクターは、提案した宿主によって認識される複製の起点を含み、そして発現ベクターの場合には、宿主によって認められるプロモーターおよび他の調節領域が含まれる。第2の核酸分子を含むベクターは、形質転換、形質移入(トランスフェクション)によって、またはウイルス侵入機構を用いることによって、細胞中に導入される。一定のベクターは、それらが導入される宿主において自律増殖が可能である(例は、複製の細菌起点を有するベクターは細菌において複製することができる)。他のベクターは、宿主への導入により宿主のゲノムに統合され、それによってホストゲノムに加えて複製される。

10

20

【0048】

発明の概略を記載する。本発明は、H3N2を含む、H3サブタイプのHAを含み、そのようなインフルエンザウイルスに対して中和活性を示すインフルエンザウイルス株に特異的に結合することができるヒト結合分子を提供する。具体化において、本発明の結合分子は、それらが、いくつかを、少なくとも一つまたはそれよりも多くの最近の、株、好ましくはすべての既知の株、インフルエンザウイルスサブタイプH3のもの、ヒトにおける最も普通の流行のサブタイプのものを含め、高い効力で中和することができるという点で独特である。具体化において、結合分子は、H3のHAタンパク質のステム領域において保存されたエピトープに結合する。具体化では、結合分子は血球凝集反応抑制活性を有する。具体化では、結合分子はHAの前駆体分子HA0のインビトロでの開裂の防止が可能である。具体化において、本発明の結合分子は、感染した細胞のエンドソーム膜とのインフルエンザウイルス膜の融合に必要なHAタンパク質の立体構造変化を防止可能である。

30

【0049】

また、本発明は、H3サブタイプが属する系統学上のグループ2内のインフルエンザのサブタイプ間で共有されている血球凝集素(haemagglutinin)タンパク質におけるエピトープに結合する結合分子を提供し、したがって、H3-、H7-、および/またはH10インフルエンザ系(based、に基づく)サブタイプ、およびこれらの特定のエピトープHAタンパク質が含まれる他のインフルエンザのサブタイプ、好ましくは系統学上のグループ2のすべてのサブタイプの間で交差反応する結合分子に関する。本発明のいくつかの結合分子は、そのように、H7および/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスのような一つまたはそれよりも多くの他のインフルエンザウイルスAサブタイプに対する交差中和活性を保有することで独特である。好ましくは、本発明の結合分子は、H3、H7およびH10のサブタイプを包含し、系統学上のグループ2のすべてのインフルエンザウイルスのサブタイプを交差中和可能であり、そのようにして、系統発生グループ2に属するインフルエンザウイルスのために普遍的な予防、診断および/または処置の薬剤として、原因となるインフルエンザのサブタイプのその系統学上のグループ内でも関係なく用いることができる。

40

【0050】

本発明に従う結合分子が、抗原ドリフトやシフトの傾向がないか、またははるかに少ない、これまで知られていない保存されたエピトープに対して結合することが推測される。

50

したがってまた、これらのエピトープを識別および/または特徴付けるために、本発明の結合分子を用いることが包含される。本発明はまた、ヒトの結合分子の少なくとも結合領域をコード化する核酸分子にも関係がある。本発明はさらに、H3N2インフルエンザの感染のようなH3のインフルエンザ感染を有し、またはその発症する危険性を有する対象体の予防および/または処置における本発明のヒトの結合分子の使用を提供する。さらにまた、本発明は、そのようなインフルエンザ感染の診断/検出における本発明のヒトの結合分子の使用にも関係する。

【0051】

詳細な説明を記載する。第一の見地において、本発明は、インフルエンザウイルスA、とりわけH3サブタイプ、特にH3N2のHAを含むインフルエンザウイルスAに特異的に結合し、およびそれに対する中和活性を有することが可能な結合分子を包含する。なるべくなら、結合分子はヒトの結合分子である。具体化において、本発明の結合分子は、いくつかのインフルエンザウイルスH3N2株、好ましくは、二つまたはそれよりも多くの異なるH3N2株、より一層好ましくは三つまたはそれよりも多くの、よりさらに好ましくは四つまたはそれよりも多くの、より一層好ましくは五つまたはそれよりも多くの異なるH3N2株に特異的に結合し、および/またはそれに対して中和活性を有することが可能である。これらの株は、双方のヒトからまたは非ヒト動物、例は、鳥類から入手することができる。具体化において、結合分子は、A/ウィスコンシン(Wisconsin)/67/2005、A/広島(Hiroshima)/52/2005、A/パナマ(Panama)/2007/99、およびA/ヨハネスバーグ(Johannesburg)/33/94からなる群から選ばれる最近のH3N2株の少なくとも一つまたはそれよりも多くに結合し、およびそれを中和する。別の具体化において、結合分子はまた、H3N2株/香港(Hong Kong)/1/68に結合し、およびそれを中和する。最も好ましくは、結合分子は、1968年および2005年の間の年からのすべてのインフルエンザH3N2株に結合し、およびそれに対して中和活性を有する。好ましくは、結合分子は、2010年1月20日の前に知られているインフルエンザウイルスH3N2の少なくともすべて自然に生じる分離体に対して中和活性を有する。

10

20

30

40

【0052】

本発明の結合分子はHAタンパク質のHA0、HA1および/またはHA2サブユニットに特異的に結合可能であることができる。それらは、HAタンパク質のHA0、HA1および/またはHA2サブユニット上の線形または構造上および/または立体構造のエピトープへの特異的結合が可能でありうる。HA分子は、ウイルスから精製し、または組換え的に生産し、および随意に使用前に単離することができる。代わりに、HAは細胞の表面に発現されることがある。なるべくなら、本発明の結合分子は、H3のHAタンパク質のHA2ポリペプチドの位置19、25、27、33および34でのアミノ酸の一つまたはそれよりも多くのを含むエピトープに結合する。具体化では、結合分子は、HA2上の前記エピトープと、位置19のアミノ酸がアスパラギン酸(D)であり、位置25のアミノ酸がグルタミンであり(Q)、位置27のアミノ酸がグリシンであり(G)、位置33のアミノ酸がグリシン(G)であり、および/または位置34のアミノ酸がグルタミンである(HA1およびHA2の間で切断部位を構成するアルギニン残基にちょうど従って位置1から始まるHA2の番号)とき、結合する。具体化では、結合分子は、HA2上の前記エピトープと、前記アミノ酸の一つまたはそれよりも多くが変化したとき結合しない。

40

【0053】

別の見地では、本発明は、少なくとも試験管内で、HA1およびHA2でのH3のHA前駆体分子HA0のトリプシン開裂を防ぐことが可能である結合分子を包含する。

【0054】

別の見地では、本発明は、少なくとも試験管内で、インフルエンザウイルス膜と感染した細胞のエンドソームの膜の膜融合のために必要な、H3のHAタンパク質の立体構造的な変化を妨げることができる結合分子を包含する。

【0055】

別の見地では、結合分子は、上記に挙げた特性、即ち、HA2のステム領域上で保存されたエピトープへの交差中和活性、結合、HA0の試験管内のトリプシン開裂の抑制、および/

50

または立体構造の変化の抑制の若干またはすべてを有する。

【0056】

具体化において、本発明の結合分子は、上記の特性のすべてまたは若干を有し、そのうえ、H1N1のようなH1サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスA型を結合および/または中和することができません。

【0057】

本発明の結合分子は、たとえば、残存可能であり、生存し、および/または感染性であり、または不活性化/弱毒化の形態であるインフルエンザウイルスH3N2と特異的に結合することが可能でありうる。ウイルス、例は、インフルエンザウイルスH3N2を不活性化/弱毒化する方法は、この技術においてよく知られており、制限されないが、ホルマリン、
-プロピオラクトン(BPL)、メルチオレートおよび/または紫外線光で処置が含まれる。

10

【0058】

本発明の結合分子はまた、とりわけサブタイプH3N2から誘導される一つまたはそれよりも多くのタンパク質および/または(ポリ)ペプチドの調製物またはH3N2の組換え的に生産されたタンパク質および/またはポリペプチドの一つまたはそれよりも多くのもののようなインフルエンザウイルスの一つまたはそれよりも多くのフラグメントに結合することが可能であることができる。H3N2感染の治療および/または防止の方法のために、結合分子は好ましくは、表面糖タンパク質、血球凝集素(HA)のようなH3N2の表面到達可能(アクセスできる)タンパク質と特異的に結合することができ、それはウイルス付着および細胞放出のために必要である。

20

【0059】

種々のH3N2株のタンパク質のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列は、GenBank(ジェンバンク)-データベース、NCBI Influenza Virus Sequence Database(インフルエンザウイルス配列データベース)、Influenza Sequence Database(インフルエンザ配列データベース)(ISD)、EMBL-データベースおよび/または他のデータベースで見出すことができる。そのような配列をそれぞれのデータベースで見出すことは、十分に熟練した人の手の届く範囲である。

【0060】

別の具体化において、本発明の結合分子は、上述のタンパク質および/またはポリペプチドのフラグメントと特異的に結合することができ、ここではフラグメントは本発明の結合分子によって認識されるエピトープを少なくとも含む。ここで用いるように、「エピトープ」は、検出可能な抗原-結合分子複合体を形成するために十分に高い親和性を伴い本発明の結合分子と結合することができる構成部分である。

30

【0061】

本発明の結合分子は、HAの細胞外部分[ここではまた可溶性HA(sHA)とも称する]と特異的に結合可能である場合があるか、そうでない場合がある。

【0062】

本発明の結合分子は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のような無傷の免疫グロブリン分子であることができ、または結合分子は、限定されないが、Fab、F(AB')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fb、相補性決定領域(CDR)フラグメント、単鎖抗体(scFv)、二価の単鎖抗体、単鎖ファージ抗体、二重特異性抗体(ダイアボディ)、三重特異性抗体(triabodies)、四重特異性抗体(tetrabodies)、および少なくともインフルエンザウイルスH3N2株またはそのフラグメントに対する特異的抗原結合性を与えるのに十分な免疫グロブリンのフラグメントを含む(ポリ)ペプチドを含む抗原結合フラグメントであることもできる。好ましい具体化において、本発明の結合分子はヒトモノクローナル抗体である。

40

【0063】

本発明の結合分子は、非分離または分離された形態で用いることができる。さらに、本発明の結合分子は単独で、または本発明の少なくとも一つの結合分子(またはその異形体またはフラグメント)を含む混合物で用いることができる。言い換えると、結合分子は、例として、本発明の二つまたはそれよりも多くの結合分子、その異形体またはフラグメン

50

トを含む製薬上の組成物として、組み合わせる用いることができる。たとえば、異なるが、相補的な活性を有する結合分子は、望ましい予防上、治療上または診断上の効果を達成するために、単一の療法に組み合わせることができるが、あるいは、同一の活性を有する結合分子はまた、望ましい予防上、治療上または診断上の効果を達成するために、単一の療法に組み合わせることができる。随意に、混合物はさらに少なくとも一つの他の治療上の薬剤を含む。なるべくなら、例えば、M2インヒビター（抑制物質）〔例は、アマンタジン（amantidine）、リマンタジン〕および/またはノイラミニダーゼインヒビター（例は、ザナミビル、オセルタミビル）のような治療上の薬剤は、インフルエンザウイルスH3N2の感染の予防および/または処置に有用である。

【0064】

典型的には、本発明に従う結合分子は、それらの結合相手、即ち、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ より低く、好ましくは $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ より低く、より好ましくは $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ より低く、好ましくは $1.0 \times 10^{-10} \text{M}$ より低く、さらにより一層好ましくは $1.0 \times 10^{-11} \text{M}$ よりも低く、および特により一層好ましくは $1.0 \times 10^{-12} \text{M}$ より低い親和定数（Kd-値）を伴い結合することができる。親和定数は、抗体のアイソタイプごとに異なることができる。たとえば、IgMアイソタイプに対する親和性結合は、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の結合親和性に言及する。親和定数は、例としては、表面プラズモン共鳴を用いて、例えば、BIACOREシステム〔Pharmacia Biosensor AB（ファルマシアバイオセンサーAB）、ウプサラ、スウェーデン〕を用い、測定することができる。

【0065】

典型的に、本発明による結合分子は、 $10 \mu\text{g/ml}$ またはそれ未満、好ましくは $5 \mu\text{g/ml}$ またはそれ未満、より一層好ましくは $2 \mu\text{g/ml}$ またはそれ未満、さらにより一層好ましくは $1 \mu\text{g/ml}$ またはそれ未満の、例6に記載のようにインビトロでのウイルス中和アッセイ（VNA）において定められるような中和活性を有する。

【0066】

本発明による結合分子は、例として、試料中で、または懸濁物中でのような可溶性の形態において、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合することができる。またはたとえば、マイクロタイタープレート、膜およびビーズ等の担体または基材に結合し、または付着したインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合することができる。担体または基材は、ガラス、プラスチック（例は、ポリスチレン）、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、またはテフロン（登録商標）、等で作成されてよい。そのような支持体の表面は、中実（中空でない）または多孔性で、そして任意の便利な形状でよい。さらにまた、結合分子は、精製/分離された、または未精製/未分離の形態でインフルエンザウイルスH3N2に結合することができる。

【0067】

本発明の結合分子は中和活性を示す。例としてここに記載するように、中和活性を測定することができる。中和活性を測定する代わりにアッセイは、例として、WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance（動物インフルエンザの診断およびサーベイランスに関するマニュアル）、ジュネーブ（Geneva）：世界保健機関（World Health Organisation）、2005年、バージョン2002.5で説明されている。

【0068】

本発明は、インフルエンザの血球凝集素タンパク質（HA）のエピトープを認識し、およびそれに結合することができる分離されたヒト結合分子に関し、前記結合分子は、H3サブタイプのHAを含む、インフルエンザウイルスA型に対する中和活性を有することで特徴付けられる。H3サブタイプのHAを含むインフルエンザのサブタイプの例はH3N2である。特に好ましいのはH3N2のインフルエンザのサブタイプを中和する結合分子である。具体化では、結合分子は最近のH3N2株の少なくとも一つまたはそれよりも多くを中和する。具体化では、このように、結合分子は、A/ウィスコンシン/67/2005、A/広島/52/2005、A/パナマ/2007/99、A/ヨハネスバーグ/33/94からなる群から選ばれる一つまたはそれよりも多くのH3

10

20

30

40

50

N2株に、少なくとも結合し、およびそれを中和する。別の具体化において、結合分子はまた、H3N2株/香港/1/68に結合し、およびそれを中和する。最も好ましくは、結合分子は、1968年および2005年の間の年からのすべてのインフルエンザH3N2株、好ましくは前記インフルエンザウイルスのサブタイプのすべての既知の菌株に結合し、およびそれに対して中和活性を有する。

【0069】

別の具体化において、本発明による結合分子はまた、他のインフルエンザウイルスA型のサブタイプのインフルエンザウイルス、好ましくは少なくとも、株A/マガモ(Mallard)/オランダ(Netherlands)/12/2000のようなH7サブタイプ、および/または株A/チック(chick)/ドイツ国(Germany)/N/49のようなH10サブタイプのHAを含む、インフルエンザウイルスに対して中和活性を有する。このように、本発明の結合分子の若干がこれらのインフルエンザのサブタイプをクロス中和することが示されている。したがって、本発明はまた、インフルエンザのサブタイプ間で共有され、および保存されている血球凝集素タンパク質のエピトープに結合する結合分子を提供し、そして従ってH3-、H7-、および/またはH10インフルエンザ系のサブタイプ、およびこれらの特定のエピトープを有するHAタンパク質が含まれる他のインフルエンザのサブタイプ、好ましくは系統学上のグループ2のすべてのインフルエンザウイルスの間で交差反応する結合分子に関する。交差中和結合分子は、好ましくは、H3-、H7、および/またはH10-サブタイプのいくつかの株に結合し、そしてそれを中和する。具体化では、これらの交差中和結合分子は、A/ウィスコンシン/67/2005、A/広島/52/2005、A/ヨハネスブルグ/33/94、およびA/パナマ/2007/99からなる群から選ばれる最近のH3N2株の少なくとも一つまたはそれよりも多くに結合し、そしてそれを中和する。別の具体化において、結合分子はまた、H3N2株/香港/1/68に結合し、そしてそれを中和する。最も好ましくは、結合分子は1968年および2005年の間の年からのすべてのインフルエンザH3N2株、好ましくは、すべての既知のもの、およびさらに好ましくはまた、将来のH3N2株に結合し、そしてそれに対して中和活性を有する。さらなる具体化では、結合分子は、前記他のインフルエンザウイルスのサブタイプの実質すべての分離体(分離株)を中和する。

【0070】

具体化において、結合分子は、系統学上のグループ2のすべてのインフルエンザウイルスのサブタイプに結合し、そしてそれを中和する。

【0071】

熟練した者は、ここに明らかにされたことに基づき、抗体が異なるサブタイプからのHAタンパク質と実際に交差反応するかどうか定めることができ、またそのうえ、それらが生体内で異なるサブタイプのインフルエンザウイルスを中和することができるかどうか定めることができる。

【0072】

標的細胞の細胞表面上でシアル酸残基と結合し、そして次いでエンドソーム中に移ることによって、それらの膜をエンドソームの膜と融合させ、そして細胞中へゲノム-転写酵素複合体を放出することによって、インフルエンザウイルスは細胞に感染する。双方の受容体結合および膜融合プロセスは、HA糖タンパク質によって媒介される。インフルエンザウイルスA型のHAは2つの構造的に別個の領域、即ち、球状先頭の領域から構成され、それは標的細胞へのウイルス付着の原因であり、HAの血球凝集活性に関与する受容体結合部位、およびステム領域を含み、ウイルス外筒および細胞のエンドソームの膜の間で膜融合のために必要である融合ペプチドが含まれる。HAタンパク質は三量体であり、それは各々のモノマーが2つのジスルフィド連結グリコポリペプチド、HA1およびHA2からなり、前駆体(HA0)のタンパク質分解開裂によって感染の間に生産される。開裂は、ウイルス感染のために必要であり、それは構造的な変化を許すために、それが膜融合のためのHAを準備する(prime)ことが要求されるからである。準備された分子の活性化はpH5およびpH6の間でエンドソームにおいて低いpHで起こり、そしてHA構造の広範囲な変化を必要とする。プレ融合未開裂(I)、プレ融合開裂(II)およびポスト融合HA(III)の立体構造の三次元構造を

10

20

30

40

50

、図4に図式的に示す。HAのプライミング（準備刺激）および膜融合プロセスでのその参加のための活性化のステージの各々は、抑制の異なる標的を、たとえば、モノクローナル抗体によって示す。

【0073】

本発明の具体化では、結合分子は、少なくともインビトロでのアッセイ、例えば、例で後述するようにアッセイにおいてHAの前駆体分子HA0の開裂を防止可能である。上で説明したように、宿主のプロテアーゼによるHA1およびHA2へのHAの前駆体分子HA0の開裂は、ウイルスの感染性を活性化するのに必要である。本発明の結合分子によるHAの前駆体分子HA0の開裂の防止は、このようにしてインフルエンザウイルスによる感染を防ぐことができる。

10

【0074】

具体化では、結合分子は、H3のHAタンパク質のHA2ポリペプチドの位置19、25、27、33および/または34でのアミノ酸を含むエピトープに結合する。具体化では、結合分子は、HA2上の前記エピトープに、位置19上でのアミノ酸がアスパラギン酸（D）であり、位置25上でのアミノ酸がグルタミン（Q）であり、位置27上でのアミノ酸がグリシン（G）であり、位置33でのアミノ酸がグリシン（G）であり、および/または位置34でのアミノ酸がグルタミンであるとき、結合する。なるべくなら、結合分子は、一つまたはそれより多くの前記アミノ酸が変化したとき、HA2上の前記エピトープには結合しない。アミノ酸のナンバリングは、UniProt（ユニプロト）データベースの数Q91MA7からのヘماغルチン（hemagglutinin）配列（配列番号193）に基づいている。Q91MA7は/香港/1/1968からの未熟なHAの全長配列を与える。HA2配列は、未開裂HAの未熟なタンパク質のG346から始まる。上記ナンバリングでG346はHA2配列でのG1である。

20

【0075】

本発明による結合分子の好ましいものは次のものである。すなわち、

a) 配列番号81の重鎖CDR1領域、配列番号82の重鎖CDR2領域、および配列番号83の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

b) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

c) 配列番号103の重鎖CDR1領域、配列番号104の重鎖CDR2領域、および配列番号105の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

30

d) 配列番号109の重鎖CDR1領域、配列番号110の重鎖CDR2領域、および配列番号111の重鎖CDR3領域、

e) 配列番号115の軽鎖CDR1領域、配列番号116の軽鎖CDR2領域、および配列番号117の軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

f) 配列番号121の重鎖CDR1領域、配列番号122の重鎖CDR2領域、および配列番号123の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

g) 配列番号126の重鎖CDR1領域、配列番号127の重鎖CDR2領域、および配列番号128の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

h) 配列番号132の重鎖CDR1領域、配列番号133の重鎖CDR2領域、および配列番号134の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

40

i) 配列番号138の重鎖CDR1領域、配列番号139の重鎖CDR2領域、および配列番号140の重鎖CDR3領域、

j) 配列番号144の重鎖CDR1領域、配列番号145の重鎖CDR2領域、および配列番号146の重鎖CDR3領域、

k) 配列番号150の重鎖CDR1領域、配列番号151の重鎖CDR2領域、および配列番号152の重鎖CDR3領域を含む結合分子

l) 配列番号156の重鎖CDR1領域、配列番号157の重鎖CDR2領域、および配列番号158の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

m) 配列番号162の重鎖CDR1領域、配列番号163の重鎖CDR2領域、および配列番号164の重鎖CDR3領域を含む結合分子、

50

n) 配列番号168の重鎖CDR1領域、配列番号169の重鎖CDR2領域、および配列番号170の重鎖CDR3領域、

o) 配列番号173の重鎖CDR1領域、配列番号174の重鎖CDR2領域、および配列番号175の重鎖CDR3領域、および

p) 配列番号179の重鎖CDR1領域、配列番号180の重鎖CDR2領域、および配列番号181の重鎖CDR3領域を含む結合分子

からなる群より選ばれる。

【0076】

好ましい具体化において、本発明による結合分子は、薬としての使用のためのものであり、好ましくは、インフルエンザ感染の診断、治療および/または予防的処置のためのものである。好ましくは、インフルエンザの感染を引き起こし、および本発明の結合分子によって処置することができるインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスサブタイプH3N2である。本発明はまた、本発明による結合分子、および薬剂的に許容可能な賦形剤を含む製薬上の組成物に関する。

10

【0077】

さらに別の具体化において、本発明は、インフルエンザウイルス感染の診断、予防、および/または処置のための薬の調製における本発明による結合分子の使用に関する。このような感染は、小さな集団で発生することがあるが、また季節的流行や、悪いことでは、百万の個体が危険にさらされているグローバルな大流行で、世界中に広がることがある。本発明は、このような季節の流行、ならびに潜在的な大流行を引き起こすインフルエンザ株の感染を中和することができる結合分子を提供する。重大なことに、保護および処置は、本発明の結合分子が系統学上のグループ2の種々のインフルエンザのサブタイプを、サブタイプH3、H7およびH10を包含して、交差中和可能であることが開示されているように、種々のインフルエンザのサブタイプとの関係で、今回本発明の結合分子と共に想定することができる。

20

【0078】

好ましい具体化において、本発明に従うヒトの結合分子は次のものであることで特徴付けられる。すなわち、

a) 配列番号81の重鎖CDR1領域、配列番号82の重鎖CDR2領域、および配列番号83の重鎖CDR3領域、配列番号84のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号85のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号86のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

30

b) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域、配列番号90のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号91のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号92のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

c) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域、配列番号93のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号94のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号95のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

40

d) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域、配列番号96のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号97のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号98のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

e) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域、配列番号99のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号100のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号101のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

f) 配列番号87の重鎖CDR1領域、配列番号88の重鎖CDR2領域、および配列番号89の重鎖CDR3領域、配列番号102アミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号85のアミノ酸配列を

50

有する軽鎖CDR2領域、および配列番号86のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

g) 配列番号103の重鎖CDR1領域、配列番号104の重鎖CDR2領域、および配列番号105の重鎖CDR3領域、配列番号106のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号107のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号108のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

h) 配列番号109の重鎖CDR1領域、配列番号110の重鎖CDR2領域、および配列番号111の重鎖CDR3領域、配列番号112のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号113のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号114のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

i) 配列番号115の重鎖CDR1領域、配列番号116の重鎖CDR2領域、および配列番号117の重鎖CDR3領域、配列番号118のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号119のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、配列番号120のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

j) 配列番号121の重鎖CDR1領域、配列番号122の重鎖CDR2領域、および配列番号123の重鎖CDR3領域、配列番号124のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号119のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号125のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

k) 配列番号126の重鎖CDR1領域、配列番号127の重鎖CDR2領域、配列番号128の重鎖CDR3領域、配列番号129のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号130のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号131のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

l) 配列番号132の重鎖CDR1領域、配列番号133の重鎖CDR2領域、配列番号134の重鎖CDR3領域、配列番号135のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号136のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号137のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

m) 配列番号138の重鎖CDR1領域、配列番号139の重鎖CDR2領域、および配列番号140の重鎖CDR3領域、配列番号141のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号142のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号143のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

n) 配列番号144の重鎖CDR1領域、配列番号145の重鎖CDR2領域、および配列番号146の重鎖CDR3領域、配列番号147のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号148のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号149のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

o) 配列番号150の重鎖CDR1領域、配列番号151の重鎖CDR2領域、および配列番号152の重鎖CDR3領域、配列番号153のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号154のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号155のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

p) 配列番号156の重鎖CDR1領域、配列番号157の重鎖CDR2領域、および配列番号158の重鎖CDR3領域、配列番号159のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号160のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域および、配列番号161のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

q) 配列番号162の重鎖CDR1領域、配列番号163の重鎖CDR2領域、および配列番号164の重鎖CDR3領域、配列番号165のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号166のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号167のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

r) 配列番号168の重鎖CDR1領域、配列番号169の重鎖CDR2領域、および配列番号170の重鎖CDR3領域、配列番号171のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号172のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号137のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

10

20

30

40

50

s) 配列番号173の重鎖CDR1領域、配列番号174の重鎖CDR2領域、および配列番号175の重鎖CDR3領域、配列番号176のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号177のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号178のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子、および

t) 配列番号179の重鎖CDR1領域、配列番号180の重鎖CDR2領域、および配列番号181の重鎖CDR3領域、配列番号182のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1領域、配列番号183のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2領域、および配列番号184のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3領域を含む結合分子

からなる群から選ばれる。

【0079】

特定の具体化において、本発明の結合分子は次のものであり、配列番号81のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1領域、配列番号82のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2領域、および配列番号83のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3領域を含む結合分子、配列番号109のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1領域、配列番号110のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2領域、および配列番号111のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3領域を含む結合分子、配列番号138のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1領域、配列番号139のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2領域、および配列番号140のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3領域を含む結合分子、配列番号144のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1領域、配列番号145のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2領域および配列番号146のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3領域を含む結合分子、配列番号173のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1領域、配列番号174のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2領域および配列番号175のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3領域を含む結合分子

からなる群より選ばれる。

【0080】

本発明の結合分子のCDR領域は表1で示される。CDR領域は、Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学的関心のタンパク質のシーケンス)で記載されるようにKabat (カバット)ら (1991)に従う。ここに明らかにされるように、本発明の具体化では、結合分子は1、2、3、4、5またはすべての6のCDR領域からなることができる。好ましくは、本発明に従う結合分子は、ここに明らかにされるCDRsの少なくとも2つを含む。

【0081】

さらに別の具体化において、本発明に従う結合分子は、配列番号2、配列番号6、配列番号10、配列番号14、配列番号18、配列番号22、配列番号26、配列番号30、配列番号34、配列番号38、配列番号42、配列番号46、配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号62、配列番号66、配列番号70、配列番号74および配列番号78からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域が含まれる。更なる具体化では、本発明に従う結合分子は、配列番号4、配列番号8、配列番号12、配列番号16、配列番号20、配列番号24、配列番号28、配列番号32、配列番号36、配列番号40、配列番号44、配列番号48、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号64、配列番号68、配列番号72、配列番号76および配列番号80からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が含まれる。

【0082】

本発明の別の見地は、ここで定義するように、結合分子の機能しうる異形体が含まれる。分子は、異形体がインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントとの特異的結合について「親の」または「参照の」結合分子と競合することが可能な場合、本発明による結合分子の機能しうる(機能的)異形体であると考えられる。言い換えれば、機能的異形体がまだインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントの同一のまたは重複するエピトープに結合することができるときである。この適用のために「親の」および「参照の」は同義語として使用され、参照または親の分子、または物理的な分子自体の情報が変動するための基礎を形成する可能性があることを意味する。好ましくは、機能的異形体は、参照結合分子によって特異的に結合される少なくとも二つ(それよりも多く)の異なるインフルエンザウイルスH3N2株またはそのフラグメントとの特異的な結合について競合することが可能である。さらにまた、分子は、それらが、インフルエンザウイルスH3N2株に対

10

20

30

40

50

して、好ましくは、少なくとも二つ（またはそれよりも多く）のインフルエンザウイルスH3N2株で、それに対して親の結合分子が中和活性を見せるものに対して中和活性を有する場合に、本発明による結合分子の機能的異形体であると考えられる。機能的異形体は、限定されないが、一次構造配列で実質類似する派生体が含まれ、Fc受容体またはエフェクター機能に関連する他の領域での修飾を有するもの、および/または例えば、インビトロまたはインビボでの修飾、親の結合分子で発見されていない化学物質および/または生化学的が含まれる。このような修飾には、とりわけ、アセチル化、アシル化、ヌクレオチドまたはヌクレオチド派生体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、架橋、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、および同様の他のものが含まれる。

10

【0083】

代わりに、親の結合分子のアミノ酸配列と比較して一つまたはそれよりも多くのアミノ酸の置換、挿入、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列が含まれる本発明で定義されているような機能的異形体は、結合分子であることができる。さらに、機能的異形体は、いずれかまたは双方のアミノまたはカルボキシル末端のアミノ酸配列の切り取り（トランケーション）を含むことができる。本発明に係る機能的異形体は、同一または異なり、高いまたは低いかのどちらかの、親の結合分子に比べて結合親和性を有するが、まだインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合することが可能である場合がある。例として、本発明に係る機能的異形体は、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントについての結合親和性を親の結合分子に比べて増加または減少させている可能性がある。好ましくは、可変領域のアミノ酸配列は、制限されないが、フレームワーク領域、超可変領域、特にCDR3領域を含み、修飾される。概して、軽鎖および重鎖の可変領域は、3つの超可変領域を含み、3つのCDRs、およびより多くの保存された領域、いわゆるフレームワーク領域（FRs）が含まれる。超可変領域はCDRsからのアミノ酸残基および超可変ループからのアミノ酸残基を含む。本発明の範囲内に入ることを目的とする機能的異形体は、少なくとも約50%～約99%、好ましくは少なくとも約60%～約99%、より好ましくは少なくとも約70%～約99%、さらにより一層好ましくは少なくとも約80%～約99%、最も好ましくは少なくとも約90%～約99%、特に少なくとも約95%～約99%、および特に少なくとも約97%～約99%のアミノ酸配列の、ここで定義されるように、親の結合分子との相同性を有する。この技術において熟練者に知られる、とりわけGap（ギャップ）またはBestfit（ベストフィット）のようなコンピュータアルゴリズムが比較されるアミノ酸配列を最適に整列させるのに、および類似または同一のアミノ酸残基を定義するために用いることができる。機能的異形体は、この技術での既知の一般的な分子生物学的方法によってその親の結合分子またはその一部を変えることによって得られ、制限されないが、エラープロードPCR法、オリゴヌクレオチド指定変異誘発、部位特異的変異誘発および重鎖および/または軽鎖シャッフリングが含まれる。具体化において、本発明の機能的異形体は、インフルエンザウイルスH3N2に対する中和活性を有する。中和活性は、親の結合分子に比べて同一であるか、または高いか低いかのどちらかでもよい。これ以降、用語（ヒトの）結合分子が使用される場合、これはまた、（ヒトの）結合分子の機能的異形体を包含する。

20

30

40

【0084】

まださらなる見地において、本発明は、免疫複合体、即ち、ここに定義されるように、少なくとも一つの結合分子を含む分子が含まれ、そしてさらにとりわけ検出可能な構成成分/薬剤のような少なくとも一つのタグが含まれる。また、本発明で意図するのは、本発明に従う免疫複合体の混合物、または本発明に従う少なくとも一つの免疫複合体および治療上の薬剤または別の結合分子または免疫複合体のような別の分子の混合物である。さらなる具体化において、本発明の免疫複合体は、一つより多くのタグを含んでもよい。これらのタグは、互いに同一または別個であることができ、そして結合分子に非共有結合で接続（ジョイン）/接合（コンジュゲート）することができる。タグ（s）はまた、共有結合を通してヒトの結合分子に直接に接続/接合することができる。代わりにまた、タグ（s）

50

は一つまたはそれよりも多くのリンク化合物によって結合分子に接続/接合することができる。結合分子にタグを接合させるための技術は当業者によく知られている。

【0085】

本発明の免疫複合体のタグは、治療上の薬剤であることができるが、それらはまた、検出可能な構成部分/薬剤であることができる。治療上および/または予防に適切なタグは、食作用または免疫刺激を高める毒素またはその機能的部分、抗生物質、酵素、他の結合分子であることができる。検出可能な薬剤を含む免疫複合体は、例えば、特定の治療法の有効性を決定するために、臨床試験の手法の一部として、例えば、対象体がインフルエンザウイルスH3N2株に感染しているかどうかを評価し、またはインフルエンザウイルスH3N2の感染症の発症または進行を監視するために、診断的に用いることができる。しかし、それらはまた、他の検出および/または分析および/または診断の目的のために用いることができる。検出可能な構成部分/薬剤は、制限されないが、酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光材料、生物発光材料、放射性物質、陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出および/または分析および/または診断の目的のための結合分子を標識するために使用されるタグは、とりわけ（組織）の試料の免疫組織化学的染色、フローサイトメトリー検出、走査型レーザーサイトメトリー検出、蛍光イムノアッセイ、酵素免疫測定法（ELISA法）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、バイオアッセイ（例えば、食作用アッセイ）、ウエスタンブロッティングアプリケーション、などに用いる特異的な検出/分析/診断技術および/または方法に依存する。この技術において知られた検出/分析/診断技術および/または方法のために適したラベルは、熟練者の十分手の届く範囲内である。

10

20

【0086】

さらにまた、本発明のヒト結合分子または免疫複合体は固体支持体に付着することもでき、それは特にインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントの試験管内の免疫アッセイまたは精製に役立つ。そのような固体支持体は、多孔性または非多孔性、平坦または非平面であってよい。本発明の結合分子は、精製を容易にするペプチドのようなマーカ配列に融合することができる。例には、制限されないが、ヘキサヒスチジンタグ、血球凝集素（HA）タグ、mycタグまたはフラッグタグが含まれる。あるいはまた、抗体は、抗体のヘテロ接合体を形成するために、第2の抗体に接合することができる。別の見地では、本発明の結合分子は、一つまたはそれよりも多くの抗原に接合/付着することができる。好ましくは、これらの抗原は、結合分子-抗原接合体が投与される対象体の免疫系によって認識される抗原である。抗原は同一であってよいが、互いに異なることができる。抗原および結合分子を付着するための接合方法は、この技術でよく知られ、制限されないが、架橋剤の使用を含む。本発明の結合分子はインフルエンザウイルスH3N2と結合し、そして、結合分子に付着する抗原は接合体への強力なT細胞攻撃を始め、それは結局、インフルエンザウイルスH3N2の破壊を導く。

30

【0087】

免疫複合体を、直接または間接的に、たとえばリンカーを介して、接合することによる化学的に生産することは別にして、免疫複合体を、本発明の結合分子および適切なタグを含む融合タンパク質として生産することができる。融合タンパク質は、例えば、適切なタグをコード化するヌクレオチド配列を有するフレームにおいて結合分子をコード化するヌクレオチド配列を含む核酸分子を組換え的に構築し、そしてそれから核酸分子を発現させることによるような、この技術で知られている方法によって生産することができる。

40

【0088】

本発明に従う少なくとも結合分子、機能的な変形（変異体）または免疫複合体をコード化する核酸分子を提供することは、本発明の別見地である。目的のクローンをつくるための中間体として、例えば、先に述べたように親和性成熟のプロセスにおいて、そのような核酸分子を用いることができる。好ましい具体化において、核酸分子を単離するか、または精製する。

【0089】

熟練した者が、これらの核酸分子の機能的な変形が本発明の一部であることをも目的

50

とすることを認める。機能的な変形は、標準的な遺伝暗号を使用して直接翻訳することができる核酸配列であり、親の核酸分子から翻訳されるのと同じのアミノ酸配列を提供する。

【0090】

好ましくは、核酸分子は、先に述べたようにCDR領域を含む結合分子をコード化する。更なる具体化において、核酸分子は、2、3、4、5または本発明の結合分子のすべての6つのCDR領域さえを含む結合分子をコード化する。

【0091】

別の具体化において、核酸分子は、先に述べたように可変的な重鎖配列を含む重鎖が含まれる結合分子をコード化する。別の具体化において、核酸分子は、先に述べたような可変的な軽鎖配列を含む軽鎖が含まれる結合分子をコード化する。本発明の結合分子の重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、下記に与える。

【0092】

本発明の別の見地は、ベクター、すなわち核酸構築物で、本発明に従う一つまたはそれよりも多くの核酸分子を含むものを提供することである。ベクターは、とりわけ、F、R1、RP1、Col、pBR322、TOL、Ti、その他のようなプラスミド；コスミド；とりわけ、ラムダ、ラムダ形 (lambdoid)、M13、Mu (ムー)、P1、P22、Q、T-偶数系 (T-even)、T-奇数系 (T-odd)、T2、T4、T7、その他のようなファージ；植物ウイルスから導き出すことができる。ベクターは、クローニングのため、および/または本発明の結合分子の発現のために用いることができ、そして遺伝子治療目的のためにさえ用いることができである。動作可能に一つまたはそれよりも多くの発現調節核酸分子に連結された本発明によって一つまたはそれよりも多く（以下、「一つ以上」ともいう）の核酸分子を含むベクターはまた、本発明によって保護される。ベクターの選定は、続けられる組換え法、および用いる宿主に依存する。宿主細胞でのベクターの導入は、とりわけリン酸カルシウムトランスフェクション、ウイルス感染、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクタミントランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって生じさせることができる。ベクターは自律的に複製してよく、またはそれらが統合された染色体と共に複製することができる。好ましくは、ベクターは一つ以上の選択マーカを含む。マーカ-
の選定は、これがこの技術での熟練者にとってよく知られているように本発明にあまり重大ではないが、一般に好まれる宿主細胞に依存することがある。それらには、制限されないが、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK)、マウスからのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) が含まれる。先に述べたようなヒト結合分子をコード化している一つ以上の核酸分子を含むベクターは、タンパク質またはペプチドをコード化している一つ以上の核酸分子に動作可能に連結され、それはヒト結合分子を単離させるのに用いることができ、本発明によっても保護される。これらのタンパク質またはペプチドは、制限されないが、グルタチオン-S-転移酵素、マルトース結合タンパク質、金属結合性ポリヒスチジン、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼおよび β -ガラクトシダーゼを含む。

【0093】

上述のベクターの一つまたはそれよりも多くのコピーが含まれる宿主は、本発明の追加の対象体である。好ましくは、宿主は宿主細胞である。宿主細胞には、制限されないが、哺乳類、植物、昆虫、真菌または細菌起源の細胞が含まれる。細菌細胞には、制限されないが、グラム陽性菌または*E. coli* (大腸菌) のようなエシェリキア属、およびシュードモナスの数種のようなグラム陰性菌からの細胞が含まれる。真菌細胞のグループでは、好ましくは酵母細胞が用いられる。酵母における発現は、とりわけ、*Pichia pastoris* (ピキア・パストリス)、*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母、サッカロマイセス・セレビシエ) および *Hansenula polymorpha* (ハンゼヌラ・ポリモーファ) のような酵母菌株を用いることによって達成することができる。さらにまた、このような *Drosophila* (ショウジョウバエ属) および Sf9 からの細胞のような昆虫細胞を宿主細胞として用いることができる。そのほかに、宿主細胞は、とりわけ、森林植物のような作物植物 (作物) からの細胞

10

20

30

40

50

、または穀物用植物、または薬用植物のような食物および原材料を提供する植物からの細胞、または観賞植物からの細胞、または球根作物 (flower bulb crops) からの細胞などのような植物細胞であることができる。形質転換された (トランスジェニック) 植物または植物細胞は、既知の方法、例えば、アグロバクテリウム媒介遺伝子移入 (導入)、葉片の形質変換、ポリエチレングリコール誘発DNA移入、エレクトロポレーション、超音波、マイクロインジェクションまたは遺伝子銃 (bolistic) 遺伝子移入によるプロトプラスト形質転換によって生産される。さらに、適切な発現系はバキュロウイルスシステムを使用できる。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS細胞、BHK細胞、NSO細胞またはBovine (ボウズ) メラノーマ細胞などのような哺乳類細胞を用いた発現系は本発明で好ましい。哺乳類細胞は、哺乳類起源の自然分子に最も類似する翻訳後修飾を有する発現タンパク質を提供する。本発明は、ヒトに投与されなければならないかもしれない分子を扱うので、完全なヒト発現系は特に好ましいであろう。したがって、さらにより一層好ましくは、宿主細胞はヒト細胞である。ヒト細胞の例としては、とりわけ、HeLa (ヒーラ) 細胞、911、AT1080、A549、293およびHEK293T細胞である。好ましい具体化では、ヒトのプロデューサー細胞 (生成細胞) は、発現可能な形式でアデノウイルスE1領域をコード化する核酸配列の少なくとも機能的な部分を含む。さらにより一層好ましい具体化において、前記宿主細胞は、ヒトの網膜に由来し、911またはEuropean Collection of Cell Cultures (細胞培養のヨーロッパコレクション) (ECACC)、CAMR、Salisbury (ソールズベリー)、Wiltshire (ウィルトシャー州) SP4 OJG、英国 (グレートブリテン) に番号96022940の下で1996年2月29日付けで寄託し、そして商標PER.C6(R) [PER.C6はCrucell Holland B.V. (クルセル・ホランド社) の登録商標である。] の下で販売される細胞系のような細胞で、アデノウイルスE1配列を含む核酸で不死化される。この出願の目的のために「PER.C6細胞」は、番号96022940の下で寄託した細胞または祖先、上流または下流の継代物、ならびに寄託細胞の祖先からの子孫、前記のいずれかのものの派生体 (誘導体) に言及する。宿主細胞における組換えタンパク質の生産は、この技術で知られた方法に従って実行することができる。興味のあるタンパク質の生産構築基盤 (プラットフォーム) として商標PER.C6(R) の下で販売される細胞の使用はWO 00/63403に記載されており、それを参照することによりその開示の全体を本明細書に組み込む。

【0094】

結合分子は種々の手段によって調製することができる。本発明による結合分子の製造方法は、本発明の追加の一部である。方法は、a) 結合分子の発現に資する条件下で本発明に従う宿主を培養すること、およびb) 随意に、発現した結合分子を回収することのステップを含む。発現した結合分子は、無細胞抽出物から回収することができるが、好ましくは、それらは培養培地から回収される。生産の上記の方法はまた、本発明の結合分子および/または免疫複合体の機能的変異体を作るために用いることができる。結合分子などのようなタンパク質を、無細胞抽出液または培養培地から回収する方法は、この技術での熟練した者 (当業者) によく知られている。上記の方法によって得られるような、結合分子、機能的変異体および/または免疫複合体はまた、本発明の一部である。

【0095】

また、宿主細胞のような宿主における発現は別にして、本発明の結合分子および免疫複合体は、慣習的なペプチド合成によって、または本発明に従うDNA分子から導き出されるRNA核酸を用いた無細胞翻訳系において合成的に生産することができる。上述の合成的生産方法または無細胞翻訳系によって得られるような結合分子および免疫複合体はまた、本発明の一部である。

【0096】

さらに別の具体化において、本発明の結合分子はまた、トランスジェニック、非ヒト、とりわけ、ラビット (ウサギ)、ヤギまたはウシなどのような哺乳類において生産し、そして例としてそのミルク中に分泌させることができる。

【0097】

さらに別の代わりの具体化において、本発明による結合分子、好ましくは、ヒト結合分

子は、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに特異的に結合し、例としてヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスまたはウサギのようなトランスジェニック非ヒト哺乳動物によって生じさせることができる。好ましくは、トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、上述のヒト結合分子のすべてまたは一部分をコード化するヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントの精製または濃縮調製物で免疫することができる。非ヒト哺乳動物を免疫するためのプロトコルは、この技術においてよく確立されている。Using Antibodies (抗体の使用) : A Laboratory Manual (ラボラトリーマニュアル)、E. Harlow (E. ハーロウ)、D. Lane (D. レーン) による編集(1998)、Cold Spring Harbor Laboratory (コールドスプリングハーバーラボラトリー)、Cold Spring Harbor (コールドスプリングハーバー)、New York (ニューヨーク) およびCurrent Protocols in Immunology (免疫学でのカレントプロトコール)、J. E. Coligan (コリガン)、A. M. Kruisbeek (クリスピーク)、D. H. Margulies (マルグリース)、E. M. Shevach (シェバシェ)、W. Strober (ストロバー) (2001)、John Wiley & Sons Inc. (ジョンワイリー & サンズ社)、New Yorkを参照し、その開示を参照することによってここに組み込む。免疫プロトコルは、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバントなどのようなアジュバントを伴うか、または伴わずのどちらでも、複数の免疫化を含むことが多いが、また、裸のDNAの免疫化が含まれる場合がある。別の具体化では、ヒトの結合分子は、B細胞、プラズマおよび/またはトランスジェニック動物由来のメモリー細胞によって生産される。さらに別の具体化では、ヒトの結合分子は、ハイブリドーマによって生産され、それは、上述のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られたB細胞を不死化細胞へ融合することにより製造される。B細胞、形質細胞、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られるようなハイブリドーマ、および上記のトランスジェニック非ヒト哺乳動物、B細胞、プラズマおよび/またはメモリー細胞およびハイブリドーマから得られるようなヒトの結合分子はまた、本発明の一部である。

【0098】

さらなる見地において、本発明は、ヒトの結合分子、例えば、ヒトモノクローナル抗体またはそのフラグメントで、インフルエンザウイルスH3N2、またはそのような結合分子をコードする核酸分子に特異的に結合するような結合分子を識別する方法を提供し、それは以下のステップを含む。すなわち、(a)複製可能な遺伝的パッケージの表面上の結合分子のコレクションを、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントと、結合に資する条件下で接触させること、(b)インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合する複製可能な遺伝的パッケージのための少なくとも一つを選定すること、(c)インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合する複製可能な遺伝的パッケージを、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに結合していない複製可能な遺伝的パッケージから分けること、および回収すること。ここで用いるように、複製可能な遺伝的パッケージは、原核生物または真核生物であることができ、そしてそれには、細胞、孢子、酵母、細菌、ウイルス、(バクテリオ)ファージ、リボソームおよびポリソームが含まれる。好適な複製可能な遺伝的パッケージはファージである。例として、単鎖FVSのような結合分子は、複製可能な遺伝子パッケージ上で表示され、すなわち、それらは、複製可能な遺伝的パッケージの外面に位置付けられるグループまたは分子に付着される。複製可能な遺伝的パッケージは、スクリーニング(選別)される結合分子を含む選別可能なユニットであり、結合分子をコードする核酸分子にリンクされる。核酸分子は、生体内(例は、ベクターとして)または試験管内(例は、PCR、転写および翻訳による)のいずれかで複製可能な必要がある。生体内での複製は、宿主因子の支援(ウイルス用として)と共に、または双方の宿主およびヘルパーウイルス(ファージミド用として)の支援と共に、自律的であることができる(細胞のように)。結合分子のコレクションを表示する複製可能な遺伝的パッケージは、複製可能な遺伝的パッケージのゲノムに表示される外因性の結合分子をコードする核酸分子を、正常に複製可能な遺伝パッケージの外表面か

10

20

30

40

50

ら発現される内因性タンパク質と融合タンパク質を形成するために導入することによって形成される。融合タンパク質の発現、外表面への移行およびアSEMBリー（組立て）は、複製可能な遺伝的パッケージの外表面からの外因性の結合分子の表示を招く。

【0099】

本発明に従う方法での選定ステップ（群）は、生きた、そしてまだ感染または不活化されるインフルエンザH3N2ウイルスで実行することができる。インフルエンザウイルスH3N2の不活化は、とりわけ、ホルマリン、 β -プロピオラクトン（BPL）、メチロサル（merthiolate）、および/または紫外線での処置のような熟練者によく知られたウイルス不活化方法によって実行することができる。インフルエンザウイルスH3N2がまだ生きてい

10

るか、感染性および/または残存可能または部分的または完全に不活化されるかどうかの試験に

【0100】

具体化において、複製可能な遺伝的パッケージと接触したとき、インフルエンザウイルスH3N2は懸濁物中にある。あるいはまた、それらはまた、接触が行われる担体に対合することができる。具体化では、最初の、およびさらなる選定は一つのインフルエンザウイルスH3N2株に対して行うことができる。あるいはまた、最初およびさらなる選定のラウンドは異なるインフルエンザウイルスH3N2株に対して実行することができる。また、選定ステップ（群）は、例えば、細胞膜調製物、組換えH3N2のタンパク質またはポリペプチド、H3N2のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質、組換えH3N2のタンパク質またはポリペプチドを発現する細胞、などのような、インフルエンザウイルスH3N2のフラグメントの存在下で実行することができる。これらのタンパク質またはポリペプチドの細胞外に露出した部分は、選定の材料としても使用できる。インフルエンザウイルスH3N2のフラグメントは、使用前に適切な材料に固定化することができ、または懸濁物において用いることができる。具体化では、選定は、インフルエンザウイルスH3N2または異なるインフルエンザウイルスH3N2株のフラグメントの異なるフラグメント上で実行することができる。適切な選定の組合せを見出すことは当業者の手の届く範囲内である。選定は、ELISAまたはFACSによって実行することができる。

20

30

【0101】

まださらなる見地において、本発明は、インフルエンザウイルスH3N2株またはそのフラグメントに特異的に結合する結合分子またはそのような結合分子をコードする核酸分子を得る方法を提供し、この方法は、a) 結合分子を識別する上記方法を実行すること、およびb) 回収された複製可能な遺伝子パッケージから結合分子および/または結合分子をコードする核酸分子を分離することのステップを含む。複製可能な遺伝的パッケージの表面上の結合分子の収集は、scFvまたはFabの収集である。新しいscFvまたはFabが結合分子または結合分子をコードする核酸分子を識別する上述の方法で確立または識別されたら、scFvまたはFabをコードするDNAは、細菌またはファージから単離し、そして、scFv、二価のscFvは、Fabsまたは所望の特異性の完全なヒト免疫グロブリン（例は、IgG、IgAまたはIgM）をコードする構築物を作成するために、標準的な分子生物学的技術と組み合わせることができる。これらの構築物は、適切な細胞系中にトランスフェクトすることができ、そして完全なヒトモノクローナル抗体を最終的に生産することができる〔Huls（ヒュルス）ら、1999年；Boel（ボエル）ら、2000年を参照〕。

40

【0102】

前述のとおり、好適な複製可能な遺伝的パッケージはファージである。（ヒト）結合分子、例えば、（ヒト）モノクローナル抗体を識別および取得するためのファージディスプレイ法は、現在、当業者によって知られた十分確立された方法によるものである。それらは、例えば、米国特許第5696108号；Burton（パートン）およびBarbas（バルバス）、1994；de Kruijf（ド・クライフ）ら、1995b；およびPhage Display（ファージディスプレ

50

イ法) : A Laboratory Manual (ラボラトリー・マニュアル)。CF Barbas、DR Burton、J K Scott (スコット) およびGJ Silverman (シルバerman) によって編集 (2001)、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州で説明されている。すべてのこれらの参照は、ここにその全体が組み込まれる。ファージディスプレイライブラリーの構築のために、ヒトモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域遺伝子のコレクションは、バクテリオファージ、好ましくは、糸状バクテリオファージ、粒子、たとえば、単鎖Fv (scFv) において、またはFabの形式において、その表面上に発現する (ドクライフら、1995b参照)。抗体フラグメントを発現するファージのライブラリーは典型的に、 1.0×10^9 より高い抗体特異性を含み、そして免疫または非免疫化した個体のBリンパ球で発現される免疫グロブリンV-領域から組み立てることができる。本発明の特定の具体化では、結合分子のファージライブラリー、好ましくは、scFvファージライブラリーは、インフルエンザウイルスに対してワクチン接種され、最近、関係のない病原体に対してワクチン接種され、最近インフルエンザウイルスH3N2の感染に苦しむ対象体から、または健康な個体から得られた細胞から単離されたRNAから調製される。RNAは、とりわけ、骨髄または末梢血、好ましくは、末梢血リンパ球または単離したB細胞またはメモリーB細胞、CD24+/CD27+B細胞として識別されたような、B細胞の亜集団でもから単離することができる。対象体は、動物、好ましくはヒトであることができる。好ましい具体化では、ライブラリーは、IgMのメモリーB細胞、IgM+/CD24+/CD27+細胞として同定されたものによって発現された免疫グロブリンV領域の抗体から組み立てることができる。

10

20

【0103】

あるいはまた、ファージディスプレイライブラリーは、部分的に、ライブラリー内の追加の抗体の多様性 (半合成ライブラリー) を導入するために試験管内で組み立てられた免疫グロブリン可変領域から構成されてもよい。例えば、試験管内で組み立てられた可変領域は、抗体の特異性のために重要な分子のこれらの領域において、合成的に生産され、ランダム化または部分的にランダム化されたDNA、例は、CDR領域のストレッチが含まれる。インフルエンザウイルスH3N2のための特異的ファージ抗体は、ウイルスまたはそのフラグメントに特異的な抗体のフラグメントを発現するファージの結合を許容するためにファージライブラリーにそのウイルスまたはフラグメントを曝すことにより、ライブラリーから選定することができる。非結合ファージは、洗浄し、そして大腸菌の細菌とその後の伝播の感染に対する結合ファージの溶出によって除去される。選定および伝播の複数のラウンドは、通常、ウイルスまたはそのフラグメントに特異的に結合するファージを十分に濃縮する必要がある。必要に応じて、ウイルスまたはそのフラグメントにファージライブラリーを曝す前に、そのファージライブラリーは、異なる菌株、すなわち非H3N2インフルエンザウイルスのウイルスまたはフラグメントのような非標的物質にファージライブラリーを曝すことで最初に差し引くことができる。これらの減算器のウイルスまたはそのフラグメントは、固相に結合することができ、または懸濁物中にあることができる。ファージはまた、随意に他の物質を添加したH3N2タンパク質または (ポリ) ペプチドの複雑な混合物のような複合抗原に対する結合のために選定することができる。1つ以上のタンパク質またはインフルエンザウイルスH3N2の (ポリ) ペプチドを発現する宿主細胞はまた、選定の目的で用いる場合がある。これらの宿主細胞を用いたファージディスプレイ法は、選別の間、標的分子のない、または似ているが、同一ではない、標的以外の分子を含む宿主細胞の過剰量を添加することによって非関連のバインダーを減算することによって拡張し、および改善することができる、そしてそれによって関連する結合分子を見出すチャンスが強力に高められる。もちろん、減算は、ウイルスまたはそのフラグメントの選別前に、その間、またはその後に行ってもよい。プロセスは、MABSTRACT(R) プロセスと称される [MABSTRACT(R) はCrucell Holland B.V.の登録商標であり、また、米国特許第6265150号を参照し、参照することによりここに組み込まれる]。

30

40

【0104】

さらにまた別の見地において、本発明は、インフルエンザウイルスH3N2に対する中和活

50

性を潜在的に有する結合分子を得る方法を提供し、その方法は、(a) インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントと特異的に結合する結合分子または先に述べたようにそのような結合分子をコード化している核酸分子を得る方法を実行すること、および(b) 分離された結合分子がウイルスに対して、好ましくは、A/香港/1/68、A/ヨハネスバーグ/33/94、A/パナマ/2007/99、A/ウイスコンシン/67/2005およびA/広島/52/2005、好ましくは、H3N2のすべての株、特にすべての既知のものおよび将来のH3N2株からなる群から選ばれる少なくとも1つ以上のインフルエンザウイルスH3N2株に対して中和活性を有するかを確かめることのステップを含む。結合分子が中和活性を有するかを確かめるアッセイはこの技術でよく知られている(WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005 version 2002.5参照)。

10

【0105】

更なる見地では、本発明は、H3サブタイプのHAを含む少なくともインフルエンザウイルスA型に対して中和活性を有するヒト結合分子に関係し、上述したような方法の一つによって入手できる。

【0106】

まだ更なる見地では、本発明は、少なくとも結合分子、好ましくは、本発明に従うヒトモノクローナル抗体、少なくともその機能的な変異体、少なくとも本発明に従う免疫複合体および/またはその組合せを含む組成物を提供する。それに加え、組成物は、とりわけ、アルブミンまたはポリエチレングリコールまたは塩類のような安定化分子(stabilizing molecule)を含むことができる。好ましくは、用いられる塩類は、結合分子の望ましい生物活性を保持し、そして少しの望ましくない毒物的な影響も与えない塩類である。必要により、本発明のヒト結合分子は、結合分子を不活性化するかもしれない酸または他の自然または不自然な条件の作用から保護するために材料において、またはその上で被覆することができる。

20

【0107】

まだ更なる見地では、本発明において定められるように、本発明は少なくとも核酸分子を含む組成物を提供する。組成物は、塩類(例は、NaClまたは上述したような塩類)、洗浄剤(例は、SDS)および/または他の適切な成分を含む水溶液のような水溶液を含むことができる。

【0108】

さらにまた、本発明は、少なくとも本発明に従うヒトモノクローナル抗体のような結合分子(または機能的なフラグメントまたはその変形)、少なくとも本発明に従う免疫複合体、少なくとも本発明に従う組成物、またはその組合せが含まれる製薬上の組成物に関係する。本発明の製薬上の組成物は、少なくとも一つの薬剤的に許容可能な賦形剤を更に含む。薬剤的に許容可能な賦形剤は、熟練者にはよく知られている。本発明に従う製薬上の組成物はさらに、少なくとも一つの他の治療上の薬剤を含むことができる。適切な薬剤はまた熟練者によく知られている。

30

【0109】

好ましい具体化において、本発明に従う製薬上の組成物は、少なくとも一つの追加の結合分子を含み、即ち、製薬上の組成物は、結合分子のカクテルまたは混合物でありうる。製薬上の組成物は、本発明に従う少なくとも二つの結合分子を含むことができ、または本発明に従う少なくとも一つの結合分子および少なくとも一つの更なるインフルエンザウイルス結合および/または中和分子を含むことができる。別の具体化において、追加の結合分子は、同時に別々であるか、または連続した投与として調剤することができる。

40

【0110】

具体化において、製薬上の組成物は、H3N2のようなH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスA型に対して中和活性を有する二つまたはそれよりも多く(以下、「二つ以上」ということがある)の結合分子が含まれる。具体化において、組合せで用いるとき、結合分子は相乗的な中和活性を見せる。言い換えると、組成物は中和活性を有する少なくとも二つの結合分子を含むことができ、結合分子は、インフルエンザウイルスH3N2を中

50

和する際に相乗的に作用するという点で特徴付けられる。ここで用いるように、「相乗的」という語は、個々に使われるときのそれらの添加効果より、組合せで使われるときの結合分子の組合せ効果が大きいことを意味する。相乗的に作用する結合分子は、インフルエンザウイルスH3N2の同じか、または異なるフラグメントの上で、異なる構造と結合することができる。相乗作用を算出する方法は組合せインデックスによる。組合せインデックス(CI)の概念は、Chou(シュー)およびTalalay(テラレイ)(1984)によって記述された。組成物は、例えば、中和活性を有する一つの結合分子および一つの非中和H3N2特有結合分子を含むことができる。非中和および中和H3N2特有結合分子も、インフルエンザウイルスH3N2を中和する際、相乗的に作用することができる。

【0111】

具体化において、製薬上の組成物は、少なくとも二つのインフルエンザウイルス中和結合分子を含むことができ、そこでは、少なくとも一つの結合分子は系統学上のグループ1の一つ以上のインフルエンザウイルスサブタイプを中和可能であり、そして少なくとも一つの結合分子は系統学上のグループ2の一つ以上のインフルエンザウイルスサブタイプを中和可能である。

【0112】

具体化において、製薬上の組成物は、本発明に従う少なくとも一つの結合分子および少なくとも一つの更なるインフルエンザウイルス中和結合分子を含むことができる。

【0113】

別の具体化において、更なるインフルエンザウイルス中和結合分子は、好ましくは、異なるサブタイプのインフルエンザウイルス、好ましくは、H1N1のようなH1のHA、および/またはH5N1のようなH5サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに結合し、そしてそれを中和することができ、WO 2008/028946で明らかにされる結合分子のようなものである。より一層好ましくは、前記更なる結合分子は、H1、H2、H5、H9を含む系統学上のグループ1の(すべて)インフルエンザウイルスサブタイプに対する交差中和結合分子である。好ましい具体化において、更なる結合分子は、WO 2008/028946においてCR6261として識別される結合分子である。そして、配列番号186のアミノ酸配列のアミノ酸1-121を含む重鎖可変領域、またはその機能的な変異体、および/または配列番号188のアミノ酸1-112を含む軽鎖可変領域が含まれる。さらに別の具体化において、結合分子は、それぞれ、配列番号186および配列番号188のアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖が含まれる。製薬上の組成物中の結合分子は好ましくは、このように、異なるサブタイプのインフルエンザウイルスと反応することができる。結合分子は高い親和性でなければならず、そして広い特異性を有するべきである。好ましくは、双方の結合分子は交差中和分子であり、それはそれらの各々が異なるサブタイプのインフルエンザウイルスを中和する。そのほかに、好ましくは、それらはできるだけ多くの異なるインフルエンザウイルスサブタイプの各々の株を中和する。

【0114】

本発明に従う製薬上の組成物はさらに、少なくとも一つの他の治療上、予防上および/または診断上の薬剤を含むことができる。好ましくは、製薬上の組成物は、少なくとも一つの他の予防上および/または治療上の薬剤を含む。好ましくは、前記更なる治療上および/または予防上の薬剤は、インフルエンザウイルスH3N2の感染および/またはそのような感染に起因する状態の防止および/または処置が可能な薬剤である。治療上および/または予防上の薬剤としては、制限されないが、抗ウイルス剤が含まれる。このような薬剤は、結合分子、小分子、有機または無機化合物、酵素、ポリヌクレオチド配列、抗ウイルス性ペプチド、その他であることができる。現在インフルエンザウイルスH3N2に感染した受動体を処置するのに用いられる他の薬剤は、M2インヒビター〔例は、アマンタジン(amantidine)、リマンタジン〕および/またはノイラミニダーゼインヒビター(例は、ザナミビル、オセルタミビル)である。これらは、本発明の結合分子と組み合わせて使用することができる。「組合せで」は、ここでは、同時に、別々の調剤物として、または一つの複合調剤物として、または別の調剤物として、任意の順序での逐次投与レジメンによることを

10

20

30

40

50

意味する。インフルエンザウイルスH3N2で感染および/または実験段階にあるような感染症に起因する状態を防止および/または処置することができる薬剤は、本発明において有用な他の治療上および/または予防上の薬剤としても用いることができる。

【0115】

本発明の結合分子または製薬上の組成物は、ヒトに用いる前に適切な動物モデル系で試験することができる。このような動物モデル系としては、制限されないが、マウス、フェレットおよびサルが含まれる。

【0116】

典型的に、製薬上の組成物は、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。本発明の結合分子、免疫複合体、核酸分子または組成物は、適切な薬剤的に許容可能な賦形剤において再構成するために、配送の前またはその時に粉体の形態でありうる。滅菌注入溶液の調製のための滅菌粉体の場合、調製の好ましい方法は、活性原材料の粉体に、その前に濾過滅菌した溶液から任意の追加の所望の成分を加えて得る真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

10

【0117】

あるいはまた、本発明の結合分子、免疫複合体、核酸分子または組成物は、溶液にすることができ、適切な薬剤的に許容可能な賦形剤は、ユニット投薬量注入可能形態を提供するために、配送前またはその時に追加および/または混合することができる。好ましくは、本発明で用いられる薬剤的に許容可能な賦形剤は、高い薬物濃度に適しており、適した流動性を維持することができ、および必要により、吸収を遅らせることができる。

20

【0118】

製薬上の組成物の投与の最適経路の選択は、組成内で活性分子の物理化学的特性、臨床状況の緊急性および所望の治療効果に対する活性分子の血しょう中濃度の関係を含むいくつかの要因によって影響される。例として、必要に応じ、本発明の結合分子は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化配送システムを含む放出制御調剤物のようなそれらを急速な放出に対して保護する担体と共に調製することができる。生分解性、生体適合性ポリマーは、とりわけ、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のように用いることができる。さらに、結合分子をコートする必要があるかもしれず、または結合分子を、ヒトの結合分子の不活性化を妨げる物質または化合物と共同管理（同時投与）することができる。例えば、結合分子は例えば、リポソームまたは希釈剤のために、適切な担体において対象体に投与することができる。

30

【0119】

投与経路は、主として2つのカテゴリ、経口および非経口投与に分けられる。好ましい投与経路は静脈内投与または吸入によってである。

【0120】

経口の剤形は、とりわけ、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性または油性の懸濁物、分散性粉体または顆粒、エマルジョン（乳濁液）、硬カプセル、軟ゼラチンカプセル、シロップまたはエリキシル剤、丸剤、ドラジェ（糖衣錠）、液体、ゲル、またはスラリーとして調剤できる。これらの調剤物は、薬剤的に、制限されないが、不活性希釈剤、造粒剤及び崩壊剤、結合剤、潤滑剤、保存剤、着色料、香料または甘味剤、植物油または鉱物油、湿潤剤、および増粘剤を含む賦形剤が含まれうる。

40

【0121】

本発明の製薬上の組成物はまた、非経口投与用に調剤することができる。非経口投与用の調剤物は、とりわけ、水性または非水性の等張性無菌非毒性の注射または注入溶液または懸濁物の形態であることができる。溶液または懸濁物は、例えば、1,3-ブタンジオール、リンゲル溶液、ハンクス溶液、等張塩化ナトリウム溶液、油、脂肪酸、局所麻酔剤、保存剤、緩衝剤、粘度または溶解度増加剤、水溶性酸化防止剤、油溶性酸化防止剤および金属キレート剤のようなものを採用する投薬量および濃度でレシピエントに非毒性である薬剤を含むことができる。

50

【0122】

さらなる見地では、ヒトモノクローナル抗体のような結合分子（その機能的フラグメントおよび変異体）、免疫複合体、組成物、または本発明の製薬上の組成物は、薬として用いることができる。そのように、本発明の結合分子、免疫複合体、組成物、または製薬上の組成物を用いるインフルエンザウイルスH3N2の感染の診断、処置および/または防止の方法は、本発明の別の部分である。上述の分子は、とりわけ、インフルエンザウイルスH3N2の感染の、診断、それからの予防、処置、またはそれらの組合せに用いることができる。それらは、インフルエンザウイルスH3N2感染を患うまだ未処置の受動体、およびインフルエンザウイルスH3N2の感染のための処置を受けたか、または受けている受動体の処置に適している。

10

【0123】

上述の分子または組成物は、診断、予防および/または治療に有用な他の分子と併せて用いることができる。それらは試験管内、エキソピボ（生体外）または生体内で用いることができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体（またはその機能的変異体）のような本発明の結合分子は、免疫複合体、組成物または製薬上の組成物は、インフルエンザウイルスH3N2のワクチン（可能な場合）と同時に投与することができる。あるいはまた、ワクチンはまた、本発明の分子の投与の前または後に投与することができる。ワクチンの代わりに、抗ウイルス剤も本発明の結合分子と組み合わせて使用することができる。適切な抗ウイルス剤は上述される。

20

【0124】

分子は典型的に、治療上または診断上有効な量で本発明の組成物および製薬上の組成物で調剤される。また、それらは調剤し、そして別々に投与することができる。例として、抗ウイルス剤のような他の分子は全身的に適用することができるが、一方で、本発明の結合分子は静脈内適用することができる。

【0125】

処置は、H3N2の感染に感受性がある受動体グループをターゲットとする（標的化）することができる。このような受動体グループは、例えば、制限されないが、高齢者が（例は、50歳、60歳、そして好ましくは65歳）、若年（例は、5歳、1歳）、入院受動体および抗ウイルス化合物で処理されているが、不十分な抗ウイルス応答を示している受動体が含まれる。

30

【0126】

投薬レジメンは、最適な所望の応答（例は、治療反応）を提供するために調整することができる。適切な投薬量範囲は、例えば、0.1~100mg/kg体重、好ましくは1~50mg/kg体重、好ましくは0.5~15mg/kg体重でありうる。さらに、例えば、単回ボラスを投与することができ、数回に分けた用量が時間をかけて投与されてもよく、または用量を治療状況の緊急性によって示されるのに比例させて減少または増加させることができる。本発明の分子および組成物は、好ましくは無菌である。これらの分子および組成物を無菌にする方法はこの技術においてよく知られている。本発明の結合分子のために提案されたように、診断、予防および/または治療に有用な他の分子は、同様の投薬レジメンで投与することができる。他の分子を別々に投与する場合、事前に受動体に投与することができ（例は、2分、5分、10分、15分、30分、45分、60分、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、2日、3日、4日、5日、7日間、2週間、4週間または6週間前）、併用により、またはそれ以降に（例えば、2分、5分、10分、15分、30分、45分、60分、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、2日、3日、4日、5日、7日間、2週間、4週間または6週間後）、一つまたはそれよりも多くの本発明のヒト結合分子または製薬上の組成物の投与である。正確な投与レジメンは、通常、ヒト患者での臨床試験中にソートされる。

40

【0127】

ヒト結合分子およびヒト結合分子を含む製薬上の組成物は、特に有用であり、そしてし

50

ばしば、生体内での治療剤のように人間に投与する際に好ましくことが多く、それは、投与抗体に対するレシピエントの免疫反応がモノクローナルのネズミ、キメラまたはヒト化結合分子の投与によって引き起こされるものよりも大幅に少なくなることが多いからである。

【0128】

別の見地において、本発明は、本発明に従う中和ヒトモノクローナル抗体（その機能的フラグメントおよび変異体）のような結合分子、免疫複合体、核酸分子、組成物または製薬上の組成物の、インフルエンザウイルスH3N2の感染の診断、予防、治療、またはその組み合わせのための薬の調製における使用に関する。

【0129】

それを別にして、少なくとも中和ヒトモノクローナル抗体（その機能的フラグメントおよび変異体）のような本発明に従う結合分子、少なくとも免疫複合体、少なくとも核酸分子、少なくとも組成物、少なくとも製薬上の組成物、少なくともベクター、少なくとも宿主またはその組合せを含むキットもまた本発明の一部である。随意に、本発明のキットの上述の成分は適切な容器に詰められ、指示された条件の診断、予防および/または治療のためにラベルが付けられる。上記成分は、水性、好ましくは滅菌、溶液として、または再構成するための凍結乾燥、好ましくは滅菌、調剤物としてユニット、または複数用量の容器において貯蔵されうる。容器は、ガラスやプラスチックのような様々な材料から形成されてもよいし、そして無菌の点検口（アクセスポート）を有することができる（たとえば、容器は静脈内溶液バッグまたは皮下注射針で貫通可能なストッパーを有するバイアルであることができる）。キットはさらに、薬剤的に許容可能な緩衝剤を含むより一層多くの容器を含むことができる。さらに、その他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、ニードル（針）、注射筒、適切な宿主の一つまたはそれよりも多くのための培養培地および、場合によっては、さらに少なくとも一つの他の治療上、予防上または診断上の薬剤が含まれ、商業上およびユーザーの観点から望ましい他の材料を含んでもよい。キットに関連して、通例、治療薬、予防薬または診断薬の商用包装に指示書が含まれ、それには、例えば、このような治療、予防薬または診断薬の使用に関する適応症、用法、投薬量、製造、管理、禁忌および/または警告についての情報が含まれる。

【0130】

本発明に従う結合分子はまた、有利には、系統学上のグループ2サブタイプのインフルエンザウイルスの検出のための試験管内の方法での診断薬剤として用いることができる。したがって、本発明はさらに、試料中でインフルエンザウイルスの系統学上のグループ2サブタイプのインフルエンザウイルスを検出する方法に関し、そこでは、方法は次のステップを含む。すなわち、（a）試料を、本発明に従う結合分子（機能的フラグメントとその変異体）または免疫複合体の診断上の有効量と接触させること、および（b）結合分子または免疫複合体が、試料の分子に特異的に結合するかどうかを定めることである。試料（サンプル）は、生物学的試料であってよく、それには、制限されないが、血液、血清、便、痰、鼻咽頭（nasopharyngeal、nasopharyngeal）吸引液、気管支肺胞洗浄液（bronchial lavages）、尿、（潜在的に）感染した対象体からの組織または他の生物学的物質、または水、飲料などの非生物学的試料が含まれる。（潜在的に）感染した対象体は、ヒト対象体であることができるが、またインフルエンザウイルスの系統学上のグループ2サブタイプのインフルエンザウイルスのキャリアとして疑われる動物は、本発明のヒトの結合分子または免疫複合体を使用してウイルスの存在について試験することができる。試料は最初に、検出の方法にそれがより一層適するように操作され得る。操作はとりわけ、ウイルスを含むか、および/または含むことが疑われる試料を、ウイルスがタンパク質、（ポリ）ペプチドまたは他の抗原性フラグメントのような抗原成分に分解されるような方法で処理することを意味する。好ましくは、本発明のヒト結合分子または免疫複合体は、ヒトの結合分子と試料中に存在する可能性のあるそのウイルスまたはその抗原成分との間の免疫複合物（immunological complex）の形成を可能にする条件下で、試料と接触させる。試料中のウイルスの存在を示す免疫複合物の形成が、もしあれば、その後の適切な手段によ

10

20

30

40

50

って検出され、そして測定される。このような方法は、とりわけ、ラジオイムノアッセイ (RIA)、ELISA、免疫蛍光、免疫組織化学、FACS、BIACOREおよびウェスタンブロット分析のような同種および異種結合イムノアッセイを含む。

【0131】

好ましいアッセイ技術は、特に患者の血清および血液および血液由来の生成物の大規模臨床選別のためには、ELISAおよびウェスタンブロット法である。ELISA検査が特に好ましい。これらのアッセイにおいて試薬として用いるため、本発明の結合分子または免疫複合体は、好都合なことにマイクロタイターウェルの内側表面に結合される。本発明の結合分子または免疫複合体は、直接マイクロタイターウェルに結合されてもよい。しかし、ウェルへの本発明の結合分子または免疫複合体の最大結合は、本発明の結合分子または免疫複合体を添加する前にポリリジンでウェルを前処理することによって達成させることができる。さらに、本発明の結合分子または免疫複合体は共有結合でウェルに既知の手段によって接着させることができる。概して、結合分子または免疫複合体は、被覆のために0.01から100 $\mu\text{g/ml}$ の間で使用されるが、より一層高いだけでなく、より一層少ない量を用いることもできる。次いで、試料は本発明の結合分子または免疫複合体で被覆されたウェルに添加される。

10

【0132】

さらに、本発明の結合分子はインフルエンザウイルスH3N2の特異的結合構造を識別するために用いることができる。結合構造はタンパク質および/またはポリペプチド上のエピトープでありうる。それらは線形であってよいが、構造的および/または立体構造でありうる。一つの具体化では、結合構造はPEPSCAN分析の手段〔特にWO 84/03564、WO 93/09872、Slootstra (スלוーツストラ)ら、1996年参照〕によって分析することができる。また、インフルエンザウイルスH3N2のタンパク質からのペプチドを含むランダムペプチドライブラリーは、本発明の結合分子に結合可能なペプチドをスクリーニングすることができる。見出された結合構造/ペプチド/エピトープはワクチンとして、インフルエンザウイルスH3N2の感染の診断のために使用できる。フラグメントの場合では、タンパク質および/またはポリペプチド以外が結合分子によって結合されるが、結合構造は、質量分析、高速液体クロマトグラフィーおよび核磁気共鳴によって識別することができる。

20

【0133】

更なる見地では、本発明は、インフルエンザウイルスH3N2の同じエピトープへの特異的結合のための結合分子(または、その機能的なフラグメントまたは変異体)を、本発明のヒト結合分子によって結合するエピトープとして選別する方法を提供し、そこでは、その方法は次のステップを含む。すなわち、(a) 選別される結合分子を、本発明の結合分子およびインフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに接触させること、(b) 選別する結合分子が、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントに対する特異的な結合について本発明の結合分子と競合可能であるかどうかを測定することである。更なるステップでは、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントへの特異的結合について競合可能な選別された結合分子が中和活性を有するかどうかを定めることができる。インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントへの特異的結合について本発明の結合分子と競合可能である結合分子は、本発明の別の部分である。また、上記のスクリーニング法において、「同じエピトープへの特異的結合」は、本発明の結合分子によって結合されるエピトープと実質的または本質的に同じエピトープへの特異的結合と考えられる。阻止、または競合する容量、インフルエンザウイルスH3N2への本発明の結合分子の結合は典型的に、選別されるべき結合分子が構造的に本発明の結合分子によって免疫特異的に (immunospecifically) 認識されるインフルエンザウイルスH3N2上の結合部位と構造的に重複するインフルエンザウイルスH3N2上のエピトープまたは結合部位に結合することを示す。あるいはまた、これは、選別されるべき結合分子が本発明の結合分子によって免疫特異的に認識された結合部位に十分に近位にあるエピトープまたは結合部位に、本発明の結合分子のインフルエンザウイルスH3N2に対する結合を立体的にか、またはそうでないことで抑制するために結合することを示すことができる。

30

40

50

【0134】

概して、競合的抑制はアッセイにより測定され、そこでは、抗原組成、即ち、インフルエンザウイルスH3N2またはそのフラグメントを含む組成は、参照結合分子、即ち、本発明の結合分子、および選別される結合分子と混合される。通常、選別される結合分子が過剰に存在する。ELISAsおよびウェスタンブロット法に基づくプロトコルは、このような単純な競合試験での使用に適する。一つだけ結合した参照結合分子を検出できるようになる種またはアイソタイプ二次抗体を用いることで、その結合は、実質同一のエピトープを認識する選別される結合分子の存在によって減少する。参照結合分子および選別される任意の結合分子（種またはアイソタイプに関係なく）の間の結合分子の競合研究を行うには、まず、例えば、ビオチン、酵素的、放射性またはその他のラベルのような検出可能なラベルで参照結合分子にラベルを付けることができ、その後の識別を可能にする。これらの競合アッセイ（「競合的結合分子」または「交差反応結合分子」）で識別される結合分子は、制限されないが、参照結合分子、即ち、本発明の結合分子により結合するエピトープまたは結合部位に結合する抗体、抗体フラグメントおよび他の結合薬剤、ならびに選別される結合分子および参照結合分子の間で競合結合が発生するように参照結合分子により結合するエピトープに対し十分に近位のエピトープまたは結合部位に結合する抗体、抗体フラグメントおよび他の結合薬剤を含む。好ましくは、本発明の競合的結合分子は、過剰に存在するとき、少なくとも10%で、好ましくは少なくとも25%で、より好ましくは少なくとも50%で、および最も好ましくは少なくとも75%-90%で、またはそれよりも多くで、選定した標的種への参照結合分子の特異的結合を抑制する。本発明の結合分子とおよそ、実質的に、本質的に、または同じエピトープに結合する一つ以上の競合的結合分子の識別は、ある簡単な技術的な問題である。競合結合分子の識別が参照結合分子、即ち、本発明の結合分子と比較して決定されるとき、実際に参照結合分子および競合結合分子が結合するエピトープを定めることが、参照結合分子と同一または実質同一のエピトープに結合する競合結合分子を識別するために、少しも必要ではないことは理解されるであろう。本発明はさらに、以下の例および図面に示されている。例はいかなる意味においても本発明の範囲を制限するものではない。

10

20

【実施例】

【0135】

例1 メモリーB細胞から抽出したRNAを用いるscFvファージディスプレイライブラリーの構築

30

【0136】

末梢血をEDTA抗凝固サンプルチューブに静脈穿刺（venapuncture、venipuncture）によって通常健康なドナーから収集した。WO 2008/028946に記載されているようにscFvファージディスプレイライブラリーを得、これを参照することにより、ここに組み込む。メモリーB細胞（CD24+/CD27+）を、ナイーブB細胞（CD24+/CD27-）およびメモリーT細胞（CD24-/CD27+）から分離し、そして次のステップでIgMのメモリーB細胞（IgM抗体+）を、スイッチメモリーB細胞（IgM抗体-）からIgM抗体の発現を使って分離した。RNAをIgMメモリーB細胞および調製されたcDNAから単離した。

40

【0137】

二つのラウンドのPCR増幅のアプローチは、それぞれのドナーのレパートリーから免疫グロブリンVHおよびVL領域を分離するために表1および2に示すプライマーセットを使用して適用した。

【0138】

表1に記載されているプライマーセットを用いるそれぞれのcDNA上での最初のラウンドの増幅は、それぞれVH、VカッパおよびVラムダ領域の約650塩基対の7、6、9生成物が得られた。IgMのメモリーB細胞VH領域の増幅のために、OCM定数プライマーを、OH1へOH7と組み合わせ使用した。最初のラウンドの増幅用のサーマルサイクリングプログラムは次のようであった：2分96（変性ステップ）、30サイクル30秒96 / 30秒55 / 60秒72、10分72の最終伸長、および4の冷凍。製品は、オンロードと1%アガロースゲルから単離

50

したゲル抽出カラム〔Qiagen (キアゲン)〕を用いて、50 μ lの1mMトリス-HClのpH8.0に溶出した。最初のラウンドの生成物(5 μ L)の10%を表2に記載のプライマーを用いて第二ラウンドの増幅に供した。これらのプライマーは、それぞれVLおよびVH領域の定方向クローニング(directional cloning)をファージディスプレイベクターPDV-C06中に可能にする制限部位を拡張した。第二ラウンドの増幅のためのPCRプログラムは以下の通りであった。すなわち、2分96 (変性ステップ)、30サイクル30秒96 /30秒60 /60秒72、10分72の最終伸長および4の冷蔵である。第二ラウンドの生成物(約350塩基対)を、免疫グロブリン遺伝子産物に見られるJセグメントの自然発生に応じて最初にプールし、それぞれそのVH、VカッパおよびVラムダの変領域のための7、6および9のプールをもたらした(表3および4を参照)。免疫ライブラリ内の免疫グロブリン配列の正規分布を得るために、6Vカッパおよび9Vラムダ軽鎖のプールを、表3に記載する割合に応じて混合した。この単一の最後VLプール(3 μ g)を、SalIおよびNotI制限酵素で一晩消化し、キアゲンのゲル抽出カラムを用いる1.5%アガロースゲル(~350塩基対)上に負荷して、それから分離し、そしてSalI-NotI切断PDV-C06ベクター(~5000塩基対)を次のように連結した。すなわち、10 μ lのPDV-C06ベクター(50ng/ μ l)、7 μ lのVL挿入(10ng/ μ l)、5 μ lの10 \times 連結緩衝液(NEB)、2.5 T4 DNAリガーゼ(400U/ μ L)(NEB)、25.5 μ lの超純水(ベクター対挿入比は1:2であった)。連結は16の水浴中で一晩実行した。次に、用量を、水で倍にし、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(75:24:1)〔インビトロゲン社(Invitrogen)〕製の等量で抽出し、次いでクロロホルム〔Merck(メルク社)〕の抽出を続け、そして1 μ lのPellet Paint(ペレットペイント)〔ノボゲン(Novogen)社〕、10 μ l酢酸ナトリウム(3M pH5.0)および100 μ lのイソプロパノールで-20 $^{\circ}$ Cで2時間沈殿させた。得られた試料はその後、4で30分間20,000 \times gで遠心分離した。得られた沈殿を70%エタノールで洗浄し、そして室温で20,000 \times gで10分間遠心分離した。エタノールを真空吸引によって除去し、そしてペレットを数分間空気乾燥し、その後、10 mMトリス-HCl、pH8.0を含む50 μ lの緩衝液に溶解した。1 μ lの連結混合物を1.7 kVで設定したGenepulser(ジーンパルサー)II装置〔Biorad(バイオラッド社)〕、200オーム、25 μ Fを使用して冷却した0.1cmエレクトロポレーションキュベット〔バイオラッド社(Bio Rad)〕において40 μ lのTG-1エレクトロコンピテント細胞〔ストラタジーン社(Stratagene)〕の形質転換に使用した(時定数~4.5ミリ秒)。直接的にパルスの後、細菌は5%(w/v)のグルコース〔シグマ社(Sigma)〕を含む37の1000 μ lのSOC培地(Invitrogen)でキュベットから流し(フラッシュし)、15mlの丸底培養チューブに移した。別の500 μ lのSOC/グルコースを、キュベットから残留細菌を洗い流すために使用し、そして培養チューブに追加した。細菌を37で正確に1時間、220rpmでのシェーカーインキュベーターにおいて培養することにより回収した。形質転換細菌を200ml 2TY寒天(16g/lのバクトトリプトン、10g/lのバクト酵母エキス、5g/lの塩化ナトリウム、15g/lの寒天、pH 7.0)の50 μ g/mlのアンピシリンおよび5%(w/v)のグルコース(Sigma)を補充したものを含む大規模な240ミリメートルの正方形のペトリ皿(petridishes)(NUNC)上に平板培養(プレート)した。1から1000まで希釈を、

計数目的のため、同じ培地を含む15cmのペトリ皿上にプレートした。この変換手順を、20回連続して繰り返して、完全なライブラリを合計で30の大きな正方形のペトリ皿にわたって播種し、37の培養ストープで一晩増殖させた。典型的に、およそ 1×10^7 のcfuが、上記のプロトコルを使用して得られた。中間VL軽鎖ライブラリを、穏やかに細菌をこすることによってプレートからプレート当たり10ml 2TY培地に回収した。細胞塊は、OD600の測定により決定され、細菌の2倍の500 ODを、メーカーの指示に従って2つのP500 maxiprep(マキシプレブ)カラム(Qiagen)を用い、マキシプラスミドDNAの調製のために用いた。

【0139】

VL可変領域に類似して、第二ラウンドVH-JH生成物を通常のJセグメント使用配布(表4参照)を得るために最初に混ぜ合わせ、そして、PH1からPH7と呼ばれる7VHサブプールをもたらした。プールは表4で表されるパーセンテージを使って、正常化された配列分布を

得るために、混ぜられ、SfiIおよびXhoI制限酵素で消化され、そして上記のように得られるSfiI-XhoI切断PDV-VL中間ライブラリーに連結された一つのVH画分が得られた。連結セットアップ、精製方法、TG1のその後の形質転換および細菌の収穫は、VL中間ライブラリー（上記参照）のために正確に上記のようであった。最終的なライブラリー（ほぼ 5×10^6 cfu）は、挿入されたVH-VL領域の側面に位置してセットされるプライマーを使うコロニーPCRで、挿入頻度についてチェックした。コロニーの95%より多くは、正しい長さの挿入物を示した（表5参照）。コロニーPCR生成物は、配列変動をチェックし、そして完全なORFを示すコロニーの割合を評価するために、以降のDNA配列分析用に用いた。これは典型的に、70%を越えた（表5参照）。V遺伝子での突然変異の頻度も分析した。50の配列から、47（94%）は成熟プロセスを示す生殖細胞系構成でなく、そしてライブラリーのためのRNA供給源として使われるB細胞のメモリー表現型と一致していた。最後に、ライブラリーをレスキューし、そしてCTヘルパーファージ（WO 02/103012参照）を用いて増幅して、下記のようにパニング法によって、ファージ抗体選定のために使った。

例2

インフルエンザA型サブタイプH3およびH7ならびにインフルエンザB型に対する単鎖Fvフラグメントを運ぶファージの選定

【0140】

抗体フラグメントは、上述したように本質的に構築された抗体ファージディスプレイライブラリーおよび一般的なファージディスプレイ技術、本質的に米国特許第6265150号およびWO 98/15833（その双方を参照することによりここに組み込む）で説明したようなMAB STRACT（R）テクノロジーを使用して選定した。また、WO 02/103012（それを参照することによりここに組み込む）に記載される方法およびヘルパーファージを、本発明で使用した。

【0141】

選定は、インフルエンザA型サブタイプH3（A/ウィスコンシン/67/2005）とH7（A/オランダ/219/2003）またはインフルエンザB型（B/オハイオ/01/2005）の組換え赤血球凝集素（HA）に対して実行した。HA抗原はPBSで希釈し（ $5.0 \mu\text{g/ml}$ ）、MaxiSorp™〔マキシソープ（商品名）〕Nunc-Immuno Tubes（ヌンク-イムノチューブ）（Nunc、ヌンク社）に添加し、ローテーター（rotating wheel）上で、4℃で一晩インキュベートした。イムノチューブを空にし、ブロックバッファ〔PBS中2%脱脂粉乳（ELK）〕で3回洗浄した。その後、イムノチューブはブロックバッファで完全に満たし、室温で1-2時間インキュベートした。ファージディスプレイライブラリーのアリコート〔 $500 \sim 1000 \mu\text{L}$ 、 $0.5 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{13}$ cfu、CTヘルパーファージを使用して増幅された（WO 02/103012を参照）〕を10%、非加熱不活性化ウシ胎仔血清および2%のマウス血清を補充したブロッキングバッファにおいて室温で1~2時間ブロックした。ブロックされたファージライブラリーを、イムノチューブに加え、室温で2時間インキュベートし、そして未結合のファージを除去するために洗浄バッファ〔PBS中の0.05%（v/v）のTween（ツイーン）-20〕で洗浄した。結合したファージを室温で10分間の100mMトリエチルアミン（TEA）の1mlとのインキュベーションにより、それぞれの抗原から溶出した。その後、溶出したファージは、pHを中和するために1Mトリス-塩酸pH7.5の0.5mlと混合した。この混合物を約0.3のOD 600nmまで37℃で増殖させたXL1-ブルー大腸菌培養液5 mlに感染させるために用いた。ファージは、37℃で30分間XL1-ブルー細菌を感染させた。その後、混合物を室温3000 x gで10分間遠心分離し、そして細菌ペレットを0.5mlの2-トリプトン酵母エキス（2TY）培地中に再懸濁した。得られた細菌懸濁液を、テトラサイクリン、アンピシリンおよびグルコースを添加した二つの2TY寒天プレート上に分割した。37℃でプレートを一晩中インキュベートした後、コロニーを、基本的にDe Kruif（ド・クライフ）ら（1995a）およびWO 02/103012によって記述されるように、プレートから掻き取り、そして濃縮ファージライブラリーを作製するために使用した。簡単に言えば、掻き取った細菌を、アンピシリン、テトラサイクリンおよびグルコースを含む2TY培地に接種するために使用し、~0.3のOD 600nmまで37℃の温度で増殖させた。CTヘルパーファージを添加し、そして培地を、アンピシリ

10

20

30

40

50

ン、テトラサイクリンおよびカナマイシンを含む2TYに変更された後に細菌を感染させた。インキュベーションは30 で一晩中継続した。翌日、細菌は、培地中のファージを、ポリエチレングリコール (PEG) 6000/NaClを用いて沈殿した後、遠心分離により2TY培地から除去した。最後に、ファージは、1%ウシ血清アルブミン (BSA) を伴う2mlのPBSに溶解し、フィルター滅菌し、そして選定の次のラウンドのために使用した。選定の第二ラウンドは、同じHAサブタイプまたは異なるサブタイプのHAのいずれかで実行する。

【0142】

選定の連続する2ラウンドは、個々の単鎖ファージ抗体の単離の前に行われた。選定の第2ラウンドの後、個々の大腸菌のコロニーはモノクローナルファージ抗体を調製するために用いられた。基本的に、個々のコロニーを96ウェルプレート形式で、対数期まで増殖させ、ファージ抗体産生を一晩中進行させた後にVCS-M13ヘルパーファージを感染させた。ファージ抗体を含む上清を、HAの抗原への結合のためにELISAに直接使用させた。また、ファージ抗体は、PEG/NaCl沈殿させ、ELISA、フローサイトメトリー解析の双方のために濾過滅菌した。

例3

HA特異的単鎖ファージ抗体の検証

【0143】

上記スクリーニングで得られた一本鎖ファージの抗体を含む選定した上清を、特異性、すなわち、異なるHAの抗原に対する結合についてELISAで検証した。この目的のために、組換えH3 (A/ウィスコンシン/67/2005)、H7 (A/オランダ/219/2003) およびB (B/オハイオ/01/2005) HAのもの〔Protein Sciences (タンパク質科学)、CT、米国〕を発現するバキュロウイルスを、Maxisorp™ ELISAプレートにコーティングした。コーティングした後、プレートを、0.1%v/vのTween-20を含有するPBSで3回洗浄し、室温で1時間、3%BSAまたは2%ELKを含むPBSでブロックした。選定された一本鎖ファージの抗体は、ブロックされたファージの抗体を得るために、4%ELKを含むPBSの等量で1時間インキュベートした。プレートを空にし、PBS/0.1%Tween-20で3回洗浄し、ブロックされた一本鎖ファージ抗体をウェルに添加した。インキュベーションを1時間進行させ、プレートをPBS/0.1%のTween-20で洗浄し、および結合したファージ抗体を、ペルオキシダーゼに接合した抗M13抗体を用いて検出した (OD 492nmの測定を使用)。コントロールとして、手順は一本鎖ファージ抗体なしと、関係のない陰性コントロールの単鎖ファージ抗体とで同時に実行した。IgMのメモリーB細胞のライブラリーで異なるHAの抗原での選定から、組換えH3のHAおよびH7のHAの双方に特異的な6つの独特な単鎖ファージの抗体が得られた (SC08-001、SC08-003、SC08-006、SC08-014、SC08-017およびSC08-018)。加えて、組換えH3のHA (SC08-015 およびSC08-016) に特異的な2つの独特な単鎖ファージ抗体および組換えH7のHA (SC08-007、SC08-009、SC08-010、SC08-011およびSC08-013) のための5つを単離した。表6を参照。

【0144】

また、PEG/NaCl沈殿し、およびろ過滅菌したファージ抗体を、ELISA結合および特異性を検証するために使用した。この目的のために、組換えインフルエンザH1 (A/ニュー・カレドニア/20/1999)、H3 (A/ウィスコンシン/67/2005)、H5 (A/ベトナム/1203/2004)、H7 (A/オランダ/219を表明/2003年) およびインフルエンザB〔B/オハイオ/01/2005、B/マレーシア/2506/2004、B/チーリン (Jilin) /219/2003〕HAのもの (Protein Sciences、CT、米国) を発現するバキュロウイルスを、Maxisorp™ ELISAプレートに被覆した。コーティングした後、プレートを、0.1%v/vのTween-20を含有するPBSで3回洗浄し、室温で1時間、3%BSAまたは2%ELKを含むPBSでブロックした。選定された単鎖ファージの抗体は、ブロックされたファージの抗体を得るために、4%ELKを含むPBSの等量で1時間インキュベートした。プレートを空にし、PBS/0.1%のTween-20で3回洗浄し、そしてブロックした単鎖ファージ抗体をウェルに添加した。インキュベーションを1時間進行させ、プレートをPBS/0.1% Tween-20で洗浄し、結合したファージ抗体はペルオキシダーゼに接合した抗M13抗体を用いて検出した (OD 492nmの測定を使用)。コントロールとして、手順は単鎖フ

ファージの抗体を伴わないものと、陰性コントロール単鎖ファージ抗体を伴うものと同時にを行った。IgMメモリーB細胞のライブラリーを有する異なるHAの抗原での選定から、組換えH1、H3とH7のHAに特異的な2つの独特な単鎖ファージ抗体を取得した（SC08-001およびSC08-014）。加えて、組換えH3のHAに特異的な6つの独特な単鎖ファージ抗体（SC08-003、SC08-006、SC08-015、SC08-016、SC08-017およびSC08-018）、および組換えH7のHAのための5つ（SC08-007、SC08-009、SC08-010、SC08-011およびSC08-013）を単離した。表7を参照。

【0145】

また、PEG/NaCl沈殿し、およぼる過滅菌したファージ抗体を、FACS分析によって結合および特異性を検証するために使用した。この目的のため、完全長の組換えインフルエンザA型サブタイプのH1（A/ニューカレドニア/20/1999）、H3（A/ウィスコンシン/67/2005）、H5（TV）、H7（A/オランダ/219/2003）およびインフルエンザB（B/オハイオ/o1/2005）HAのものを、PER.C6細胞の表面で発現させた。細胞を1時間単鎖ファージ抗体とともにインキュベートし、次いでPBS+0.1%BSAで3回の洗浄ステップを続けた。結合したファージを、M13-抗体接合FITCを用いて検出した。インフルエンザA型サブタイプH1、H3とH7のHAに特異的な一つの単鎖ファージ抗体を、IgMのメモリーB細胞のライブラリーでの異なるHAの抗原の選定から、単離した（SC08-001）。加えて、H3のHAに特異的な6つの独特な単鎖ファージ抗体（SC08-003、SC08-006、SC08-015、SC08-016、SC08-017およびSC08-018）、H7のHAに特異的な4つの独特な単鎖ファージ抗体（SC08-007、SC08-010、SC08-011およびSC08-013）を単離した。表8を参照。これらのうち、6つのファージ抗体（SC08-001、SC08-003、SC08-015、SC08-016、SC08-017、SC08-018）をさらなる特徴付けのための完全なヒト免疫グロブリンの構築のために使用した（例5を参照）。

例4

インフルエンザA（H3N2）のHA特異的不死化B細胞クローンの選定と検証

【0146】

ファージディスプレイに加えて、本発明の結合分子はまた、他の方法により単離することができ、たとえば、不死化B細胞を用い、例ではWO 2007067046に説明される。不死化IgMメモリー細胞（CD19+/CD27+、IgD+）、ワクチン接種を受けたドナーから導き出し、APC標識したH3のHAで染色し、および単一細胞を限界希釈培養に分類した。回収および細胞増加後、H3のHA分類された細胞の上清を、H1、H3およびH7の免疫反応性について固相ELISAにより測定した。

【0147】

続いて、標的特異的B細胞を、結合活性および中和のために特徴付けた。B細胞は、単一のクローンを産生するために、限界希釈法によりクローニングした。クローンを培養プレートに播種し、そして細胞を14日間培養した。クローンの上清を、H1、H3、H5およびH7由来のHAを発現するHA-トランスフェクト293細胞に結合する抗HAモノクローナル抗体の生産についてスクリーニングした。特異的（aspecific）または背景染色のコントロールとして、未トランスフェクト293細胞を使用した。

【0148】

上記スクリーニングで得られたIgMまたはIgG抗体のいずれかを含む選定されたB細胞のクローンの上清が、インフルエンザA型（H3N2）感染をブロック可能であったかどうかを定めるために、試験管内でのウイルスの中和アッセイ（VNA）を実行した。VNAを、MDCK細胞（ATCC CCL-34）上で実行した。MDCK細胞は、MDCK細胞培養培地〔10%（v/v）のウシ胎仔血清を補充した、抗生物質、20mMのヘペス（Hepes）および0.15%（w/v）の重炭酸ナトリウム（完全MEM培地）を添加したMEM培地〕で培養した。アッセイで使用したH3N2（A/ウィスコンシン/67/2005）、株は、 $5,7 \times 10^3$ TCID₅₀/ml（ml当たり50%組織培養感染用量）の力価に、Spearman（スピアマン）およびKarber（カルバー）の方法に従って計算された力価で希釈した。四つ一組の（quadruplicate、4連）ウェルにおいて完全MEM培地中で、IgGまたはIgMの調製物を連続的に2倍に希釈した（1:64～1:2）。それぞれのIgGの希釈物の25 μlを、ウイルス懸濁液の25 μl（100 TCID₅₀/25 μL）と混合し、37 °Cで1時間インキ

ュベートした。次いで、この懸濁液を50 μ lの完全MEM培地中でコンフルエントMDCK培養を含む96ウェルプレートに四つ一組で移行させた。使用前に、MDCK細胞を、ウェルあたり 3×10^4 細胞でMDCK細胞培養培地に播種し、細胞がコンフルエントに達するまで増殖させ、300~350 μ lのPBS、pH7.4で洗浄し、そして最終的に50 μ lの完全MEM培地を各ウェルに添加した。接種した細胞を3~4日37℃で培養し、そして細胞変性効果(CPE)の発達のために毎日観察した。CPEは陽性コントロールと比較した。

【0149】

187のテストIgGの上清のうち、43はこのアッセイで使用されるH3N2(A/Wisconsin/67/2005)株を中和することが見出された。これらのうち、14は例5に記載のようにヒトIgG免疫グロブリンの構築のために使用した。

例5

選定された単鎖FVSおよびB細胞クローンからの完全ヒト免疫グロブリン分子(ヒトモノクローナル抗体)の構築

【0150】

選定された特異的単鎖ファージ抗体(scFv)から、クローンプラスミドDNAを取得し、そしてヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、標準的な技術によって定めた。scFvsの重鎖および軽鎖可変領域を、IgG発現ベクターpIg-C911-HCガンマ1の発現のために、制限消化によって直接クローン化した(配列番号189参照)、pIG-C909-Cカップ(配列番号190参照)、またはpIg-C910-Cラムダ(配列番号191参照)。B細胞クローンの重鎖および軽鎖可変領域はPCR増幅され、そしてIgG発現ベクターpIg-C911-HCガンマ1の発現のために制限消化によって直接クローン化した(配列番号190参照)、pIG-C909-Cカップ(配列番号191参照)、またはpIg-C910-Cラムダ(配列番号192参照)。scFvsのうち、VHおよびVL遺伝子アイデンティティ[Tomlinson IM(トムリンソンIM)ら、V-BASE Sequence Directory(V-ベース・シーケンス・ディレクトリ)。Cambridge United Kingdom(ケンブリッジ・イギリス):MRC Centre for Protein Engineering(MRCタンパク質工学センター)(1997)。]を定めた(表9参照)。

【0151】

すべての構築物のためのヌクレオチド配列は、熟練者に知られている標準的な技術によって確かめられた。ヒトIgG1重鎖および軽鎖をコード化している得られた発現構築物を、293T細胞において組合せで一過性で発現させ、そしてヒトIgG1抗体を含む上清を取得して、標準的な精製手順を用いて生産した。ヒトIgG1抗体は、H3、H7またはB抗原に対して10および0.003 μ g/mlの間の濃度範囲で滴定された(示されないデータ)。無関係な抗体が、コントロール抗体として含まれた。

【0152】

選定された免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖のCDRのアミノ酸配列は、表9で与える。重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、下記に与える。下記に与えるように、免疫グロブリンはCR6261の重鎖および軽鎖定常領域を含む。

例6

H3N2結合IgGによるインフルエンザウイルスのインビトロ中和(ウイルス中和アッセイ)

【0153】

選定されたIgGsが、インフルエンザA型(H3N2)感染をブロック可能であったかどうかを定めるために、インビトロでのウイルスの中和アッセイ(VNA)を実行した。VNAを、MDCK細胞(ATCC CCL-34)上で実行した。MDCK細胞は、MDCK細胞培養培地[10%(v/v)のウシ胎仔血清を補充した、抗生物質、20mMのヘペスおよび0.15%(w/v)の重炭酸ナトリウム(完全MEM培地)を添加したMEM培地]で培養した。アッセイで使用したH3N2(A/ウィスコンシン/67/2005)株は、 5.7×10^3 TCID50/ml(ml当たり50%組織培養感染用量)の力価に、スピアマンおよびカルバーの方法に従って計算された力価で希釈した。四つ一組のウェルにおいて完全MEM培地中で、IgG調製物(200 μ g/ml)を連続的に2倍に希釈した(1:2~1:512)。それぞれのIgG希釈物の25 μ lを、ウイルス懸濁液の25 μ l(100 TCID50/25 μ

10

20

30

40

50

1)と混合し、37℃で1時間インキュベートした。次いで、この懸濁液を50 µlの完全MEM培地中でコンフルエントMDCK培養を含む96ウェルプレートに四つ一組で移行させた。使用前に、MDCK細胞を、ウェルあたり 3×10^4 細胞でMDCK細胞培養培地に播種し、細胞がコンフルエンスに達するまで増殖させ、300~350 µlのPBS、pH7.4で洗浄し、そして最終的に50 µlの完全MEM培地を各ウェルに添加した。接種した細胞を3~4日37℃で培養し、そして細胞変性効果(CPE)の発達のために毎日観察した。CPEは陽性コントロールと比較した。

【0154】

例5のヒト抗H3 HAおよび/または抗H7 HA抗体を、上記のVNAを受けさせた。これらの抗体のうち、すべての抗体は、CR8040、CR8052およびCR8069を除き、A/ウィスコンシン/67/2005のH3N2株を中和した。これらの抗体がMDCK培養物をCPEから保護する濃度(µg/mlにおいて)は、表11に与える。

例7

抗H3N2 IgGsの交差結合反応性

【0155】

上述のH3N2中和IgG抗体は、結合特異性について、即ち、異なるHAの抗原への結合性を、ELISAで検証した。この目的のために、組換えH1(A/ニューカレドニア/20/1999)、H3(A/Wisconsin/67/2005、/ニューヨーク/55/2004、A/ワイオミング(Wyoming)/3/2003)およびH7(A/オランダ/219/2003)HAのもの(Protein Sciences、CT、米国)を発現するバキュロウイルスを、Maxisorp™ ELISAプレートに塗布した。コーティングした後、プレートを0.1%v/vのTween-20を含有するPBSで3回洗浄し、そして室温で1時間、3%BSAまたは2%ELKを含むPBSでブロックした。プレートを空にし、PBS/0.1%のTween-20で3回洗浄し、そしてIgG抗体をウェルに加えた。インキュベーションを1時間進行させ、プレートをPBS/0.1%のTween-20で洗浄し、そして結合した抗体はペルオキシダーゼに接合した抗ヒトIgG抗体を用いて検出した(OD 492nmの測定を使用)。コントロールとして、無関係なIgG抗体CR4098が使用された。

【0156】

選定されたH3N2中和抗体から、CR8001は、ヘテロサブタイプの(heterosubtypic)交差結合を、テストしたすべての組換えHAのものに対して示し、CR8020、CR8021、CR8041、CR8043およびCR8057は、すべての3つのテストしたH3のHAのもの、ならびにH7のHAに対してヘテロサブタイプの交差結合を示す。CR8003、CR8015、CR8016、CR8017、CR8018、CR8038、CR8039、CR8040、CR8049、CR8050、CR8052およびCR8069は、すべての3つのテストしたH3のHAのものに対して交差結合を示す。一つの抗体、CR8019は、わずか2つだけのH3のHAのものへの結合を示す。表12を参照。

【0157】

さらに、選定されたH3N2中和抗体は、FACS分析によってヘテロサブタイプの結合をテストするために使用された。この目的のため、完全長の組換えインフルエンザA型サブタイプのH1(A/ニューカレドニア/20/1999)、H3(A/ウィスコンシン/67/2005)およびH7(A/オランダ/219/2003)HAのものを、PER.C6細胞の表面に発現させた。細胞を1時間IgG抗体とともにインキュベートし、次いでPBS+0.1%BSAで3つの洗浄ステップを続けた。結合した抗体はPE接合抗ヒト抗体を用いて検出した。コントロールとして、トランスフェクトされていないPER.C6細胞を使用した。

【0158】

H3N2中和抗体から、CR8001はインフルエンザA型サブタイプH1、H3およびH7のHAに対して交差結合反応を示したが、野生型PER.C6細胞にはそうでなかった。さらに、CR8020およびCR8041は、H3およびH7のHAの双方への強い結合を示す。CR8043およびCR8057は、H3のHAへの強い結合およびH7のHAへの弱い結合を示す。CR8055はPER.C6細胞での背景染色の低いレベルを示した。残りの13の抗体は、表12を参照するだけのH3トランスフェクションされた細胞への結合を示す。

例8

抗H3N2 IgGの交差中和活性

10

20

30

40

50

【0159】

選定されたIgGsが、多重なインフルエンザA型株をブロックすることが可能であったかどうかを定めるために、追加のインビトロでのウイルスの中和アッセイ（VNA）を実行した。VNAを、MDCK細胞（ATCC CCL-34）上で実行した。MDCK細胞は、MDCK細胞培養培地〔10%（v/v）のウシ胎仔血清を補充した、抗生物質、20mMのヘペスおよび0.15%（w/v）の重炭酸ナトリウム（完全MEM培地）を添加したMEM培地〕で培養した。アッセイで使用したH1N1（A/ニューカレドニア/20/1999 A/ブリスベン（Brisbane）/59/2007およびA/ソロモン諸島（Solomon Islands）/IVR-145）、H3N2（A/香港/1/68、A/ヨハネスバーグ/33/94、A/パナマ/2000/1999、A/広島/52/2005およびA/ウィスコンシン/67/2005）、H7N3（A/マガモ（Mallard）/オランダ/12/2000）およびH10（A/チック（Chick）/ドイツ/N/49）株はすべて、 5.7×10^3 TCID₅₀/ml（ml当たり50%組織培養感染用量）の力価に、スピアマンおよびカルバーの方法に従って計算された力価で希釈した。四つ一組のウェルにおいて完全MEM培地中で、IgG調製物（80 μg/ml）を連続的に2倍に希釈した（1:2～1:512）。それぞれのIgG希釈物の25 μlを、ウイルス懸濁液の25 μl（100 TCID₅₀/25 μl）と混合し、37 °Cで1時間インキュベートした。次いで、この懸濁液を50 μlの完全MEM培地中でコンフルエントMDCK培養を含む96ウェルプレートに四つ一組で移行させた。使用前に、MDCK細胞を、ウェルあたり 3×10^4 細胞でMDCK細胞培養培地に播種し、細胞がコンフルエンスに達するまで増殖させ、300～350 μlのPBS、pH7.4で洗浄し、そして最終的に50 μlの完全MEM培地を各ウェルに添加した。接種した細胞を3～4日37 °Cで培養し、そして細胞変性効果（CPE）の発達のために毎日観察した。CPEは陽性コントロールと比較した。

10

20

【0160】

H3N2中和抗体のパネルから、CR8020およびCR8041は、すべてのテストされたインフルエンザA型サブタイプ、H3、H7およびH10ウイルスに対してヘテロサブタイプの交差中和活性を示すが、H1ウイルスにはそうでない。加えて、CR8043は、すべてのテストされたH3およびH10のウイルス株に対して交差中和を示す。CR8039、CR8041、CR8043およびCR8057は、すべてのテストされたH3ウイルス株の交差中和を示す。追加の13の抗体は、試験したH3ウイルス株の1よりも多くに交差中和を示す。表13を参照。

例9

抗H3N2抗体はHAのプレ融合の立体構造に結合する

【0161】

選定されたIgGが、HA分子のプレまたはポスト融合の立体構造を結合可能であったかどうかを定めるために、インビトロpHシフトの実験を実行した。

30

【0162】

この目的のために、完全長の組換えインフルエンザA型サブタイプH3（A/ウィスコンシン/67/2005）HAを、PER.C6細胞の表面に発現させた。異なる構造のHAの立体構造での特異的反応性をアッセイするため、 3×10^5 個の細胞を、室温（RT）で30分間DMEM中の10 μg/mlのトリプシン-EDTAで処理し、洗浄し、そして酸性化したPBS（pH4.9）中で5分間インキュベートし、洗浄し、そして次いで室温で20mMのDTTの存在下で20分間インキュベートした。細胞を、各ステップで分け、未処理付着細胞を0.05%EDTA中に再懸濁させた。各処理の細胞画分を30分間抗H3N2 IgGのCR8001、CR8020、CR8041、CR8043およびCR8057とインキュベートした。次いで、細胞を、フィコエリスリン接合抗IgG〔サザン・バイオテック社（Southern Biotech）〕と共に30分間インキュベートした。染色した細胞をCELLQuest Pro（セルクエスト・プロ）ソフトウェア〔ベクトン・ディクソン社（Becton Dickinson）〕でFACS Calibur（キャリバー）を用いて分析した。表面に発現したH3 rHAへのIgG1のFACS結合は、トリプシンでの逐次処理（縞模様のバー）、pH4.9の緩衝化した培地（中実白色バー）およびDTT（交差バー）の後に測定し、および未処理rHAへの結合（中実黒色バー）の割合として表した。図2を参照。

40

【0163】

抗体CR8001、CR8020、CR8041およびCR8043はすべて、pHシフト後の結合において著しい低下を示し、HA分子の低pH誘発立体構造変化前だけに存在するエピトープについて特異性

50

が示される。抗体CR8057は、DTT処理の後にだけ結合における減少を示し、HA1が存在する場合にだけ使用できるエピトープに無関係な立体構造について特異性を示した。

例10

抗H3N2抗体CR8041はHA0の切断を防ぐ

【0164】

選定されたIgGがHA分子をプロテアーゼ開裂から保護することができたかどうか定めるために、試験管内のプロテアーゼ感受性アッセイを実行した。

【0165】

この目的のために、7.5 μgの組換え可溶性インフルエンザA型サブタイプH3 (A/ウィスコンシン/67/2005)、HA (プロテイン・サイエンス、CT、米国) を、37 °Cで1時間、異なるpH (4.9、5.3および8.0) の処置を受けさせた。インキュベーション後、反応を中和した。試料を、7.5 μgのCR8041またはCR8057のFabフラグメントの存在および不存在で0.5 μgのトリプシンで一晩中消化した。反応は、SDS添加緩衝剤の追加によって停止させた。3 μlのNupage (ヌページ) 還元剤 (インビトロゲン社) を、各々の試料に加えた。試料は、1 × MOPS緩衝剤で4~12%のピストリス (BisTris) ゲル上で動かした。タンパク質バンドを、コロイドブルー染色によって視覚化した (図3を参照)。Fabフラグメントが存在しない場合、H3のHA分子は、pH 8.0でなく、pH 4.9または5.3でそのプロテアーゼ感受性ポスト融合の形態にすぐ変わる。FabフラグメントCR8057が存在する場合、H3のHAの分解およびこのようにしてpH4.9での立体構造的変化は抑制されない。対照的に、Fab CR8041の存在は、H3のHAの立体構造的な変化および低いpHでの分解を防ぐだけでなく、また、HA1およびHA2へのHA0のpHから独立した開裂を防ぐ。これらの結果は、開裂部位の、またはその近くのCR8041のためのエピトープの方に向く。抗H3N2抗体パネルでの競合実験 (示していない結果) は、CR8001、CR8020およびCR8043抗体のために重複エピトープ (overlapping epitope) および類似した作動機構を示す。

例11

本発明の結合分子の作用の機構

【0166】

HA糖タンパク質は、三量体であり、各々のモノマーが2つのジスルフィド連結したグリコポリペプチド (HA1およびHA2と称する) からなり、前駆体 (HA0) のタンパク質分解開裂によって感染の間に生産される。開裂は、それが膜融合のためのHAをプライムし、立体構造的変化を許すために要求されるので、ウイルス感染のために必要である。

【0167】

プライムド分子の活性化は、エンドソーム内の低pH、pH5およびpH6の間で発生し、そしてHAの構造での大規模な変化を必要とする。プレ融合未開裂 (I)、プレ融合開裂 (II) およびポスト融合HA (III) の立体構造の3次元構造を模式的に図4に示す。

【0168】

試験管内で、HA分子の立体構造変化は、HA表面発現哺乳類細胞を用いて擬態することができる。第一に、タンパク質分解開裂は、細胞にトリプシンを追加することによって始動させることができる。第二に、プレからポスト融合の立体構造変化は、pHを下げることでより達成することができる。さらに、分子のHA1部分は、DTTに似た還元剤を添加することによって除去することができる。この方法では、特定の段階での抗体の添加によって、抗体が感染のプロセスにどの段階で干渉するのかを調査することが可能である。これまで、PER.C6(R)細胞はA/ウィスコンシン/67/2005からのHAを保有するH3のHA発現構築物で形質移入され、そして例10で説明されるように、異なる処置を受けさせた。

【0169】

この実験について、細胞を最初にトリプシン開裂前に抗H3 mAbと共にインキュベートし、そして続いて上記のように処理した (図5を参照)。

抗H3 mAbの結合は、標準プロトコルに従って、PE接合抗ヒト抗体で検出した。蛍光信号はFACS分析によって測定した。「細胞だけ」は、未処理の細胞へのmAb結合後に得られ、そして100%に設定された信号を意味する。図5からわかるように、mAb (モノクローナル

10

20

30

40

50

抗体)は、まだHAに結合し、次いで異なる処置が続く。上記例10において、H3 mAbsのCR8020、CR8041およびCR8043だけがプレ融合状態(即ち、pHを下げることによる立体構造変化の前に)に結合することが示されるので、実際には抗体の結合が、トリプシン開裂を抑制し(また、例10を参照)、少なくともインビトロで、そして従ってまたその後のステップが立体構造変化および融合をもたらすと結論された。受容体結合部位の近くで、HA分子のHA1部分を結合する抗体CR8057は、立体構造シフトの後にHAに結合可能であり、そして予想通り、DTT処理によるHA1およびHA2のドメイン間のジスルフィド結合の破壊に続き、HA1部分が除去されるときに失われる。

【0170】

トリプシン開裂の抑制を、その後、異なる試験管内の実験で確認された。最初に、経時実験を、H3のHAが、HA1およびHA2でのHA0の適切な開裂を実現するために、トリプシンでどれだけ長くインキュベートすべきかを定めるために実行した。これまで、組換え可溶性H3 HA(A/ウィスコンシン/67/2005、タンパク質科学、CT、米国)を、6.7 μg/mlのトリプシンおよび1%N-ドデシル-β-D-デマルトシド(demaltosid)を含むpH8.0の4mMのトリスHCl緩衝液中でインキュベートした。トリプシン消化は、1%BSAを添加することによっていくつかの時間点で停止させた。試料をSDS-pageゲル(還元)上で動かし、そして標準的な方法に従ってプロットした。HA0、HA1およびHA2のバンドを、ウサギ抗H3HAポリクローナル抗体を用いて検出した(タンパク質科学、CT、米国)。図6は、2時間のインキュベーションが還元ゲル上のHA1およびHA2のバンドの出現によって証明される完全に近い開裂のために十分であることを示す。次に、組換え可溶性H3 HAを、CR8020、CR8041、CR8043またはCR8057のいずれかと一緒にインキュベートし、そして続いてpH8.0でのトリプシン開裂に供した。トリプシン消化は再び1%BSAを追加することによっていくつかの時間点で停止させた。試料をSDS-page(還元)上で実行し、そしてプロットした。HA0、HA1およびHA2のバンドは、抗H3ポリクローナル抗体を用いて検出した。結果は、すべての3種のmAb CR8020、CR8041およびCR8043は、インビトロでトリプシン開裂を防ぎ、それは抗体に結合したH3のHAのトリプシンとのインキュベーションがゲル上でのHAのHA0形態の保護をもたらすからであることを示す(図7)。対照的に、同じ条件でのコントロールmAb(CR8057)とのH3 HAのインキュベーションはHA0バンドの消失を招く。この実験では、CR8041のための例10で説明したデータを確認し、そしてCR8020およびCR8043抗体に、この観察を拡張する。本発明の結合分子は、このように、少なくとも試験管内で、HA0分子の少なくともトリプシンの開裂を防ぐ。しかしながら、これはその追加の抑制効果が、感染の過程においてより下流にあるCR

8020、CR8041およびCR8043のmAbsによって媒介され、およびpH誘発立体構造変化および/または融合プロセスによる干渉を招くことを除外するものではないことに注目される。

【0171】

これは上述の実験が繰り返される場合、しかしここでは、抗体CR8043、またはコントロールとして抗体CR8057で、可能性があるかどうかを研究するために、唯一のトリプシン開裂後H3 HAを発現する細胞に加えた。インキュベーション後に、細胞は、例10に記載のように、低pHの緩衝液中でインキュベートし、そしてDTTで処理した。作用の機構がトリプシン開裂の阻害に制限される場合、mAb CR8043はpH処理後の結合性を失うことが予想され、それは本発明者によって例10において抗体がHAのポスト融合の立体構造に結合しないことが確立されているからである。対照的に、図8から分かるように、mAb CR8043の結合性は、依然として低pHおよび続くDTT処理への曝露後に検出され、pH誘発立体構造シフトはまた、少なくとも試験管内で、CR8043により抑制されることを示す。HAのHA1領域に結合することが示されるCR8057が期待どおりに振る舞い、そしてHA1部分がDTT処理後に失われたときにはもはや検出不可能である。

【0172】

抗体CR8020およびCR8041はまた、HAのpH誘発立体構造変化をブロックすることが可能かどうかを調べるために、上述の実験を繰り返した。ここでは、抗体CR8020、CR8041およびCR8043、またはコントロールとして抗体CR8057を、いずれかのA/香港/11/1968、/香港/24/

1985またはA/ウィスコンシン/67/2005サブタイプH3のHAを発現する細胞に、上記で説明されているすべての処理の後、低いpHのインキュベーションの前またはトリプシン切断の前のいずれかに添加した。

【0173】

A/ウィスコンシン/67/2005 H3 HAのために前に示すように、CR8020、CR8041およびCR8043抗体は、低pH処理の前にだけ存在するエピトープを認識する。このエピトープは、図9cに見られるように、この実験で使用した3つのHAsに保存されている。

【0174】

作用のメカニズムがトリプシン切断の抑制に制限される場合、mAb CR8020、CR8041およびCR8043はpH処理後に既に切断されたHAの結合性を失うことが期待され、それは本発明者により例10において抗体がHAのポスト融合立体構造に結合しないことを確立しているからである。対照的に、図9bから分るように、mAb結合性は、依然としてすべての3つの異なるH3のHAsで低pHおよびその後のDTT処理への曝露後に検出され、pH誘発立体構造シフトがまた、少なくとも試験管内でCR8020、CR8041および(anc)CR8043により抑制されることを示す。HAの高度に可変なHA1領域に結合することが示されるCR8057は、A/香港/1/1968およびA/香港/24/1985 HAsには結合しないことを示す。

例12

試験管内で生成されたエスケープ変異体はエピトープの位置がH3のHAで保存された配列と一致することを示す

【0175】

HAのどの領域にCR8020、CR8041およびCR8043が結合するかを研究するために、試験管内培養においてエスケープ変異体を生じさせることを試みた。A/香港/1/1968ウイルスを、制限された量のモノクローナル抗体の存在下にMDCK細胞培養において継代させた。まず、抗体のどんな濃度が、異なる量のモノクローナル抗体と混ぜ合わせた100 TCID₅₀単位でのMDCK細胞の接種および3日の間インキュベーションの後、ウイルス感染の3対数減少をもたらすかを定めた。抗体のこの濃度を連続継代において接種原に加え、そして各々の継代の後、ウイルスは、ウイルスがまだ抗体媒介中和に敏感かどうか定めるために異なる量の抗体の不存在および存在下でブランク滴定した。この手順は、mAbs CR8020、CR8041およびCR8043の各々のために続けた。各々の培養物から、エスケープウイルスを、ブランクアッセイによって分離することができ、そして各々の2つの分離株のうち、ウイルスRNAを抽出し、HA配列を決定するのに用いた。観察した変異するアミノ酸は以下の通りであった。すなわち、

CR8020：双方の分析したブランクでのD19NおよびQ27；

CR8041：2つのブランクでのG33E；

CR8043：1つでのR25Mおよび他のブランクでのQ34R。

【0176】

すべての3つのモノクローナル抗体は、融合ペプチドに隣接するHAステム領域のHA2部分での類似したドメインにおけるエスケープ変異を示す。この領域におけるNCBIインフルエンザ・データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi>) に存在するH3N2ウイルスのアミノ酸配列の比較は、配列の著しい保存を明らかにする。表14は、観察されたエスケープ変異を強調して有するアミノ酸W14およびK39の間でHA2領域における配列変動を描く。N=特異的配列を有する株の数。そのうえ、分離体の年(年)を示し、ならびに、株はH3抗体での中和実験における陽性反応を示した(Pa=A/パナマ/2000/1999、Wis=A/ウィスコンシン/67/2005、Hs=A/広島/52/2005、HK=A/香港/1/1968)。前述のHA2配列を含むデータベースに存在する1363のH3ウイルスのうち、大多数(81%)は、中和されることが示されたウイルス株に存在する配列を有する。残りの配列のうち、ほとんどは、保存された変化と考えることができるアミノ酸を有する。他の変異のために、機能的な中和試験は、変化が抗体の機能に影響を及ぼすかどうか確立するために必要である。重要なことに、エスケープウイルス実験(R25、G33およびQ34)で現れる3つのアミノ酸変化は自然のインフルエンザ配列、そして組合せ(D19とQ27)で、自然な配列にも存在し

ない組合せだけで現れたその他の2つの変異で生じない。これは、変異がウイルス適応（フィットネス）への否定的な影響があることを意味することができた。要するに、抗体が、モノクローナル抗体の幅広い中和化能力を確かめるH3サブタイプウイルスの間に高度に保存されるHA2上でのエピトープと相互作用すると結論される。

例13

生体内実験のためのモノクローナル抗体の調製

【0177】

特徴付けおよびその後のIgGの生体内での潜在的な治療上の抗体としての確認を可能にするために、それらを十分な量で製造し、そして精製する必要がある。IgGは25LのWave（ウェーブ）-バッグ中でPER.C6(R)細胞において生産し、そして培養物を収穫した。浄化した（clarified）収穫物から、IgGはプロテインA親和性クロマトグラフィーを用いて、そして緩衝液交換ステップを用いて精製した。精製された緩衝液交換されたIgGのモノマー含量は、0.2µm滅菌ろ過の前、そしてその後、~99%である。追加的な試験管内のウイルス中和アッセイ（VNA）は、得た異なる抗体調製物を用い、上述のように実行した。結果を表15に示す。

例14

生体内での致死H3N2負荷試験に対するヒトIgGモノクローナル抗体の予防上の活性

【0178】

MABs CR8020、CR8041およびCR8043を、雌性の129X1/SvJマウス〔Jackson Labs（ジャクソン・ラボズ社）においてのインフルエンザA型/HK/1/68-MA20（H3N2）ウイルスでのマウス致死負荷試験モデルの予防効果について試験した（MA=マウス適応）。A/HK/1/68-MA20ウイルスは、E.G. Brown（ブラウン）教授、University of Ottawa（オタワ大学）、Ottawa（オタワ）、Ontario（オンタリオ州）、Canada（カナダ）；Brown, E. G.ら（2001）から取得した。ウイルスは、一回マウス実験での使用前に胚形成された鶏卵において継代した。すべてのマウスは、実験の始まりに先立ち、少なくとも4日の期間までのために慣れさせ、そして維持された。

【0179】

MABを、30、10、3と1mg/kgでの静注で尾静脈（尾骨静脈、vena coccygeus）にて負荷試験前に日-1に投薬し、マウスにつき、18gの平均体重、そして0.2mLの一定用量容量を仮定した。それから、マウス（グループにつきn=8）は25のLD50 A/HK/1/68-MA20（H3N2）ウイルスで、日0で鼻腔内接種によって負荷試験した。動物の接種が完了したあと、等よされたウイルスの実際の量は、残っている接種原からの少量の反復試料を滴定することによって推定した。接種原のウイルス力価（TCID50/mL）は、MDCK細胞上で測定した。ウイルスの不活化が接種原の調製または投与の間、意図せずに起きることはなかったことを成績は示した。臨床徴候および体重は、負荷試験の前の日-1から日21の研究の終了まで毎日測定した。臨床徴候はスコアシステム（評価法）により点数化した〔0=臨床徴候なし；1=ラフコート（rough coat）；2=ラフコート、低い反応性、取扱いの間受動的；3=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難（laboured breathing）、取扱いの間受動的；4=ラフコート、ロールアップ、呼吸困難、胃はその裏に置いた時ロールバック（後退）されない。〕。4のスコアで動物を安楽死させた。日0でmAbの血しょうレベルを分析し、そして日21で抗体を抑制する赤血球凝集（HI）の存在を決めるために、血液試料をD0で、負荷試験の直前に、そして感染後D21ですべてのマウスから取り出した。

【0180】

mAbsは、2つの別の実験でテストされた。各々の実験では、陰性コントロール抗体（CR3014）のグループは、30mg/kgで投薬されるのに沿っていた。MAB CR8020は、最初の実験においてテストされ、mAb CR8041およびCR8043が第2においてであった。

【0181】

すべてのマウスは活発であり、そして順化期間の間に病気の徴候を示すことなく健康にみえた。図10はmAb投与の後、マウスの残存率を示す。明らかな用量反応関係は、30、10または3mg/kgにてCR8020、CR8041またはCR8043で投薬したすべてのグループが100%の生き

残りを示して観察されたが、その一方、1mg/kgのCR8020で、マウスの25%は生き残り、そして1mg/kgのCR8041およびCR8043のグループでは、マウスのどれでも生き残りがなかった。2つのコントロールmAbグループは、0%の生き残りを示した。最初の実験では、コントロール群と比較して、mAb CR8020の投与は、テストされたすべての4つの濃度で、生存可能時間に統計的に有意な違いをもたらした〔 $p < 0.005$ ；ログランク検定 (Log Rank Test)〕。コントロール群と比較して、第2の実験で、mAbsのCR8041およびCR8043の投与はまた、テストされたすべての4つの濃度で、生存可能時間に統計的に有意な違いをもたらした（双方のmAbsについて $p < 0.001$ ；ログランク検定）。

【 0 1 8 2 】

図11において、mAb投与の後、21日の調査期間の間に、マウスの平均体重変化が示される。残存率と似て、体重減少および用いる抗体の量の明らかな逆の関係がある。抗体の濃度が増えたとき、体重減少は減少した。すなわち、CR8020、CR8041またはCR8043で30、10または3mg/kgの投薬をされたグループでのマウスは、ほぼ日0から日21でのおよそ10-15%の平均体重の増大が示され、年齢に関連する体重増加と一致したが、その一方、1mg/kgのグループで、そしてコントロールmAbのグループでは、調査期間で減少したマウスの平均体重があった。

【 0 1 8 3 】

体重変化を、曲線下面積 (AUC) 分析で、より一層詳細に分析した。この分析の目的で、マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合、最後に観察された体重が日21に繰り越された。手短かに言うと、日0のマウスに当たりの重さを基線値として用い、そして日0から日21までの重さ変化を、基線と比較して定めた。AUCは、基線より上の面積および基線より下の面積の合計として定義した。mAb用量グループの平均AUC値は、多重比較のダネットの調整を伴う分散分析を使ってそれぞれのコントロールグループと比較した（表16）。

【 0 1 8 4 】

分析は、CR8020、CR8041およびCR8043からの3、10および30mg/kgのグループの平均AUCが対応するコントロールグループのそれから統計学的に有意に異なる ($P < 0.001$)を示した（表16）。CR8041-ならびにCR8043の1mg/kgの用量グループのための双方ともについて、コントロールグループと比較されるとき、統計的に有意な違いが見出された（それぞれ $p = 0.004$ および $p < 0.001$ ）。しかし、CR8020の1mg/kgの用量グループの2つの生き残りマウスのために、体重の変動での増加は観察され、そして従ってコントロールグループと比較するとき、統計有意差は示されなかった。

【 0 1 8 5 】

追加的な分析は、多重比較のチューキーの調整を伴う分散分析を用いて各抗体に対する抗体濃度あたりの平均AUC値を比較することにより、体重損失の減少での用量反応を研究するために実行した（表16）。双方のmAbs CR8020およびCR8041について、1mg/kgのグループでの体重損失は、それぞれ3mg/kgのグループに比べて有意に高い ($p < 0.001$) が、その一方で、3、10および30mg/kgのグループの間には統計的に有意な差がない ($p > 0.05$)。mAb CR8043について、1mg/kgグループでの双方の体重損失は、3mg/kgグループでのものよりも統計的に有意に高く ($p < 0.001$)、その一方、3mg/kgグループでは10mg/kgグループのそれよりも有意に高かった ($p < 0.001$)。CR8043の10および30mg/kgグループの平均AUCは有意に差がなかった ($p = 0.997$)。

【 0 1 8 6 】

マウスの中央臨床スコアを図12に示す。30および10mg/kgでのCR8020、CR8041またはCR8043を投薬したマウスは、2つの調査での0から21日の調査期間を通じて中央臨床スコアで示される何らの臨床徴候も示さなかった。MAbの8020はまた、3mg/kgの用量グループでは、臨床スコアを示さなかったが、MAb 8041および8043の3mg/kgの用量グループでは、臨床スコアの増加がそれぞれ1と3の中央スコアまで観察された。すべての3つのmAbsの1mg/kgの用量グループでは、臨床スコアは、増加し、すべてのグループの4の中央値スコアに達した。臨床スコア4で観察されたマウスは同じ日に安楽死させた。CR8020の1mg/kgの用量

グループでの2つの生存マウスは、調査の日7で病気になり、そしてそれぞれ、1および3の最大臨床スコアを示した。双方のマウスは完全に回復した。CR8041およびCR8043の3mg/kgの用量グループの体重損失のプロファイルは、臨床スコアのプロファイルと同様のパターンを示す。

【0187】

これらの結果は、ここに開示するように、少なくとも3つのヒト抗H3N2抗体が識別され、および開発され（CR8020、CR8041やCR8043）、各々別々にインビボにおけるインフルエンザH3N2の致死用量に対する保護を提供することができることを示す。投与された各抗体の量および残存率の間に明確な用量反応関係が観察された。結果は、抗H3N2 IgG抗体CR8041および8043が10mg/kgまたはそれよりも多くの用量にて感染前に1日に投与したとき、マウスにおいてH3N2感染の臨床症状を防ぐことができたことを示す。MAb CR8020は3mg/kgまたはそれよりも多くの用量にて感染前に1日に投与したとき、マウスでのH3N2感染の臨床症状を防ぐことができた。

10

例15

生体内での致死的H3N2負荷試験に対するヒトIgGモノクローナル抗体の保護および治療活性

【0188】

調査を、生体内での致死的H3N2 A/HK/1/68-MA20のインフルエンザウイルスの負荷試験に対し、ポスト感染モデルにおいて、CR8020に代表される、ここに開示するようなモノクローナル抗体の治療上の効果を試験するために実行した。

20

マウス（n=グループあたり10）を、mAb CR8020の15mg/kgでの静注で尾静脈（尾骨静脈、vena coccygeus）にて負荷試験前に日-1（グループ1；予防上の陽性コントロール）または負荷試験後日1、2、3、4、5、または6（グループ2~7）に投薬し、マウスにつき、18gの平均体重、そして0.2mLの一定用量容量を仮定した。グループ8は陰性コントロールmAb CR3014（15mg/kg）を負荷試験後日1に受け取った。マウスは25のLD50（2.8対数TCID50）A/HK/1/68-MA20（H3N2）ウイルスで、日0に鼻腔内接種により負荷試験した。ウイルスのバッチおよびタイプ、およびマウスの齢は、例14で使用されるのと同じであった。臨床徴候および体重は、負荷試験前日-1から日21の調査の終了まで毎日決定した。

【0189】

図13Aは、mAb CR8020（すべてのグループで15mg/kg）またはコントロールmAb（15mg/kg）の静脈内投与後、マウスの残存率を示す。15mg/kgのmAbのCR8020が日1のプレ負荷試験で、または日1または2でのポスト負荷試験で投与したとき、すべての動物はウイルス感染を生き残ったが、コントロールmAbグループでの残存率は0%であった。15mg/kgのmAb CR8020が負荷試験後日3または4で投与したとき、50%および10%の残存がそれぞれ観察された。これらの各グループの生存時間は、コントロールグループと比較して統計的に有意に異なっていた（日3のグループ：、 $p < 0.001$ および日4グループ： $p = 0.002$ ；ログランク検定）。日5または6で15mg/kgのCR8020で処置されたグループは、0%の残存率を示した。日5または6で処置されたグループの残存時間には、コントロールグループに比べての統計学的に有意な差は認められなかった（それぞれ $p = 0.648$ および $p = 0.342$ 、ログランク検定）。

30

【0190】

図13Bには、マウスの日0に関連した、21日間の試験期間中の平均体重変化が示される。残存率と同様に、重量損失および15mg/kgのmAb CR8020投与の時間の間に明確な関係があり、15mg/kgのmAb CR8020による処置を後での時点で施すとき、体重損失が増加した。

40

【0191】

体重変化は統計的に曲線下面積（AUC）の分析を用いて詳細に分析した（表17）。曲線下面積分析のために、マウスが死亡し/フォローアップ調査の間に安楽死したとき、最後に観察された体重が日21に繰り越された。手短に言うと、日0のマウスに当たりの重さを基線値として用い、そして日0から日21までの重さ変化を、基線と比較して定めた。AUCは、基線より上の面積および基線より下の面積の合計として定義した。

【0192】

50

マウスの中央臨床スコアを図13Cに描く。プレ負荷試験の日-1で15mg/kgのCR8020を投与したマウスのうち、すべてが残存し、およびいずれも観察期間中に臨床徴候を示さなかった。日1のポスト負荷試験にて15mg/kgのCR8020で処置したマウスは、100%の残存率を示したが、しかし、10のうち4匹は、1および3の間の最大臨床スコアに達し、臨床徴候を示した。日2のポスト負荷試験にて15mg/kgのCR8020で処置した動物のうち、すべては生き残った。しかし、10の動物のうち9は、2または3の最大臨床スコアに到達する臨床徴候を示した。日3のポスト負荷試験にて15mg/kgのCR8020で処置した動物は50%の残存率を示した。残存体 (n=5) のすべての動物は、3の最大臨床スコアを有する臨床的徴候を示した。日4のポスト負荷試験にて15mg/kgのCR8020で処置した動物からは、1つを除くすべてのマウスが死亡した。生き残ったマウスは、2の最大臨床スコアに到達する臨床徴候を示した。処置の治療群 (treatment arms) を越え生き延びたすべてのマウスは日21で症状から解放された。

10

20

30

40

50

【0193】

臨床スコアは、対象体としてのマウスでの反復測定および順序尺度上で測定したデータについてモデルに合うようにGENMOD手順 (SAS) を用いて分析した (表18)。曲線は異なるパターンを有するので、変数「日」はこのモデルでクラス変数として入力した。日-1の負荷試験前および日1および2のポスト負荷試験にて15mg/kgのmAb CR8020で処置したグループからは、100%のマウスが生存し、中央臨床スコアは、調査のほとんどの間の21日の期間にコントロールmAbグループから有意に異なった (すべての3グループについて $p < 0.01$)。日3または日4のポスト負荷試験にて15mg/kgのmAb CR8020で処置したグループからは、それぞれマウスの50%、および10%が生き残り、中央臨床スコアは、調査のほとんどの間の21日の期間中にも、コントロールmAbのグループから有意に異なった (双方のグループについて $p < 0.05$)。日5または日6のポスト負荷試験にて15mg/kgのmAb CR8020で処置したグループからは、中央臨床スコアが、日3にてコントロールmAbのグループから有意に異なった ($P = 0.001$)。この差は、統計的に有意であるが、関連するとはみなされない。

【0194】

結論として、15mg/kgのmAb CR8020による治療は、致死性H3N2マウスモデルでの負荷試験後日2まで100%の保護を提供する。負荷試験の後日3または日4にて投与されるとき、15mg/kgのmAb CR8020による処置は部分的な保護を提供する。負荷試験の後日5または日6にて投与されるとき、15mg/kgのmAb CR8020の保護的影響は、致死性H3N2マウスモデルで観察されなかった。

【0195】

ここに明らかにされるように、そして抗体CR8020によって実証されるように、H3N2インフルエンザウイルスに対して向けられるモノクローナル抗体でのポスト-感染処置が哺乳類の対象体を、ここではそのことはマウスで示されるように、H3N2インフルエンザウイルスの致死性用量で負荷試験の後に救うことができることが、これらの成績によって示される。遅いステージでも、即ち、4日のポスト感染でさえ、抗体はインフルエンザH3N2ウイルスでの致死性感染からマウスを部分的に保護することができる。際立って、日21のポスト感染にて、すべての生き残っている抗体処置動物は、通常の体重レベルに達し、そして少しの残りの臨床徴候も示さなかった。

例16

生体内での致死性H7N7負荷試験に対するヒトIgGモノクローナル抗体の予防的活性

【0196】

調査を、ここに明らかにするように、モノクローナル抗体の予防上の効果を試験するために実行し、CR8020により、生体内においてH7N7インフルエンザウイルスでの致死性な負荷試験に対して実証する。MAb CR 8020を、マウス致死性負荷試験モデルで、マウス適合インフルエンザのA型/チキン/オランダ/621557/2003 (H7N7) ウイルス [Central Veterinary Institute (セントラル・バーテリナリー・インスティテュート) (CVI)、Lelystad (レリスタット)、オランダ] で、予防的効力を試験した。A/CH/NL/621557/03 (H7N7) ウイルスは、3つの肺から肺への通過後マウスに適合した。マウス適合H7N7継代物 (Passa

ge) 3のウイルスをCVIの実験室で胚形成した鶏卵にて増加させた。すべてのマウス (Balb/c、雌性、齢6-8週、n=グループにつき8) は、実験の始まりの前に、少なくとも4日間慣れさせて、それを維持した。MAb CR8020は日-1の負荷試験前にて30、10、3および1mg/kgでの静注にて尾静脈(尾骨静脈)で投薬し、マウスにつき、18gの平均体重、そして0.2mLの一定用量容量を仮定した。コントロールグループは30mg/kgの陰性コントロールmAb CR3014で投薬して携帯した。それから、マウスは25のLD₅₀ A/CH/NL/621557/03 (H7N7) ウイルスで、日0で鼻腔内接種によって負荷試験した。動物の接種が完了したあと、投与されたウイルスの実際の量は、残っている接種原からの少量の反復試料を滴定することによって推定した。接種原のウイルス力価(TCID₅₀/mL)は、MDCK細胞上で測定した。臨床徴候および体重は、例14で記載したのと同じ方法で、負荷試験の前日-1から日21の調査の終了まで毎日測定した。日0でmAbの血しょうレベルを分析し、そして日21で抗体を抑制する赤血球凝集(HI)の存在を決めるために、血液試料をD0で、負荷試験の直前に、そして感染後D21ですべてのマウスから取り出した。

10

【0197】

すべてのマウスは活発であり、そして順化期間の間に病気の徴候を示すことなく健康にみえた。図14はmAb投与の後、マウスの残存率を示す。1mg/kgのmAb CR8020またはそれより多くのもので投薬したマウスは100%の残存率を示したが、その一方、コントロールmAbグループにおいて、生き残りは0%であった。

【0198】

図14Bの中で、mAb投与の後、21日の調査期間の間に、マウスの平均体重変化が示される。mAb CR8020 3、10および30mg/kgのグループにおいて、マウスは21日の調査期間の間、重さを失う(loose)ことがなかったが、mAb CR8020の1mg/kgおよびコントロールmAbグループにおいて、重量損失が観察され、mAb CR8020 1mg/kgのグループのマウスの平均体重が日21に基線レベルに回復した。体重変化を、曲線下面積(AUC)分析で、より一層詳細に分析した(表19)。曲線下面積分析のため、マウスが死亡/フォローアップ調査の間に安楽死した場合、最後に観察された体重が日21に繰り越された。手短に言うと、日0のマウスに当たりの重さを基線値として用い、そして日0から日21までの重さ変化を、基線と比較して定めた。AUCは、基線より上の面積および基線より下の面積の合計として定義した。

20

【0199】

体重損失および用いる抗体の用量の明らかな逆の関係がある。抗体の濃度が増えたとき、体重損失は減少した。体重損失での平均差は、コントロールmAbと比較して、それぞれ、mAb CR8020の1、3、10および30mg/kgのグループにおいて47.44、79.75、86.71および80.48 g*dayであった。すべての違いは統計的に有意であった(p<0.001)。

30

【0200】

マウスの中央臨床スコアを図14C中に描く。すべての、一または二以外の、各々のグループ内の動物は、日1のポスト負荷試験にて臨床徴候(スコア=1)を示した。これは多分、調査において携帯する非負荷試験グループが日1で類似した効果を示したので(データは示さない)、ウイルス負荷試験に関連がない。

【0201】

日-1のプレ負荷試験にて3、10または30mg/kgのmAb CR8020で処置したマウスのうち、すべてが残存し、およびどの動物も観察期間中にどのような臨床徴候をも示さなかった(日2から日21のポスト感染)。日-1のプレ負荷試験にて1mg/kgのmAb CR8020で処置したマウスは、100%の残存率を示したが、8匹のうち8が3の最大臨床スコアに達する臨床徴候を示した。

40

【0202】

これらの結果は、ヒト抗H3N2抗体CR8020が、ここに開示したように、識別され、そして開発され(CR8020)、生体内でのインフルエンザH7N7の致死用量に対してヘテロサブタイプの保護を提供することができることを示す。3mg/kgまたはそれよりも多くの用量にて感染前に1日に投与するとき、mAb CR8020は完全にマウスのH7N7感染の臨床症状を防ぐこ

50

とができた。感染に先立つ1mg/kgのCR8020投与一日の用量で、すべてのマウスは致死の負荷試験に生き残り、および体重損失および観測された臨床症状は完全に21日間の試験期間の終了時に解決した。

【0203】

第二の調査を、H7N7マウスモデルでのmAb CR8020、CR8041およびCR8043の予防効果を評価し、比較するために実行した。MAb CR8020、CR8041およびCR8043〔PER.C6(R)細胞で産生される〕を、マウス致死の負荷試験モデルで、マウス適応インフルエンザA/チキン/オランダ/621557/2003 (H7N7) ウイルス (セントラル・バーテリナリー・インスティテュート (CVI)、レリスタッド、オランダ) で、マウス致死モデルの予防効果について試験した。簡単に言えば、すべてのマウス (BALB/c、雌性、齢6~8週間、n=グループごとに8) を、実験の始まりの前に、少なくとも4日間慣れさせて、それを維持した。MAb CR8020は日-1の負荷試験前にて10、3および1mg/kgでの静注にて尾静脈 (尾骨静脈) で投薬し、マウスにつき、18gの平均体重、そして0.2mLの一定用量容量を仮定した。MAb CR8041およびCR8043を、30、10、3または1mg/kgで同じ方法で投薬した。コントロールグループは30mg/kgの陰性コントロールmAb CR3014で投薬して携帯させた。mAb投与後、マウスは25のLD₅₀のマウス適合A/CH/NL/621557/03 (H7N7) ウイルスで、日0にて鼻腔内接種によって負荷試験した。臨床徴候および体重は、負荷試験の前日-1から日21の調査の終了まで毎日決定した。

【0204】

図15において、mAbsの予防的投与後の残存率、%体重変化およびマウスの臨床スコアを描く。図15Aに示すように、100%の残存は3または10g/kgのCR8020、10または30mg/kgのCR8041を受けるグループで、および30mg/kgのCR8043を受けるグループで観察された。コントロールmAbのグループで残存率は0%であった。すべての4つの用量レベルでのCR8020、およびすべての3つの用量レベルでのCR8041による予防的投与は、コントロールmAbグループに比べ、生存時間の統計的に有意な改善を提供する (ロジランク検定、 $p < 0.002$)。CR8043の1mg/kgの予防的投与は、コントロールmAbグループに比べ、生存時間の有意な改善には至っていない (ロジランク検定、 $p = 0.692$)。CR8043用量の3mg/kgまたはそれより多くの増加は、コントロールmAbグループに比べ、生存時間の統計学的に有意な改善をもたらした (ロジランク検定、 $p = 0.034$)。

【0205】

事後解析では、生存時間を、mAbs CR8020、CR8041およびCR8043の最低用量グループで比較した。1mg/kgのCR8020の予防的投与は、1mg/kgのCR8041および1mg/kgのCR8043に比べ、生存時間の統計学的に有意な改善をもたらした (ロジランク検定、それぞれ $p = 0.029$ および $p < 0.001$)。さらに、1mg/kgのCR8041の予防的投与は、1mg/kgのCR8043と比較するとき、生存時間の統計学的に有意な改善をもたらした (ロジランク、 $p = 0.004$)。

【0206】

図15Bでは、mAbsの予防的投与後21日間の調査期間中のマウスの平均体重変化を示す。mAb CR8020およびmAb CR8041の1mg/kgのグループの重度の重量損失はコントロールmAbグループのそれに相当すると観察された。mAb CR8020およびCR8041の高用量グループでは、21日間の調査の間での重量損失は限られ、および不存在であった。mAb CR8043を投薬したグループでは、重度の体重損失は、すべてのグループで観察され、30mg/kgで投薬されたグループの平均体重がほぼ日21で、基線のレベルに回復する。体重変化を、曲線下面積 (AUC) 分析で、より一層詳細に分析した (表21)。体重損失および用いる抗体の用量の明らかな逆の関係がある。抗体の濃度が増えたとき、体重損失は減少した。CR8020の1mg/kgでは、コントロールグループに比べて体重損失に統計的に有意な減少はみられなかった ($p = 0.356$)。3または10mg/kgの投与量を増やすと、コントロールグループに比べて、体重損失が統計的に有意な減少をもたらした (どちらの場合も $p < 0.001$)。CR8041の1mg/kgでは、コントロールグループに比べて体重損失に統計的に有意な減少はなかった ($p = 1$)。

【0207】

3、10または30mg/kgのCR8041への投薬を増やすことは、コントロールグループに比べて

、体重損失にて統計的に有意な減少をもたらした（すべての3例で $p < 0.001$ ）。CR8043の1、3、または10mg/kgでは、コントロールグループに比べて体重損失において統計的に有意な減少はみられなかった（それぞれ $p = 0.997$ 、 0.510 および 0.992 ）。30mg/kgへの投薬量を増やすと、コントロールグループに比べて、体重損失において統計的に有意な減少をもたらした（ $p < 0.001$ ）。体重変化のデータの平均AUCの追加的な分析では、mAbs CR8020、CR8041およびCR8043は、固定要因としてモデルに含まれる抗体および用量での分散の単変量解析を用いて比較した。CR8020の30mg/kgの投薬が調査に含まれていなかったため、比較は、抗体の1、3および10mg/kgの用量に制限された。抗体間の違いは、多重比較のためシダック（Sidak）調整を伴う限界的手段（marginal means）を用いて推定した。考えられる抗体の3回の投薬にわたって、CR8020による処置は、CR8041およびCR8043に比べて、体重損失の統計的に有意に改善された減少をもたらした（23.73および68.29g*日の限界的手段での平均差を意味し、それぞれ、 $p = 0.013$ および $p < 0.001$ ）。さらに、CR8043と比較すると、CR8041による処置は体重損失の統計的に有意に改善された減少をもたらした（44.56g*日、 $p < 0.001$ の限界的手段での差）。

10

【0208】

マウスの中央臨床スコアを図15Cに描く。すべてのマウスは、日0（3mg/kgのCR8020グループ）の一つを除いて、日0から-日3で臨床的徴候（スコア=1、ラフコート）を示した。この増加は、順化期間で、および日-1に観察されなかった。この増加した臨床スコアの原因は正確には明らかではない。日-1のプレ負荷試験にて3または10mg/kgのmAb CR8020で処置したグループのうち、中央臨床スコアは、日9のポスト負荷試験で0に戻り、一方で、コントロールグループでは、中央臨床スコアは、日8で4に達し、すべてのマウスは、日9で死亡または安楽死した。CR8020の1mg/kgグループは、日4~13から3の中央臨床スコアを示し、日15でスコア0に戻る。日-1のプレ負荷試験にて、3、10または30mg/kgのmAb CR8041で処置したグループのうち、中央臨床スコアはそれぞれ日9、10または12のポスト負荷試験にて0に戻る。CR8041の1mg/kgグループは負荷試験後の日10で4の中央臨床スコアに達した。1、3、または10mg/kgのCR8043で処置したグループは、中央臨床スコアが、それぞれ、日9、9または12で4に達し、その一方で、30mg/kgのCR8043グループの中央臨床スコアは、日6-13で3に達し、そして日14で0に戻る。

20

【0209】

上記の結果は明らかに、ヒト抗H3N2抗体CR8020、CR8041およびCR8043は、生体内でインフルエンザH7N7の致死用量に対してヘテロサブタイプの保護を提供することができることを示す。Mab CR8020は、生存時間および体重（body weight）変化の事後解析の成果に基づいて、マウス適合インフルエンザA/CH/NL/621557/03（H7N7）ウイルスに対する3つのmAbsの最も強力であることが見出された。感染する前の3または10mg/kgのmAb CR8020の用量での一日投与では、マウスの100%が致死負荷試験を生き残り、そしてH7N7感染の臨床症状が強く減少した。感染前の1mg/kgのCR8020の用量での一日投与では、マウスの75%は、この実験での致死負荷試験を生き残り、および生存マウスの臨床症状は21日間の調査期間の日15で完全に解消した。

30

例17

生体内での致死H7N7負荷試験に対するヒトIgGモノクローナル抗体の治療活性

40

【0210】

この調査を、H7N7モデルでのmAb CR8020の治療効力およびウインドウを評価するために実行した。Mab CR8020〔PER.C6(R)細胞で産生〕を、マウス致死負荷試験モデルで、マウス適応インフルエンザA/チキン/オランダ/621557/2003（H7N7）ウイルス（セントラル・パーテリナリー・インスティテュート（CVI）、レリスタッド、オランダ）で、マウス致死モデルの治療効果について試験した。簡単に言えば、すべてのマウス（BALB/c、雌性、齢6~8週間、 $n =$ グループごとに8）を、実験の始まりの前に、少なくとも4日間慣れさせて、それを維持した。Mab CR8020は日-1の負荷試験前（グループ1；予防的陽性コントロール）にて、または日1、2、3、4、5、または6の負荷試験後（グループ2~7）にて15mg/kgでの静注にて尾静脈（尾骨静脈）で投薬し、マウスにつき、18gの平均体重、そして0.2m

50

Lの一定用量容量を仮定した。グループ8は日1の負荷試験後にて陰性コントロールmAb CR3014 (15mg/kg)を受けた。マウスは25のLD₅₀のマウス適合A/CH/NL/621557/03 (H7N7) ウイルスで、日0にて鼻腔内接種によって負荷試験した。臨床徴候および体重は、負荷試験の前の日-1から日21の調査の終了まで毎日決定した。

【0211】

図16Aは、mAb CR8020 (すべてのグループで15mg/kg) またはコントロールmAb (15mg/kg) の静脈内投与の後のマウスの残存率を示す。15mg/kgのmAb CR8020が日1のプレ負荷試験または日1または3のポスト負荷試験にて投与されたとき、すべての動物はウイルス負荷試験を生き残り、ところが、コントロールmAbグループにおいて、残存率は0%でした。15mg/kgのmAb CR8020が日2および4で投与されたとき、それぞれ87.5%および50%の生き残りが観察された。これらのグループの生き残り時間は、コントロールmAbグループのそれと、統計的に有意に異なった (それぞれ、 $p=0.002$ および $p=0.014$)。日5および6に15mg/kgのCR8020で処置されたグループは0%の残存率を経験し、そしてこれらのグループの生き残り時間は、コントロールmAbグループと比較して統計的に有意な違いがなかった (それぞれ、 $p=0.837$ および $p=0.876$)。

10

【0212】

図16Bで、21日の調査期間の間のマウスの日0に関連した平均体重変化を示す。概して、mAb CR8020が負荷試験に次いで、後の時点に投与されるとき、平均体重の損失は増加する。しかし、mAb CR8020での日2および3にての処置グループの平均体重曲線は、日10で、日2の処置グループでの単なる非生存マウスのために交差する。体重変化の曲線下面積分析は、日4~6 (表22) に比較して、日-1から日3まででの処置との間で平均体重損失の激しい移行を示す。日-1のプレ負荷試験または日1、2または3のポスト負荷試験にての15mg/kgのCR8020による処置は、コントロールグループと比較して、体重損失の統計的に有意な減少をもたらした (すべての4つのグループのための $p<0.001$)。日4、5または6の15mg/kgのCR8020による処置は、コントロールグループと比較して、体重損失の統計的に有意な減少を招かなかった (それぞれ、 $p=0.566$ 、 $p=0.979$ および $p=0.858$)。

20

【0213】

マウスの中央臨床スコアを図16C中に描く。日-1のプレ負荷試験にて15mg/kgのCR8020で処置された動物のうち、すべてが生き残り、そして動物のどれも観察期間の間に少しの臨床徴候も示さなかった。日1のポスト負荷試験にて処置された動物は100%の生き残りを示したが、しかし、8の動物の7匹は、1の最大臨床スコアに達する臨床徴候を示した。8番目の動物は3の最大臨床スコアに達した。日2のポスト負荷試験にて処置された動物のうち、2つは、唯一の動物以外はすべてが生き残った。生き残る動物 (8中7つ) は、1 ($n=4$) または3 ($n=3$) の最大臨床スコアに達する臨床徴候を示した。日3のポスト負荷試験にて処置された動物は100%の生き残りを示し、そしてすべての動物は3の最大臨床スコアを有する臨床徴候を示した。日4のポスト負荷試験にて処置される動物のうち、50%は致死性的負荷試験を生き残った。生き残る動物は、3の最大臨床スコアに達する臨床徴候を示した。日5または6のポスト負荷試験で処置される動物は生き残らなかった。臨床スコアは、対象体としてのマウスでの反復測定および順序尺度上で測定したデータについてモデルに合うようにGENMOD手順 (SAS) を用いて分析した (表23)。日-1の負荷試験前および日1、2、3、または4のポスト負荷試験にて15mg/kgのmAb CR8020で処置したグループから、中央臨床スコアは、21日の調査期間のほとんどの間にコントロールmAbグループからものと統計的に有意に異なった (日8~21; すべての4グループについて $p=0.038$)。日5のポスト負荷試験にて15mg/kgのmAb CR8020で処置したグループから、中央臨床スコアは、日8だけでコントロールmAbのグループから有意に異なった ($p=0.001$)。この差は、統計的に有意であるが、関連するとはみなされない。15mg/kgのmAb CR8020で日6の処置グループの中央臨床スコアは、コントロールグループから統計的に異ならなかった。

30

40

【0214】

この調査は、致死性的H7N7マウスモデルでの日3までの負荷試験後の投与のとき、15mg/kgのmAb CR8020での治療が87.5~100%の保護を提供することを明らかにする。負荷投与後日

50

4で投与されるとき、15mg/kgのmAb CR8020による処置は部分的な保護を提供する。負荷試験後日5または日6に投与されるとき、15mg/kgのmAb CR8020の保護の効果は致死的なH7N7マウスモデルで観察されなかった。言い換えると、死の4日またはそれよりも長く前に投与されるとき、CR8020はこの致死的なマウスモデルで保護を提供する。

例18

系統学上のグループ1および2からの多重なインフルエンザサブタイプを効率的に中和するモノクローナル抗体のカクテル

【0215】

季節性インフルエンザワクチンは毎年インフルエンザA株に対する免疫を誘発する二つの異なる調製物、循環H1サブタイプの代表および循環H3株の代表で構成される。この根本的な理由は、H1およびH3サブタイプからのインフルエンザ株では、どちらかのタイプから調製したワクチンが、他のサブタイプに対する保護を誘発しないように大きく異なるということである。理想的には、インフルエンザを治療するために広範な保護のモノクローナル抗体製剤は、系統学上のグループ1(H1)およびグループ2(H3)の双方からのインフルエンザ株に対しても有効であろう。しかし、再度、HAの分子間の配列の違いにより、そのような単一抗体を見出すのは難しい。たとえば、WO 2009/115972に記載されたFab28抗体は、系統学上のグループ内でのウイルスに比べて、グループ1およびグループ2のウイルス間のエピトープの少ない保存におそらく起因してH3サブタイプのウイルスよりはるかに良好にH1サブタイプに結合し、そしてそれを中和する。双方の系統学上のグループからの多重のインフルエンザサブタイプに対して有効な単一の生成物の目標を達成するために、このようにして、カクテルにおいて2つまたはそれよりも多くの異なる抗体を組み合わせることが必要になることがある。成功するためには、そのような調製物は互いに干渉しない抗体からなるべきである。

【0216】

効率的にH1、H5およびH9サブタイプからのウイルスを中和する抗体は、WO2008/028946において、典型的な例として、抗体CR6261およびCR6323と共に記載されている。CR6261の結合領域(エピトープ)は、H1またはH5のHA分子およびCR6261の共結晶化を用いて詳細に明らかにされている[また、<http://www.pdb.org>およびEkiert(エキェルト)ら、2009年でのPDBデータベースのエントリー3GBMおよび3GBMを参照]。本発明のモノクローナル抗体を前述のCR6261抗体と組み合わせて使用することができるかどうかを研究するために、抗体が系統学上のグループ1および2の双方からのサブタイプに結合することができたかどうかを試験した。ここに、ElisaおよびFACS結合実験を、例7で説明したように、H1およびH5サブタイプ、ならびにH3およびH7サブタイプのHAの分子、CR6261、CR6323、CR8001、CR8020、CR8041およびCR8043を用いて行った。結果を、表20に要約し、そしてグループ1のウイルスを広範に中和する抗体は、グループ2およびその逆のウイルスに結合しないことを示す。抗体が互いに干渉しないので、それぞれのサブタイプに対する抗体の中和能力が維持され、グループ1および2サブタイプの双方の効率的な中和がもたらされることが期待できる。

【0217】

したがって、一方でのCR6261および/またはCR6323および他方でのCR8020、CR8041、および/またはCR8043を含むカクテルは、少なくともサブタイプH1およびH3の双方のウイルスに対して活性になる。このようにして、効率的な保護が、一つの調製物を用いて系統学上のグループ1および2からのインフルエンザサブタイプに対して可能である。

例19。

結合分子の結合動態。

【0218】

CR8020およびCR8043のパパイン切断したFabフラグメントの親和性は、Octet(オクテット)REDシステムおよびForteBio(フォルテバイオ)からのストレプトアビジンのバイオセンサーを用いて測定した。H3サブタイプのA/ウィスコンシン/67/2005(プロテイン・サイエンス)およびA/プリズベン/10/2007(プロテイン・サイエンス)のインフルエンザ赤

10

20

30

40

50

血球凝集素抗原はストレプトアビジンのバイオセンサー（フォルテバイオ）への固定化のためにビオチン化された。Fab結合実験は、それぞれ、CR8020およびCR8043のために、動態バッファ（kinetic buffer）（フォルテバイオ、18.5032）において、2.3-150nMおよび0.16-30nMの濃度範囲を使用して5回繰り返した。次のようにオクテットでの親和性測定用の実験装置（experimental set-up）があった。すなわち、1800秒間のストレプトアビジンバイオセンサーへのビオチン化血球凝集素の固定化、次いで1200秒間の連続希釈したFab CR8020およびCR8043の接続、およびその後の1800秒間の動態バッファでの解離である。結合データは、1:1モデルを用いるOctet Analysis（オクテット分析）ソフトウェアで解析した。

【 0 2 1 9 】

H3サブタイプのHAのための結合分子の親和性定数（ K_d 値）を表24に示す。

【 0 2 2 0 】

【表1】

表1:第1ラウンドのVカップ、VラムダおよびVHの増幅

プライマー名	プライマーヌクレオチド配列	配列番号
OK1 (HuVK1B)	GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC	192
OK2 (HuVK2)	GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC	193
OK3 (HuVK2B2)	GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC	194
OK4 (HuVK3B)	GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC	195
OK5 (HuVK5)	GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC	196
OK6 (HuVK6)	GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC	197
OCK (HuCK)	ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT	198
OL1 (HuVL1A)*	CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC	199
OL1 (HuVL1B)*	CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC	200
OL1 (HuVL1C)*	CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC	201
OL2 (HuVL2B)	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC	202
OL3 (HuVL3A)	TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC	203
OL4 (HuVL3B)	TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC	204
OL5 (HuVL4B)	CAG CYT GTG CTG ACT CAA TC	205
OL6 (HuVL5)	CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC	206
OL7 (HuVL6)	AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA	207
OL8 (HuVL7/8)	CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC	208
OL9 (HuVL9)#	CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC	209
OL9 (HuVL10)#	CAG GCA GGG CTG ACT CAG	210
OCL (HuCL2)X	TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG	211
OCL (HuCL7)X	AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG	212
OH1 (HuVH1B7A)+	CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG	213
OH1 (HuVH1C)+	SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG	214
OH2 (HuVH2B)	CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG	215
OH3 (HuVH3A)	GAG GTG CAG CTG GTG GAG	216
OH4 (HuVH3C)	GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG	217
OH5 (HuVH4B)	CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG	218
OH6 (HuVH4C)	CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG	219
OH7 (HuVH6A)	CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG	220
OCM (HuCIgM)	TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT	221

* 1:1:1の比で混合

1:1の比で混合

X 1:1の比で混合

+ 1:1の比で混合

【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

【表2】

表2:第2ラウンドのVカップ、VラムダおよびVHの増幅

プライマー名	プライマーヌクレオチド配列	配列番号
OK1S (HuVK1B-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC	222
OK2S (HuVK2-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC	223
OK3S (HuVK2B2-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC	224
OK4S (HuVK3B-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC	225
OK5S (HuVK5-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC	226
OK6S (HuVK6-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC	227
OJK1 (HuJK1-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC	228
OJK2 (HuJK2-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC	229
OJK3 (HuJK3-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC	230
OJK4 (HuJK4-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC	231
OJK5 (HuJK5-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC	232
OL1S (HuVL1A-SAL)*	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC	233
OL1S (HuVL1B-SAL)*	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC	234
OL1S (HuVL1C-SAL)*	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG CC	235
OL2S (HuVL2B-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC	236
OL3S (HuVL3A-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG TCC TAT GNG CTG ACT CAG CCA CC	237
OL4S (HuVL3B-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC	238
OL5S (HuVL4B-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG CTT GTG CTG ACT CAA TC	239
OL6S (HuVL5-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC	240
OL7S (HuVL6-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA	241
OL8S (HuVL7/8-SAL)	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG CTG ACY CAG GAG CC	242
OL8S (HuVL9-SAL)#	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG CTT GTG CTG ACT CAG CDM CC	243
OL8S (HuVL10-SAL)#	TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG GCA GGG CTG ACT CAG	244
OJL1 (HuJL1-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC	245
OJL2 (HuJL2/3-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC	246
OJL3 (HuJL7-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC GGC ACG GAG GAC GGT CAG CTG GGT CCC	247
OH1S (HuVH1B-SFI)+	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG TCG CAG CTG GTG CAR TCT GG	248
OH1S (HuVH1C-SFI)+	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG	249
OH2S (HuVH2B-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG TCC ACC TTG AAG GAG TCT GG	250
OH3S (HuVH3A-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG	251
OH4S (HuVH3C-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCT GG	252
OH5S (HuVH4B-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG	253
OH6S (HuVH4C-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG	254
OH7S (HuVH5A-SFI)	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG	255
OJH1 (HuJH1/2-XHO)	GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT GCC	256
OJH2 (HuJH3-XHO)	GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC	257
OJH3 (HuJH4/5-XHO)	GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	258
OJH4 (HuJH6-XHO)	GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC	259

* 1:1:1の比で混合

1:1の比で混合

+ 1:1の比で混合

【 0 2 2 2 】

10

20

30

40

【表3】

表3:第2ラウンドのVL領域の増幅の概要

テンプレート	5' プライマー	3' プライマー	プロダクト	PK/PLでの共有 (%)	プール	VLでの共有 (%)
K1	OK1S	OJK1	K1J1	25	PK1	30
	OK1S	OJK2	K1J2	25		
	OK1S	OJK3	K1J3	10		
	OK1S	OJK4	K1J4	25		
	OK1S	OJK5	K1J5	15		
K2	OK2S	OJK1	K2J1	25	PK2	4
	OK2S	OJK2	K2J2	25		
	OK2S	OJK3	K2J3	10		
	OK2S	OJK4	K2J4	25		
	OK2S	OJK5	K2J5	15		
K3	OK3S	OJK1	K3J1	25	PK3	1
	OK3S	OJK2	K3J2	25		
	OK3S	OJK3	K3J3	10		
	OK3S	OJK4	K3J4	25		
	OK3S	OJK5	K3J5	15		
K4	OK4S	OJK1	K4J1	25	PK4	19
	OK4S	OJK2	K4J2	25		
	OK4S	OJK3	K4J3	10		
	OK4S	OJK4	K4J4	25		
	OK4S	OJK5	K4J5	15		
K5	OK5S	OJK1	K5J1	25	PK5	1
	OK5S	OJK2	K5J2	25		
	OK5S	OJK3	K5J3	10		
	OK5S	OJK4	K5J4	25		
	OK5S	OJK5	K5J5	15		
K6	OK6S	OJK1	K6J1	25	PK6	5
	OK6S	OJK2	K6J2	25		
	OK6S	OJK3	K6J3	10		
	OK6S	OJK4	K6J4	25		
	OK6S	OJK5	K6J5	15		
L1	OL1S	OJL1	L1J1	30	PL1	14
	OL1S	OJL2	L1J2	60		
	OL1S	OJL3	L1J3	10		
L2	OL2S	OJL1	L2J1	30	PL2	10
	OL2S	OJL2	L2J2	60		
	OL2S	OJL3	L2J3	10		
L3	OL3S	OJL1	L3J1	30	PL3	10
	OL3S	OJL2	L3J2	60		
	OL3S	OJL3	L3J3	10		
L4	OL4S	OJL1	L4J1	30	PL4	1
	OL4S	OJL2	L4J2	60		
	OL4S	OJL3	L4J3	10		
L5	OL5S	OJL1	L5J1	30	PL5	1
	OL5S	OJL2	L5J2	60		
	OL5S	OJL3	L5J3	10		
L6	OL6S	OJL1	L6J1	30	PL6	1
	OL6S	OJL2	L6J2	60		
	OL6S	OJL3	L6J3	10		
L7	OL7S	OJL1	L7J1	30	PL7	1
	OL7S	OJL2	L7J2	60		
	OL7S	OJL3	L7J3	10		
L8	OL8S	OJL1	L8J1	30	PL8	1
	OL8S	OJL2	L8J2	60		
	OL8S	OJL3	L8J3	10		
L9	OL9S	OJL1	L9J1	30	PL9	1
	OL9S	OJL2	L9J2	60		
	OL9S	OJL3	L9J3	10		
					VL	100%

10

20

30

40

【表4】

表4: 第2ラウンドのVH領域の増幅の概要

テンプレート	5' プライマー	3' プライマー	プロダクト	PK/PLでの共有 (%)	プール	VHでの共有 (%)
H1	OH1S	OJH1	H1J1	10	PH1	25
	OH1S	OJH2	H1J2	10		
	OH1S	OJH3	H1J3	60		
	OH1S	OJH4	H1J4	20		
H2	OH2S	OJH1	H2J1	10	PH2	2
	OH2S	OJH2	H2J2	10		
	OH2S	OJH3	H2J3	60		
	OH2S	OJH4	H2J4	20		
H3	OH3S	OJH1	H3J1	10	PH3	25
	OH3S	OJH2	H3J2	10		
	OH3S	OJH3	H3J3	60		
	OH3S	OJH4	H3J4	20		
H4	OH4S	OJH1	H4J1	10	PH4	25
	OH4S	OJH2	H4J2	10		
	OH4S	OJH3	H4J3	60		
	OH4S	OJH4	H4J4	20		
H5	OH5S	OJH1	H5J1	10	PH5	2
	OH5S	OJH2	H5J2	10		
	OH5S	OJH3	H5J3	60		
	OH5S	OJH4	H5J4	20		
H6	OH6S	OJH1	H6J1	10	PH6	20
	OH6S	OJH2	H6J2	10		
	OH6S	OJH3	H6J3	60		
	OH6S	OJH4	H6J4	20		
H7	OH7S	OJH1	H7J1	10	PH7	1
	OH7S	OJH2	H7J2	10		
	OH7S	OJH3	H7J3	60		
	OH7S	OJH4	H7J4	20		
					VH	100%

10

20

30

40

【 0 2 2 4 】

【表5】

表5: 個々のIgMメモリーB細胞ライブラリーズの特徴

IgMメモリーライブラリーズ						
ドナー	細胞		ライブラリーズ			
	合計 PBL ($\times 10^6$)	%メモ リー B細 胞	サイ ズ ($\times 10^6$)	%挿 入頻 度	% ORF	% ユニーク
個体1			3	96	74	98
個体2	72.5	1.7	5	98	79	98
個体3	67.5	1.4	3	96	79	98
個体4	132.5	2.3	6	98	69	99

10

【0225】

【表6】

表6: ELISAによって測定される異なるHA亜型のHA分子に対する単鎖ファージ抗体の交差結合活性(ELISAタイター, OD492nm)。X=定められず、H3=H3亜型のHA、H7=H7亜型のHA、HB=インフルエンザウイルスBのHA。

SC #	H3	H7	HB
sc08-001	0.885	2.451	x
sc08-003	1.320	0.222	x
sc08-006	0.511	0.227	x
sc08-007	0.074	2.365	x
sc08-009	0.095	1.130	x
sc08-010	0.165	1.242	x
sc08-011	0.090	1.802	x
sc08-013	0.078	1.400	x
sc08-014	0.239	0.834	x
sc08-015	0.727	0.165	x
sc08-016	1.112	0.164	x
sc08-017	1.158	0.285	x
sc08-018	0.711	0.221	x

20

30

40

【0226】

【表 7】

表7: ELISAによって測定される異なる HA 亜型の HA 分子に対する PEG/NaCl 沈殿された、およびフィルター滅菌されたファージ抗体の交差結合活性 (OD 492 nm)。H1=H1 亜型の HA、H3=H3 亜型の HA、H5=H5 亜型の HA、H7=H7 亜型の HA、B(0)=インフルエンザウイルス B/オハイオ/01/2005 の HA。

SC #	H1	H3	H5	H7	B(0)
sc08-001	+	+	-	+	-
sc08-003	-	+	-	-	-
sc08-006	-	+	-	-	-
sc08-007	-	-	-	+	-
sc08-009	-	-	-	+	-
sc08-010	-	-	-	+	-
sc08-011	-	-	-	+	-
sc08-013	-	-	-	+	-
sc08-014	+	+	-	+	-
sc08-015	-	+	-	-	-
sc08-016	-	+	-	-	-
sc08-017	-	+	-	-	-
sc08-018	-	+	-	-	-

10

20

【 0 2 2 7 】

【表 8】

表8: PEG/NaCl 沈殿された、およびフィルター滅菌されたファージ抗体 FACS 分析 (MFI=平均蛍光強度)。PER.C6=非形質移入の PER.C6 細胞(コントロール)、mH1、mH3、mH5、mH7、mHB=亜型 H1、H3、H5、H7 およびインフルエンザ B 亜型、それぞれの膜結合 HA。

SC #	PER. C6	mH1	mH3	mH5	mH7	mHB
sc08-001	2	27	68	5	62	x
sc08-003	5	9	77	7	7	x
sc08-006	2	6	69	5	6	x
sc08-007	1	5	4	4	73	x
sc08-009	11	12	11	10	15	x
sc08-010	2	4	3	4	60	x
sc08-011	1	3	4	4	73	x
sc08-013	2	5	3	7	61	x
sc08-014	10	26	82	17	32	x
sc08-015	3	7	79	7	6	x
sc08-016	1	7	82	5	5	x
sc08-017	1	6	81	5	5	x
sc08-018	2	6	74	6	7	x

30

40

50

【 0 2 2 8 】

【 表 9 】

表9: HA 特異的免疫グロブリンの CDR 領域のデータ (配列番号)

Ig #	Vh ロー カス	HCDR 1	HCDR2	HCDR3	Vl ロー カス	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CR 80 01	3-53	SNVVS (81)	LIYTGGT TYYADSV KG (82)	VSALRFLLQ WPNYAMDV (83)	1-4	SGTRSDVG GHVYVS (84)	EVSHR PS (85)	SSYTGEGP LGV (86)
CR 80 03	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGS EKYYVDS VKG (88)	GSCDSDWT GCHDAFDI (89)	2-14	GGNNIGSR SVH (90)	DSARP S (91)	QVWESGSD LRLI (92)
CR 80 15	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGS EKYYVDS VKG (88)	GSCDSDWT GCHDAFDI (89)	2-14	GGDNIGRK SVH (93)	DNSDR PS (94)	HWGSSRD HYV (95)
CR 80 16	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGS EKYYVDS VKG (88)	GSCDSDWT GCHDAFDI (89)	1-13	TCSSNIG AGYDVH (96)	GNN (97) R PS	QSYDSLS VYV (98)
CR 80 17	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGS EKYYVDS VKG (88)	GSCDSDWT GCHDAFDI (89)	2-13	QGSLRSY YAS (99)	AKTNR PS (100)	NSRDSGN HWV (101)
CR 80 18	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGS EKYYVDS VKG (88)	GSCDSDWT GCHDAFDI (89)	1-4	TGTSDDVG GYNVVS (102)	EVSHR PS (85)	SSYTGEGP LGV (86)
CR 80 19	3-23	TSAMS (103)	GISGSGA TTYVAGS VKG (104)	DTSLFETD TSGTAPG NAFDI (105)	012	RASQISG YLN (106)	GASTL QS (107)	QQYTSPP YA (108)
CR 80 20	1-18	RPGVS (109)	WISAYNG DTYYAQQ FQA (110)	EPPLFYSS WFLDN (111)	A27	ARASQSVS MNYLA (112)	GASRR AT (113)	QQYTSPP T (114)
CR 80 21	3-23	AYAMN (115)	AIGSGGG STYYADS VKG (116)	GRDWTGGY FFDS (117)	B3	KSSQSIFY SSNNKNYL T (118)	WASTR ES (119)	QQYTSPP T (120)
CR 80 38	3-23	GYAMS (121)	DIGSGGG GTYVADS VKG (122)	SSWDRAY FFDS (123)	B3	KSSQSVLY SSTHKNYL A (124)	WASTR ES (119)	QQYTSPP T (125)
CR 80 39	4-59	SYWMS (126)	YIYRGG TSYVPSL KS (127)	KDWGSAAG SVVYFDL (128)	1-2	TGTSDDVG GYNVVS (129)	EVSHR PS (130)	SSYAGSNN LI (131)
CR 80 40	3-33	SYGMS (132)	FVWYDGS NKHYADS MKG (133)	DGGYSTWE WYFDL (134)	A26	RASQIGS NLH (135)	YASQS IT (136)	QQSSSLP T (137)
CR 80 41	1-18	SPGLS (138)	WISAYNG EKYYAQQ FQG (139)	EPPLFYSS WFLDF (140)	A27	ARASQSVS SNYLA (141)	GASRR AT (142)	QQYTSPP T (143)
CR 80 43	1-03	AYSMH (144)	WIMTAIG NTQYSQQ PQD (145)	GASWDARG WSGY (146)	B3	KSSQSVPS SSTNKNYL A (147)	WASTR ES (148)	HWYTPPW T (149)
CR 80 49	2-26	NTRMS (150)	HIFSNDE TSYRTSL KR (151)	IGSGYESS AYSTWLDP (152)	2-14	EGDTIGSK SVH (153)	NDRDR PS (154)	QVWESGSD QTV (155)
CR 80 50	4-34	DHYWS (156)	EVVHSGD TNYVPSL RN (157)	GRNVAVVG AIQRHYDY (158)	A27	RASQSVSR NYLA (159)	GASSR AT (160)	QHYGSVL VA (161)
CR 80 52	4-61	SGTYWS (162)	DISYSGS TNYVPSL KS (163)	AMAAVND RGGYNDY YMDV (164)	012	RASQIGS YLN (165)	AASL QS (166)	QQSYSTA IT (167)
CR 80 55	3-33	TYGMS (168)	FVWYDGS NKHYQDS VKG (169)	DGGYSTWE WYFDL (170)	A26	RASRIGS DLR (171)	PASQS MS (172)	QQSSSLP LT (137)
CR 80 57	3-53	VIFMS (173)	IIVIDDS TYYADSV KG (174)	ESGDFGQ TGPYHYA MDV (175)	2-14	TCSSGDI GYNVVS (176)	EVSRR PS (177)	CSFADSN ILI (178)
CR 80 69	3-43	DYTHH (179)	LISWDGG MSNYADS VKG (180)	DIRPWFPA RHFWDV (181)	L2	RASQVNY NLA (182)	VASTR AT (183)	QQYVWPP PAIT (184)

10

20

30

40

【 0 2 2 9 】

【表 10】

表10: HA 特異的 IgGs. 重鎖および軽鎖の可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸の配列の
配列番号のデータ

名称 IgG	ヌクレオチド配 列重鎖可変領域 の配列番号	アミノ酸配列重 鎖可変領域の配 列番号	ヌクレオチド配 列軽鎖可変領域 の配列番号	アミノ酸配列軽 鎖可変領域の配 列番号
CR8001	1	2	3	4
CR8003	5	6	7	8
CR8015	9	10	11	12
CR8016	13	14	15	16
CR8017	17	18	19	20
CR8018	21	22	23	24
CR8019	25	26	27	28
CR8020	29	30	31	32
CR8021	33	34	35	36
CR8038	37	38	39	40
CR8039	41	42	43	44
CR8040	45	46	47	48
CR8041	49	50	51	52
CR8043	53	54	55	56
CR8049	57	58	59	60
CR8050	61	62	63	64
CR8052	65	66	67	68
CR8055	69	70	71	72
CR8057	73	74	75	76
CR8069	77	78	79	80

10

20

30

【 0 2 3 0 】

【表 1 1】

表11: 選定された IgGs によるインフルエンザウイルス H3N2 のインビトロでの中和

中和力価 SK50 ($\mu\text{g/ml}$)	
IgG #	A/ウイスコンシン/67/2005
CR8001	11.95
CR8003	5.31
CR8015	23.78
CR8016	1.77
CR8017	2.82
CR8018	6.03
CR8019	1.98
CR8020	8.45
CR8021	1.77
CR8038	3.54
CR8039	1.8
CR8040	>40
CR8041	3.99
CR8043	1.49
CR8049	3.26
CR8050	1.77
CR8052	>40
CR8055	1.07
CR8057	0.011
CR8069	ND

10

20

30

【 0 2 3 1 】

【表 1 2】

表12: 抗H3N2 IgGsの交差結合活性。NCal.=A/ニューカレドニア/20/1999 (H1N1)、
 Wisc.=A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、NY.=A/ニューヨーク/55/2004 (H3N2)、
 Wyo.=A/ワイオミング/3/2003 (H3N2)、Neth.=A/オランダ/219/2003 (H7N7)、ND=終わっ
 ていない

IgG #	IgG Elisa 結合(滴定)					Facs 結合、[IgG]=5µg/ml, MFI			
	H1	H3	H3	H3	H7	PerC6	H1	H3	H7
	NCal.	Wisc	NY	Wyo	Neth				
CR8001	+	+	+	+	+	4	100	763	106
CR8003	-	+	+	+	-	3	3	657	5
CR8015	-	+	+	+	-	3	4	600	4
CR8016	-	+	+	+	-	3	3	840	5
CR8017	-	+	+	+	-	3	3	558	4
CR8018	-	+	+	+	-	3	3	348	4
CR8019	-	+	-	+	-	3	4	685	6
CR8020	-	+	+	+	+	4	3	657	140
CR8021	-	+	+	+	+	4	4	678	4
CR8038	-	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND
CR8039	-	+	+	+	-	4	4	503	4
CR8040	-	+	+	+	-	4	5	446	4
CR8041	-	+	+	+	+	4	4	364	120
CR8043	-	+	+	+	+	4	4	646	11
CR8049	-	+	+	+	-	3	3	542	4
CR8050	-	+	+	+	-	6	8	282	6
CR8052	-	+	+	+	-	4	4	364	5
CR8055	-	-	-	-	-	21	31	433	26
CR8057	-	+	+	+	低	7	8	943	15
CR8069	-	+	+	+	-	4	6	447	5

10

20

30

【 0 2 3 2 】

【表 1 3】

表13: 抗 H3N2 IgGs の交差中和活性、ND=終わっていない

IgG #	中和力価 SK50 ($\mu\text{g/ml}$)									
	H1			H3				H7	H10	
	A/ニューカレドニア/20/1999	A/プリズベーン/59/1007	A/ソロン諸島/IVR-145	A/ウイスコンシン/67/2005	A/広島/52/2005	A/パナマ/2000/1999	A/ヨハネスバーグ/33/1994	A/香港/1/1968	A/マガモ/オランダ/12/2000	A/チック/ドイツ/N/49
CR8001	>40	>40	>40	11.95	13.02	>40	6.51	7.07	>40	>40
CR8003	>40	>40	>40	5.31	4.27	>40	>40	ND	>40	>40
CR8015	>40	>40	>40	23.78	28.28	>40	>40	ND	>40	>40
CR8016	>40	>40	>40	1.77	8.84	28.28	>40	ND	>40	>40
CR8017	>40	>40	>40	2.82	13.55	>40	>40	ND	>40	>40
CR8018	>40	>40	>40	6.03	8.45	>40	>40	ND	>40	>40
CR8019	>40	>40	>40	1.98	0.88	>40	0.88	ND	>40	>40
CR8020	>40	>40	>40	8.45	11.95	7.74	7.07	1.77	0.028	17.68
CR8021	ND	>40	>40	1.77	2.5	>40	3.54	14.14	>40	>40
CR8038	ND	ND	ND	3.54	7.07	>40	5.95	ND	>40	>40
CR8039	>40	>40	>40	1.8	3.26	4.6	1.33	2.97	>40	>40
CR8040	>40	>40	>40	>40	>40	>40	6.77	ND	>40	>40
CR8041	>40	>40	>40	3.99	4.75	2.99	1.69	1.05	1.105	25
CR8043	>40	>40	>40	1.49	3.54	10.15	2.66	4.2	>40	14.87
CR8049	>40	>40	>40	3.26	3.54	>40	>40	ND	>40	>40
CR8050	ND	ND	ND	1.77	ND	6.5	1.49	ND	>40	>40
CR8052	>40	>40	>40	>40	>40	21.89	>40	ND	>40	>40
CR8055	>40	>40	>40	1.07	1.15	>40	3.38	ND	>40	>40
CR8057	>40	>40	>40	0.011	0.0068	0.022	2.17	2.17	>40	>40
CR8069	>40	>40	>40	ND	3.54	11.89	3.54	11.89	>40	>40

10

20

30

【 0 2 3 3】

40

【表 1 4】

表14: H3 mAbs CR8020、CR8041 およびCR8043 の結合領域周辺の配列保存

	HA2 位置																			N	年	試験株								
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32				33	34	35	36	37	38	39	
コンセンサス	W	E	G	M	V	D	G	W	Y	G	F	R	H	D	N	S	E	C	T	G	Q	A	A	D	L	K				
グループ_1	655	1972-2008	Pa
グループ_2	380	2004-2008	Hs-Wi
グループ_3	M	127	1999-2004	
グループ_4	R	91	2007-2009	
グループ_5	I	69	1968-1997	HK
グループ_6	10	2007	
グループ_7	L	6	1999-2004	
グループ_8	M	I	4	2002-2007	
グループ_9	A	3	2004	
グループ_10	K	3	1999	
グループ_11	R	F	.	.	2	2009	
グループ_12	Y	2	2003-2004	
グループ_13	F	.	.	1	2006	
グループ_14	V	1	2007	
グループ_15	X	1	2007	
グループ_16	Y	.	.	R	1	2008	
グループ_17	N	1	2003	
グループ_18	C	1	2001	
グループ_19	N	1	1999	
グループ_20	I	1	1975	
グループ_21	M	R	1	2008	
グループ_22	M	1	2002	
グループ_23	.	K	R	1	2002	

10

20

【 0 2 3 4】

【表 1 5】

表15: 種々のインフルエンザA株での中和力価

IgG#	H1	H3						H7	H10		
	3 H1N1 株(1999-2007)	A/タイヌコ/57/2005	A/広島/52/2005	A/パチヤ/2000/1999	A/ヨハネスバーグ/33/1994	A/香港/1/1968	A/HK/1/68-H2D	A/HK/1/68-M2C	A/マサモ/オランダ/12/2000	A/チツタ/NL/621557/03-ma	A/チツタ/ドイツ/N/49
CR8001	>40	11.9	13.0	>40	6.5	7.1	5.26	tbd	>40	38.8	>40
CR8020	>40	3.5	3.5	5.0	2.0	1.8	1.8	1.8	2.5	27.6	6.6
CR8041	>40	3.3	3.5	5.0	1.6	1.7	1.8	1.7	38.0	258.8	37.2
CR8043	>40	1.6	1.8	4.2	1.2	0.8	1.8	1.2	>40	>40	6.6
CR8057	>40	0.005	0.003	0.01	>40	>40	>40	>40	>40	-	>250

30

40

すべてのSK50力価でug/ml、マウス適応株、Ma ‘パンデミック’ H7株

【 0 2 3 5】

【表 16】

表16: 0日でのベースラインからの体重量変化の曲線下の平均面積

調査	グループ	平均 AUC (g*日)	SD (g*日)	p-値 ^a (mAb 対 コント ロール)	p-値 ^b
1	30 mg/kg コントロ ール	-82.86	14.15		
	1 mg/kg CR8020	-63.21	30.91	0.09	
	3 mg/kg CR8020	16.95	8.20	<0.001	<0.001 (1 対 3 mg/kg)
	10 mg/kg CR8020	31.44	9.09	<0.001	0.454 (3 対 10 mg/kg)
	30 mg/kg CR8020	25.62	12.94	<0.001	ns
2	30 mg/kg コントロ ール	-86.51	8.83		
	1 mg/kg CR8041	-68.26	11.41	0.004	
	3 mg/kg CR8041	19.51	13.82	<0.001	<0.001 (1 対 3 mg/kg)
	10 mg/kg CR8041	35.23	11.06	<0.001	0.061 (3 対 10 mg/kg)
	30 mg/kg CR8041	28.21	7.89	<0.001	ns
	1 mg/kg CR8043	-66.19	8.74	<0.001	
	3 mg/kg CR8043	8.48	11.81	<0.001	<0.001 (1 対 3 mg/kg)
	10 mg/kg CR8043	31.57	7.90	<0.001	<0.001 (3 対 10 mg/kg)
	30 mg/kg CR8043	27.72	6.61	<0.001	0.997 (10 対 30 mg/kg)

10

20

^a mAbドーズグループの平均AUC値を、多重比較のためのダネットの調整 (Dunnet 's adjustment) を伴う分散の分析を用い、コントロールのAbグループと比較した。

30

^b 抗体濃度当たりの平均AUC値を、多重比較のためのチューキーの調整 (Tukey 's adjustment) を伴う分散の分析を用い、各抗体について比較した。

ns=統計的に有意でない

【 0 2 3 6 】

【表 17】

表17: 0日でのベースラインからの体重量変化の曲線下の平均面積

グループ	平均 AUC (g*日)	SD (g*日)	p-値 ^a
15 mg/kg CR8020 の-1 日	33.44	10.06	<0.001
15 mg/kg CR8020 の 1 日	10.70	16.23	<0.001
15 mg/kg CR8020 の 2 日	-15.23	11.60	<0.001
15 mg/kg CR8020 の 3 日	-65.45	35.90	0.003
15 mg/kg CR8020 の 4 日	-85.95	23.14	0.742
15 mg/kg CR8020 の 5 日	-100.88	12.78	0.986
15 mg/kg CR8020 の 6 日	-84.91	12.28	0.653
コントロール mAb の 1 日	-95.76	11.55	

40

50

^a15 mg/kg mAb CR8020投薬されたグループの平均AUC値を、事後解析 (post-hoc analysis) において多重比較のためのダネットの調整を伴う分散の分析を用い、コントロールのAbグループと比較した。15 mg/kg mAb CR8020での予防上の処置は、コントロールグループと比較して重量損失での統計的に有意な減少をもたらした ($p < 0.001$)。また、1日、2日または3日での15 mg/kg mAb CR8020での治療上の処置は、コントロールグループと比較して重量損失での統計的に有意な減少をもたらした (それぞれ、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ および $p < 0.003$)。4日、5日または6日での15 mg/kg mAb CR8020での処置は、コントロールグループと比較して重量損失での統計的に有意な減少をもたらさなかった (すべての3つのグループについて $p < 0.05$)。

【 0 2 3 7 】

【 表 1 8 】

10

表18: 中央臨床スコア (Median clinical scores)。

コントロール mAb グループと比較した臨床スコア間の有意差を伴う間隔をリストする (例は、15 mg/kg の-1日およびコントロールグループの間で、臨床スコアにおける違いは4日を超えてから有意である)。

グループ	コントロールに関連して	
	間隔 (日数) (s)	p
15 mg/kg CR8020 の-1日	4-21	≤ 0.001
15 mg/kg CR8020 の1日	2-21	≤ 0.001
15 mg/kg CR8020 の2日	3, 5-21	≤ 0.001
15 mg/kg CR8020 の3日	3, 5-21	≤ 0.012
15 mg/kg CR8020 の4日	3, 5-21	≤ 0.034
15 mg/kg CR8020 の5日	3	≤ 0.001
15 mg/kg CR8020 の6日	3	≤ 0.001

20

30

【 0 2 3 8 】

【表 19】

表19: 0日でのベースラインからの体重量変化の曲線下の平均面積。

グループ	平均 AUC (g*日)	SD (g*日)	p-値 ^a (mAb CR8020 対コントロール)
30 mg/kg コントロール	-93.06	10.88	
1 mg/kg CR8020	-45.61	15.05	<0.001
3 mg/kg CR8020	-13.31	9.51	<0.001
10 mg/kg CR8020	-6.35	12.40	<0.001
30 mg/kg CR8020	-12.59	7.35	<0.001

10

^a mAb CR8020投薬されたグループの平均AUC値を、事後解析において多重比較のためのダネットの調整を伴う分散の分析を用い、コントロールのAbグループと比較した。

【 0 2 3 9 】

【表 20】

20

表20: インフルエンザウイルス HAに特異的なモノクローナル抗体の結合および中和の特性の概略。

	H1		H3	
	結合	VNA	結合	VNA
CR6261	+	+	-	-
CR6323	+	+	-	-
CR8001	+	-	+	+
CR8020	-	-	+	+
CR8041	-	-	+	+
CR8043	-	-	+	+

30

【 0 2 4 0 】

【表 2 1】

表21: 0日でのベースラインからの体重量変化の曲線下の平均面積。

グループ	平均AUC (g*日)	SD (g*日)	p-値 (mAb対 コントロール) ^a
30 mg/kg コントロール	-101.38	11.67	
1 mg/kg CR8020	-82.58	34.71	0.356
3 mg/kg CR8020	-5.70	23.97	<0.001
10 mg/kg CR8020	2.13	13.13	<0.001
1 mg/kg CR8041	-105.05	17.04	1
3 mg/kg CR8041	-32.22	30.87	<0.001
10 mg/kg CR8041	-20.06	17.92	<0.001
30 mg/kg CR8041	-10.01	10.11	<0.001
1 mg/kg CR8043	-107.75	11.04	0.997
3 mg/kg CR8043	-117.88	5.91	0.510
10 mg/kg CR8043	-94.00	23.23	0.992
30 mg/kg CR8043	-56.82	17.55	<0.001

10

20

^a mAb CR8020投薬されたグループの平均AUC値を、事後解析において多重比較のためのダネットの調整を伴う分散の分析を用い、コントロールのAbグループと比較した。

【 0 2 4 1】

【表 2 2】

表22: 0日でのベースラインからの体重量変化の曲線下の平均面積。

グループ	平均AUC (g*日)	SD (g*日)	p-値 (mAb対 コントロール) ^a
15 mg/kg CR8020 の-1日	-7.68	8.17	< 0.001
15 mg/kg CR8020 の1日	-20.43	8.41	< 0.001
15 mg/kg CR8020 の2日	-38.18	37.35	< 0.001
15 mg/kg CR8020 の3日	-28.27	9.63	< 0.001
15 mg/kg CR8020 の4日	-99.11	37.90	0.566
15 mg/kg CR8020 の5日	-93.62	10.29	0.979
15 mg/kg CR8020 の6日	-94.06	7.65	0.858
コントロール抗体の1日	-93.33	10.58	

30

40

^a 平均AUC 値は、アウトライヤーにあまり重きを置かないロバストレッグ手法 (SAS) を用いて比較した。

【 0 2 4 2】

【表 2 3】

表23: 中央臨床スコア。

グループ	コントロールに関連して	
	間隔 (日数(s))	p
15 mg/kg CR8020 の-1日	4-21	≤0.001
15 mg/kg CR8020 の1日	2, 5-21	≤ 0.012
15 mg/kg CR8020 の2日	6-21	≤ 0.038
15 mg/kg CR8020 の3日	7-21	≤ 0.035
15 mg/kg CR8020 の4日	5, 6, 8-21	≤ 0.016
15 mg/kg CR8020 の5日	8	<0.001
15 mg/kg CR8020 の6日	-	≥ 0.449

10

【 0 2 4 3】

【表 2 4】

20

表24: 結合の動力学

A/ウィスコンシン

Fab	kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (nM)
CRF8020	2.03E+05	2.08E-03	11.2
CRF8043	4.08E+05	9.86E-05	0.3

A/ブリズベーン

Fab	kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (nM)
CRF8020	1.81E+05	1.43E-03	8.9
CRF8043	3.12E+05	8.69E-05	0.3

30

【 0 2 4 4】

重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列：

【 0 2 4 5】

>SC08-001 VH DNA (配列番号1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCGATCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATT
 CACCGTCAGTAGCAACTACGTGAGCTGGGTCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTCTCACTTATTTACACGG
 GTGGTACCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAATACGGTGTTCCTT
 CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACGCGGCCATGTATTACTGTGCGAGAGTGTTCAGCATTACGGTTTTTTGCAGTGGCC
 AAACACGCGATGGACGTC

40

【 0 2 4 6】

>SC08-001 VH プロテイン (配列番号2)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYVSWVRQAPGKGLEWLSLIYTGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVFL
 QMNSLRAEDAAMYCARVSALRFLQWPYAMDV

【 0 2 4 7】

>SC08-001 VL DNA (配列番号3)

50

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACGGTCGATCACCATCTCCTGCTCTGGAACCCGCAG
 TGACGTTGGTGGTCATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCA
 GTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGCCTC
 CAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCCCCCTAGGAGTG

【 0 2 4 8 】

>SC08-001 VL プロテイン (配列番号4)

QSALTQPASVSGSPGRS I T I SCSGTRSDVGGHNYVSWYQQHPGKAPKLM I YEVSHPSPGVSNRFSGSKSGSTASLT I SGL
 QSEDEADYYCSSYTGEGLGV

【 0 2 4 9 】

>SC08-003 VH DNA (配列番号5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGAATT
 CAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATGAAGCAAG
 ATGGAAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCATTATAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGTTCCCTGTGACGATTCTTGGACTGG
 TTGTCATGATGCTTTTGACATC

【 0 2 5 0 】

>SC08-003 VH プロテイン (配列番号6)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFT I SRDNAKNSLY
 LQMNSLRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFD I

【 0 2 5 1 】

>SC08-003 VL DNA (配列番号7)

GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTCTAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTGCCTGTGGGGGAAACAACATTGGGAG
 TAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTATGATGATAGCGCCCGGCCCTCAG
 GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAGGCCGGGGATGAA
 GCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAGAGTGGTAGTGATCTACGACTGCTT

【 0 2 5 2 】

>SC08-003 VL プロテイン (配列番号8)

VLTQPPSVSVAPGQTAR I ACGNN I GSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDARPSG I PERFSGSNSGNTATLT I SRVEAGDE
 ADYYCQWESGSDLRLL

【 0 2 5 3 】

>SC08-015 VH DNA (配列番号9)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGAATT
 CAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATGAAGCAAG
 ATGGAAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCATTATAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGTTCCCTGTGACGATTCTTGGACTGG
 TTGTCATGATGCTTTTGACATC

【 0 2 5 4 】

>SC08-015 VH プロテイン (配列番号10)

QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFT I SRDNAKNSLY
 LQMNSLRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFD I

【 0 2 5 5 】

>SC08-015 VL DNA (配列番号11)

GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTCTAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAG
 AAAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCCTGGCCCCTGTGCTGGTCTCAATGATAATAGCGACCGGCCCTCAG
 GGATCCCTGCGCGATTCTCTGGCTCCAATCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAG
 GCCGACTATTACTGTCACGTGTGGGGTAGTAGTCGTGACCATTATGTC

【 0 2 5 6 】

>SC08-015 VL プロテイン (配列番号12)

10

20

30

40

50

VLTPPPSVSVAPGQTAKITCGGDNIGRKSVMHWYQQKPLAPVLVNDNSDRPSGIPARFSGSNSGNTATLTSRVEAGDE
ADYYCHVWGSSRDHYV

【 0 2 5 7 】

>SC08-016 VH DNA (配列番号13)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGAATT
CAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATGAAGCAAG
ATGGAAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCATTATAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCCTGTGACGATTCTTGACTGG
TTGTCATGATGCTTTTGACATC

【 0 2 5 8 】

10

>SC08-016 VHプロテイン(配列番号14)

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSSWRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

【 0 2 5 9 】

>SC08-016 VL DNA (配列番号15)

CAGTCTGCTGTCGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTC
CAACATCGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACA
ACAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGATCCAGGTCTGGCCCTTTAGCCCTCCTGGCCATCACTGGGCTC
CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCTATGACAGCAGCCTGAGTGTATTATGTC

【 0 2 6 0 】

20

>SC08-016 VLプロテイン(配列番号16)

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDRFSGSRSGPLALLAITGL
QAEDEADYYCQSYDSSLSVYV

【 0 2 6 1 】

>SC08-017 VH DNA (配列番号17)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGAATT
CAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATGAAGCAAG
ATGGAAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCATTATAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCCTGTGACGATTCTTGACTGG
TTGTCATGATGCTTTTGACATC

【 0 2 6 2 】

30

>SC08-017 VHプロテイン(配列番号18)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSSWRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

【 0 2 6 3 】

>SC08-017 VL DNA (配列番号19)

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCT
CAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGCTAAAACCAACCGGC
CCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAAACACTGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAG
GATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTA

【 0 2 6 4 】

40

>SC08-017 VLプロテイン(配列番号20)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYAKTNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLITGAQAE
DEADYYCNSRDSSGNHVV

【 0 2 6 5 】

>SC08-018 VH DNA (配列番号21)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGAATT
CAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATGAAGCAAG
ATGGAAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCATTATAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCCTGTGACGATTCTTGACTGG

50

TTGTCATGATGCTTTTGATATC

【 0 2 6 6 】

>SC08-018 VH プロテイン (配列番号22)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLY
LQMNSLRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

【 0 2 6 7 】

>SC08-018 VL DNA (配列番号23)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG
TGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCA
GTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGCCTC
CAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCCCCCTAGGAGTG

10

【 0 2 6 8 】

>SC08-018 VL プロテイン (配列番号24)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEYVSHRPSGVSNRFSGSKSGSTASLTISGL
QSEDEADYYCSSYTGEGLGV

【 0 2 6 9 】

>SC08-019 VH DNA (配列番号25)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGGAGCCTCTGGAAT
CAGCGTTAGCACTTCTGCCATGAGCTGGGTCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTA
GTGGTGTACACATACTACGCAGGCTCCGTGAAGGGTGCATTACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACACTGCAT
CTGCAAATGAGCAGACTGAGAGCCGAGGACACGGCCATTTACTACTGTGCGAAAGATACCTCCTTGTGTTGAGTATGATAC
AAGTGGTTTTACGGCTCCCGCAATGCTTTTTGATATC

20

【 0 2 7 0 】

>SC08-019 VH プロテイン (配列番号26)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGISVSTSAMSWVRQVPGKGLEWVSGISGSGATYYAGSVKGRFTISRDKSKNTLH
LQMSRLRAEDTAIYYCAKDTSLFEYDTSGFTAPGNAFDI

【 0 2 7 1 】

>SC08-019 VL DNA (配列番号27)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGATGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GAGCATTAGCGGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTT
TGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCT
GAAGACTATGCAACTTACTACTGTCAACAGACTTACACCTCCCCTCCGTACGCT

30

【 0 2 7 2 】

>SC08-019 VL プロテイン (配列番号28)

DIQXTQSPSSLSASVDDRVTITCRASQSIGYLNWYQQKPGKAPNLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQP
EDYATYYCQQTYSPPYA

【 0 2 7 3 】

>SC08-020 VH DNA (配列番号29)

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGAGCTGAGGTGAAGACCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGATA
CACCTTTACCAGGTTTGGTGTGCTGAGCTGGATACGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGGATGGATCAGCGCTT
ACAATGGTGACACATACTATGCACAGAAGTTCCAGGCCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGACCACAGCCTAC
ATGGAGATGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGAAACCCCCCTTTTTTACAGCAGCTG
GTCTCTTGACAAC

40

【 0 2 7 4 】

>SC08-020 VH プロテイン (配列番号30)

QVQLQQSGAEVKTPGASVKVSKASGYTFTRFGVSWIRQAPGGGLEWIGWISAYNGDTYYAQKFQARVTMTTDTSTTTAY
MEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN

【 0 2 7 5 】

>SC08-020 VL DNA (配列番号31)

50

GAAATTGTGWTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA
GAGTGTTAGCATGAACTACTTAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCGTCCC
GCAGGGCCACTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGCAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTACCTCACCTCGGACG

【 0 2 7 6 】

>SC08-020 VL プロテイン (配列番号32)

EIVXTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRISGSGSGTDFTLTI SRLE
PADFAVYYCQQYGTSPRT

【 0 2 7 7 】

>SC08-021 VH DNA (配列番号33)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGCGCCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTGGTGGTA
GTGGCGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAAGATCCTGTAT
CTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAAAAGCCGGGATTGGACTGGGGTTACTT
CTTTGACTCC

【 0 2 7 8 】

>SC08-021 VH プロテイン (配列番号34)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWRQAPGKGLEWVSAIGSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKIKLY
LQMNGLRAEDTAIYYCAKGRDWTGGYFFDS

【 0 2 7 9 】

>SC08-021 VL DNA (配列番号35)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCA
GAGTATTTTCTACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAACTTGGTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCA
TTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGAGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGCGAAAAGCAGTAGCTGGGACCGGGCCTACTT

【 0 2 8 0 】

>SC08-021 VL プロテイン (配列番号36)

DIQXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSI FYSSNNKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYT

【 0 2 8 1 】

>SC08-038 VH DNA (配列番号37)

GAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CGCCTTTAGCGGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGATATTGGTGGTA
GTGGTGGTGGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGCAGTAGCTGGGACCGGGCCTACTT
CTTTGACTCC

【 0 2 8 2 】

>SC08-038 VH プロテイン (配列番号38)

VQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGYAMSWWRQAPGKGLEWVSDIGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCAKSSSWDRAYFFDS

【 0 2 8 3 】

>SC08-038 VL DNA (配列番号39)

GATATTGTGATGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCA
GAGTGTTTTATACAGCTCCATCCATAAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCA
TTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGCGAAAAGCAGTAGCTGGGACCGGGCCTACTT

【 0 2 8 4 】

>SC08-038 VL プロテイン (配列番号40)

DIIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSIHKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQAEDVAVYYCQQYYRSPPT

10

20

30

40

50

【 0 2 8 5 】

>SC08-039 VH DNA (配列番号41)

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACGTGCACTGTCTCTGGCGG
 CTCATCGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATACGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACC
 GTGGGGTACCAGTTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAGCCAGTTCACCTTG
 AAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGGACTGGGGATCAGCGGCCGGAAGTGT
 CTGGTACTTCGATCTC

【 0 2 8 6 】

>SC08-039 VHプロテイン (配列番号42)

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGSYWWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYRGGTSYNPSLKSRVTISVDTSKSQFTL
 KLNSVTAADTAVYYCARKDWGSAAGSVWYFDL

10

【 0 2 8 7 】

>SC08-039 VL DNA (配列番号43)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG
 TGACGTTGGTGGTTATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTCGTGAGGTCA
 GTAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTC
 CAGGCTGAGGATGAGGCTGAATACTACTGCAGCTCGTATGCAGGCAGCAACAATCTGATA

【 0 2 8 8 】

>SC08-039 VLプロテイン (配列番号44)

QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIREVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGL
 QAEDEAEYYCSSYAGSNL I

20

【 0 2 8 9 】

>SC08-040 VH DNA (配列番号45)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT
 CGCTTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGACCTTTATATGGTATG
 ATGGAAGTAATAAACTACTATGCAGACTCCATGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGATGGGGATATAGCACCTGGGAATG
 GTACTTCGATCTC

【 0 2 9 0 】

>SC08-040 VHプロテイン (配列番号46)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFVFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTFIWDGNSNKHYADSMKGRFTISRDNSKNTLY
 LQMSSLRAEDTAVYYCARDGGYSTWEWYFDL

【 0 2 9 1 】

>SC08-040 VL DNA (配列番号47)

GAAATTTGCTGACTCAGTCTCCGGACTTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAGAGTACCATCACCTGCCGGGCCAGTCA
 GGGCATTGGCAGTAACTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCCAGT
 CCATCACAGGGTCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGTT
 GAAGATGCTGCAGTGTATTACTGTCATCAGAGTAGTAGTTTACCGCTCACT

【 0 2 9 2 】

>SC08-040 VLプロテイン (配列番号48)

EIVLTQSPDFQSVTPKERVTITCRASQIGSNLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSIGVPSRFSGRGSGTDFTLTINSLEV
 EDAAVYYCHQSSSLPLT

【 0 2 9 3 】

>SC08-041 VH DNA (配列番号49)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCAGGCTTCGGGTTA
 CACCTTTACCTCCTTTGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTT
 ACAATGGTGAAATAAAGTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCTCCATGACCACAGACACATCAACGAGGACAGCCTAC
 ATGGAGGTGCGGAGCCTCAGACCTGACGACACGGCCGTATACTACTGTGCGAGAGAGCCCCCCTGTATTTTCAGTAGCTG

30

40

50

GTCTCTCGACTTC

【 0 2 9 4 】

>SC08-041 VH プロテイン (配列番号50)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSFGLSWVRQAPGQGPEWMGW I SAYNGE I KYAQKFQGRVSMITTDSTRAY
MEVRSRLRPDDTAVYYCAREPPLYFSSWSLDF

【 0 2 9 5 】

>SC08-041 VL DNA (配列番号51)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA
GAGTGTTAGCAGCAACTACTTAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCAA
GGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGCTCACCTCGGACG

10

【 0 2 9 6 】

>SC08-041 VL プロテイン (配列番号52)

E I VLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWFQQKPGQAPRLL I YGASRRATG I PDRFSGSGSGTDFTLT I SRLE
PEDFAVYYCQQYDSSPRT

【 0 2 9 7 】

>SC08-043 VH DNA (配列番号53)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTTTCTGCAAGGCTTCTGGATA
CACCTTCACTGCCTATTCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGCCTTGAGTGGTTGGGATGGATCAACACTG
CCATCGGTAACACACAATATTCACAGAAGTTCCAGGACAGAGTCAACCATTACCAGGGACACATCTGCGCGCACATCGTAC
ATGGAACCTGAGCAGCCTGAGATCTGGAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGGGCCTCTTGGGACGCCCGTGGGTG
GTCTGGCTAC

20

【 0 2 9 8 】

>SC08-043 VH プロテイン (配列番号54)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYSMHWVRQAPGQSLEWLGW I NTA I GNTQYSQKFQDRVT I TRDTSARTSY
MELSSLRSGDTAVYFCARGASWDARGWSGY

【 0 2 9 9 】

>SC08-043 VL DNA (配列番号55)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCA
GAGTGTTTTTTCCAGCTCCACCAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGGTGCTAA
TTTACTGGTCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTCCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGCAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATTATACTGCTCCGTGGACG

30

【 0 3 0 0 】

>SC08-043 VL プロテイン (配列番号56)

D I QXTQSPDSLAVSLGERAT I NCKSSQSVFSSSTNKNYLAWYQQKPGQPPKVL I YWSSSTRESGVPDRFSASGSGTDFTLT
I SSLQAADVAVYYCHQYYTAPWT

【 0 3 0 1 】

>SC08-049 VH DNA (配列番号57)

CAGGTACACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTACTGGTGAAGCCAAAAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTT
CTCACTCAGCAACTAGAAATGGGTGTGAGTTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATCT
TTTCGAACGACGAAACATCCTACAGGACATCTCTGAAGAGGAGGCTCACCATCTCCCAGGACATCTCCAAAAGTCAGGTG
GTCCTTTCTATGACCAACGTGGACCCTGCAGACACAGCCACATATTTTTGTGCACGGATCGGGTCTGGCTATGAGAGTAG
TGCTTACTCCACCTGGCTCGACCC

40

【 0 3 0 2 】

>SC08-049 VH プロテイン (配列番号58)

QVTLKESGPVLVKPKETLTLTCTVSGFSLNTRMGVSW I RQPPGKALEWLAH I FSNDETSYRTSLKRRLT I SQD I SKSQV
VLSMTNVDPADTATYFCAR I GSGYESSAYSTWLDP

【 0 3 0 3 】

>SC08-049 VL DNA (配列番号59)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGTCAGTGGCCCCAGGGCAGACGGCCAGGCTCACCTGTGAGGGAGACACAAT

50

TGGCAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGTCGTCTATAATGATCGCGACCGGC
 CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGCGCACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGG
 GATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGAGAGTGGAGGTGATCAGACTGTC

【 0 3 0 4 】

>SC08-049 VL プロテイン (配列番号60)

QSVLTQPPSVSVAPGQTARLTCEGDTIGSKSVHWYQQRPGQAPVLVVYNDRDRPSGIPERFSGSNSGRTATLTI SRVEAG
 DEADYFCQVWESGGDQTV

【 0 3 0 5 】

>SC08-050 VH DNA (配列番号61)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTATTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTGTATGGTGG
 GTCGTTCACTGATCACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGTGAAGTCGTTTATA
 GTGGAGACACCAACTACACCCCGTCCCTCAGAAATCGAGTTTCCATATCGGTGCGACTCGTCCAAGAATCAGTTCTCCCTG
 AGGCTGGGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTCTACTGTGCGAGAGGCAGGAATGTTGCGGTAGTTGGTGCTAT
 TCAGAGGCACTATGACTAC

10

【 0 3 0 6 】

>SC08-050 VH プロテイン (配列番号62)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSTFDHYWSWIRQSPGKGLEWIGEYVHSGDTNYTPSLRNRVSI SVDSSKNQFSL
 RLGSVTAADTAVYYCARGRNVAVVGAIQRHVDY

【 0 3 0 7 】

>SC08-050 VL DNA (配列番号63)

GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA
 GAGTGTTAGCAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAGCCTGGCCTGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCGA
 GCAGGGCCACTGGCGTCCCAGACAGTTTCACTGGCAGGGGGTCTGACACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTCCCGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTTCGGTCCCTGTAGCT

20

【 0 3 0 8 】

>SC08-050 VL プロテイン (配列番号64)

EIVMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSRNYLAWYQQKPKGLAPRLISGASSRATGVPDRFSGRGSDDFTLTI SRLE
 PEDFAVYYCQHYGSLVLA

30

【 0 3 0 9 】

>SC08-052 VH DNA (配列番号65)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG
 CTCCGTGACAGTGGTACTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGGATATCT
 CTTACAGTGGGAGACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATTTCTAGAGACACGTCCAAGAACCCTGGTC
 TCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGCATTACTGTGCGAGAGCGATGGCGGCTTATAATTATGA
 CAGGGGTGGTTATAACGACTACTACTACATGGACGTC

【 0 3 1 0 】

>SC08-052 VH プロテイン (配列番号66)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGTYYWSWIRQPPGKGLEWIGDI SYSGSTNYNPSLKSRTVTSRDTSKNLV
 SLKLTSTVTAADTAVHYCARAMAAVNYDRGGYNDYYMDV

40

【 0 3 1 1 】

>SC08-052 VL DNA (配列番号67)

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGCGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
 GGGCATTAAACACCTATTTAAATTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAGGCCCTAAGGTCCCTGATCTTTGCTGCATCCACTT
 TGCAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGTTCTGGGACAGAATTCCTCAACATCAACAATCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACTGCGATCACT

【 0 3 1 2 】

>SC08-052 VL プロテイン (配列番号68)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINTYLNWYQQKPKGKAPKVLIFAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLNINNLQP

50

EDFATYYCQQSYSTAIT

【 0 3 1 3 】

>SC08-055 VH DNA (配列番号69)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCGTCTGGATT
 CAGCTTACCACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCTTTATTTGGTATG
 ATGGAAGTAACAAACACTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAGGACAATTCCAACAACATGTTGTAT
 CTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTCGCCGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAGATGGGGGATATAGCACCTGGGAATG
 GTACTTCGATCTC

【 0 3 1 4 】

>SC08-055 VH プロテイン (配列番号70)

EVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFSFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAFI WYDGSNKHYQDSVKGRFTI SKDNSNMMLY
 LQMDSL RVADTAVYYCVRDGGYSTWEWYFDL

10

【 0 3 1 5 】

>SC08-055 VL DNA (配列番号71)

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTTCAGTCTGTGGCTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAGTCG
 GAGCATTGGTAGTGACTTGCCTGGTTTCAGCAGAGGCCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAGTTTGCTTCCCAGT
 CCATGTCAGGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAGAGATTTACCCCTACCATCAGTAGCCTGGAGGCT
 GAAGATGCTGCTACGTATTACTGTTCATCAGAGTAGTAGTTTACCGCTCACT

【 0 3 1 6 】

>SC08-055 VL プロテイン (配列番号72)

EI VLTQSPDFQSVAPKEKVTI TCRASRSI GSDLHW FQQRPDQSPKLLI KFASQSMSGVPSRFSGSGSGRDFTLTI SSLEA
 EDAATYYCHQSSSLPLT

20

【 0 3 1 7 】

>SC08-057 VH DNA (配列番号73)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAACTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTT
 CACCGACAGTGTTCATCTTCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGTGTCTCAATTATTTATATCG
 ATGATTCCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGACACAATTCCATGGGCACAGTGTTCCTT
 GAAATGAACAGCCTGAGACCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGACAGAGAGCGGAGACTTTGGTGACCAAACGGG
 TCCCTATCATTACTACGCTATGGACGTC

【 0 3 1 8 】

>SC08-057 VH プロテイン (配列番号74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVI FMSWVRQAPGKGLECVSI IYI DDSTYYADSVKGRFTI SRHNSMGTVFL
 EMNSLRPDDTAVYYCATESGDFGDQTPYHYAMDV

30

【 0 3 1 9 】

>SC08-057 VL DNA (配列番号75)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTTCGATACCATCTCCTGCACTGGAAGCAGCGG
 TGACATTGGTGGTTATAACGCTGTCTCCTGGTACCAACACCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTGATGATTTATGAGGTCA
 CTAGTCGGCCCTCAGGGGTTTCCGATCGTTCTCTGCGTCCAGGTCTGGCGACACGGCCTCCCTGACTGTCTCTGGTCTC
 CAGGCTGAGGACGAGGCTCACTATTACTGCTGCTCATTTGCAGACAGCAACATTTTGATT

40

【 0 3 2 0 】

>SC08-057 VL プロテイン (配列番号76)

QSALTQPASVSGSPGQSI TI SCTGSSGD IGGYNAVSWYQHHPGKAPKLM IYEVTSRPSGVSDRFSASRSGDTASLTVSGL
 QAEDEAHYYCCSFADSN I LI

【 0 3 2 1 】

>SC08-069 VH DNA (配列番号77)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGTCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGCTT
 CACGTTTGAGGATTATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGTTCCGGGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGCGCTCATTAGTTGGG
 ATGGCGGTATGTCAAACATATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCTCTGTAT

50

CTGCAAGTGAGCAGTCTGAGAAGTGAAGACACCGCCCTGTATTACTGTGCAAAAAGATATACGACCCCGTATGCCAGCTCG
TCACTTTATGGACGTC

【 0 3 2 2 】

>SC08-069 VH プロテイン (配列番号78)

EVQLVETGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTTFEDYTMHWVRQVPGKGLEWVALI SWDGGMSNYADSVKGRFTI SRDNSKNSLY
LQVSSLRSED TALYYCAKDIRPRMPARHFMDV

【 0 3 2 3 】

>SC08-069 VL DNA (配列番号79)

GAAATTTGTGTTGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCGGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA
GAATGTCAACTACAACCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGTTGCATCCACCA
GGGCCACTGGTATCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGCGATCACT

10

【 0 3 2 4 】

>SC08-069 VL プロテイン (配列番号80)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQNVNYNLAWYQQKPGQAPRLLIYVASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLISSLQS
EDFAVYYCQQYNWPPAIT

【 0 3 2 5 】

>CR6261 HC DNA (配列番号185)

gaggTgcagc	fggtggagtc	fggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaagtc	60	
tcttgcaagg	cttctggagg	ccccttccgc	agctatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120	20
cctggacaag	ggcctgagtg	gatgggaggg	atcatcccta	tttttggtag	aacaaaatac	180	
gcaccgaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	atctcgcggg	cacagtttac	240	
atggagctga	gcagcctgcg	atctgaggac	acggccatgt	actactgtgc	gaaacataatg	300	
gggtaccagg	tgcgcgaaac	tatggacgtc	tggggcaaag	ggaccacggt	caccgtctcg	360	
agtgcctagca	ccaagggccc	cagcgtgttc	cccctggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	420	
ggcggcacag	ccgccctggg	ctgcctggtg	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg	480	
agctggaaca	gcggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctgcagagc	540	
agcggcctgt	acagcctgag	cagcgtggtg	accgtgccca	gcagcagcct	gggcacccag	600	
acctacatct	gcaacgtgaa	ccacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	acgcgtggag	660	
ccaagagct	gcgacaagac	ccacacctgc	ccccctgcc	ctgccccga	gctgctgggc	720	30
ggaccctccg	igtctctgtt	ccccccaag	ccaaggaca	ccctcatgat	cagccggacc	780	
cccgagtgga	cctgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgagg	accccagggt	gaagttcaac	840	
tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcacaac	gccaagacca	agccccggga	ggagcagtac	900	
aacagcacct	accgggtggt	gagcgtgctc	accgtgctgc	accaggactg	gctgaaacggc	960	
aaggagtaca	agtgcaaggt	gagcaacaag	gccctgcctg	ccccatcga	gaagaccatc	1020	
agcaaggcca	agggccagcc	ccgggagccc	caggtgtaca	ccctgcccc	cagccgggag	1080	
gagatgacca	agaaccaggt	gtccctcacc	tgtctggtga	agggttcta	cccagcgcac	1140	
atcgccgtgg	agtgggagag	caacggccag	cccgagaaca	actacaagac	cacccccct	1200	
gtgctggaca	gcgacggcag	cttcttctg	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagccgg	1260	
tggcagcagg	gcaacgtgtt	cagctgcagc	gtgatgcagc	aggccctgca	caaccactac	1320	40
accagaaga	gcctgagcct	gagccccggc	aag			1353	

【 0 3 2 6 】

>CR6261 HC プロテイン (配列番号186)

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

50

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

【 0 3 2 7 】

>CR6261 LC DNA (配列番号187)

10

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aatgattatg tatcctggta ccagcagctc 120
 ccaggaacag ccccaaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccacc tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccaacta ttactgcgca acatgggatc gccgcccgac tgcttatgtt 300
 gtcttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctagggtgcg cgcagggcca gccaaggcc 360
 gctcccagcg tgaccctgtt cccccctcc tccgaggagc tgcaggccaa caaggccacc 420
 ctggtgtgcc tcatcagcga ctctaccct ggcgccgtga ccgtaggctg gaaggccgac 480
 agcagccccg tgaaggccg cgtaggagacc accacccca gcaagcagag caacaacaag 540
 tacgccgcca gcagctacct gagcctcacc cccgagcagt ggaagagcca cgggagctac 600
 agctgccagg tgaccacga gggcagcacc gtggagaaga ccgtggcccc caccgagtgc 660
 agc 663

20

【 0 3 2 8 】

>CR6261 LCプロテイン(配列番号188)

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

30

【 0 3 2 9 】

ベクター-plg-C911-HCガンマ1 (配列番号190)

tcgacggatc gggagatctc ccgatcccct atgggtgact ctacagtacaa tctgctctga 60
 tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggctc ctgagtagtg 120
 cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgca tgaagaatct 180
 gcttagggtt aggcgttttg cgctgcttcg ctagggtggc aatattggcc attagccata 240
 ttattcattg gtatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 300
 ccatatcata atatgtacat ttatatggc tcatgtccaa cattaccgcc atgttgacat 360
 tgattattga ctagtatta atagtaatca attacgggt cattagttca tagcccatat 420
 atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 480
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gtccccatag taacgccaat agggactttc 540
 cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg 600
 tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat 660
 tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 720
 atcgctatta ccatggtgat gcggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 780
 gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 840
 caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc 900
 ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 960
 gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc 1020

40

50

ctccgcgggc	gggaacggtg	cattggaagc	tggcctggat	atcctgactc	tcttaggtag	1080	
ccttgcagaa	gttggctcgtg	aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	1140	
taaggagatc	aatagaaact	gggcttgtcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	1200	
gcacctattg	gtctfactga	catccacttt	gcctttctct	ccacagggtg	ccactcccag	1260	
ttcaattaca	gctcgcacc	atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	gtactgctgc	1320	
tggcccagcc	ggccagtgac	cttgaccggt	gcaccacttt	tgatgatggt	caagctccta	1380	
attacactca	acatacttca	tctatgaggg	gggtttacta	tcttgatgaa	atTTTTtagat	1440	
cggacactct	ttatttaact	caggatttat	ttcttccatt	ttattcta	gttacagggt	1500	
ttcatactat	taatcatacg	tttggcaacc	ctgtcatacc	ttttaaggat	ggtatTTtatt	1560	
ttgctgccac	agagaaatca	aatgtgtcc	gtggttgggt	tttgggttct	accatgaaca	1620	10
acaagtcaca	gtcggtgatt	attatttaaca	atttactactaa	tgttgttata	cgagcatgta	1680	
actttgaatt	gtgtgacaac	cctttctttg	ctgtttctaa	acccatgggt	acacagacac	1740	
atactatgat	attcgataat	gcatttaatt	gcactttcga	gtacatatct	gatgcctttt	1800	
cgcttgatgt	ttcagaaaag	tcaggtaatt	ttaaacactt	acgagagttt	gtgtttaaaa	1860	
ataaagatgg	gtttctctat	gtttataagg	gctatcaacc	tatagatgta	gttcgtgatc	1920	
taccttctgg	ttttaacact	tfgaaaccta	tttttaagtt	gcctcttggg	attaacatta	1980	
caaatTTtag	agccattctt	acagcctttt	cacctgctca	agacatttgg	ggcacgtcag	2040	
ctgcagccta	tttTgttggc	tatttaaagc	caactacatt	tatgctcaag	tatgatgaaa	2100	
atggtacaat	cacagatgct	gttgattggt	ctcaaaatcc	acttgcTgaa	ctcaaatgct	2160	
ctgttaagag	ctttgagatt	gacaaaaggaa	tttaccagac	ctctaatttc	agggTgttc	2220	20
cctcaggaga	tgttgtgaga	ttccctaata	ttacaaactt	gtgtcctttt	ggagaggttt	2280	
ttaatgctac	taaatTccct	tctgtctatg	catgggagag	aaaaaaaaat	tctaattgtg	2340	
ttgctgatta	ctctgtgctc	tacaactcaa	catTTTTttc	aacctttaag	tgctatggcg	2400	
tttctgccac	taagtTgaat	gatctttgct	tctccaatgt	ctatgcagat	tcttttTtag	2460	
tcaagggaga	tgatgtaaga	caaatagcgc	caggacaaac	tggTgttatt	gctgattata	2520	
attataaatt	gccagatgat	ttcatgggtt	gtgtccttgc	ttggaatact	aggaacattg	2580	
atgctacttc	aactggtaat	tataattata	aatataggta	tcttagacat	ggcaagctta	2640	
ggcccttTga	gagagacata	tctaattgtc	ctttctcccc	tgatggcaaa	ccttgcaccc	2700	
cacctgctct	taattgttat	tggccattaa	atgattatgg	tttttacacc	actactggca	2760	
ttggctacca	accttacaga	gttTtagtac	tttcttttga	acttttaaat	gcaccggcca	2820	30
cggTttgtgg	accaaaaTta	tccactgacc	ttattaagaa	ccagtgtgtc	aatTTtaatt	2880	
ttaatggact	cactggfact	ggtgtgttaa	ctccttcttc	aaagagattt	caacctttc	2940	
aacaattTgg	ccgtgatggt	tctgatttca	ctgattccgt	tcgagatcct	aaaacatctg	3000	
aaatattaga	catTtcacct	tgtctttttg	ggggTgtaag	tgtaatTaca	cctggaacaa	3060	
atgcttcatc	tgaagtTgct	gttctatatac	aagatgttaa	ctgcactgat	gtttctacag	3120	
caattcatgc	agatcaactc	acaccagctt	ggcgcatata	ttctactgga	aacaatgtat	3180	
tccagactca	ggcaggctgt	cttataggag	ctgagcatgt	cgacacttct	tatgagtgcg	3240	
acattcctat	tggagctggc	atTtTgtgcta	gttaccatac	agtttcttta	ttacgtagta	3300	
ctagccaaaa	atctattgtg	gcttatacta	tgtcttttagg	tgtctgatagt	tcaattgctt	3360	
actctaataa	cacattgctt	atacctacta	acttttcaat	tagcattact	acagaagtaa	3420	40
tgcctgtttc	tatggctaaa	acctccgtag	atTgtaatat	gtacatctgc	ggagattcta	3480	
ctgaatgtgc	taattTgctt	ctccaatatg	gtagcttttg	cacacaacta	aatcgtgcac	3540	
tctcaggTat	tgtctgtgaa	caggatcgca	acacacgtga	agtgttcgct	caagtcaaac	3600	
aaatgtacaa	aaccccaact	tfgaaatatt	ttggTggttt	taatttttca	caaatattac	3660	
ctgaccctct	aaagccaact	aagaggcttt	ttattgagga	cttgcctttt	aataaggTga	3720	
cactcgctga	tgtctggcttc	atgaagcaat	atggcgaaatg	cctaggTgat	attaatgcta	3780	
gagatctcat	ttgtgcgcag	aagtTcaatg	gacttacagt	gttggccacct	ctgctcactg	3840	
atgatatgat	tgtctgcctac	actgctgctc	tagttagTgg	tactgccact	gctggatgga	3900	
catTtggTgc	tggcgtgctt	cttcaaaTac	ctttTgctat	gcaaaTggca	tataggTtca	3960	
atggcatTgg	agtTaccTaa	aatgtTctct	atgagaacca	aaaacaatc	gccaaccaat	4020	50

ttaacaaggc	gattagtcaa	attcaagaat	cacttacaac	aacatcaact	gatttgggca	4080	
agctgcaaga	cgttgttaac	cagaatgctc	aagcattaaa	cacacttggt	aaacaactta	4140	
gctctaattt	tggtgcaatt	tcaagtgtgc	taaatgatat	cctttcgcga	cttgataaag	4200	
tcgaggcgga	ggtacaaaat	gacaggttaa	ttacaggcag	acttcaaagc	cttcaaacct	4260	
atgtaacaca	acaactaatc	agggtgtctg	aaatcagggc	ttctgcta	cttgctgcta	4320	
ctaaaatgtc	tgagtgtgtt	cttggacaat	caaaaagagt	tgacttttgt	ggaaagggct	4380	
accaccttat	gtccttcca	caagcagccc	cgcatgggtg	tgtcttccta	catgtcacgt	4440	
atgtgccatc	ccaggagagg	aacttcacca	cagcgcagc	aatttgtcat	gaaggcaaag	4500	
catacttccc	tcgtgaaggt	gttttttgtg	ttaatggcac	ttcttggttt	attacacaga	4560	
ggaacttctt	ttctccacaa	ataattacta	cagacaatac	atftgtctca	ggaaatgtg	4620	10
atgtcgttat	tggcatcatt	aacaacacag	tttatgatcc	tctgcaacct	gagcttgact	4680	
catfcaaaga	agagctggac	aagtacttca	aaaatcatac	atcaccagat	gttgattttg	4740	
gcgacatttc	aggcattaac	gcttctgtcg	tcaacattca	aaaagaaatt	gaccgcctca	4800	
atgaggctgc	taaaaattta	aatgaatcac	tcatfgacct	tcaagaactg	ggaaaatatg	4860	
agcaatata	taaaatggcct	ctcgcagaac	aaaaactcat	ctcagaagag	gatctgaatg	4920	
ctgtgggcca	ggacacgcag	gaggtcatcg	tggtgccaca	ctccttgccc	tttaaggtgg	4980	
tggtgatctc	agccatcctg	gccctgggtg	tgtcaccat	catctccctt	atcatcctca	5040	
tcatgctttg	gcagaagaag	ccacgttagg	cggccgctcg	agtgttagca	ccaagggccc	5100	
cagcgtgttc	ccccggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	ggcggcacag	ccgcccggg	5160	
ctgcctggtg	aaggactact	tccccgagcc	ctgaccgtg	agctggaaca	gcggcgcctt	5220	20
gaccagcggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctgcagagc	agcggcctgt	acagcctgag	5280	
cagcgtggtg	accgtgccc	gcagcagcct	gggcaccag	acctacatct	gcaacgtgaa	5340	
ccacaagccc	agcaacacca	aggtaggaca	acgcgtggag	ccaagagct	gcgacaagac	5400	
ccacacctgc	ccccctgcc	ctgccccga	gctgtggtgg	ggaccctccg	tgttctgttt	5460	
ccccccaag	ccaaggaca	ccctcatgat	cagccggacc	cccagggtga	cctgctgtgt	5520	
ggtggacgtg	agccacgagg	accccgagg	gaagttcaac	tggtagctgg	acggcgtgga	5580	
ggtgcacaac	gccaagacca	agccccggga	ggagcagtac	aacagcacc	accgggtggt	5640	
gagcgtgtc	accgtgtgc	accaggactg	gctgaacggc	aaggagtaca	agtgcaaggt	5700	
gagcaacaag	gcccgtcctg	ccccatcga	gaagaccatc	agcaaggcca	agggccagcc	5760	
ccgggagccc	caggtgtaca	ccctgcccc	cagccgggag	gagatgacca	agaaccaggt	5820	30
gtccctcacc	tgtctggiga	agggttcta	cccagcgcac	atcgccgtgg	agtgggagag	5880	
caacggccag	cccgagaaca	actacaagac	cacccccct	gtgctggaca	gcgacggcag	5940	
cttcttctg	tacagcaagc	taccgtgga	caagagccgg	tggcagcagg	gcaacgtgtt	6000	
cagctgcagc	gtgatgcag	aggccctgca	caaccactac	accagaaga	gcctgagcct	6060	
gagccccggc	aagtataat	ctagagggcc	cgtttaaac	cgctgatcag	cctcgactgt	6120	
gccttctagt	tgccagccat	ctgtgtttg	cccccccc	gtgccttctt	tgaccctgga	6180	
aggtgccact	cccactgtcc	tttcttaata	aaatgaggaa	atfgcatcgc	atgtgtctgag	6240	
taggtgtcat	tctatcttgg	gggttgggt	ggggcaggac	agcaaggggg	aggattggga	6300	
agacaatagc	aggcatgctg	gggatgctgt	gggtctatg	gcttctgagg	cgaaaagaac	6360	
cagctggggc	tctaggggt	atccccacgc	gccctgtagc	ggcgattaa	gcgcggcggg	6420	40
tgtgggtggt	acgcgcagcg	tgaccgtac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	6480	
cgcttcttct	ccttcttct	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	6540	
ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgaccca	aaaaacttga	6600	
ttagggtgat	ggttcacgta	gtgggccaatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	6660	
gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaacct	6720	
tatctcggtc	tattcttttg	atftataagg	gattttgccg	atftcggcct	atftggtaaa	6780	
aaatgagctg	atftaacaaa	aatftaacgc	gaatftaatc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	6840	
gggtgtggaa	agftccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcatctcaat	6900	
tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagftcccc	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	6960	
atgcatctca	atftagtcagc	aacctagctc	ccgcccctaa	ctccgccc	cccgccccta	7020	50

actccgcca	gttccgcca	tctccgccc	catggctgac	taatTTTTT	tatttatgca	7080	
gaggccgagg	ccgctctgc	ctctgagcta	tccagaagt	agtgaggagg	cttttttga	7140	
ggcctaggct	tttgcaaaaa	gctcccggga	gcttgtatat	ccattttcgg	atctgatcaa	7200	
gagacaggat	gaggatcgtt	tcgcatgatt	gaacaagaatg	gatfgcacgc	aggttctccg	7260	
gccgctfgg	tgagaggct	atcggctat	gactgggcac	aacagacaat	cgctgctct	7320	
gatgccgccg	tgttccggct	gtcagcgcag	gggcgcccgg	tctttttgt	caagaccgac	7380	
ctgtccggtg	ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	7440	
acgggcttc	cttgcgcagc	tgtgtcgcac	gttgtcacctg	aagcgggaag	ggactggctg	7500	
ctattggg	aagtgccggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	acctgctcc	tgccgagaaa	7560	
gtatccatca	tggtgatgc	aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccca	7620	10
ttcgaccacc	aagcgaaaaca	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	agccggtctt	7680	
gtcgatcagg	atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	7740	
aggctcaagg	cgcgcatgcc	cgacggcgag	gatctcgtcg	tgaccatgg	cgatgcctgc	7800	
ttgccgaata	tcatggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	tcatcgactg	tggccggctg	7860	
ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	7920	
ggcggcgaat	gggctgaccg	cttctcgtg	ctttacggta	tcgccgctcc	cgattcgcag	7980	
cgatcgcct	tctatcgcc	tcttgacgag	ttctctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	8040	
tgaccgacca	agcgacgccc	aacctgccat	cacgagattt	cgattccacc	gccgcttct	8100	
atgaaagg	gggctcggga	atcgttttcc	gggacgccgg	ctggatgatc	ctccagcgcg	8160	
gggatctcat	gctggagttc	ttcgcccacc	ccaacttgtt	tattgcagct	tataatggtt	8220	20
acaaataaag	caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atTTTTTca	ctgatttcta	8280	
gttgtggttt	gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	tgcacctcta	8340	
gctagagctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttctgt	gtgaaatgt	tatccgctca	8400	
caatccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctgggg	gcctaatgag	8460	
tgagctaact	cacattaatt	cggttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	8520	
cggtccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgattgggc	8580	
gctcttccgc	ttctcgcctc	actgactcgc	tcgctcgg	cgttcggctg	cggcgagcgg	8640	
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacgg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	8700	
agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	8760	
cgTTTTTcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	8820	30
ggtggcgaaa	cccagacagga	ctataaagat	accaggcgtt	tccccctgga	agctccctcg	8880	
tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggataacct	gtccgcttt	ctcccttcgg	8940	
gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgg	taggtcgttc	9000	
gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	9060	
gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccggtaaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	9120	
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	ttgaagtgg	9180	
ggcctaacta	cggtacact	agaagaacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	9240	
ttacctcgg	aaaaagagtt	gtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	9300	
gtTTTTTgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	9360	
tgatctttc	tacgggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	9420	40
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaataaaaaa	tgaagtttta	9480	
aatcaatcta	aagtataat	gagtaaaact	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	9540	
aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatctc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgctc	9600	
tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgctgca	atgataccgc	9660	
gagaccacg	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	9720	
agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tgttggccgg	9780	
aagctagagt	aagtagtctg	ccagttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	9840	
gcatcgtgg	gtcacgctcg	tctgttggtg	tggttcatt	cagctccgg	tcccaacgat	9900	
caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggtcctc	9960	
cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	10020	50

ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 10080
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 10140
gggataaatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcatggga aaacgttctt 10200
cgggcgcaaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccctactc 10260
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctctcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 10320
caggaaggca aatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaaatgt tgaatactca 10380
tactcttctt ttttcaatat tattgaagca ttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 10440
acatatftga atgtatftag aaaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 10500
aagtgccacc tgacg 10515

10

【 0 3 3 0 】

ベクター-plg-C909-Cカップ(配列番号191)

tcgacggatc gggagatctc ccatccccc atggtgcact ctcaagtaca tctgctctga 60
tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggctg ctgagtagtg 120
cgcgagcaaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgtt aattaacatg 180
aagaatctgc ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgct aggtggtcaa tattggccat 240
tagccatatt attcatgggt tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccatgacata 300
cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca ttaccgccat 360
gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 420
gccatataat ggagttccgc gttacataaac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 480
ccaacgacc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 540
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 600
atcaagtgtat cataatgcc agtacgccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 660
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 720
tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 780
agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 840
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccatgacgc 900
aaatgggagg taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 960
gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc 1020
gatccagcct ccgcgcccg gaacggtgca ttggaatcga tgactctctt aggtagcctt 1080
gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagatcaa ggttacaaga caggtttaag 1140
gagatcaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact ctgcgtttc tgataggcac 1200
ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac tcccagttca 1260
attacagctc gccaccatgc ggctgcccgc ccagctgctg ggcccttctca tgctgtgggt 1320
gcccgcctcg agatctatcg atgcatgcca tggtagcaag ctgcccacca tgagcagcag 1380
ctcttggctg ctgctgagcc tggtagccgt gacagccgcc cagagcacca tcgaggagca 1440
ggccaagacc ttcttgaca agttcaacca cgaggccgag gacctgttct accagagcag 1500
cctggccagc tggaaactaca acaccaacat caccgaggag aacgtgcaga acatgaacaa 1560
cgccggcgac aagtggagcg ccttcttgaa ggagcagagc acactggccc agatgtaccc 1620
cctgcaggag atccagaacc tgaccgtgaa gctgcagctg caggccctgc agcagaacgg 1680
cagcagcgtg ctgagcgagg acaagagcaa gcggctgaac accatcctga acaccatgtc 1740
caccatctac agcaccggca aagtgtgcaa ccccgacaac ccccaggagt gcctgctgct 1800
ggagcccggc ctgaacgaga tcatggccaa cagcctggac tacaacgagc ggctgtgggc 1860
ctgggagagc tggcggagcg aagtgggcaa gcagctgagg cccctgtacg aggagtacgt 1920
ggtgctgaag aacgagatgg ccagggcca ccactacgag gactacggcg actactggag 1980
aggcgactac gaagtgaacg gcgtggacgg ctacgactac agcagaggcc agctgatcga 2040

ggacgtggag cacaccttcg aggagatcaa gcctctgtac gagcacctgc acgcctacgt 2100
gctggccaag ctgatgaacg cctaccccag ctacatcagc cccatcggct gcctgcccgc 2160
ccacctgctg ggcgacatgt ggggcccgtt ctggaccaac ctgtacagcc tgaccgtgcc 2220

20

30

40

50

cttcggccag	aagcccaaca	tcgacgtgac	cgacgccatg	gtggaccagg	cctgggacgc	2280	
ccagcggatc	ttcaaggagg	ccgagaagtt	cttcgctgagc	gtgggacctgc	ccaacatgac	2340	
ccagggcttt	tgggagaaca	gcatgctgac	cgacccccggc	aatgtgcaga	aggccgtgtg	2400	
ccaccccacc	gcctgggacc	tgggcaaggg	cgacttccgg	atcctgatgt	gcaccaaagt	2460	
gaccatggac	gacttctga	ccgcccacca	cgagatgggc	cacatccagt	acgacatggc	2520	
ctacgccgcc	cagcccttcc	tgctgcgga	cggcgccaac	gagggctttc	acgaggccgt	2580	
gggcgagatc	atgagcctga	gcgcccacc	ccccaaagcac	ctgaagagca	tcggcctgct	2640	
gagccccgac	tccaggagg	acaacgagac	cgagatcaac	ttcctgctga	agcaggccct	2700	
gaccatcgtg	ggcacctgc	ccttcaccta	catgctggag	aagtggcggg	ggatgggtgt	2760	
taagggcgag	atccccaaag	accagtggat	gaagaagtgg	tgggagatga	agcgggagat	2820	10
cgtagggcgtg	gtggagcccg	tgccccacga	cgagacctac	tgcgacccccg	ccagcctgtt	2880	
ccacgtgagc	aacgactact	ccttcatccg	gtactacacc	cggaccctgt	accagttcca	2940	
gttccaggag	gcccgtgtcc	aggccgcca	gcacgagggc	cccctgcaca	agtgcgacat	3000	
cagcaacagc	accgaggccg	gacagaaact	gttcaacatg	ctgcggctgg	gcaagagcga	3060	
gcccctggacc	ctggccctgg	agaaatgtgg	gggcgccaag	aacatgaatg	tgcgccccct	3120	
gctgaactac	ttcgagcccc	tgttcacctg	gctgaaggac	cagaacaaga	acagcttctg	3180	
gggctggagc	accgactgga	gccccacgc	cgaccagagc	atcaaagtgc	ggatcagcct	3240	
gaagagcggc	ctgggcgaca	aggcctacga	gtggaacgac	aacgagatgt	acctgttccg	3300	
gagcagcgtg	gcctatgcca	tgcggcagta	cttctgaaa	gtgaagaacc	agatgatcct	3360	
gttcggcgag	gaggacgtga	gagtggccaa	cctgaagccc	cggatcagct	tcaacttctt	3420	20
cgtagccgcc	cccaagaacg	tgagcgacat	catcccccg	accgaagtgg	agaaggccat	3480	
ccggaatgagc	cggagccgga	tcaacgacgc	cttccggctg	aacgacaact	ccctggagtt	3540	
cctgggcatc	cagcccaccc	tgggccctcc	caaccagccc	cccgtgagca	tctggctgat	3600	
cggtgttggc	gtggtgatgg	gcgtgatcgt	ggtgggaatc	gtgatcctga	tcttcaccgg	3660	
catccgggac	cggaagaaga	agaacaaggc	ccggagcggc	gagaaccccc	acgccagcat	3720	
cgatatcagc	aagggcgaga	acaacccccg	cttccagaac	accgacgacg	tgcagaccag	3780	
cttctgataa	tctagaacga	gctcgaattc	gaagcttctg	cagacgcgtc	gacgtcatat	3840	
ggaatccgata	tcgccgtggc	ggccgcaccc	agcgtgttca	tcttcccccc	ctccgacgag	3900	
cagctgaaga	gcggcaccgc	cagcgtgggtg	tgcctgctga	acaacttcta	ccccggggag	3960	
gccaaggtgc	agtggaaggt	ggacaacgcc	ctgcagagcg	gcaacagcca	ggagagcgtg	4020	30
accgagcagg	acagcaagga	ctccacctac	agcctgagca	gcaccctcac	cctgagcaag	4080	
gccgactacg	agaagcacia	ggtgtacgcc	tgcgagggtga	cccaccaggg	cctgagcagc	4140	
cccgtgacca	agagcttcaa	ccggggcgag	tgttaataga	cttaagttta	aaccgctgat	4200	
cagcctcgac	tgtgcccttct	agttgccagc	catctgttgt	tggccccctcc	cccgtgccctt	4260	
ccttgaccct	ggaaggtgcc	actcccactg	tcctttccta	ataaaatgag	gaaatgcat	4320	
cgcatgtct	gagtaggtgt	catcttatct	tggggggtgg	ggtggggcag	gacagcaagg	4380	
gggaggattg	ggaagacaat	agcaggcatg	ctggggatgc	ggtgggctct	atggcttctg	4440	
aggcggaaag	aaccagctgg	ggctctaggg	ggtatcccca	cgcgccctgt	agcggcgcac	4500	
taagcgcggc	gggtgtgggt	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	agcggcctag	4560	
cgcccgtcc	tttcgctttc	ttcccttctt	ttctcgccac	gttcgcccggc	tttccccgtc	4620	40
aagctctaaa	tcgggggctc	cctttagggg	tccgatttag	tgctttacgg	cacctcgacc	4680	
ccaaaaaact	tgattagggg	gatggttcac	gtagtggggc	atcgccctga	tagacggttt	4740	
ttcgcccttt	gacgttggag	tccacgttct	ttaatagtgg	actctgttct	caaactggaa	4800	
caacactcaa	ccctatctcg	gtctattctt	tgtatttata	agggattttg	gccatttccg	4860	
cctatgggtt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaaataa	tctgtggaa	4920	
tgtgtgtcag	ttaggggtgt	gaaagtcccc	aggctcccca	gcaggcagaa	gtatgcaaag	4980	
catgcatctc	aattagtcag	caaccagggtg	tggaaagtcc	ccaggctccc	cagcaggcag	5040	
aagfatgcaa	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccggccc	taactccgcc	5100	
catcccggcc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	cccctatggct	gactaatttt	5160	
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	tgcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	5220	50

aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctcccg	ggagcttgta	tatccat ttt	5280	
cggatctgat	cagcacgtga	tgaaaaagcc	tgaactcacc	gcgacgtctg	tcgagaagtt	5340	
tctgatcgaa	aagttcgaca	gcgtctccga	cctgatgcag	ctctcggagg	gcgaagaatc	5400	
tcgtgctttc	agcttcgatg	taggagggcg	tggatatgtc	ctgcgggtaa	atagctgcgc	5460	
cgatggtttc	tacaaaagatc	gttatgttta	tcggcacttt	gcatcggccg	cgctcccgat	5520	
tccggaagtg	cttgacattg	gggaattcag	cgagagcctg	acctat t gca	tctcccgcg	5580	
tgcacaggg	gtcacgt tgc	aagacctgcc	tgaaacccgaa	ctgcccgcctg	t tctgcagcc	5640	
ggtcgcggag	gcatggatg	cgatcgctgc	ggccgatctt	agccagacga	gcgggt t cgg	5700	
cccat t cgg	ccacaaggaa	tccgtcaata	cactacatgg	cgtgat t tca	tatgcgcgat	5760	10
tgctgatccc	catgtgtatc	actggcaaac	tgtgatggac	gacaccgtca	gtgcgtccgt	5820	
cgcgaggct	ctcgatgagc	tgatgctttg	ggccgaggac	tgccccgaag	tccggcacct	5880	
cgtgcacgcg	gatttcggct	ccaacaatgt	cctgacggac	aatggccgca	taacagcgg	5940	
cat t gactgg	agcgaggcga	tgttcgggga	ttccaatac	gaggtcgcca	acatct tctt	6000	
ctggaggccg	tgg t tggctt	gtatggagca	gcagacgcgc	tact t c g a g c	ggaggcatcc	6060	
ggagct t gca	ggatcgccgc	ggctccgggc	gtatatgctc	cgcat t g g t c	t t g a c c a a c t	6120	
ctatcagagc	t t g g t t g a c g	gcaat t t c g a	tgatgcagct	tgggcgcagg	gtcgatgcga	6180	
cgcaatcgtc	cgatccggag	ccgggactgt	cgggcgtaca	caaatcgccc	gcagaagcgc	6240	
ggccgct t g g	accgatggct	gtgtagaagt	actcgcgat	agtggaaacc	gacgcccag	6300	
cactcg t c c g	agggcaaagg	aatagcacgt	gctacgagat	t t c g a t t c c a	ccgccgcctt	6360	20
ctatgaaagg	t t g g g c t t c g	gaatcg t t t t	ccgggacgcc	ggctggatga	t c c t c c a g c g	6420	
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccaaacttg	t t t a t t g c a g	cttataatgg	6480	
t t a c a a a t a a	agcaatagca	tcaaaaat t t	cacaaaataaa	gcat t t t t t t	cactgcattc	6540	
tag t t g t g g t	t t g t c c a a a c	tcatcaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	cg t c g a c c t c	6600	
tagctagagc	t t g g c g t a a t	catggtcata	gctgt t t c c t	gtgtgaaat t	g t t a t c c g c t	6660	
cacaat t c c a	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgccta at g	6720	
agt g a g c t a a	ctcacat t a a	t t g c g t t g c g	ctcactgccc	gct t t c c a g t	c g g g a a a c c t	6780	
gtcgtgccag	ctgcat t a a t	gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtat t g g	6840	
gcgctct t c c	gct t c c t c g c	t c a c t g a c t c	gctgcgctcg	gtcgt t c g g c	t g c g g c g a g c	6900	
ggatcagct	cactcaaagg	cggtaaatag	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcag	6960	30
aaagaacatg	t g a g c a a a a g	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgt t g c t	7020	
ggcgt t t t t c	cataggctcc	gccccct t g a	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	7080	
gagg t g g c g a	aaccgacag	gactataaag	ataccaggcg	t t t c c c c c t g	gaagctccct	7140	
cgtgcgctct	cctgt t c c g a	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	t t c t c c c t t c	7200	
gggaagcgtg	gcgct t t t c t c	atagctcacg	ctgtaggat	ctcag t t c g g	t g t a g g t c g t	7260	
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgt t c a g	cccgaccgct	gcgcct t a t c	7320	
cggt a a c t a t	cg t c t t g a g t	ccaaccgggt	aagacacgac	t t a t c g c c a c	t g g c a g c a g c	7380	
cactggtaac	aggat tagca	gagcgaggta	tgtaggcgg	gctacagagt	t c t t g a a g t g	7440	
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtat t t g g t	atctgcgctc	t g c t g a a g c c	7500	
ag t t a c c t t c	ggaaaaagag	t t g g t a g c t c	t t g a t c c g g c	aaacaaacca	ccgc t g g t a g	7560	40
cgg t t t t t t t	g t t t g c a a g c	agcagat t a c	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	7620	
t t t g a t c t t t	tctacgggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aaactcacgtt	aagggat t t t	7680	
ggtcatgaga	t t a t c a a a a a	ggatct t c a c	ctagatct t t	t t a a a t t a a a	aatgaagt t t	7740	
t a a t c a a t c	t a a a g t a t a t	atgagtaaac	t t g g t c t g a c	ag t t a c c a a t	g c t t a a t c a g	7800	
t g a g g c a c c t	atctcagcga	tctgtctatt	tcgt t c a t c c	atag t t g c c t	g a c t c c c c g t	7860	
cgtgtagata	actacgatac	gggagggctt	accatctggc	cccag t g c t g	caatgat acc	7920	
gcgagacca	cgctcaccgg	ctccagat t t	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	7980	
cgagcgcaga	ag t g g t c c t g	caact t t a t c	cgctccatc	cag t c t a t t a	at t g t t g c c g	8040	
ggaagctaga	gtaagt ag t t	cgccag t t a a	tag t t t g c g c	aacgt t g t t g	ccat t g c t a c	8100	
aggcatcg t g	gtgtcacgct	cg t c g t t t g g	tatggct t c a	t t c a g c t c c g	g t t c c c a a c g	8160	50

atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 8220
 tccgatcgtt gtcagaagta agtggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 8280
 gcataattct ctactgtca tggcatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 8340
 aaccaagtca ttctgagaat agtgatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 8400
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaagtgt ctcatcattg gaaaacgttc 8460
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgaaccac 8520
 tctgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 8580
 aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaaat gttgaatact 8640
 catactcttc ctttttcaat attatgaag catttatcag ggttatgtc tcatgagcgg 8700
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 8760
 aaaagtcca cctgacg 8777

10

【 0 3 3 1 】

ベクター-pIlg-C910-Cラムダ(配列番号192)

tgcacggatc gggagatctc ccgatcccct atggtgact ctcagtacaa tctgctctga 60
 tggcgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggctg ctgagtagtg 120
 cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgtt aattaacatg 180
 aagaatctgc ttagggtag gcgtttgcg ctgcttcgct aggtggtcaa tattggccat 240
 tagccatatt attcattggt tataatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata 300
 cgttgtatcc atatacataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca ttaccgcat 360
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 420
 gccatataat ggagtccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 480
 ccaacgacc cgcgccatgt acgtcaataa tgacgatgt tcccatagta acgccaatag 540
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac 600
 atcaagtgt tcatatgcc agtacgccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 660
 cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 720
 tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttgga gtacatcaat gggcgtggat 780
 agcggtttga ctacgggga ttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 840
 ttggcacca aatcaacgg gactttcaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 900
 aaatgggagg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 960
 gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc 1020
 gatccagcc cgcggccgg gaacggtgca ttggaatcga tgactctctt aggtagcctt 1080
 gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga caggtttaag 1140
 gagatcaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact ctgctgtttc tgataggcac 1200
 ctattggtct tactgacatc cactttgcc tttctctccac aggtgtccac tcccagttca 1260
 attacagctc gccaccatgc ggttctccgc tcagctgctg ggcttctgg tctgtggat 1320
 tcccggcgtc tcgagatcta tcgatgatg ccatggtacc aagcttgcca ccatgagcag 1380
 cagctcttg ctgctgctga gccgtgtggc cgtgacagcc gccagagca ccatcgagga 1440
 gcaggccaag accttctgg acaagtcaa ccacgaggcc gaggacctgt tctaccagag 1500
 cagcctggcc agctggaact acaacaccaa catcaccgag gagaacgtgc agaacaatgaa 1560
 caacgccggc gacaagtga gcgccttct gaaggagcag agcacactgg cccagatgta 1620
 cccctgcag gagatccaga acctgaccgt gaagctgcag ctgcaggccc tgcagcagaa 1680
 cggcagcagc gtctgagcg aggacaagag caagcggctg aacaccatcc tgaacaccat 1740
 gtccaccatc tacagcaccg gcaaagtgtg caaccccagc aaccccagc agtgcctgct 1800
 gctggagccc ggctgaacg agatcatggc caacagcctg gactacaacg agcggctgtg 1860
 ggctgggag agctggcgga gcgaagtgg caagcagctg cggcccctgt acgaggagta 1920
 cgtggtgctg aagaacgaga tggccagggc caaccactac gaggactacg gcgactactg 1980
 gagaggcgac tacgaagtga acggcgtgga cggctacgac tacagcagag gccagctgat 2040
 cgaggacgtg gagcacacct tcgaggagat caagcctctg tacgagcacc tgcacgccta 2100
 cgtgcgggccc aagctgatga acgcttacc cagctacatc agccccatcg gctgcctgcc 2160
 cgcccacctg ctgggcgaca tgggggccc gttctggacc aacctgtaca gcctgaccgt 2220

20

30

40

50

gcccttcggc	cagaagccca	acatcgacgt	gaccgacgcc	atggtggacc	aggcctggga	2280	
cgcccagcgg	atcttcaagg	aggccgagaa	gttcttcgtg	agcgtgggcc	tgcccaacat	2340	
gacccagggc	ttttgggaga	acagcatgct	gaccgacccc	ggcaatgtgc	agaaggccgt	2400	
gtgccacccc	accgctggg	acctgggcaa	gggcgacttc	cggatcctga	tgtgcaccaa	2460	
agtgaccatg	gacgactfcc	tgaccgcca	ccacgagatg	ggccacatcc	agtacgacat	2520	
ggcctacgcc	gccagccct	tctgtctgcg	gaacggcgcc	aacgagggct	ttcacgaggc	2580	
cgtdggcgag	atcatgagcc	tgagcgccgc	cacccccaa	cacctgaaga	gcatcggcct	2640	
gctgagcccc	gactfccagg	aggacaacga	gaccgagatc	aacttctgtc	tgaagcaggc	2700	
cctgaccatc	gtgggcaccc	tgcccttcac	ctacatgctg	gagaagtggc	ggtggatggg	2760	
gtttaagggc	gagatcccca	aggaccagtg	gatgaagaag	tggtdgggaga	tgaagcggga	2820	10
gatcgtgggc	gtggtggagc	ccgtgcccc	cgacgagacc	tactgcgacc	ccgccagcct	2880	
gttccacgtg	agcaacgact	actccttcat	ccgtactac	accggaccc	tgtaccagtt	2940	
ccagttccag	gaggccctgt	gccaggccgc	caagcacgag	ggccccctgc	acaagtgcga	3000	
catcagcaac	agcaccgagg	ccggacagaa	actgttcaac	atgctgcggc	tgggcaagag	3060	
cgagccctgg	acctggccc	tggagaaatgt	gtdggcgcc	aagaacatga	atgtgcgccc	3120	
cctgctgaac	tacttcgagc	ccctgttcac	ctggctgaag	gaccagaaca	agaacagctt	3180	
cgtdggctgg	agcaccgact	ggagccccct	cgccgaccag	agcatcaaag	tgcggatcag	3240	
cctgaagagc	gcccgggagc	acaaggccct	cgagtggaa	gacaacgaga	tgtacctgtt	3300	
ccggagcagc	gtggcctatg	ccatgcgga	gtacttctg	aaagtgaaga	accagatgat	3360	
cctgttcggc	gaggaggagc	tgagagtggc	caacctgaag	ccccggatca	gcttcaactt	3420	20
cttcgtgacc	gcccccaaga	acgtgagcga	catcatcccc	cggaccgaag	tggagaaggc	3480	
catccggatg	agccggagcc	ggaatcaacga	cgccttccgg	ctgaacgaca	actccctgga	3540	
gttcttgggc	atccagccca	ccctgggccc	tcccaaccag	ccccccgtga	gcatctggct	3600	
gatcgtgttt	ggcgtggiga	tgggcgtgat	cgtdgtggga	atcgtgatcc	tgatcttcac	3660	
cggcattccg	gaccggaaga	agaagaacaa	ggcccgagc	ggcgagaacc	cctacgccag	3720	
catcgatata	agcaagggcg	agaacaaccc	cggcttccag	aacaccgacg	acgtgcagac	3780	
cagcttctga	taatctagaa	cgagctcgaa	tctgaagctt	ctgcagacgc	gtcgacgtca	3840	
tatggatccg	atatcgccgt	ggcggccgca	ggccagccca	aggccgctcc	cagcgtgacc	3900	
ctgttcccc	cctcctccga	ggagctgcag	gccaacaagg	ccaccctggg	gtgcctcatc	3960	
agcgaactct	acctggcgc	cgtagaccgt	gcttggaaag	ccgacagcag	ccccgtgaag	4020	30
gcccggctgg	agaccaccac	ccccagcaag	cagagcaaca	acaagtacgc	cgccagcagc	4080	
tacctgagcc	tcacccccga	gcagtggaa	agccaccgga	gctacagctg	ccaggtgacc	4140	
cacgagggca	gcaccgtgga	gaagaccgtg	gccccaccg	agtcagcta	atagacttaa	4200	
gtttaaaccg	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagtgt	ccagccatct	gttgtttgcc	4260	
cctccccgt	gccttcttgc	accttggaa	gtgccactcc	cactgtcctt	tcctaataaa	4320	
atgaggaaa	tgcatacgat	tgtctgagta	ggtgtcattc	tattctgggg	ggtggggtgg	4380	
ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	gatgcggtgg	4440	
gctctatggc	tcttgaggcg	gaaagaacca	gctggggctc	taggggtat	ccccacgcgc	4500	
cctgtagcgg	cgcattaagc	gcggcgggtg	tggtdggttac	gcgcagcgtg	accgctacac	4560	
ttgccagcgc	cctagcggcc	gctcctttcg	cttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	4620	40
ccggctttcc	ccgtcaagct	ctaaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	4680	
tacggcacct	cgaccccaaa	aaacttgatt	agggtagatg	ttcacgtagt	gggccaatcg	4740	
cctgatagac	ggtttttcgc	cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	agtggactct	4800	
tgttccaaac	tgaacaaca	ctcaacccta	tctcggtcta	ttcttttgat	ttataaggga	4860	
ttttggccat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaaa	tttaacgcga	4920	
attaattctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	4980	
cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtdtggaa	agtccccagg	5040	
ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	5100	
gcccctaact	ccgcccattc	cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccc	5160	
tggctgacta	atftttttta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctctgcct	ctgagctatt	5220	50

ccagaagtag	tgaggaggct	tttttggagg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	tcccgggagc	5280	
ttgtatatcc	attttcggat	ctgatcagca	cgatgatgaa	aagcctgaac	tcaccgcgac	5340	
gtctgtcgag	aagtftctga	tcgaaaagt	cgacagcgtc	tccgacctga	tcagactctc	5400	
ggaggcgaa	gaatctcgtg	ctttcagctt	cgatgtagga	ggcgtggat	atgtcctgcg	5460	
ggtaaatagc	tgcccgatg	gtttctacaa	agatcgttat	gtttatcggc	actttgcatc	5520	
ggccgcgctc	ccgattccgg	aagtgtctga	catgggggaa	ttcagcgaga	gcctgaccta	5580	
ttgcatctcc	cgccgtgcac	agggtgtcac	gttgcaagac	ctgcctgaaa	ccgaactgcc	5640	
cgctgttctg	cagccggctg	cggaggccat	ggatgcgatc	gctgcggccg	atcttagcca	5700	
gacgagcggg	ttcggcccat	tcggaccgca	aggaatcggg	caatacacta	catggcgtga	5760	
tttcatatgc	gcgattgctg	atccccatgt	gtatcactgg	caaactgtga	tggacgacac	5820	10
cgtcagtgcg	tccgtcgcgc	aggctctcga	tgagctgatg	ctttgggccc	aggactgccc	5880	
cgaagtccgg	cacctcgtgc	acgcggatft	cggctccaac	aatgtcctga	cggacaatgg	5940	
ccgcataaca	gcggtcatft	actggagcga	ggcgtgttcc	ggggattccc	aatacgaggt	6000	
cgccaacatc	ttcttctgga	ggccgtggtt	ggcttgtatg	gagcagcaga	cgcgctactt	6060	
cgagcggagg	catccggagc	ttgcaggatc	gccgcggctc	cgggctata	tgctccgcat	6120	
tggctttgac	caactctatc	agagcttggg	tgacggcaat	ttcgatgatg	cagcttgggc	6180	
gcagggctga	tgcgacgcaa	tcgtccgatc	cggagccggg	actgtcgggc	gtacacaaat	6240	
cgcccgcaga	agcgcggccg	tcggaccgga	tggctgtgta	gaagtactcg	ccgatagtgg	6300	
aaaccgacgc	cccagcactc	gtccgagggc	aaaggaatag	cacgtgttac	gagatttcca	6360	
ttccaccgcc	gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttccggg	acgccggctg	6420	20
gatgatcctc	cagcgcgggg	atctcatgct	ggagtcttcc	gcccacccca	acttgtttat	6480	
tgagcttat	aatggttaca	aaataagcaa	tagcatcaca	aatttcaca	ataaagcatt	6540	
tttttactg	catctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	aatgtatctt	atcatgtctg	6600	
tataccgtcg	acctctagct	agagcttggc	gtaatcatgg	tcatagtgtg	ttcctgtgtg	6660	
aaattgttat	ccgctcaca	ttccacacaa	catagcagcc	ggaagcataa	agtgtaaagc	6720	
ctggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgcttt	6780	
ccagtccgga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaaccg	cggggagagg	6840	
cggtttgcgt	atggggcgt	cttccgcttc	ctcgctcact	gactcgctgc	gctcggctcgt	6900	
tcggctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	ccacagaatc	6960	
aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	7020	30
aaaggccg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaacaaa	7080	
tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaacc	gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	7140	
ccctggaagc	tcctcgtg	gctctcctgt	tcggaccctg	ccgcttaccg	gataacctgtc	7200	
cgctttctc	cttccgggaa	gcgtggcgt	ttctcatagc	tcacgctgta	ggtatctcag	7260	
ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagccccga	7320	
ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaaagc	acgacttatac	7380	
gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatgttag	gcggtgcttac	7440	
agagtcttgg	aagtgggtgg	ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	ttggtatctg	7500	
cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagtggg	agctcttgat	ccggcaaaaca	7560	
aaccaccgct	ggtagcggtt	ttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	7620	40
atctcaagaa	gatcctttga	tttttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	7680	
acgttaaggg	attttggta	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttttaa	7740	
ttaaaaatga	agttttaa	caatctaag	tatatatgag	taaactggg	ctgacagtta	7800	
ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttctgt	catccatagt	7860	
tgctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	7920	
tgctgcaatg	ataccgag	accacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	7980	
gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgct	ccatccagtc	8040	
tattaatftg	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	8100	
tgttgccatt	gctacaggca	tcgtgggtgc	acgctcgtcg	tttggatagg	cttcatcag	8160	
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgtgtgca	aaaaagcgg	8220	50

tagctccttc ggtcctccga tcggtgtcag aagtaagttg gccgcagtg t taccactcat 8280
 ggttatggca gcactgcata attctcttac tgcatagcc tccgtaagat gcttttctgt 8340
 gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtg atgcggcgac cgagttgctc 8400
 ttgccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 8460
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 8520
 ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 8580
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg 8640
 gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 8700
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaata taggggttcc 8760
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cg 8792

10

【 0 3 3 2 】

A/ 香港 /1/1968からの未熟HAの配列 (配列番号193)

MKTI I ALSY I FCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKT I TDDQ I EVTNATELVQSSSTGK I CNNPHR I LDG I DC
 TL I DALLGDPHCDVFNQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF I TEGFTWTGVTQNGGSNACKRGP
 SGFFSRLNLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLY I WGVHHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRRSQQT I I PNI GSRPWVR
 GLSSR I S I YWT I VKPGDVLV I NSNGNL I APRGYFKMRTGKSS I MRSDAP I DTC I SEC I TPNGS I PNDKPFQNVNK I TYGA
 CPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGA I AGF I ENGWEGM I DGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQAA I DQ I NGKLNRV
 I EKTNEKFHQ I EKEFSEVEGR I QDLEKYVEDTK I DLWSYNAELLVALENQHT I DLT DSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGN
 GCFK I YHKCDNAC I ES I RNGTYDHDVYRDEALN
 NRFQ I KGVELKSGYKDW I LW I SFA I SCFLLCVVLLGF I MWACQRGN I RCN I C I

20

【 0 3 3 3 】

参照文献

(1)

Air MA (エアMA) (1981年)、Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus (インフルエンザA型ウイルスの12サブタイプのヘマグルチニン遺伝子間の配列関係)。Proc Natl Acad Sci USA 78 (12):7639-7643。

(2)

Boel E (ボエルE) ら (2000年)、Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments (ファージディスプレイライブラリ由来の単鎖Fv抗体フラグメントから構築されるすべてのアイソタイプの機能的なヒトモノクローナル抗体)。J Immunol Methods 239:153-166。

30

(3)

Brown EG (ブラウンEG) ら (2001年)、Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes (マウスの肺における毒性の増加への適応に関するインフルエンザA型ウイルスのゲノムにおける変異のパターン: 機能的なテーマの識別)。PNAS 98:6883-6888。

40

(4)

Burton DR (パートンDR) およびBarbas CF (バルバスCF) (1994)、Human antibodies from combinatorial libraries (コンビナトリアルライブラリーからのヒト抗体)。Adv Immunol. 57:191-280。

(5)

Chou TC (チョウTC) およびP Talalay (Pテラレイ) (1984)、Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors (用量-効果関係の定量分析: 複数の薬剤または酵素インヒビターの併用効果)。Adv Enzyme Regul 22:27-55。

(6)

50

De Kruif J (ドクライフJ) ら (1995a)、Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library (合成ファージ抗体ライブラリーから細胞亜種特異的ヒトモノクローナル抗体の迅速選定)。Proc Natl Acad Sci USA 92:3938。

(7)

De Kruif J ら (1995b)、Selection and application of human single-chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions (設計されたCDR3領域を有する半合成ファージ抗体ディスプレイライブラリーからのヒト単鎖Fv抗体フラグメントの選定および応用)。J Mol Biol 248:97-105。

(8)

Ekiert (エキェルト) ら (2009年)、Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope (高度に保存されたインフルエンザウイルスエピトープの抗体認識)。Science 324:246-251。

(9)

Fouchier AM (フーシャーAM) ら。(2005)、Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls (頭の黒いカモメから得られた新型インフルエンザA型ウイルスのヘマグルチニンサブタイプ(H16)の特徴付け)。J Virol 79(5):2814 - 2822。

(10)

Gocnik (ゴクニク) M. ら (2007)、Antibodies specific to the HA2 glycopolyptide of influenza A virus haemagglutinin with fusion-inhibition activity contribute to the protection of mice against lethal infection (融合抑制活性を有するインフルエンザA型ウイルスの赤血球凝集素のHA2グルコポリペプチドに特異的な抗体は致死感染に対するキースの保護に貢献する) J Gen Virol 88: 951-955。

(11)

Huls G (ヒュルスG) ら (1999)、Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies (ファージディスプレイから派生した完全ヒトIgG1およびIgA1モノクローナル抗体により見出される抗腫瘍免疫エフェクター機構)。Cancer Res 59:5778-5784。

(12)

Ostberg L (エストベリL) および Pursch E (1983)、Human x (Mouse x Human) hybridomas stably producing human antibodies (ヒト抗体を安定的に産生するヒト x (マウス x ヒト) ハイブリドーマ)。Hybridoma 2(4): 361-367。

(13)

Slootstra (スルーツストラ) JW ら (1996)、Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries (小さなランダムペプチドライブラリーを通して明らかにされる抗体-抗原相互作用の構造的側面)。Mol Divers 1:87-96。

(14)

Stropkowska (ストロコブスカ) ら (2009)、Broadly cross-reactive monoclonal antibodies against HA2 glycopeptide of influenza A virus hemagglutinin of H3 subtype reduce replication of influenza A viruses of human and avian origin (H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスの血球凝集素のHA2糖ペプチドに対する大まかな交差反応性モノクローナル抗体は、ヒトおよびトリ由来のインフルエンザA型ウイルスの複製を減少させる)。Acta Virologica 53: 15-20。

(15)

The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network (2005) (世界保健機関のグローバルインフルエンザプログラムのサーベイランスネットワーク)、Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia (アジアでのH5N1トリインフルエンザウイルスの進化)。Emerg Infect Dis 11:1515-1521。

10

20

30

40

50

(16)

Varec kova (バレク・コバ) E.ら (2003A)、Inhibition of fusion activity of influenza A haemagglutinin mediated by HA2-specific monoclonal antibodies (HA2-特異的モノクローナル抗体により媒介されるインフルエンザA型ヘマグルチニンの融合活性の抑制)。Arch Virol 148 : 469-486。

(17)

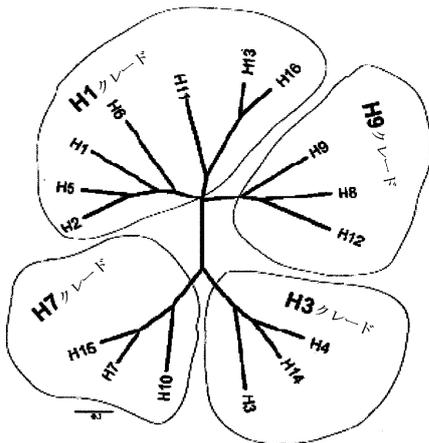
Varec kova E.ら (2003b)、A monoclonal antibody specific to the HA2 glycoprotein of influenza A virus haemagglutinin that inhibits its fusion activity reduces replication of the virus (融合活性を抑制するインフルエンザウイルスの赤血球凝集素のHA2糖タンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、ウイルスの複製を減らす)。Acta Virologica 47 : 229-236。

10

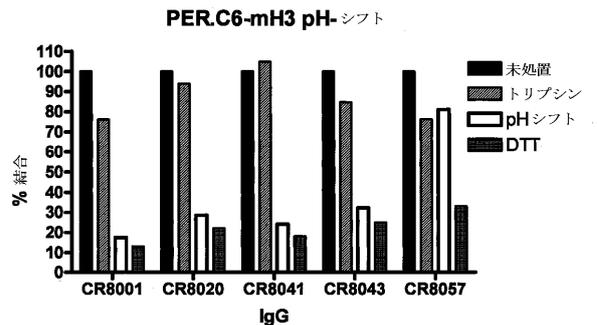
(18)

Wang T. (ワンT.) ら (2010)、Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins (異なる赤血球凝集素で連続免疫に続く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)。PLoS Pathogens 6(2) : 1-9。

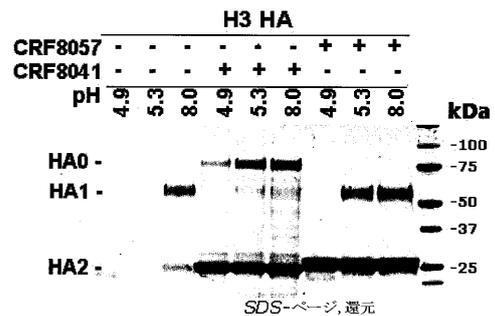
【 図 1 】



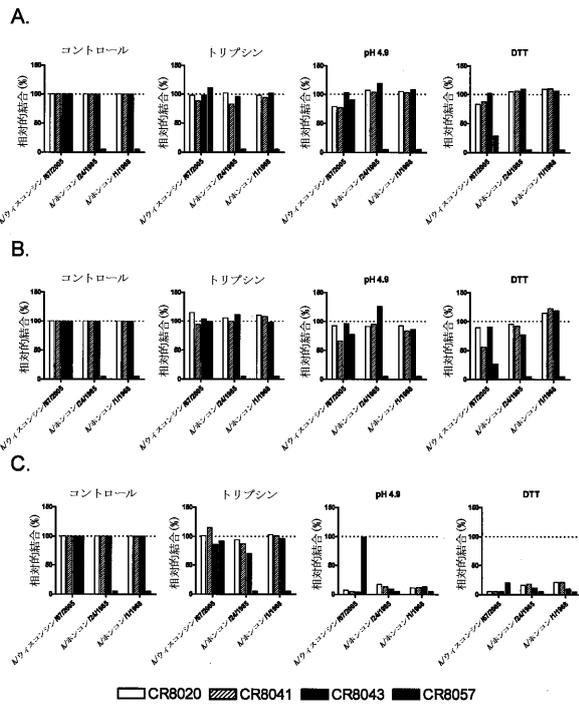
【 図 2 】



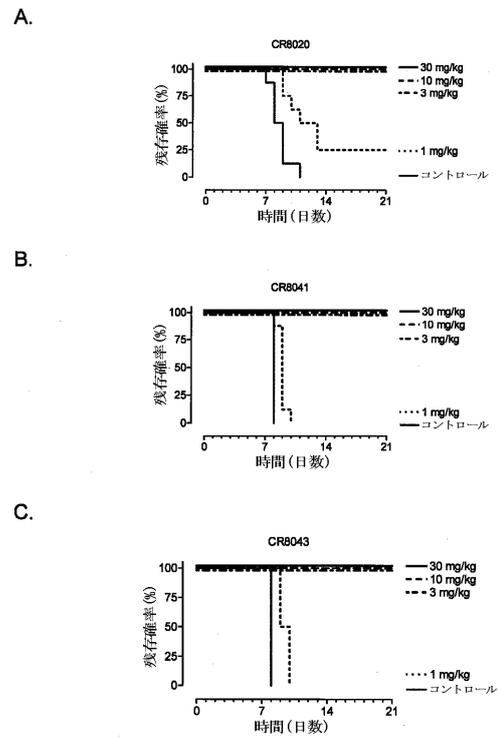
【 図 3 】



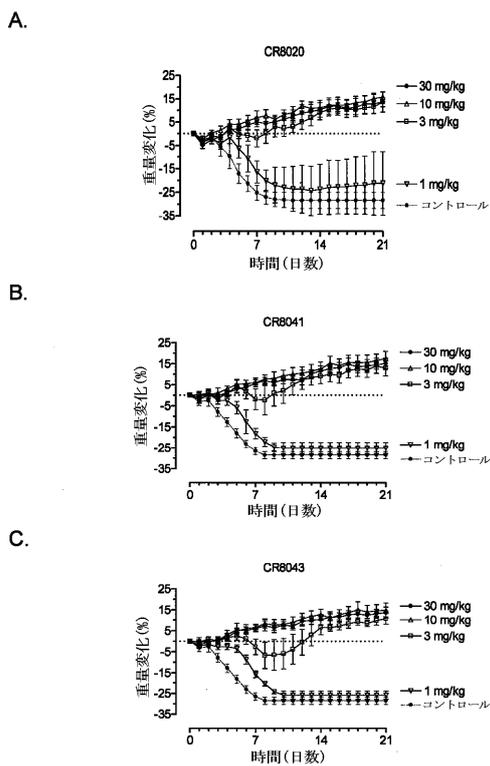
【 図 9 】



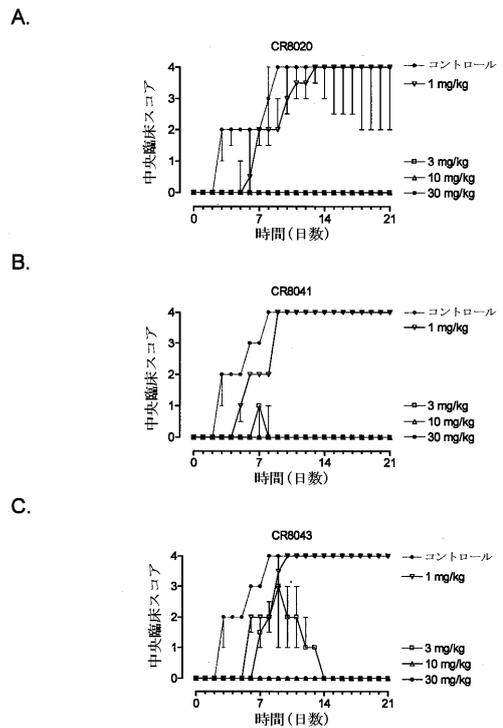
【 図 10 】



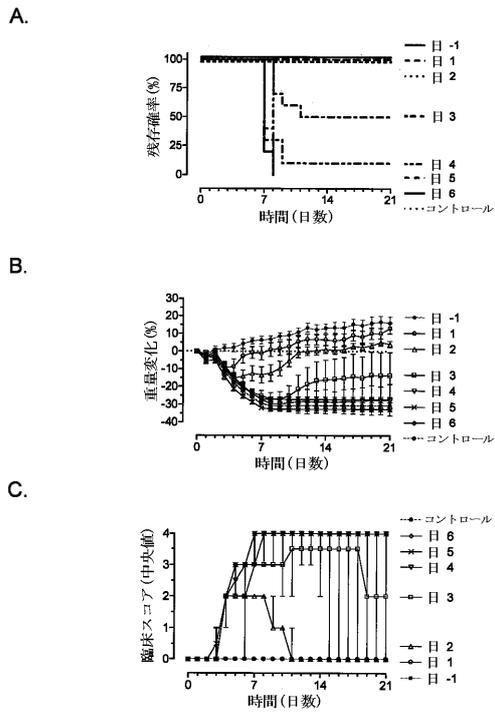
【 図 11 】



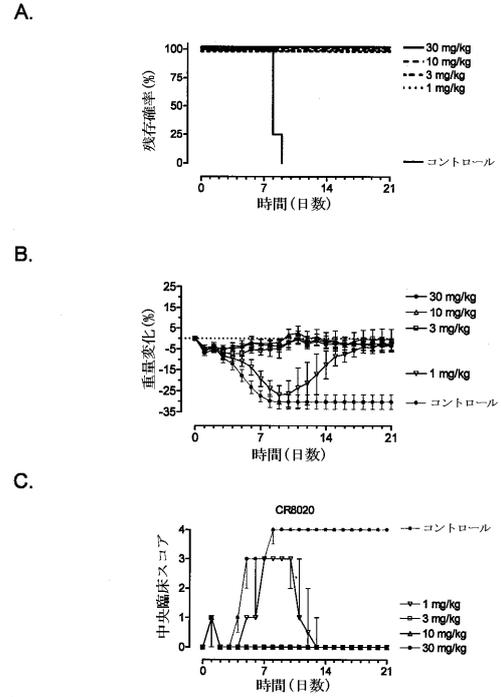
【 図 12 】



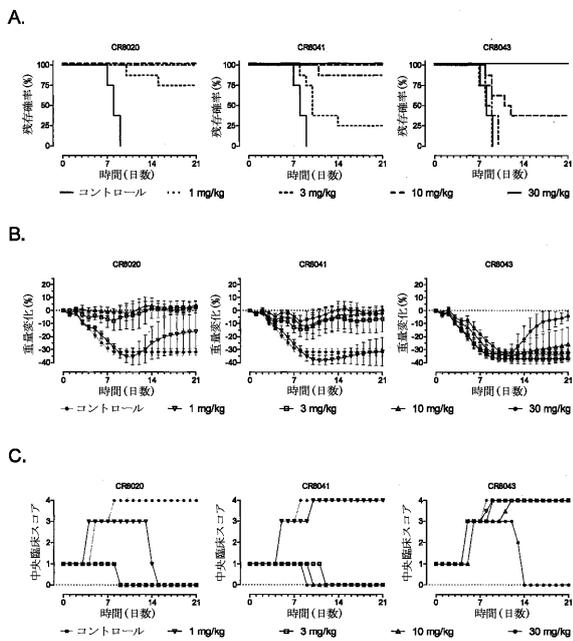
【 図 1 3 】



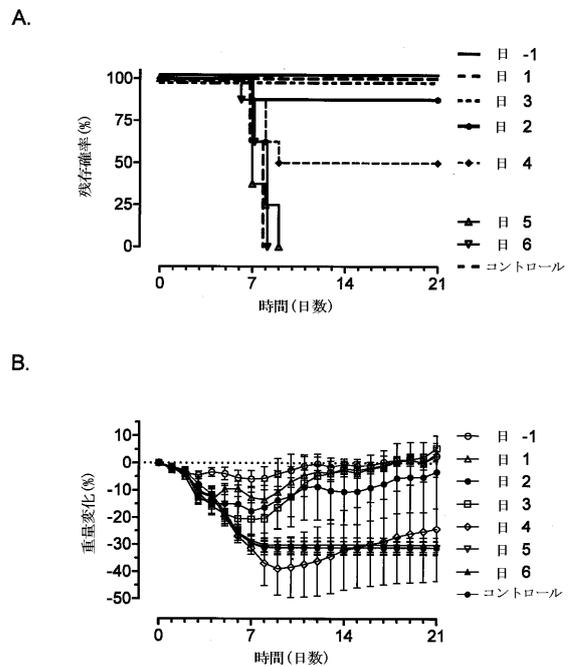
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

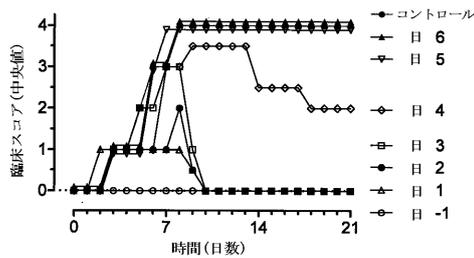


【 図 1 6 - 1 】



【図 16 - 2】

C.



(つづき)

【配列表】

2012526526000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年3月11日(2011.3.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インフルエンザの血球凝集素タンパク質(HA)におけるエピトープを特異的に認識し、かつそれに結合することが可能であり、H3N2のような、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有し、および少なくとも、H7サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスおよび/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する交差中和活性を有する、分離したヒト結合分子。

【請求項 2】

インフルエンザの血球凝集素タンパク質(HA)におけるエピトープを特異的に認識し、かつそれに結合することが可能であり、H3N2のような、H3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有する分離したヒト結合分子であって、前記結合分子は、少なくとも、A/ウィスコンシン/67/2005、A/広島/52/2005、A/パナマ/2007/99、およびA/ヨハネスバーグ/33/94からなる群より選ばれるH3N2株の一つまたはそれよりも多くに対して中和活性を有する、請求項1に従う分離した結合分子。

【請求項 3】

前記結合分子はさらに、H3N2株A/香港/1/68に対する中和活性を有する、請求項2に従う

結合分子。

【請求項 4】

前記結合分子は、H3HAタンパク質のHA2ポリペプチドの位置19、25、27、33および/または34でのアミノ酸を含むエピトープに結合する、請求項1～3のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 5】

結合分子は、位置19上のアミノ酸がアスパラギン酸(D)、位置25上のアミノ酸がグルタミン(Q)、位置27上のアミノ酸がグリシン(G)、位置33でのアミノ酸がグリシン(G)および/または位置34でのアミノ酸がグルタミンであるとき、HA2上の前記エピトープと結合する、請求項4に従う結合分子。

【請求項 6】

結合分子は一つまたはそれよりも多くの前記アミノ酸が変わったHA2上での前記エピトープと結合しない、請求項5に従う結合分子。

【請求項 7】

結合分子は、HA1およびHA2でのH3 HA前駆体分子HA0の試験管内でのトリプシン開裂を防ぐことが可能である、請求項1～6のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 8】

結合分子は、ウイルス膜と感染した細胞のエンドソーム膜との融合のために必要とされるH3 HAタンパク質の立体構造変化を防ぐことが可能である、請求項1～7のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 9】

結合分子は、H1N1のようなH1サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスAに結合し、かつそれを中和することが可能でない、請求項1～8のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 10】

結合分子は、次の

a . 配列番号109の重鎖CDR1領域、配列番号110の重鎖CDR2領域、および配列番号111の重鎖CDR3領域、および配列番号112の軽鎖CDR1領域、配列番号113の軽鎖CDR2領域および配列番号114の軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

b . 配列番号138の重鎖CDR1領域、配列番号139の重鎖CDR2領域、および配列番号140の重鎖CDR3領域、および配列番号141の軽鎖CDR1領域、配列番号142の軽鎖CDR2領域および配列番号143の軽鎖CDR3領域を含む結合分子、

c . 配列番号144の重鎖CDR1領域、配列番号145の重鎖CDR2領域、および配列番号146の重鎖CDR3領域、および配列番号147の軽鎖CDR1領域、配列番号148の軽鎖CDR2領域および配列番号149の軽鎖CDR3領域を含む結合分子

からなる群より選ばれる、請求項1～9のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 11】

前記結合分子はヒトモノクローナル抗体である、請求項1～10のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 12】

薬としての使用のための請求項1～11のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 13】

H3N2のようなH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスによって引き起こされるインフルエンザ感染の診断、治療および/または予防上の処置における薬としての使用のための、請求項1～12のいずれか一項に従う結合分子。

【請求項 14】

結合分子の機能しうる異形体であって、H3N2のようなH3サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスに対する中和活性を有することを特徴とする、請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子の機能しうる異形体。

【請求項 15】

請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子、または請求項14に従う機能しうる異形体

を含む免疫複合体であって、さらに少なくとも1つのタグを含む、免疫複合体。

【請求項16】

請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子、および/または請求項14に従う機能しうる異形体、および/または請求項15に従う免疫複合体、および薬剂的に許容可能な賦形剤を含む製薬上の組成物。

【請求項17】

請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子、および/または請求項14に従う機能しうる異形体、および/または請求項15に従う免疫複合体の、インフルエンザウイルス感染の診断、予防、および/または処置のための薬の調製においての使用。

【請求項18】

インフルエンザ感染は、H3N2のようなH3サブタイプH3のHAを含むインフルエンザウイルスによって引き起こされることを特徴とする、請求項17に従う使用。

【請求項19】

少なくとも1種の追加の結合分子を含む、請求項16に従う製薬上の組成物。

【請求項20】

追加の結合分子は、H1N1およびH5N1のようなH1およびH5サブタイプ、またはその機能しうる異形体のHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能なことを特徴とする、請求項19に従う製薬上の組成物。

【請求項21】

少なくとも2つのインフルエンザウイルスの中和結合分子を含む製薬上の組成物であって、少なくとも1つの結合分子は系統学上のグループ1の一つまたはそれよりも多くのインフルエンザウイルスサブタイプを中和することが可能であること、および少なくとも1つの結合分子は系統学上のグループ2の一つまたはそれよりも多くのインフルエンザウイルスサブタイプを中和することが可能であることを特徴とする、製薬上の組成物。

【請求項22】

少なくとも2つのインフルエンザウイルスの中和結合分子を含む製薬上の組成物であって、少なくとも1つの結合分子はH1および/またはH5サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能であること、および少なくとも1つの結合分子はH3、H7および/またはH10サブタイプのHAを含むインフルエンザウイルスを中和することが可能であることを特徴とする、製薬上の組成物。

【請求項23】

請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子または請求項14に従う機能しうる異形体をコードする核酸分子。

【請求項24】

請求項23に従う少なくとも1つの核酸分子を含むベクター。

【請求項25】

請求項24に従う少なくとも1つのベクターを含む宿主。

【請求項26】

宿主はヒト細胞である、請求項25に従う宿主。

【請求項27】

請求項1～13のいずれか一項に従う結合分子、または請求項14に従う機能しうる異形体を生産する方法であって、次のステップ

請求項25または26に従う宿主を結合分子または機能しうる異形体の発現の助けになる状況の下で培養すること、

発現された結合分子または機能しうる異形体を回収することを含む、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/056217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/10 A61K39/42 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/028946 A (CRUCCELL HOLLAND BV [NL]; VAN DEN BRINK EDWARD NORBERT [NL]; DE KRUIJF C) 13 March 2008 (2008-03-13) cited in the application the whole document	1-31
Y	WO 2009/053604 A (SANOFI PASTEUR [FR]) 30 April 2009 (2009-04-30) page 5, line 11 - page 27, line 2	1-31
Y	WO 2009/036157 A (SEA LANE BIOTECHNOLOGIES LLC [US]; HOROWITZ LAWRENCE [US]; BHATT RAMES) 19 March 2009 (2009-03-19) page 30 - page 42; table 3	1-31
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 July 2010		Date of mailing of the international search report 14/07/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/056217

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>YOSHIDA REIKO ET AL: "Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses." PLOS PATHOGENS MAR 2009, vol. 5, no. 3, March 2009 (2009-03), page E1000350, XP002541080 ISSN: 1553-7374 the whole document</p>	1-31
Y	<p>STROPKOVSKÁ A ET AL: "Broadly cross-reactive monoclonal antibodies against HA2 glycopeptide of Influenza A virus hemagglutinin of H3 subtype reduce replication of influenza A viruses of human and avian origin." ACTA VIROLOGICA 2009, vol. 53, no. 1, March 2009 (2009-03), pages 15-20, XP009121270 ISSN: 0001-723X cited in the application page 19; figure 4</p>	1-31
Y	<p>GOCNIK M ET AL: "Antibodies specific to the HA2 glycopolyptide of influenza A virus haemagglutinin with fusion-inhibition activity contribute to the protection of mice against lethal infection" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 88, no. Part 3, March 2007 (2007-03), pages 951-955, XP002541081 ISSN: 0022-1317 the whole document</p>	1-31
Y	<p>THROSBY MARK ET AL: "Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells." PLOS ONE 2008, vol. 3, no. 12, 2008, page E3942, XP002541082 ISSN: 1932-6203 the whole document</p>	1-31
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2010/056217

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KASHYAP ARUN K ET AL: "Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 105, no. 16, 22 April 2008 (2008-04-22), pages 5986-5991, XP002488075 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-31
Y	LIU SHUO ET AL: "Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus." PLOS ONE 2009, vol. 4, no. 3, 27 March 2009 (2009-03-27), page E5022, XP002541083 ISSN: 1932-6203 table 1	8,9
Y	WO 2008/110937 A (HUMABS LLC [US]; LANZAVECCHIA ANTONIO [CH]) 18 September 2008 (2008-09-18) page 14, line 31 - page 15, line 7	25,26
Y	WO 2009/035420 A (TEMASEK LIFE SCIENCES LAB LTD [SG]; QIAN HONG LIANG [SG]; HE FANG [SG]) 19 March 2009 (2009-03-19) page 21, line 19	25,26
Y	SUI JIANHUA ET AL: "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses" NATURE STRUCTURAL AND MOLECULAR BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, [Online] vol. 16, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 265-273, XP002538005 ISSN: 1545-9993 Retrieved from the Internet: URL:10.1038/NSMB.1566> [retrieved on 2009-02-22] page 268 - page 269; figure 5	8,9
X,P	WO 2009/079259 A (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; BURNHAM INST FOR MEDICAL RES [US]; M) 25 June 2009 (2009-06-25) claims 29,34,35	25,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/056217**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2010 /056217

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-24, 27-31

directed to isolated human binding molecules that recognize and bind influenza HA protein and neutralize one or more influenza virus strains comprising HA of the H3 subtype, and that have cross-neutralizing activity against at least an influenza virus comprising HA of the H7 and/or H10 subtypes.

2. claims: 25, 26

directed to pharmaceutical compositions comprising two binding molecules that neutralize one or more influenza virus subtypes of the phylogenetic group 1 and 2, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/056217

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008028946	A	13-03-2008	AU 2007293662 A1	13-03-2008
			CA 2663388 A1	13-03-2008
			EA 200970255 A1	30-10-2009
			EP 2059532 A2	20-05-2009
			JP 2010502207 T	28-01-2010
			KR 20090059121 A	10-06-2009
			US 2009311265 A1	17-12-2009
WO 2009053604	A	30-04-2009	CA 2700430 A1	30-04-2009
			FR 2921928 A1	10-04-2009
			US 2009092620 A1	09-04-2009
WO 2009036157	A	19-03-2009	AU 2008298939 A1	19-03-2009
			EP 2190477 A1	02-06-2010
			US 2008152657 A1	26-06-2008
WO 2008110937	A	18-09-2008	EP 2125886 A2	02-12-2009
WO 2009035420	A	19-03-2009	AU 2008297594 A1	19-03-2009
			EP 2201039 A1	30-06-2010
WO 2009079259	A	25-06-2009	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 S	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/569 L	
	G 0 1 N 33/577 B	

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

(72)発明者 ロバート ハイイツ エドワード フリーゼン
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6
 (72)発明者 テオドルス ヘンドリクス ジェコブス クワークス
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6
 (72)発明者 マンディー アントニア カタリーナ ジョンゲニーレン
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA51 CA03 DA05 EA04 GA11
 4B064 AG27 CA19 DA01 DA15
 4B065 AA01X AA94Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 AA34 BB36 CC22 CC23 DD62
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA29 EA53 FA74