

(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2019-503648

(P2019-503648A)

(43) 公表日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/81 (2006.01)	C 1 2 N 15/81 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-521052 (P2018-521052)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月27日 (2016.10.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月18日 (2018.6.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/058975
 (87) 国際公開番号 W02017/075124
 (87) 国際公開日 平成29年5月4日 (2017.5.4)
 (31) 優先権主張番号 62/247,841
 (32) 優先日 平成27年10月29日 (2015.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/367,359
 (32) 優先日 平成28年7月27日 (2016.7.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596129215
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション
 Merck Sharp & Dohme Corp.
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U. S. A.

(74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト呼吸器合胞体ウイルスを中和する抗体

(57) 【要約】

本発明は、高い抗RSV中和力価を有するモノクローナル抗体に関する。本発明は更に、本発明の抗体をコードする単離された核酸およびそれにより形質転換された宿主細胞を提供する。本発明は更に、特に乳幼児および高齢者における受動免疫療法剤としての、本発明の抗体および核酸を使用する診断、予防および治療方法を提供する。

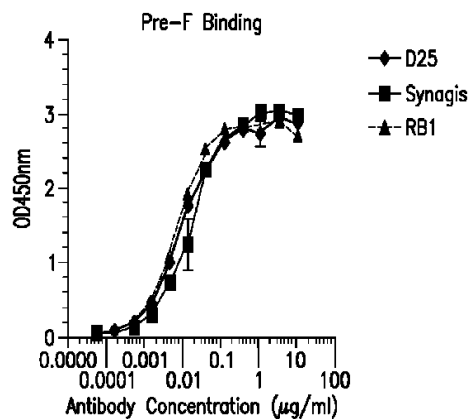


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、ヒト R S V F タンパク質に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

1) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント、

2) 配列番号 7 に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を含む重鎖可変領域および / または配列番号 8 に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント、および

3) 配列番号 7 に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を含む重鎖可変領域および / または配列番号 8 に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体のフレームワーク領域内にいずれかの配列変異が存在するもの

からなる群から選択される、軽鎖免疫グロブリン、重鎖免疫グロブリンまたは軽鎖および重鎖の両方の免疫グロブリンを含む、ヒト R S V F タンパク質に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

該抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E) または類似技術 (例えば、K i n E x a または O C T E T) により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K D 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する、請求項 1 または 2 記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

配列番号 7 の重鎖可変領域および配列番号 8 の軽鎖可変領域を含む抗体と同じヒト R S V F タンパク質のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E) または類似技術 (例えば、K i n E x a または O C T E T) により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K D 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 5】

該抗体が、以下の相互作用、すなわち、

1) 軽鎖 C D R 3 ループが、残基 P h e 9 1 および L e u 9 2 を介して、ヒト R S V F タンパク質の A r g 4 2 9 の側鎖と相互作用し、該相互作用は、C D R 3 ループ内の P h e 9 1 および L e u 9 2 のカルボニル酸素とヒト R S V F タンパク質の A r g 4 2 9 の Guanidino 窒素との間の 2 つの水素結合の形成によるものである；

2) 軽鎖 C D R 2 ループが、残基 A s p 5 0 および G l u 5 5 を介して、ヒト R S V F タンパク質の A s n 4 2 6 および L y s 4 4 5 と水素結合を形成する；

3) 重鎖 C D R 3 ループが、残基 T y r 1 0 4 および T y r 1 1 0 を介して、ヒト R S V F タンパク質上の I l e 4 3 2 とのファンデルワールス相互作用のための表面を形成する；

4) 重鎖 C D R 3 ループが、A s n 1 0 7 を介して、ヒト R S V F タンパク質の L y s 4 3 3 と水素結合を形成する；ならびに

5) 軽鎖が R S V 融合前三量体の隣接単量体の G l u 1 6 1 および S e r 1 8 2 に詰め寄る

10

20

30

40

50

の1以上を介してヒトRSV Fタンパク質に結合する、請求項4記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項6】

該抗体が、以下の相互作用、すなわち、

1) 軽鎖CDR3ループが、残基Phe91およびLeu92を介して、ヒトRSV Fタンパク質のArg429の側鎖と相互作用し、該相互作用は、CDR3ループ内のPhe91およびLeu92のカルボニル酸素とヒトRSV Fタンパク質のArg429の Guanidino 窒素との間の2つの水素結合の形成によるものである；

2) 軽鎖CDR2ループが、残基Asp50およびGlu55を介して、ヒトRSV Fタンパク質のAsn426およびLys445と水素結合を形成する；

3) 重鎖CDR3ループが、残基Tyr104およびTyr110を介して、ヒトRSV Fタンパク質上のIle432とのファンデルワールス相互作用のための表面を形成する；

4) 重鎖CDR3ループが、Asn107を介して、ヒトRSV Fタンパク質のLys433と水素結合を形成する；ならびに

5) 軽鎖がRSV融合前三量体の隣接単量体のGlu161およびSer182に詰め寄る

の全てを介してヒトRSV Fタンパク質に結合する、請求項5記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項7】

該抗体が、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項8】

各軽鎖が、配列番号8を含む可変領域およびヒトカッパ軽鎖(配列番号14)を含み、各重鎖が、配列番号7を含む可変領域およびヒトIgG1定常領域(配列番号13)を含む、2本の軽鎖と2本の重鎖とを有する完全長抗体である請求項7記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項9】

該抗体が、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む、請求項7記載の単離された抗体。

【請求項10】

重鎖のアミノ酸配列が配列番号23のアミノ酸配列からなり、軽鎖のアミノ酸配列が配列番号25のアミノ酸配列からなる、請求項8記載の単離された抗体。

【請求項11】

IgG抗体である、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項12】

CHO細胞において産生される抗体である、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項13】

配列番号7または8のいずれか1つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項14】

配列番号23または25のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項13記載の単離されたポリペプチド。

【請求項15】

請求項13または14記載のポリペプチドのいずれか1つをコードする単離された核酸。

【請求項16】

請求項15または16記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の抗体、抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

ピチア (*Pichia*) 細胞またはチャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項 17 記載の宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと医薬上許容される担体または希釈剤とを含む組成物。

【請求項 20】

インフルエンザ、ヒトサイトメガロウイルス (*hCMV*)、ヒトメタニューモウイルス (*hMPV*)、ヒトパラインフルエンザ (*hPIV*)、ヒトライノウイルス (*hRV*)、マイコプラズマ・ニューモニア (*mycoplasma pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*streptococcus pneumoniae*)、アデノウイルス、ポカウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスまたは BK ウイルスから選択される呼吸器病原体に対する抗体またはその抗原結合性フラグメントを更に含む、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 21】

呼吸器病原体がインフルエンザ、*hCMV*、*hMPV*、*hPIV*、ノロウイルスまたは BK ウイルスである、請求項 20 記載の組成物。

【請求項 22】

1) 請求項 1 ~ 12 記載の抗体または抗原結合性フラグメントのいずれか 1 つの重鎖および / または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、該ポリヌクレオチドの発現に好ましい条件下で培養し、

2) 所望により、該抗体または抗原結合性フラグメントを該宿主細胞および / または培地から回収することを含む、抗体または抗原結合性フラグメントの製造方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントの有効量を、所望によりもう 1 つの予防または治療剤と共に、対象に投与することを含む、ヒト対象における RSV 感染の予防または治療方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントの有効量を、所望によりもう 1 つの予防または治療剤と共に、対象に投与することを含む、ヒト対象における移植関連 RSV 感染の予防または治療方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと、RSV F タンパク質および RSV G タンパク質ならびにそれらの断片から選択される抗原とを含む免疫原性組成物。

【請求項 26】

サンプルを請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体またはフラグメントと接触させ、該抗体またはフラグメントとペプチドとの複合体の存在を検出することを含む、サンプルにおけるヒト RSV 融合前 F タンパク質またはその断片の存在を検出するための方法であって、該複合体の検出が RSV 融合前 F タンパク質の存在を示す、方法。

【請求項 27】

1) 感染または感染症を予防または治療するための、あるいは

2) 感染性合併症による呼吸器疾患および移植疾患を予防または治療するための医薬の製造における使用のための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 28】

RSV 感染の予防または治療のための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体もし

10

20

30

40

50

くは抗原結合性フラグメントまたは請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高い抗 R S V 中和力価を有するヒトモノクローナル抗体、ならびに乳幼児および高齢者における受動免疫療法剤としてのこれらの抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

パラミクソウイルスは、重要なヒトおよび動物病原体である包膜マイナス鎖 RNA ウィルスである。ヒト呼吸器合胞体ウイルス (h R S V、R S V) はパラミクソウイルス科、ニューモウイルス亜科に属する。A 型および B 型の 2 つの亜型が特定されており、6 月齢未満の小児においては、重篤であり時には致命的でさえある呼吸器感染の主要原因である。C O P D、喘息、癌、免疫不全状態 (H I V または移植後を含む) のような基礎疾患を有する成人も、重篤な R S V 感染症を発症するリスクを有する。50 歳を超える成人における急性呼吸器感染による年間入院の 15 % が R S V により引き起こされる。米国においては、R S V は毎年 100,000 件を超える入院を引き起こし、世界中で毎年約 160,000 人の死亡を引き起こすと推定されている。現在、R S V に対するワクチンは存在せず、ホルマリン不活化ウイルスでの治験は、R S V に感染した際の乳幼児における疾患重篤度の増加を伴っていた。ヒトメタニューモウイルス (h M P V) およびヒトパラインフルエンザウイルス (h P I V) を含む他の科のメンバーも、h R S V に類似した急性呼吸器疾患を引き起こす。

10

20

【0003】

h R S V ゲノムは、11 個のタンパク質をコードする約 15 kb の一本鎖マイナスセンス RNA 分子である。これらのタンパク質のうち 2 個はビリオンの主要表面糖タンパク質である。これらは、(i) 細胞へのウイルス結合を媒介する付着 (G) タンパク質、および (ii) 感染サイクルの初期段階におけるウイルスと細胞膜との融合、および特徴的な合胞体を形成する、感染細胞の膜と隣接細胞の膜との融合の両方を促進する融合タンパク質 (F) である。付着タンパク質 G は細胞表面受容体に結合し、F と相互作用する。この相互作用は F におけるコンホメーション変化を誘発して膜融合を誘発し、それにより、ウイルスリボ核タンパク質複合体を宿主細胞の細胞質内に放出する。

30

【0004】

F タンパク質または G タンパク質に対するモノクローナル抗体はインビトロにおける中和作用およびインビボにおける予防効果を有することが示されている。例えば、B e e l e r および C o e l i n g h 1989, J. V i r o l . 63 : 2941 - 50 ; G a r c i a - B a r r e n o ñ a , 1989, J. V i r o l . 63 : 925 - 32 ; T a y l o r ñ a , 1984, I m m u n o l o g y 52 : 137 - 142 ; W a l s h ñ a , 1984, I n f e c t i o n a n d I m m u n i t y 43 : 756 - 758 ; ならびに米国特許第 5,842,307 および第 6,818,216 号を参照されたい。F 糖タンパク質上の中和エピトープは最初は、抗体エスケープ変異体において変化したアミノ酸を特定すること及び R S V F 由来ペプチドへの抗体結合を評価することによりマッピングされた。これらの研究は、中和抗体が、しばしば、2 つの異なる線状エピトープを標的とすることを示した。融合前および融合後 F 形態の抗原部位の総説については、G r a h a m ñ a , 2015, C u r r O p i n I m m u n o l 35 : 30 - 38 を参照されたい。抗原部位 I I (部位 A とも称される) は残基 255 ~ 275 を含み、パリビズマブ (S Y N A G I S (登録商標), A s t r a Z e n e c a) の標的である。このエピトープはコンホメーション依存的であると推定され、このエピトープと複合体化したパリビズマブのより強力な誘導体の構造は、線状エピトープがヘリックス - ループ - ヘリックス・コンホメーションをとることを明らかにした。抗原部位 I V (部位 C とも称される) は残基 422 ~ 438 を含み、抗体 M A b 19 および 101 F の標的である。このエピトー

40

50

ブは、システインに富む領域のC末端であり、ドメインI Iの一部であり、これは、相同パラミクソウイルスF糖タンパク質においては、融合前および融合後のコンホメーションの間で構造的に不変のままである。5 C 4、A M 2 2およびD 2 5は、融合前Fタンパク質上にのみ存在する部位0と称されるエピトープを示し、パリビズマブより50倍強力であった。McLellanら, 2013, Science 340: 1113 - 1117; 国際特許出願番号WO 2008/147196および米国特許第8,568,726号を参照されたい。他のhRSV抗体は国際特許出願番号WO94/06448およびWO92/04381ならびに米国特許第8,221,759号を参照されたい。

【0005】

能動免疫化のためのRSVワクチンは、入手可能であったとしても、未熟免疫系を有する新生児または免疫抑制された患者の治療には使用できないであろう。より慢性の形態の疾患の結果として、予防用受動免疫療法が必要な患者においては、現在の療法は、プール血漿から製造されたヒトIgGの定期的静脈内接種により行われる。このタイプの療法は、中和抗RSV抗体の力価が低いため、大量のグロブリン(例えば、0.75g/kg)を要し、したがって、診療所または病院において、高リスク月間(秋、冬および早春)には毎月、長時間(2~4時間)にわたる静脈内投与を要する。

10

【発明の概要】

【0006】

発明の概括

本発明は、以下に特定する構造的および機能的特徴を含む抗RSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントを提供する。

20

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む、ヒトRSV Fタンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも1つを有していてもよい：(i)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ のKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する；あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ~約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ のKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

30

【0007】

もう1つの実施形態においては、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む、ヒトRSV Fタンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。ある実施形態においては、該軽鎖または軽鎖可変領域は配列番号8のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該軽鎖は、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖に結合していない。ある実施形態においては、該軽鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖に結合している。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも1つを有していてもよい：(i)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ のKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する；あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ のKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。ある実施形態においては、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

40

【0008】

もう1つの実施形態においては、本発明は、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重

50

鎖可変領域 C D R 1、(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、および (i i i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、ヒト R S V F タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号 9 のアミノ酸配列を含まない。1 つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも 1 つを有していてもよい：(i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する；あるいは (i i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合後 F タンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

10

【 0 0 0 9 】

1 つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、(i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および (i i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある実施形態においては、該軽鎖または軽鎖可変領域は配列番号 8 のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該軽鎖は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖に結合していない。ある実施形態においては、該軽鎖は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖に結合している。1 つの実施形態においては、該抗体またはその抗体フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも 1 つを有していてもよい：(i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する；あるいは (i i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合後 F タンパク質に結合する。ある実施形態においては、該軽鎖は配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

20

【 0 0 1 0 】

1 つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、(i i i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、(i v) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、(v) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および (v i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号 9 のアミノ酸配列を含まない。1 つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも 1 つを有していてもよい：(i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する；あるいは (i i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K d 値でヒト R S V 融合後 F タンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

30

40

【 0 0 1 1 】

もう 1 つの実施形態においては、本発明は、(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、(i i i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、(i v) 配列番号 4

50

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、(v) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および (v i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、ヒト R S V F タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、配列番号 7 からなる重鎖可変領域に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を含む重鎖可変領域と、配列番号 8 からなる軽鎖可変領域に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を含む軽鎖可変領域とを含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号 9 のアミノ酸配列を含まない。これらの前記実施形態においては、フレームワーク領域内に配列変異が存在する。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも1つを有していてもよい：(i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する；あるいは (i i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} M の K d 値でヒト R S V 融合後 F タンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号 23 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

10

【0012】

もう1つの実施形態においては、本発明はまた、(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、(i i i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、(i v) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1、(v) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2、および (v i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、ヒト R S V に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号 9 のアミノ酸配列を含まない。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは重鎖 C D R（配列番号 1 ~ 3）内および/または軽鎖 C D R（配列番号 4 ~ 6）内に1、2または3個のアミノ酸置換を含む。配列番号 7 の V H 配列は配列番号 1 ~ 3 の C D R を有し、配列番号 8 の V L 配列は配列番号 4 ~ 6 の C D R を有する。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも1つを有していてもよい：(i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質に結合する；あるいは (i i) 表面プラズモン共鳴（例えば、B I A C O R E）または類似技術（例えば、K i n E x a または O C T E T）により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} M の K d 値でヒト R S V 融合後 F タンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号 23 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

20

30

40

【0013】

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む可変重鎖および/または配列番号 8 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒト R S V F タンパク質に結合する。もう1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる重鎖と、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる軽鎖とを含み、ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒト R S V F タンパク質に結合する。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合

50

性フラグメントは、所望により、以下の特徴の少なくとも1つを有していてもよい：(i)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する；あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。

【0014】

もう1つの実施形態においては、本発明は、配列番号23の重鎖と配列番号25の軽鎖とを含む抗体の場合と同じ、ヒトRSV Fタンパク質のエピトープに結合する抗体または抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは以下の特徴の少なくとも1つを有する：(i)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する；あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。1つの実施形態においては、該抗体はそれぞれ配列番号7および8の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは配列番号7の重鎖可変領域および/または配列番号8の軽鎖可変領域内に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸置換を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0015】

もう1つの実施形態においては、本発明は、配列番号23の重鎖と配列番号25の軽鎖とを含む抗体の、ヒトRSVへの結合を交差遮断する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは以下の特徴の少なくとも1つを有する：(i)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する；あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、B I A C O R E)または類似技術(例えば、K i n E x aまたはO C T E T)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは配列番号7の重鎖可変領域または配列番号8の軽鎖可変領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは配列番号7の重鎖可変領域または配列番号8の軽鎖可変領域内に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸置換を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは重鎖CDR(配列番号1~3)内および/または軽鎖CDR(配列番号4~6)内に1、2または3個のアミノ酸置換を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0016】

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖もしくは30個以下のアミノ酸置換を含むその変異体および/または12個以下のアミノ酸置換を含む配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、ヒトRSV Fタンパク質に結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントに関する。ある実施形態においては、重鎖

10

20

30

40

50

または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0017】

ある実施形態においては、本発明は、ヒトRSV Fタンパク質に結合する単離された抗体または抗原結合性フラグメントに関するものであり、ここで、該抗体は以下の相互作用の1以上または以下の相互作用の全てを介してヒトRSV Fタンパク質に結合する：

1) 軽鎖CDR3ループが、残基Phe91およびLeu92を介して、ヒトRSV Fタンパク質のArg429の側鎖と相互作用し、該相互作用は、CDR3ループ内のPhe91およびLeu92のカルボニル酸素とヒトRSV Fタンパク質のArg429のグアニジノ窒素との間の2つの水素結合の形成によるものである；

2) 軽鎖CDR2ループが、残基Asp50およびGlu55を介して、ヒトRSV Fタンパク質のAsn426およびLys445と水素結合を形成する；

3) 重鎖CDR3ループが、残基Tyr104およびTyr110を介して、ヒトRSV Fタンパク質上のIle432とのファンデルワールス相互作用のための表面を形成する；

4) 重鎖CDR3ループが、Asn107を介して、ヒトRSV Fタンパク質のLys433と水素結合を形成する；ならびに

5) 軽鎖がRSV融合前三量体の隣接単量体のGlu161およびSer182に詰め寄る(pack)。

【0018】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは単離されている。

【0019】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは組換え抗体である。

【0020】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは完全長抗体である。

【0021】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(a)前記の可変重鎖のいずれかと、(b)リーダーペプチド(例えば、配列番号10のリーダーペプチド)とからなる重鎖可変領域を含みうる。前記実施形態のいずれかの或る態様においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(a)前記の軽重鎖のいずれかと、(b)リーダーペプチド(例えば、配列番号10のリーダーペプチド)とからなる軽鎖可変領域を含みうる。

【0022】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、前記の可変重鎖のいずれかと任意のヒト重鎖定常ドメインを含む抗体である。1つの実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントはIgGアイソタイプのものであり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4ヒト重鎖定常ドメインを含む。1つの実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒト重鎖IgG1定常ドメインを含み、ここで、該IgG1定常ドメインはアフコシル化(afucosylated)されている。

【0023】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは前記の可変軽鎖のいずれか及びヒト軽鎖定常ドメインを含みうる。1つの実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒトカッパ軽鎖定常ドメインまたはその変異体を含み、ここで、該変異体は、20、10、5、3、2または1個まで修飾アミノ酸置換を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒトラムダ軽鎖定常ドメインまたはその変異体を含み、ここで、該変異体は、20、10、5、3、2または1個まで修飾アミノ酸置換を含む。1つ

10

20

30

40

50

の実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、配列番号 14 のアミノ酸配列を含むヒトカッパ軽鎖定常ドメインを含む。

【0024】

1つの実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体は、2本の軽鎖と2本の重鎖とを有する完全四量体構造を含み、ここで、各軽鎖は、配列番号8を含む可変領域およびヒトカッパ軽鎖定常領域（配列番号14）を含み、各重鎖は、配列番号7を含む可変領域およびヒトIgG1定常領域（配列番号13）を含む。

【0025】

前記実施形態のいずれかの或る態様においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントは少なくとも1つの予防または治療剤にコンジュゲート化（結合）されうる。1つの実施形態においては、該治療剤は第2抗体またはそのフラグメント、免疫調節剤、ホルモン、細胞毒性剤、酵素、放射性核種、第2抗体であって少なくとも1つの免疫調節剤、酵素、放射能標識、ホルモン、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは細胞毒性剤にコンジュゲート化されたもの、あるいはそれらの組合せを含む。

10

【0026】

本発明はまた、配列番号1～8、23もしくは25のいずれか1つのアミノ酸配列または任意の前記配列の断片を含む単離されたポリペプチドを提供する。ある実施形態においては、重鎖アミノ酸配列を含むポリペプチドは配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0027】

本発明はまた、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントのいずれか1つをコードする単離された核酸を提供する。1つの実施形態においては、本発明は、配列番号1～8、23または25のポリペプチドのいずれか1つをコードする単離された核酸を提供し、ここで、該ポリペプチドは、所望により、リーダー配列を含んでもよい。ある実施形態においては、重鎖アミノ酸配列を含むポリペプチドは配列番号9のアミノ酸配列を含まない。本発明はまた、配列番号1～8、23または25のポリペプチド（ここで、該ポリペプチドは、所望により、リーダー配列を含んでもよい）のいずれか1つをコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。ある実施形態においては、重鎖アミノ酸配列を含むポリペプチドは配列番号9のアミノ酸配列を含まない。これらの単離された核酸およびそれらを含む発現ベクターは、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントを組換え宿主細胞内で発現させるために使用されうる。したがって、本発明はまた、配列番号1～8、23または25のポリペプチド（ここで、該ポリペプチドは、所望により、リーダー配列を含んでもよい）のいずれか1つをコードする単離された核酸を含む宿主細胞を提供する。ある実施形態においては、重鎖アミノ酸配列を含むポリペプチドは配列番号9のアミノ酸配列を含まない。1つの実施形態においては、該宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣細胞である。1つの実施形態においては、該宿主細胞は酵母細胞、例えばピチア（*Pichia*）細胞またはピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）宿主細胞である。

20

30

【0028】

本発明はまた、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと医薬上許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。1つの実施形態においては、医薬上許容される担体または希釈剤はL-ヒスチジンである。この実施形態の1つの態様においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは10mM L-ヒスチジン、7%（w/v）スクロースおよび0.02%（w/v）ポリソルベート-80（pH6.0）中で処方（製剤化）される。該抗体または抗原結合性フラグメントは、典型的には、そのような処方（製剤）中に約100mg/mLで存在する。

40

【0029】

1つの実施形態においては、本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと、もう1つの予防または治療剤とを含む組成物を提供する。1つの実施形態においては、前記のもう1つの予防または治療剤は、第2の抗hRSV抗体またはその抗原結合性

50

フラグメントからなる群から選択される。1つの実施形態においては、本発明の第2の抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0030】

本発明はまた、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントのいずれか1つを含む容器または注射装置を提供する。1つの実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

10
20

【0031】

本発明はまた、本発明の抗体(またはその抗原結合性フラグメント)の重鎖および/または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、該ポリヌクレオチドの発現に好ましい条件下で培養し、所望により、該抗体または抗原結合性フラグメントを該宿主細胞および/または培地から回収することを含む、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントの製造方法を提供する。1つの実施形態においては、該重鎖をコードするポリヌクレオチドおよび該軽鎖をコードするポリヌクレオチドは単一のベクター内に存在する。もう1つの実施形態においては、該重鎖をコードするポリヌクレオチドおよび該軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、異なるベクター内に存在する。1つの実施形態においては、該重鎖をコードするポリヌクレオチドおよび該軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む抗体または抗原結合性フラグメントをコードしている。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

30
40

【0032】

本発明はまた、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントの有効量を、所望によりもう1つの予防もしくは治療剤または治療手技と共に、対象に投与することを含む、hRSV感染の予防または治療を要する対象におけるhRSV感染の予防または治療方法を提供する。1つの実施形態においては、治療される対象はヒト対象である。1つの実施形態においては、前記のもう1つの予防または治療剤は、以下のものからなる群から選択される：第2の抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメント、抗hRSV F抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸、あるいは抗体コンジュゲート。1つの実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配

50

列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

【0033】

本発明はまた、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントの有効量を、所望によりもう1つの予防もしくは治療剤または治療手技と組合せて、対象に投与することを含む、hRSV感染の予防または治療を要する対象におけるhRSV感染の予防または治療方法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

10

20

【0034】

本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントを含むワクチンまたは免疫原性組成物を提供する。1つの実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体または抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

30

【0035】

1つの実施形態においては、該ワクチンまたは免疫原性組成物は更に、RSV Fタンパク質およびRSV Gタンパク質ならびにそれらの断片から選択される抗原を含む。

【0036】

本発明はまた、サンプルを本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させ、該抗体またはフラグメントと該ペプチドとの複合体の存在を検出することを含む、(Fタンパク質またはその断片を検出することにより)サンプルにおけるRSVの存在を検出するための方法を提供し、ここで、該複合体の検出はRSV Fタンパク質の存在を示す。1つの実施形態においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、(iii)配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、(iv)配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、(v)配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および(vi)配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、該重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、該軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

40

50

【0037】

本発明はまた、親抗hRSV Fタンパク質抗体を得、該親抗hRSV Fタンパク質抗体のエフェクター機能を増強することを含む、抗hRSV Fタンパク質抗体の抗hRSV活性を増強する方法を提供し、ここで、得られる抗hRSV Fタンパク質抗体の活性は、親抗hRSV Fタンパク質抗体と比較して増強している。本明細書中で用いる「親抗抗体」は、野生型Fc領域および/または野生型グリコシル化（すなわち、未操作哺乳類宿主細胞におけるポリペプチドの発現から生じるグリコシル化パターン）を有する抗体を意味する。親抗体のエフェクター機能は、そのFc領域を突然変異させることにより、または例えば該抗体をアフコシル化することによりそのグリコシル化を改変すること（後記で更に詳細に説明される）により増強されうる。1つの実施形態においては、親抗hRSV Fタンパク質抗体のエフェクター機能は、親抗hRSV Fタンパク質抗体のFc領域内に突然変異を施すことにより増強される。もう1つの実施形態においては、親抗hRSV Fタンパク質抗体のエフェクター機能は、該抗体からフコース残基を除去すること、または糖タンパク質にフコースを付加する酵素の活性を除去するように遺伝的に操作された宿主細胞において該抗体を発現させることにより増強される。

10

【0038】

詳細な説明

略語

本発明の詳細な説明および実施例の全体にわたって、以下の略語を用いる。

20

【0039】

A D C C 抗体依存性細胞傷害；

C D C 補体依存性細胞傷害；

C D R K a b a t (カバト) 番号付け系を用いて定められた、免疫グロブリン可変領域内の相補性決定領域；

C H O チャイニーズハムスター卵巣；

E L I S A 酵素結合イムノソルベントアッセイ；

F R 抗体フレームワーク領域：C D R領域を除く免疫グロブリン可変領域；

H R P ホースラディッシュペルオキシダーゼ；

I C 5 0 50%の抑制をもたらす濃度；

I g G 免疫グロブリンG；

30

K a b a t E l v i n A . K a b a t ((1 9 9 1) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d .) により開発された免疫グロブリンアライメントおよび番号付け系；

m A b または M a b または M A b モノクローナル抗体；

V 領域 異なる抗体間で配列が可変性であるI g G鎖のセグメント。それは軽鎖内のK a b a t 残基109および重鎖内の113まで伸長する；

V H 免疫グロブリン重鎖可変領域；

V K 免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域。

40

【0040】

定義

本発明がより容易に理解されうるように、幾つかの科学技術用語を以下に具体的に定義する。本明細書中の他の箇所にて特に定義されていない限り、本明細書中で用いる他の全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解される意味を有する。

【0041】

添付の特許請求の範囲を含む本明細書において用いる単数形の語は、文脈に明らかに矛盾しない限り、その対応複数対象物を含む。

【0042】

「投与」および「治療（処理、処置）」は、それが動物、ヒト、実験対象、細胞、組織

50

、器官または生物学的流体に適用される場合には、該動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官または生物学的流体との外因性医薬、治療剤、診断剤または組成物の接触を意味する。細胞の処理は、該細胞との試薬の接触、および該細胞に接触している流体との試薬の接触を含む。「投与」および「処理（治療、処置）」は、試薬、診断剤、結合性化合物または別の細胞による、例えば細胞の、インビトロおよびエクスピボ（*ex vivo*）処理をも意味する。

【0043】

「RSV疾患」は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）による感染によって直接的または間接的に引き起こされる任意の疾患、ならびに患者をRSVによる感染にかかりやすくする疾患または状態を意味する。前者の範疇に入る疾患の例には、肺炎および細気管支炎が含まれる。後者の範疇における疾患および状態（すなわち、重篤なRSV感染のリスクに患者をさらす疾患および状態）には、嚢胞性線維症、先天性心疾患、癌、加齢性免疫抑制、移植レシピエント、および一般に、免疫抑制の状態または免疫系の機能低下を引き起こす任意の状態、例えば術後臓器移植レジメンまたは早産が含まれる。

10

【0044】

「治療する」または「治療」は、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかを含有する組成物のような治療剤を、該治療剤が治療活性を示す疾患の症状の1以上を有する又は該疾患を有する疑いのある対象または患者に内的または外的に投与することを意味する。典型的には、該治療剤は、いずれかの臨床的に測定可能な度合によるそのような症状の退縮の誘導またはそのような症状の進行の抑制により、治療対象または集団における1以上の疾患症状を軽減するのに有効な量で投与される。いずれかの特定の疾患症状を軽減するのに有効な治療剤の量は患者の病態、年齢および体重、ならびに対象において所望の応答を惹起する薬物の能力のような要因によって変動しうる。疾患症状が軽減したかどうかは、その症状の重症度または進行状態を評価するために医師または他の熟練した医療提供者によって典型的に用いられるいずれかの臨床的尺度により評価されうる。抗RSV抗体での治療は、他の呼吸器病原体を治療するための他の介入（抗抗体、核酸、ワクチンおよび小分子化合物）とも組合せられうるであろう。

20

【0045】

「予防する」または「予防」は、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかを含有する組成物のような予防剤を、該予防剤が予防活性を示すhRSVに感染するリスクを有する対象または患者に内的または外的に投与することを意味する。予防には、後のRSV感染の可能性または重症度の低減、RSV感染時の下気道感染（LRI）に関連した症状の改善、およびRSV感染に対する防御のための免疫の誘導が含まれる。典型的には、予防剤は、感染を阻止するために、肺および/または鼻におけるRSVを中和するのに有効な量で投与される。いずれかの特定の疾患症状を軽減するのに有効な予防剤の量は患者の年齢および体重、ならびに対象において所望の応答を惹起する予防剤の能力のような要因によって変動しうる。疾患症状が軽減したかどうかは、その症状の重症度または進行状態を評価するために医師または他の熟練した医療提供者によって典型的に用いられるいずれかの臨床的尺度により評価可能であり、ある場合には、それは入院の必要性を低減するであろう。

30

40

【0046】

hRSV Fタンパク質

ヒトRSV Fタンパク質は、共有結合したF1およびF2サブユニットへとタンパク質分解により切断される準安定性三量体前駆体（F0）として合成される。パラミクソウイルス科のPIV5およびRSVメンバーに関しては、融合前形態のF三量体の原子構造が決定されている。McLellanら、2011、*J Virol*、85:7788-7796（RSV）およびWelchら、2012、*Proc Natl Acad Sci* 109:16672-16677（PIV5）を参照されたい。融合前Fは、短いC末端の細胞質尾部、単一の膜貫通ドメイン、ヘリックス柄（*helical stalk*）および球状頭部ドメインを有する。NDV、hPIV3およびRSV F（融合後形態

50

)の原子構造は、大きなリフォールディング事象が生じて前融合Fを融合後Fへと変換し、この場合、球状頭部ドメインの一部が再編成して6ヘリックス束を形成することを示している。これらの構造は、ペプチド阻害データと共に、F媒介性膜融合のモデルを示唆しており、該モデルにおいては、活性化に際して、F1/F2が再編成して、疎水性融合ペプチドをF1のN末端から標的細胞膜内に挿入してプレヘアピン中間体を形成する。この比較的伸長した構造はウイルスを細胞膜に係留し、崩壊して、融合後構造の安定な6ヘリックス束を形成する。準安定融合前形態からプレヘアピン中間体および融合後コンホメーションへの移行は、エネルギー勾配を下るように進行し、融合後形態は最も安定な状態であり、Fリフォールディング中に放出されたエネルギーは膜融合と共役している。

【0047】

hRSV Fタンパク質なる語はヒトRSV Fタンパク質およびその断片、例えば、シグナルペプチドを欠くその成熟断片を含む。本発明の1つの実施形態においては、ヒトRSV Fタンパク質のアミノ酸配列は、Genbankアクセッション番号AAR14266(hRSV B株9320)において開示されているアミノ酸配列を含む。

【0048】

抗hRSV抗体およびその抗原結合性フラグメント

本発明は、融合前Fタンパク質および融合後Fタンパク質の両方に結合するヒトRSV Fタンパク質(好ましくは、RSV A菌株およびB菌株の両方からのもの)に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント、ならびにそのような抗体またはフラグメントの使用を提供する。幾つかの実施形態においては、該抗RSV Fタンパク質抗体は単離されている。本明細書に記載されている抗体はFタンパク質のIV部位のエピトープに結合する。本明細書に記載されている本発明の実施形態のいずれかにおいては、ある実施形態においては、重鎖もしくは重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まず、および/または軽鎖もしくは軽鎖可変領域は配列番号8のアミノ酸配列を含まない。ある実施形態においては、重鎖は配列番号23のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなり、軽鎖は配列番号25のアミノ酸配列を含む、それから実質的になる、またはそれからなる。

【0049】

好ましい実施形態においては、抗RSV Fタンパク質抗体は完全にヒト形態である。本発明のモノクローナル抗体の主な利点は、それがヒトCDR3配列を含み、幾つかの実施形態においては、完全にヒトモノクローナル抗体でありうることから導かれる。したがって、RSV疾患の免疫予防および免疫療法のための本発明の完全ヒトモノクローナル抗体のインビボでの使用は受動的投与抗体に対する宿主免疫応答の問題を著しく軽減する。この問題は、異種またはキメラ由来の先行技術のモノクローナル抗体が使用される場合に一般に生じる。この利点の第2の重要な態様は、非ヒト配列を含有する異種またはキメラタンパク質の発現が終結され得ない遺伝子治療用途の場合の、これらのヒトモノクローナル抗体の潜在的安全性である。

【0050】

本明細書中で用いる抗RSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントは、ヒトRSV Fタンパク質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを意味する。「ヒトRSVに特異的に結合する」抗体またはその抗原結合性フラグメントは、約1nMのKDまたはより高いアフィニティ(例えば、1nM~2pM、1nM、100pM、10pMまたは2pM)で融合前または融合後ヒトRSV Fタンパク質に結合するが、この配列を欠く他のタンパク質には結合しない抗体またはその抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態においては、ヒトhRSV Fタンパク質に特異的に結合する本発明の抗体はウシRSV Fタンパク質に対しても交差反応性である。本明細書中で用いる「交差反応性」は、抗体が他の種由来の相同タンパク質と反応する能力を意味する。抗体がヒトRSV Fタンパク質に特異的に結合するかどうかは、当技術分野で公知のいずれかのアッセイを用いて判定されうる。結合アフィニティを決定するための当技術分野で公知のアッセイの例には、表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)また

10

20

30

40

50

は類似技術（例えば、KinExaまたはOCTET）が含まれる。

【0051】

本発明は抗hRSV Fタンパク質抗体およびその使用方法を含む。本明細書中で用いる「抗体」なる語は、所望の生物活性を示す任意の形態の抗体を意味する。したがって、それは最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体（2本の軽鎖と2本の重鎖とを含む完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化抗体、完全ヒト抗体およびキメラ抗体を含むが、これらに限定されるものではない。

【0052】

本発明は抗hRSV Fタンパク質抗原結合性フラグメントおよびその使用方法を含む。本明細書中で用いる「抗体フラグメント」または「抗原結合性フラグメント」は、特に示されていない限り、抗体の抗原結合性フラグメント、すなわち、完全長抗体により結合される抗原に特異的に結合する能力を保有する抗体フラグメント、例えば、1以上のCDR領域を保有するフラグメントを意味する。抗原結合性フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；ジアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、例えばscFv；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0053】

本発明は抗hRSV Fタンパク質Fabフラグメントおよびその使用方法を含む。「Fabフラグメント」は1個の軽鎖ならびに1個の重鎖の可変領域およびC_H1から構成される。Fab分子の重鎖は別の重鎖分子とはジスルフィド結合を形成し得ない。「Fabフラグメント」は抗体のパイニン切断の産物でありうる。

20

【0054】

本発明は、抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント（これはFc領域を含む）ならびにそれらの使用方法を含む。「Fc」領域は、抗体のC_H1およびC_H2ドメインを含む2個の重鎖フラグメントを含有する。それらの2個の重鎖フラグメントは2以上のジスルフィド結合により、およびC_H3ドメインの疎水性相互作用により結合している。

【0055】

本発明は抗hRSV Fタンパク質Fab'フラグメントおよびその使用方法を含む。「Fab'フラグメント」は1個の軽鎖、ならびにV_HドメインおよびC_H1ドメインを含有する1個の重鎖の部分またはフラグメント、ならびにC_H1およびC_H2ドメイン間の領域を含有し、その結果、2個のFab'フラグメントの、2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成されてF(ab')₂分子を形成しうる。

30

【0056】

本発明は抗hRSV Fタンパク質F(ab')₂フラグメントおよびその使用方法を含む。「F(ab')₂フラグメント」は、2個の軽鎖、ならびにC_H1およびC_H2ドメイン間の定常領域の部分を含む2個の重鎖を含有し、その結果、それらの2個の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')₂フラグメントは、それらの2個の重鎖の間のジスルフィド結合により連結された2個のFab'フラグメントから構成される。「F(ab')₂フラグメント」は抗体のペプシン切断の産物でありうる。

40

【0057】

本発明は抗hRSV Fタンパク質Fvフラグメントおよびその使用方法を含む。「Fv領域」は重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠いている。

【0058】

本発明は抗hRSV Fタンパク質scFvフラグメントおよびその使用方法を含む。「一本鎖Fv」または「scFv」抗体なる語は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントであって、これらのドメインが単一ポリペプチド鎖内に存在するものを意味する。一般に、Fvポリペプチドは更に、抗原結合のための所望の構造をscFvが

50

形成することを可能にする、 V_H および V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。 $scFv$ の総説としては、Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, RosenbergおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315を参照されたい。また、国際特許出願公開番号WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および第5,260,203号を参照されたい。

【0059】

本発明は抗hRSV Fタンパク質ドメイン抗体およびその使用方法を含む。「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントである。幾つかの場合には、2以上の V_H 領域がペプチドリンカーにより共有結合されて2価ドメイン抗体を形成する。2価ドメイン抗体の、2個の V_H 領域は、同じまたは異なる抗原を標的化しうる。

10

【0060】

本発明は抗hRSV Fタンパク質二価抗体およびその使用方法を含む。「二価抗体」は2個の抗原結合部位を含む。幾つかの場合には、それらの2個の結合部位は同じ抗原特異性を有する。しかし、二価抗体は二重特異性でありうる（後記を参照されたい）。

【0061】

本発明は抗hRSV Fタンパク質ジアボディおよびその使用方法を含む。本明細書中で用いる「ジアボディ」なる語は、2個の抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを意味し、該フラグメントは、同一ポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)($V_H - V_L$ または $V_L - V_H$)を含む。同一鎖上で2個のドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとペア形成することを強要され、2個の抗原結合部位を生成する。ジアボディは、例えばEP 404,097; WO 93/11161; およびHollingerら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448に、より詳細に記載されている。操作された抗体変異体の総説としては、全般的には、HollingerおよびHudson(2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136を参照されたい。

20

【0062】

典型的には、何らかの方法で修飾された本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、活性がモル基準で表された場合、(親抗体と比較した場合に)その結合活性の少なくとも10%を保有する。好ましくは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは親抗体としてのhRSV Fタンパク質結合アフィニティの少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%またはそれ以上を保有する。また、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、その生物活性を実質的に改変しない保存的または非保存的アミノ酸置換(抗体の「保存的変異体」または「機能保存変異体」と称される)を含みうると意図される。

30

【0063】

本発明は、単離された抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントならびにそれらの使用方法を含む。「単離(された)」抗体またはその抗原結合性フラグメントは、それらが産生された細胞または細胞培養からの他の生物学的分子を少なくとも部分的に含有しない。そのような生物学的分子には、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、または細胞残渣および増殖培地のような他の物質が含まれる。単離された抗体または抗原結合性フラグメントは更に、宿主細胞からの又はその増殖培地の生物学的分子のような発現系成分を少なくとも部分的に含有しない。一般に、「単離(された)」なる語は、そのような生物学的分子の完全な非存在、または水、バッファーもしくは塩の非存在、または該抗体もしくはフラグメントを含む医薬製剤の成分に関するものを意図したものではない。

40

【0064】

50

本発明はモノクローナル抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントを含む。また、本発明は、多くの(plurality)単離されたモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体組成物を含む。本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は実質的に均一な抗体の集団を意味し、すなわち、該集団を構成する抗体分子は、僅かな量で存在しうる可能な自然突然変異以外は、アミノ酸配列において同一である。これとは対照的に、通常の(ポリクローナル)抗体調製物は、典型的には、異なるエピートープに対して特異的であることが多い可変ドメイン、特にCDR内に異なるアミノ酸配列を有する多数の異なる抗体を含む。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られるという該抗体の特性を示しており、いずれかの特定の方法による該抗体の製造を要するとは解釈されない。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)により製造可能である。

10

【0065】

一般に、基本的(または「完全長」)抗体構造単位は四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の、2つの同一ペアを含み、各ペアは1つの「軽」鎖(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識をもたらす約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域またはドメインを含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能をもたらす定常領域またはドメインを定めうる。典型的には、ヒト軽鎖はカッパおよびラムダ軽鎖として分類される。更に、ヒト重鎖は、典型的には、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとしての、抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖においては、可変領域および定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。全般的には、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W. 編, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。抗体またはその抗原結合性フラグメントの文脈においては、ドメインおよび領域なる語は、適当な場合には、互換的に用いられうる。

20

【0066】

各軽/重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、無傷抗体は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性抗体の場合を除き、それらの2つの結合部位は一般に同じである。

30

【0067】

典型的には、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)内に位置する、相補性決定領域(CDR)とも称される3つの超可変領域を含む。CDRは、通常、特定のエピートープへの結合が可能になるように、フレームワーク領域により整列されている。一般に、N末端からC末端方向に、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方はFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の帰属は、一般に、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabatら; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat, 1978, Adv. Prot. Chem. 32: 1-75; Kabatら, 1977, J. Biol. Chem. 252: 6609-6616; Chothiaら, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917またはChothiaら, 1989, Nature 342: 878-883の定義に基づいている。

40

【0068】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合をもたらす、抗体またはその抗原結合性フラグメントのアミノ酸残基を意味する。超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」(すなわち、軽鎖可変ドメイン内のCDRL1、CDRL2およびCDRL3ならびに重鎖可変ドメイン内のCDRH1、CDRH2およびCDRH3)からのアミ

50

ノ酸残基を含む。Kabatら(1991) Sequences of Protein
s of Immunological Interest, 5th Ed. Public
Health Service, National Institutes of
Health, Bethesda, Md. (配列により抗体のCDR領域を定めている)
を参照されたい。また、ChothiaおよびLesk, 1987, J. Mol. Bio
l. 196:901-917 (構造により抗体のCDR領域を定めている)も参照されたい。
本明細書中で用いる「フレームワーク」または「FR」残基なる語は、CDR残基と
して本明細書中で定義されている超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【0069】

「単離された核酸分子」または「単離されたポリヌクレオチド」は、該単離ポリヌクレ
オチドが天然で見出される場合のポリヌクレオチドの全部または一部を伴っておらず、あ
るいはそれが天然で連結していないポリヌクレオチドに連結している、ゲノム、mRNA
、cDNAまたは合成由来のDNAまたはRNAあるいはそれらの何らかの組合せを意味
する。本開示の目的においては、特定のヌクレオチド配列を「含む核酸分子」は無傷染色
体を含まない、と理解されるべきである。特定されている核酸配列を「含む」単離された
核酸分子は、特定されている配列に加えて、10個まで又は更には20個まで又はそれ以
上の他のタンパク質またはその一部もしくは断片のコード配列を含むことが可能であり、
あるいは、挙げられている核酸配列のコード領域の発現を制御する機能的に連結された調
節配列を含むことが可能であり、および/あるいは、ベクター配列を含むことが可能である。

10

20

【0070】

「制御配列」なる語は、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現
に必要なDNA配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えば、プロモーター
、所望により、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は
プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを用いることが公知である。

【0071】

核酸またはポリヌクレオチドが「機能的に連結」されていると言えるのは、それが別の
核酸配列に対して機能的な関係で配置されている場合である。例えば、プレ配列または分
泌リーダーのDNAがポリペプチドのDNAに機能的に連結されていると言えるのは、そ
れが、該ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合であり、
プロモーターまたはエンハンサーがコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、
それが該配列の転写に影響を及ぼす場合であり、あるいはリボソーム結合部位がコード配
列に機能的に連結されていると言えるのは、翻訳を促進するようにそれが位置している場合
である。一般に(しかし常にそうであるとは限らないが)、「機能的に連結(されている
)」は、連結されているそれらのDNA配列が連続的であり、分泌リーダーの場合には、
連続的であり、かつ、リーディングフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサ
ーは連続的である必要はない。連結は簡便な制限部位における連結により達成される。そ
のような部位が存在しない場合には、通常の慣例に従って合成オリゴヌクレオチドアダプ
ターまたはリンカーが使用される。

30

40

【0072】

本明細書中で用いる「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」なる表現は互換的に用い
られ、全てのそのような表示は後代を含む。したがって、「形質転換体」および「形質転
換細胞」なる語は、導入(トランスファー)の数には無関係に、初代対象細胞、およびそ
れに由来する培養を含む。また、意図的な又は故意でない突然変異のため、全ての後代は
厳密に同一のDNA含量を有するわけではないと理解される。元の形質転換細胞において
スクリーニングされたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体後代も含まれる
。異なる名称が意図される場合、それは文脈から明らかであろう。

【0073】

本明細書中で用いる「生殖系列配列」は未再構成免疫グロブリンDNA配列の配列を意
味する。いずれかの適当な未再構成免疫グロブリン配列源が用いられうる。ヒト生殖系列

50

配列は、例えば、National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Healthのウェブサイト上でJOINSOLVER生殖系列データベースから得られうる。マウス生殖系列配列は、例えば、Giudicelliら, 2005, Nucleic Acids Res. 33: D256 - D261に記載されているとおりを得られうる。

【0074】

典型的な抗RSV Fタンパク質抗体の物理的および機能的特性

本発明は、特定されている構造的および機能的特徴を有する抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント、ならびにRSV感染に関連した疾患/状態の治療または予防における該抗体またはその抗原結合性フラグメントの使用方法を提供する。

10

【0075】

「本発明の抗RSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメント」は、本明細書に記載されている任意の抗体もしくはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）またはその変異体（例えば、配列変異体または機能的変異体）；表7に記載されているCDRの任意の1以上を含む任意の抗体または抗原結合性フラグメント；本明細書に記載されている抗体（例えば、RB1）と同じ、ヒトRSV Fタンパク質におけるエピトープに結合する任意の抗体または抗原結合性フラグメント；およびRSV結合に関して、本明細書に記載されている抗体（例えば、RB1）を交差遮断（部分的または完全）する又は該抗体により交差遮断（部分的または完全）される任意の抗体または抗原結合性フラグメントを含む。

20

【0076】

交差遮断性抗体およびその抗原結合性フラグメントは、標準的な結合アッセイ（例えば、BIACore、ELISA、フローサイトメトリー）において本発明の抗体と交差競合するそれらの能力に基づいて特定されうる。例えば、標準的なELISAアッセイが使用可能であり、該アッセイにおいては、組換えRSV Fタンパク質をプレート上に固定化し、該抗体の1つを蛍光標識し、該標識抗体の結合に関して競合する非標識抗体の能力を評価する。追加的または代替的に、交差競合する該抗体の能力を評価するために、BIACore分析が用いられうる。RSV Fタンパク質への別の抗体（例えば、抗体D25）の結合を試験抗体が抑制しうることは、該試験抗体がRSV Fタンパク質への結合に関して別の抗体（例えば、D25）と競合可能であり、したがって幾つかの場合には、抗体D25と同じhRSV Fタンパク質上のエピトープあるいは重複エピトープに結合しうることを示している。

30

【0077】

前記のとおり、本発明の抗RSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントのいずれかと同じエピトープに結合する抗体およびそのフラグメントも本発明の一部を構成する。更に、ある実施形態においては、本発明の抗RSV Fタンパク質抗体のいずれかにより結合されるエピトープと重複するエピトープに結合する抗体も本発明の一部を構成する。標的抗原上の抗体エピトープを位置決定（マッピング）するための幾つかの方法が利用可能であり、それらには、H/D-Ex、質量分析、X線結晶解析、ペプスカン（pepscan）分析および部位特異的突然変異誘発が含まれる。例えば、タンパク質分解および質量分析と組合されたHDX（水素重水素交換）が、特異的抗原Y上の抗体のエピトープを決定するために用いられうる。HDX-MSは、D₂O中で自然に又はその抗体の存在下で種々の時間間隔でインキュベートした場合の、抗原による重水素取り込みの度合の正確な測定および比較に基づいている。重水素は露出領域内のタンパク質のアミドバックボーン上の水素と交換されるが、抗体に結合した抗原の領域は保護され、タンパク質分解断片のLC-MS/MSによる分析の後で僅かな交換しか又は交換を全く示さないであろう。

40

【0078】

50

本発明の抗RSV Fタンパク質抗体の免疫グロブリン鎖およびそのCDRの例には、表7に開示されているもの(配列番号1~8、23および25)が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明は、配列番号1~8、23および25のアミノ酸配列を含む又はそれらから実質的になる又はそれらからなる任意のポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドを含む。

【0079】

本発明の範囲は、本明細書に記載されている免疫グロブリン鎖の変異体(例えば、配列番号7、8のいずれか)を含む単離された抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントを含み、ここで、該変異体は以下の特徴の1以上を示す:(i)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する;あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

10

【0080】

ある実施形態においては、本発明は、配列番号8(V_L)および7(V_H)に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するV_LドメインおよびV_Hドメインを有する、ヒトhRSV Fタンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、該変異体は所望の結合および特性、例えば以下のものを示す:(i)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKd値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する;あるいは(ii)表面プラズモン共鳴(例えば、BIACORE)または類似技術(例えば、KinExaまたはOCTET)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのKd値でヒトRSV融合後Fタンパク質に結合する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

20

【0081】

「保存的に修飾された変異体」または「保存的置換」は、タンパク質におけるアミノ酸が、類似特性(例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、バックボーンコンホメーションおよび剛性など)を有する他のアミノ酸で置換されることを意味し、この場合、そのような変化は、しばしば、該タンパク質の生物活性を変化させることなく施されうる。一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させない、と当業者は認識している(例えば、Watsonら(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224(4th Ed.)を参照されたい)。また、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物活性を損なう可能性が低い。典型的な保存的置換を表1に示す。

30

【表 1】

表 1. 典型的な保存的アミノ酸置換

元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

【0082】

本発明の抗体の機能保存的変異体も本発明に含まれる。本明細書中で用いる「機能保存的変異体」は、所望の特性、例えば抗原アフィニティおよび/または特異性を改変することなく1以上のアミノ酸残基が変化している、抗体またはフラグメントを意味する。そのような変異体は、類似特性を有するアミノ酸でのアミノ酸の置換、例えば、表1の保存的アミノ酸置換を含むが、これらに限定されるものではない。また、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個まで又はそれ以上のアミノ酸置換（これらは専らフレームワーク領域内に存在しうる、またはそれらのうちの1以上は1以上のCDR内に位置しうる）を有する、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体のV_Lドメインを含む単離されたポリペプチド（例えば、配列番号8）、および本発明の抗hRSV抗体のV_Hドメインを含む単離されたポリペプチド（例えば、配列番号7）を提供する。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

30

【0083】

もう1つの実施形態においては、本明細書に記載されているV_LドメインまたはV_Hドメインの1以上に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%または75%の配列同一性を有するV_LドメインおよびV_Hドメインを有し、hRSV Fタンパク質への特異的結合を示し、hRSV Fタンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。もう1つの実施形態においては、本発明の結合性抗体またはその抗原結合性フラグメントは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個まで又はそれ以上のアミノ酸置換（これらは専らフレームワーク領域内に存在しうる、またはそれらのうちの1以上は1以上のCDR内に位置しうる）を有するV_LおよびV_Hドメイン（シグナル配列を

40

50

有する及び有さない)を含み、h R S V Fタンパク質への特異的結合を示す。ある実施形態においては、該重鎖または重鎖可変領域は配列番号9のアミノ酸配列を含まない。

【0084】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

本発明は更に、本発明の抗h R S V Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントのポリペプチドまたは免疫グロブリン鎖のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む。1つの実施形態においては、単離されたポリヌクレオチドは、本発明の少なくとも1つの成熟免疫グロブリン軽鎖可変(V_L)ドメインおよび/または少なくとも1つの成熟免疫グロブリン重鎖可変(V_H)ドメインを含む抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードしている。幾つかの実施形態においては、単離されたポリヌクレオチドは、単一ポリヌクレオチド分子上で軽鎖および重鎖の両方をコードしており、他の実施形態においては、軽鎖および重鎖は別々のポリヌクレオチド分子上でコードされている。もう1つの実施形態においては、該ポリヌクレオチドは更に、シグナル配列をコードしている。例えば、本発明は、配列番号1~8、23および25に記載されているアミノ酸をコードするポリヌクレオチド、ならびにそれにハイブリダイズするポリヌクレオチド、そしてまた、そのようなハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる任意のポリペプチドを含む。1つの実施形態においては、本発明は、配列番号15(可変重鎖)または配列番号16(可変軽鎖)を含む、それから本質的になる、またはそれからなる核酸配列を含む。ある実施形態においては、核酸の特性、例えば或る宿主における発現を増強するために、コドン最適化が用いられうる。1つの実施形態においては、本発明は、配列番号17(コドン最適化可変重鎖)または配列番号18(コドン最適化可変軽鎖)を含む、それから本質的になる、またはそれからなる核酸配列を含む。ある実施形態においては、リーダー配列が使用されうる。1つの実施形態においては、本発明は、それぞれ配列番号21または配列番号22を与えるように重鎖または軽鎖に連結された配列番号19(リーダー配列および重鎖)または配列番号20(リーダー配列および軽鎖)を含む、それから本質的になる、またはそれからなる核酸配列を含む。

【0085】

一般に、該ポリヌクレオチドは低度、中等度または高度なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズし、h R S V Fタンパク質に結合する能力を維持する抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードしている。第1ポリヌクレオチド分子が第2ポリヌクレオチド分子に「ハイブリダイズ可能」と言えるのは、温度および溶液イオン強度の適当な条件下(Sambrookら, 前掲を参照されたい)、第1ポリヌクレオチド分子の一本鎖形態が第2ポリヌクレオチド分子にアニーリングしうる場合である。温度およびイオン強度の条件はハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。典型的な低度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は55°C、5×SSC、0.1% SDSおよびホルムアミドの非存在;または30°C、ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDS、42°Cを含む。典型的な中等度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は5×または6×SSCの存在下の40°C、ホルムアミド、および0.1% SDS、42°Cである。高度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は50°C、ホルムアミド、5×または6×SSC、42°C、または所望により、より高い温度(例えば、57°C、59°C、60°C、62°C、63°C、65°Cまたは68°C)である。一般に、SSCは0.15M NaClおよび0.015M クエン酸Naである。ハイブリダイゼーションは、それらの2つのポリヌクレオチドが相補的配列を含有することを要する。尤も、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに応じて、塩基間のミスマッチが可能である。ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションのための適当なストリンジェンシーはポリヌクレオチドの長さ、および相補性の度合、当技術分野でよく知られた変数に左右される。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の度合が大きければ大きいほど、それらの核酸がハイブリダイズしうるストリンジェンシーは高くなる。100ヌクレオチドを超える長さのハイブリッドの場合、融解温度を計算するための式が導き出されている(Sambrookら, 前掲, 9.50-9.51を参照されたい)。より短いポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、例えばオリゴヌクレオチドでのハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (Sambrookら, 前掲, 11.7 - 11.8を参照されたい)。

【0086】

1つの実施形態においては、本発明は、CDR-H1 (配列番号1)、CDR-H2 (配列番号2) および CDR-H3 (配列番号3) を含む抗体重鎖可変 (V_H) ドメインまたはその抗原結合性フラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。

【0087】

1つの実施形態においては、本発明は、CDR-L1 (配列番号4)、CDR-L2 (配列番号5) および CDR-L3 (配列番号6) を含む抗体軽鎖可変 (V_L) ドメインまたはその抗原結合性フラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。

10

【0088】

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号7の免疫グロブリン重鎖可変 (V_H) ドメインまたは配列番号23の重鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。

【0089】

1つの実施形態においては、本発明は、配列番号8の免疫グロブリン重鎖可変 (V_L) ドメインまたは配列番号25の軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。

【0090】

本発明はまた、本発明の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、例えば発現ベクター、例えばプラスミドを提供し、ここで、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞が該ベクターでトランスフェクトされた場合に宿主細胞により認識される制御配列に機能的に連結されている。また、本発明のベクターを含む宿主細胞も提供する。また、該抗体またはその抗原結合性フラグメントの免疫グロブリン鎖をコードする発現ベクターまたは核酸を含有する宿主細胞を培地内で培養し、該宿主細胞または培地から該抗原またはその抗原結合性フラグメントを単離することを含む、本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはポリペプチドの製造方法も提供する。

20

【0091】

同様に本発明に含まれるものは、BLASTアルゴリズム [ここで、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大マッチを与えるように選択される (例えば、予想閾値: 10; ワードサイズ: 3; クエリ範囲内の最大マッチ: 0; BLOSUM62マトリックス; ギャップコスト: 存在11、伸長1; 条件付き組成スコアマトリックス補正 (conditional compositional score matrix adjustment))] により比較を行った場合、本発明で提供される抗体のアミノ酸配列に対して少なくとも約75%同一である、80%同一である、より好ましくは、少なくとも約90%同一である、最も好ましくは、少なくとも約95% (例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%) 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、例えば免疫グロブリンポリペプチドである。

30

【0092】

配列同一性は、2つの配列が最適にアライメントされた場合に2つのポリペプチドのアミノ酸が同等位置において同一である度合を意味する。

40

【0093】

以下の参考文献は、配列分析にしばしば使用されるBLASTアルゴリズムに関するものである: BLASTアルゴリズム: Altschulら (2005) FEBS J. 272 (20): 5101 - 5109; Altschul, S. F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; Gish, W. ら (1993) Nature Genet. 3: 266 - 272; Madden, T. L. ら (1996) Meth. Enzymol. 266: 131 - 141; Altschul, S. F. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402; Zhang, J. ら (1997) Genome Res. 7: 649 - 656; Wootton, J. C. ら (1993) Comput. Chem. 17: 149 - 163; Hancock, J. M

50

ら (1994) *Comput. Appl. Biosci.* 10: 67 - 70; アライメント・スコアリング・システム: Dayhoff, M. O. ら, "A model of evolutionary change in proteins", *Atlas of Protein Sequence and Structure*. (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (編), pp. 345 - 352, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC; Schwartz, R. M. ら, "Matrices for detecting distant relationships", *Atlas of Protein Sequence and Structure*. (1978) vol. 5, suppl. 3. "M. O. Dayhoff (編), pp. 353 - 358, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, DC; Altschul, S. F. (1991) *J. Mol. Biol.* 219: 555 - 565; States, D. J. ら (1991) *Methods* 3: 66 - 70; Henikoff, S. ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 - 10919; Altschul, S. F. ら (1993) *J. Mol. Evol.* 36: 290 - 300; アライメント統計学: Karlin, S. ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264 - 2268; Karlin, S. ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873 - 5877; Dembo, A. ら (1994) *Ann. Prob.* 22: 2022 - 2039; および Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments". *Theoretical and Computational Methods in Genome Research* (S. Suhai 編), (1997) pp. 1 - 14, Plenum, New York.

【0094】

結合アフィニティ

限定的なものではなく一例に過ぎないが、本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメントは、表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E) または類似技術 (例えば、K i n E x a または O C T E T) により測定された場合に少なくとも約 1×10^{-9} M の K_d 値 (すなわち、 1×10^{-9} M 以下の K_D 値) でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。1つの実施形態においては、本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメントは、表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E) または類似技術 (例えば、K i n E x a または O C T E T) により測定された場合に少なくとも約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K_d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。1つの実施形態においては、本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメントは、表面プラズモン共鳴 (例えば、B I A C O R E) または類似技術 (例えば、K i n E x a または O C T E T) により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} M の K_d 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。1つの実施形態においては、本明細書に開示されている抗体および抗原結合性フラグメントは、B I A C O R E または類似技術により測定された場合に少なくとも約 100 pM の K_D 値 (すなわち、約 100 pM 以下の K_D 値) でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。1つの実施形態においては、本明細書に開示されている抗体および抗原結合性フラグメントは、B I A C O R E または類似技術により測定された場合に少なくとも約 10 pM の K_D 値 (すなわち、約 10 pM 以下の K_D 値) でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。1つの実施形態においては、本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、B I A C O R E または類似技術により測定された場合に約 1 pM ~ 約 100 pM の K_D 値でヒト R S V 融合前 F タンパク質または融合後 F タンパク質に結合しうる。

【0095】

10

20

30

40

50

抗体およびその抗原結合性フラグメントの製造方法

本発明は、抗体またはフラグメントを発現する細胞系をそのような発現に好ましい条件下で培養し、所望により、該抗体またはフラグメントを該細胞および/または増殖培地（例えば、細胞培養培地）から単離することを含む、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントの製造方法を含む。

【0096】

本明細書に開示されている抗hRSV Fタンパク質抗体は組換え法によって（例えば、大腸菌（*E. coli*）/T7発現系、哺乳類細胞発現系または下等真核生物発現系において）も製造されうる。この実施形態においては、本発明の抗体免疫グロブリン分子（例えば、V_HまたはV_L）をコードする核酸をpET系プラスミド内に挿入し、大腸菌（*E. coli*）/T7系内で発現させることが可能である。例えば、本発明は、抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその免疫グロブリン鎖を宿主細胞（例えば、細菌宿主細胞、例えば、大腸菌（*E. coli*）、例えば、BL21またはBL21DE3）内で発現させるための方法を含み、該方法は、T7プロモーターに機能的に連結された免疫グロブリン鎖をコードするポリヌクレオチドをも含む細胞内でT7 RNAポリメラーゼを発現させることを含む。例えば、本発明の1つの実施形態においては、細菌宿主細胞、例えば大腸菌（*E. coli*）は、lacプロモーターに機能的に連結されたT7 RNAポリメラーゼ遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含み、IPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）の存在下の該宿主細胞のインキュベーションにより該ポリメラーゼおよび該鎖の発現が誘導される。

10

20

【0097】

当技術分野で公知である組換え抗体を製造するための幾つかの方法が存在する。抗体の組換え製造のための方法の一例は米国特許第4,816,567号に開示されている。

【0098】

形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するためのいずれかの公知方法により行われうる。哺乳類細胞内に異種ポリヌクレオチドを導入するための方法は当技術分野でよく知られており、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム内へのポリヌクレオチドの封入、遺伝子銃注入および核内へのDNAの直接マイクロインジェクションを包含する。また、ウイルスベクターにより哺乳類細胞内に核酸分子を導入することが可能である。細胞を形質転換する方法は当技術分野でよく知られている。例えば、米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号および第4,959,455号を参照されたい。

30

【0099】

したがって、本発明は、本発明の抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその免疫グロブリン鎖の組換え製造方法であって、該抗体またはフラグメントの免疫グロブリン鎖（例えば、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン）の1以上をコードするポリヌクレオチドを導入し、そのような発現に好ましい条件下で宿主細胞（例えば、CHOまたはピチア（*Pichia*）またはピチア・パストリス（*Pichia pastoris*））を培養し、所望により、該宿主細胞から、および/または該宿主細胞を増殖させた培地から、該抗体またはフラグメントまたは鎖を単離することを含む製造方法を含む。

40

【0100】

抗hRSV Fタンパク質抗体は、米国特許第6,331,415号に記載されている方法のいずれかによっても合成されうる。

【0101】

本明細書に開示されている抗体またはフラグメントまたは免疫グロブリン鎖の発現のための宿主としての、哺乳類細胞を含む真核宿主細胞および原核宿主細胞は当技術分野でよく知られており、American Type Culture Collection（ATCC）から入手可能な多数の不死化細胞系を包含する。これらは、とりわけ、チャ

50

イニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、A549細胞、3T3細胞、HEK-293細胞および多数の他の細胞系を包含する。哺乳類宿主細胞はヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマおよびハムスター細胞を包含する。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するのかを決定することにより選択される。使用されうる他の細胞系としては、昆虫細胞系、例えばSf9細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞が挙げられる。真菌細胞には、例えば以下のものを含む酵母および糸状菌細胞が含まれる：ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ピチア・フィンランドイカ(*Pichia finlandica*)、ピチア・トレハロフィラ(*Pichia trehalophila*)、ピチア・コクラメ(*Pichia koclamae*)、ピチア・メンブранаエファシエンス(*Pichia membranaefaciens*)、ピチア・ミヌタ(*Pichia minuta*) (オガタエア・ミヌタ(*Ogataea minuta*))、ピチア・リンドネリ(*Pichia lindneri*)、ピチア・オープンチエ(*Pichia opuntiae*)、ピチア・テルモトレランス(*Pichia thermotolerans*)、ピチア・サリクタリア(*Pichia salictaria*)、ピチア・グエルクウム(*Pichia guercuum*)、ピチア・ピエペリ(*Pichia pijperi*)、ピチア・スチプティス(*Pichia stipitis*)、ピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)、ピチア属種(*Pichia sp.*)、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス属種(*Saccharomyces sp.*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、クライベロミセス属種(*Kluyveromyces sp.*)、クライベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・レーゼイ(*Trichoderma reesei*)、クリソスポリウム・ルックノウエンス(*Chrysosporium lucknowense*)、フザリウム属種(*Fusarium sp.*)、フザリウム・グラミネウム(*Fusarium gramineum*)、フザリウム・ベネナム(*Fusarium venenatum*)、フィスコミトレラ・パテンス(*Physcomitrella patens*)およびニューロスポラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)。ピチア属種(*Pichia sp.*)、任意のサッカロミセス属種(*Saccharomyces sp.*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、任意のクライベロミセス属種(*Kluyveromyces sp.*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、任意のアスペルギルス属種(*Aspergillus sp.*)、トリコデルマ・レーゼイ(*Trichoderma reesei*)、クリソスポリウム・ルックノウエンス(*Chrysosporium lucknowense*)、任意のフザリウム属種(*Fusarium sp.*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、およびニューロスポラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)。重鎖またはその抗原結合性部分もしくはフラグメント、軽鎖および/またはその抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞内に導入する場合、該宿主細胞における該抗体もしくはフラグメントもしくは鎖の発現、または該宿主細胞が培養される培地内への分泌を可能にするのに十分な時間にわたって該宿主細胞を培養することにより、該抗体を製造する。

【0102】

抗体およびその抗原結合性フラグメントおよび免疫グロブリン鎖は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。更に、生産細胞系からの本発明の抗体およびその抗原結合性フラグメントおよび免疫グロブリン鎖(またはそれからの他の部分)の発

現は、幾つかの公知技術を用いて増強されうる。例えば、グルタミンシンターゼ遺伝子発現系（GS系）は、一定条件下で発現を増強するための一般的アプローチである。GS系は欧州特許第0 2 1 6 8 4 6号、第0 2 5 6 0 5 5号および第0 3 2 3 9 9 7号ならびに欧州特許出願第8 9 3 0 3 9 6 4 . 4号において全体的または部分的に考察されている。したがって、本発明の1つの実施形態においては、哺乳類宿主細胞（例えば、CHO）はグルタミンシンターゼ遺伝子を欠いており、グルタミンの非存在下の培地内で増殖されるが、この場合、該免疫グロブリン鎖をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞における該遺伝子の欠如を相補するグルタミンシンターゼ遺伝子を含む。

【0103】

本発明は、本発明の抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメントを精製するための方法を含み、該方法は、該抗体またはフラグメントを含むサンプルを精製媒体（例えば、カチオン交換媒体、アニオン交換媒体、疎水性交換媒体、アフィニティ精製媒体（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL））に導入し、該媒体に結合しない該サンプルのフロースルー画分からの精製抗体またはフラグメントを集め、あるいは該フロースルー画分を廃棄し、結合抗体またはフラグメントを該媒体から溶出し、溶出液を集めることを含む。本発明の1つの実施形態においては、媒体は、サンプルが適用されるカラム内に存在する。本発明の1つの実施形態においては、宿主細胞における該抗体またはフラグメントの組換え発現の後で該精製方法を行い、例えば、この場合、まず、宿主細胞を細胞溶解し、所望により、ライセートを不溶物から精製した後、媒体上の精製を行う。

【0104】

一般に、個々の細胞系またはトランスジェニック動物において産生される糖タンパク質は、該細胞系またはトランスジェニック動物において産生される糖タンパク質に特徴的なグリコシル化パターンを有するであろう。したがって、抗体の個々のグリコシル化パターンは、該抗体を製造するために使用される個々の細胞系またはトランスジェニック動物に左右されるであろう。しかし、本発明で提供される核酸分子によりコードされる、または本発明で提供されるアミノ酸を含む全ての抗体は、該抗体が有しうるグリコシル化パターンには無関係に、本発明を構成する。同様に、特定の実施形態においては、非フコシル化N-グリカンのみを含むグリコシル化パターンを有する抗体が有利でありうる。なぜなら、これらの抗体は、インビトロおよびインビボの両方において、それらのフコシル化対応物より高い効力を典型的に示すことが示されているからである（例えば、Shinkawara, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); 米国特許第6,946,292号および第7,214,775号を参照されたい）。非フコシル化N-グリカンを有するこれらの抗体が免疫原性である可能性は低い。なぜなら、それらの炭水化物構造は、ヒト血清IgGにおいて存在する集団の正常成分であるからである。

【0105】

本発明は、hRSV Fタンパク質および別の抗原、例えばhRSV Gタンパク質に対する結合特異性を有する二重特異性および二官能性抗体ならびに抗原結合性フラグメント、ならびにそれらの使用方法を含む。二重特異性または二官能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖ペアおよび2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含む種々の方法により製造されうる。例えば、Songsivilaiら(1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelnyら(1992) J. Immunol. 148, 1547-1553を参照されたい。また、二重特異性抗体は「ジアポディ」(Holligerら(1993) PNAS USA 90: 6444-6448)または「ジャヌシン(Janusin)」(Traunckerら(1991) EMBO J. 10: 3655-3659およびTraunckerら(1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 51-52)として形成されうる。

【0106】

本発明は更に、本明細書に開示されている抗hRSV抗体の抗hRSV Fタンパク質

抗原結合性フラグメントを含む。該抗体フラグメントにはF(a b)₂フラグメントが含まれ、これは例えばペプシンによるIg Gの酵素的切断により製造されうる。F a bフラグメントは、例えば、ジチオトレイトールまたはメルカプトエチルアミンでのF(a b)₂の還元により製造されうる。

【0107】

免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、種々のクラスに帰属されうる。免疫グロブリンの、少なくとも5つの主要クラス、すなわち、Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mが存在し、これらの幾つかは更に、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIg G 1、Ig G 2、Ig G 3およびIg G 4; Ig A 1およびIg A 2に分類されうる。本発明は抗体のこれらのクラスまたはサブクラスのいずれかの抗体および抗原結合性フラグメントを含む。

10

【0108】

1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは重鎖定常領域、例えばヒト定常領域、例えば 1、 2、 3もしくは 4ヒト重鎖定常領域またはそれらの変異体を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは、軽鎖定常領域、例えばヒト軽鎖定常領域、例えばラムダもしくはカッパヒト軽鎖領域またはそれらの変異体を含む。例えば、限定的なものではないが、ヒト重鎖定常領域は4であることが可能であり、ヒト軽鎖定常領域はカッパであることが可能である。もう1つの実施形態においては、該抗体のFc領域は、Ser 228 Pro突然変異を有する4である(Schuurman, Jら, 2001, Mol. Immunol. 38: 1 - 8)。

20

【0109】

1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントはIg G 1サブタイプの重鎖定常領域を含む。

【0110】

幾つかの実施形態においては、種々の定常ドメインが、本発明で提供されるCDRに由来するヒト化V_LおよびV_H領域に連結されうる。例えば、本発明の抗体(またはフラグメント)の個々の意図される使用がエフェクター機能の改変を求めるものである場合には、ヒトIg G 1以外の重鎖定常ドメインが使用可能であり、あるいはハイブリッドIg G 1 / Ig G 4が使用可能である。

30

【0111】

ヒトIg G 1抗体は長い半減期およびエフェクター機能、例えば補体活性化および抗体依存性細胞傷害性をもたらすが、そのような活性は該抗体の全ての用途に望ましいとは限らない可能性がある。そのような場合、例えばヒトIg G 4定常ドメインが使用されうる。本発明は、Ig G 4定常ドメインを含む抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント、例えば、アンタゴニストヒト化抗hRSV Fタンパク質抗体およびフラグメント、ならびにそれらの使用方法を含む。1つの実施形態においては、該Ig G 4定常ドメインはEU系における228位およびK A B A T系における241位に対応する位置において天然ヒトIg G 4定常ドメイン(Swiss - Protアクセション番号P01861.1)とは異なることが可能であり、この場合、適切な鎖内ジスルフィド結合形成を妨げうるCys 106およびCys 109(EU系におけるCys 226およびCys 229位ならびにK A B A T系におけるCys 239およびCys 242位に対応する)間の潜在的鎖間ジスルフィド結合を妨げるために天然Ser 108はProで置換される。Angalら(1993)Mol. Immunol. 30: 105を参照されたい。他の場合においては、半減期を増加させるために又はエフェクター機能を低減するために修飾された修飾Ig G 1定常ドメインが使用されうる。

40

【0112】

抗体の改変

本発明の抗体は、抗体の特性を改善するために、フレームワーク突然変異に付されうる。1つのそのようなフレームワーク修飾は、フレームワーク領域内または更には1以上の

50

C D R 領域内の 1 以上の残基を突然変異させて、T 細胞エピトープを除去し、それにより該抗体の潜在的免疫原性を低下させることを含む。このアプローチは「脱免疫化 (d e i m m u n i z a t i o n) 」とも称され、米国特許第 7 , 1 2 5 , 6 8 9 号に更に詳細に記載されている。

【 0 1 1 3 】

特定の実施形態においては、脱アミド化または異性化を避けるために、最終的な抗体の、より高い化学的安定性を得るために、露出側鎖を含有する或るアミノ酸を別のアミノ酸残基へと変化させることが望ましいであろう。アスパラギンの脱アミド化は N G、D G、N G、N S、N A、N T、Q G または Q S 配列上で生じ、イソアスパラギン酸残基の生成をもたらす可能性があり、該残基はポリペプチド鎖内にねじれ (キンク) を導入し、その安定性を低下させる (イソアスパラギン酸効果)。D G、D S、D A または D T 配列において異性化が生じうる。ある実施形態においては、本開示の抗体は脱アミド化またはアスパラギン異性部位にを含有しない。

10

【 0 1 1 4 】

例えば、特に C D R 内の、いずれかの A s n - G l y 配列におけるイソアスパルタートの形成の可能性を低減するために、アスパラギン (A s n) 残基は G l n または A l a へと改変されうる。同様の問題は A s p - G l y 配列においても生じうる。R e i s s n e r および A s w a d (2 0 0 3) C e l l . M o l . L i f e S c i . 6 0 : 1 2 8 1。イソアスパルタート形成は抗体のその標的抗原への結合を減弱し、または完全に阻止しうる。P r e s t a (2 0 0 5) J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 1 1 6 : 7 3 1 , p . 7 3 4 を参照されたい。1 つの実施形態においては、該アスパラギンはグルタミン (G l n) へと改変される。小さなアミノ酸がアスパラギンまたはグルタミンに隣接して存在する場合にはより高い率で生じる脱アミド化の可能性を低減するために、アスパラギン (A s n) またはグルタミン (G l n) 残基に隣接したアミノ酸を改変することも望ましいかもしれない。B i s c h o f f & K o l b e (1 9 9 4) J . C h r o m a t o g . 6 6 2 : 2 6 1 を参照されたい。また、抗原結合アフィニティを低減し、そしてまた、最終抗体調製物における分子不均一性に寄与しうるメチオニン硫黄の酸化の可能性を低減するために、C D R 内のいずれかのメチオニン残基 (典型的には溶媒露出 M e t) が L y s、L e u、A l a または P h e または他のアミノ酸へと改変されうる (同誌)。また、A s n - P r o ペプチド結合の潜在的な切断を妨げ又は最小にするために、C D R において見出されるいずれかの A s n - P r o の組合せを G l n - P r o、A l a - P r o または A s n - A l a へと改変することが望ましいかもしれない。ついで、そのような置換を有する抗体をスクリーニングして、該置換が h R S V F タンパク質に対する抗体のアフィニティもしくは特異性または他の所望の生物活性を、許容し得ないレベルに低減しないことを確認する。

20

30

【表 2】

表 2. CDR の典型的な安定化変異体

CDR 残基	安定化変異体配列
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly 又は Asn-Ala (Q-G), (A-G)又は(N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly 又は Asp-Ala (E-G), (A-G)又は(D-A)
Met (典型的には溶媒露出) (M)	Lys, Leu, Ala 又は Phe (K), (L), (A)又は(F)
Asn (N)	Gln 又は Ala (Q)又は(A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro 又は Asn-Ala (Q-P), (A-P)又は(N-A)

10

【 0 1 1 5 】

20

F c 領域の抗体改変

本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）はまた、F c 領域内の修飾を含むように、典型的には、該抗体の特性、例えば血清半減期、補体固定、F c 受容体結合および/またはエフェクター機能（例えば、抗原依存性細胞傷害性）の1以上を変化させるために改変（操作）されうる。更に、本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）は化学的に修飾可能であり（例えば、1以上の化学的部分が該抗体に結合可能である）、あるいは、再び該抗体またはフラグメントの特性の1以上を改変するために、そのグリコシル化を改変するように修飾されうる。これらの実施形態のそれぞれは後記に更に詳細に記載されている。F c 領域内の残基の番号付けは K a b a t の E U インデックスのものである。

30

【 0 1 1 6 】

本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）はまた、改変されたエフェクター機能をもたらすための、修飾（または遮断）された F c 領域を有する抗体およびフラグメントをも含む。例えば、米国特許第 5, 6 2 4, 8 2 1 号；W O 2 0 0 3 / 0 8 6 3 1 0；W O 2 0 0 5 / 1 2 0 5 7 1；W O 2 0 0 6 / 0 0 5 7 7 0 2 を参照されたい。そのような修飾は、診断および療法における可能な有益な効果を伴って、免疫系の種々の反応を増強または抑制するために用いられうる。F c 領域の改変には、アミノ酸変化（置換、欠失および挿入）、グリコシル化または脱グリコシル化および複数の F c の付加が含まれる。F c に対する変化はまた、治療用抗体における抗体の半減期を改変することが可能であり、それほど頻繁でない投与ならびにそれによる便利さの向上および物資の使用の減少を可能にする。P r e s t a, 2 0 0 5, J. A l l e r g y C l i n. I m m u n o l. 1 1 6 : 7 3 1, p. 7 3 4 - 3 5 を参照されたい。

40

【 0 1 1 7 】

本発明の1つの実施形態においては、C H 1 のヒンジ領域は、該ヒンジ領域内のシステイン残基の数が増加または減少するように修飾される。このアプローチは米国特許第 5, 6 7 7, 4 2 5 号に更に詳細に記載されている。C H 1 のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の集合を促進させるために、または抗体の安定性を増強もしくは低減するために改変される。

【 0 1 1 8 】

もう1つの実施形態においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメント（例えば

50

、R B 1) は、その生物学的半減期を増加させるために修飾される。種々のアプローチが可能である。例えば、米国特許 6, 277, 375 号に記載されているとおり、以下の突然変異の 1 以上が導入されうる：T 252L、T 254S、T 256F。あるいは、米国特許第 5, 869, 046 号および第 6, 121, 022 号に記載されているとおり、生物学的半減期を増加させるために、該抗体は、Ig G の Fc 領域の CH2 ドメインの 2 つのループから取られたサルベージ (salvage) 受容体結合性エピトープを含有するように CH1 または CL 領域内で改変されうる。1 つの実施形態においては、M 252Y / S 254T / T 256E (YTE) 突然変異が導入される。例えば、Oganesyan ら、Mol. Immunol. 2009, 46: 1750 を参照されたい。

【0119】

更に他の実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントのエフェクター機能を改変するために、少なくとも 1 つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することにより、Fc 領域を改変する。例えば、該抗体がエフェクターリガンドに対する改変されたアフィニティを有し、親抗体の抗原結合能を保有するように、アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 および 322 から選択される 1 以上のアミノ酸が異なるアミノ酸残基で置換されうる。アフィニティが改変されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc 受容体または補体の C1 成分でありうる。このアプローチは米国特許第 5, 624, 821 号および第 5, 648, 260 号に更に詳細に記載されている。

【0120】

もう 1 つの例においては、該抗体が C1q 結合の変化および / または補体依存性細胞傷害性 (CDC) の低減もしくは消失を示すように、アミノ酸残基 329、331 および 332 から選択される 1 以上のアミノ酸が別のアミノ酸残基で置換されうる。このアプローチは米国特許第 6, 194, 551 号に詳細に記載されている。

【0121】

もう 1 つの例においては、アミノ酸 231 位および 239 位における 1 以上のアミノ酸残基を改変して、それにより、補体を固定する該抗体の能力を改変する。このアプローチは国際特許出願公開番号 WO 94 / 29351 に更に詳細に記載されている。

【0122】

更にもう 1 つの例においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメント (例えば、R B 1) が抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) をもたらす能力を低減するために、および / または Fc 受容体に対する該抗体またはフラグメントのアフィニティを低減するために、以下の位置：238、239、243、248、249、252、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 または 439 位における 1 以上のアミノ酸を修飾することにより、Fc 領域を修飾する。このアプローチは国際特許出願公開番号 WO 00 / 42072 に更に詳細に記載されている。更に、Fc RI、Fc RII、Fc RIII および Fc Rn に対するヒト Ig G 1 上の結合部位が位置決定されており、改善した結合を示す変異体が記載されている (Shields ら (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 を参照されたい)。

【0123】

本発明の 1 つの実施形態においては、本発明の抗体 (例えば、R B 1) がエフェクター機能をもたらす能力を低減するために、および / または抗炎症特性を増強するために、残基 243 および 264 を修飾することにより、Fc 領域を修飾する。1 つの実施形態においては、243 位および 264 位における残基をアラニンへと変化させることにより、該

10

20

30

40

50

抗体またはフラグメントのFc領域を修飾する。1つの実施形態においては、該抗体またはフラグメントがエフェクター機能をもたらす能力を低減するために、および/または抗炎症特性を増強するために、残基243、264、267および328を修飾することにより、Fc領域を修飾する。

【0124】

エフェクター機能の増強

幾つかの実施形態においては、抗hRSV抗体のFc領域は、エフェクター機能をもたらす該抗体もしくは抗原結合性フラグメントの能力を増強するために、および/またはFcガンマ受容体(FcR)へのそれらの結合を増強するために、修飾される。

【0125】

本明細書中で用いる「エフェクター機能」なる語は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)、補体依存性細胞傷害活性(CDC)媒介性応答、Fc媒介性食作用または抗体依存性細胞食作用(ADCP)、およびFcRn受容体を介した抗体リサイクリングの1以上を意味すると意図される。

【0126】

抗原結合性タンパク質の定常領域と種々のFc受容体(FcR)[FcガンマR1(CD64)、FcガンマRII(CD32)およびFcガンमारIII(CD16)を含む]との間の相互作用が抗原結合性タンパク質のエフェクター機能、例えばADCCおよびCDCをもたらすと考えられている。Fc受容体は抗体架橋にも重要であり、これは抗腫瘍免疫に重要でありうる。

【0127】

エフェクター機能は、例えば、ADCCエフェクター機能を測定するための、ナチュラルキラー細胞へのFcRIIIの結合または単球/マクロファージへのFcRIの結合による方法を含む幾つかの方法で測定されうる。例えば、本発明の抗原結合性タンパク質はナチュラルキラー細胞アッセイにおいてADCCエフェクター機能に関して評価されうる。そのようなアッセイの例はShieldsら, 2001 J. Biol. Chem., Vol. 276, p 6591-6604; Chappelら, 1993 J. Biol. Chem., Vol. 268, p 25124-25131; Lazarら, 2006 PNAS, 103; 4005-4010において見出されうる。

【0128】

本発明の抗体のADCCもしくはCDCの特性またはそれらの架橋特性は幾つかの方法で増強されうる。

【0129】

残基Asn297におけるグリコシル化の改変または特異的突然変異を含有するヒトIgG1定常領域はFc受容体への結合を増強することが示されている。幾つかの場合においては、これらの突然変異はADCCおよびCDCを増強することも示されている(Lazarら, Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103; 4005-4010; Shieldsら, J Biol Chem 2001, 276; 6591-6604; Nechanskyら, Mol Immunol, 2007, 44; 1815-1817)。

【0130】

本発明の1つの実施形態においては、そのような突然変異は、239、332および330位(IgG1)または他のIgGアイソタイプにおける同等位置から選択される位置の1以上に存在する。適当な突然変異の例としては、S239DおよびI332EおよびA330Lが挙げられる。1つの実施形態においては、本明細書に記載されている本発明の抗原結合性タンパク質は239および332位において突然変異しており(例えば、S239DおよびI332E)、またはもう1つの実施形態においては、それは、239および332および330から選択される3以上の位置において突然変異している(例えば、S239DおよびI332EおよびA330L(EUインデックスの番号付け))。

【0131】

10

20

30

40

50

本発明のもう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質がエフェクター機能の増強を示すようにグリコシル化プロファイルの改変を有する重鎖定常領域を含む抗体を提供する。例えば、この場合、該抗体はADCCの増強またはCDCの増強を示し、あるいはそれはADCCおよびCDCエフェクター機能の両方の増強を示す。グリコシル化プロファイルの改変を有する抗原結合性タンパク質を製造するための適当な方法の例は国際特許出願公開番号WO2003011878およびWO2006014679ならびに欧州特許出願番号EP1229125に記載されている。

【0132】

もう1つの態様においては、本発明は「非フコシル化」または「アフコシル化 (afucosylated)」抗体を提供する。非フコシル化抗体は、フコース残基を有さないFcの複合型N-グリカンのトリ-マンノシルコア構造を含有する。Fc N-グリカンからのコアフコース残基を欠くこれらの糖操作抗体は、Fc RIIIIa結合能の増強により、フコシル化等価体より強力なADCCを示しうる。

10

【0133】

本発明はまた、a)本明細書に記載されている単離された核酸を含む発現ベクターを含み、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼを含まない組換え宿主細胞を培養し、b)抗原結合性タンパク質を回収する工程を含む本発明の抗体の製造方法を提供する。該組換え宿主細胞は、通常、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含有していなくてもよく(例えば、酵母宿主細胞、例えば、ピチア属種(Pichia sp.))、あるいはアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼを不活性化するように遺伝的に修飾されていてもよい。アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を不活性化するように遺伝的に修飾された組換え宿主細胞が入手可能である。例えば、BioWa, Inc. (Princeton, N.J.)から入手可能なPOTELLIGENT(商標)技術システムを参照されたい。それにおいては、FUT8遺伝子の機能的コピーを欠くCHOK1SV細胞が、機能的FUT8遺伝子を含有する細胞において産生される同一モノクローナル抗体と比べて増強した抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を示すモノクローナル抗体を産生する。POTELLIGENT(商標)技術システムの種々の態様が米国特許第7,214,775号、第6,946,292号ならびに国際特許出願番号WO0061739およびWO0231240に記載されている。他の適当なシステムも当業者に認識されるであろう。

20

30

【0134】

そのような修飾は単独で用いられうるだけでなく、エフェクター機能を更に増強するために互いに組合せて用いられうるのが当業者に明らかであろう。

【0135】

修飾グリコシル化を有する抗体の製造

更にもう1つの実施形態においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメント(例えば、RB1態)は特定のグリコシル化パターンを含む。例えば、アフコシル化または非グリコシル化(アグリコシル化)(aglycosylated)抗体またはフラグメント(すなわち、該抗体は、それぞれ、フコースまたはグリコシル化を欠く)が製造される。抗体またはフラグメントのグリコシル化パターンは、例えば、hRSV Fタンパク質抗原に対する該抗体またはフラグメントのアフィニティまたはアビディティを増強するために改変されうる。そのような修飾は、例えば、該抗体またはフラグメント配列内のグリコシル化部位の1以上を改変することにより達成されうる。例えば、可変領域フレームワークグリコシル化部位の1以上の除去をもたらし、それによりその部位におけるグリコシル化を排除する1以上のアミノ酸置換が施されうる。そのような非グリコシル化は抗原に対する該抗体またはフラグメントのアフィニティまたはアビディティを増強しうる。例えば、米国特許第5,714,350号および第6,350,861号を参照されたい。

40

【0136】

本明細書に開示されている抗体および抗原結合性フラグメント(例えば、RB1)は更に、哺乳類またはヒト様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するように遺

50

伝的に操作された下等真核宿主細胞、特に真菌宿主細胞、例えば酵母および糸状菌において産生されるものを含む（例えば、Choiら（2003）Proc. Natl. Acad. Sci. 100:5022-5027; Hamiltonら（2003）Science 301:1244-1246; Hamiltonら（2006）Science 313:1441-1443; Nettら,（2011）Yeast 28(3):237-52; Hamiltonら,（2007）Curr Opin Biotechnol. Oct; 18(5):387-92を参照されたい）。これらの遺伝的に修飾された宿主細胞は、該細胞内で産生される糖タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する能力を有し、その結果、特定のN-グリカン構造が優勢な糖タンパク質の組成物が製造されうる（例えば、米国特許第7,029,872号および米国特許第7,449,308号を参照されたい）。これらの遺伝的に修飾された宿主細胞は、特定のN-グリカン構造を主に有する抗体を製造するために使用されている（例えば、Liら（2006）Nat. Biotechnol. 24:210-215を参照されたい）。

10

【0137】

特定の実施形態においては、本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は更に、二分岐および多アンテナ（multiantennary）種を含むフコシル化および非フコシル化ハイブリッドおよび複合N-グリカン（例えば、GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; NANA₍₁₋₄₎Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂のようなN-グリカンを含むが、これらに限定されるものではない）を含む、下等真核宿主細胞において産生されるものを含む。

20

【0138】

特定の実施形態においては、本発明において提供する抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、GlcNAcMan₅GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂; およびNANAGalGlcNAcMan₅GlcNAc₂からなる群から選択される少なくとも1つのハイブリッドN-グリカンを含む抗体またはフラグメントを含む。特定の態様においては、該ハイブリッドN-グリカンは該組成物中の主要N-グリカン種である。

【0139】

特定の実施形態においては、本発明において提供する抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、GlcNAcMan₃GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂; NANAGalGlcNAcMan₃GlcNAc₂; GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; NANAGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂; およびNANA₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂からなる群から選択される少なくとも1つの複合N-グリカンを含む抗体およびフラグメントを含む。特定の態様においては、該複合N-グリカンは該組成物中の主要N-グリカン種である。更に詳細な態様においては、該複合N-グリカンは、該組成物中の複合N-グリカンの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%または100%を構成する特定のN-グリカン種である。1つの実施形態においては、本発明において提供する抗体およびその抗原結合性フラグメントは複合N-グリカンを含み、ここで、複合N-グリカンの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%または100%が構造NANA₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂を含み、ここで、そのような構造はアフコシル化されている。そのような構造は、例えば、操作されたピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）宿主細胞において製造されうる。

30

40

【0140】

特定の実施形態においては、該N-グリカンはフコシル化されている。一般に、該コースは、該N-グリカンの還元末端におけるGlcNAcとの1,3-結合、該N-グリカンの還元末端におけるGlcNAcとの1,6-結合、該N-グリカンの非還元末

50

端におけるGalとの 1, 2 - 結合、該N - グリカンの非還元末端におけるGlcNAcとの 1, 3 - 結合、または該N - グリカンの非還元末端におけるGlcNAcとの 1, 4 - 結合で存在する。

【0141】

したがって、前記の糖タンパク質組成物の特定の態様においては、該グリコフォーム (glycoform) は、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ 、 $\text{NANA Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ および $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ からなる群から選択されるグリコフォームを与える 1, 3 - 結合または 1, 6 - 結合フコース; $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ および $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ からなる群から選択されるグリコフォームを与える 1, 3 - 結合または 1, 4 - 結合フコース; あるいは $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NANA Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ および $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ からなる群から選択されるグリコフォームを与える 1, 2 - 結合フコースで存在する。

10

20

【0142】

更に詳細な態様においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、限定的なものではないが $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ を含む高マンノースN - グリカン、または $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ N - グリカン構造からなるN - グリカンを含む。

【0143】

前記の更に詳細な態様においては、該複合N - グリカンは更に、フコシル化および非フコシル化二分岐および多アンテナ種を含む。

30

【0144】

本明細書中で用いる「N - グリカン」および「グリコフォーム (糖形態)」なる語は互換的に用いられ、N - 結合オリゴ糖を意味し、例えば、ポリペプチドのアスパラギン残基にアスパラギン - N - アセチルグルコサミン結合により結合しているN - 結合オリゴ糖を意味する。N - 結合糖タンパク質は、タンパク質中のアスパラギン残基のアミド窒素に結合したN - アセチルグルコサミン残基を含有する。糖タンパク質上で見出される主な糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N - アセチルガラクトサミン (GalNAc)、N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) およびシアル酸 (例えば、N - アセチル - ノイラミン酸 (NANA)) が挙げられる。糖基のプロセッシングは翻訳と同時にERの内腔において生じ、翻訳後はN - 結合糖タンパク質のためにゴルジ装置において継続する。

40

【0145】

N - グリカンは $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の共通の五糖コアを有する (「Man」はマンノースを意味し、「Glc」はグルコースを意味し、「NAc」はN - アセチルを意味し、 GlcNAc はN - アセチルグルコサミンを意味する)。通常、N - グリカン構造は、非還元末端を左側に、そして還元末端を右側にして表される。N - グリカンの還元末端は、該タンパク質上のグリコシル化部位を含むAsn残基に結合している末端である。N - グリカンは、「トリマンノースコア」、「五糖コア」または「少 (pauci) マンノースコア」とも称される $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「 Man_3 」) コア構造に付加される周

50

辺糖（例えば、GlcNAc、ガラクトース、フコースおよびシアル酸）を含む分岐（アンテナ）の数において異なる。N-グリカンは、その分岐（分枝）構成成分に従い分類される（例えば、高マンノース、複合またはハイブリッド）。「高マンノース」型N-グリカンは5個以上のマンノース残基を有する。「複合」型N-グリカンは、典型的には、「トリマンノース」コアの1, 6マンノースアームに結合した少なくとも1つのGlcNAcと、1, 3マンノースアームに結合した少なくとも1つのGlcNAcとを有する。複合N-グリカンは、シアル酸または誘導体（例えば、「NANA」または「NeuAc」が挙げられ、ここで、「Neu」はノイラミン酸を意味し、「Ac」はアセチルを意味する）で修飾されていてもよいガラクトース（「Gal」）またはN-アセチルガラクトサミン（「GalNAc」）残基をも有しうる。複合N-グリカンは、コアフコース（「Fuc」）および「二分岐（bisecting）」GlcNAcを含む鎖内置換をも有しうる。複合N-グリカンはまた、「トリマンノース・コア」上に複数のアンテナを有することが可能であり、これは、しばしば、「多アンテナグリカン」と称される。「ハイブリッド」N-グリカンは、トリマンノースコアの1, 3マンノースアームの末端における少なくとも1つのGlcNAcと、トリマンノースコアの1, 6マンノースアーム上の0個以上のマンノースとを有する。前記の種々のN-グリカンは「グリコフォーム（糖形態）」とも称される。

10

【0146】

複合N-グリカンに関しては、「G-2」、「G-1」、「G0」、「G1」、「G2」、「A1」および「A2」なる語は以下を意味する。「G-2」は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「G-1」なる語は、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「G0」なる語は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「G1」なる語は、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「G2」なる語は、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「A1」なる語は、 $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味し、「A2」なる語は、 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ として特徴づけられうるN-グリカン構造を意味する。特に示されていない限り、「G-2」、「G-1」、「G0」、「G1」、「G2」、「A1」および「A2」なる語は、N-グリカンの還元末端においてGlcNAc残基に結合したフコースを欠くN-グリカン種を意味する。該用語が「F」を含む場合、「F」は、該N-グリカン種が該N-グリカンの還元末端においてGlcNAc残基上にフコース残基を含有することを示す。例えば、G0F、G1F、G2F、A1FおよびA2Fは全て、N-グリカンが、該N-グリカンの還元末端においてGlcNAc残基に結合したフコース残基を更に含むことを示す。酵母および糸状菌のような下等真核生物は、通常、フコースを示すN-グリカンを産生しない。

20

30

【0147】

多アンテナN-グリカンに関しては、「多アンテナN-グリカン」なる語は、該N-グリカンの1, 6アームもしくは1, 3アームの非還元末端を含むマンノース残基上のGlcNAc残基、または該N-グリカンの1, 6アームおよび1, 3アームの非還元末端を含むマンノース残基のそれぞれにおいてGlcNAc残基を更に含むN-グリカンの意味する。したがって、多アンテナN-グリカンは、式 $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、または $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ により特徴づけられうる。「1-4」なる語は1、2、3または4個の残基を意味する。

40

【0148】

二分岐N-グリカンに関しては、「二分岐N-グリカン」なる語は、GlcNAc残基が該N-グリカンの還元末端においてマンノース残基に結合している、N-グリカンを意味する。二分岐N-グリカンは式 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ により特徴づけ

50

られることが可能であり、ここで、各マンノース残基はその非還元末端においてGlcNAc残基に結合している。これに対して、多アンテナN-グリカンがGlcNAc₃Man₃GlcNAc₂として特徴づけられる場合、該式は、2つのGlcNAc残基が、N-グリカンの、2つのアームの一方の非還元末端において、マンノース残基に結合しており、1つのGlcNAc残基が、該N-グリカンの他方のアームの非還元末端において、マンノース残基に結合していることを示す。

【0149】

抗体の物理特性

本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は更に、軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域内に1以上のグリコシル化部位を含有しうる。あるグリコシル化部位は抗原結合の変化による該抗体のpKの変化または該抗体もしくはフラグメントの免疫原性の低減をもたらしうる（Marshallら, 1972, *Annu Rev Biochem* 41: 673 - 702; GalaおよびMorrison, 2004, *J Immunol* 172: 5489 - 94; Wallickら, 1988, *J Exp Med* 168: 1099 - 109; Spiro, 2002, *Glycobiology* 12: 43R - 56R; Parekhら, 1985, *Nature* 316: 452 - 7; Mimuraら, 2000, *Mol Immunol* 37: 697 - 706）。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフにおいて生じることが公知である。

10

【0150】

各抗体または抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、一般には6～9.5のpH範囲内である特有の等電点（pI）を有する。IgG1抗体のpIは典型的には7～9.5のpH範囲内であり、IgG4抗体のpIは典型的には6～8のpH範囲内である。

20

【0151】

各抗体または抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は特徴的な融解温度を有し、より高い融解温度は、より大きなインピボ総安定性を示す（Krishnamurthy RおよびManning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361 - 71）。一般に、T_{M1}（初期アンフォールディングの温度）は60より高い、65より高い、または70より高いことが可能である。抗体またはフラグメントの融点は、示差走査熱量測定（Chenら (2003) *Pharm Res* 20: 1952 - 60; Ghirlandoら (1999) *Immunol Lett* 68: 47 - 52）または円二色性（Murrayら (2002) *J Chromatogr Sci* 40: 343 - 9）を用いて測定されうる。

30

【0152】

もう1つの実施形態においては、急速に分解しない抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）を選択する。抗体またはフラグメントの分解は、キャピラリー電気泳動（CE）およびMALDI-MS（Alexander AJおよびHughes DE (1995) *Anal Chem* 67: 3626 - 32）を用いて測定されうる。

。

【0153】

もう1つの実施形態においては、望ましくない免疫応答の誘発および/または変化した若しくは好ましくない薬物動態特性を招きうる凝集作用が最小である抗体（例えば、RB1）およびその抗原結合性フラグメントを選択する。一般に、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下または5%以下の凝集を示す抗体およびフラグメントが許容される。凝集は、サイズ排除カラム（SEC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および光散乱を含む幾つかの技術により測定されうる。

40

【0154】

抗体コンジュゲート

本明細書に開示されている抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は化学的部分にコンジュゲート化（結合）されることも可能で

50

ある。該化学的部分は、とりわけ、重合体、放射性核種、細胞毒性因子でありうる。特定の実施形態においては、該化学的部分は、対象の体内の該抗体またはフラグメントの半減期を増加させる重合体である。適当な重合体には、ポリエチレングリコール（PEG）（例えば、2 kDa、5 kDa、10 kDa、12 kDa、20 kDa、30 kDaまたは40 kDaの分子量を有するPEG）、デキストランおよびモノメトキシポリエチレングリコール（mPEG）（これらに限定されるものではない）を包含する親水性重合体が含まれるが、これらに限定されるものではない。Leeら（1999）（*Bioconj. Chem.* 10:973-981）はPEGコンジュゲート化一本鎖抗体を開示している。Wenら、（2001）（*Bioconj. Chem.* 12:545-553）は、放射性金属キレーター（ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA））に結合したPEGに対して抗体をコンジュゲート化することを開示している。

10

【0155】

本明細書に開示されている抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）はまた、例えば⁹⁹Tc、⁹⁰Y、¹¹¹In、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹¹C、¹⁵O、¹³N、¹⁸F、³⁵S、⁵¹Cr、⁵⁷Co、²²⁶Ra、⁶⁰Co、⁵⁹Fe、⁵⁷Se、¹⁵²Eu、⁶⁷Cu、²¹⁷Pb、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Sc、¹⁰⁹Pd、²³⁴Thおよび⁴⁰K、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、⁵²Tlおよび⁵⁶Feのような標識に対してコンジュゲート化されうる。

【0156】

本明細書に開示されている抗体および抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、例えば、その生物学的（例えば、血清）半減期を増加させるために、ペグ化（PEGylation）されることも可能である。抗体またはフラグメントをペグ化するためには、典型的には、1以上のPEG基が該抗体または抗体フラグメントに結合する条件下、該抗体またはフラグメントを、反応性形態のポリエチレングリコール（PEG）、例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と反応させる。特定の実施形態においては、ペグ化は、反応性PEG分子（または類似反応性水溶性重合体）とのアシル化反応またはアルキル化反応により行われる。本明細書中で用いる「ポリエチレングリコール」なる語は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のいずれか、例えばモノ（C₁-C₁₀）アルコキシ-またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドを含むと意図される。ある実施形態においては、ペグ化されるべき抗体またはフラグメントは非グリコシル化抗体またはフラグメントである。タンパク質をペグ化するための方法は当技術分野で公知であり、本発明の抗体に適用されうる。例えば、欧州特許出願番号EP 0 154 316およびEP 0 401 384を参照されたい。

20

30

【0157】

本明細書に開示されている抗体および抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、蛍光または化学発光標識、例えば発蛍光団、例えば希土類キレート、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアナート、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、フルオレスカミン、¹⁵²Eu、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナル標識、イソルミナル標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジミウム塩標識、シュウ酸エステル標識、エクオリン標識、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ピオチン/アビジン、スピン標識および安定フリーラジカルに対してコンジュゲート化されることも可能である。

40

【0158】

本発明の抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、細胞毒性因子、例えばジフテリア毒素、シュードモナス・エルジノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォルディ（*Aleurites fordii*）タンパク質および化合物（例えば、脂肪酸）、ジアンシン（*dianthin*）タンパク質、フィ

50

トイアッカ・アメリカナ (*Phytolacca americana*) タンパク質 P A P I、P A P I I および P A P - S、モモルディカ・カランチア (*Momordica charantia*) インヒビター、クルシン、クロチン、サボナリア・オフィシナリス (*Saponaria officinalis*) インヒビター、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシンおよびエノマイシンにコンジュゲート化されることも可能である。

【0159】

本発明の抗体およびその抗原結合性フラグメント (例えば、R B 1) を種々の部分にコンジュゲート化するための当技術分野で公知のいずれかの方法が利用可能であり、該方法は、Hunterら, 1962, *Nature* 144:945; Davidら, 1974, *Biochemistry* 13:1014; Painら, 1981, *J. Immunol. Meth.* 40:219; および Nygren, J., 1982, *Histochem. and Cytochem.* 30:407 に記載されている方法を包含する。抗体およびフラグメントのコンジュゲート化方法は常套手段であり、当技術分野において非常によく知られている。

10

【0160】

抗 h R S V 抗体の予防的および治療的用途

更に、本明細書に開示されている単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント (例えば、R B 1) を使用して、R S V 感染の症状の予防、治療または改善を要する対象 (ヒト対象を含む) において R S V 感染の症状を予防、治療または改善するための方法を提供する。本発明の1つの実施形態においては、そのような対象は R S V 感染に罹患している。本発明の1つの実施形態においては、そのような対象は R S V 感染のリスクを有する。

20

【0161】

特定の実施形態においては、R S V 感染に関連した1以上の症状の治療、予防または改善のために、本発明の1以上の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を、R S V 力価を減少させるのに有効な量で、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。この実施形態においては、抗体または抗体フラグメントの有効量は、例えば、哺乳動物からの肺からの洗浄液または喀痰サンプルにおける R S V の濃度により測定された、肺における R S V 力価を低下させる。もう1つの実施形態においては、R S V 感染に関連した症状の治療、予防または改善のために、本発明の1以上の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を、哺乳動物において R S V を中和する及び/又は R S V 感染を阻止するのに有効な量で、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。

30

【0162】

モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒトおよび他の動物の両方において R S V 疾患に対して免疫療法的に使用されうる。本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントに関して本明細書中で用いる「免疫療法的に」または「免疫療法」なる語は、予防的および治療的な両方の投与、ならびに実質的に精製されたポリペプチド産物での受動免疫化および該産物またはその一部をコードするポリヌクレオチド配列の導入による遺伝子治療の両方を示す。受動免疫には、能動的体液性免疫の移行またはそれを要する対象への抗体の供与が含まれる。したがって、本発明の或る実施形態においては、本発明は、能動的体液性免疫の移行のための方法、および R S V 感染のリスクを有する患者に R S V 抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば I g G 抗体を供与する方法を提供する。したがって、該モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、R S V 疾患の可能性および/または重症度を低減するために、高リスク対象に投与されることが可能であり、あるいは活動性感染を既に明らかに示している対象に投与されうる。

40

【0163】

本発明はまた、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの成人性または小児性 R S V 関連疾患、限定的なものではないが例えば、下気道感染症、肺炎、気管

50

気管支炎、細気管支炎、気管支炎、および任意の関連感染症または炎症障害、限定的なものではないが例えば、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性敗血症、グラム陰性敗血症、培養陰性敗血症、真菌性敗血症、好中球減少性発熱、尿路性敗血症、髄膜炎菌血症、成人性呼吸窮迫症候群、アレルギー性鼻炎、通年性鼻炎、喘息、全身性アナフィラキシー、受容体過敏反応、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、過敏性肺炎、細胞内生物による肉芽腫、薬物過敏、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患の少なくとも1つ、またはそれらに関連した少なくとも1つの炎症；細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの感染症、限定的なものではないが例えば、急性および慢性細菌感染、急性および慢性寄生性または感染性過程の少なくとも1つ、例えば、細菌、ウイルスおよび真菌感染、HIV感染、HIV神経障害、髄膜炎、肝炎（A、BまたはCなど）、敗血症性関節炎、腹膜炎、肺炎、喉頭蓋炎、大腸菌（*E. coli*）O157:h7、溶血性尿毒症症候群、血栓溶解性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、ハンセン病、毒素ショック症候群、連鎖球菌性筋炎、ガス壊疽、結核菌、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ（*mycobacterium avium intracellulare*）、カリニ肺炎、骨盤内炎症性疾患、睾丸炎、精巣上体炎、レジオネラ、ライム病、インフルエンザA、エプスタイン・バーウイルス、バイタル（*vital*）関連血球貪食症候群、致命的（バイタル）脳炎、無菌性髄膜炎などをモジュレーションまたは治療するための方法を提供する。そのような方法は、所望により、少なくとも1つのRSV抗体またはその抗原性フラグメントを含む組成物または医薬組成物の有効量を、そのようなモジュレーション、治療または療法を要する細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含みうる。

【0164】

1つの実施形態においては、RSV感染に関連した1以上の症状を治療、予防または改善するために、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。もう1つの実施形態においては、嚢胞性線維症、気管支肺異形成、先天性心疾患、先天性免疫不全もしくは後天性免疫不全を有するヒトに、または移植（例えば、骨髄、肺または造血幹細胞移植（HCT））を受けたヒトに、RSV感染に関連した1以上の症状を治療、予防または改善するために、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を投与する。

【0165】

もう1つの実施形態においては、RSV感染に関連した1以上の症状を治療、予防または改善するために、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を、ヒト乳児、好ましくは早産ヒト乳児、またはRSV感染による入院のリスクを有するヒト乳児に投与する。更にもう1つの実施形態においては、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む予防用、治療用または医薬組成物を、高齢者またはグループホーム（例えば、養護施設またはリハビリセンター）の居住者または免疫無防備状態の個体に投与する。

【0166】

RSV抗原に免疫特異的に結合する、高アフィニティのおよび/または強力なインビボ抑制性抗体および/または中和抗体またはその抗原結合性フラグメントを、RSV感染の予防およびRSV感染の治療の両方のために使用することが好ましい。RSV抗原に免疫特異的に結合する、高アフィニティのおよび/または強力なインビボ抑制性抗体および/または中和抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードするポリヌクレオチドを、RSV感染の予防およびRSV感染の治療の両方のために使用することも好ましい。そのような抗体またはそのフラグメントは、好ましくは、RSV F糖タンパク質および/またはF糖タンパク質の断片に対するアフィニティを有する。

【0167】

本発明の抗体および機能的等価体（例えば、その抗原結合性フラグメント）はRSV Fタンパク質内のエピトープを認識する。該エピトープを特異的に認識する抗体またはその機能的等価体は、既に公知である、異なるエピトープに結合するRSV特異的抗体、例

えばパリビズマブ、D 2 5、A M 1 4、A M 1 6 および A M 2 3 と組合せられる。該エピトープを特異的に認識する本発明の抗体または機能的等価体を公知 R S V 特異的抗体と組合せることにより、同じ療法中に 2 以上の異なる R S V エピトープが認識される。このように、R S V に対する、より強力な免疫原性応答および / または R S V に対する、より高い抗体特異性が得られる。R S V に対する、より強力な免疫原性応答およびより高い特異性により、そのような組合せは、R S V 関連障害の、より有効な治療および / または予防をもたらす。

【 0 1 6 8 】

1 以上の R S V 抗原に免疫特異的に結合する本発明の 1 以上の抗体またはそのフラグメントは予防剤として身体において局所的または全身的に使用される。本発明の抗体またはそのフラグメントはまた、他のモノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血増殖因子（例えば、I L - 2、I L - 3、I L - 7 および I L - 1 5）（これらは、例えば、該抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるように働く）と組合せて有利に使用される。本発明の抗体またはそのフラグメントはまた、他のモノクローナルもしくはキメラ抗体、またはリンホカインもしくは造血増殖因子（例えば、I L - 2、I L - 3、I L - 7 および I L - 1 5）（これらは、例えば、免疫応答を増強するように働く）と組合せて有利に使用される。本発明の抗体またはそのフラグメントはまた、R S V 感染を治療するために使用される 1 以上の薬物、例えば抗ウイルス剤と組合せて有利に使用される。

10

【 0 1 6 9 】

本発明の抗体またはフラグメントは以下の薬物の 1 以上と組合せて使用される：N I H - 3 5 1 (G e m i n i T e c h n o l o g i e s)、組換え R S V ワクチン (A v i r o n)、R S V f - 2 (I n t r a c e l)、F - 5 0 0 4 2 (P i e r r e F a b r e)、T - 7 8 6 (T r i m e r i s)、V P - 3 6 6 7 6 (V i r o P h a r m a)、R F I - 6 4 1 (A m e r i c a n H o m e P r o d u c t s)、V P - 1 4 6 3 7 (V i r o P h a r m a)、P F P - 1 および P F P - 2 (A m e r i c a n H o m e P r o d u c t s)、R S V ワクチン (A v a n t I m m u n o t h e r a p e u t i c s) ならびに F - 5 0 0 7 7 (P i e r r e F a b r e)。

20

【 0 1 7 0 】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、単独で、または他のタイプの治療（例えば、ホルモン療法、免疫療法および抗炎症剤）と組合せて投与される。一般に、患者と同じ種である種起源または種反応性（抗体の場合）の産物の投与が好ましい。したがって、好ましい実施形態においては、ヒトまたはヒト化抗体、フラグメント誘導體、類似体または核酸は、治療または予防のために、ヒト患者に投与される。

30

【 0 1 7 1 】

「対象」は哺乳動物、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、マウス、ラット、サル [例えば、カニクイザル、例えば、マカカ・ファシクラリス (M a c a c a f a s c i c u l a r i s)] またはウサギである。本発明の好ましい実施形態においては、対象はヒト対象である。

【 0 1 7 2 】

特定の実施形態においては、本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）は、単独で、または抗ウイルス療法と組合せて使用される。

40

【 0 1 7 3 】

特定の実施形態においては、本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）は、単独で、または別の R S V モノクローナル抗体と組合せて使用される。

【 0 1 7 4 】

特定の実施形態においては、本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）は、単独で、または別の R S V ワクチンと組合せて使用され

50

うる。

【0175】

「組合される（組合せて）」なる語は、本発明の方法において投与される成分（例えば、抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）およびペンプロリズムブ）が、同時運搬のために単一組成物へと製剤化されることが可能であり、あるいは2以上の組成物（例えば、キット）に別々に製剤化されることが可能であることを示す。各成分は、その他の成分が投与される時点とは異なる時点で対象に投与されうる。例えば、各投与は、ある時間にわたって、幾つかの間隔をあけて非同時（例えば、別々または連続的）に行われうる。更に、そのような別々の成分は、同じ経路または異なる経路によって対象に投与されうる。

10

【0176】

実験的および診断的用途

本明細書に開示されている抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）はアフィニティ精製剤として使用されうる。このプロセスにおいては、当技術分野でよく知られた方法を用いて、該抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントを固相、例えばSephadex（登録商標）、ガラスもしくはアガロース樹脂または濾紙上に固定化する。該固定化抗体またはフラグメントを、精製すべきhRSV Fタンパク質（またはその断片）を含有するサンプルと接触させ、ついで、該固定化抗体またはフラグメントに結合したhRSV Fタンパク質タンパク質以外のサンプル中の実質的に全ての物質を除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、該結合hRSV Fタンパク質（例えば、プロテインA）を溶出する溶媒で該支持体を洗浄する。そのような固定化抗体およびフラグメントは本発明の一部を形成する。

20

【0177】

更に、例えば、ウエスタンブロットおよび本明細書に記載されている他のイムノアッセイを行うのに有用である二次抗体を産生させるための抗原を提供する。特に、本明細書に開示されている治療用抗体（例えば、RB1）の可変領域および/またはCDR配列を含み、例えば治療場面において該抗体の存在を特異的に検出するために使用される抗イデオタイプ抗体を産生させるために使用されうるポリペプチドを開示する。

【0178】

抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメントはまた、hRSV Fタンパク質に関する検出アッセイにおいて、例えば、特定の細胞、組織または血清におけるその発現を検出するのに有用でありうる。そのような診断方法は種々の疾患診断において有用でありうる。

30

【0179】

本発明は、本明細書に開示されている抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）の使用を含むELISAアッセイ（酵素結合イムノソルベントアッセイ）を含む。

【0180】

例えば、そのような方法は以下の工程を含む：

(a) 抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントで基体（例えば、マイクロタイタープレートウェル、例えばプラスチックプレートの表面）をコーティングすること；

40

(b) hRSV Fタンパク質の存在に関して試験されるべきサンプルを該基体に適用すること；

(c) 該プレートを洗浄して、該サンプル中の未結合物質を除去すること；

(d) hRSV Fタンパク質抗原と同様に特異的である検出可能な様態で標識された抗体（例えば、酵素結合抗体）を適用すること；

(e) 該基体を洗浄して、未結合標識抗体を除去すること；

(f) 標識抗体が酵素結合体である場合には、酵素により蛍光シグナルに変換される化学物質を適用すること；および

50

(g) 標識抗体の存在を検出すること。

【0181】

該基体に結合した標識の検出はhRSV Fタンパク質の存在を示す。

【0182】

もう1つの実施形態においては、該標識抗体またはその抗原結合性フラグメントはペルオキシダーゼで標識され、これはABTS（例えば、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)）または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと反応して、検出可能な変色をもたらす。あるいは、該標識抗体またはフラグメントは、検出可能な放射性同位体（例えば、³H）で標識され、これは、シンチラントの存在下、シンチレーションカウンターにより検出されうる。

10

【0183】

本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）はウエスタンブロットまたは免疫-タンパク質ブロット法において使用されうる。そのような方法は本発明の一部を構成し、例えば以下のことを含む。

【0184】

(1) 当技術分野で公知の方法（例えば、半乾燥プロッティングまたはタンクプロッティング）を用いて、hRSV Fタンパク質の存在に関して試験すべきサンプル由来の（例えば、サンプル中のタンパク質のPAGEまたはSDS-PAGE電気泳動分離からの）タンパク質を膜または他の固体基体上へ所望により移し、結合hRSV Fタンパク質またはその断片の存在に関して試験すべき膜または他の固体基体を本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させること。

20

【0185】

そのような膜は、例えば、非変性PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）ゲルまたはSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）ゲルにおいてhRSVの存在に関して試験すべきタンパク質が（例えば、該ゲルにおける電気泳動分離の後で）トランスファー（転移）されたニトロセルロースまたはビニル系（例えば、ポリビニリデンフルオライド（PVDF））膜の形態をとりうる。該膜を該抗hRSV抗体またはフラグメントと接触させる前に、所望により、該膜上の非特異的タンパク質結合部位に結合するように、該膜を例えば脱脂乾燥乳などでブロッキングしてもよい。

【0186】

(2) 該膜を1回以上洗浄して、未結合抗hRSV Fタンパク質抗体またはフラグメントおよび他の未結合物質を除去すること；ならびに

30

(3) 結合した抗hRSV Fタンパク質抗体またはフラグメントを検出すること。

【0187】

結合抗体またはフラグメントの検出は、該膜または基体上および該サンプル中にhRSV Fタンパク質が存在することを示す。該結合抗体またはフラグメントの検出は、検出可能な状態で標識された二次抗体（抗免疫グロブリン抗体）に該抗体またはフラグメントを結合させ、該二次抗体の存在を検出することによるものでありうる。

【0188】

本明細書に開示されている抗hRSV Fタンパク質抗体およびその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は免疫組織化学的方法にも使用されうる。そのような方法は本発明の一部を構成し、例えば、

40

(1) hRSV Fタンパク質の存在に関して試験すべき細胞を本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させ、

(2) 該細胞上または細胞内の該抗体またはフラグメントを検出することを含む。

【0189】

該抗体またはフラグメント自体が検出可能な状態で標識されている場合、それは直接的に検出されうる。あるいは、検出可能な状態で標識された二次抗体に該抗体またはフラグメントを結合させ、該標識を検出することが可能である。

【0190】

50

医薬組成物および投与

本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体および抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）の医薬組成物または無菌組成物を製造するためには、該抗体またはその抗原結合性フラグメントを医薬上許容される担体または賦形剤と混合する。例えば、Remington's Pharmaceutical SciencesおよびU.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)を参照されたい。

【0191】

治療用および診断用物質の製剤は、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水性溶液または懸濁液の形態で、生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより製造されうる（例えば、Hardmanら(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, WilliamsおよびWilkins, New York, NY; Avisら(編)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; WeinerおよびKotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NYを参照されたい)。1つの実施形態においては、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントを1~20mMのヒスチジンバッファー(pH5~7)中で適当な濃度まで希釈し、所望により、浸透圧のためにNaClまたはスクロース（例えば、2~15%(w/v)）を加えてもよい。安定性を増強するために、追加的物質、例えばポリソルベート20またはポリソルベート80が0.01~0.10%(w/v)で加えられうる。代表的な製剤は10mM L-ヒスチジン、7%(w/v)スクロースおよび0.02%(w/v)ポリソルベート-80(pH6.0)である。

【0192】

単独で又は別の治療剤と組合せて投与される本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントの毒性および治療効力は、例えばLD₅₀（集団の50%に致死的である用量）およびED₅₀（集団の50%において治療的に有効である用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法により決定されうる。毒性効果と治療効果との用量比は治療係数(LD₅₀/ED₅₀)である。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲の決定において使用されうる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど又は全く伴わないED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。該投与量は、使用される剤形および投与経路に応じて、この範囲内で変動しうる。

【0193】

投与方法は様々でありうる。投与経路には、経口、直腸、経粘膜、腸、非経口；筋肉内、皮下、皮内、髄内、鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、眼内、吸入、吹送、局所、皮膚、経皮または動脈内が含まれる。好ましい投与方法は筋肉内、静脈内および鼻腔内である。

【0194】

特定の実施形態においては、本発明の抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、侵襲的経路、例えば注射により投与されうる。本発明の更に詳細な実施形態においては、抗hRSV Fタンパク質抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたはその医薬組成物は静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腫瘍内に

10

20

30

40

50

、または吸入、エアゾール運搬により投与される。非侵襲性経路（例えば、経口的、例えば、丸剤、カプセル剤または錠剤）による投与も本発明の範囲内である。

【0195】

本発明は、本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）またはその医薬組成物のいずれかを含む容器（例えば、プラスチックまたはガラスバイアル、例えば、キャップまたはクロマトグラフィーカラム、中空穿孔針またはシリンジシリンダーを有するもの）を提供する。本発明はまた、本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）またはその医薬組成物のいずれかを含む注射装置を提供する。注射装置は、非経口経路、例えば筋肉内、皮下または静脈内経路により患者の体内に物質を導入する装置である。例えば、注射装置はシリンジ（例えば、医薬組成物が予め充填されたもの、例えば、自動注入装置）であることが可能であり、これは、例えば、注射すべき流体（例えば、抗体もしくはフラグメントまたはその医薬組成物）を保持するためのシリンダーまたは筒状物、該流体の注射のために皮膚および/または血管を穿刺するための針、ならびに該シリンダーから及び針穿孔を介して該流体を押し出すプランジャーを含む。本発明の1つの実施形態においては、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたはその医薬組成物を含む注射装置は静脈内（IV）注射装置である。そのような装置は、カニューレまたはトロカール/針を介して患者の体内に導入される流体（例えば、生理食塩水；またはNaCl、乳酸ナトリウム、KCl、CaCl₂を含み、所望によりグルコースを含む乳酸リンゲル液）を保持するためのバッグ（袋）またはリザーバ（貯蔵容器）に接続されうるチューブに接続されうるカニューレまたはトロカール/針の中に該抗体もしくはフラグメントまたはその医薬組成物を含む。本発明の1つの実施形態においては、トロカールおよびカニューレが対象の静脈内に挿入され、挿入カニューレからトロカールが取り外されたら、該抗体もしくはフラグメントまたはその医薬組成物が装置内に導入される。IV装置は、例えば、（例えば、手または腕における）末梢静脈内；上大静脈または下大静脈、または心臓の右心房（例えば、中央IV）内；あるいは鎖骨下、内頸、または大腿静脈に挿入されることが可能であり、例えば、それが上大静脈または右心房（例えば、中心静脈線）に達するまで、心臓に向けて進入可能である。本発明の1つの実施形態においては、注射装置は自動注入装置、ジェットインジェクターまたは外部注入ポンプである。ジェットインジェクターは、該抗体もしくはフラグメントまたはその医薬組成物を患者の体内へ導入するために、表皮に浸透する液体の高圧ナロー（narrow）ジェットを使用する。外部注入ポンプは、制御された量の該抗体もしくはフラグメントまたはその医薬組成物を患者の体内に運搬する医療装置である。外部注入ポンプは電気的または機械的に駆動されうる。ポンプは、ポンプによって異なる様態で作動する。例えば、シリンジポンプはシリンジのリザーバ内に流体を保持し、可動式ピストンが流体運搬を制御し、弾性（elastomeric）ポンプは伸縮性バルーンリザーバ内に流体を保持し、バルーンの弾性壁からの圧力が流体運搬を駆動する。蠕動ポンプにおいては、1組のローラーが可撓性チューブの或る長さを絞り込んで、流体を前方へ押し出す。マルチチャンネルポンプにおいては、流体は複数のリザーバから複数の速度で運搬されうる。

【0196】

本明細書に開示されている医薬組成物は、例えば米国特許第6,620,135号、第6,096,002号、第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号または第4,596,556号に開示されている装置のような無針（needleless）皮下注射装置によっても投与されうる。該医薬組成物を含むそのような無針装置も本発明の一部である。本明細書に開示されている医薬組成物は注入によっても投与されうる。医薬組成物を投与するための良く知られたインプラントおよびモジュールの例には、米国特許第4,487,603号（これは、制御された速度で医薬を分注するための移植可能な微量注入ポンプを開示している）、米国特許第4,447,233号（これは、正確な注入速度で医薬を運搬するための医薬注入ポンプを開示している）、米国特許第4,447,224号（これは、連続的薬物運搬のための可変流量移植可能注入装置を開示

10

20

30

40

50

している)、米国特許第4,439,196号(これは、マルチチャンバ・コンパートメントを有する浸透性薬物運搬系を開示している)に開示されているものが含まれる。多数の他のそのようなインプラント、運搬系およびモジュールは当業者によく知られており、本発明の医薬組成物を含むものは本発明の範囲内である。

【0197】

投与レジメンは、該治療用抗体または抗原結合性フラグメントの血清または組織代謝回転速度、症状の程度、該予防用/治療用抗体の免疫原性、および生物学的マトリックスにおける標的細胞の接近可能性を含む幾つかの要因に左右される。好ましくは、投与レジメンは、望ましくない副作用を最小にすると同時に標的罹患状態の改善をもたらす十分な治療用抗体またはフラグメントを運搬する。したがって、運搬される生物学的物質の量は、部分的には、個々の予防用/治療用抗体および治療される状態の重症度に左右される。治療量抗体またはフラグメントの適当な用量を選択する際の指針が入手可能である(例えば、Wawrzynczak(1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina(編)(1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach(編)(1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baertら, 2003, *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgromら, 1999, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamonら, 2001, *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitzaら, 2000, *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghoshら, 2003, *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipskyら, 2000, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602を参照されたい)。

10

20

【0198】

適当な用量の決定は、例えば、予防または治療に影響を及ぼすことが当技術分野で知られている又は疑われているパラメータまたは因子を用いて、臨床家によりなされる。一般に、用量は、最適用量より幾分少ない量から開始し、ついで、負の副作用と比較して所望または最適効果が得られるまで、少しずつ増量する。重要な診断尺度には、例えば炎症の症状の尺度、または産生される炎症性サイトカインのレベルが含まれる。一般に、使用される生物学的物質を、治療のために標的化される動物と同じ種から誘導し、それにより該薬剤に対する免疫応答を最小にすることが望ましい。例えば、ヒト対象の場合には、ヒト化抗体および完全ヒト抗体が望ましいかもしれない。

30

【0199】

本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメント(例えば、RB1)は、連続的注入により、または例えば、毎日、週1~7回、毎週、隔週、毎月、隔月、年4回、年2回、毎年などで投与される用量で投与される。投与は、例えば、静脈内、皮下、局所、経口、鼻腔内、直腸内、筋肉内、大脳内、髄腔内投与または吸入により行われうる。毎週の全用量は、一般には、少なくとも0.05 µg/kg体重、より一般には少なくとも0.2 µg/kg、0.5 µg/kg、1 µg/kg、10 µg/kg、100 µg/kg、0.25 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/ml、10 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg以上である(例えば、Yangら, 2003, *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Heroldら, 2002, *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liuら, 1999, *J. Neuro. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portieljiら, 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:151-144を参照されたい)。また、用量は、対象の血清中の抗hRSV抗体の所定の目標濃度、例えば、0.1、0.3、1、3、10、30、100、30

40

50

0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれ以上を達成するように投与されうる。他の実施形態においては、本発明の抗 h R S V 抗体は、例えば、皮下または静脈内に、毎週、隔週、「4 週間ごと」、毎月、隔月または年 4 回、10、20、50、80、100、200、500、1000 または 2500 $\text{mg}/\text{対象}$ で投与される。

【0200】

本明細書中で用いる「有効量」なる語は、単独で又は追加的な治療/予防剤と共に細胞、組織または対象に投与された場合に、R S V を中和する及び/又は R S V 感染に関連した疾患もしくは状態の症状の 1 以上を予防する若しくは該症状の 1 以上における測定可能な改善を引き起こすのに有効である、本発明の抗 h R S V またはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）の量を意味する。有効量は更に、症状の少なくとも部分的な予防または改善をもたらすのに十分な該抗体またはフラグメントの量を意味する。有効量は、単独で投与される個々の有効成分に適用される場合には、その成分のみに関するものである。有効量は、組合せ体に適用される場合には、連続投与または同時投与のいずれで組合せ投与されるかにかかわらず、予防または治療効果をもたらす、有効成分の組合せられた量を意味する。ある実施形態においては、有効量は、5 カ月間にわたって 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の臨床目標血清濃度をもたらす量である。1 つの実施形態においては、有効量は、標準的な前臨床コットラットモデルにおいて測定された場合に、有効性に関して 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトラフ濃度 (C t r o u g h) 目標を与える、ヒトにおける用量である。

10

【0201】

キット

更に、本明細書に記載されている医薬上許容される担体および/または予防/治療剤（これらに限定されるものではない）を含む 1 以上の追加的成分と共に、本明細書に開示されている抗 h R S V F タンパク質抗体または抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）（これらに限定されるものではない）を含む 1 以上の成分を含むキットを提供する。該抗体もしくはフラグメントおよび/または該予防/治療剤は、純粋な組成物として、または医薬組成物において医薬上許容される担体と組合せて製剤化されうる。

20

【0202】

1 つの実施形態においては、該キットは、本発明の抗 h R S V F タンパク質抗体もしくはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）またはその医薬組成物を 1 つの容器（例えば、無菌ガラスまたはプラスチックバイアル）内に、そしてその医薬組成物および/または予防/治療剤をもう 1 つの容器（例えば、無菌ガラスまたはプラスチックバイアル）内に含む。

30

【0203】

もう 1 つの実施形態においては、該キットは、単一の共通の容器内に、所望により医薬組成物において、一緒に製剤化される 1 以上の予防/治療剤と所望により組合せられていてもよい、本発明の抗 h R S V F タンパク質抗体もしくはその抗原結合性フラグメント（例えば、R B 1）と医薬上許容される担体とを含む、本発明の組合せを含む。

【0204】

該キットが対象への非経口投与のための医薬組成物を含む場合、該キットは、そのような投与を行うための装置を含みうる。例えば、該キットは前記の 1 以上の皮下針または他の注射装置を含みうる。

40

【0205】

該キットは、該キットにおける医薬組成物および剤形に関する情報を含む添付文書を含みうる。一般に、そのような情報は、封入されている医薬組成物および剤形を有効かつ安全に使用することにおいて患者および医師を補助する。例えば、本発明の組合せに関する以下の情報が添付文書（インサート）において供給されうる：薬物動態、薬力学、臨床試験、有効性パラメータ、適応症および用法、禁忌、警告、予防策、有害反応、過剰投薬、適切な投与量および投与、供給方法、適切な保存条件、参考資料、製造業者/流通業者情報ならびに特許情報。

50

【0206】

検出用キットおよび予防用／治療用キット

便宜上、本発明の抗hRSV抗体またはその抗原結合性フラグメント（例えば、RB1）は、キットとして、すなわち、診断用または検出用アッセイを行うための説明を伴う所定量の試薬のパッケージ化された組合せとして提供されうる。該抗体またはフラグメントが酵素で標識されている場合には、該キットは、該酵素により要求される基質および補因子（例えば、検出可能な発色団または発蛍光団を与える基質前駆体）を含む。また、他の添加物、例えば安定剤、バッファー（例えば、ブロッキングバッファーまたは細胞溶解バッファー）などが含まれうる。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中濃度をもたらすように大きく変動しうる。特に、該試薬は、適当な濃度を有する試薬溶液を溶解時に与える賦形剤を含む乾燥粉末、通常は凍結乾燥粉末として提供されうる。

10

【0207】

また、例えばELISA（サンドイッチ型または競合形態）のようなイムノアッセイを含む種々の検出アッセイにおいて使用される1以上のそのような試薬を含む診断用または検出用試薬およびキットを提供する。キットの成分は固体支持体に予め結合していることが可能であり、あるいはキットが使用される際に固体支持体の表面に適用されることが可能である。本発明の幾つかの実施形態においては、シグナル生成手段は、本発明の抗体またはフラグメントが予め結合した状態で提供されることが可能であり、あるいは使用前に1以上の成分、例えばバッファー、抗体-酵素コンジュゲート、酵素基質などと一緒にすることを要しうる。キットはまた、追加的な試薬、例えば、固相表面への非特異的結合を低減するためのブロッキング試薬、洗浄試薬、酵素基質などを含みうる。該固相表面はチューブ、ビーズ、マイクロタイプレート、マイクロスフェア、またはタンパク質、ペプチドもしくはポリペプチドを固定化するのに適した他の材料の形態でありうる。特定の態様においては、化学発光性もしくは発色性産物の形成または化学発光性もしくは発色性基質の還元を触媒する酵素がシグナル生成手段の成分の1つである。そのような酵素は当技術分野でよく知られている。キットは、本明細書に記載されている捕捉剤および検出試薬のいずれかを含みうる。所望により、キットは、本発明の方法を実施するための説明をも含みうる。

20

【0208】

また、容器、例えばバイアルまたはボトル内にパッケージングされた抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントを含み、更に、該容器に貼付またはパッケージングされたラベルを含むキットを提供し、該ラベルは該容器の内容物を記載し、本明細書に記載されている1以上の病態を予防／治療するための該容器の内容物の使用に関する指示および／または説明を提供する。

30

【0209】

1つの態様においては、該キットは、RSV感染に関連した疾患／状態を予防または治療するためのものであり、抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントおよびもう1つの予防／治療剤またはワクチンを含む。該キットは、所望により、更に、非経口投与用、例えば静脈内投与用のシリンジを含みうる。もう1つの態様においては、該キットは、抗hRSV Fタンパク質抗体またはその抗原結合性フラグメントを含み、そしてまた、該ワクチンまたはもう1つの治療剤と共に該抗体またはフラグメントを使用することを示す、容器に貼付またはパッケージングされたラベルを含む。更にもう1つの態様においては、該キットは、該ワクチンまたはもう1つの予防／治療剤を含み、そしてまた、該抗hRSV Fタンパク質抗体またはフラグメントと共に該ワクチンまたはもう1つの予防／治療剤を使用することを示す、容器に貼付またはパッケージングされたラベルを含む。ある実施形態においては、抗hRSV Fタンパク質抗体およびワクチンまたはもう1つの予防／治療剤は別個のバイアル内に存在し、あるいは同じ医薬組成物中で一緒になっている。

40

【0210】

50

併用予防または療法の場合、2つの予防/治療剤の共投与は、それらの物質がそれらの予防/治療効果を奏する期間の重複が存在する限り、それらの物質が同時に又は同じ経路によって投与されることを要しない。異なる日または週の投与と同様に、同時または連続投与が想定される。

【0211】

本明細書に開示されている抗体、ペプチド、抗原結合性フラグメントまたはポリヌクレオチドの少なくとも1つと、検出試薬または予防/治療剤として該組成物を使用するための説明とを含む、本明細書に開示されている予防/治療用キットおよび検出用キットも調製されうる。そのようなキットにおいて使用される容器は、典型的には、該検出用および/または予防/治療用組成物の1以上が配置されうる、そして好ましくは、適切にアリコート化されうる、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の適当な容器を含みうる。第2の予防/治療剤も提供される場合には、該キットは、この第2の検出用および/または予防/治療用組成物が配置されうる第2の異なる容器をも含有しうる。あるいは複数の化合物が単一医薬組成物において調製可能であり、単一収容手段、例えばバイアル、フラスコ、シリンジ、ボトルまたは他の適当な単一容器内にパッケージングされうる。本明細書に開示されているキットはまた、典型的には、商業的販売のために密封された、該バイアルを収容するための手段、例えば、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形プラスチック容器を含む。放射能標識、発色性、蛍光性または他のタイプの検出可能な標識または検出手段が該キット内に含まれる場合、標識剤は検出用または予防/治療用組成物自体と同じ容器において提供されることが可能であり、あるいは、第2の組成物が配置されうる、そして適切にはアリコート化されうる第2の異なる収容手段内に配置されうる。あるいは検出試薬および標識は単一収容手段において調製されることが可能であり、ほとんどの場合、該キットは、典型的には、商業的販売および/または簡便な包装（パッケージング）および運搬のために密封して該バイアルを収容するための手段をも含む。

10

20

【0212】

本明細書に記載されている検出またはモニタリング方法を実施するための装置または器具をも提供する。そのような装置は、サンプルが入れられうるチャンバーまたはチューブ、サンプルの流れを装置に通すためのバルブまたはポンプを所望により含んでもよい流体処理系、血液から血漿または血清を分離するための所望により含まれていてもよいフィルター、捕捉剤または検出試薬の添加のための混合チャンバー、および捕捉剤免疫複合体に結合した検出可能な標識の量を検出するための所望により含まれていてもよい検出装置を含みうる。サンプルの流れは受動的（例えば、サンプルが適用されたら該装置の更なる操作を要しない毛管力、流体静力または他の力によるもの）または能動的（例えば、機械ポンプ、電気浸透ポンプ、遠心力または空気圧の増加により生じる力の適用によるもの）でありうる。

30

【0213】

他の実施形態においては、プロセッサ、コンピュータ可読メモリおよびルーチン（これは、コンピュータ可読メモリ上で保存され、本明細書に記載されている方法のいずれかを実施するためにプロセッサ上で実行されるように適合化される）をも提供する。適当なコンピューティングシステム、環境および/または設定の例には、パーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、ハンドヘルドまたはラップトップデバイス、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースシステム、セットトップボックス、プログラマブルコンシューマエレクトロニクス、ネットワークPC、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ、前記のシステムまたはデバイスのいずれかを含む分散コンピューティング環境、あるいは当技術分野で公知のいずれかの他のシステムが含まれる。

40

【0214】

一般的方法

分子生物学における標準的な方法は、Sambrook, FritschおよびManiatis (1982, 1989 2nd Editionおよび2001 3rd E

50

dition) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; SambrookおよびRussell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. に記載されている。標準的な方法は、Ausubelら (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NYにも記載されており、これは、細菌細胞におけるクローニングおよびDNA突然変異誘発 (Vol. 1)、哺乳類細胞および酵母におけるクローニング (Vol. 2)、複合糖質およびタンパク質発現 (Vol. 3)、ならびにバイオインフォマティクス (Vol. 4) を記載している。

10

【0215】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離および結晶化を含むタンパク質精製のための方法が記載されている (Coliganら (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の製造、タンパク質のグリコシル化が記載されている (例えば、Coliganら (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubelら (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5 - 16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; pp. 45 - 89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384 - 391を参照されたい)。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の製造、精製およびフラグメント化が記載されている (Coliganら (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; HarlowおよびLane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; HarlowおよびLane, 前掲)。リガンド/受容体相互作用を特徴づけるための標準的な技術が利用可能である (例えば、Coliganら (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New Yorkを参照されたい)。

20

30

【0216】

一本鎖抗体およびジアボディが記載されている (例えば、Maleckiら, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 213 - 218; Conrathら, 2001, J. Biol. Chem. 276: 7346 - 7350; Desmyterら, 2001, J. Biol. Chem. 276: 26285 - 26290; HudsonおよびKortt, 1999, J. Immunol. Methods 231: 177 - 189; ならびに米国特許第4,946,778号を参照されたい)。二官能性抗体が提供されている (例えば、Mackら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7021 - 7025; Carter (2001) J. Immunol. Methods 248: 7 - 15; Volkelら (2001) Protein Engineering 14: 815 - 823; Segalら (2001) J. Immunol. Methods 248: 1 - 6; Brennanら (1985) Sci

40

50

ence 229:81-83; Rasoř (1997) J. Biol. Chem. 272:27623; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Traunekerř (1991) EMBO J. 10:3655-3659; ならびに米国特許第5,932,448号、第5,532,210号および第6,129,914号を参照されたい)。

【0217】

二重特異性抗体も提供されている(例えば、Azzoniř (1998) J. Immunol. 161:3493; Kitař (1999) J. Immunol. 162:6901; Merchantř (2000) J. Biol. Chem. 74:9115; Pandeyř (2000) J. Biol. Chem. 275:38633; Zhengř (2001) J. Biol. Chem. 276:12999; Propstř (2000) J. Immunol. 165:2214; Long (1999) Ann. Rev. Immunol. 17:875を参照されたい)。

10

【0218】

抗体は例えば小薬物分子、酵素、リポソーム、ポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲート化されうる。抗体は治療、診断、キットまたは他の目的に有用であり、例えば色素、放射性同位体、酵素または金属、例えばコロイド金に結合した抗体を包含する(例えば、Le Doussalř (1991) J. Immunol. 146:169-175; Gibelliniř (1998) J. Immunol. 160:3891-3898; HsingおよびBishop (1999) J. Immunol. 162:2804-2811; Evertsř (2002) J. Immunol. 168:883-889を参照されたい)。

20

【0219】

蛍光標識細胞分取検出系(FACS)を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である(例えば、Owensř (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) Flow Cytometry, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJを参照されたい)。例えば診断試薬としての使用のための、核酸プライマーおよびプローブを含む核酸、ポリペプチドおよび抗体を修飾するのに適した蛍光試薬が利用可能である(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO)。

30

【0220】

免疫系の標準的な組織学的方法が記載されている(例えば、Muller-Harmelink (編) (1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiattř (2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louisř (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NYを参照されたい)。

40

【0221】

例えば抗原フラグメント、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能的ドメイン、グリコシル化部位および配列アライメントを決定するためのソフトウェアパッケージおよびデータベースが利用可能である(例えば、GenBank, Vector NTI (登録商標) Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GC G Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher (登録商標) (TimeLogic Corp., C

50

Crystal Bay, Nevada); Menneñ (2000) Bioinformatics 16:741-742; Menneñ (2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742; Wrenñ (2002) Comput. Methods Programs Biomed. 68:177-181; von Heijne (1983) Eur. J. Biochem. 133:17-21; von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14:4683-4690を参照されたい)。

【図面の簡単な説明】

【0222】

【図1】図1A~Bは、ヒトRSV F融合前(A)および融合後(B)タンパク質に対するヒトRSV抗体D25、パリズマブおよびRB1の結合曲線(ELISAからのもの)を示す。

10

【図2】図2A~Bは、RSV A Long株(A)およびRSV B Washington株(B)におけるヒトRSV抗体の中和曲線を示す。

【図3】図3A~Bは、融合Fタンパク質のアラニンスキャニング突然変異誘発によるRB1のエピトープマッピング(A)、および融合前F結晶構造上のエピトープマッピング残基(B)を示す。

【図4】図4A~Dは、肺においてD25と比較された場合の、抗体の濃度に対してプロットされたRSV Aのコットンラットチャレンジモデル(A)、および抗体の濃度に対してプロットされたRSV Bチャレンジ(B)における、RB1の有効性、またはRSV Aチャレンジ(C)およびRSV Bチャレンジ(D)に関する、抗体の用量に対してプロットされた、組織内に存在するウイルス粒子(PFU/g)を示す。

20

【図5】図5A~Dは、鼻においてD25と比較された場合の、抗体の濃度に対してプロットされたRSV Aのコットンラットチャレンジモデル(A)、および抗体の濃度に対してプロットされたRSV Bチャレンジ(B)における、RB1の有効性、またはRSV Aチャレンジ(C)およびRSV Bチャレンジ(D)に関する、抗体の用量に対してプロットされた、組織内に存在するウイルス粒子(PFU/g)を示す。

【図6】図6はヒトRSV A Fタンパク質に対するヒトRSV抗体RB1+YTEの結合曲線(ELISAからのもの)を示す。

【図7】図7は、YTE突然変異セットを有するモタズマブに対するRB1-YTE(RB1+YTE)のアカゲザルにおける薬物動態特性を示す。

30

【0223】

実施例

実施例1：完全ヒトRSV中和抗体の特定

強力なHRSV中和抗体を特定するために、血清を、インフォームドコンセントを得たドナーから得、インビトロでHRSVウイルスを中和する能力に関してアッセイした。該中和アッセイのために、まず、血清サンプルを系列希釈し、ついで、増強した緑色蛍光タンパク質を発現する600pfuのhRSV-A株(RSV-GFP)と共にインキュベートした。96ウェルU底プレートにおいて、ウェルあたり200μlの全容量中、RSV-GFPを血清希釈物と1:1で37で1時間混合した。ついで、ウェルあたり100μlの該混合物をHEp-2細胞播種プレート(ウェルあたり15,000細胞)に移した。プレートをacumen(登録商標)Cellista(TTP LabTech, Cambridge, MA)でスキャンし、データをGFP事象の数および総蛍光強度(ウェルあたり)としてエクスポートした。GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)を使用して、4パラメータ曲線フィッティングによりNT50値を計算した。RSV前F(pre-F)タンパク質および後F(post-F)タンパク質に対するELISA結合力価の測定を以下のとおりに行った。Nunc C96 Maxisorp(登録商標)Nunc-Immuno(商標)プレート(Thermo Scientific, Inc.)をウェルあたり50μlのhRSV前F(McLellanら, 2013, Science

40

50

342:592を参照されたい)または後Fタンパク質(融合後F LZF21タンパク質は、融合ペプチドを伴わないwtFエクトドメインからなる(McLellenら, 2011, J. Virol 85:7788を参照されたい))(PBS中、1 μ g/ml)で4で一晚コーティングした。該プレートをPBS/Tween 20で洗浄し、ついでPBS中の3% 脱脂乳でブロックした。ついで50 μ lの系列希釈血清サンプルをウェルごとに加え、室温で90分間インキュベートした。プレートを洗浄し、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG(Southern Biotech, Birmingham, AL)を1:2,000希釈で加えた。1時間後、プレートを洗浄し、SuperBlue Turbo TMB溶液(Viro Labs, Inc., Sterling, VA)で発色させた。Wallac 1420 VICTOR²(商標)Multilabel Counter(Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して、OD450nmの読取り値を得た。GraphPad Prism 6を使用して、4パラメーター曲線フィッティングによりEC50値を計算した。高いHRSV中和および結合力価を示したドナーの集団を呼び戻して、PBMCを得るために、より大きな血液容量を得た。PBMCの調製は商業的ベンダーによって行われ、購入したPBMCをその後の使用まで液体窒素において保存した。

【0224】

1名の被験者からのPBMCが良好な中和力価を示し、融合後Fタンパク質に対するELISA結合アッセイにおいて最高力価をも示し、融合前Fタンパク質に対する選り抜きの(エリート)結合体でもあった(データ非表示)。したがって、このドナーのPBMCを、FACSソーティングにより後F特異的記憶B細胞を単離するために選択した。

【0225】

EZ Link(商標)Sulfo-NHS-LCビオチン化キット(Life Technologies, Grand Island, NY)を製造業者の説明に従い使用してLZF21(McLellenら, 2011, J. Virol 85:7788)をビオチン化することにより、ビオチン化三量体融合後Fタンパク質(LZF21)を製造した。LZF21タンパク質は、融合ペプチドを伴わない野生型Fタンパク質エクトドメインからなる(McLellenら, 2011, J. Virol 85:7788)。融合Fタンパク質特異的マウスハイブリドーマ4D7(4D7は、Balb/cマウスをRSV A2ウイルスで免疫化することにより作製されたマウスハイブリドーマである)。Balb/cマウスをRSV A2ウイルスで2回、腹腔内に免疫化し、静脈注射により20 μ gの精製RSV A2(Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD)を使用して融合の3日前に追加免疫した。脾臓を回収し、ポリエチレングリコールを使用して脾細胞をSP2/0骨髓腫細胞と融合させた。細胞を培地D(Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC)に加え、245mm \times 245mmの正方形ペトリ皿内でプレーティングし、37、5% CO₂で2週間インキュベートした。個々のコロニーを、Clone Pix(Geneticix)を使用して採取し、96ウェルプレートに移し、前記のとおり1週間インキュベートした。ついで精製RSV A2に対するELISAにより抗RSV活性に関して上清をスクリーニングした。4D7を含む陽性クローンを増殖させ、限界希釈により更にサブクローニングした。前記のとおりサブクローンをスクリーニングし、4D7-8を特定し、FACSによる記憶B細胞に対するLZF21-ビオチンの染色を最適化するために使用した(データ非表示)。これらの最適化実験により、1.5 μ g/mlのLZF21-ビオチンが後F特異的記憶B細胞の染色のための最良濃度であると決定された。無関係なマウスハイブリドーマを陰性対照として使用し、100~1000倍過剰の非標識LZF21との結合を競合させることにより、該染色反応の特異性が実証された。

【0226】

抗原特異的記憶B細胞はCD3⁻CD19⁺IgG⁺LZF21⁺として示された。これらの細胞を、CD40リガンド発現性HEK293細胞系(標準的な分子生物学技術を

用いて作製された)およびIL-21(Sino Biological Inc., North Wales, PA)を含有する96ウェルプレート(1細胞/ウェル)内に選別した。30個の選別サンプルのうち、6個のウェルからの上清がELISAアッセイ(前記のとおりに行った)において後Fタンパク質への結合を示した。これらのサンプルは前Fタンパク質にも結合する(データ非表示)。ついでこれらの6個のサンプルを、前記のとおり、希釈することなく中和アッセイにおいて試験した。GFP事象の減少に基づいて中和活性の存在が確認された。6個のサンプルのうち2個(RB1およびRB11と称される)がHRSV-A株の完全な中和を示した(表3を参照されたい)。

【表3】

10

表3

ウェル番号	ELISA 450nm			中和	
	IgG	後F	前F	GFP 対象数	中和率%
A8	0.641	1.743	1.222	783	
A9	1.743	1.915	1.754	689	
A11	1.81	1.905	1.555	500	
B1	1.82	1.925	1.910	0	100%
B11	1.851	1.748	1.900	1	100%
B12	1.801	1.838	1.679	548	
対照	0.037	0.038	0.044	596	

20

【0227】

単一選別記憶B細胞培養のためのRNA抽出およびRT-PCR

第1部:

RNeasy(登録商標)Micro Kit(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を製造業者のマニュアルに従い使用して、RB1ヒットライゼートからの96ウェルプレートからのRNAを抽出した。RNA濃度を、UV260nmでNano Drop(商標)2000C(Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE)を使用して測定した。リーダー配列(フォワード)およびIgG JH、カッパ定常領域またはラムダ定常領域のC'末端(リバーズ)からの配列を使用するプライマー配列を使用する抗体重鎖および軽鎖遺伝子のRT-PCR増幅における鋳型として、RB1ウェルからの抽出RNAを使用した。

30

【0228】

One Step RT-PCRキット(Qiagen Inc, Valencia, CA)を製造業者の説明に従い使用して、抗体配列を増幅した。PCR条件は以下のとおりであった: 50 で30分間、95 で15分間、[94 で30秒間、55 で30秒間、72 で1分間] x 40、72 で10分間および4 で保持。

40

【0229】

該RT-PCR産物をネステッドPCRの鋳型として直接使用した。

【0230】

第2部: ネステッドPCR

該RT-PCR産物を、pfx50 DNAポリメラーゼ(Invitrogen, カタログ番号: 12355-012)を使用して抗体可変領域を増幅するためのネステッドPCRにおける鋳型として使用した。ネステッドPCRプライマーの設計は、ヒトIgG重鎖および軽鎖可変領域のフレームワーク1領域の生殖系列配列に基づいていた。

【0231】

50

1 μ l の RT-PCR 産物を 2.5 μ l の 10 \times PCR バッファー、2.5 μ l の 10 \times PCR X Enhancer (Invitrogen)、0.5 μ l の dNTP 混合物、0.5 μ l の フォワードプライマープール (それぞれ 10 μ M)、0.5 μ l の リバースプライマー (10 μ M)、0.5 μ l の pf x 50 DNA ポリメラーゼおよび 17 μ l の 水と混合した。ネステッド PCR 条件は以下のとおりであった：94 で 2 分間、94 で 30 秒間、50 で 30 秒間、68 で 1 分間の 10 サイクル、ついで 94 で 30 秒間、60 で 30 秒間、68 で 1 分間の 30 サイクル、ついで 68 で 7 分間の 伸長し、ついで 短期保存のための 4 での 保持。

【0232】

VH および VK または VH および VL 増幅 PCR 産物の RB1 ネステッド PCR 産物を、抗体軽鎖および重鎖遺伝子を一緒にアニーリングするための特異的リンカーとのオーバーラップ PCR における鋳型として用いて、次工程のインフュージョンクローニングを容易にした。

10

【0233】

第3部：オーバーラップ PCR およびインフュージョンクローニング

pf x 50 DNA ポリメラーゼ (Invitrogen) をこの反応において使用した。クローニングベクター内へのオーバーラップ PCR 産物のインフュージョンクローニングが容易となるように、フォワードおよびリバースプライマーを設計した。1 μ l の重鎖ネステッド PCR 産物、1 μ l の軽鎖ネステッド PCR 産物および 1 μ l のリンカーを 5 μ l の 10 \times PCR バッファー、5 μ l の 10 \times PCR X エンハンサー、1 μ l の dNTP 混合物、1 μ l の フォワードプライマー (10 μ M)、1 μ l の リバースプライマー (10 μ M)、1 μ l の pf x 50 DNA ポリメラーゼおよび 33 μ l の 水と混合した。

20

【0234】

PCR 条件は以下のとおりであった：94 で 2 分間、[94 で 30 秒間、60 で 30 秒間、68 で 2 分間] \times 10、[94 で 30 秒間、65 で 30 秒間、68 で 2 分間] \times 30、68 で 7 分間、4 での 保持。

【0235】

オーバーラップ PCR 産物をインフュージョンクローニングのためにアガロースゲルで精製した (約 1.2 kb の RB1 VH+VK オーバーラップ PCR 産物が得られた)。インフュージョンクローニングを適用して、RB1 VH+VK オーバーラップ PCR 産物を pMab11Exp2 (軽鎖発現の場合には OmpA リーダー配列を伴い、重鎖発現の場合には PelB リーダー配列を伴う) ベクター内にクローニングした。Infusion HD (登録商標) クローニングキット (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) を使用し、製造業者の説明に従った。形質転換体を採取し、配列決定のために GeneWiz, Inc. (South Plainfield, NJ) へ送った。

30

【0236】

配列決定の結果を Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) で分析した。

40

【0237】

RB1 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表 7 に示す (患者の単離 RB1 可変重鎖および可変軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 9 および配列番号 8 に示されている)。ヌクレオチド変化を有する Jh リバースプライマーの設計ゆえに、天然配列の 125 位に存在する イソロイシンは発現タンパク質においてはトレオニンに変化した (得られた RB1 可変重鎖は配列番号 7 に示されている)。コドン最適化およびヒト IgG1 変換ならびに CHO-過性発現および産生のために、RB1 抗体重鎖および軽鎖可変ドメイン遺伝子のアミノ酸配列を GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) へ送った。合成 DNA を CHO-3E7 細胞発現のために pTT5 ベクター内にサブクローニングした。各抗体の重鎖および軽鎖をコードする組換えプラスミドを CHO-3

50

E7細胞培養物内に一過性にコトランスフェクトした。第6日に回収された細胞培養上清をプロテインAカラムによる精製に使用した。精製されたRB1ヒトIgG1を、実施例2に記載されている中和アッセイおよび他の特徴づけ実験において使用した。

【0238】

実施例2：抗hRSV抗体の特徴づけ

実施例1に記載されているELISAアッセイにおいて、RB1は前Fおよび融合後Fタンパク質の両方に結合したが(EC₅₀は1~10ng/mlの範囲であった)、D25抗体(Kwakkenbosら, 2010, Nature Medicine 16: 123-128を参照されたい)は融合前Fに優先的に結合した。図1A~Bを参照されたい。

10

【表4】

mAb名	前F (EC50 ng/ml)	後F (EC50 ng/ml)
D25	8.939	>10,000
パリビズマブ	17.37	10.5
RB1	7.053	14.08

20

【0239】

RB1、RB11および文献に報告されている幾つかの基準抗体(D25、パリビズマブ、完全長[D25抗体は公開配列に基づいて社内で製造され、SYNAGIS(登録商標)(パリビズマブ)はMyoderm, Norristown, PAから購入された])に関する中和をRSV A Long株(ATCC番号VR-26(商標))およびRSV B Washington株18537株(ATCC番号VR-1580(商標))において比較した。試験サンプルを、2%熱不活性化FBSで補足されたEMEM中、11個の希釈点にわたって3倍系列希釈した。ついで該系列希釈サンプルを、100pfu/ウェルのRSV AまたはB株を含有する2%熱不活性化FBSで補足された等体積のEMEMと混合した。37℃で1時間のインキュベーションの後、1.5×10⁵細胞/mlの濃度の100μlのHEp-2細胞を、該ウイルス/抗体混合物を含有する96ウェルプレートに移した。感染後の第3日に、該細胞をPBSで1回洗浄し、ついで80%アセトン中で室温で10分間固定した。RSV F(mAb143-F3-B138)とRSV N(34C9)特異的マウスmAb(社内で入手したもの)との混合物を該プレートに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween 20で洗浄し、ビオチン化ウマ抗マウスIgGをプレートに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tweenで洗浄した。赤外色素-ストレプトアビジンを、RSV特異的シグナルを検出するために使用し、アッセイ標準化のための2つの細胞染色剤を96ウェルプレートに加え、暗所で1時間インキュベートした。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、暗所で20分間風乾させ、細胞標準化のためには700チャンネルレーザーを使用し、RSV特異的シグナルの検出のためには800チャンネルレーザーを使用して、Licor Aerius(登録商標)自動イメージングシステムで読取った。800/700比および中和率(%)を計算し、IC50値をGraphPadにおける4パラメーター曲線フィットにより決定した。

30

40

【0240】

RB1はRSV-AおよびRSV-B株を等しい効力(1~5ng/mlのIC50)で中和することが可能であった。RB1はまた、基準抗体と比較して優れた抗RSV中和を示した。図2A~Bおよび表4を参照されたい。

50

【表 5】

表 4: 基準抗体と比較した場合の RB1 の結合および中和効力

	融合前 F 結合	融合後 F 結 合	中和活性, IC50 (ng/mL)	
			RSV A/Long	RSV B/washington
RB1	+	+	3	1.7
D25	+	-	3.6	25.9
AM22	+	-	50	172.8
131-2A, マウス (Millipore)	+/-	+	1046	>10,000
4D7 (Merck), マ ウス	+/-	+	2408	>10,000
パリピズマブ	+	+	211.5	166
MPE8	+	-	106.6	46
101F, マウス	+	+	67	43.6
AM14	+	-	3.2	1.9

10

20

【0241】

融合前および融合後 F タンパク質への R B 1 の結合に関するアフィニティ測定:

抗ヒト R S V F タンパク質抗体 R B 1 (実施例 1 に記載されているとおりに製造) の動力学的結合活性を、Biacore T200 システム (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用する表面プラズモン共鳴により測定した。約 5000 RU の抗マウス IgG, GE Healthcare カタログ番号 BR-1008-38、または約 13,000 RU のヤギ抗ラット IgG Fc ガンマ、フラグメント特異的, Jackson ImmunoResearch カタログ番号 112-006-071 をアミンカップリング化学法により Series S CM5 センサーチップ (カタログ番号 BR-1005-30) 上に固定化した。

30

【0242】

会合速度定数 (k_a) および解離速度定数 (k_d) ならびに平衡解離定数 K_D を分析するために、バックグラウンド減算結合センサーグラムを使用した。得られたデータセットを、Biacore T200 評価ソフトウェア (バージョン 2.0) を使用して、1:1 ラングミュア結合モデルでフィットさせた。表 5 は、RSV F タンパク質の融合前形態および融合後形態に対する抗ヒト R S V F タンパク質抗体のアフィニティを要約したものである。

【表 6】

表 5: Biacore を使用した場合の RSV 融合前 F および融合後 F に対する RB1

のアフィニティの測定

タンパク質	K_{on} (M ⁻¹ S ⁻¹)	K^{off} (S ⁻¹)	K_D (nM)
融合前F	4.4×10^6	1.4×10^{-4}	0.031
融合後F	2.2×10^6	9×10^{-4}	0.41

40

【0243】

R B 1 は、 ~ 31 pM の K_d を有する、融合前 F タンパク質の非常に強力な結合体である。融合後結合の K_d は下方の 0.41 nM の大きさであった。国際特許出願公開番号 WO 2014/121021 A 1 に報告されている D 2 5 の K_d は 57 pM であった。また

50

、融合後Fタンパク質と比較して、 1.4×10^{-4} の、より遅い解離速度からも分かる
とおり、融合前F上では、抗体RB1は、融合後の場合より長く留まった。

【0244】

実施例3：RB1抗体のエピトープマッピング

融合Fタンパク質上のRB1の結合エピトープを、アラニンスキャン突然変異誘発実験
を行うことによりマッピングした。エピトープマッピングは、記載されているとおりに (
DavidsonおよびDoranz, 2014, Immunology 143(1)
: 13-20)、Integral Molecularにおいてショットガン突然変異
誘発により行われた。ショットガン突然変異誘発ライブラリーを構築するために、RSV
- Fタンパク質発現ベクターを突然変異誘発させて、クローンのライブラリーを得る。そ
のそれぞれは、個々の点突然変異体を表し、該タンパク質内の全ての残基を累積的にカバ
ーする。各残基の側鎖寄与を定めるためのより制御された方法をもたらすアラニンスキャ
ニング突然変異誘発を用いて、ライブラリーを構築した。半自動ロボットプロトコール
を用いて、各突然変異プラスミドを個々にクローニングし、配列決定し、ミニプレップし、
ヒト細胞における反復トランスフェクション、発現および抗体結合アッセイのために38
4ウェルマイクロプレートフォーマット内でアレイ化した。アラニンスキャン突然変
異体ライブラリーを、抗体結合の喪失に関してRB1に対してスクリーニングした。アル
ギニン-429およびイソロイシン-432の2つの残基がRB1結合に決定的に重要で
あることが確認された。後記および図3Aを参照されたい。RB1はIV部位モノクロー
ナル抗体(101F様)であるようであり、文献におけるIV部位結合抗体は融合前Fお
よび融合後Fの両方に結合すると報告されている。

10

20

【表7】

結合反応性 (% WT)			
突然変異	RB1 MAbs	RB1 Fab	D25 MAbs
R429A	33.1 (27)	5.1 (4)	385.0 (13)
I432A	36.7 (39)	3.6 (7)	327.8 (161)

30

【0245】

本発明者らは更に、結合エピトープをよりよく理解するために、融合前Fタンパク質を
伴うRB1 Fabを共結晶化した。3.4~3.5オングストロームで結晶から回折デ
ータを収集した。RB1抗体は重鎖および軽鎖の両方のCDRループとの相互作用を介し
て融合前Fタンパク質に結合する。軽鎖CDR3ループは、Phe91およびLeu92
のカルボニル酸素とArg429の Guanidino 窒素との間の2つの水素結合の形成を介し
てArg429の側鎖と相互作用する。また、軽鎖上では、CDR2ループ上のAsp5
0およびGlu55は、RSVのAsn426およびLys445と水素結合を形成する
ように位置している。RB1の重鎖のCDR3ループを介して広範囲の相互作用が生じ、
Tyr104およびTyr110はRSV上のIle432とのファンデルワールス相互
作用の表面を形成する。RSVのLys433はCDR3ループのAsn107と水
素結合を形成する。結晶構造から、RB1の軽鎖はまた、RSV融合前三量体のGlu1
61およびSer182または隣接単量体に詰め寄る(pack)。

40

【0246】

RB1に関して特定された結合エピトープは、文献に報告されている946個中944
個のFタンパク質配列の間で高度に保存されている。これは、この領域に対する抗体に対
する耐性(抵抗性)が低いと予想されることを示唆している。

【0247】

実施例4：動物モデルにおけるRSV抗体の抗RSV活性

50

コットンラットチャレンジモデルにおいて防御をもたらすために、R B 1 抗体を D 2 5 およびパリビズマブと比較した。この研究は、2.5 mg / k で与えられ 0.25 mg / k g まで 10 倍系列希釈されたパリビズマブ、D 2 5 および R B 1 抗体を含んでいた。受動免疫療法はこのモデルにおいて、コットンラットに R B 1、D 2 5 またはパリビズマブを第 0 日に種々の濃度で与え、1 日後に 10^5 p f u の R S V で該ラットをチャレンジした。チャレンジ R S V ウイルスの鼻および肺の力価をチャレンジの 4 日後に測定し、ブランクアッセイによりウイルス排出を決定するために用いた。

【0248】

コットンラット：平均体重約 100 グラムの 3 ~ 7 週齢の少なくとも 5 匹のコットンラット (シグモドン・ヒスピドゥス (S i g m o d o n h i s p i d u s)) を S A G E L a b s (B o y e r t o w n , P A) から入手した。通常のげっ歯類用飼料および水を自由に与えた。

【0249】

抗体試薬：凍結乾燥パリビズマブ 100 mg (M y o d e r m , N o r r i s t o w n , P A) を 100 mg / m l で水中に配合 (製剤化) した。その他の抗体は社内で発現され、精製された。

【0250】

抗体試薬の製剤化：製剤化バッファーは各抗体に特異的にタンパク質を安定化させ、沈殿を予防するものであった。製剤化は以下のとおりであった：R B 1 および D 2 5 を 1 x リン酸緩衝食塩水 (p H 7.2) 中で希釈した。パリビズマブを、製造業者の推奨に従い、25 m M ヒスチジンおよび 1.3 m M グリシン (p H 6.0) 中で該タンパク質を有効に緩衝化する蒸留水中に溶解することにより製剤化した。

【0251】

投与溶液の調製、投与および分析：

用いたコホートの平均体重を決定するために、5 匹の動物を無作為に秤量した。製剤は、動物への投与の約 1 時間前に調製した。抗体の凍結ストックを湿潤氷上で 1 回の解凍で解凍した。各抗体を、各群に投与される適切な用量濃度に希釈した。第 0 日 (研究の開始時) に、各群に無作為に割り付けられた動物を 1 ~ 4 % イソフルラン麻酔で軽く鎮静させ、26 G シリンジおよび針で右四頭筋内に 0.1 m l を筋肉内投与した。動物は 2 分以内に鎮静効果から回復した。約 24 時間後 (+ / - 2 時間)、コットンラットを 1 ~ 4 % イソフルランで鎮静させ、眼窩後叢から採血した後、直ちに W i l l i a m s E 培地中の $1 \times 10^5 \cdot 5$ p f u の R S V A 2 または R S V B W a s h i n g t o n 野生型ウイルスを鼻孔経由で投与した。接種の 4 日後、動物を C O ₂ 吸入により犠死させ、肺 (左葉) および鼻甲介を摘出し、湿潤氷上のスクロースリン酸グルタミンバッファー (S P G) を含有するハンクス平衡塩溶液 (L o n z a) (10 倍体積) 中でホモジナイズした。サンプルを 2000 r p m で 10 分間の遠心分離により清澄化し、アリコート化し、急速凍結し、直ちに、ブランクアッセイにおける試験まで - 70 で凍結保存した。

【0252】

図 4 A ~ D および図 5 A ~ D に示されているとおり、R B 1 は、D 2 5 と同様に、そしてパリビズマブ (これは鼻においてウイルス力価に影響を及ぼすことができなかった) より良好に、2.5 m p k の用量で R S V A および R S V B の両方に関してウイルス力価における 2 ~ 3 l o g の減少を肺および鼻において達成することが可能であった。

【0253】

実施例 5 : R B 1 の F c 改変

I g G に対する新生児 F c 受容体 (F c R n) は母体から胎児への受動的体液性免疫の伝達において十分に特徴づけられている。また、一生を通して、F c R n は I g G を分解から保護し、それにより、血清中のこのクラスの抗体の長い半減期が説明される。例えば、I s r a e l ら, 1996, I m m u n o l o g y 89 : 573 - 8 を参照されたい。F c R n は、補体の C 1 q 成分または古典的 F c R の結合部位とは異なる部位において I g G の F c 部分に結合する。F c R n - F c 共結晶構造は、F c R n が I g G 抗体の

10

20

30

40

50

CH₂ - CH₃ ヒンジ領域に結合することを示した。IgG - FcRn 経路の顕著な特徴は絶対 (obligate) pH 依存性である。IgG - FcRn 結合はリソソームにおける酸性 pH (6.0) により駆動され、一方、解離は細胞外環境の中性 pH (7.4) で生じる。リソソームにおける酸性化 (pH 6.0 ~ 6.5) は低マイクロモルのアフィニティでの IgG の Fc 領域への FcRn の結合を可能にし、異化からそれを保護する。ついで該保護 FcRn 結合 IgG は細胞表面へと往復運搬され、細胞外環境中に放出される。この過程は、細胞外分解へのそれらの曝露を低減することにより、抗体を保護する。

【0254】

半減期を改善するために RB1 抗体を Fc 改変に付した。RB1 + YTE は、RB1 の Fc 部分に導入された三重突然変異 (M252Y / S254T / T256E (YTE)) を有する RB1 の誘導体である。この YTE の突然変異の組合せは新生児 Fc 受容体への抗体結合を改善して、ヒトにおけるより長い半減期をもたらす。例えば、Dall'Acqua ら, 2006, J Biol Chem. 281:23514-24 を参照されたい。モタビズマブの Fc 領域内の 3 つのアミノ酸における突然変異 (YTE: M252Y / S254T / T256E) はヒトおよびサル両方に関して pH 6.0 でインビトロ FcRn 結合における 10 倍の増加をもたらして、サルにおいてインビボ血清半減期における 4 倍の増加をもたらした。Robbie ら, 2013, Antimicrob Agents Chemother. 57:6147-53 を参照されたい。

10

【0255】

コドン最適化およびヒト IgG1 変換ならびに CHO 一過性発現および産生のために、RB1 + YTE 抗体重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) に送った。RB1 + YTE のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表 7 に示す。

20

【0256】

合成 DNA を CHO - 3E7 細胞発現のために pTT5 ベクター内にサブクローニングした。各抗体の重鎖および軽鎖をコードする組換えプラスミドを CHO - 3E7 細胞培養物内に一過性にコトランスフェクトした。第 6 日に回収された細胞培養上清をプロテイン A カラムによる精製に使用した。精製 RB1 + YTE ヒト IgG1 を中和アッセイおよび他の特徴づけ実験に使用した。

【0257】

30

実施例 6: RB1 + YTE の特徴づけ

実施例 1 に記載されているとおりに行った ELISA アッセイにおいて、RB1 + YTE は F タンパク質に結合し、EC₅₀ は 1.97 ~ 2.457 ng/ml の範囲であった。図 6 を参照されたい。RB1 + YTE および文献 (Motavizumab, MedImmune, Gaithersburg, MD; 米国特許出願公開番号 US 20110158985) に報告されている基準抗体 (公開配列に基づいて社内で製造された) に関する中和を RSV A Long 株 (ATCC 番号 VR-26 (商標)) および RSV B Washington 株 18537 株 (ATCC 番号 VR-1580 (商標)) において比較した。試験サンプルを、2% 熱不活性化 FBS で補足された EMEM 中、11 個の希釈点にわたって 3 倍系列希釈した。ついで該系列希釈サンプルを、100 pfu/ウェルの RSV A または B 株を含有する 2% 熱不活性化 FBS で補足された等体積の EMEM と混合した。37 °C で 1 時間のインキュベーションの後、1.5 × 10⁵ 細胞/ml の濃度の 100 μl の HEP-2 細胞を、該ウイルス/抗体混合物を含有する 96 ウェルプレートに移した。感染後の第 3 日に、該細胞を PBS で 1 回洗浄し、ついで 80% アセトン中で室温で 10 分間固定した。RSV F (mAb 143 - F3 - B138) と RSV N (34C9) 特異的マウス mAb (mAb 143 - F3 - B138 および 34C9 は、それぞれの抗原でのマウスの免疫化およびハイブリドーマ技術を用いる B 細胞の不死化により誘導された社内抗体である) との混合物を該プレートに加え、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBS / 0.05% Tween 20 で洗浄し、ビオチン化ウマ抗マウス IgG をプレートに加え、室温で 1 時間インキュベートした。プレ

40

50

ートをPBS/0.05% Tweenで洗浄した。赤外色素 - ストレプトアビジンを、RSV特異的シグナルを検出するために使用し、アッセイ標準化のための2つの細胞染色剤を96ウェルプレートに加え、暗所で1時間インキュベートした。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、暗所で20分間風乾させ、細胞標準化のためには700チャンネルレーザーを使用し、RSV特異的シグナルの検出のためには800チャンネルレーザーを使用して、Licor Aeri us (登録商標) 自動イメージングシステムで読取った。800/700比および中和率(%)を計算し、IC50値をGraphPadにおける4パラメーター曲線フィットにより決定した。

【0258】

RB-1+YTEはRSV-AおよびRSV-B株を同等効力(5~10ng/ml IC50)で中和することが可能であった。表6を参照されたい。

【表8】

表6: RSV 融合前Fおよび融合後Fに対するRB1+YTEのアフィニティおよび中和の測定

Mab	IC ₅₀ インビトロ 中和 (ng/ml)		速度定数 (融合前 F)			速度定数 (融合後 F)		
	RSV A	RSV B	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
	RB-1	3	1.7	4.4x10 ⁶	1.4x10 ⁻⁴	0.031	2.2x10 ⁶	9x10 ⁻⁴
RB-1 + YTE	3.6	3.49	3.2x10 ⁶	2.3x10 ⁻⁴	0.071	1.4x10 ⁶	7x10 ⁻⁴	0.48

【0259】

RB1のFc部分におけるYTE突然変異の導入は、RSV AおよびB株を中和する該抗体のインビトロ効力を変化させなかった。RSV Aのインビトロ中和効力は、RB1およびRB1+YTEに関して、それぞれ、3および3.6ng/mlであった。RSV Bのインビトロ中和効力は、RB1およびRB1+YTEに関して、それぞれ、1.7および3.49ng/mlであった。Biocoreにより測定された速度定数はRB1およびRB1+YTEに関して類似していたが、このことは、抗体のFc領域におけるYTEの導入がその抗原結合特性を変化させなかったことを示唆している。

【0260】

非GLP (Good Laboratory Practice) 薬物動態研究がNew Iberia Research Center (UL Lafayette, LA) において実施された。生物製剤未処置の8頭の雄アカゲザルを無作為化し、2つの研究群の1つに割り付けた (n=4/群)。各動物はRB1+YTEまたはモタビズマブ-YTE (10mg/kg) の単一静脈内 (i.v.) 用量の投与を受けた。第0日、投与後の0.5、1、3、8および24時間の時点、ならびに投与後の第1、2、3、5、7および10日に、血液サンプルを採取した。アカゲザル血清中のRB1+YTE (ヒトx [RSV] mAb (RB1-YTE) IgG1/カッパ (CE)) およびモタビズマブ-YTE (ヒト化x [RSV] mAb IgG1/カッパ) の両方を定量するために、ECL系イムノアッセイを用いた。

【0261】

該アッセイは捕捉試薬としてのビオチン化マウス抗ヒトIgGカッパ鎖 (BD Biosciences, San Jose, CA) および検出試薬としてのスルホTAGマウス抗ヒトIgG Fc (Southern Biotech Birmingham, AL) を使用した。該アッセイの定量下限 (LLOQ) は、最小必須希釈度 (MRD) が20の場合、1.37ng/mlであると決定された。

【0262】

RB1+YTEおよびモタビズマブ-YTEを定量するために、同じイムノアッセイを用いて、10mg/kgで静脈内投与されたアカゲザルにおいて、RB1+YTEおよびモタビズマブ-YTEの薬物動態を最大10日間評価した。各動物に関して、Phoen

10

20

30

40

50

ix Winnonlin 6.3 (Cartara, NJ) を使用して、非コンパートメントモデルを各動物の血清濃度データにフィットさせて、曲線下面積 (AUC_{0~10}日) を推定した。AUC_{0~10}日を各処理群に関して4頭の動物にわたって平均し、平均±標準偏差として表した。RB1+YTEに関しては、AUC_{0~10}日 = 1159 ± 116 μg/mL * 日であり、モタビズマブ-YTEに関しては、AUC_{0~10}日 = 1381 ± 63.0 μg/mL * 日である。

【0263】

RB1+YTE (図の凡例においてはRB1-YTEとして示されている) およびモタビズマブ-YTEは、アカゲザルにおいて、類似した血清濃度プロファイルおよび薬物動態を示した。図7を参照されたい。NHPにおけるRB1+YTE PKは、文献で報告されているカニクイザルにおけるモタビズマブ-YTE PKと同等であることも判明した。Dall'Acquaら, 2006, J Biol Chem, 281: 23514-24を参照されたい。

10

【0264】

本明細書中に引用されている全ての参考文献を、各個の刊行物、データベースエントリー (例えば、GenBank配列またはGeneIDエントリー)、特許出願または特許が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。参照により組み入れるというこの陳述は、そのような引用が、参照により組み入れるという宣誓陳述の直前直後にない場合であっても、37 C.F.R. § 1.57 (b) (1) に従い、各個の刊行物、データベースエントリー (例えば、Genbank配列またはGeneIDエントリー)、特許出願または特許 [それらのそれぞれは37 C.F.R. § 1.57 (b) (2) に従い明らかに特定されるものである] に関連づけることを出願人が意図しているものである。参照により組み入れるという宣誓陳述が明細書中に含まれている場合、それは、参照により組み入れるというこの一般的 (general) 陳述を何ら弱めるものではない。本明細書における参考文献の引用は、該参考文献が関連先行技術であると自認するものではなく、また、それは、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して何ら自認するものでもない。

20

【0265】

本発明は、本明細書に記載されている特定の実施形態により範囲において限定されるものではない。実際、本明細書に記載されているものに加えて、本発明の種々の修飾が前記説明および添付図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような修飾は添付の特許請求の範囲の範囲に含まれると意図される。

30

【表 9】

表 7: 配列情報

配列番号	説明	配列
1	RB1 H - CDR1	DSAMS
2	RB1 H - CDR2	FIKSKTYGGTKEYAASVKG
3	RB1 H - CDR3	GAPYGGNSDYGLDV
4	RB1 L - CDR1	RTSQDVRGALA
5	RB1 L - CDR2	DASSLET
6	RB1 L - CDR3	QQFLDFPFT
7	RB1 VH	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSAMSWVRQ APGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSK NIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGA PYGGNSDYGLDVWGQGTTVTVSS
8	RB1 VL (患者 単離体)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSQDVRGALAWYQQK PGKAPKLLIFDASSLETGVP SRFSGSGSTVFTLTISLQPEDFAAYYCQQFLDFPFTFGQTRLEIKRT
9	RB1 VH (患者 単離体)	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSAMSWVRQ APGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSK NIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGA PYGGNSDYGLDVWGQGTTVTVSS
10	リーダー配列	MGWSCIIILFLVATATGVHS
11	RB1 VH + リーダー	MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVLRPGRSLRL SCTVSGFSFDDSAMSWVRQAPGKGLEWISFIKSKTYGGT KEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYC TRGAPYGGNSDYGLDVWGQGTTVTVSS
12	RB1 VL + リーダー	MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGRVT ITCRTSQDVRGALAWYQQKPGKAPKLLIFDASSLETGVP SRFSGSGSTVFTLTISLQPEDFAAYYCQQFLDFPFTFG QGTTRLEIKRT
13	重鎖定常ドメイン- IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH E DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	カップ軽鎖定常ドメイン	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【 0 2 6 6 】

15	RB1 VH をコードする 核酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACG GCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGCACAGTTTCTG GATTCAGCTTTGACGACTCTGCTATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATAAGTTTCAT TAAAAGTAAAACCTTATGGTGGGACAAAAGAATACGCCG CGTCTGTGAAAGGCAGGTTCCACATCTCAAGAGATGAT TCCAAAACATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAA AACCGAGGACACAGCCGTGTATTATTGTACTAGAGGGG CGCCTTACGGCGGTAACCTCCGATTACTACTACGGTTTG GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTC A	
16	RB1 VL をコードする 核酸	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGACAA GTCAGGACGTTAGAGGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCAGGGAAGCTCCTAAACTCCTGATCTTTGATGC CTCCAGTTTGGAGACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACAGTTTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGCTTATTACTGTCA GCAGTTTCTTGATTTCCCTTTCACCTTCGGCCAGGGGA CACGACTGGAAATCAAACGTACG	10
17	RB1 VH をコードする 核酸 (コドン最適化)	GAGGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGGGGGGGGCTGGTGCG GCCTGGCAGGTCTCTGAGACTGAGCTGCACCGTGAGCG GCTTCTCCTTTGACGATTCGCCATGAGCTGGGTGCGG CAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATCTCCTTCAT CAAGTCTAAGACCTACGGCGGCACAAAGGAGTACGCCG CTTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCAGCAGGGACGAT TCCAAGAACATCGCCTATCTGCAGATGAACAGCCTGAA GACCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCACAAGAGGAG CTCCTTACGGAGGCAACAGCGACTACTATTACGGACTG GACGTGTGGGGACAGGGAACCACAGTGACCGTGAGCTC C	20
18	RB1 VL をコードする 核酸 (コドン最適化)	GACATTCAGATGACTCAGTCCCCTTCAAGTCTGAGCGCC TCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCCGGACCAGC CAGGATGTGCGGGGCGCCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAG CCAGGCAAGCCCCCAAGCTGCTGATCTTTGACGCTAGC TCCCTGGAGACCGGCGTGCCCTCCAGGTTTCTGGCAGC GGCTCCGGCACAGTGTTACCCTGACAATCTCTAGCCTG CAGCCTGAGGACTTTGCCGCTTACTATTGCCAGCAGTTC CTGGATTTCCCCTTACCTTCGGCCAAGGCACACGGCTG GAGATCAAGAGGACC	
19	リーダー配列重鎖をコ ードする核酸	ATGGGTTGGTCCTGTATTATCCTGTTCCCTGGTCGCCAC TGCTACTGGGGTCCACTCA	30
20	リーダー配列軽鎖をコ ードする核酸	ATGGGCTGGTCCTGTATTATCCTGTTCCCTGGTGGCAAC CGCAACTGGTGTGCATAGC	

【 0 2 6 7 】

21	重鎖定常ドメイン -IgG1 をコードする 核酸	GCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCACTGGCTCC CTCTTCCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGG GATGTCTGGTGAAGGATTAATCCCAGAGCCCGTGACC GTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCA CACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGCCTGTATT CCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTCCCTG GGCACCCAGACATACATCTGTAACGTGAATCACAAGCC AAGCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTCGAGCCCAAGT CCTGTGATAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCTCTGCT CCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTTCC ACCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTAGGACCC CCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAG GATCCTGAGGTGAAGTTTAACTGGTACGTGATGGCGT GGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGC AGTATAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACA GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAG CCACAGGTGTATACACTGCCTCCATCCAGAGACGAGCT GACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGG GCTTCTACCCTTCTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGCCAGCCAGAGAACAATTATAAGACCACACCCCC TGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTGAGCTGTTCTGTGATGCACGAAGCCCTGCACAA TACTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTACCTGGTA AA
22	カッパ軽鎖定常ドメイ ンをコードする核酸	GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCCCCTTCTGA CGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCTAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACAATTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGATAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGCCA GGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCTAAGGATAGCACAT ATTCCTGTCTCTACCCTGACACTGTCTAAGGCCGAT TACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCA CCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGTCATTCAATC GGGGCGAGTGC
23	RB1+YTE 重鎖	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSAMSWVR QAPGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDD SKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGAPYGGNSDYYYGL DVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK SCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLYITRE PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

10

20

30

【 0 2 6 8 】

【 図 1 A 】

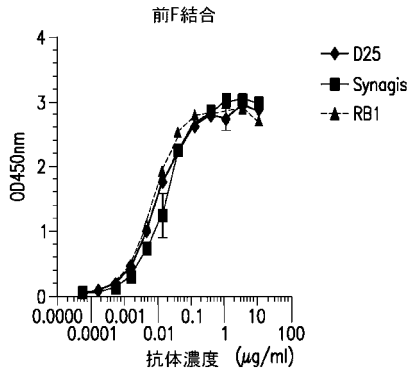


FIG.1A

【 図 1 B 】

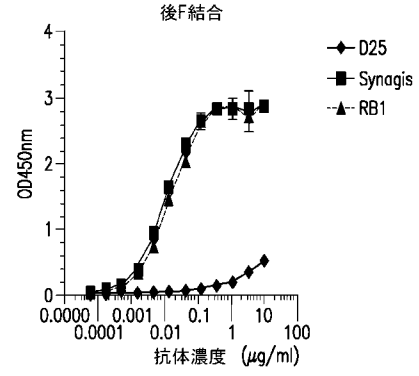


FIG.1B

【 図 2 A 】

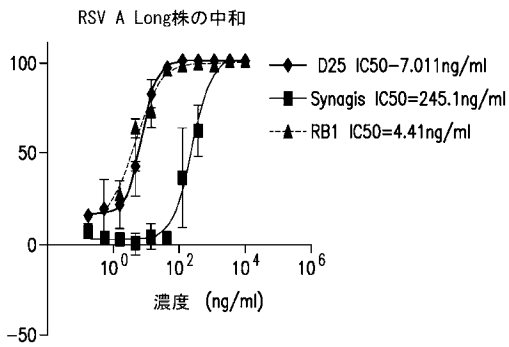


FIG.2A

【 図 2 B 】

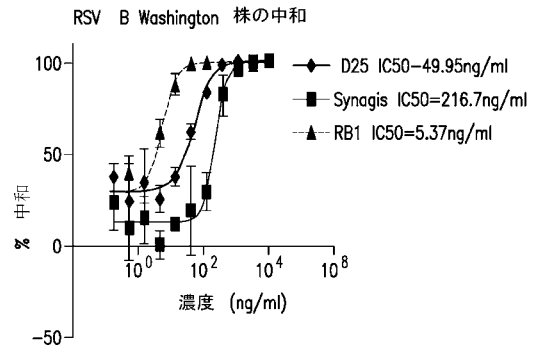
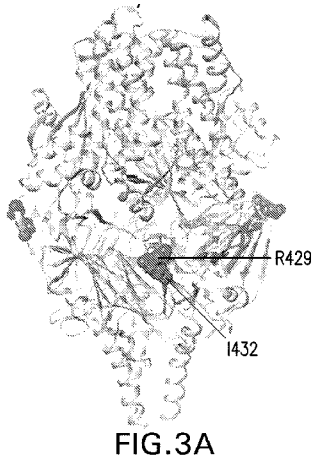
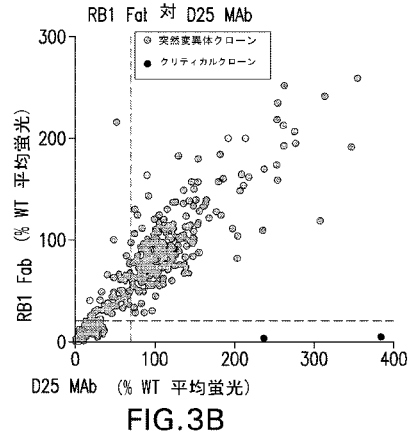


FIG.2B

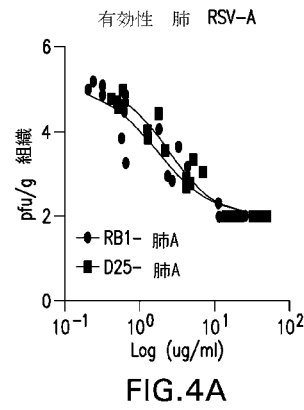
【 図 3 A 】



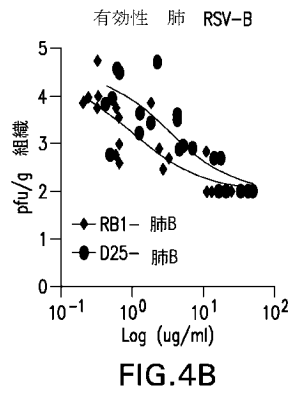
【 図 3 B 】



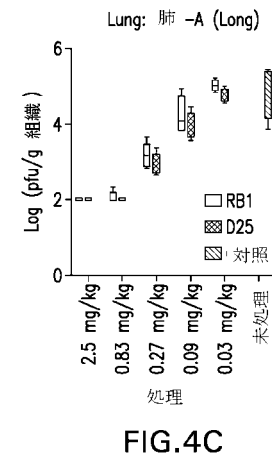
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 4 C 】



【 図 4 D 】

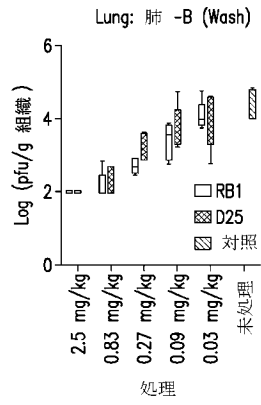


FIG.4D

【 図 5 A 】

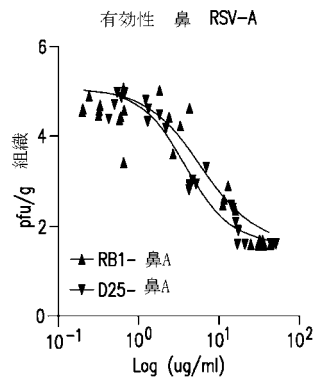


FIG.5A

【 図 5 B 】

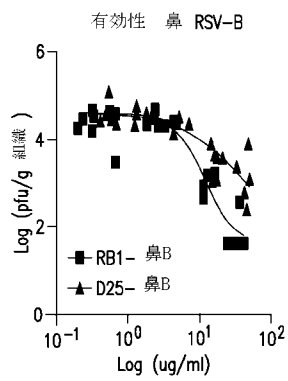


FIG.5B

【 図 5 C 】

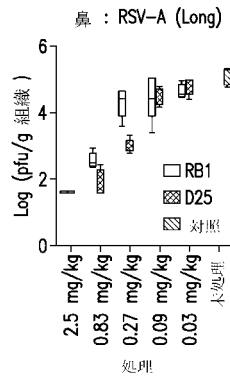


FIG.5C

【 図 5 D 】

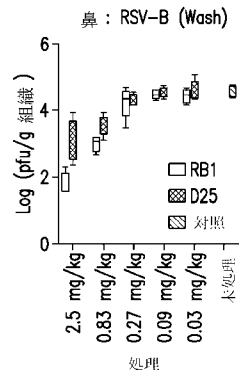


FIG.5D

【 図 6 】

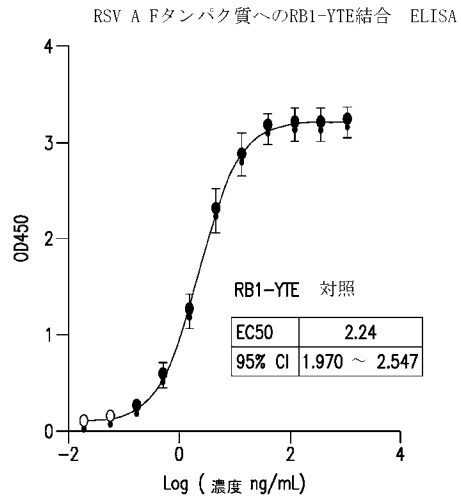


FIG.6

【 図 7 】

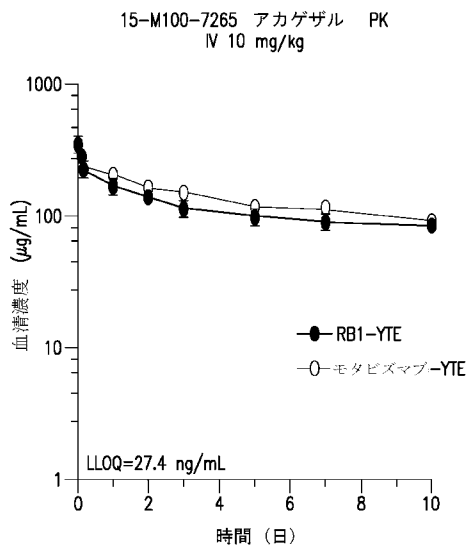


FIG.7

【配列表】

2019503648000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月25日(2018.6.25)

【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】

配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2、および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を含む、ヒトRSV Fタンパク質に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

1) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント、

2) 配列番号7に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を含む重鎖可変領域および/または配列番号8に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント、および

3) 配列番号7に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を含む重鎖可変領域および/または配列番号8に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を含む軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体のフレームワーク領域内にいずれかの配列変異が存在するもの

からなる群から選択される、軽鎖免疫グロブリン、重鎖免疫グロブリンまたは軽鎖および重鎖の両方の免疫グロブリンを含む、請求項1に記載のヒトRSV Fタンパク質に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項3】

該抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表面プラズモン共鳴(例えば、BIAcore)または類似技術(例えば、KinExaまたはOctet)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKD値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する、請求項1または2に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項4】

配列番号7の重鎖可変領域および配列番号8の軽鎖可変領域を含む抗体と同じヒトRSV Fタンパク質のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表面プラズモン共鳴(例えば、BIAcore)または類似技術(例えば、KinExaまたはOctet)により測定された場合に約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-12} MのKD値でヒトRSV融合前Fタンパク質に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項5】

該抗体が、以下の相互作用、すなわち、

1) 軽鎖CDR3ループが、残基Phe91およびLeu92を介して、ヒトRSV Fタンパク質のArg429の側鎖と相互作用し、該相互作用は、CDR3ループ内のPhe91およびLeu92のカルボニル酸素とヒトRSV Fタンパク質のArg429のグアニジン窒素との間の2つの水素結合の形成によるものである；

2) 軽鎖 CDR2 ループが、残基 Asp50 および Glu55 を介して、ヒト RSV F タンパク質の Asn426 および Lys445 と水素結合を形成する；

3) 重鎖 CDR3 ループが、残基 Tyr104 および Tyr110 を介して、ヒト RSV F タンパク質上の Ile432 とのファンデルワールス相互作用のための表面を形成する；

4) 重鎖 CDR3 ループが、Asn107 を介して、ヒト RSV F タンパク質の Lys433 と水素結合を形成する；ならびに

5) 軽鎖が RSV 融合前三量体の隣接単量体の Glu161 および Ser182 に詰め寄る

の1以上を介してヒト RSV F タンパク質に結合する、請求項4記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項6】

該抗体が、以下の相互作用、すなわち、

1) 軽鎖 CDR3 ループが、残基 Phe91 および Leu92 を介して、ヒト RSV F タンパク質の Arg429 の側鎖と相互作用し、該相互作用は、CDR3 ループ内の Phe91 および Leu92 のカルボニル酸素とヒト RSV F タンパク質の Arg429 のグアニジノ窒素との間の2つの水素結合の形成によるものである；

2) 軽鎖 CDR2 ループが、残基 Asp50 および Glu55 を介して、ヒト RSV F タンパク質の Asn426 および Lys445 と水素結合を形成する；

3) 重鎖 CDR3 ループが、残基 Tyr104 および Tyr110 を介して、ヒト RSV F タンパク質上の Ile432 とのファンデルワールス相互作用のための表面を形成する；

4) 重鎖 CDR3 ループが、Asn107 を介して、ヒト RSV F タンパク質の Lys433 と水素結合を形成する；ならびに

5) 軽鎖が RSV 融合前三量体の隣接単量体の Glu161 および Ser182 に詰め寄る

の全てを介してヒト RSV F タンパク質に結合する、請求項5記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項7】

該抗体が、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項8】

各軽鎖が、配列番号8を含む可変領域およびヒトカップ軽鎖（配列番号14）を含み、各重鎖が、配列番号7を含む可変領域およびヒト IgG1 定常領域（配列番号13）を含む、2本の軽鎖と2本の重鎖とを有する完全長抗体である請求項7記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項9】

該抗体が、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む、請求項7記載の単離された抗体。

【請求項10】

重鎖のアミノ酸配列が配列番号23のアミノ酸配列からなり、軽鎖のアミノ酸配列が配列番号25のアミノ酸配列からなる、請求項8記載の単離された抗体。

【請求項11】

IgG抗体である、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項12】

CHO細胞において産生される抗体である、前記請求項のいずれか1項記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項13】

配列番号 7 または 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 23 または 25 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 13 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 記載のポリペプチドのいずれか 1 つをコードする単離された核酸。

【請求項 16】

請求項 15 または 16 記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の抗体、抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

ピチア (Pichia) 細胞またはチャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項 17 記載の宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと医薬上許容される担体または希釈剤とを含む組成物。

【請求項 20】

インフルエンザ、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ヒトパラインフルエンザ (hPIV)、ヒトライノウイルス (hRV)、マイコプラズマ・ニューモニア (mycoplasma pneumoniae)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (streptococcus pneumoniae)、アデノウイルス、ポカウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスまたは BK ウイルスから選択される呼吸器病原体に対する抗体またはその抗原結合性フラグメントを更に含む、請求項 19 記載の組成物。

【請求項 21】

呼吸器病原体がインフルエンザ、hCMV、hMPV、hPIV、ノロウイルスまたは BK ウイルスである、請求項 20 記載の組成物。

【請求項 22】

1) 請求項 1 ~ 12 記載の抗体または抗原結合性フラグメントのいずれか 1 つの重鎖および / または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、該ポリヌクレオチドの発現に好ましい条件下で培養し、

2) 所望により、該抗体または抗原結合性フラグメントを該宿主細胞および / または培地から回収することを含む、抗体または抗原結合性フラグメントの製造方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントと、RSV F タンパク質および RSV G タンパク質ならびにそれらの断片から選択される抗原とを含む免疫原性組成物。

【請求項 24】

サンプルを請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体またはフラグメントと接触させ、該抗体またはフラグメントとペプチドとの複合体の存在を検出することを含む、サンプルにおけるヒト RSV 融合前 F タンパク質またはその断片の存在を検出するための方法であって、該複合体の検出が RSV 融合前 F タンパク質の存在を示す、方法。

【請求項 25】

1) 感染または感染症を予防または治療するための、あるいは

2) 感染性合併症による呼吸器疾患および移植疾患を予防または治療するための医薬の製造における使用のための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 26】

R S V 感染の予防または治療のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項記載の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項記載の組成物の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/058975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/10 A61P31/14 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/050280 A2 (CENTOCOR INC [US]; DELVECCHIO ALFRED [US]; TSUI PING [US]; BRANIGAN PA) 11 May 2006 (2006-05-11) the whole document, in particular tables 1, 2 and examples 10-12 -----	1-28
X	WO 97/11177 A1 (INTRACEL CORP [US]; PILKINGTON GLENN R [US]; GILMOUR PAGE S [US]) 27 March 1997 (1997-03-27) page 5, line 20 - line 29 page 10, line 24 - page 11, line 23 page 21, line 22 - page 22, line 8 page 29, line 15 - page 30, line 4 claims 1-18; examples 2,3; tables 2-5 ----- -/--	1-28
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 February 2017		Date of mailing of the international search report 28/02/2017
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 Bayer, Annette

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/058975

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MCKAY BROWN ET AL: "Tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2: A means of minimizing B cell wastage from somatic hypermutation?", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3285-3291, XP002649029, ISSN: 0022-1767 the whole document, in particular abstract -----</p>	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/058975

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006050280 A2	11-05-2006	AR 051942 A1	21-02-2007
		AU 2005302301 A1	11-05-2006
		CA 2585817 A1	11-05-2006
		EP 1809319 A2	25-07-2007
		JP 2008518602 A	05-06-2008
		TW 200636064 A	16-10-2006
		US 2006159695 A1	20-07-2006
		US 2011027294 A1	03-02-2011
		WO 2006050280 A2	11-05-2006

WO 9711177 A1	27-03-1997	AT 194291 T	15-07-2000
		AU 7075496 A	09-04-1997
		AU 7240096 A	09-04-1997
		CA 2230116 A1	27-03-1997
		CA 2230127 A1	27-03-1997
		DE 69609188 D1	10-08-2000
		DE 69609188 T2	21-12-2000
		DK 0853487 T3	23-10-2000
		EP 0851924 A1	08-07-1998
		EP 0853487 A1	22-07-1998
		ES 2148799 T3	16-10-2000
		GR 3034349 T3	29-12-2000
		PT 853487 E	30-11-2000
		US 2004005324 A1	08-01-2004
		US 2009110684 A1	30-04-2009
		US 2012087909 A1	12-04-2012
		WO 9710846 A1	27-03-1997
WO 9711177 A1	27-03-1997		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	16/10	(2006.01)	C 0 7 K	16/10
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/22
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 S
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267

- 弁理士 森山 正浩
 (74)代理人 100146318
 弁理士 岩瀬 吉和
 (74)代理人 100127812
 弁理士 城山 康文
 (72)発明者 ヴォーラ, カルピット・エー
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 コックス, カーラ・エス
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 タン, エイミン
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 チェン, チーフエン
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 ディステファーノ, ダニエル
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 チャン, ラン
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0
 (72)発明者 スー, ホア - ポー
 アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウエスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・
 7 7 0

F ターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA77X AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA45
 4C085 AA14 BB36 CC05 CC07 CC31 DD23 DD62 EE01 EE03 GG01
 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA15 CA40 DA75 DA76 EA20
 FA72 FA74

专利名称(译)	抗体中和人呼吸道合胞病毒		
公开(公告)号	JP2019503648A	公开(公告)日	2019-02-14
申请号	JP2018521052	申请日	2016-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	默沙东CORP.		
申请(专利权)人(译)	默克公司和夏普公司巨蛋		
[标]发明人	ヴォーラカルピットエー コックスカーラエス タンエイミン チェンチーフエン ディステファーノダニエル チャンラン スーホアポー		
发明人	ヴォーラ,カルピット・エー コックス,カーラ・エス タン,エイミン チェン,チーフエン ディステファーノ,ダニエル チャン,ラン スー,ホア・ポー		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/81 C12N15/85 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/10 A61P31/00 A61P11/00 A61P37/06 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/22 A61P31/20 A61K39/395 A61P43/00 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/54 A61K2039/545 A61P11/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P31/22 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/1027 C07K2317/34 C07K2317/524 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 A61K39/42 C07K2317/21 C07K2317/41 C07K2317/565 C07K2317/732 C07K2317/14		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/81.Z C12N15/85.Z C12N1/19 C12N5/10 C07K16/10 A61P31/00 A61P11/00 A61P37/06 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/22 A61P31/20 A61K39/395.S A61P43/00.121 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA77X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA45 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤 健二 市川 英彦 青木 孝弘 五味 渊拓哉 近藤 俊 饭野 洋一 市川 雄介 森山 正博		
优先权	62/247841 2015-10-29 US		

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及具有高抗RSV中和效价的单克隆抗体。本发明进一步提供了编码本发明抗体的分离的核酸和用其转化的宿主细胞。本发明进一步提供了使用本发明的抗体和核酸，特别是作为婴儿和老年人中的被动免疫治疗剂的诊断，预防和治疗方法。

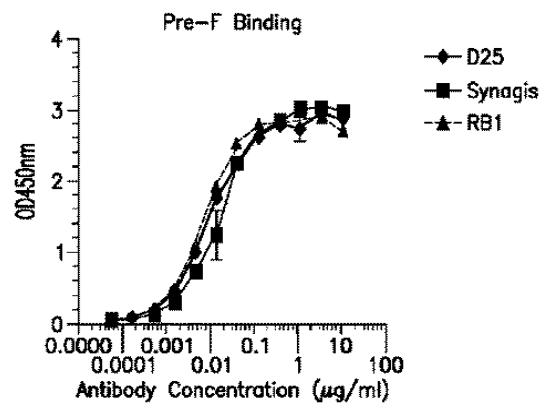


FIG. 1A