

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5744196号
(P5744196)

(45) 発行日 平成27年7月8日 (2015.7.8)

(24) 登録日 平成27年5月15日 (2015.5.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/08 (2006.01)

C O 7 K 16/08

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

請求項の数 9 (全 198 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-518872 (P2013-518872)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月8日 (2011.7.8)
 (65) 公表番号 特表2013-539357 (P2013-539357A)
 (43) 公表日 平成25年10月24日 (2013.10.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/043463
 (87) 国際公開番号 W02012/006596
 (87) 国際公開日 平成24年1月12日 (2012.1.12)
 審査請求日 平成25年5月16日 (2013.5.16)
 (31) 優先権主張番号 61/456,454
 (32) 優先日 平成22年11月5日 (2010.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/399,310
 (32) 優先日 平成22年7月9日 (2010.7.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 301055549
 クルセル ホランド ベー ヴェー
 オランダ国 2333 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸
 (74) 代理人 100174001
 弁理士 結城 仁美
 (72) 発明者 ロバート アンソニー ウィリアムソン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 037 ラ ホーヤ チェルシー ストリ
 ート 5329

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒト呼吸器多核体ウイルス (RSV) 抗体および使用の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

RSV (呼吸器多核体ウイルス) は抗体またはその抗原結合断片の存在下にウイルス複製の10またはそれよりも多くのラウンドの後に抗体またはその抗原結合断片による中和を回避するウイルスを生産せず、および抗体またはその抗原結合断片には、配列番号405もしくは437で表されるアミノ酸残基の配列を含むVH CDR1、配列番号406で表されるアミノ酸残基の配列を含むVH CDR2、および配列番号407で表されるアミノ酸残基の配列を含むVH CDR3が含まれる可変重鎖、および配列番号408で表されるアミノ酸の配列を含むVL CDR1、配列番号409で表されるアミノ酸の配列を含むVL CDR2、および配列番号410で表されるアミノ酸の配列を含むVL CDR3が含まれる可変軽鎖が含まれ、および抗体またはその抗原結合断片は、呼吸器多核体ウイルス (RSV) 融合 (F) タンパク質と免疫特異的に結合し、および/またはRSVを中和する、抗RSV抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号396のアミノ酸1~121で表されるVHドメイン、および

VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号395のアミノ酸1~110で表されるVLドメインが含まれる、請求項1に記載の抗RSV抗体または抗原結合断片。

【請求項 3】

抗体または抗原結合断片は、インビトロプラーク減少アッセイにおけるRSVの中和に

ついて、 2 nM 未満の EC_{50} 、または分離された RSV F タンパク質に対して、もしくは RSV ウイルスに対して少なくとも 10^8 M^{-1} の親和性を有する、請求項1または2に記載の抗 RSV 抗体または抗原結合断片。

【請求項4】

請求項1または2に記載の抗体もしくは抗原結合断片または多量体化ドメインとコンジュゲートしたその抗原結合断片を含む第一抗原結合部分、および、

第二の多量体化ドメインとコンジュゲートした抗ウイルス抗体の抗原結合断片を含む第二抗原結合部分を含み、

第一の多量体化ドメインおよび第二の多量体化ドメインは補完的または同じであり、それによって第一抗原結合部分および第二抗原結合部分が多価抗体を形成する、多価抗体。

10

【請求項5】

請求項1または2に記載の抗体または抗原結合断片、請求項4に記載の多価抗体、および製薬上許容可能な担体または賦形剤を含む、製薬上組成物。

【請求項6】

RSV 感染の1以上の症状の処置もしくは抑制のため、または RSV 感染の防止のための、請求項1または2に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項7】

RSV 感染の1以上の症状の処置もしくは抑制のため、または RSV 感染の防止のための、薬の調剤用の請求項1または2に記載の抗体または抗原結合断片の使用。

20

【請求項8】

(a) 請求項1または2に記載の抗体または抗原結合断片を用いて、流体、細胞、または組織のサンプル中の RSV 抗原のレベルをアッセイすることと、

(b) アッセイされた RSV 抗原のレベルを対照レベルと比較し、それによって、 RSV 抗原の対照レベルと比較した、アッセイされた RSV 抗原のレベルの増大が、 RSV 感染を示すこととを含む、 RSV 感染を検出する方法。

【請求項9】

請求項1または2に記載の抗体または抗原結合断片をコードする分離された核酸。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

2010年7月9日に出願された「ANTIBODIES AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(RSV)AND METHODS OF USE〔ヒト呼吸器多核体ウイルス(RSV)に対する抗体および使用の方法〕」と題された、Robert Anthony Williamson (ロバート・アンソニー・ウィリアムソン)、Jehangir Wadia (ジェハンジラ・ワディア)、Gabriel Pascual (ガブリエル・パスクアル)、Elissa Keogh (エリッサ・キーオー)への米国仮特許出願第61/399,310号および2010年11月5日に提出された「ANTI-HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(RSV)AND METHODS OF USE〔抗ヒト呼吸器多核体ウイルス(RSV)抗体および使用の方法〕」と題された、Robert Anthony Williamson、Jehangir Wadia、Gabriel PascualおよびElissa Keoghへの米国仮特許出願第61/456,454号に優先権の利益を主張する。上記で参照された出願の各々の主題は、その全文が参照により組み込まれる。

40

【0002】

この出願は、2010年8月13日に提出された米国特許出願第12/806,498号で、US-2011-0076268 A1として公開された、「ANTIBODIES AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(RSV)AND METHODS OF USE」と題されたもの、および2010年8月13日に提出された国際出願第PCT/US10/045549号で、

50

国際PCT出願の第WO 2 0 1 1 / 0 2 0 0 7 9号として公開され、「ANTIBODIES AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(RSV)AND METHODS OF USE」と題されたものに関連し、そのどちらも、2009年8月13日に出願された「ANTIBODIES AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(RSV)AND METHODS OF USE」と題された米国仮特許出願第61/274,395号に優先権を主張する。

【0003】

上記で参照された出願の各々の主題は、その全文が参照により組み込まれる。

【0004】

電子形式で提供される配列表の参照による組み込み

配列表の電子版が本明細書とともに出願され、その内容は、その全文において参照により組み込まれる。電子ファイルは458キロバイトの大きさであり、1161seq.PC1.txtの題名がついている。

【0005】

本発明の分野

呼吸器多核体（呼吸器合胞体）ウイルス（RSV）のFタンパク質および／もしくはRSVと免疫特異的に結合し、かつ／またはRSVを中和する抗体およびその抗原結合断片（抗原結合フラグメント）が提供される。また、抗RSV抗体およびその抗原結合断片を使用する診断法および治療法が提供される。治療法は、RSV感染の予防もしくは治療ならびに／またはRSV感染、例えば、乳児における感染および臓器移植と関連している感染の1種もしくは複数の症状の寛解のために、提供された抗RSV抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む。本明細書において提供される複数の異なる抗RSV抗体およびその抗原結合断片ならびに／またはその他の抗RSV抗体およびその抗原結合断片との組合せを、併用療法のために使用してもよい。抗RSV抗体およびその抗原結合断片の混合物を含有する組成物も提供される。

【背景技術】

【0006】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、乳児および幼児における重篤な呼吸器疾患の1番の原因であり、小児細気管支炎の主な原因である [Welliver (2003) J Pediatr 143:S112]。世界中で、推定6千4百万の呼吸器疾患の症例および160,000人の死亡が、RSV誘発性疾患に起因する。米国単独で、何万件もの乳児の入院が、RSVおよびパラインフルエンザウイルス（PIV）などのパラミクソウイルスによる感染によるものである [Shay et al. (1999) JAMA 282:1440-1446]。重篤なRSV感染は、ほとんどの場合、幼児および乳児において、特に、未熟児において生じる。慢性肺疾患または先天性心疾患などの根底にある健康問題は、深刻な病気のリスクを大幅に増大し得る。RSV感染はまた、高齢者、慢性肺疾患を有する個人および骨髄移植レシピエントなどの免疫無防備状態の成人において深刻な病気を引き起こし得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ワクチン開発、抗ウイルス化合物（リバビリン）、アンチセンス薬物、RNA干渉技術ならびに免疫グロブリンまたは静脈内モノクローナル抗体などの抗体製品をはじめ、RSV感染を予防および治療するためのいくつかのアプローチが研究されてきた。ドナーから単離された静脈内免疫グロブリン [RSV-IGIV; RespiGam（登録商標）] およびモノクローナル抗体、パリビズマブ（SYNAGIS（登録商標））が、ハイリスクの幼児におけるRSV予防のために承認されている。しかし、RSVのためのワクチンまたは市販の治療は、まだ、利用可能ではない。唯一リバビリンが、RSV感染の治療のために承認されている。低い特異性のために、RSV感染の治療にとって有効であるには、RSV-IGおよびパリビズマブなどの抗体製品の高用量の頻繁な投与および／または容量が必要である。さらに、静脈内免疫グロブリンなどの製品の使用は、ドナーを利用できることに依存している。したがって、RSV感染の予防または治療のためのさらなる薬剤の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

概要

呼吸器多核体ウイルス（RSV）感染およびRSV媒介性疾患または状態の予防および治療のための単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。また、RSV感染を診断および／またはモニタリングするための単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片も本明細書において提供される。RSVと免疫特異的に結合し、それを中和する、単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。いくつかの例では、本明細書において提供されるポリペプチドは、本明細書において提供されるポリペプチドが抗体またはその抗原結合断片中に含有される場合に、RSVと免疫特異的に結合し、それを中和する。また、RSVと免疫特異的に結合し、それを中和する、本明細書において提供されるポリペプチドを含有する抗体および抗原結合断片も本明細書において提供される。本明細書において提供されるポリペプチド、抗体および抗原結合断片は、Fタンパク質と特異的に結合し、さらにはRSVを中和し得る。RSVサブタイプAおよびBを中和し得る単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。RSVのFタンパク質と免疫特異的に結合する単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。いくつかの例では、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1～16および1627～1628のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有し、ここで、単離されたポリペプチドは、RSV融合（F）タンパク質と免疫特異的に結合する。

【0009】

配列番号405、411、417、423、429、437-441、458、464、470または482-484に示されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号405、411、417、423、429、437-441、458、464、470または482-484に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれよりも高い（99%以上の）配列同一性を有するアミノ酸の配列をもつV_H CDR1；

配列番号406、412、418、424、430、459、465または471に示されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号406、412、418、424、430、459、465または471に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するアミノ酸の配列をもつV_H CDR2；

配列番号407、413、419、425、431、460、466または472に示されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号407、413、419、425、431、460、466または472に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をもつV_H CDR3；

配列番号408、414、420、426、432、461、467または473に示されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号408、414、420、426、432、461、467または473に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するアミノ酸の配列をもつV_L CDR1；

配列番号409、415、421、427、433、462、468または474に示されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号409、415、421、427、433、462、468または474に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するアミノ酸の配列をもつV_L CDR2；および

配列番号410、416、422、428、434、463、469または475に示

されるアミノ酸残基の配列または少なくとも配列番号410、416、422、428、434、463、469または475に対する配列同一性またはそれらに対して少なくとも約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するアミノ酸の配列をもつV_L CDR3を含む、抗体またはその抗原結合断片がここでは提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、呼吸器多核体（呼吸器合胞体）ウイルス（RSV）融合（F）タンパク質と免疫特異的に結合し、かつ／またはRSVを中和する。

【0010】

特に、ここでは、配列番号405または437に示されるVHCDR1、配列番号406に示されるVHCDR2、配列番号407に示されるVHCDR3、配列番号408に示されるVLCDR1、配列番号409に示されるVLCDR2、および配列番号410に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号405－410または437のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

10

【0011】

また、ここでは、配列番号464または483に示されるVHCDR1、配列番号465に示されるVHCDR2、配列番号466に示されるVHCDR3、配列番号467に示されるVLCDR1、配列番号468に示されるVLCDR2、および配列番号469に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号464－469または483のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

20

【0012】

また、ここでは、配列番号411または438に示されるVHCDR1、配列番号412に示されるVHCDR2、配列番号413に示されるVHCDR3、配列番号414に示されるVLCDR1、配列番号415に示されるVLCDR2、および配列番号416に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号411－416または438のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

30

【0013】

また、ここでは、配列番号417または439に示されるVHCDR1、配列番号418に示されるVHCDR2、配列番号419に示されるVHCDR3、配列番号420に示されるVLCDR1、配列番号421に示されるVLCDR2、および配列番号422に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号417－422または439のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

【0014】

また、ここでは、配列番号423または440に示されるVHCDR1、配列番号424に示されるVHCDR2、配列番号425に示されるVHCDR3、配列番号426に示されるVLCDR1、配列番号427に示されるVLCDR2、および配列番号428に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号423－428または440のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

40

【0015】

また、ここでは、配列番号429または441に示されるVHCDR1、配列番号430に示されるVHCDR2、配列番号431に示されるVHCDR3、配列番号432に

50

示されるVLCDR1、配列番号433に示されるVLCDR2、および配列番号434に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号429-434または441のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

【0016】

また、ここでは、配列番号458または482に示されるVHCDR1、配列番号459に示されるVHCDR2、配列番号460に示されるVHCDR3、配列番号461に示されるVLCDR1、配列番号462に示されるVLCDR2、および配列番号463に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号458-463または482のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

10

【0017】

また、ここでは、配列番号470または484に示されるVHCDR1、配列番号471に示されるVHCDR2、配列番号472に示されるVHCDR3、配列番号473に示されるVLCDR1、配列番号474に示されるVLCDR2、および配列番号475に示されるVLCDR3を含む抗体、または少なくとも配列番号470-475または484のいずれかとの配列同一性またはそれらとの約80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するCDRsを含む抗体が提供される。

20

【0018】

若干の例において、ここで提供する分離した抗体またはその抗原結合断片は重鎖を含み、その重鎖は配列番号396に示されるアミノ酸配列を有する。若干の例において、ここで提供する分離した抗体または抗原結合断片はV_Hドメインを含み、それは配列番号396のアミノ酸1-121に示されるアミノ酸配列を有する。若干の例では、ここで提供する分離した抗体または抗原結合断片は軽鎖を含み、それは配列番号395に示されるアミノ酸配列を有する。若干の例では、ここで提供する分離した抗体またはその抗原結合断片はV_Lドメインを含み、それは配列番号395のアミノ酸1-110に示されるアミノ酸配列を有する。特定の例では、分離した抗体またはその抗原結合断片は30D8である。

30

【0019】

配列番号396に示される重鎖と、配列番号395に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する、可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する分離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、ここで提供される。

【0020】

若干の例において、ここで提供する分離した抗体またはその抗原結合断片は配列番号405または437に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号406に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号407に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含む。

40

【0021】

若干の例において、ここで提供する分離した抗体またはその抗原結合断片は配列番号408に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号409に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号410に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含む。

【0022】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離された抗体またはその抗原結合断片は、配列番号398に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号398のアミノ酸1-125として示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する。い

50

くつかの例では、本明細書において提供される単離された抗体またはその抗原結合断片は、配列番号397に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号397のアミノ酸1～107として示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する。特定の例では、単離された抗体またはその抗原結合断片は、104E5である。

【0023】

配列番号398に示される重鎖と、配列番号397に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する、可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離された抗RSV抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。

10

【0024】

若干の例では、本明細書において提供される分離された抗体またはその抗原結合断片は、配列番号411または438に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号412に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号413に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含む。

【0025】

いくつかの例では、本明細書において提供される分離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号414に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号415に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号416に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含む。

20

【0026】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号400に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号400のアミノ酸1～124に示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号399に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号399のアミノ酸1～108に示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、38F10である。

30

【0027】

配列番号400に示される重鎖と、配列番号399に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する、可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0028】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号417または439に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号418に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号419に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含む。

40

【0029】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号420に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号421に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号422に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含む。

【0030】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号402に示されるアミノ酸配列を有するV_H重鎖を含む。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号402のアミノ酸1～125に示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含む。いくつかの例では、本

50

細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号401に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号401のアミノ酸1-113に示されるアミノ酸配列を有するV_LドメインCDR2を含む。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、14G3である。

【0031】

可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号402に示される重鎖と、配列番号401に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

10

【0032】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号423または440に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号424に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号425に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する。

【0033】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号426に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号427に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号428に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する。

20

【0034】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号404に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号404のアミノ酸1-123に示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号403に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号403のアミノ酸1-107に示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、90D3である。

30

【0035】

可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号404に示される重鎖と、配列番号403に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

【0036】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号429または441に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号430に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号431に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する。

40

【0037】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号432に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号433に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号434に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する。

【0038】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号452に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本

50

明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号452のアミノ酸1～124に示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号453に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号453のアミノ酸1～111に示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、56E11である。

【0039】

可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号452に示される重鎖と、配列番号453に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

10

【0040】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号458または482に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号459に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号460に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する。

【0041】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号461に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号462に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号463に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する。

20

【0042】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号454に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号454のアミノ酸1～133に示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号455に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号455のアミノ酸1～107に示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、17C9である。

30

【0043】

可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を含有する単離抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号454に示される重鎖と、配列番号455に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

【0044】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号464または483に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1、配列番号465に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および配列番号466に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する。

40

【0045】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号467に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1、配列番号468に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および配列番号469に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する。

【0046】

50

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 456 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号 456 のアミノ酸 1～118 に示されるアミノ酸配列を有する V_H ドメインを含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 457 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する。いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体または抗原結合断片は、配列番号 457 のアミノ酸 1～109 に示されるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含有する。特定の例では、単離抗体またはその抗原結合断片は、69F6 である。

【0047】

10

可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) を含有する単離抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号 456 に示される重鎖と、配列番号 457 に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 融合 (F) タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

【0048】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 470 または 484 に示されるアミノ酸配列を有する V_H CDR1、配列番号 471 に示されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2、および配列番号 472 に示されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3 を含有する。

20

【0049】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 473 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1、配列番号 474 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2、および配列番号 475 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3 を含有する。

【0050】

可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) を含有する単離抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供され、そこでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号 396、398、400、402、404、452、454 または 456 に示される重鎖と、配列番号 395、397、399、401、403、453、455 または 457 に示される軽鎖とを含有する抗体または抗原結合断片と同一の呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 融合 (F) タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する。

30

【0051】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 405、411、417、423、429、437-441、458、464、470 または 482-484 に示されるアミノ酸配列を有する V_H 相補性決定領域 1 (CDR1) を含む。若干の例では、ここで提供する分離抗体または抗原結合断片は、配列番号 406、412、418、424、430、459、465 または 471 に示されるアミノ酸配列を有する V_H CDR2 を含む。若干の例では、ここで提供する分離抗体または抗原結合断片は、配列番号 407、413、419、425、431、460、466 または 472 に示されるアミノ酸配列を有する V_H CDR3 を含む。若干の例では、ここで提供する単離抗体または抗原結合断片は、配列番号 408、414、420、426、432、461、467 または 473 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR1 を含む。若干の例では、ここで提供する分離抗体または抗原結合断片は、配列番号 409、415、421、427、433、462、468 または 474 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR2 を含む。若干の例では、ここで提供する分離抗体または抗原結合断片は、配列番号 410、416、422、428、434、463、469 または 475 に示されるアミノ酸配列を有する V_L CDR3 を含む。

40

【0052】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離抗体またはその抗原結合断片は、

50

V_H C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 4 0 5、4 1 1、4 1 7、4 2 3、4 2 9、4 3 7-4 4 1、4 5 8、4 6 4、4 7 0 または 4 8 2-4 8 4 に示される V_H C D R 1、V_H C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 4 0 6、4 1 2、4 1 8、4 2 4、4 3 0、4 5 9、4 6 5 または 4 7 1 に示される V_H C D R 2、および V_H C D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 4 0 7、4 1 3、4 1 9、4 2 5、4 3 1、4 6 0、4 6 6 または 4 7 2 に示される V_H C D R 3 を含む。若干の例では、ここで提供する単離抗体またはその抗原結合断片は、V_L C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 4 0 8、4 1 4、4 2 0、4 2 6、4 3 2、4 6 1、4 6 7 または 4 7 3 に示される V_L C D R 1、V_L C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 4 0 9、4 1 5、4 2 1、4 2 7、4 3 3、4 6 2、4 6 8 または 4 7 4 に示される V_L C D R 2、V_L C D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 4 1 0、4 1 6、4 2 2、4 2 8、4 3 4、4 6 3、4 6 9 または 4 7 5 に示されるアミノ酸配列を有する V_L C D R 3 を含む。

10

【0053】

配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を有する R S V F タンパク質の一部と免疫特異的に結合する単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。

【0054】

ヒトまたはヒト化抗体またはその抗原結合断片である抗原結合ドメインを含有する単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。いくつかの例では、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体または抗原結合断片は、キメラ抗体である。いくつかの例では、単離されたポリペプチド、抗体または抗原結合断片は、一本鎖 F v (s c F v)、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、d s F v、ダイアボディ、F d または F d' 断片である。いくつかの例では、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体または抗原結合断片は、ペプチドリンカーを含有する。いくつかの例では、ペプチドリンカーは、約 1~約 5 0 個のアミノ酸を含有する。

20

【0055】

いくつかの例では、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片は、ポリエチレングリコール (P E G) とコンジュゲートしている。いくつかの例では、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体または抗原結合断片は、治療薬または診断薬を含有する。例示的診断薬としては、それだけには限らないが、酵素、蛍光化合物、電子移動剤および放射標識が挙げられる。

30

【0056】

タンパク質トランスダクション(transduction)ドメインを含有する単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。いくつかの例では、タンパク質トランスダクションドメインは、配列番号 2 8 4~3 5 5 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドの中から選択される。いくつかの例では、タンパク質トランスダクションドメインは、H I V-T A T タンパク質トランスダクションドメインである。

【0057】

多量体化ドメインとコンジュゲートしている、本明細書において提供されるポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片を含有する第 1 の抗原結合部分と、第 2 の多量体化ドメインとコンジュゲートしている、抗ウイルス抗体の抗原結合断片を含有する第 2 の抗原結合部分とを含有する多価抗体が、本明細書において提供される。このような例では、第 1 の多量体化ドメインおよび第 2 の多量体化ドメインは、相補的であるか、または同一であり、それによって第 1 の抗原結合部分および第 2 の抗原結合部分が多価抗体を形成する。いくつかの例では、本明細書において提供される多価抗体は、1、2、3、4 または 5 つのさらなる抗原結合部分を含有する。例示的多価抗体として、二価、三価、四価、五価、六価または七価抗体が挙げられる。本明細書において提供される多価抗体は、ヘテロ二価またはホモ二価抗体を含む。本明細書において提供される多価抗体は、多重特異性抗体を含む。いくつかの例では、多重特異性抗体は、二重特異性、三重特異性または四重特異性

40

50

抗体である。いくつかの例では、本明細書において提供される多価抗体は、一本鎖 Fv (scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、ダイアボディ、Fd または Fd' 断片である抗原結合断片を含有する。本明細書において提供される多価抗体の第1の抗原結合部分および/または第2の抗原結合部分は、共有結合または非共有結合によって、多量体化ドメインとコンジュゲートし得る。いくつかの例では、抗原結合部分は、化学リンカーまたはポリペプチドリンカーなどのリンカーを介して多量体化ドメインとコンジュゲートしている。いくつかの例では、本明細書において提供される多価抗体の多量体化ドメインは、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、ロイシンジッパー、相補的疎水性領域、相補的親水性領域または適合するタンパク質間相互作用ドメインの中から選択される。いくつかの例では、Fcドメインは、IgG、IgMまたはIgE Fcドメインである。

10

【0058】

いくつかの例では、本明細書において提供される多価抗体は、2種以上の抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する。特定の例では、本明細書において提供される多価抗体は、2種以上の抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する。

【0059】

多量体化ドメインとコンジュゲートしている本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する第1の抗原結合部分と；第2の多量体化ドメインとコンジュゲートしている、パリビズマブ、モタビズマブ、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1、RF-2またはその抗原結合断片の中から選択される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する第2の抗原結合部分とを含有する多価抗体が、本明細書において提供される。

20

【0060】

多量体化ドメインとコンジュゲートしている、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する第1の抗原結合部分と；第2の多量体化ドメインとコンジュゲートしている、パラインフルエンザウイルス (PIV) またはヒトメタニューモウイルス (hMPV) の抗原と免疫特異的に結合する抗ウイルス抗体を含有する第2の抗原結合部分とを含有する多価抗体が本明細書において提供される。

30

【0061】

本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および抗ウイルス薬を含有する組合せが本明細書において提供される。いくつかの例では、抗ウイルス薬は、リバビリンである。単一の組成物として、または別個の組成物として製剤化されている、本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片と、抗ウイルス薬とを含有する組合せが、本明細書において提供される。

【0062】

本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体を含有する組合せが本明細書において提供される。いくつかの例では、組合せは、2種以上の異なる抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する。いくつかの例では、組合せは、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片の中から選択される、2種以上の異なる抗RSV抗体または抗原結合断片を含有する。いくつかの例では、組合せは、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片と、パリビズマブ、モタビズマブ、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、

40

50

A 1 3 a 1 1、A 1 h 5、A 4 B 4 (1)、A 4 B 4 L 1 F R - S 2 8 R、A 4 B 4 - F 5 2 S、r s v 6、r s v 1 1、r s v 1 3、r s v 1 9、r s v 2 1、r s v 2 2、r s v 2 3、R F - 1、R F - 2の中から選択される抗体またはその抗原結合断片とを含有する。いくつかの例では、組合せは、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片と、パラインフルエンザウイルス (P I V) またはヒトメタニューモウイルス (h M P V) の抗原と免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片の中から選択される抗体とを含有する。いくつかの例では、P I V抗原は、ヒトP I V 1型、ヒトP I V 2型、ヒトP I V 3型および／またはヒトP I V 4型の抗原である。いくつかの例では、P I V抗原は、P I Vヌクレオカプシドホスホプロテイン、P I V融合 (F) タンパク質、P I Vホスホプロテイン、P I Vラージ (L) タンパク質、P I Vマトリックス (M) タンパク質、P I V血球凝集素ノイラミニダーゼ (H N) 糖タンパク質、P I V R N A依存性R N Aポリメラーゼ、P I V Y 1タンパク質、P I V Dタンパク質、P I V Cタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P V A型またはh M P V B型の抗原である。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P VサブタイプA 1、h M P VサブタイプA 2、h M P VサブタイプB 1またはh M P VサブタイプB 2の抗原である。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P V核タンパク質、h M P Vホスホプロテイン、h M P Vマトリックスタンパク質、h M P V小疎水性タンパク質、h M P V R N A依存性R N Aポリメラーゼ、h M P V Fタンパク質、h M P V Gタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。

10

【0063】

20

本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体を含有する組合せが本明細書において提供され、ここで、1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、一本鎖F v (s c F v)、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、d s F v、ダイアボディ、F dまたはF d'断片である。

【0064】

本明細書において提供される任意の単離されたポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書において提供される任意の多価抗体または本明細書において提供される任意の組合せと、製薬 (医薬) 上許容される担体もしくは賦形剤とを含有する製薬上組成物が本明細書において提供される。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、ゲル、軟膏、液体、懸濁液、エアゾール、錠剤、丸剤、散剤または鼻腔スプレーとして製剤化されている。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、肺投与、鼻腔内投与または非経口投与用に製剤化されている。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、単回投与用に製剤化されている。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、徐放用に製剤化されている。

30

【0065】

本明細書において提供される単離ポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体を含有する製薬上組成物が、本明細書において提供される。いくつかの例では、製薬上組成物は、2種以上の異なる抗R S V抗体またはその抗原結合断片を含有する。いくつかの例では、製薬上組成物は、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片の中から選択される、2種以上の異なる抗R S V抗体または抗原結合断片を含有する。いくつかの例では、製薬上組成物は、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片と、パリビズマブ、モタビズマブ、A F F F、P 1 2 f 2、P 1 2 f 4、P 1 1 d 4、A 1 e 9、A 1 2 a 6、A 1 3 c 4、A 1 7 d 4、A 4 B 4、A 8 c 7、1 X - 4 9 3 L 1、F R H 3 - 3 F 4、M 3 H 9、Y 1 0 H 6、D G、A F F F (1)、6 H 8、L 1 - 7 E 5、L 2 - 1 5 B 1 0、A 1 3 a 1 1、A 1 h 5、A 4 B 4 (1)、A 4 B 4 L 1 F R - S 2 8 R、A 4 B 4 - F 5 2 S、r s v 6、r s v 1 1、r s v 1 3、r s v 1 9、r s v 2 1、r s v 2 2、r s v 2 3、R F - 1、R F - 2の中から選択される抗体またはその抗原結合断片とを含有する。いくつかの例では、製薬上組成物は、本明細書において提供され

40

50

る抗体またはその抗原結合断片と、パラインフルエンザウイルス（P I V）またはヒトメタニューモウイルス（h M P V）の抗原と免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片の中から選択される抗体とを含有する。いくつかの例では、P I V抗原は、ヒトP I V 1型、ヒトP I V 2型、ヒトP I V 3型および／またはヒトP I V 4型の抗原である。いくつかの例では、P I V抗原は、P I Vヌクレオカプシドホスホプロテイン、P I V融合（F）タンパク質、P I Vホスホプロテイン、P I Vラージ（L）タンパク質、P I Vマトリックス（M）タンパク質、P I V血球凝集素ノイラミニダーゼ（H N）糖タンパク質、P I V RNA依存性RNAポリメラーゼ、P I V Y 1タンパク質、P I V Dタンパク質、P I V Cタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P V A型またはh M P V B型の抗原である。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P VサブタイプA 1、h M P VサブタイプA 2、h M P VサブタイプB 1またはh M P VサブタイプB 2の抗原である。いくつかの例では、h M P V抗原は、h M P V核タンパク質、h M P Vホスホプロテイン、h M P Vマトリックスタンパク質、h M P V小疎水性タンパク質、h M P V RNA依存性RNAポリメラーゼ、h M P V Fタンパク質、h M P V Gタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。

10

【0066】

本明細書において提供される単離ポリペプチド、抗体もしくは抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体を含有する製薬上組成物が、本明細書において提供され、ここで、1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、一本鎖F v（s c F v）、F a b、F a b'、F（a b'）₂、F v、d s F v、ダイアボディ、F dまたはF d'断片である。

20

【0067】

本明細書において提供される単離されたポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において提供される多価抗体および抗ウイルス薬を含有する製薬上組成物が、本明細書において提供される。いくつかの例では、抗ウイルス薬は、リバビリンである。

【0068】

対象に、本明細書において提供される製薬上組成物の治療上有効な量を投与することを含む、対象においてウイルス感染を治療する方法が、本明細書において提供される。対象に、本明細書において提供される製薬上組成物の治療上有効な量を投与することを含む、対象においてウイルス感染の1種または複数の症状を治療または阻害する方法が、本明細書において提供される。また、対象に、本明細書において提供される製薬上組成物の治療上有効な量を投与することを含む、対象においてウイルス感染を予防する方法も、本明細書において提供される。特定の例では、ウイルス感染は、R S V感染である。特定の例では、R S V感染は、上気道感染である。

30

【0069】

投与は、それだけには限らないが、局所的に（topically）、非経口的に、局在的に（locally）もしくは全身に、例えば、鼻腔内に、筋肉内に、皮内に、腹膜内に、静脈内に、皮下に、経口的になど、または肺の投与によってをはじめ、任意の適した経路によって達成され得る。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、噴霧器または吸入器によって投与される。本明細書において提供される製薬上組成物は、哺乳類、例えば、ヒトなどの任意の適した対象に投与してよい。

40

【0070】

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、ヒト乳児、未熟児で生まれたかまたはR S V感染による入院のリスクのあるヒト乳児、高齢のヒト、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症、後天性免疫不全、白血病もしくは非ホジキンリンパ腫を有するヒト対象または例えば、骨髄移植もしくは肝臓移植などの移植を受けたヒト対象に投与される。

【0071】

50

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、RSVの季節（例えば、10月から5月）の間に1回、2回、3回、4回または5回投与される。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、RSVの季節の前の1ヶ月、2ヶ月または3ヶ月内に1回、2回、3回、4回または5回投与される。

【0072】

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、1種または複数の抗ウイルス薬とともに投与してもよい。いくつかの例では、抗ウイルス薬は、リバビリンである。いくつかの例では、製薬上組成物および抗ウイルス薬は、単一の組成物として、または別個の組成物として製剤化されている。本明細書において提供される方法では、製薬上組成物および抗ウイルス薬は、逐次、同時または断続的に投与してもよい。

10

【0073】

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、ホルモン療法、免疫療法または抗炎症薬とともに投与してもよい。いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体またはその抗原結合断片とともに投与してもよい。製薬上組成物および1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、単一の組成物として、または別個の組成物として化されている。製薬上組成物および1種または複数のさらなる抗RSV抗体は、逐次、同時に、または断続的に投与してもよい。いくつかの例では、抗原結合断片は、一本鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、ダイアボディ、FdまたはFd'断片である。

【0074】

20

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、例えば、パリビズマブ、モタビズマブ、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1、RF-2もしくはその抗原結合断片などの抗RSV抗体またはその抗原結合断片の中から選択される1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体とともに投与してもよい。

【0075】

30

いくつかの例では、本明細書において提供される製薬上組成物は、パラインフルエンザウイルス（PIV）またはヒトメタニューモウイルス（hMPV）の抗原と免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片の中から選択される1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体とともに投与してもよい。いくつかの例では、PIV抗原は、ヒトPIV1型、ヒトPIV2型、ヒトPIV3型および／またはヒトPIV4型の抗原である。いくつかの例では、PIV抗原は、PIVヌクレオカプシドホスホプロテイン、PIV融合（F）タンパク質、PIVホスホプロテイン、PIVラージ（L）タンパク質、PIVマトリックス（M）タンパク質、PIV血球凝集素ノイラミニダーゼ（HN）糖タンパク質、PIV RNA依存性RNAポリメラーゼ、PIV Y1タンパク質、PIV Dタンパク質、PIV Cタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。いくつかの例では、hMPV抗原は、hMPV A型またはhMPV B型の抗原である。いくつかの例では、hMPV抗原は、hMPVサブタイプA1、hMPVサブタイプA2、hMPVサブタイプB1またはhMPVサブタイプB2の抗原である。いくつかの例では、hMPV抗原は、hMPV核タンパク質、hMPVホスホプロテイン、hMPVマトリックスタンパク質、hMPV小疎水性タンパク質、hMPV RNA依存性RNAポリメラーゼ、hMPV Fタンパク質、hMPV Gタンパク質およびその対立遺伝子変異体の中から選択される。

40

【0076】

(a) 本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片を使用して、流体(fluid)、細胞または組織サンプル中のRSV抗原のレベルをアッセイすることと；(b) ア

50

ッセイされた R S V 抗原のレベルを対照レベルと比較し、それによって、R S V 抗原の対照レベルと比較した、アッセイされた R S V 抗原のレベルの増大が、R S V 感染を示すことを含む、R S V 感染を検出する方法が本明細書において提供される。いくつかの例では、細胞または組織サンプルは、ヒト対象から得られる。いくつかの例では、細胞または組織サンプルは、血液、尿、唾液、肺痰、洗浄またはリンパサンプルである。

【0077】

本明細書において提供されるポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸が本明細書において提供される。本明細書において提供されるポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含有するベクターが本明細書において提供される。

10

【0078】

本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片、本明細書において提供される核酸または本明細書において提供されるベクターを含有する単離された細胞が本明細書において提供される。本明細書において提供される細胞は、例えば、原核細胞または真核細胞であり得る。また、本明細書において提供される核酸または本明細書において提供されるベクターを含有するトランスジェニック動物が、明細書において提供される。また、本明細書において提供される単離された細胞を、コードされる抗体を発現する条件下で培養することを含む、または本明細書において提供されるトランスジェニック動物からの抗体または抗原結合断片の単離によって、単離された抗体またはその抗原結合断片を発現させる方法が、本明細書において提供される。いくつかの例では、抗体または抗原結合断片は、トランスジェニック動物の血清または乳から単離される。

20

【0079】

1つまたは複数の容器中に、本明細書において提供されるポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片、本明細書において提供される多価抗体または本明細書において提供される組合せおよび使用するための説明書を含有するキットが本明細書において提供される。

【0080】

また、対象におけるウイルス感染の予防のための本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片の使用が本明細書において提供される。また、対象におけるウイルス感染の治療のための、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片の使用も本明細書において提供される。また、対象におけるウイルス感染の1種または複数の症状の治療または阻害のための、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片の使用が本明細書において提供される。

30

【0081】

また、対象体におけるウイルス感染の予防のための薬の調剤のために、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片の使用が提供される。また、対象におけるウイルス感染の治療用薬の製剤化のために、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片の使用が提供される。また、対象におけるウイルス感染の1種または複数の症状を治療または阻害する医薬の製剤化のために、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片の使用が本明細書において提供される。

【0082】

40

抗 R S V 中和抗体またはその抗原結合断片を本明細書において提供し、そこでは R S V は、抗体またはその抗原結合断片の存在下に、10 よりも多い、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 またはそれよりも多いウイルス複製のラウンドの後に、その抗体またはその抗原結合断片によって中和が回避（エスケープ）されたウイルスを生成しない。また、抗 R S V 中和抗体またはその抗原結合断片をここで提供し、そこでは、R S V はその抗体またはその抗原結合断片の存在下に、ウイルス複製の最大20ラウンドまでの後、その抗体またはその抗原結合断片によって中和が回避されたウイルスを生成しない。若干の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、30D8 と称される抗体と同じエピトープに特異的に結合する。他の例においては、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は30D8 と称される。若干の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合

50

断片は、R S V Fタンパク質に特異的に結合する。他の例では、抗R S V抗体またはその抗原結合断片はF a bまたはs c F vである。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】図1はR S V Fタンパク質のそのプレ融合コンホメーションでの3Dモデルである。例12において抗体58C5の結合のために重要であると識別されるアミノ酸残基を、黒色の、空間充填モデルにおいて示す。残基がプレ融合R S V Fタンパク質の3Dモデル上で表示されるとき、それらは、スパイクの制限されたエリア上に集まり、そして抗体58C5の抗体フットプリントを示す。

【図2】図2は、プレ融合およびプレ融合コンホメーションにおいて抗体58C5の結合にとって重要なR S V Fタンパク質残基を含むR S V Fタンパク質のD3領域の3DモデルX線構造を示す。図2に示すように、抗体58C5の結合にとって重要な残基は、プレ融合モデルにおいてだけ集まる。プレ融合モデルでは、残基はタンパク質表面の広いエリアにわたって分布する。

【図3】図3はR S V Fタンパク質のそのプレ融合コンホメーションでの3Dモデルである。例12において抗体30D8の結合のために重要であると識別されるアミノ酸残基を、黒色の、空間充填モデルにおいて示す。残基は、D1ドメインにおいてステム／ストーク領域のちょうど上のロリポップのベースに集まる。

【発明を実施するための形態】

【0084】

詳細な説明

概略

A. 定義

B. 概説

1. 呼吸器合胞体ウイルス

C. 抗R S V抗体

1. 一般的な抗体構造および機能ドメイン

a. 抗体の構造的および機能ドメイン

b. 抗体断片

2. 例示的抗R S V抗体

a. 誘導抗体

i. 一本鎖抗体

i i. 抗イディオタイプ抗体

i i i. 多重特異性抗体および抗体多量体化

D. 抗R S V抗体のさらなる改変

1. 免疫原性を低下させるための改変

2. F c改変

3. ペグ化

4. 検出可能な部分のコンジュゲーション

5. 治療部分のコンジュゲーション

6. 結合特異性を改善するための改変

E. 抗R S V抗体を単離する方法

F. 抗R S V抗体およびその改変体または変異体および抗体をコードする核酸を製造する方法

1. 核酸

2. ベクター

3. 細胞発現系

a. 原核生物の発現

b. 酵母細胞

c. 昆虫細胞

10

20

30

40

50

- d. 哺乳類細胞
- e. 植物
- 4. 抗体の精製
- G. 抗 R S V 抗体特性および活性を評価すること
 - 1. 結合アッセイ
 - 4 3. 抗 R S V 抗体の有効性を評価するためのインビボ動物モデル
- H. 診断上の使用
 - 1. 病原体感染のインビトロ検出
 - 2. 病原体感染のインビボ検出
 - 3. 感染のモニタリング
- I. 予防上および治療上の使用
 - 1. 治療の対象
 - 2. 投与量
 - 3. 投与経路
 - 4. 併用療法
 - a. 併用療法のための抗ウイルス抗体
 - i. 抗 R S V 抗体
 - i i. その他の呼吸器ウイルスに対する抗体
 - 5. 遺伝子療法
- J. 製薬上組成物、組合せおよび製造品／キット
 - 1. 製薬上組成物
 - 2. 製造品／キット
 - 3. 組合せ

K. 例

【0085】

A. 定義

特に断りのない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明（単数または複数）が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。すべての特許、特許出願、公開出願および刊行物、GenBank配列、データベース、ウェブサイトおよび本明細書において全開示内容を通じて参照されるその他の公開された資料は、特に断りのない限り、その全文が参照により組み込まれる。本明細書において用語について複数の定義がある事象では、この節におけるものが優先する。URLまたはその他のこのような識別子またはアドレスが参照される場合には、このような識別子は変わり得ることおよびインターネットに関する特定の情報は移り変わる場合があるが、インターネットを検索することによって同等の情報を見出すことができることは理解される。それに対する参照によって、このような情報の利用の可能性および一般への普及が証明される。

【0086】

本明細書において、「抗体」とは、天然に産生されたか、部分的にもしくは全体的に合成的に、例えば、組換えによって製造されたかにかかわらず、全長免疫グロブリンの結合特異性能を保持する免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも一部を含有するその任意の断片を含めた、免疫グロブリンおよび免疫グロブリン断片を指す。したがって、抗体は、免疫グロブリン抗原結合ドメイン（抗体結合部位）に対して相同または実質的に相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を含む。抗体は、抗 R S V 抗体断片などの抗体断片を含む。本明細書において、したがって、用語抗体は、合成抗体、組換えによって製造された抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内抗体および抗体断片、例えば、それだけには限らないが、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、F v 断片、ジスルフィド結合 F v (d s F v)、F d 断片、F d ' 断片、一本鎖 F v (s c F v)、一本鎖 F a b (s c F a b)、ダイアボディ、抗イディオタイプ（抗 I d）抗体または上記のいずれかの抗原結合

断片を含む。本明細書において提供される抗体は、任意の免疫グロブリンのタイプ（例えば、I g G、I g M、I g D、I g E、I g AおよびI g Y）のメンバー、任意のクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2）またはサブクラス（例えば、I g G 2 aおよびI g G 2 b）を含む。

【0087】

本明細書において、「抗体断片」または抗体の「抗原結合断片」とは、全長未満であるが、抗原と結合する抗体の可変領域の少なくとも一部（例えば、1つまたは複数のC D Rおよび／または1つまたは複数の抗体結合部位）を含有し、したがって、結合特異性および全長抗体の特異的結合能の少なくとも一部を保持する全長抗体の任意の部分を目指す。よって、抗原結合断片は抗体断片が導き出される抗体と同じ抗原に結合する抗原結合部分を含む抗体断片を指す。抗体断片は、全長抗体の酵素処理によって製造された抗体誘導体、ならびに合成的に、例えば、組換えによって製造された誘導体を含む。抗体断片は、抗体の中に含まれる。抗体断片の例として、それだけには限らないが、F a b、F a b'、F（a b'）₂、一本鎖F v（s c F v）、F v、d s F v、ダイアボディ、F dおよびF d'断片および改変断片を含めたその他の断片を含む〔例えば、Methods in Molecular Biology, Vol 207:Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p3-25, Kipriyanov参照のこと〕。断片は、例えば、ジスルフィド橋によって、および／またはペプチドリンカーによって一緒に連結している複数の鎖を含み得る。抗体断片は、一般に、少なくともまたは約50個のアミノ酸、通常、少なくともまたは約200個のアミノ酸を含有する。

【0088】

本明細書において、抗原結合断片は、抗体フレームワーク中に挿入された場合に（対応する領域を置換することなどによって）、抗原と免疫特異的に結合する（すなわち、少なくともまたは少なくとも約 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ のK_aを示す）抗体をもたらす任意の抗体断片を含む。

【0089】

本明細書において、「治療抗体」とは、ヒトをはじめとする動物の治療のために投与される任意の抗体またはその抗原結合断片を指す。このような抗体は、ポリペプチドの製造のための任意の既知法によって調製され得、したがって、それだけには限らないが、組換えによって製造された抗体、合成によって製造された抗体ならびに細胞または組織およびその他の供給源から抽出された治療抗体を含む。任意の供給源から単離され、または製造されるので、治療抗体は、長さが不均一で、グリコシル化（すなわち、炭水化物含量）などの翻訳後修飾が異なり得る。治療抗体の不均一性はまた、治療抗体の供給源に応じて異なり得る。したがって、治療抗体への言及は、製造または単離されるように不均一な集団を指す。均一な製剤が意図される場合には、そのように記載する。本明細書において治療抗体への言及は、必要に応じて、その単量体、二量体またはその他の多量体の形態に対するものである。

【0090】

本明細書において、「中和抗体」は、病原体と結合し、病原体の対象において細胞に感染する能力および／または疾患を引き起こす能力に干渉する任意の抗体またはその抗原結合断片である。中和抗体の例示として、ウイルス、細菌および真菌病原体と結合する中和抗体がある。通常、本明細書において提供される（provide herein）中和抗体は、病原体の表面と結合する。病原体がウイルスである例では、ウイルスと結合する中和抗体は、通常、ウイルスの表面上のタンパク質と結合する。ウイルスのクラスに応じて、表面タンパク質は、カプシドタンパク質（例えば、エンベロープを持っていないウイルスのカプシドタンパク質）またはウイルスのエンベロープタンパク質（例えば、エンベロープを持ったウイルスのウイルスエンベロープタンパク質）であり得る。いくつかの例では、タンパク質は、糖タンパク質である。ウイルスのウイルス感染性を阻害する能力は、例えば、インビトロ中和アッセイ、例えば、V e r o宿主細胞を使用するプラーク減少アッセイなどによって測定できる。

【0091】

本明細書において、「エンベロープを持ったウイルス」とは、ウイルスカプシドの周囲のウイルスタンパク質含有脂質二重層である、外膜またはエンベロープを有する動物ウイルスである。ウイルスのエンベロープタンパク質は、感染粒子の組み立てに参与し、また、宿主細胞上に存在する受容体との結合およびウイルスのエンベロープと宿主細胞の膜間の融合の誘導によるウイルス侵入に参与している。エンベロープを持ったウイルスは、球状または繊維状（桿状）のいずれかであり得る。例示的なエンベロープを持ったウイルスとして、それだけには限らないが、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、アレナウイルス科、フラビウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、コロナウイルス科およびボルナウイルス科のウイルスファミリーのメンバーが挙げられる。呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、パラミクソウイルス科ファミリー、肺炎ウイルス亜科サブファミリーのネガティブセンス一本鎖RNAエンベロープを有するウイルスである。

10

【0092】

本明細書において、「エンベロープを持っていないウイルス」または「裸のウイルス」とは、ウイルスのエンベロープを欠くウイルスである。宿主細胞の感染のために、エンベロープを持っていないウイルスは、標的細胞との結合のためにウイルスのカプシドのタンパク質を使用する。例示的なエンベロープを持っていないウイルスとして、それだけには限らないが、アデノウイルス科、パピローマウイルス科 (Papillomavirinae)、パルボウイルス科、ポリオーマウイルス科 (polyomavirinae)、サーコウイルス科、レオウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科およびアストロウイルス科のウイルスファミリーが挙げられる。

20

【0093】

本明細書において、病原体の「表面タンパク質」は、病原体の外表面に位置している任意のタンパク質である。表面タンパク質は、外部環境（すなわち、外表面）に対して部分的に曝されている場合も、完全に曝されている場合もある。表面タンパク質の例示として、膜タンパク質、例えば、ウイルスのエンベロープまたは細菌外膜の表面上に位置するタンパク質（例えば、膜糖タンパク質）などがある。膜タンパク質は、膜貫通タンパク質（すなわち、脂質二重層を横切るタンパク質）または非膜貫通細胞表面結合型タンパク質であるタンパク質（例えば、膜の表面にアンカー固定されたかまたは共有結合によって結合された、例えば、病原体の表面上の別のタンパク質との結合）であり得る。その他の例示的表面タンパク質として、外部環境に対して少なくとも部分的に曝されている、エンベロープを持っていないウイルスのウイルスカプシドタンパク質が挙げられる。

30

【0094】

本明細書において、「モノクローナル抗体」とは、同一抗体の集団を指し、これは、モノクローナル抗体の集団中の個々の抗体分子各々が、他に対して同一であることを意味する。この特性は、複数の異なる配列を有する抗体を含有する抗体のポリクローナル集団のものとは対照的である。モノクローナル抗体は、いくつかの周知の方法によって製造できる [Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57, 912-917; および Nelson et al., J Clin Pathol (2000), 53, 111-117]。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞株を作製することによるB細胞の不活化によって、またはEBVなどのウイルスによるB細胞の感染によって製造できる。また、宿主細胞を、抗体をコードするヌクレオチドの人工配列を保持するプラスミドを用いて形質転換することによって、組換え技術を使用して、インビトロで宿主細胞のクローン集団から抗体を製造してもよい。

40

【0095】

本明細書において、「従来の抗体」とは、2種の重鎖（HおよびH'と表され得る）と、2種の軽鎖（LおよびL'と表され得る）と、2種の抗体結合性部位とを含有する抗体を指し、これでは、各重鎖が、全長免疫グロブリン重鎖または抗原結合能を保持するその

50

任意の機能領域であり得（例えば、重鎖は、それだけには限らないが、 V_H 、鎖 $V_H - C_{H1}$ 鎖および $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ 鎖を含む）、各軽鎖が、全長軽鎖またはその任意の機能領域であり得る（例えば、軽鎖は、それだけには限らないが、 V_L 鎖および $V_L - C_L$ 鎖）である。各重鎖（HおよびH'）は、1種の軽鎖（それぞれ、LおよびL'）と対を形成する。

【0096】

本明細書において、全長抗体とは、2種の全長重鎖（例えば、 $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ または $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} - C_{H4}$ ）と、2種の全長軽鎖（ $V_L - C_L$ ）とヒンジ領域とを有する抗体、例えば、抗体を分泌するB細胞によって天然に産生されるヒト抗体および合成によって製造される同一ドメインを有する抗体である。

10

【0097】

本明細書において、Fv抗体断片は、非共有結合相互作用によって連結している1つの重鎖可変ドメイン（ V_H ）および1つの軽鎖可変（ V_L ）ドメインからなる。

【0098】

本明細書において、dsFvとは、 $V_H - V_L$ 対を安定化させる、操作された分子間ジスルフィド結合を有するFvを指す。

【0099】

本明細書において、Fd断片は、抗体重鎖の可変ドメイン（ V_H ）および1つの定常領域ドメイン（ C_{H1} ）を含有する抗体の断片である。

【0100】

20

本明細書において、Fab断片とは、パパインを用いる全長免疫グロブリンの消化に起因する抗体断片または合成によって、例えば、組換え法によって製造される同一構造を有する断片である。Fab断片は、軽鎖（ V_L および C_L を含有する）および重鎖（ V_H ）の可変ドメインと、重鎖の1つの定常領域ドメイン（ C_{H1} ）を含有する別の鎖を含有する。

【0101】

本明細書において、 $F(ab')_2$ 断片とは、pH 4.0～4.5でのペプシンを用いる免疫グロブリンの消化に起因する抗体断片または合成によって、例えば、組換え法によって製造される同一構造を有する断片である。 $F(ab')_2$ 断片は、2種のFab断片を本質的に含有し、これでは、各重鎖部分が、2つの断片を接続するジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むさらなる数個のアミノ酸を含有する。

30

【0102】

本明細書において、Fab'断片とは、 $F(ab')_2$ 断片の1/2（1つの重鎖および1つの軽鎖）を含有する断片である。

【0103】

本明細書において、Fd'断片とは、 $F(ab')_2$ 断片の1つの重鎖部分を含有する抗体の断片である。

【0104】

本明細書において、Fv'断片とは、抗体分子の V_H および V_L ドメインのみを含有する断片である。

40

【0105】

本明細書において、hsFvとは、Fab断片中に通常存在する定常ドメインが、ヘテロ二量体コイルドコイルドメインで置換されている抗体断片を指す〔例えば、Arndt et al. (2001) J Mol Biol. 7:312:221-228参照のこと〕。

【0106】

本明細書において、scFv断片とは、任意の順序でポリペプチドリンカーによって共有結合によって結合されている可変軽鎖（ V_L ）および可変重鎖（ V_H ）を含有する抗体断片を指す。リンカーは、2つの可変ドメインが、実質的な干渉を伴わずに架橋されるような長さのものがある。例示的リンカーとして、溶解度を高めるために、いくつかのGluまたはLys残基が全体に分散されている（Gly-Ser）_n残基がある。

50

【0107】

本明細書において、用語「誘導体」とは、例えば、アミノ酸残基置換、欠失または付加の導入によって、ポリペプチドへの任意の種類の分子の共有結合によって（例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロッキング基（blocking groups）による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたはその他のタンパク質と連結による）改変されている抗RSV抗体またはその断片のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを指す。抗RSV抗体またはその抗原結合断片の誘導体は、それだけには限らないが、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化をはじめとする、当業者に公知の技術を使用する化学修飾によって改変され得る。さらに、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の誘導体は、1種または複数の非古典的アミノ酸を含有し得る。通常、ポリペプチド誘導体は、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同様のまたは同一の機能を有する（例えば、RSVの中和）。

10

【0108】

本明細書において、語句「に由来する」とは、モノクローナル抗体などの別の抗体に由来する抗体断片に言及する場合、元の抗体の結合特異性を保持する抗体断片（例えば、Fab、Fab'、Fab'₂、一本鎖Fv（scFv）、Fv、dsFv、ダイアボディ、FdおよびFd'断片）のエンジニアリングを指す。このような断片は、それだけには限らないが、酵素的切断、化学的架橋、組換え手段またはそれらの組合せをはじめとする当技術分野で公知の種々の方法によって導くことができる。一般に、誘導された抗体断片は、同一または実質的に同一の親抗体の重鎖可変領域（V_H）および軽鎖可変領域（V_L）を共有し、その結果、抗体断片および親抗体が同一のエピトープと結合する。

20

【0109】

本明細書において、「親抗体」または「供給源抗体」とは、抗体断片（例えば、Fab、Fab'、Fab'₂、一本鎖Fv（scFv）、Fv、dsFv、ダイアボディ、FdおよびFd'断片）が由来する抗体を指す。

【0110】

本明細書において、用語「エピトープ」とは、抗体のパラトープが結合する、抗原上の任意の抗原決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群を含有し、通常、特定の三次元構造特徴ならびに特定の荷電特徴を有する。

30

【0111】

本明細書において、キメラポリペプチドとは、少なくとも2つの異なるポリペプチドに由来するか、または単一ポリペプチドの2つの不連続部分に由来する部分を含有するポリペプチドを指す。したがって、キメラポリペプチドは、通常、1種のポリペプチドのすべてまたは一部に由来するアミノ酸残基の配列と、別の異なるポリペプチドのすべてまたは一部に由来するアミノ酸の配列とを含む。2つの部分は直接的に連結している場合も、間接的に連結している場合もあり、平衡条件および生理学的条件下で、例えば、等張pH7緩衝生理食塩水中で、キメラポリペプチドの実質的な部分の完全性を維持するのに十分な強度の、ペプチド結合、その他の共有結合またはその他の非共有結合相互作用によって連結している場合もある。本明細書における目的上、キメラポリペプチドは、別のポリペプチド、例えば、多量体化ドメイン、異種免疫グロブリン定常ドメインまたはフレームワーク領域または診断用もしくは治療用ポリペプチドなどと連結している抗RSV抗体のすべてまたは一部を含有するものを含む。

40

【0112】

本明細書において、融合タンパク質とは、例えば、ベクターの長さに沿って互いに近接している、例えば、隣接する、2種のポリペプチドをコードする2種の核酸を含有するベクターから、融合タンパク質を発現させることによって、一緒に結合されている2種の別個のポリペプチドに対応するアミノ酸の配列を含有するよう操作されたポリペプチドである。一般に、本明細書において提供される融合タンパク質とは、抗体またはその抗原結合断片のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、異種ポリペプチドまたはペプチド、例えば

50

、診断用または治療用ポリペプチドなどのアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはペプチドとを含有するポリペプチドを指す。したがって、融合タンパク質とは、直接的にまたはペプチド結合を介して間接的に連結している2つの、または2つからの部分の、またはそれよりも多くのタンパク質またはペプチドを含むキメラタンパク質を指す。2種の分子は、コンストラクト中で隣接している場合も、リンカーもしくはスペーサーポリペプチドによって分離している場合もある。スペーサーは、溶解度または細胞内輸送などのポリペプチドの特性を変更するポリペプチドをコードし得る。

【0113】

本明細書において、「リンカー」または「スペーサー」ペプチドとは、2種のポリペプチド配列（またはこのようなアミノ酸配列をコードする核酸）を接続するアミノ酸の短い配列を指す。「ペプチドリinker」とは、2種のポリペプチド配列を接続するアミノ酸の短い配列を指す。ポリペプチドリinkerの例示として、ペプチド形質導入ドメインを抗体と接続するリンカーまたは2種の抗体鎖を、合成抗体断片、例えば、s c F v断片に接続するリンカーがある。リンカーは、周知であり、任意の公知のリンカーを、提供される方法において使用できる。ポリペプチドリinkerの例示として、溶解度を高めるために、いくつかのG l uまたはL y s残基が全体に分散されている（G l y - S e r）_nアミノ酸配列がある。その他の例示的リンカーは、本明細書に記載されており、これらのいずれかおよびその他の公知のリンカーを、提供される組成物および方法とともに使用できる。

【0114】

本明細書において、「抗体ヒンジ領域」または「ヒンジ領域」とは、その他の抗体ドメインと相同性を有さないC_H1およびC_H2ドメイン間の、γ、δおよびα抗体アイソタイプの重鎖中に天然に存在するポリペプチド領域を指す。この領域は、プロリン残基が豊富であり、I g G、I g DおよびI g A抗体柔軟性を与え、これによって、F a b部分の2つの「アーム」（各々、1つの抗体結合部位を含有する）が、それらが抗原と結合する時に互いに関して種々の角度を想定しながら可動性であることが可能となる。この柔軟性によって、F a bアームが、抗体結合部位を整列させて細胞表面上のエピトープまたはその他の抗原と相互作用するために動くことが可能となる。ヒンジ領域内の2つの鎖間ジスルフィド結合によって、2つの重鎖間の相互作用が安定化される。本明細書において提供されるいくつかの実施形態では、合成によって製造された抗体断片は、例えば、2つの抗体鎖間の相互作用によって安定性を促進するために、1つまたは複数のヒンジ領域を含有する。ヒンジ領域は、二量体化ドメインの例示である。

【0115】

本明細書において、ダイアボディとは、二量体のs c F vであり、ダイアボディは、通常、s c F vよりも短いペプチドリinkerを有し、好ましくは、二量体を形成する。

【0116】

本明細書において、ヒト化抗体とは、ヒトへの投与が免疫応答を誘発しないよう、アミノ酸の「ヒト」配列を含むように改変されている抗体を指す。ヒト化抗体は、通常、非ヒト種免疫グロブリンに由来する相補性決定領域（C D R）を含有し、抗体分子の残りの部分は、ヒト免疫グロブリンに主に由来する。このような抗体を調製する方法は、公知である。例えば、モノクローナル抗体をコードするD N Aを、非可変領域のアミノ酸組成がヒト抗体に基づいている抗体をコードするよう、組換えD N A技術によって変更してもよい。免疫グロブリンの可変および非可変領域を同定するために設計されているコンピュータプログラムをはじめ、このような領域を同定する方法は公知である。

【0117】

本明細書において、イディオタイプとは、免疫グロブリン分子の可変領域に対して特異的である、1種または複数の抗原決定基のセットを指す。

【0118】

本明細書において、抗イディオタイプ抗体とは、抗体またはT細胞受容体の配列の抗原特異的部分に対する抗体を指す。原則として、抗イディオタイプ抗体は、特異的免疫応答を阻害する。

10

20

30

40

50

【0119】

本明細書において、Igドメインは、当業者によってそのようなものとして認識され、2つのβブリーツシートを含有し、各々が、ループによって結合されたアミノ酸の逆平行β鎖を含有する免疫グロブリン(Ig)フォールドと呼ばれる構造によって区別されるドメインである。Igフォールド中の2つのβシートは、疎水性相互作用および保存された鎖内ジスルフィド結合によって一緒に挟まれている。抗体鎖内の個々の免疫グロブリンドメインは、機能に基づいてさらに区別され得る。例えば、軽鎖は、1種の可変領域ドメイン(V_L)および1種の定常領域ドメイン(C_L)を含有するのに対し、重鎖は、1種の可変領域ドメイン(V_H)および3種または4種の定常領域ドメイン(C_H)を含有する。各V_L、C_L、V_HおよびC_Hドメインは、免疫グロブリンドメインの一例である。

10

【0120】

本明細書において、可変ドメインまたは可変領域は、異なる抗体間で変わるアミノ酸の配列を含有する、抗体重鎖または軽鎖の特異的Igドメインである。各軽鎖および各重鎖は、1つの可変領域ドメイン、V_LおよびV_Hをそれぞれ有する。可変ドメインは、抗原特異性を提供し、したがって、抗原認識に関与している。各可変領域は、抗原結合部位ドメインおよびフレームワーク領域(FR)の一部であるCDRを含有する。

【0121】

本明細書において、「抗原結合ドメイン(antigen-binding domain)」、「抗原結合部位(antigen-binding site)」、「抗原結合性部位(antigen combining site)」および「抗体結合性部位(antibody combining site)」とは、同族抗原を認識し、物理的に相互作用する抗体内のドメインを指すよう同義的に使用される。天然の従来の全長抗体分子は、2つの従来の抗原結合部位を有し、各々が、重鎖可変領域の部分と、軽鎖可変領域の部分とを含有する。従来の抗原結合部位は、可変領域ドメイン内の逆平行β鎖をつなぐループを含有する。抗原結合性部位は、可変領域ドメインのその他の部分を含有し得る。各従来の抗原結合性部位は、重鎖に由来する3種の超可変領域と、軽鎖に由来する3種の超可変領域とを含有する。超可変領域はまた、相補性決定領域(CDRs)と呼ばれる。

20

【0122】

本明細書において、「超可変領域」、「HV」、「相補性決定領域」および「CDR」および「抗体CDR」は、抗体の抗原結合部位と一緒に形成する各可変領域内の複数の部分のうち1種を指すよう同義的に使用される。各可変領域ドメインは、CDR1、CDR2およびCDR3と名づけられた3種のCDRを含有する。3種のCDRは、直鎖のアミノ酸配列に沿っては不連続であるが、フォールディングされたポリペプチド中で近接している。CDRは、可変ドメインのβシートの平行な鎖を接続するループ内に位置する。本明細書において記載されるように、当業者ならば、承知しており、CDRをKabatまたはChothia番号付けに基づいて同定できる[例えば、Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917参照のこと]。

30

【0123】

本明細書において、フレームワーク領域(FR)とは、βシート内に位置する、抗体可変領域ドメイン内のドメインであり、FR領域は、そのアミノ酸配列に関して、超可変領域よりも比較的保存されている。

40

【0124】

本明細書において、「定常領域」ドメインとは、可変領域ドメインのものよりも比較的保存されているアミノ酸の配列を含有する抗体重鎖または軽鎖中のドメインである。従来の全長抗体分子では、各軽鎖は、単一の軽鎖定常領域(C_L)ドメインを有し、各重鎖は、C_H1、C_H2、C_H3およびC_H4を含む、1種または複数の重鎖定常領域(C_H)ドメインを含有する。全長IgA、IgDおよびIgGアイソタイプは、C_H1、C_H2、C_H3およびヒンジ領域を含有するが、IgEおよびIgMは、C_H1、C_H2、C_H3およびC_H4を含有する。C_H1およびC_Lドメインは、抗体分子のFabアームを延長

50

し、したがって、抗原との相互作用および抗体アームの回転に参与している。抗体定常領域は、それだけには限らないが、例えば、種々の細胞、生体分子および組織との相互作用による、抗体が特異的に結合する抗原、病原体および毒素のクリアランスなどのエフェクター機能を果たし得る。

【0125】

本明細書において、抗体の機能領域とは、抗体の少なくとも V_H 、 V_L 、 C_H （例えば、 C_{H1} 、 C_{H2} または C_{H3} ）、 C_L もしくはヒンジ領域ドメインまたは少なくともその機能領域を含有する抗体の部分である。

【0126】

本明細書において、 V_H ドメインの機能領域とは、全長 V_H ドメインの結合特異性の少なくとも一部を保持する（例えば、全長 V_H ドメインの1つまたは複数のCDRを保持することによって）全長 V_H ドメインの少なくとも一部であり、その結果、 V_H ドメインの機能領域は、単独または、別の抗体ドメイン（例えば、 V_L ドメイン）またはその領域と組み合わせて、抗原と結合する。 V_H ドメインの例示的機能領域として、 V_H ドメインのCDR1、CDR2 および／または CDR3 を含有する領域がある。

【0127】

本明細書において、 V_L ドメインの機能領域は、全長 V_L ドメインの結合特異性の少なくとも一部を保持する（例えば、全長 V_L ドメインの1つまたは複数のCDRを保持することによって）全長 V_L ドメインの少なくとも一部であり、その結果、 V_L ドメインの機能領域は、単独または、別の抗体ドメイン（例えば、 V_H ドメイン）またはその領域と組み合わせて、抗原と結合する。 V_L ドメインの例示的機能領域として、 V_L ドメインのCDR1、CDR2 および／または CDR3 を含有する領域がある。

【0128】

本明細書において、抗体またはその抗原結合断片に関して「特異的に結合する」または「免疫特異的に結合する」は、本明細書において同義的に使用され、抗体または抗原結合断片の、抗体の抗体結合部位（単数または複数）と抗原の間の非共有結合相互作用によって、同族抗原と1つまたは複数の非共有結合を形成する能力を指す。抗原は、単離抗原であっても、ウイルス中で提示されてもよい。通常、ウイルス抗原またはウイルスと免疫特異的に結合する（または特異的に結合する）抗体は、約 $1 \times 10^7 M^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 M^{-1}$ もしくはそれ以上または $1 \times 10^7 M^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 M^{-1}$ もしくはそれ以上の親和性定数 K_a （または $1 \times 10^{-7} M$ もしくは $1 \times 10^{-8} M$ もしくはそれ以下の解離定数（ K_d ））でウイルス抗原と（またはウイルス中の抗原と、もしくはウイルスと）結合するものである。親和性定数は、抗体反応の標準動態方法論、例えば、イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴（SPR）[Rich and Myszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599]、等温滴定熱量測定法（ITC）または当技術分野で公知のその他の動態相互作用アッセイによって決定することができる[例えば、Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989) 参照のこと；抗RSV抗体の結合親和性を算出するための例示的SPRおよびITC法の説明については、米国特許第7,229,619号も参照のこと]。結合速度のリアルタイム検出およびモニタリングのための計測手段および方法は公知であり、市販されている[例えば、BiaCore 2000、Biacore AB、Upsala、Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27:335]。ウイルス抗原（またはウイルス）と免疫特異的に結合する抗体は、その他のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質またはウイルスと、同等または低い結合親和性で結合し得る。通常、RSVFタンパク質（またはRSVウイルス）と免疫特異的に結合する本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片は、その他の抗原と交差反応しないか、または実質的に（少なくとも10～100倍）低い親和性でこのような抗原と交差反応する。特定のウイルス抗原（例えば、RSVFタンパク質）と免疫特異的に結合する抗体または抗原結合断片は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）などのイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、表面プラズモン共鳴または当業者に公知のその他の技

術によって同定できる。R S V Fタンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、通常、それだけには限らないが、イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴または当業者に公知のその他の技術などの実験技術を使用して決定される、任意の交差反応性エピトープとよりも高い結合親和性で、エピトープ（タンパク質またはウイルス中で提示される）と結合するものである。単離されたR S Vタンパク質（すなわち、組換えによって製造されたタンパク質）、例えば、R S V Fタンパク質との免疫特異的結合は、抗体が、同じ免疫特異的結合および／またはウイルスの中和を示すことを必ずしも意味しない。このような測定値と特性は別個のものである。ウイルスまたはウイルス中で提示される抗原に対する抗体または抗原結合断片の親和性は、決定できる。本明細書における目的上、親和性または関連用語を説明する場合、標的、例えば、単離されたタンパク質またはウイルスは、同定される。

10

【0129】

本明細書において、用語「表面プラズモン共鳴」とは、例えば、BiaCoreシステム（GE Healthcare Life Sciences）を使用してバイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイム相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。

【0130】

本明細書において、「多価」抗体とは、2つ以上の抗原結合部位を含有する抗体である。多価抗体は、二価、三価、四価、五価、六価、七価またはより高い結合価の抗体を包含する。

20

【0131】

本明細書において、「単一特異性」とは、各抗原結合部位が、同一エピトープと免疫特異的に結合する、2つ以上の抗原結合部位を含有する抗体である。

【0132】

本明細書において、「多重特異性」抗体とは、抗原結合部位のうち少なくとも2つが、異なるエピトープと免疫特異的に結合する、2つ以上の抗原結合部位を含有する抗体である。

【0133】

本明細書において、「二重特異性」抗体とは、2つ以上の抗原結合部位を含有し、2種の異なるエピトープと免疫特異的に結合し得る多重特異性抗体である。「三重特異性」抗体とは、3つ以上の抗原結合部位を含有し、3種の異なるエピトープと免疫特異的に結合し得る多重特異性抗体であり、「四重特異性」抗体とは、4つ以上の抗原結合部位を含有し、4種の異なるエピトープと免疫特異的に結合し得る多重特異性抗体であるなど。

30

【0134】

本明細書において、「ヘテロ二価」抗体とは、各抗原結合部位が、異なるエピトープと免疫特異的に結合する、2つの抗原結合部位を含有する二重特異性抗体である。

【0135】

本明細書において、「ホモ二価」抗体とは、各抗原結合部位が、同一エピトープと免疫特異的に結合する、2つの抗原結合部位を含有する単一特異性抗体である。ホモ二価抗体として、それだけには限らないが、従来の全長抗体、操作された全長抗体または合成全長抗体、2つの同一抗原結合断片の任意の多量体または同一の抗原結合ドメインを含有する2つの抗原結合断片の任意の多量体が挙げられる。

40

【0136】

本明細書において、多量体化ドメインとは、ポリペプチド分子と、1種または複数のさらなるポリペプチド分子との安定な相互作用を促進するアミノ酸の配列を指し、各々は、第1のドメインと安定な多量体を形成する同一の多量体化ドメインであっても、異なる多量体化ドメインであってもよい、相補的な多量体化ドメインを含有する。一般に、ポリペプチドは、多量体化ドメインと直接的にまたは間接的に接続される。例示的多量体化ドメインとして、免疫グロブリン配列またはその一部、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域および適合するタンパク質間相互作用ドメインが挙げられる。多量体化ドメインは

50

、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4サブタイプをはじめとするI g G、I g A、I g E、I g DおよびI g Mに由来するF cドメインまたはその一部などの免疫グロブリン定常領域またはドメインならびにその改変体であり得る。

【0137】

本明細書において、二量体化ドメインとは、2つのポリペプチド配列（例えば、それだけには限らないが、抗体鎖）間の相互作用を容易にする多量体化ドメインである。二量体化ドメインとして、それだけには限らないが、2つのポリペプチド配列間のジスルフィド結合の形成を促進するシステイン残基を含有するアミノ酸配列、例えば、全長抗体ヒンジ領域のすべてもしくは一部またはポリペプチド間の相互作用を促進するとわかっているアミノ酸の配列である1種または複数の二量体化配列（例えば、ロイシンジッパー、GCN4ジッパー）が挙げられる。

10

【0138】

本明細書において、「F c」または「F c領域」または「F cドメイン」とは、抗体重鎖の定常領域を含有し、第1の定常領域免疫グロブリンドメインを除外するポリペプチドを指す。したがって、F cとは、I g A、I g DおよびI g Eの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメインまたはI g EおよびI g Mの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメインを指す。所望により、F cドメインは、これらのドメインの柔軟なヒンジN末端のすべてまたは一部を含み得る。I g AおよびI g Mについては、F cは、J鎖を含み得る。I g Gの例示的F cドメインについては、F cは、免疫グロブリンドメインC γ 2およびC γ 3、および所望により、C γ 1およびC γ 2間のヒンジのすべてまたは一部を含有する。F c領域の境界は、変わり得るが、通常、ヒンジ領域の少なくとも一部を含む。さらに、F cはまた、任意の対立遺伝子もしくは種変異体またはF c Rとの結合を変更するか、もしくはF cによって媒介されるエフェクター機能を変更する任意の変異体もしくは改変体などの任意の変異体もしくは改変体も含み得る。

20

【0139】

本明細書において、「F cキメラ」とは、1つまたは複数のポリペプチドが、F c領域またはその誘導体と直接的にまたは間接的に連結されているキメラポリペプチドを指す。通常、F cキメラは、免疫グロブリンのF c領域を、例えば、抗RSV抗体断片などの別のポリペプチドと組み合わせる。改変されたF cポリペプチドの誘導体は、当業者に公知である。

30

【0140】

本明細書において、「タンパク質トランスダクション(transduction)ドメイン」すなわち「PTD」は、標的細胞へのタンパク質の結合および／または取り込みを促進するために、本明細書において提供される抗体などのタンパク質にコンジュゲートされ得るペプチドドメインである。

【0141】

本明細書において、「タグ」または「エピトープタグ」とは、本明細書において提供される抗体などのポリペプチドのN-またはC-末端に通常加えられるアミノ酸の配列を指す。ポリペプチドに融合されたタグを含むことによって、ポリペプチド精製および／または検出が容易になり得る。通常、タグまたはタグポリペプチドとは、抗体によって認識されるエピトープを提供するのに十分な残基を有する、または検出もしくは精製に役立ち得るが、連結されているキメラポリペプチドの活性に干渉しないよう十分に短いポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、通常、十分に独特であるので、それに特異的に結合する抗体は、それに連結しているポリペプチド中のエピトープと実質的に交差反応しない。適したタグポリペプチドは、一般に、少なくとも5または6個のアミノ酸残基、普通、約8～50個のアミノ酸残基、通常、9～30個の残基を有する。多量体では、タグは、1つまたは複数のキメラポリペプチドと連結され得、多量体の検出またはサンプルもしくは混合物からのその回収が可能となる。このようなタグは、周知であり、容易に合成および設計できる。例示的タグポリペプチドとして、アフィニティー精製に使用されるものが挙げられ、Hisタグ、インフルエンザ血球凝集素(HA)タグポリペプチドおよびその抗体

40

50

12CA5、[Field et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165] ; c-myc タグならびにそれに対する 8F9、3C7、6E10、G4、B7 および 9E10 抗体 [例えば、Evan et al. (1985) Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616 参照のこと] ; ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D (gD) タグおよびその抗体 [Paborsky et al. (1990) Protein Engineering 3:547-553 (1990)] が挙げられる。エピトープタグが付いた抗体を検出するために使用される抗体は、通常、本明細書において、二次抗体と呼ばれる。

【0142】

本明細書において、「ポリペプチド」とは、共有結合によって接続している 2 個以上のアミノ酸を指す。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において同義的に使用される。

10

【0143】

本明細書において、「ペプチド」とは、2～約 40 個または 40 個のアミノ酸長のポリペプチドを指す。

【0144】

本明細書において、「アミノ酸」とは、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物である。ポリペプチドは、2 個以上のアミノ酸を含有する。本明細書における目的上、提供される抗体中に含有されるアミノ酸は、20 種の天然に存在するアミノ酸 (表 1)、非天然アミノ酸およびアミノ酸類似体 (例えば、 α -炭素が側鎖を有するアミノ酸) を含む。本明細書において、本明細書中に現れる、ポリペプチドの種々のアミノ酸配列中に生じるアミノ酸は、その周知の三文字または一文字略語に従って同定される (表 1 参照)。種々の核酸分子および断片中に生じるヌクレオチドは、当技術分野で日常的に使用される標準的な一文字名称を用いて命名される。

20

【0145】

本明細書において、「アミノ酸残基」とは、そのペプチド結合でのポリペプチドの化学消化 (加水分解) の際に形成されるアミノ酸を指す。本明細書において記載されるアミノ酸残基は、通常「L」異性体の形態にある。「D」異性体の形態の残基は、所望の機能特性がポリペプチドによって保持される限り、任意の L-アミノ酸残基と置換してもよい。 NH_2 とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。 COOH とは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1968) に記載され、37 C. F. R. §§ 1.821～1.822 で採用された標準ポリペプチド命名法を踏まえて、アミノ酸残基の略語が表 1 に示されている。

30

【0146】

【表 1】

表 1－対応表

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	グルタミン酸および／または グルタミン
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	アスパラギン酸および／または アスパラギン
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知またはその他

【0147】

式によって本明細書において表されるアミノ酸残基のすべての配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の従来の向きで左から右の方向を有する。さらに、語句「アミノ酸残基」は、対応表（表 1）に列挙されるアミノ酸、改変された、非天然アミノ酸および稀なアミノ酸を含むように定義される。さらに、アミノ酸残基配列の始めまたは最後のダッシュは、1 個もしくは複数のアミノ酸残基のさらなる配列との、または NH_2 などのアミノ末端基との、または COOH などのカルボキシル末端基とのペプチド結合を示す。

【0148】

ペプチドまたはタンパク質では、アミノ酸の適した保存的置換は、当業者に公知であり、通常、得られる分子の生物活性を変更することなく行われ得る。当業者ならば、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は、生物活性を実質的に変更しないということを認識するであろう（例えば、Watson et al., Molecular Biology of th

10

20

30

40

50

e Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224参照のこと)。

【0149】

このような置換は、以下の表2に示される模範的置換に従って行われ得る。

【0150】

【表2】

表2

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

【0151】

その他の置換も許容され、経験的にか、またはその他の公知の保存的もしくは非保存的置換に従って決定され得る。

【0152】

本明細書において、「天然に存在するアミノ酸」とは、ポリペプチド中に生じる20種のL-アミノ酸を指す。

【0153】

本明細書において、用語「非天然アミノ酸」とは、天然アミノ酸と類似の構造を有するが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するよう構造的に修飾されている有機化合物を指す。したがって、天然に存在しないアミノ酸は、例えば、20種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体を含み、それだけには限らないが、アミノ酸のD-イソステレオマー (isostereomers) を含む。例示的非天然アミノ酸は、当業者に公知であり、それだけには限らないが、2-アミノアジピン酸 (Aad)、3-アミノアジピン酸 (Baad)、β-アラニン/β-アミノプロピオン酸 (Bala)、2-アミノ酪酸 (Abu)、4-アミノ酪酸/ピペリジン酸 (4Abu)、6-アミノカプロン酸 (Acp)、2-アミノヘプタン酸 (Ahe)、2-アミノイソ酪酸 (Aib)、3-アミノイソ酪酸 (Bai b)、2-アミノピメリン酸 (Apm)、2, 4-ジアミノ酪酸 (Dbu)、デスモシン (Des)、2, 2'-ジアミノピメリン酸 (Dpm)、2, 3-ジアミノプロピオン酸 (Dpr)、N-エチルグリシン (EtGly)、N-エチルアスパラギン (EtAsn)、ヒドロキシリシン (Hyl)、アローヒドロキシリシン (Ahy l)、3-ヒドロキシプロリン (3Hyp)、4-ヒドロキシプロリン (4Hyp)、イソデスモシン (Ide)、アローイソロイシン (Aile)、N-Mエチルグリシ

ン、サルコシン (Me Gly)、N-メチルイソロイシン (Me Ile)、6-N-メチルリシン (Me Lys)、N-メチルバリン (Me Val)、ノルバリン (Nva)、ノルロイシン (Nle)、およびオルニチン (Orn) が挙げられる。

【0154】

本明細書において、「天然(native)ポリペプチド」または「天然(native)核酸」分子とは、それぞれ、天然に見出すことができるポリペプチドまたは核酸分子である。天然ポリペプチドまたは核酸分子は、ポリペプチドまたは核酸分子の野生型であり得る。天然ポリペプチドまたは核酸分子は、ポリペプチドの優勢な形態またはその任意の対立遺伝子または天然変異体であり得る。本明細書において提供される変異体ポリペプチドおよび核酸分子は、天然ポリペプチドおよび核酸分子と比較して改変を有し得る。

10

【0155】

本明細書において、ポリペプチドまたは核酸分子の野生型の形態は、遺伝子によって、または遺伝子によってコードされるコード配列によってコードされる形態である。通常、遺伝子、またはそれによってコードされる分子の野生型の形態は、機能または構造を変更する突然変異またはその他の改変を含有しない。用語野生型はまた、種の中、種間で生じるので対立遺伝子変異を有する形態も包含する。本明細書において、ポリペプチドまたは核酸分子の優勢な形態とは、遺伝子から生じた主要な形態である分子の形態を指す。「優勢な形態」は、供給源毎に変わる。例えば、異なる細胞または組織種は、例えば、選択的スプライシングによって、および／または選択的タンパク質プロセッシングによって異なる形態のポリペプチドを生じ得る。各細胞または組織種では、異なるポリペプチドが、「優勢な形態」であり得る。

20

【0156】

本明細書において、「対立遺伝子変異体」または「対立遺伝子変異」とは、同一の染色体遺伝子座を占める遺伝子の2種以上の代替形態のいずれかについて言及する。対立遺伝子変異は、突然変異によって天然に生じ、集団内に表現型多型をもたらし得る。遺伝子突然変異は、サイレントであり得る（コードされるポリペプチドに変化はない）か、または変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。用語「対立遺伝子変異体」はまた、遺伝子の対立遺伝子変異体によってコードされるタンパク質を示すよう、本明細書において使用される。通常、遺伝子の参照形態は、野生型形態および／または集団からのポリペプチドの優勢な形態または種の単一の参照メンバーをコードする。通常、種の中および種間の変異体を含む対立遺伝子変異体は、通常、同一種からの野生型および／または優勢な形態と少なくともまたは約(at least or about)80%、85%、90%、95%またはそれ以上のアミノ酸同一性を有し、同一性の程度は、遺伝子および比較が種間であるか種内であるかに応じて変わる。一般に、種内対立遺伝子変異体は、野生型および／または優勢な形態と、少なくともまたは約80%、85%、90%または95%の同一性またはそれ以上、例えば、ポリペプチドの野生型および／または優勢な形態と、96%、97%、98%、99%またはそれ以上を有する。本明細書において対立遺伝子変異体への言及は、一般に、同一種のメンバー内のタンパク質中の変異を指す。

30

【0157】

本明細書において、本明細書において「対立遺伝子変異体」と同義的に使用される「対立遺伝子」とは、遺伝子またはその一部の代替形態を指す。対立遺伝子は、同じ遺伝子座または相同染色体上の位置を占める。対象が2つの同一の対立遺伝子の遺伝子を有する場合、対象は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合体であるといわれる。対象が2つの異なる対立遺伝子の遺伝子を有する場合、対象は、その遺伝子についてヘテロ接合体であるといわれる。特定の遺伝子の対立遺伝子は、単一のヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドにおいて互いに異なる可能性があり、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、突然変異を含有する遺伝子の形態であり得る。

40

【0158】

本明細書において、「種変異体」とは、異なる種、例えば、マウスおよびヒトなどの異

50

なる哺乳類種ならびにウイルスおよび細菌などの微生物の種の中のポリペプチドにおける変異体を指す。

【0159】

本明細書において、ポリペプチド「ドメイン」とは、構造的におよび／または機能的に識別可能かまたは定義可能であるポリペプチドの一部（3個以上の、通常、5個、10個またはそれ以上のアミノ酸の配列）である。ポリペプチドドメインの例示として、1つまたは複数の構造モチーフ（例えば、ループ領域によってつながれている α ヘリックスおよび／または β 鎖）で構成されているポリペプチド内に独立にフォールディングされる構造を形成し得るポリペプチドの一部ならびに／または酵素活性、二量体化または抗原結合などの特定の機能活性によって認識されるポリペプチドの一部がある。ポリペプチドは、1つまたは複数の、通常、2以上の別個のドメインを有し得る。例えば、ポリペプチドは、1つまたは複数の構造ドメインおよび1つまたは複数の機能ドメインを有し得る。単一のポリペプチドドメインは、構造および機能に基づいて区別され得る。ドメインは、アミノ酸の連続する直鎖配列を包含し得る。あるいは、ドメインは、ポリペプチドのアミノ酸の直鎖配列に沿って不連続である、複数の不連続なアミノ酸部分を包含し得る。通常、ポリペプチドは、複数のドメインを含有する。例えば、抗体分子の各重鎖および各軽鎖は、各約110個のアミノ酸長である、複数の免疫グロブリン（Ig）ドメインを含有する。

10

【0160】

当業者ならば、ポリペプチドドメインに精通しており、その他のこのようなドメインとの構造的および／または機能的相同性によってそれらを同定できる。本明細書における例示のために、定義が提供されるが、名前で個々のドメインを認識することは、十分に当業者の範囲内であることは理解される。必要に応じて、ドメインを同定するために適当なソフトウェアを使用してもよい。

20

【0161】

本明細書において、ポリペプチドの機能領域は、少なくとも1つの機能ドメイン（例えば、抗原結合、DNA結合、リガンド結合または二量体化を介して、または酵素活性、例えば、キナーゼ活性もしくはタンパク質分解活性によって生体分子と相互作用する能力などの特定の機能を付与する）を含有するポリペプチドの領域であり、ポリペプチドの機能領域の例示として、 V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L などの抗体ドメインおよびCDR1、CDR2およびCDR3をはじめとするCDRなどのその一部または抗体結合部位などの抗原結合部分がある。

30

【0162】

本明細書において、ポリペプチドの構造的領域とは、少なくとも1つの構造的ドメインを含有するポリペプチドの領域である。

【0163】

本明細書において、抗体などのポリペプチドの「特性」とは、それだけには限らないが、結合特異性、構造配置またはコンホメーション、タンパク質安定性、タンパク質分解に対する抵抗性、コンホメーションの安定性、熱耐性およびpH条件に対する耐性をはじめとするポリペプチドによって示される任意の特性を指す。特性の変化は、ポリペプチドの「活性」を変更し得る。例えば、抗体ポリペプチドの結合特異性における変化は、抗原と結合する能力および／または親和性もしくはアビディティなどの種々の結合活性またはポリペプチドのインビボ活性を変更し得る。

40

【0164】

本明細書において、抗体などのポリペプチドの「活性」または「機能活性」とは、ポリペプチドによって示される任意の活性を指す。このような活性は経験的に決定できる。例示的活性として、それだけには限らないが、例えば、抗原結合、DNA結合、リガンド結合または二量体化、酵素活性、例えば、キナーゼ活性もしくはタンパク質分解活性を介して生体分子と相互作用する能力が挙げられる。抗体（抗体断片を含む）、活性として、それだけには限らないが、特定の抗原と特異的に結合する能力、抗原結合の親和性（例えば、高親和性または低親和性）、抗原結合のアビディティ（例えば、高アビディティま

50

たは低アビディティー)、結合速度(on-rate)、解離速度(off-rate)、エフェクター機能、例えば、抗原中和またはクリアランス、ウイルス中和を促進する能力およびインビボ活性、例えば、感染もしくは病原体の侵入を防ぐ能力またはクリアランスを促進する能力または身体中の特定の組織もしくは体液もしくは細胞に浸透する能力が挙げられる。活性は、E L I S A、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴または結合速度もしくは解離速度を測定する同等のアッセイ、免疫組織化学および免疫蛍光組織学および顕微鏡検査、細胞ベースのアッセイ、フローサイトメトリーおよび結合アッセイ(例えば、パニングアッセイ)などの認識されるアッセイを使用して、インビトロまたはインビボで評価できる。例えば、抗体ポリペプチドについては、結合親和性、アビディティーおよび/または結合係数(例えば、結合速度/解離速度について)およびインビトロでのその他の活性を測定することによって、または免疫効果、例えば、抗原クリアランス、抗体の組織への浸透もしくは局在性、疾患、例えば、感染からの保護、血清もしくはその他の体液抗体力価など、インビボで種々の効果を測定することまたは当技術分野で周知のその他のアッセイによって、活性を評価してもよい。ポリペプチドが活性を示すことを示すこのようなアッセイの結果は、インビボでのポリペプチドの活性と相関があり得、これでは、インビボ活性は、治療活性または生物活性と呼ばれることもある。改変されたポリペプチドの活性は、改変されていないポリペプチドの任意のレベルのパーセンテージ、例えば、それだけには限らないが、改変されていないポリペプチドと比較して、活性の1%、活性の2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれ以上であり得る。改変された(例えば、変異体)抗体の機能性または活性を測定するためのアッセイは、当技術分野で周知である。

10

20

【0165】

本明細書において、「治療活性」とは、治療用ポリペプチドのインビボ活性を指す。一般に、治療活性とは、疾患または状態を治療するために使用される活性である。改変されたポリペプチドの治療活性は、改変されていないポリペプチドの治療活性の任意のレベルのパーセンテージ、例えば、それだけには限らないが、改変されていないポリペプチドと比較して、活性の1%、治療活性の2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれ以上であり得る。

30

【0166】

本明細書において、「少なくとも1つの活性を示す」または「少なくとも1つの活性を保持する」とは、改変を含有しない標的ポリペプチドまたは改変されていないポリペプチドと比較して、改変されたポリペプチド、例えば、提供される方法に従って生じた変異体ポリペプチド、改変抗体、例えば、変異体抗体またはその他の治療用ポリペプチド(例えば、改変された抗RSV抗体またはその抗原結合断片)などによって示される活性を指す。標的ポリペプチドの活性を保持する改変ポリペプチドまたは変異体ポリペプチドは、改善された活性を示し得るか、または改変されていないポリペプチドの活性を維持し得る。いくつかの例では、改変されたポリペプチドまたは変異体ポリペプチドは、標的ポリペプチドまたは改変されていないポリペプチドと比較して増大している活性を保持し得る。いくつかの場合には、改変されたポリペプチドまたは変異体ポリペプチドは、改変されていないポリペプチドまたは標的ポリペプチドと比較して低減している活性を保持し得る。改変されたポリペプチドまたは変異体ポリペプチドの活性は、改変されていないポリペプチドまたは標的ポリペプチドの活性の任意のレベルのパーセンテージ、例えば、それだけには限らないが、改変されていないポリペプチドまたは標的ポリペプチドと比較して、活性の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれ以上の

40

50

活性であり得る。その他の実施形態では、活性の変化は、改変されていないポリペプチドまたは標的ポリペプチドの少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍またはそれ以上の倍数である。活性の保持についてのアッセイは、保持される活性に応じて変わる。このようなアッセイは、インビトロまたはインビボで実施できる。活性は、例えば、それだけには限らないが、ELISAおよびパニングアッセイなどの、当技術分野で公知であり、以下の実施例に記載されるアッセイを使用することによって測定できる。改変されていないポリペプチドまたは標的ポリペプチドと比較した、改変されたポリペプチドまたは変異体ポリペプチドの活性はまた、インビボ治療活性もしくは生物活性またはポリペプチドの投与後の結果の点で評価できる。

10

【0167】

本明細書において、用語「評価すること」とは、サンプル中に存在するプロテアーゼまたはそのドメインの活性の絶対値を得るという意味の、また活性のレベルを示す指標、比率、パーセンテージ、視覚的価値またはその他の価値を得るという意味の定量的および定性的決定を含むものとする。評価は、直接的または間接的であり得、実際に検出される化学種は、もちろん、そのタンパク質分解生成物でなくともよいが、例えば、その誘導体または何らかのさらなる物質であり得る。例えば、SDS-PAGEおよびクマシーブルーを用いるタンパク質染色などによる、補体タンパク質の切断生成物の検出。

【0168】

20

本明細書において、「核酸」とは、通常、ホスホジエステル結合によって一緒に接続している、少なくとも2つの連結しているヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体、例えば、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)を指す。また、用語「核酸」中には、ペプチド核酸(PNA)、ホスホロチオエートDNAなどの核酸の類似体およびその他のこのような類似体および誘導体またはそれらの組合せも含まれる。核酸はまた、例えば、ヌクレオチド類似体またはリン酸ジエステル結合以外の「骨格」結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホルアミダート結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合(ペプチド核酸)を含有するDNAおよびRNA誘導体も含む。この用語はまた、同等なものとして、ヌクレオチド類似体でできているRNAまたはDNAいずれかの誘導体、変異体および類似体、一本鎖(センスまたはアンチセンス)および二本鎖核酸も含む。デオキシリボヌクレオチドは、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンを含む。RNAについては、ウラシル塩基は、ウリジンである。

30

【0169】

核酸は、例えば、核酸分子の質量区別(mass differentiation)を可能にする質量が改変されたヌクレオチド；核酸分子の検出を可能にする検出可能な標識、例えば、蛍光、放射活性、発光または化学発光標識を含有するヌクレオチド；または核酸分子の固相支持体への固定化を容易にする反応性基、例えば、ビオチンもしくはチオール基を含有するヌクレオチドをはじめとするヌクレオチド類似体を含有し得る。核酸はまた、選択的に切断可能な、例えば、化学的に、酵素的にまたは光分解的に切断可能な1つまたは複数の骨格結合を含有し得る。例えば、核酸は、1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドと、それに続く1つまたは複数のリボヌクレオチドを含む場合があり、これに、1つまたは複数のデオキシリボヌクレオチドが続く場合があり、このような配列は、塩基加水分解によってリボ核酸配列で切断可能である。核酸はまた、切断に対して比較的抵抗性である1つまたは複数の結合を含み得る、例えば、ペプチド核酸結合によって連結しているヌクレオチドと、リン酸ジエステル結合またはその他の適した結合によって連結しており、ポリメラーゼによって伸長され得る、3'末端の少なくとも1つのヌクレオチドとを含み得るキメラオリゴヌクレオチドプライマー。ペプチド核酸配列は、周知の方法を使用して調製できる[例えば、Weiler et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:2792-2799参照のこと]。

40

【0170】

50

本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」とは、通常、ホスホジエステル結合によって一緒に接続している、少なくとも2つの連結しているヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含むオリゴマーまたはポリマー、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を指す。ポリヌクレオチドはまた、例えば、ヌクレオチド類似体またはリン酸ジエステル結合以外の「骨格」結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホホルアミダート結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合（ペプチド核酸）を含むDNAおよびRNA誘導体も含む。ポリヌクレオチド（核酸分子）は、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）ならびにRNAまたはDNAいずれかの類似体または誘導体などの一本鎖および／または二本鎖ポリヌクレオチドを含む。この用語はまた、同等なものとして、ヌクレオチド類似体10
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0171】

本明細書において、「DNAコンストラクト」とは、天然には見られない方法で組み合わされている、および並んでいるDNAのセグメントを含む一本鎖または二本鎖、直鎖または環状DNA分子である。DNAコンストラクトは、ヒトの操作の結果として存在し、操作された分子のクローンおよびその他のコピーを含む。

【0172】

本明細書において、「DNAセグメント」とは、特定の特質を有する大きなDNA分子の一部である。例えば、特定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、5'から3'方向に読むと、特定のポリペプチドのアミノ酸の配列をコードするプラスミドまたはプラスミド断片などのより長いDNA分子の一部である。

【0173】

本明細書において、正鎖ポリヌクレオチドとは、負鎖または「アンチセンス」鎖と相補的である「センス鎖」またはポリヌクレオチド二本鎖を指す。遺伝子をコードするポリヌクレオチドの場合には、センス鎖は、ポリペプチドに翻訳されるmRNA鎖と同一である鎖であり、一方で、アンチセンス鎖は、その鎖と相補的である。二本鎖の正鎖および負鎖は、互いに相補的である。

【0174】

本明細書において、遺伝因子とは、ポリペプチドまたはタンパク質またはその領域をコードする遺伝子またはその任意の領域を指す。いくつかの例では、遺伝因子は、融合タンパク質をコードする。

【0175】

本明細書において、核酸分子の調節領域とは、機能的に連結している遺伝子の発現に正または負に影響を及ぼすシス作用核酸配列を意味する。調節領域は、遺伝子の誘導性（すなわち、転写の増大のために物質または刺激を必要とする）発現を付与するヌクレオチドの配列を含む。誘導物質が存在するか、高濃度である場合には、遺伝子発現が増大され得る。調節領域はまた、遺伝子発現の抑制を付与する（すなわち、物質または刺激が転写を低減する）配列も含み得る。レプレッサーが存在するか、または高濃度である場合には、遺伝子発現が低減され得る。調節領域は、細胞増殖、細胞成長および細胞死、細胞分化および免疫調節をはじめとする多数のインビボ生物活性に影響を及ぼす、調節する、または制御することがわかっている。調節領域は、通常、1以上の(one or more)トランス作用性タンパク質と結合し、遺伝子の転写の増大または低減のいずれかをもたらす。

10

【0176】

遺伝子調節領域の特定の例として、プロモーターおよびエンハンサーがある。プロモーターは、転写または翻訳開始部位の周囲に位置する、通常、翻訳開始部位の5'に位置する配列である。プロモーターは、普通、翻訳開始部位の1 kb内に位置するが、さらに、例えば、2 kb、3 kb、4 kb、5 kbまたは最大10 kbを含めてそれ以上離れて位置する場合もある。エンハンサーは、遺伝子の5'または3'に位置する場合に、またはエキソンもしくはイントロン中に位置するかもしくはその一部である場合に、遺伝子発現に影響を及ぼすと分かっている。エンハンサーはまた、遺伝子から相当な距離で、例えば、約3 kb、5 kb、7 kb、10 kb、15 kbまたはそれ以上の距離で機能し得る。

20

【0177】

調節領域はまた、制限されないが、プロモーター領域に加えて、翻訳を容易にする配列、イントロンのためのスプライシングシグナル、mRNAのインフレーム翻訳を可能にする遺伝子の正しいリーディングフレームの維持、停止コドン、リーダー配列および融合パートナー配列、多重遺伝子またはポリシストロン性メッセージの作製のための内部リボソーム結合部位(IRES)エレメント、注目する遺伝子の転写物の適切なポリアデニル化を提供するためのポリアデニル化シグナルおよび停止コドンも含み、所望により、発現ベクター中に含まれ得る。

30

【0178】

本明細書において、核酸配列、領域、エレメントまたはドメインに関して「機能し得る形で連結されている」とは、核酸領域が、互いに機能的に関連していることを意味する。例えば、リーダーペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドをコードする核酸と機能し得る形で連結され得、それによって、核酸は、転写および翻訳されて、機能的融合タンパク質を発現することができ、ここで、リーダーペプチドは、融合ポリペプチドの分泌を達成する。いくつかの例では、第1のポリペプチド（例えば、リーダーペプチド）をコードする核酸は、第2のポリペプチドをコードする核酸に機能し得る形で連結され、核酸は、単一のmRNA転写物として転写されるが、mRNA転写物の翻訳は、2種のポリペプチドのうち1種が発現されることをもたらし得る。例えば、アンバー停止コドンは、第1のポリペプチドをコードする核酸および第2のポリペプチドをコードする核酸の間に位置する場合があり、その結果、部分アンバーサプレッサー細胞中に導入されると、得られた単一のmRNA転写物が翻訳され、第1のおよび第2のポリペプチドを含有する融合タンパク質が産生され得るか、翻訳されて第1のポリペプチドのみが産生され得るのいずれかとなる。別の例では、プロモーターは、ポリペプチドをコードする核酸と機能し得る形で連結され、それによって、プロモーターが核酸の転写を調節または媒介し得る。

40

【0179】

本明細書において、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して「合成」とは、組換え法によって、および／または化学合成法によって産生される核酸

50

分子またはポリペプチド分子を指す。

【0180】

本明細書において、組換えDNA法を使用することによる組換え手段による製造とは、クローニングされたDNAによってコードされるタンパク質を発現するための分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

【0181】

本明細書において、「発現」とは、ポリヌクレオチドの転写および翻訳によってポリペプチドが産生されるプロセスを指す。ポリペプチドの発現のレベルは、例えば、宿主細胞から産生されるポリペプチドの量を決定する方法をはじめとする当技術分野で公知の任意の方法を使用して評価できる。このような方法として、それだけには限らないが、ELISA、ゲル電気泳動後のクマシーブルー染色、ローリータンパク質アッセイおよびブラッドフォードタンパク質アッセイによる細胞溶解物中のポリペプチドの定量化が挙げられる。

10

【0182】

本明細書において、「宿主細胞」とは、ベクターを受け取り、維持し、複製(reproduce)し、増幅するために使用される細胞である。宿主細胞はまた、ベクターによってコードされるポリペプチドを発現させるためにも使用できる。ベクター中に含有される核酸は、宿主細胞が分裂するときに複製され、それによって核酸を増幅する。一例では、宿主細胞は、変異体ポリペプチドをその表面に発現させるために導入され得る遺伝子パッケージである。別の例では、宿主細胞は、遺伝子パッケージに感染する。例えば、宿主細胞は、ファージディスプレイ適合宿主細胞であり得、これは、ファージまたはファージミドベクターを用いて形質転換され得、変異体ポリペプチドを含有する融合タンパク質を発現するファージのパッケージングを提供する。

20

【0183】

本明細書において、「ベクター」は、ベクターが適当な宿主細胞に形質転換される場合に、それから1種または複数の異種タンパク質が発現され得る複製可能な核酸である。ベクターへの言及は、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸が、通常、制限消化およびライゲーションによって導入され得るそれらのベクターを含む。ベクターへの言及はまた、ポリペプチドをコードする核酸を含有するそれらのベクターも含む。ベクターは、核酸の増幅のために、または核酸によってコードされるポリペプチドの発現/ディスプレイのために、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入するために使用される。ベクターは、通常、エピソーム性のままであるが、ゲノムの染色体への遺伝子またはその一部の組み込みを達成するよう設計してもよい。また、酵母人工染色体および哺乳類人工染色体などの人工染色体であるベクターも考慮される。このようなビヒクルの選択および使用は、当業者に周知である。

30

【0184】

本明細書において、ベクターはまた、「ウイルスベクター(virus vectors)」または「ウイルスベクター(viral vectors)」を含む。ウイルスベクターとは、外因性遺伝子を細胞に移行させるよう(ビヒクルまたはシャトルとして)外因性遺伝子と機能し得る形で連結されている操作されたウイルスである。

40

【0185】

本明細書において、「発現ベクター」は、このようなDNA断片の発現を達成できるプロモーター領域などの調節配列と機能し得る形で連結しているDNAを発現できるベクターを含む。このようなさらなるセグメントは、プロモーターおよび転写終結配列を含み得、また、所望により、1種または複数の複製起点、1種または複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含み得る。発現ベクターは、通常、プラスミドまたはウイルスDNAから導かれ、両方の要素を含有し得る。したがって、発現ベクターとは、適当な宿主細胞への導入の際に、クローニングされているDNAの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたはその他のベクターなどの組換えDNAまたはRNAコンストラクトを指す。適当な発現ベクターは、当業者には周知であり、真核

50

細胞および／または原核細胞中で複製可能であるものおよびエピソーム性のままであるものまたは宿主細胞ゲノムに組み込むものを含む。

【0186】

本明細書において、用語「オリゴヌクレオチド」および「オリゴ」は、同義的に使用される。オリゴヌクレオチドとは、制限された数のヌクレオチドの長さを含むポリヌクレオチドである。当業者ならば、オリゴヌクレオチドは、一般に、250未満または約250未満、通常、200未満または約200未満、通常、100未満または約100未満のヌクレオチド長であることは認識している。通常、本明細書において提供されるオリゴヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドである。合成オリゴヌクレオチドは、250もしくは200未満または約250もしくは約200未満のヌクレオチド長、例えば、約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190もしくは200未満のヌクレオチド長を含む。通常、オリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドである。末尾の「マー（mer）」を使用して、オリゴヌクレオチドの長さを表すことができる。例えば、「100マー」は、100ヌクレオチド長を含むオリゴヌクレオチドを指すために使用され得る。本明細書において提供される合成オリゴヌクレオチドの例示として、正鎖および負鎖オリゴヌクレオチド、無作為化オリゴヌクレオチド、参照配列オリゴヌクレオチド、鋳型オリゴヌクレオチドおよびフィルインプライマーがある。

10

【0187】

本明細書において、合成オリゴヌクレオチドとは、化学合成によって製造されたオリゴヌクレオチドである。化学的オリゴヌクレオチド合成法は、周知である。既知合成法のいずれかを使用して、提供される方法において設計され、使用されるオリゴヌクレオチドを製造してよい。例えば、合成オリゴヌクレオチドは、通常、保護基を含む単一ヌクレオチドモノマーまたはヌクレオチドトリマーを化学的に接続することによって製造される。通常、ホスホルアミダイト、保護基を含む単一のヌクレオチドが1つずつ加えられる。合成は、通常、オリゴヌクレオチドの3'末端を用いて始まる。最も3'のホスホルアミダイトが、固相支持体と結合しており、最後の5'末端に各ホスホルアミダイトを加えることによって合成が進行する。各付加の後に、最も直近に付加された塩基上の5'リン酸基から保護基を除去し、これによって別のホスホルアミダイトの付加が可能になる。自動化シンセサイザーは、一般に、オリゴヌクレオチドを最大約150～約200ヌクレオチド長まで合成できる。通常、提供される方法において設計され、使用されるオリゴヌクレオチドは、ホスホルアミダイトモノマーから標準シアノエチル化学を使用して合成される。この標準法によって製造された合成オリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA) またはTriLink Biotechnologies (San Diego, CA) から購入できる。

20

30

【0188】

本明細書において、「プライマー」とは、適当なバッファー中の適当な条件下（例えば、4種の異なるヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合剤の存在下で）、適した温度で、鋳型による（template-directed）核酸合成の開始点として作用し得る核酸分子を（より通常は、配列同一性を共有するこのような分子のプールを）指す。当然のことではあるが、特定の核酸分子は、「プローブ」として、および「プライマー」として役立ち得る。しかし、プライマーは、伸長のための3'ヒドロキシル基を有する。プライマーは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素（RT）-PCR、RNA PCR、LCR、マルチプレックスPCR、パンハンドルPCR、キャプチャーPCR、発現PCR、3'および5' RACE、インサイツ（in situ）PCR、ライゲーション介在PCRおよびその他の増幅プロトコールをはじめとする種々の方法で使用できる。

40

【0189】

本明細書において、「プライマー対」とは、増幅される（例えば、PCRによって）配列の5'末端と特異的にハイブリダイズする5'（上流）プライマーおよび増幅される配

50

列の3'末端の相補体と特異的にハイブリダイズする3'（下流）プライマーを含むプライマーのセット（例えば、2種のプライマーのプール）を指す。「プライマー」は、同一核酸分子のプールを指す場合もあるので、プライマー対は、通常、2種のプライマーのプールの対である。

【0190】

本明細書において、「単一プライマー」および「単一プライマープール」とは、同義的に、プール中の各プライマーが、その他のプライマーメンバーと配列同一性を含有するプライマーのプール、例えば、メンバーが、少なくともまたは約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を共有するプライマーのプールを指す。単一のプライマープール中のプライマー（すべて配列同一性を共有する）は、5'（上流）プライマー〔増幅される（例えば、PCRによって）配列の5'末端と特異的にハイブリダイズする〕として、また、3'（下流）プライマー（増幅される配列の3'末端の相補体と特異的にハイブリダイズする）として作用する。したがって、その他のプライマーを伴わずに、単一のプライマーを使用して、相補鎖の合成をプライムし、ポリメラーゼ増幅反応において核酸を増幅できる。

【0191】

本明細書において、2種のヌクレオチドに関して相補性とは、2種のヌクレオチドの、2種の核酸分子のハイブリダイゼーションの際に互いに塩基対を形成する能力を指す。相補性を共有する2種の核酸分子は、相補的核酸分子と呼ばれ、例示的な相補的核酸分子として、ポリヌクレオチド二本鎖中の正鎖および負鎖がある。本明細書において、核酸分子またはその領域が、別の核酸分子またはその領域と相補的である場合、2種の分子または領域は、互いに特異的にハイブリダイズする。2種の相補的核酸分子は、相補性%の観点で記載され得る。例えば、互いと特異的にハイブリダイズするが、互いに関して5つのミスマッチを含有する各100ヌクレオチド長の2種の核酸分子は、95%相補的であると言われる。2種の核酸分子について、100%の相補性でハイブリダイズするには、両分子の全長に沿って相補性が存在することが必要であるわけではない。例えば、20の連続ヌクレオチド長を含有する核酸分子は、500の連続ヌクレオチド長を含有する核酸分子のうち連続する20ヌクレオチドの部分と特異的にハイブリダイズする。この20ヌクレオチドの部分に沿ってミスマッチが生じない場合は、20ヌクレオチド分子は、100%の相補性でハイブリダイズする。通常、相補的核酸分子は、相補的ヌクレオチド間で25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満のミスマッチ（言い換えれば、少なくともまたは約75%、80%、85%、90%、95、96%、97%、98%もしくは99%の相補性）を有してアラインする。別の例では、相補的核酸分子は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%もしくは約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相補性を含有する。一例では、相補的核酸分子は、5、4、3、2または1つ未満のミスマッチしたヌクレオチドを含有する。一例では、相補的ヌクレオチドは、100%相補的である。必要に応じて、相補性のパーセンテージは、指定される。通常、2種の分子は、それらがハイストリンジェンシーの条件下で特異的にハイブリダイズするよう選択される。

【0192】

本明細書において、核酸分子の相補鎖とは、ポリヌクレオチド二本鎖中の核酸分子の反対の鎖などの分子と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド、例えば、核酸分子の配列を指す。例えば、ポリヌクレオチド二本鎖中では、正鎖オリゴヌクレオチドの相補鎖は、二本鎖中の正鎖オリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする負鎖オリゴヌクレオチドである。提供された方法の一例では、二本鎖を形成するポリヌクレオチドの相補鎖を合成するために、通常、ポリヌクレオチドにオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズすることによって始まるポリメラーゼ反応が使用される。

【0193】

本明細書において、「特異的にハイブリダイズする」とは、核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）の、別の核酸分子との相補的塩基対形成によるアニーリングを指す。当業者ならば、個々の分子の長さおよび組成などの特定のハイブリダイゼーションに影響を及ぼすインビトロおよびインビボパラメータに精通している。インビトロハイブリダイゼーションに特に関連しているパラメータとして、さらに、アニーリングおよび洗浄温度、バッファー組成および塩濃度が挙げられる。2種の核酸分子が、互いに特異的にハイブリダイズするために100%の相補性を示すことは必要ではない。例えば、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%もしくは50%の相補性または約99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%もしくは50%の相補性または少なくとももしくは約99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%もしくは50%の相補性などの配列相補性を共有する2種の相補的核酸分子が、互いに特異的にハイブリダイズできる。本明細書において提供されるインビトロハイブリダイゼーション法において使用されるパラメータ、例えば、バッファー成分、時間および温度は、2種の核酸分子の特定のハイブリダイゼーションに必要な相補性パーセントを変更するようストリンジェンシーにおいて調整できる。当業者ならば、これらのパラメータを、核酸分子の、特定の適用にとって適当な標的核酸分子との特定のハイブリダイゼーションを達成するよう容易に調整できる。

10

20

【0194】

本明細書において、「一次配列」とは、ポリペプチド中のアミノ酸残基の配列または核酸分子中のヌクレオチドの配列を指す。

【0195】

本明細書において、2種のタンパク質または核酸間の「類似性」とは、タンパク質のアミノ酸の配列または核酸のヌクレオチド配列間の関連性を指す。類似性は、残基の配列およびそれに含有される残基の同一性の程度に基づき得る。タンパク質または核酸間の類似性の程度を評価する方法は、当業者に公知である。例えば、配列類似性を評価する一方法では、2種のアミノ酸またはヌクレオチド配列を配列間で最大レベルの同一性を生じる方法でアラインする。「同一性」とは、アミノ酸またはヌクレオチド配列が不変である程度を指す。アミノ酸配列およびある程度までは、ヌクレオチド配列のアラインメントも、アミノ酸（またはヌクレオチド）における保存的相違および／または頻繁な置換を考慮し得る。保存的相違とは、関与する残基の物理化学的特性を保つものである。アラインメントは、グローバル（配列の全長にわたり、すべての残基を含む比較される配列のアラインメント）またはローカル（最も類似した領域または複数の領域のみを含む配列の一部のアラインメント）であり得る。

30

【0196】

本明細書において、ポリペプチドまたは核酸分子またはその領域が、別のポリペプチドまたは核酸分子または領域と「同一性」または「相同性」を含有するか、または有する場合、2種の分子および／または領域は、40%または約40%以上の配列同一性、通常、50%または約50%以上の配列同一性、例えば、少なくともまたは約(at least or about) 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を共有し、同一性の正確なパーセンテージは、必要に応じて指定することができる。第2の核酸分子または領域に対して同一または相同である核酸分子またはその領域は、第2の核酸分子または領域と100%相補的である核酸分子または領域と特異的にハイブリダイズできる。あるいは、同一性を2種の理論上のヌクレオチドまたはアミノ酸配列間または核酸もしくはポリペプチド分子および理論上の配列間で比較できる。

40

【0197】

配列「同一性」は、それ自体、技術分野で認識された意味を有し、2種の核酸またはポ

50

リペプチド分子または領域間の配列同一性のパーセンテージは、公開された技術を使用して算出できる。配列同一性は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全長に沿って、または分子の領域に沿って測定できる（例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991参照のこと）。2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の同一性を測定するためのいくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は、当業者には周知である [Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)]。

10

【0198】

2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全長に沿って比較される配列同一性とは、分子の全長に沿った同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを指す。例えば、ポリペプチドAが、100個のアミノ酸を有し、ポリペプチドAのアミノ酸1～95と同一であるポリペプチドBが95個のアミノ酸を有する場合には、配列同一性が、ポリペプチドBの全長と比較して、ポリペプチドAの全長に沿って比較される場合には、ポリペプチドBは95%の同一性を有する。あるいは、ポリペプチドAおよびポリペプチドB間の配列同一性は、各ポリペプチドの領域、例えば、20個のアミノ酸類似体領域に沿って比較できる。この場合には、ポリペプチドAおよびBが、その領域に沿って20個の同一のアミノ酸を有する場合には、領域の配列同一性は、100%である。あるいは、配列同一性は、別の分子の領域と比較して、分子の長さに沿って比較できる。あるいは、ポリペプチドAおよびポリペプチドB間の配列同一性は、同じ長さであるが、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換を有するポリペプチドに沿って比較できる。以下に論じられ、当業者には公知であるように、同一性を評価するための種々のプログラムおよび方法が当業者には公知である。90%または95%の同一性などの高レベルの同一性は、ソフトウェアを用いずに容易に決定できる。

20

【0199】

任意の2種の核酸分子が、少なくともまたは約(at least or about)60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一である」ヌクレオチド配列を有するかどうかは、例えば、Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444におけるようなデフォルトパラメータを使用する「FASTA」プログラムなどの既知コンピュータアルゴリズムを使用して決定できる [その他のプログラムとして、GCGプログラムパッケージ {Devereux, J. et al. (1984) Nucleic Acids Research 12(1):387}、BLASTP、BLASTN、FASTA {Altschul, S.F. et al. (1990) J. Molec. Biol. 215:403; Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994およびCarrillo et al. (1988) SIAMJ Applied Math 48:1073} が挙げられる]。例えば、National Center for Biotechnology InformationデータベースのBLAST関数を使用して同一性を決定できる。その他の市販の、または公的に入手可能なプログラムとして、DNASTar「MegAlign」プログラム (Madison, WI) およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)「Gap」プログラム (Madison WI) が挙げられる。タンパク質および/または核酸分子の相同性または同一性パーセントは、例えば、GAPコンピュータプログラム [例えば、SmithおよびWaterman {(1981) Adv. Appl. Math. 2:482} によって修正されたようなNeedleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443] を使用して配列情報を比較することによって決定できる。手短には、GAPプログラムは、2種の配列のうち短いほうの記号の総数によって除された、類似であるアラインされた記号（すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸）の数として類似性を規定する。GAPプログラムのデフォルトパラメータとして：（1）単項比較マトリックス（同一性に対して1および非同一性に対して0の値を含有する）およびSchwartz and D

30

40

50

ayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載される、Gribskov et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14:6745の加重比較マトリックス；(2) 各ギャップに対して3.0のペナルティーおよび各ギャップ中の各記号に対してさらなる0.10のペナルティーおよび(3) 末端ギャップに対するペナルティーなしが挙げられる。

【0200】

一般に、配列同一性パーセンテージの決定のためには、最高次のマッチが得られるよう配列をアラインする[例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAMJ Applied Math 48:1073参照のこと]。配列同一性のために、標準アラインメントアルゴリズムプログラムによって保存されたアミノ酸の数を決定し、各供給者によって確立されたデフォルトギャップペナルティーを用いて使用できる。実質的に相同な核酸分子は、通常、注目する核酸の長さすべてに沿って、中程度のストリンジェンシーで、または高ストリンジェンシーで特異的にハイブリダイズする。また、核酸分子のハイブリダイズにおいて、コドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子も考慮される。

【0201】

したがって、用語「同一性」とは、特定の数と関連している場合は、第1および第2のポリペプチドまたはポリヌクレオチドまたはその領域の配列間および／または理論的ヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の比較を示す。本明細書において、用語少なくとも「と90%同一である」とは、第1の核酸またはポリペプチドのアミノ酸配列に対する90~99.99の同一性パーセントを指す。90%以上のレベルでの同一性は、例示目的で100個のアミノ酸の長さの第1および第2のポリペプチドが比較されると仮定すると、第1のポリペプチド中のアミノ酸のわずか10%（すなわち、100個のうちの10個）しか、第2のポリペプチドのものと異ならないという事実を示す。同様の比較を、第1および第2のポリヌクレオチド間で行うことができる。第1および第2の配列間のこのような相違は、ポリペプチドの全長にわたって無作為に分配されたか、または最大の許容可能な、例えば、10個／100個のアミノ酸の相違（約90%の同一性）までで変動する長さの1つまたは複数の位置に密集している場合もある点突然変異として表され得る。相違は、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基置換、挿入、付加または欠失として定義される。約85~90%を超える相同性または同一性のレベルで、結果は、プログラムおよびギャップパラメータセットと無関係であり、このような高レベルの同一性は、ソフトウェアに頼らず手作業でのアラインメントによって容易に評価できることが多い。

【0202】

本明細書において、配列のアラインメントとは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の2種以上の配列をアラインするための相同性の使用を指す。通常、50%以上の同一性によって関連している2種以上の配列がアラインされる。アラインされた配列のセットとは、対応する位置でアラインされている2種以上の配列を指し、ゲノムDNA配列とアラインされた、ESTおよびその他のcDNAなどのRNAに由来するアラインしている配列を含み得る。

【0203】

関連ポリペプチドまたは変異体ポリペプチドまたは核酸分子は、当業者に公知の任意の方法によってアラインできる。このような方法は、通常、マッチを最大にし、手作業によるアラインメントを使用することおよび利用可能な多数のアラインメントプログラム（例えば、BLASTP）および当業者に公知のその他のものを使用することによるなどの方法を含む。ポリペプチドまたは核酸の配列をアラインすることによって、当業者ならば、

ガイドとして保存されたおよび同一のアミノ酸残基を使用して類似の部分または位置を同定することができる。さらに、当業者ならばまた、ガイドとして保存されたアミノ酸またはヌクレオチド残基を使用して、ヒトおよび非ヒト配列間の対応するアミノ酸またはヌクレオチド残基を見出すことができる。例えば、コンピュータシミュレーションしたタンパク質構造のアラインメントを使用することによって、対応する位置も構造アラインメントに基づくことができる。その他の例では、対応する領域も同定できる。当業者ならば、ガイドとして保存されたアミノ酸残基を使用して、ヒトおよび非ヒト配列間の対応するアミノ酸残基を見出すこともできる。

【0204】

本明細書において、「類似の」および「対応する」部分、位置または領域は、マッチを最大する当業者に公知のアラインメント法を使用して、最高次のマッチが得られるよう、2種以上の関連するポリペプチドまたは核酸配列（分子の配列、分子および／または理論上の配列の領域を含む）をアラインすると、互いにアラインされる部分、位置または領域である。言い換えれば、2種の類似の位置（または部分または領域）は、2種以上のポリペプチドまたは核酸配列のベストフィットアラインメントの際にアラインする。類似の部分／位置／領域は、2種以上の配列がアラインされる場合、直鎖核酸またはアミノ酸配列に沿った位置に基づいて同定される。類似の部分は、互いに任意の配列類似性を必ずしも共有するわけではない。例えば、各100のヌクレオチド長の2種の相同核酸分子の配列のアラインメント（マッチを最大にするような）は、100ヌクレオチドのうち70が同一であると示し得る。他の同一でない30個のアミノ酸のうち一部またはすべてを含有するこれらの核酸分子の部分は、配列同一性を共有しない類似部分である。あるいは、類似の部分は、互いに対していくらかのパーセンテージの配列同一性、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはその一部(fraction)または約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはその一部を含有し得る。一例では、類似部分は、100%同一である。

【0205】

本明細書において、「改変」とは、ポリペプチドのアミノ酸の配列または核酸分子中のヌクレオチドの配列の改変に関して、アミノ酸およびヌクレオチド、それぞれの欠失、挿入および置換を含む。組換えDNA法を使用することによってなどのポリペプチドを改変する方法は、当業者には日常的である。

【0206】

本明細書において、「欠失」とは、核酸またはポリペプチド配列に言及する場合には、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたは天然もしくは野生型配列などの配列と比較して、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の欠失を指す。

【0207】

本明細書において、「挿入」とは、核酸またはアミノ酸配列に言及する場合には、標的、天然、野生型またはその他の関連配列内に1つまたは複数のさらなるヌクレオチドまたはアミノ酸を含めることを説明する。したがって、野生型配列と比較して1つまたは複数の挿入を含有する核酸分子は、配列の直線の長さ内に1つまたは複数のさらなるヌクレオチドを含有する。本明細書において、核酸およびアミノ酸配列への「付加」とは、別の配列と比較した、いずれかの末端へのヌクレオチドまたはアミノ酸の付加を説明する。

【0208】

本明細書において、「置換」とは、天然、標的、野生型またはその他の核酸またはポリペプチド配列中の1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸を、分子の長さ（残基の数で記載される）を変更することなく、代替のヌクレオチドまたはアミノ酸と置き換えることを指す。したがって、分子中の1つまたは複数の置換は、分子のアミノ酸残基またはヌクレオチドの数を変更しない。特定のポリペプチドと比較した置換突然変異は、ポリペプチド配列の長さに沿ったアミノ酸残基の数で表すことができる。例えば、イソロイシン（Ile；I）のシステイン（Cys；C）との置換である、アミノ酸配列の19番目の

位置のアミノ酸に改変を有する改変されたポリペプチドは、I 1 9 C、I 1 e 1 9 Cまたは簡単にC 1 9と表し、改変された19番目の位置のアミノ酸がシステインであることを示すことができる。この例では、置換を有する分子は、改変されていないポリペプチドのI 1 e 1 9に改変を有する。

【0209】

本明細書において、結合特性とは、1種または複数の結合パートナーと結合するか否か、どのように結合するかに関する、分子、例えば、ポリペプチドの特徴である。結合特性として、結合パートナー（単数または複数）と結合する能力、結合パートナーと結合する親和性（例えば、高親和性）、結合パートナーと結合するアビディティ、結合パートナーとの結合の強度および結合パートナーとの結合についての特異性が挙げられる。

10

【0210】

本明細書において、親和性とは、結合パートナーなどの2種以上の分子間の相互作用の強度、通常、2種の結合パートナー間の非共有結合相互作用の強度を説明する。抗体またはその抗原結合断片の、抗原エピトープに対する親和性は、単一の抗体結合部位およびエピトープ間の総非共有結合相互作用の強度の尺度である。低親和性抗体抗原相互作用は弱く、分子は、迅速に解離する傾向があるが、高親和性抗体抗原結合は強く、分子は長期間結合しているままである。結合定数／解離定数を決定する方法など、親和性を算出する方法は周知である。親和性は、経験的に推定でき、親和性は、例えば、特定の抗原に対するある種の抗体と別の抗体の親和性を比較することによって比較的決定できる。

【0211】

20

本明細書において、抗体アビディティとは、反復エピトープまたはエピトープアレイを有する抗原と結合している複数の結合部位を含有する抗体に関してなど、多価抗体およびその同族抗原間の複数の相互作用の強度を指す。高アビディティ抗体は、低アビディティ抗体と比較して、高強度のこのような相互作用を有する。

【0212】

本明細書において、「結合する」とは、2種の分子が、互いに極接近している安定な結合をもたらす、別の分子との任意の引力相互作用における分子の関与を指す。結合として、それだけには限らないが、非共有結合、共有結合（例えば、可逆的および不可逆的共有結合）が挙げられ、それだけには限らないが、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質および薬物を含めた化学化合物などの小分子などの分子間の相互作用を含む。例示的な結合として、抗体抗原相互作用および受容体リガンド相互作用がある。抗体が、特定の抗原と「結合する」場合には、結合するとは、抗体結合部位での同族抗体抗原相互作用による抗体による抗原の特異的認識を指す。結合はまた、ジスルフィド結合によって相互作用する抗体鎖などのポリペプチドの複数の鎖の結合を含み得る。

30

【0213】

本明細書において、「親和性定数」とは、抗体の抗原に対する親和性を測定するために使用される結合定数（ K_a ）を指す。親和性定数が高いほど、抗体の抗原に対する親和性が高い。親和性定数は、モル濃度の逆数（すなわち、 M^{-1} ）の単位で表され、抗体反応（例えば、イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴または当技術分野で公知のその他の動力学的作用アッセイ）の標準の動力学的方法によって測定される結合解離反応の速度定数から算出できる。

40

【0214】

本明細書において、用語「同一の」とは、抗体結合親和性に関して使用される場合、結合定数（ K_a ）が、参照抗体の約1～100倍または1～10倍であることを意味する（参照抗体よりも1～100倍高い親和性または1～100倍低い親和性、または任意の数値もしくは範囲またはこのような範囲内の値）。

【0215】

本明細書において、「実質的に同一の」とは、結合定数（ K_a ）に関して使用される場合、結合定数が、参照抗体の結合定数、 K_a よりも約5～5000倍高いかまたは低い範囲内にあることを意味する（参照抗体よりも5～5000倍高いかまたは5000倍低い

50

）。抗体の結合親和性はまた、解離定数、 K_d として表される場合もある。解離定数は、結合定数、 K_d の逆数 $=1/K_a$ である。

【0216】

本明細書において、語句「同一の結合特異性を有する」とは、別の抗体に関して抗体を説明するために使用される場合は、抗体が参照抗体と同一の抗原エпитーブのすべてまたは一部と特異的に結合する（ウイルスと免疫特異的に結合するか、または特異的に結合する）ことを意味する。したがって、58c5としてまたは30D8として示される抗体と同一の結合特異性を有する抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、58c5としてまたは30D8としてそれぞれ示される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同一のエピトープのすべてまたは一部と特異的に結合する。エピトープは、単離されたタンパク質中か、またはウイルス中のタンパク質中にあり得る。2種の抗体の同一エピトープと結合する能力は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイおよび抗体競合アッセイなどの当技術分野で公知のアッセイによって調べることができる。通常、同一エピトープと免疫特異的に結合する抗体は、エピトープとの結合について競合し得、これは、例えば、当技術分野で公知の技術を使用するインビトロ結合競合アッセイ（例えば、競合ELISA）によって測定できる。通常、第2の抗体と同一のエピトープと免疫特異的に結合する第1の抗体は、エピトープとの結合について30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%または約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%競合し得、これでは、競合パーセンテージは、第2の抗体の、エピトープとの第1の抗体の結合を置き換える測定された能力である。例示的競合アッセイでは、抗原は、標識された抗体の所定の制限希釈（例えば、50~70%飽和濃度）および標識されていない競合抗体の段階希釈の存在下でインキュベートされる。競合は、標識された抗体の抗原との結合を、競合抗体の存在下での結合の任意の低減について測定することによって決定される。種々の標識技術および例えば、放射測定検出、蛍光検出、酵素検出および比色検出を含めた検出法をはじめとするこのようなアッセイの変動は、当技術分野で公知である。第1の抗体の、第2の抗体と同一のエピトープと結合する能力はまた、例えば、モノクローナル抗体耐性突然変異体（Monoclonal Antibody-Resistant Mutants）（MARM）を使用するウイルス中和アッセイによっても決定できる。例えば、第1の抗RSV抗体が、野生型RSVを中和するが、特定の突然変異体RSVを中和しない場合、野生型RSVを中和するが、特定の突然変異体RSVを中和しない第2の抗体は、通常、第1の抗体と同一のRSV上のエピトープと結合する。第1の抗RSV抗体が野生型RSVを中和するが、特定の突然変異体RSVを中和しない場合、野生型RSVを中和し特定の突然変異体RSVを中和する第2の抗体は、通常、第1の抗体と同一のRSV上のエピトープとは結合しない。

【0217】

本明細書において、「モノクローナル抗体エスケープ突然変異体」とも呼ばれる「モノクローナル抗体耐性突然変異体」（MARM）は、野生型RSVウイルスを中和するモノクローナル抗体による中和に対して耐性を示す突然変異体呼吸器合胞体ウイルス（RSV）である。実際に、RSV MARMの50%を中和するために必要な抗体の濃度は、少なくとも、MARMが抗体を逃れたと考えられるべき対照野生タイプの伝染性ウイルス粒子の等価量を中和するのに要求されるもの、またはそれより少なくとも10倍大きくなければならない。

【0218】

MARMは、ウイルス複製の各連続ラウンド後に、ウイルス中和作用を生じるのに漸増濃度の抗体が必要であるように、そのような抗体の存在下でのウイルス複製の連続ラウンドにわたってモノクローナル抗体の存在下で野生型RSVを培養することによって作製する。細胞変性作用（CPE）のみは、もはや抗体によって効率的に中和されない突然変異体ウイルスが生じるまで漸増濃度の抗体の存在下で観察される。MARMの出現のために、第2の抗体と比較して、第1の抗体の存在下で、複製のより多くのラウンドが必要である場合には、第1の抗体は、第2の抗体が結合するエピトープとは異なるエピトープと結

合すると結論づけることができる。第1の抗体が、第2の抗体に対して生じたMAR Mを中和できる場合は、抗体は異なるエピトープと特異的に結合するか、または相互作用すると結論づけることができる。MAR Mは、競合結合アッセイと比較して、抗体の抗原結合エピトープをより精密にマッピングでき、その結果、ある抗体は、抗原との結合について別のものと競合し得るが、その競合物のMAR Mを中和できる。いくつかの抗体について、MAR Mを生成することは選定の少数（2、3）のラウンドを要求するだけであり、他の抗体について、より多くのラウンドが必要とされる。本明細書に提供される一定の抗体に関しては、MAR MSは10、11、12、13、14、15、20、25、30またはそれより多くのラウンド後に発生しない。いくつかの場合には、MAR Mを生成することは不可能である。

10

【0219】

本明細書において、 EC_{50} とは、例えば、本明細書において記載されるウイルスプラーク減少アッセイ（例えば、感染のためにVer o宿主細胞またはその他の宿主細胞を使用するプラーク減少アッセイ）または当技術分野で公知のその他のウイルス中和アッセイなどのインビトロ中和アッセイにおいて、抗体が、ウイルス感染を50%阻害し得る有効な濃度を指す。通常、中和ウイルスとは、ウイルスプラーク減少アッセイなどのインビトロ中和アッセイにおけるウイルスの阻害について、2 n M以下の EC_{50} を有するものである。

【0220】

本明細書において、「結合パートナー」とは、別の分子が、例えば、共有結合的または非共有結合的相互作用、例えば、抗体の同族抗原との相互作用によって特異的に相互作用する分子（ポリペプチド、脂質、糖脂質、核酸分子、炭水化物またはその他の分子など）を指す。結合パートナーは、天然にまたは合成によって生じ得る。一例では、所望の変異体ポリペプチドは、例えば、インビトロまたはインビボ法を使用して、1種または複数の結合パートナーを使用して選択される。例示的なインビトロ法として、固相支持体、例えば、ビーズ、プレート、カラム、マトリックスまたはその他の固相支持体とカップリングしている結合パートナーを使用する選択または別の選択可能な分子、例えば、ビオチン分子とカップリングしている結合パートナーを使用する選択と、それに続く、その他の選択可能な分子と固相支持体とのカップリングによるその後の選択が挙げられる。通常、インビトロ法は、結合していないポリペプチドを除去するための洗浄ステップと、それに続く、選択された変異体ポリペプチド（単数または複数）の溶出を含む。このプロセスは、選択されたポリペプチドの中から変異体ポリペプチドを選択するための反復性のプロセスにおいて1回または複数回反復され得る。

20

30

【0221】

本明細書において、ジスルフィド結合（S-S結合またはジスルフィド橋とも呼ばれる）は、チオール基のカップリングに由来する共有単結合である。タンパク質中のジスルフィド結合は、システイン残基のチオール基間に形成され、抗体ドメインなどのポリペプチドドメイン間の相互作用を安定化する。

【0222】

本明細書において、「カップリングされた」かまたは「コンジュゲートされた」とは、共有結合的または非共有結合的相互作用によって結合していることを意味する。

40

【0223】

本明細書において、語句「抗体にコンジュゲートされた」かまたは「抗体に連結している」またはその文法的変異は、診断用または治療用部分などの部分の、抗体またはその抗原結合断片との結合に関する場合、部分が、ペプチドを結合するための任意の公知の手段によって、例えば、組換え手段による融合タンパク質の製造によって、または翻訳後に化学的手段などによって、抗体またはその抗原結合断片と結合していることを意味する。コンジュゲーションは、コンジュゲーションを達成するために種々の連結剤、例えば、それだけには限らないが、ペプチドまたは化合物リンカーまたは化学的架橋剤のいずれも使用してよい。

50

【0224】

本明細書において、「ファージディスプレイ」とは、繊維状バクテリオファージの表面でのポリペプチドの発現を指す。

【0225】

本明細書において、「ファージディスプレイ適合細胞」または「ファージディスプレイ適合宿主細胞」とは、ファージに感染し得、したがって、ポリペプチド、例えば、変異体ポリペプチドを含有するファージがディスプレイする融合タンパク質の産生を支持することができ、したがって、ファージディスプレイのために使用できる宿主細胞である、通常、細菌宿主細胞である。例示的なファージディスプレイ適合細胞として、それだけには限らないが、XL1-blue細胞が挙げられる。

10

【0226】

本明細書において、「パニング」とは、結合パートナー、例えば、捕獲分子（例えば、抗原）またはアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列またはその中のエピトープ、領域、部分もしくは遺伝子座に対して特異性を有する、ファージがディスプレイする分子の単離のための親和性ベースの選択手順を指す。

【0227】

本明細書において、「ディスプレイタンパク質」または「遺伝子パッケージディスプレイタンパク質」とは、ディスプレイタンパク質が注目するポリペプチド（例えば、発現の低減が望まれるポリペプチド）と融合している（例えば、融合タンパク質の一部として含まれる）場合には、ポリペプチドが、遺伝子パッケージの外表面上にディスプレイされるような、遺伝子パッケージ上にポリペプチドをディスプレイするための任意の遺伝子パッケージポリペプチドを意味する。ディスプレイタンパク質は、通常、遺伝子パッケージ、例えば、ファージなどのウイルスの遺伝子パッケージの、遺伝子パッケージの外表面または外コンパートメント（例えば、膜、細胞壁、コートまたはその他の外表面またはコンパートメント）上もしくは内に存在し、その結果、注目するポリペプチドへの融合の際に、ポリペプチドが遺伝子パッケージ上にディスプレイされる。

20

【0228】

本明細書において、コートタンパク質は、少なくとも一部が遺伝子パッケージの外表面に存在するディスプレイタンパク質であり、その結果、注目するポリペプチドと融合されると、ポリペプチドが遺伝子パッケージの外表面上にディスプレイされる。通常、コートタンパク質は、ファージコートタンパク質などのウイルスコートタンパク質である。ファージコートタンパク質などのウイルスコートタンパク質は、宿主細胞におけるアセンブリの間ウイルス粒子と会合する。一例では、コートタンパク質は、本明細書において、遺伝子パッケージ上でのポリペプチドのディスプレイのために使用され、コートタンパク質は、アミノ酸のコートタンパク質配列およびディスプレイされるポリペプチドのアミノ酸の配列を含有する融合タンパク質の一部として発現される。コートタンパク質は、全長コートタンパク質であっても、遺伝子パッケージの表面上のポリペプチドのディスプレイを達成できるその任意の一部であってもよい。

30

【0229】

例示的なコートタンパク質として、ファージコートタンパク質、例えば、それだけには限らないが、(i) 遺伝子IIIタンパク質 (gIIIp, cp3) などの繊維状ファージのマイナーコートタンパク質、(ii) 遺伝子VIIタンパク質 (gVIIp, cp8) などの繊維状ファージのメジャーコートタンパク質 (10コピー以上、例えば、数十、数百または数千のコピーでウイルスコート中に存在する)；遺伝子VIタンパク質、遺伝子VIIタンパク質または遺伝子IXタンパク質（例えば、WO00/71694参照のこと）などのその他のファージコートタンパク質との融合物；およびそれだけには限らないが、例えば、gIIIpまたはgVIIpのアンカードメインなどのファージ粒子中に安定に組み込まれているドメインなどのこれらのタンパク質の一部（例えば、ドメインまたは断片）などがある。さらに、突然変異体gVIIpなどの改善された表面ディスプレイ特性を有する突然変異体などの、大きなペプチドの発現のために最適化されてい

40

50

る g V I I I p の突然変異体を使用してもよい〔例えば、Sidhu et al. (2000) J. Mol. Biol. 296:487-495参照のこと〕。

【0230】

本明細書において、「疾患または障害」とは、それだけには限らないが、感染症、後天的な状態、遺伝的な状態をはじめとする原因または状態に起因する生物における病状を指し、同定可能な症状を特徴とする。本明細書において注目する疾患および障害として、R S V 感染を含むものまたは R S V 感染のリスクを高めるものがある。

【0231】

本明細書において、「感染」および「R S V 感染」とは、宿主における R S V 生活環のすべての段階（それだけには限らないが、細胞または身体組織における R S V による侵入および R S V の複製を含む）ならびに R S V による侵入および R S V の複製に起因する病的状態を指す。R S V による侵入および R S V の増殖は、それだけには限らないが、以下のステップ：R S V 粒子を細胞とドッキングするステップ、ウイルスを細胞膜と融合するステップ、ウイルスの遺伝情報を細胞に導入するステップ、R S V タンパク質を発現するステップ、新規 R S V 粒子を製造し、細胞から R S V 粒子を放出するステップを含む。R S V 感染は、上気道 R S V 感染（U R I）、下気道 R S V 感染（L R I）またはそれらの組合せであり得る。いくつかの例では、R S V による侵入および R S V の複製に起因する病的状態は、急性 R S V 疾患である。

【0232】

本明細書において、「急性 R S V 疾患」とは、R S V 感染の結果として肺または下気道における臨床的に重要な疾患を指し、これは、肺炎および／または細気管支炎として現れることがあり、これではこのような症状として、例えば、低酸素症、無呼吸、呼吸困難、速い呼吸、喘鳴音およびチアノーゼが挙げられる。急性 R S V 疾患は、罹患個体に入院、酸素の投与、挿管および／または人工呼吸などの医学的介入を受けるように求める。

【0233】

本明細書において、疾患または状態を有する対象を「治療すること」とは、治療後、対象の症状が部分的または完全に軽減されるか、または変化しないままであることを意味する。したがって、治療は、予防、治療および／または治癒を包含する。予防とは、潜在的な疾患の防止および／または症状の悪化もしくは疾患の進行の防止を指す。治療とは、本明細書において提供される任意の抗体またはその抗原結合断片の、または提供される組成物の任意の薬剤使用も包含する。

【0234】

本明細書において、「防止」または予防およびその文法的に同等の形態とは、疾患または状態を発症するリスクが低減される方法を指す。

【0235】

本明細書において、「治療的に有効な薬剤」とは、それだけには限らないが、例えば、麻酔薬、血管収縮薬、分散剤、従来の治療薬物、例えば、小分子薬および治療用タンパク質をはじめとする任意の治療薬または生物活性剤を含む。

【0236】

本明細書において、「治療効果」とは、疾患もしくは状態の症状を変更、通常、改善または寛解させるか、または疾患もしくは状態を治癒する、対象の治療に起因する効果を意味する。

【0237】

本明細書において、「治療上有効な量」または「治療上有効な用量」とは、少なくとも、対象への投与後に治療効果を生じさせるのに十分である、薬剤、化合物、物質または化合物を含有する組成物の量を指す。したがって、疾患または障害の症状を予防、治癒、寛解、停止または部分的に停止するのに必要な量である。

【0238】

本明細書において、「治療効力」とは、薬剤、化合物、物質または化合物を含有する組成物の、薬剤、化合物、物質または化合物を含有する組成物が投与された対象において治

10

20

30

40

50

療効果を生じさせる能力を指す。

【0239】

本明細書において、「予防的に有効な量」または「予防的に有効な用量」とは、対象に投与された場合に、意図される予防効果、例えば、疾患もしくは症状の発症もしくは再発の防止もしくは遅延、疾患もしくは症状の発症もしくは再発の可能性の低減またはウイルス感染の罹患率の低減を有する、薬剤、化合物、物質または化合物を含有する組成物の量を指す。完全な予防効果は、1用量の投与によって必ずしも起こるわけではなく、一連の用量の投与後にのみ起こる場合もある。したがって、予防的に有効な量は、1回または複数回の投与で投与され得る。

【0240】

本明細書において、用語「免疫療法的に」または「免疫療法」とは、提供される抗体と併用して、予防的投与ならびに治療的投与を示す。したがって、提供される治療用抗体は、疾患の可能性および／または重篤度を減らすためにウイルス感染（例えば、RSV感染）に罹患するリスクのある対象へ投与され得るか、または活性なウイルス感染（例えば、RSV感染）をすでに証明している対象に投与される。

【0241】

本明細書において、医薬組成物またはその他の治療薬の投与などによる特定の疾患または障害の症状の寛解とは、組成物または治療薬の投与に起因し得るか、またはそれと関連している、永久的または一時的、持続性または一過性に関わらない症状の任意の低減を指す。

【0242】

本明細書において、用語「診断上有効な」量とは、少なくとも、対象への投与後の化合物の検出にとって十分である、薬剤、化合物、物質または検出可能な化合物を含有する組成物の量を指す。一般に、検出可能に標識された抗体もしくはその抗原結合断片または検出のために対象に投与される、第2の薬剤によって検出され得る抗体もしくはその抗原結合断片などの抗RSV抗体またはその抗原結合断片の診断上有効な量とは、それに対して抗体またはその抗原結合断片が特異的である、RSV抗原を有する部位の検出を可能にするのに十分である抗体またはその抗原結合断片の量である。抗原のインビボ検出のために本明細書において提供される抗体を使用することでは、検出可能に標識された抗体またはその抗原結合断片は、診断上有効な用量で与えられる。

【0243】

本明細書において、標識または検出可能な部分は、分子（例えば、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片）と直接的または間接的に結合または連結され得るか、それと会合され得、インビボおよび／またはインビトロで検出され得る検出可能なマーカー〔例えば、蛍光分子、化学発光分子、生物発光分子、造影剤（例えば、金属）、放射性核種、発色団、検出可能なペプチドまたは検出可能な生成物の形成を触媒する酵素〕である。検出法は、既知インビボおよび／またはインビトロ検出法〔例えば、目視検査、磁気共鳴（MR）分光法、超音波シグナル、X線、γ線分光法（例えば、陽電子放射型断層撮影（法）（PET）スキャニング、単一光子放出コンピューター断層撮影法（SPECT））、蛍光分光法または吸収によるイメージング〕をはじめとする当技術分野で公知の任意の方法であり得る。間接検出とは、検出可能な部分と直接的または間接的に結合する原子、分子または組成物の、エネルギーまたは粒子放出または吸収などの物理現象の測定（例えば、一次抗体と結合する標識された二次抗体またはその抗原結合断片（例えば、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の検出）を指す。

【0244】

本明細書において、用語「対象」とは、ヒトなどの哺乳類を含めた動物を指す。

【0245】

本明細書において、患者とは、ヒト対象を指す。

【0246】

本明細書において、動物とは、それだけには限らないが、ヒト、ゴリラおよびサルをはじめとする霊長類；マウスおよびラットなどのげっ歯類；ニワトリなどの家禽；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどの反芻動物；ブタおよびその他の動物などの任意の動物を含む。非ヒト動物は、考慮される動物としてヒトを除外する。本明細書において提供されるポリペプチドは、任意の供給源、動物、植物、原核生物および真菌に由来するものである。ほとんどのポリペプチドは、哺乳類起源をはじめ、動物起源のものである。

【0247】

本明細書において、「高齢の」とは、年齢のために免疫応答が低減した、ワクチン接種に対する応答が減少した対象を指す。通常、高齢の対象とは、65歳以上の、より一般には、70歳以上のヒトである。

10

【0248】

本明細書において、「ヒト乳児」とは、約24ヶ月以下のヒト（例えば、約16ヶ月以下、約12ヶ月以下、約6ヶ月以下、約3ヶ月以下、約2ヶ月以下または約1ヶ月以下の年齢）を指す。通常、ヒト乳児は、38週を超える妊娠期間で誕生する。

【0249】

本明細書において、「未熟児で生まれたヒト乳児」とは、約40週以下の妊娠期間、通常、約38週以下の妊娠期間で生まれたヒトを指す。

【0250】

本明細書において、「単位用量形態」とは、ヒトおよび動物対象にとって適した、当技術分野で公知のように個々にパッケージングされている物理的に別個の単位を指す。

20

【0251】

本明細書において、「単回投与製剤」とは、直接投与のための製剤を指す。

【0252】

本明細書において、「製造品」とは、製造され、販売されている製品である。本出願を通じて使用されるように、この用語は、パッケージング品に含有される本明細書において提供される組成物のいずれも包含するよう意図される。

【0253】

本明細書において、「流体(fluid)」とは、流れることができる任意の組成物を指す。したがって、流体は、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリームおよびその他のこのような組成物の形態にある組成物を包含する。

30

【0254】

本明細書において、単離または精製されたポリペプチドまたはタンパク質（例えば、単離された抗体またはその抗原結合断片）またはその生物学的に活性な部分（例えば、単離された抗原結合断片）は、タンパク質が由来する細胞もしくは組織に由来する細胞物質もしくはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合には化学前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、このような純度を評価するために当業者によって使用される、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）などの分析の標準法によって決定されるように、容易に検出可能な不純物を含まないと思われる場合は、実質的に含まないと決定され得るか、またはさらなる精製が、物質の、酵素活性および生物活性などの物理的および化学的特性を検出可能に変更しないよう十分に純粋であると決定され得る。実質的に化学的に純粋な化合物を製造するための化合物の精製方法は、当業者に公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であり得る。このような例では、さらなる精製は、化合物の比活性を増大し得る。本明細書において、「細胞抽出物」または「溶解物」とは、溶解されたか、または破壊された細胞から製造した調製物または画分を指す。

40

【0255】

本明細書において、単離された核酸分子とは、核酸分子の天然供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、組換え技術によって製造される場合には、その他の細胞性物質もしくは培養培地を

50

実質的に含まないか、または化学的に合成される場合には化学前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。本明細書において提供される例示的な単離された核酸分子として、提供される抗体または抗原結合断片をコードする単離された核酸分子が挙げられる。

【0256】

本明細書において、「対照」とは、試験パラメータで処理されていないか、または血漿サンプルである場合には、注目する状態に冒されていない正常なボランティアから得たものであり得る点を除いて、試験サンプルと実質的に同一であるサンプルを指す。対象はまた、内部対照でもあり得る。

【0257】

本明細書において、「組成物」とは、任意の混合物を指す。溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0258】

本明細書において、「組合せ」とは、2種以上の品目の間の任意の関連を指す。組合せは、2種の組成物または2種の収集物などの2種以上の別個の品目であり得、2種以上の品目の単一の混合物またはその任意の変動などのそれらの混合物であり得る。組合せの要素は、一般に、関連または関係している。

【0259】

本明細書において、併用療法とは、2種以上の異なる抗RSV抗体および／または抗RSV抗体およびその抗原結合断片などの2種以上の異なる治療薬の投与を指す。異なる治療薬は、別個に、逐次、断続的に提供および投与してもよく、単一の組成物中で提供してもよい。

【0260】

本明細書において、キットとは、それだけには限らないが、生物活性または特性の活性化、投与、診断および評価をはじめとする目的のために、所望により、さらなる試薬および組合せまたはその要素を使用するための説明書などのその他の要素を含んでもよい、パッケージングされた組合せである。

【0261】

本明細書において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、明確に別に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「免疫グロブリンドメイン」を含むポリペプチドへの言及は、1つまたは複数の(a plurality of)免疫グロブリンドメインを有するポリペプチドを含む。

【0262】

本明細書において、用語「または」は、代替物のみを指すよう明確に示されない限り、または代替物が互いに排他的でない限り、「および／または」を意味するよう使用される。

【0263】

本明細書において、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表され得る。約はまた、正確な量も含む。したがって、「約5個のアミノ酸」とは、「約5個のアミノ酸」および「5個のアミノ酸」も意味する。

【0264】

本明細書において、「所望の」または「所望により」とは、続いて記載される事象または状況が生じるか、または生じないことおよび記載が前記事象または状況が生じる例および生じない例を含むこと意味する。例えば、所望により変異体部分とは、部分が変異体または非変異体であることを意味する。

【0265】

本明細書において、任意の保護基、アミノ酸およびその他の化合物の略語は、別に示されない限り、その一般的な用法、認識されている略語またはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureに一致している[Biochem. (1972) 11(9):1726-1732参照のこと]。

10

20

30

40

50

【0266】

B. 概説

【0267】

呼吸器合胞体ウイルスと結合し、それを中和する、抗RSV抗体またはその抗原結合断片が提供される。本明細書において提供される抗RSV抗体は、RSVの表面上の1種または複数のエピトープを認識する中和抗体である。特に、本明細書において提供される抗体は、RSV融合(F)タンパク質と結合する。本明細書において提供される抗体は、予防治療において使用され得る。本明細書において提供される抗体はまた、治療薬として使用され得る。

【0268】

例えば、提供される抗体は、それだけには限らないが、対象間のウイルス伝達の阻害、宿主におけるウイルス感染の確立の阻害および対象中のウイルス量の低減をはじめとする、病原性疾患の予防および／または伝播のために使用され得る。抗体はまた、RSV感染の1種または複数の症状を予防、治療および／または軽減するためにか、またはRSV感染期間の低減のために使用され得る。したがって、本明細書において提供される抗体での患者の治療は、RSV感染と関連している死亡率および／または罹患率を低減し得る。

【0269】

RSV残留性は、抗体によって中和され得ないエスケープ突然変異体の生成と関連している。したがって、治療用抗ウイルス抗体の開発への主な課題は、1) 種々の株または血清型にわたって保存されている中和エピトープおよび2) エスケープ突然変異体を作製するためにウイルスを進化させることが困難な中和エピトープを有する抗体の作製または同定である。本明細書において提供される抗体は、種々のRSVサブグループおよび株と結合する。本明細書において提供される抗体はまた、先行技術における既存の抗体と比較して、改善されたウイルス中和活性を示す。提供される抗体は、複製の連続ラウンドにわたってウイルスを有効に中和し、これでは、RSVは、通常、中和に抵抗するエスケープ突然変異体を作製する。MARIMの作製を制限する能力とは、本明細書において提供される抗体が、作製されたエスケープ突然変異体の形態における変動に対して感受性が低いエピトープと結合することを意味する。したがって、このエピトープは、その他の既知抗RSV抗体のエピトープとは異なる。したがって、提供される抗RSV抗体は、予防治療に加えて、RSV感染の治療にとっても有用である。現在、RSV感染に対する、公知の承認された抗体治療薬はない。そのようなものとして、本明細書において提供される抗体は、高齢の患者、例えば、近接によって、患者間のウイルス伝播のリスクが高まるグループホームまたは老人ホームの人の間でRSV感染の治療にとって特に重要である。パリビズマブを用いるRSVの予防治療におけるノンコンプライアンスが、ウイルス耐性を引き起こすことに次第につながっているため、本明細書において提供される抗体での治療はまた、投与計画に対するノンコンプライアンスがウイルスエスケープのリスクを高める状況において重要である [例えば、Adams et al., (2010) Clin Infect Dis. 51(2):185-188]。

【0270】

一般に、本明細書において提供される抗RSV抗体は、高親和性でRSV Fタンパク質と結合する。既存の承認された抗RSV抗体 [例えば、パリビズマブ; Synagis^(R) (商標)] と比較して、本明細書において提供される高親和性抗RSV抗体によって、RSV感染を予防および／または治療するための、RSV感染の1種または複数の症状を治療および／または軽減するための、またはRSV感染期間を低減するためのあまり頻繁ではない投与が可能になる。したがって、本明細書において提供される抗RSV抗体は、治療用抗体として、すなわちRSV感染の治療のために有用である。あまり頻繁でない投与によって、投与計画に対する容易なコンプライアンスが可能となり、したがって、抗RSV抗体に対するウイルス耐性の増大につながる飲み忘れた投与量の可能性が少なくなる。RSVと免疫特異的に結合する低用量の抗体はまた、免疫グロブリン療法の有害作用の可能性も低減し得る。

【0271】

一般に、本明細書において提供される抗 R S V 抗体は、例えば、ウイルスの標的細胞膜との会合、ウイルスの標的細胞膜との融合および／または細胞侵入、新規ウイルス粒子の製造などのウイルスの 1 つまたは複数の活性を阻害または低減する能力、例えば、ウイルス複製または感染細胞の別の細胞の細胞間融合（すなわち、合胞体形成）の阻害を有する。提供される抗 R S V 抗体はまた、R S V 感染に対する免疫応答を増大するために使用され得る。

【0272】

1. 呼吸器合胞体ウイルス

【0273】

ヒト R S V は、パラミクソウイルス科のニューモウイルスサブファミリーのメンバーである。ヒト R S V の 2 種の別個のサブグループ、グループ A およびグループ B がある。さらに、各サブタイプは 2 種の株、A 1 および A 2 ならびに B 1 および B 2 にさらに分けられる。R S V は、11 種のウイルスタンパク質をコードする約 15,000 のヌクレオチドからなるゲノムを有する、エンベロープ型の、非分割型の、ネガティブセンス RNA ウイルスである。

10

【0274】

R S V は、2 種の主要な表面糖タンパク質、糖タンパク質 G および糖タンパク質 F をコードする。糖タンパク質 G すなわち、結合タンパク質が、細胞受容体とのウイルス結合を媒介するのに対し、糖タンパク質 F、すなわち、融合タンパク質は、ウイルスおよび細胞膜の融合を促進し、ウイルスのリボ核タンパク質の細胞の細胞質への浸透を可能にする [Lopez et al. (1998) J. Virology 72:6922-6928]。糖タンパク質 F はまた、感染細胞の膜の、隣接する細胞のものと融合も促進し、これは、合胞体の形成につながる。F タンパク質は、不活性の、N-グリコシル化前駆体のタンパク質分解切断によって生じる、2 種のジスルフィド結合されたサブユニット F₁ および F₂ を含有する。G タンパク質は、32 kDa の前駆体タンパク質と結合している N-結合型および O-結合型オリゴ糖を含有する 80~90 kDa の II 型膜貫通糖タンパク質である。

20

【0275】

R S V F または G 糖タンパク質に対して調製された抗体は、R S V をインビトロで高効率に中和し、インビボで予防効果を有することがわかっている [例えば、Walsh et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 67:505; Beeler et al. (1989) J. Virol. 63:2941-2950、Garcia-Borreno et al. (1989) J. Virol. 63:925-932、Taylor et al. (1984) Immunology 52:137-142 および米国特許第 5,824,307 号および同 6,818,216 号参照のこと]。R S V F タンパク質に対する抗体はまた、R S V 感染細胞の、隣接する非感染細胞との融合の阻害においても有効である。

30

【0276】

R S V F タンパク質と免疫特異的に結合する種々のモノクローナル抗体の分析は、3 つの重複しない抗原部位、A、B および C および 1 つの架橋部位、A B の同定につながった [Beeler et al. (1989) J. Virol. 63:2941-2950]。抗原部位の各々は、別個のエピトープを含有する。1 つの研究では、18 種のモノクローナル抗体のパネルの 1 つの研究において、抗原部位 A の 5 種のエピトープ、抗原部位 B の 4 種のエピトープおよび抗原部位 C の 4 種のエピトープが、モノクローナル抗体エスケープ突然変異体 (MARM) に基づいて同定された [例えば、Beeler et al. (1989) J. Virol. 63:2941-2950 参照のこと]。抗原部位 A エピトープ 4 と結合するモノクローナル抗体 1129 [Beeler et al. (1989) J. Virology 63(7):2841-2950] は、それからヒト化パリビズマブ (SYNAGIS (登録商標)) が作製された親抗体である [Johnson et al. (1997) J. Infect. Diseases 176:1215-1224 および米国特許第 5,824,307 号参照のこと]。さらなる R S V F タンパク質エピトープも同定されている。例えば、ヒト抗 R S V Fab 断片 Fab19 [Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10164-10168 および Crowe et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1386-1390 参照のこと] は、Beeler らによって同定されたエピトープとは異なる抗原部位 A 中のエピトープと結合する [Crowe et al.

40

50

(1998) Virology 252:373-375およびBarbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 89:10164-10168参照のこと]。

【0277】

R S V Fタンパク質は、R S V AおよびBサブグループにわたって91%を超える類似性を示すのに対し、R S V Gタンパク質は、R S V AおよびR S V Bサブグループ間で53%のアミノ酸類似性しか示さない[Sullender (2000) Clin. Microbiol. Rev. 13:1-15]。AおよびBウイルスサブタイプは、ほとんどのR S V伝染病において同時に循環するので、本明細書において提供される抗R S V抗体または抗原結合断片などのR S VのAおよびBサブタイプを中和する抗体が望ましい。

【0278】

ヒトR S Vは、ほとんどのRNAウイルスのように、選択圧の下で迅速な変異を受ける能力を有する。R S Vエスケープ変異体(MARMS)のインビトロでのモノクローナル抗体を用いた選択はよく実証されている[例は、Garcia-Borreno et al. (1989) J. Virol. 63:925-932参照]。例えば、R S V A2 Fタンパク質において、アミノ酸残基N262、I266、N268、K272、S275、N276、P389またはR429での単一アミノ酸変異またはF32およびK272またはA241およびK421での二重アミノ酸変異は、知られている抗R S Vモノクローナル抗体のエスケープをもたらすことが示された[例は、Crowe et al. (1998) Virology 252:373-375; Zhao et al., (2004) J. Infectious Disease 190:1941-1946およびLiu et al., (2007) Virology Journal 4:71参照]。加えて、パリビズマブ(SYNAGIS[®])は、インビトロならびにインビボで、エスケープ変異用の選択のために示され、およびいくつかの分離された変異体はコトラットにおいてパリビズマブ予防法に対して十分に耐性であった[例は、Zhao et al. (2005) J. Virol. 79:3962-3968およびZhao et al. (2004) J. Infect. Dis. 190:1941-1946参照]。例えば、R S V Fタンパク質での単一アミノ酸変異は、パリビズマブからのエスケープを招くことが例証された[Zhao et al., (2004) J. Infectious Disease 190:1941-1946参照]。このように、エスケープ変異の生成を伴わずに、複製の連続するラウンドにわたってR S Vウイルスを効果的に中和する抗体で、ここに提供される抗R S V抗体または抗原結合断片のようなものが好適である。

【0279】

呼吸器合胞体ウイルス(R S V)感染は、乳児および小児における下気道疾患の主な原因である。R S V感染はまた、米国では、細気管支炎または肺中の小さい気道の炎症および1歳未満の幼児における肺炎の最も一般的な原因である。さらに、R S V感染はまた、高齢者における呼吸器疾患の重要な原因としても認識されている。R S V感染と関連している症状および状態として、例えば、喘息、喘鳴音、反応性気道疾患(RAD)および慢性閉塞性肺疾患(COPD)が挙げられる。したがって、本明細書において記載されるように、本明細書において提供される抗R S V抗体は、R S V感染の予防および治療のためにおよび／またはこのようなR S V媒介性疾患の1種または複数の症状の軽減のために使用され得る。

【0280】

C. 抗R S V抗体

【0281】

治療用、予防用および診断用に使用され得る抗R S V抗体またはその抗原結合断片が本明細書において提供される。本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、例えば、R S Vに対する対象の受動免疫のために、またはウイルス感染を有する対象の治療のために使用され得る。一例では、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、予防、すなわち、R S V感染の防止のために使用される。別の例では、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、治療用抗体として、すなわち、R S Vウイルス感染の治療のために使用される。さらに別の例では、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、R S Vに対する対象の受動免疫のために使用される。提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断

片はまた、インビトロおよびインビボでの R S V 感染の検出のために、または R S V 感染のモニタリングのために使用され得る。

【0282】

1. 一般的な抗体構造および機能ドメイン

【0283】

抗体は、膜結合型および分泌型で B 細胞によって天然に産生される。抗体は、同族相互作用によって、抗原エピトープを特異的に認識し、結合する。同族抗原と結合する抗体は、毒素、病原体およびその他の感染性病原体の中和およびクリアランスを引き起こす複数のエフェクター機能を開始できる。

【0284】

10

抗体特異性における多様性は、B 細胞発達の間の組換え事象によって天然に生じる。これらの事象を通じて、抗体分子の可変領域をコードする、複数の抗体 V、D および J 遺伝子、セグメントの種々の組合せが、定常領域遺伝子と接続されて、多数の多様な抗体を有する天然抗体レパートリーが生じる。ヒト抗体レパートリーは、 10^{10} を超える種々の抗原特異性を含有し、したがって、理論的には、あらゆる外来抗原を特異的に認識することができる。抗体は、このような天然に産生された抗体ならびに合成によって、すなわち、組換えによって製造された抗体、例えば、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片をはじめとする抗体断片を含む。

【0285】

フォールディングされた抗体ポリペプチドでは、結合特異性は、重鎖および／または軽鎖可変領域ドメインの部分を含む抗原結合部位ドメインによって付与される。抗体分子上のその他のドメインは、シグナル伝達ならびにその他の細胞、ポリペプチドおよび生体分子との相互作用などの事象に参加することによってエフェクター機能を果たす。これらのエフェクター機能は、抗体によって認識される感染性病原体の中和および／またはクリアランスを引き起こす。抗体ポリペプチドのドメインは、特定の特性を変更するために本明細書における方法に従って変化させることができる。

20

【0286】

a. 抗体の構造的および機能ドメイン

【0287】

全長抗体は、複数の鎖、ドメインおよび領域を含む。全長の従来の抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む、その各々が、複数の免疫グロブリン (I g) ドメインを含む。I g ドメインは、各々、ループによってつながれている逆平行 β 鎖を含む β プリーツシートを含む、I g フォールドと呼ばれる構造を特徴とする。I g フォールド中の2つの β シートは、疎水性相互作用および保存された鎖内ジスルフィド結合によって一緒に挟まれている。抗体鎖中の I g ドメインは、可変 (V) および定常 (C) 領域ドメインである。各重鎖は、ジスルフィド結合によって軽鎖と連結されており、2つの重鎖は、ジスルフィド結合によって互いに連結されている。重鎖の連結は、ヒンジ領域として知られる重鎖の可動性領域によって媒介される。

30

【0288】

各全長の従来の抗体軽鎖は、1つの可変領域ドメイン (V_L) および1つの定常領域ドメイン (C_L) を含む。各全長の従来の重鎖は、1つの可変領域ドメイン (V_H) および3または4つの定常領域ドメイン (C_H) およびいくつかの場合には、ヒンジ領域を含む。上記で論じられた組換え事象のために、可変領域ドメインをコードする核酸配列は、抗体間で異なっており、個々の抗体に抗原特異性を付与する。他方、定常領域は、抗体間でより保存された配列によってコードされている。これらのドメインは、抗体に機能特性、例えば、免疫系の細胞および血清タンパク質と相互作用して、感染性病原体のクリアランスを引き起こす能力を付与する。種々のクラスの抗体、例えば、I g M、I g D、I g G、I g E および I g A が、種々の定常領域を有し、これによって、それらが別個のエフェクター機能を果たすことが可能となる。

40

【0289】

50

各可変領域ドメインは、相補性決定領域（CDR）または超可変（HV）領域と呼ばれる3つの部分を含有し、これらは、高度に可変の核酸配列によってコードされている。CDRは、可変領域Igドメインのβシートをつなぐループ内に位置する。3つの重鎖CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）および3つの軽鎖CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）は、一緒になって、抗体の従来の抗原結合部位（抗体結合部位）を構成し、これは、同族抗原と物理的に相互作用し、抗体の特異性を提供する。全抗体は、各々、1つの重鎖および1つの軽鎖に由来するCDRで構成される、2つの同一の抗体結合部位を含有する。それらは、β鎖をつなぐループ内に含有されるので、3つのCDRは、可変領域の直鎖アミノ酸配列に沿って不連続である。抗体ポリペプチドのフォールディングの際には、CDRループは極接近し、抗原結合部位を構成する。可変領域ドメインのβシートは、フレームワーク領域（FR）を形成し、これは、抗体のその他の特性、例えば、安定性にとって重要である、より保存された配列を含有する。

10

【0290】

b. 抗体断片

【0291】

本明細書において提供される抗体は、全長抗体の全配列未満を含有するが、少なくとも全長抗体の部分特異的結合能を保持する、全長抗体の誘導体である抗体断片を含む。抗体断片はまた、親抗体の結合親和性を保持するために、抗体フレームワーク中に挿入してもよい（例えば、キメラ抗体）抗体の抗原結合部分も含み得る。抗体断片の例として、それだけには限らないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖Fv（scFv）、Fv、dsFv、ダイアボディ、FdおよびFd'断片ならびに改変された断片を含むその他の断片が挙げられる〔例えば、Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p 3-25、Kipriyanov参照のこと〕。抗体断片は、例えば、ジスルフィド橋によって一緒に連結されている複数の鎖を含み得、組換えによって製造できる。抗体断片はまた、合成リンカー、例えば、2つ以上のドメインを連結するためのペプチドリンカーを含有し得る。抗原結合断片を作製する方法は、当技術分野では周知であり、本明細書において提供される任意の抗体を改変するために使用してよい。抗体分子の断片は、例えば、酵素的切断などによって製造できる。例えば、パパインによるプロテアーゼ切断の際には、重鎖定常領域の二量体、Fcドメインが、2つのFab領域（すなわち、可変領域を含有する部分）から切断される。

20

30

【0292】

一本鎖抗体は、特定の抗体の重鎖可変領域（V_H）および軽鎖可変領域（V_L）を接続することによって組換えによって操作され得る。可変領域の特定の核酸配列は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびその他の組換え核酸技術などの標準の分子生物学法によってクローニングできる。sFvsを製造する方法は、例えば、Whitlow and Filpula (1991) Methods, 2:97-105; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Pack et al. (1993) Bio/Technology 11:1271-77; および米国特許第4,946,778号、同5,840,300号、同5,667,988号、同5,658,727号、同5,258,498号）によって記載されている。一本鎖抗体はまた、標的抗原との結合について一本鎖抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。このようなライブラリーを構築およびスクリーニングする方法は、当技術分野で周知である。

40

【0293】

2. 例示的抗RSV抗体

【0294】

RSVと結合し、それを中和する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。特に、抗体または抗原結合断片は、RSV Fタンパク質と免疫特異的に結合する。例えば、ここで提供する抗RSV抗体は、分離または精製され、または組換えられたRSV Fタンパク質に免疫特異的に結合する。他の例では、ここに提供する抗RSV抗体は表面糖タンパク質F（RSV Fタンパク質）をコード化するRSVビリオン（ウ

50

イルス粒子) または R S V ウイルスに免疫特異的に結合する。

【0295】

本明細書において提供される抗RSV抗体は、この技術分野での抗RSV抗体から有利または異なる特性を示した。例えば、本明細書において提供される抗体は、R S V Fタンパク質についてより一層低いか、または改善された結合親和性で、例えば、分離または精製された、または組換えのRSV Fタンパク質、または自然なFタンパク質を発現するR S V ウイルスまたはビリオンについてのより一層低いか、または改善された結合親和性のようなものを示す抗RSV抗体を包含する。他の例では、本明細書において提供される抗体には、改善されたか、またはより良好なR S Vの中和活性を示す抗RSV抗体が包含される。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体には、他の先行技術または既存の抗R S V抗体と比較して生成されたエスケープ変異(M A R M s)の形態において変形の影響を受けにくいR S V上のエピトープに結合する抗体が包含される。例えば、本明細書において提供される抗R S V抗体、例えば、抗体30D8またはその全長または他の抗体断片の形態の存在下、R S Vは、ウイルス複製の10よりも多くのラウンド後、一般的には11、12、13、14、15、16、17、18、19または20よりも多くのラウンド後に、エスケープ変異体を生成することが不可能である。

【0296】

抗R S V抗体には、抗体S C 5または58c5、またはそれらの全長または他の抗体断片の形態が含まれる(例えば、米国特許出願公開第US2011/0076268号および国際公開PCT出願第WO2011/020079号を参照)。58c5は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含むF a b断片である。抗体または58c5の抗原断片形態で58c5と同じエピトープ結合するものには、G A S I N S D N Y Y W T (配列番号2)または配列番号435で示される相補性決定領域(C D R s)のV_H C D R 1、H I S Y T G N T Y Y T P S L K S (配列番号3)で示されるV_H C D R 2、およびC G A Y V L I S N C G W F D S (配列番号4で示されるV_H C D R 3を有する重鎖、およびQ A S Q D I S T Y L N (配列番号6)で示されるC D R s V_L C D R 1、G A S N L E T (配列番号7)で示されるV_L C D R 2、およびQ Q Y Q Y L P Y T (配列番号8)で示されるV_L C D R 3を有する軽鎖を含む。一般に、58c5の抗体断片形態は、配列番号1のアミノ酸1~125に示されるアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号5のアミノ酸1~107に示されるアミノ酸配列を有するVLドメインを含む。s c 5は、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号13に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含むF a b断片である。抗体またはs c 5の抗原断片形態でs c 5と同じエピトープに結合するものには、G D S I S G S N W W N (配列番号10)または配列番号436で示される相補性決定領域(C D R s)のV_H C D R 1、E I Y Y R G T T N Y K S S L K G (配列番号11)で示されるV_H C D R 2、およびG G R S T F G P D Y Y Y Y M D V (配列番号12)で示されるV_H C D R 3を有する重鎖、およびR A S Q N I K N Y L N (配列番号14)を有するC D R sのV_L C D R 1、A A S T L Q S (配列番号15)で示されるV_L C D R 2、およびQ Q S Y N N Q L T (配列番号16)で示されるV_L C D R 3を有する軽鎖が含まれる。一般的には、s c 5の抗体断片の形態には、配列番号9のアミノ酸1~125に示されるアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号13のアミノ酸1~107に示されるアミノ酸配列を有するVLドメインが含まれる。

【0297】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖F v (s c F v)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、F a b断片、F (a b')断片、ジスルフィド結合F v (s d F v)および抗イディオタイプ(抗I d)抗体、細胞内抗体または上記のいずれかの抗原結合断片を含む。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち、抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の種類(例えば、I g G、I g E、I g M

、I g D、I g AおよびI g Y)、クラス(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2)またはサブクラスのものであり得る。

【0298】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖F v (s c F v)、一本鎖抗体、単一ドメイン抗体、F a b断片、F (a b')断片、ジスルフィド結合F v (s d F v)および抗イディオタイプ(抗I d)抗体、細胞内抗体または上記のいずれかの抗原結合断片を含む形態で、治療および診断法において使用できる。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち、抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の種類(例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g AおよびI g Y)、クラス(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2)またはサブクラスのものであり得る。

【0299】

R S V Fタンパク質と免疫特異的に結合する本明細書において提供される例示的抗R S V抗体またはその抗原結合断片として、本明細書において他の部分で詳細に記載されるF a b断片である30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9および69F6が挙げられる。本明細書において提供される例示的抗R S V抗体またはその抗原結合断片はまた、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6の重鎖可変(V_H)ドメインおよび定常重鎖ドメイン1(C_H1)を含有する重鎖ならびに／または軽鎖可変(V_L)ドメインおよび定常軽鎖ドメイン(C_L)を含有する軽鎖を含有する、抗R S V抗体またはその抗原結合断片を含む。例えば、本明細書において提供される例示的抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、配列番号396、398、400、402、404、452、454または456に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および／または配列番号395、397、399、401、403、453、455、または457に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する、抗R S V抗体またはその抗原結合断片を含む。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号396に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号395に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号398に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号397に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号400に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号399に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号402に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号401に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号404に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号403に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号452に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号453に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号454に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号455に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。特定の例では、抗R S V抗体は、配列番号456に示されるアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号457に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有するF a b断片である。

【0300】

本明細書において提供される抗体は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6の全長抗体の形態を含む。本明細書において提供される抗体はまた、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6の抗原結合部位(例えば、CDR)を含有する全長抗体の形態も含む。本明細書において提供される全長抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、当技術分野で既知の任意の軽鎖および重鎖の定常領域、例えば、当技術分野で既知

の任意のヒト定常領域のようなものを含むことができる。本明細書において提供される全長抗体は、ヒト軽鎖カッパ (κ)、ヒト軽鎖ラムダ (λ) である軽鎖定常領域 (C_L) を含むことができる。本明細書において提供される全長抗体は、重鎖定常領域 (C_H1 リンカー $C_H2 - C_H3$) で、任意のアイソタイプのもの、そしてとりわけ IgG を含むことができる。定常領域はサブクラス $IgG1$ の定常領域 (配列番号 356)、 $IgG2$ の定常領域 (配列番号 357)、 $IgG3$ の定常領域 (配列番号 358) または $IgG4$ の定常領域 (配列番号 359) であることができる。特に、本明細書で提供される全長抗体の形態は、 IgG 、サブクラス $IgG1$ の定常領域を含む。

【0301】

本明細書において提供される抗体は、 RSV タンパク質と免疫特異的に結合する 30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9 および 69F6 のその他の抗体断片の形態を含む。このような断片として、 RSV タンパク質と結合する能力を保持する、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9 または 69F6 の抗原結合断片 (単数または複数) を含有する任意のその抗原結合断片または操作された抗体が挙げられる。このような抗体は、例えば、キメラ抗体、一本鎖 Fv ($scFv$)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、 $F(a b')$ 断片、ジスルフィド結合 Fv ($sdFv$)、抗イデオタイプ (抗 Id) 抗体、細胞内抗体または上記のいずれかの抗原結合断片を含む。特定の例では、抗体は、Fab 30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9 または 69F6 である。

【0302】

本明細書において提供される例示的抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9 または 69F6 の、それぞれ、 V_H ドメインおよび／または V_L ドメインのアミノ酸配列を有する V_H ドメインおよび／または軽鎖可変 V_L ドメインを含有する抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を含む。例えば、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 398 もしくは 402 のアミノ酸 1～125、配列番号 396 のアミノ酸 1～121、配列番号 404 のアミノ酸 1～123、配列番号 400 もしくは 452 のアミノ酸 1～124、配列番号 454 のアミノ酸 1～133 または配列番号 456 のアミノ酸 1～118 に示されるアミノ酸配列を有する V_H ドメインおよび／または配列番号 397、403 もしくは 455 のアミノ酸 1～107、配列番号 399 のアミノ酸 1～108、配列番号 395 のアミノ酸 1～110、配列番号 401 のアミノ酸 1～113、配列番号 453 のアミノ酸 1～111 または配列番号 457 のアミノ酸 1～109 に示されるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含み得る。

【0303】

本明細書において提供される例示的抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9 または 69F6 の V_H ドメインおよび／または V_L ドメインそれぞれと少なくともまたは約 80% 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインおよび／または V_L ドメインを含有する抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を含む。例えば、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 398 もしくは 402 のアミノ酸 1～125、配列番号 396 のアミノ酸 1～121、配列番号 404 のアミノ酸 1～123、配列番号 400 もしくは 452 のアミノ酸 1～124、配列番号 454 のアミノ酸 1～133 または配列番号 456 のアミノ酸 1～118 に示されるアミノ酸配列と 80% 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインおよび／または配列番号 397、403 もしくは 455 のアミノ酸 1～107、配列番号 399 のアミノ酸 1～108、配列番号 395 のアミノ酸 1～110、配列番号 401 のアミノ酸 1～113、配列番号 453 のアミノ酸 1～111 または配列番号 457 のアミノ酸 1～109 に示されるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含み得る。

【0304】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、配列番号398もしくは402のアミノ酸1～125、配列番号396のアミノ酸1～121、配列番号404のアミノ酸1～123、配列番号400もしくは452のアミノ酸1～124、配列番号454のアミノ酸1～133または配列番号456のアミノ酸1～118に示されるアミノ酸配列と少なくとももしくは約(at least or about)81%、少なくとももしくは約82%、少なくとももしくは約83%、少なくとももしくは約84%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約86%、少なくとももしくは約87%、少なくとももしくは約88%、少なくとももしくは約89%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約91%、少なくとももしくは約92%、少なくとももしくは約93%、少なくとももしくは約94%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約96%、少なくとももしくは約97%、少なくとももしくは約98%または少なくとももしくは約99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Hドメインおよび／または配列番号397、403もしくは455のアミノ酸1～107、配列番号399のアミノ酸1～108、配列番号395のアミノ酸1～110、配列番号401のアミノ酸1～113、配列番号453のアミノ酸1～111または配列番号457のアミノ酸1～109に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約81%、少なくとももしくは約82%、少なくとももしくは約83%、少なくとももしくは約84%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約86%、少なくとももしくは約87%、少なくとももしくは約88%、少なくとももしくは約89%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約91%、少なくとももしくは約92%、少なくとももしくは約93%、少なくとももしくは約94%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約96%、少なくとももしくは約97%、少なくとももしくは約98%または少なくとももしくは約99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含み得る。

10

20

【0305】

したがって、配列番号396のアミノ酸1～121に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含み、ならびに配列番号395のアミノ酸1～110に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

30

【0306】

このように、配列番号398のアミノ酸1～125に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含み、ならびに配列番号397のアミノ酸1～107に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

40

【0307】

このように、配列番号400のアミノ酸1～124に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも9

50

5 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインを含み、ならびに配列番号 399 のアミノ酸 1 ~ 108 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0308】

10

このように、配列番号 402 のアミノ酸 1 ~ 125 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインを含み、ならびに配列番号 401 のアミノ酸 1 ~ 113 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

20

【0309】

このように、配列番号 404 のアミノ酸 1 ~ 123 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインを含み、ならびに配列番号 403 のアミノ酸 1 ~ 107 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

30

【0310】

このように、配列番号 452 のアミノ酸 1 ~ 124 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_H ドメインを含み、ならびに配列番号 453 のアミノ酸 1 ~ 111 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

40

【0311】

このように、配列番号 454 のアミノ酸 1 ~ 133 に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約 80 % ~ 99 % 同一である、例えば、90 % ~ 99 % または少なくとも 95 % 同一である、例えば、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、

50

98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含み、ならびに配列番号455のアミノ酸1～107に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0312】

このように、配列番号456のアミノ酸1～118に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含み、ならびに配列番号457のアミノ酸1～109に示されるアミノ酸配列と、少なくとももしくは約80%～99%同一である、例えば、90%～99%または少なくとも95%同一である、例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含む抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0313】

また、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6のCDRの中から選択される1つまたは複数のV_H相補性決定領域(CDR)を含有する抗RSV抗体またはその抗原結合断片も提供される。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号405、411、417、423、429、437-441、458、464、470または482-484に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1を含有し得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列GFTFSGHTIA(配列番号405)、GGTFDITYTIS(配列番号411)、GFSITDFGIH(配列番号417)、GASISSDNHYWS(配列番号423)、GFTLKNYEMN(配列番号429)、GHTIA(配列番号437)、TYTIS(配列番号438)、DFGIH(配列番号439)、SDNHYWS(配列番号440)、NYEMN(配列番号441)、GVSINSNNYFWA(配列番号458)、GDSFNDFYFWT(配列番号464)、GYSFTSYWIA(配列番号470)、SNNYFWA(配列番号482)、DYFWT(配列番号483)またはSYWIA(配列番号484)を有するV_H CDR1を含み得る。

【0314】

別の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号406、412、418、424、430、459、456または471に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2を含有し得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列WVSTNNGNTEYAQKIQG(配列番号406)RIIPSLGETNYAHKLQG(配列番号418)、SIYYTG GTNYP SLKS(配列番号424)、YISSSGNVVKYVDSVQG(配列番号430)、NIYYGGSTHYNASLQS(配列番号459)、EISHSGSTNYSPLKS(配列番号465)またはIIFPNDSDATYSPSFQG(配列番号471)を有するV_H CDR2を含有し得る。

【0315】

別の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号407、413、419、425、431、460、466または472に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含み得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列EWLVMGGFAFDH(配列番号407)、RITGPVDWVWDYGM DV(配列番号413)、DVWEDSWLSLACFQE(配列番号419)、GLFFITA

R P Y W Y F D L (配列番号 4 2 5) または G F S I D K Y D S S V D E Y (配列番号 4 3 1)、S E S I F W D Y Y Y G L D V (配列番号 4 6 0)、G V R S R P P P S Y R G S G S P P Y Y H Y G M D V (配列番号 4 6 6) または Q Y Y L G S F E S (配列番号 4 7 2) を有する V_H C D R 3 を含有し得る。

【0316】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 0 5 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 0 6 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 0 7 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 3 7 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 0 6 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 0 7 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。

10

【0317】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 1 1 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 1 3 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 3 8 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 1 3 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。

20

【0318】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 1 7 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 3 9 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。

【0319】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 2 4 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 2 5 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 4 0 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 2 4 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 4 2 5 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。

30

【0320】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 2 9 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 3 0 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 4 1 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 3 0 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2 および配列番号 4 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。

40

【0321】

1つの特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 5 9 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 2、および配列番号 4 6 0 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 3 を含む。別の特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 8 2 に示されるアミノ酸配列を有する V_H C D R 1、配列番号 4 5 9 に示されるアミノ酸配列

50

を有するV_H CDR 2、および配列番号460に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 3を含む。

【0322】

1つの特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号464に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 1、配列番号465に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 2、および配列番号466に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号483に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 1、配列番号465に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 2、および配列番号466に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 3を含む。

10

【0323】

1つの特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号470に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 1、配列番号471に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 2、および配列番号472に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号484に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 1、配列番号471に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 2、および配列番号472に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR 3を含む。

【0324】

また、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6のCDRの中から選択される1つまたは複数のV_L 相補性決定領域(CDR)を含有する抗RSV抗体またはその抗原結合断片も提供される。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号408、414、420、426、432、461、467または473に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1を含み得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列GANNIGSQNVH(配列番号408)、RASQNIKTYLN(配列番号414)、RASQSISNWL A(配列番号420)、RSSQSLLDSDDGNTYLD(配列番号426)、RASQSISNFLN(配列番号432)、TGTS SDVGGYNYVS(配列番号461)、RASQNIINTWLA(配列番号467)またはQASDISNYLN(配列番号473)を有するV_L CDR 1を含み得る。

20

【0325】

別の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号409、415、421、427、433、462、468または474に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2を含み得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列DDRDRPS(配列番号409)、AVSNLQS(配列番号415)、KASNLED(配列番号421)、TLSYRAS(配列番号427)、AASSLQG(配列番号433)、EVTKRPS(配列番号462)、AASF LQS(配列番号468)またはDASYLDT(配列番号474)を有するV_L CDR 2を含み得る。

30

【0326】

別の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号410、416、422、428、434、463、469または475に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含み得る。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列QVWDS SRDQAVI(配列番号410)、QQSF S I P L T(配列番号416)、QQYNSYSGLS(配列番号422)、MQRMEFPFT(配列番号428)、QQTYISLYT(配列番号434)、SSYAGSRHV V(配列番号463)、Q QANSFPR T(配列番号469)またはQQYDDLRGGFT(配列番号475)を有するV_L CDR 3を含み得る。

40

【0327】

1つの特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号408に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号409に示されるアミノ酸配列を有

50

するV_L CDR 2、および配列番号410に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号414に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号415に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号416に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号420に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号421に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号422に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。

【0328】

別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号426に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号427に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号428に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号432に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号433に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号434に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号461に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号462に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号463に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号467に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号468に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号469に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。別の特定の例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、配列番号473に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 1、配列番号474に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 2、および配列番号475に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR 3を含む。

【0329】

本明細書において提供されるCDRの任意の組合せは、抗体または抗原結合断片が、RSV Fタンパク質と免疫特異的に結合する能力を保持するという条件で、抗体またはその抗原結合断片の作製のために選択できる。抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、当技術分野で公知の抗体フレームワーク領域を含有し得る。例示的フレームワーク領域として、ヒトフレームワーク領域をはじめとする、単離された天然に存在するフレームワーク領域またはコンセンサスフレームワーク領域が挙げられる〔例えば、Chothia et al. (1998) J. Mol. Biol. 278:457-479参照のこと〕。いくつかの例では、抗体フレームワーク領域は、ヒト抗体フレームワーク領域である。いくつかの例では、抗体または抗原結合断片は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6のフレームワーク領域を含む。

【0330】

本明細書において提供される例示的な単離された抗RSV抗体またはその抗原結合断片として、本明細書において提供される抗体のいずれかと同一の、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)融合(F)タンパク質上のエピトープと免疫特異的に結合する任意の抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。一例では、配列番号396に示される重鎖および配列番号395に示される軽鎖を含有する抗体である30D8と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号398に示される重鎖および配列番号397に示される軽鎖を含有する抗体である104E5と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号400に示される重鎖および配列番号399に示される軽鎖を含有する抗体である38F10と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号402に示される重鎖および配列番号401に示される軽鎖を含有する抗体である14G3と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号404に示される重鎖および配列番号403に示される軽鎖を含有する抗体である9

0 D 3 と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号 4 5 2 に示される重鎖および配列番号 4 5 3 に示される軽鎖を含有する抗体である 5 6 E 1 1 と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号 4 5 4 に示される重鎖および配列番号 4 5 5 に示される軽鎖を含有する抗体である 1 7 C 9 と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。別の例では、配列番号 4 5 6 に示される重鎖および配列番号 4 5 7 に示される軽鎖を含有する抗体である 6 9 F 6 と同一のエピトープと結合する抗体が、本明細書において提供される。通常、このような抗体は、可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) またはその抗原結合断片を含む。

【0331】

本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、少なくとももしくは約 (at least or about) $1 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $2.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとももしくは約 $1 \times 10^{15} M^{-1}$ または少なくとももしくは約 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ という R S V F タンパク質エピトープの結合親和性定数 (K_a) を示す。本明細書において提供される抗体は、配列番号 2 5 に示される R S V

A 2 株 F タンパク質の細胞外ドメインなどの組換えによって精製された F タンパク質に対して結合親和性を示し得る。本明細書において提供される抗体はまた、細胞における R S V の感染および発現によって生じるものなどの天然 R S V F タンパク質に対して結合親和性を示し得る。本明細書において提供される抗体は、組換え F タンパク質対天然 R S V F タンパク質に対して、同一または異なっている結合親和性を有し得る。例えば、実施例 5 は、3 0 D 8 が、天然 R S V F タンパク質に対してよりも組換え F タンパク質に対して高い結合親和性を有することを示す。対照的に、s c 5 (米国特許出願公開第 U S 2 0 1 1 / 0 0 7 6 2 6 8 号および国際公開された P C T 出願第 W O 2 0 1 1 / 0 2 0 0 7 9 号) は、R S V F タンパク質が天然であろうと、組換え F タンパク質であろうと類似の結合親和性を示す。

【0332】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、約 $1 \times 10^{-8} M$ またはそれ未満、約 $4 \times 10^{-9} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-9} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-9} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-10} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-10} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-11} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-11} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-12} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-12} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-13} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-13} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-14} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-14} M$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-15} M$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-15} M$ またはそれ未満または約 $2 \times 10^{-16} M$ またはそれ未満という R S V F タンパク質エピトープに対する解離定数 (K_d) を有する。

【0333】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、R S V の中和についてのインビトロマイクロ中和アッセイにおいて、約 $0.005 nM$ またはそれ未満、約 $0.01 nM$ またはそれ未満、約 $0.025 nM$ またはそれ未満、約 $0.05 nM$ またはそれ未満、約 $0.075 nM$ またはそれ未満、約 $0.1 nM$ またはそれ未満、約 $0.5 nM$ またはそれ未満、約 $0.75 nM$ またはそれ未満、約 $1 nM$ またはそれ未満、約 $1.25 nM$ またはそれ未満、約 $1.5 nM$ またはそれ未満、約 $1.75 nM$ またはそれ未満、または約 $2 nM$ またはそれ未満の EC_{50} を有する。特定の例では、本明細書において提供される単離された抗 R S V 抗体または抗原結合断片は、R S V の中和についての

インビトロプラーク減少アッセイにおいて、約0.005 nMもしくはそれ未満～約2 nMもしくはそれ未満；約0.005 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.005 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満；約0.01 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.05 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.05 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満；または約0.1 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満のEC₅₀を有する。

【0334】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、RSVの中和についてのインビトロマイクロ中和において、種々の抗RSV抗体に対するモノクローナル抗体エスケープ突然変異体(MARM)を中和する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、それからMARMが作製された親RSV株の中和のEC₅₀であるか、またはほぼ同一であるEC₅₀でMARMを中和する。第1の抗体が、第2の抗体に対して作製されたMARMを中和できる場合には、抗体は、異なるエピトープと特異的に結合するか、または相互作用すると結論づけることができる。

【0335】

いくつかの例では、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、生成されたエスケープ変異の形態(MARMS)での変形の影響を受けにくいエピトープに結合する。いくつかの例では、RSVは、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の存在下においてウイルス複製の8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれらよりも多くの連続したラウンド後にエスケープ変異を生成することが不可能である。特定の例では、RSVは、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の存在下においてウイルス複製の11、12、13、14、15またはそれらよりも多くの連続したラウンド後にエスケープ変異を生成しない。別の特定の例では、RSVは、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片からのエスケープをもたらすことができない。例えば、実施例11Aは、30D8の存在下においてウイルス複製の12ラウンド後、RSVがエスケープをもたらすことができなかったことを示す。対照的に、RSVは、ウイルス複製のわずか7ラウンド後にMotavizumab(モタビズマブ)^(R)をエスケープすることができた。

【0336】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、RSVの、その宿主細胞受容体との結合を、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の不在下でのRSVのその宿主細胞受容体との結合と比較して、少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%阻害する。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体または抗原結合断片は、RSV複製を、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の不在下でのRSV複製に対して少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%阻害する。

【0337】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片は、15日以上、20日以上、25日以上、30日以上、40日以上、45日以上、50日以上、55日以上、60日以上、3ヶ月以上、4ヶ月以上または5ヶ月以上の半減期を有する。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長する方法は、当技術分野で公知である。このような方法として、例えば、本明細書において他の部分で記載されるようなペグ化、グリコシル化およびアミノ酸置換が挙げられる。

【0338】

a. 誘導抗体

【0339】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を使用して、キメラ抗体またはその他の抗原結合断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖Fv(scFv)、Fv、dsFv、ダイアボディ、FdおよびFd'断片などといった誘導抗体を作製できる。一般に、親抗体に由来する誘導抗体または抗原結合断片は、親抗体の結合特異性を保持する。抗体断片は、当業者に公知の任意の技術によって作製できる。例えば、FabおよびF(ab')₂断片は、パパイン(Fab断片を製造するための)またはペプシン(F(ab')₂断片を製造するための)などの酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって製造できる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のC_H1ドメインを含有する。さらに、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を使用して作製できる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の抗原結合可変領域を、当技術分野で公知の1つまたは複数の定常領域と組換えによって融合して、キメラ全長抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂またはその他の抗原結合断片を作製できる。抗体断片から全長抗体を作製するための例示的方法は、当技術分野で公知であり、本明細書において提供される。キメラ抗体を製造する方法は、当技術分野で公知である[例えば、Morrison (1985) Science 229:1202; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; ならびに米国特許第5,807,715号、同4,816,567号および同4,816,397号を参照のこと]。

【0340】

本明細書において提供される抗RSV抗体に由来する1つまたは複数のCDRと、異種免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、例えば、CDRグラフティング(EP239,400; PCT公開番号WO91/09967; および米国特許第5,225,539号、同5,530,101号および同5,585,089号)、ベニヤリング(veneering)または再表面形成(resurfacing)[EP592,106; EP519,596; Padlan (1991) Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering 7(6):805-814; およびRoguska et al. (1994) PNAS 91:969-973] および鎖シャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)をはじめとする当技術分野で公知の種々の技術を使用して製造できる。

【0341】

いくつかの例では、抗体は、30D8の1つまたはそれよりも多くのCDR(例えば、配列番号405~410および437に示される1つまたはそれよりも多くのCDR)および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、104E5の1つまたはそれよりも多くのCDR(例えば、配列番号411~416および438に示される1つまたはそれよりも多くのCDR)および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、38F10の1つまたはそれよりも多くのCDR(例えば、配列番号417~422および439に示される1つまたはそれよりも多くのCDR)および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、14G3の1つまたはそれよりも多くのCDR(例えば、配列番号423~428および440に示される1つまたはそれよりも多くのCDR)および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、

90D3の1つまたはそれよりも多くのCDR（例えば、配列番号429～434および441に示される1つまたはそれよりも多くのCDR）および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、56E11の1つまたはそれよりも多くのCDR（例えば、配列番号458～463および482に示される1つまたはそれよりも多くのCDR）および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、17C9の1つまたはそれよりも多くのCDR（例えば、配列番号464～469および483に示される1つまたはそれよりも多くのCDR）および異種フレームワーク領域を含む。いくつかの例では、抗体は、69F6の1つまたはそれよりも多くのCDR（例えば、配列番号470～475および484に示される1つまたはそれよりも多くのCDR）および異種フレームワーク領域を含む。フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合性を
10
変更、例えば、改善するために、CDRドナー抗体に由来する対応する残基と置換してもよい。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合性にとって重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリングおよび特定の位置での異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される〔例えば、米国特許第5,585,089号；およびRiechmann et al. (1988) Nature 332:323参照のこと〕。

【0342】

いくつかの例では、誘導抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとももしくはは約 $1 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ または少なくとももしくはは約 $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ の、RSV Fタンパク質エピトープの結合親和性定数 (K_a) を有する。
20

【0343】

いくつかの例では、誘導抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-11} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-12} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-13} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-14} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-14} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $2 \times 10^{-15} \text{ M}$ またはそれ未満、約 $1 \times 10^{-15} \text{ M}$ またはそれ未満または約 $2 \times 10^{-16} \text{ M}$ またはそれ未満の、RSV Fタンパク質エピトープに対する解離定数 (K_d) を有する。
30

【0344】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、RSVの中和についてのインビトロマイクロ中和において、種々の抗RSV抗体に対するモノクローナル抗体エスケープ突然変異体 (MAR M) を中和する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、MAR Mが生成される親RSV株の中和の EC_{50} であるか、またはほぼ同一である EC_{50} でMAR Mを中和する。
40

【0345】

いくつかの例では、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、生成されたエスケープ変異の形態での変形の影響を受けにくいエピトープに結合する。いくつかの例では、RSVは、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の存在下においてウイルス複製の8、9、10、11、12、13、14、15、16、1
50

7、18、19、20またはそれらよりも多くの連続したラウンド後にエスケープ変異を生成することが不可能である。別の特定の例では、RSVは、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片からのエスケープをもたらすことができない。

【0346】

いくつかの例では、誘導(derivative)抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、RSVの中和についてのインビトロマイクロ中和アッセイにおいて、約0.005 nMまたはそれ未満、約0.01 nMまたはそれ未満、約0.025 nMまたはそれ未満、約0.05 nMまたはそれ未満、約0.075 nMまたはそれ未満、約0.1 nMまたはそれ未満、約0.5 nMまたはそれ未満、約0.75 nMまたはそれ未満、約1 nMまたはそれ未満、約1.25 nMまたはそれ未満、約1.5 nMまたはそれ未満、約1.75 nMまたはそれ未満、約2 nMまたはそれ未満のEC₅₀を有する。特定の例では、誘導抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、RSVの中和についてのインビトロブランク減少アッセイにおいて、約0.005 nMもしくはそれ未満～約2 nMもしくはそれ未満；約0.005 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.005 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満；約0.01 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.05 nMもしくはそれ未満～約1 nMもしくはそれ未満；約0.05 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満；または約0.1 nMもしくはそれ未満～約0.5 nMもしくはそれ未満のEC₅₀を有する。

10

【0347】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の任意の誘導体は、治療レジメン、予防療法および／または診断技術において、例えば、提供される方法において使用できる。例えば、誘導抗体またはその抗原結合断片は、RSV感染の治療、予防および／もしくは検出またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の軽減のためにRSVと結合するために使用できる。

20

【0348】

i. 一本鎖抗体

【0349】

特定の例では、抗RSV抗体は、一本鎖抗体である。一本鎖抗体は、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片のいずれかの抗原結合ドメインから作製できる。組換え技術を使用して一本鎖抗体を作製する方法は、例えば、Marasco et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893、Whitlow and Filpula (1991) Methods、2: 97-105；Bird et al. (1988) Science 242:423-426；Pack et al. (1993) Bio/Technology 11:1271-77；および米国特許第4,946,778号、同5,840,300号、同5,667,988号、同5,658,727号に記載されるものなど、当技術分野で公知である。

30

【0350】

一本鎖抗体は、本明細書において提供される任意の抗RSV抗体またはその抗原結合断片の、軽鎖可変(V_L)ドメインまたはその機能領域および重鎖可変(V_H)ドメインまたはその機能領域を含有し得る。いくつかの例では、一本鎖抗体のV_Lドメインまたはその機能領域は、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の相補性決定領域1(CDR1)、相補性決定領域2(CDR2)および／または相補性決定領域3(CDR3)を含有する。いくつかの例では、一本鎖抗体のV_Hドメインまたはその機能領域は、本明細書において提供される任意の抗RSV抗体またはその抗原結合断片の相補性決定領域1(CDR1)、相補性決定領域2(CDR2)および相補性決定領域3(CDR3)を含有する。いくつかの例では、一本鎖抗体は、ペプチドリinkerをさらに含有する。このような例では、ペプチドリinkerは、軽鎖可変ドメイン(V_L)と重鎖可変ドメイン(V_H)の間に位置し得る。

40

【0351】

一本鎖抗体は、抗体の1つまたは複数のドメインの間にペプチドスパーサーまたはリンカーを含有し得る。例えば、抗体の軽鎖可変ドメイン(V_L)は、可動性リンカーペプチ

50

ドを介して重鎖可変ドメイン (V_H) とカップリングされ得る。種々のペプチドリンカーが、当技術分野で周知であり、提供される方法において使用され得る。ペプチドリンカーは、一連のグリシン残基 (Gly) またはセリン (Ser) 残基を含み得る。ポリペプチドリンカーの例示として、アミノ酸配列 (Gly-Ser)_n、(Gly_mSer)_n または (Ser_mGly)_n を有するペプチドがあり、ここで、m は、1~6、通常、1~4、通常、2~4 であり、n は、1~30 または 1~10、通常、1~4 であり、溶解度を高めるために、一部のグルタミン酸 (Glu) またはリシン (Lys) 残基がいたるところに分散されている (例えば、コンジュゲートにおいて使用するための例示的リンカーを提供する国際 PCT 出願番号 WO 96/06641 参照のこと)。例示的ペプチドリンカーとして、それだけには限らないが、配列 GGSRRSSSSSGGGGSGGGG (配列番号 267)、GSGRSGGGGSGGGGS (配列番号 268)、EGKSSGSGSESKST (配列番号 269)、EGKSSGSGSESKSTQ (配列番号 270)、EGKSSGSGSESKVD (配列番号 271)、GSTSGSGKSSSEGKG (配列番号 272)、KESGSVSSSEQLAQFRSLD (配列番号 273) および ESGSVSSSEELAFRSLD (配列番号 274) を有するペプチドが挙げられる。一般に、リンカーペプチドは、およそ 1~50 個のアミノ酸長である。本明細書において使用されるリンカーはまた、細胞内利用能、血清安定性、特異性および溶解度を高めるか、または増大した柔軟性を提供するか、または立体障害を軽減し得る。連結部分は、例えば、Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883、Whitlow et al. (1993) Protein Engineering 6:989-995 および Newton et al., (1996) Biochemistry 35:545-553 に記載されている。その他の適したペプチドリンカーとして、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 4,751,180 または同 4,935,233 号に記載されるもののいずれかが挙げられる。

【0352】

i i. 抗イディオタイプ抗体

【0353】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を利用し、当業者に周知の技術を使用して、抗体が免疫特異的に結合する RSV F タンパク質抗原を「模倣する」抗イディオタイプ抗体を作製できる [例えば、Greenspan & Bona (1989) FASEB J. 7(5):437-444; および Nissinoff (1991) J. Immunol. 147(8):2429-2438 参照のこと]。例えば、当技術分野で周知のアッセイによって決定されるように、その宿主細胞受容体と結合し、RSV のその宿主細胞受容体との結合を競合的に阻害する、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を使用して、RSV 抗原を「模倣し」、RSV 受容体と結合する、すなわち、宿主細胞との結合についてウイルスと競合し、したがって、ウイルスへの宿主細胞の感染率を低下させる抗イディオタイプを作製できる。いくつかの例では、抗抗イディオタイプは、当業者に周知の技術によって作製できる。抗抗イディオタイプは、抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片の結合ドメインを模倣し、結果として、RSV と結合し、それを中和する。

【0354】

i i i. 多重特異性抗体および抗体多量体化

【0355】

本明細書において提供される 2 種以上の抗体またはその抗原結合断片を操作して、二価、三価、四価、五価、六価、七価またはそれ以上の結合価 (すなわち、2、3、4、5、6、7 またはそれ以上の抗原結合部位を含有する) の誘導抗体などの多価誘導抗体または多量体を形成できる。このような多価誘導抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはそれ以上の多重特異性のものであり得る。いくつかの例では、多価誘導抗体は、単一特異性であり、同一のエピトープと免疫特異的に結合する 2 以上の抗原結合ドメインを含有する。いくつかの例では、多価誘導抗体は、多重特異性であり、2 種以上の異なるエピトープと免疫特異的に結合する 2 以上の抗原結合ドメインを含有する。いくつかの特定の例では、多価誘導抗体は、二価であり、2 つの抗原結合ドメインを含有する。このよう

な二価抗体は、それぞれ、同一または異なるエピトープと免疫特異的に結合するホモ二価またはヘテロ二価抗体であり得る。

【0356】

いくつかの例では、多重特異性抗体は、R S Vの2種以上の異なるエピトープと免疫特異的に結合し得る。多重特異性抗体を操作する技術は、当技術分野で公知であり、これとして、例えば、共有結合、非共有結合または化学結合による2種以上の抗原結合断片の連結が挙げられる。いくつかの例では、多価誘導抗体は、2以上の抗R S V抗体またはその抗原結合断片の二量体化によって形成され得る。2種の抗R S V抗体または抗原結合断片間の多量体化は、自発的である場合も、2以上のポリペプチドの強制的な連結によって起こる場合もある。一例では、抗R S V抗体の多量体は、異なる抗R S V抗体上のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合によって連結され得る。別の例では、多価誘導抗体は、抗体またはその抗原結合断片と融合しているペプチド部分と、共有結合または非共有結合相互作用によって接続される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を含み得る。このようなペプチドは、ペプチドリンカー（スパーサー）または多量体化を促進する特性を有するペプチドであり得る。いくつかの例では、多価誘導抗体は、化学結合によって、例えば、ヘテロ二官能性リンカーを使用することなどによって、2つの抗体間で形成され得る。

【0357】

任意の多重特異性および／または多価誘導抗体は、抗体が、生体適合性であり（例えば、ヒトをはじめとする動物への投与のために）、1つまたは複数のエピトープとの結合および／またはR S Vの中和などのその活性を維持するという条件で、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片から作製され得る。本明細書において提供される多重特異性および多価誘導抗体について、誘導抗体は、少なくとも30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6によって認識されるエピトープに対して免疫特異的である。また、本明細書において提供される多重特異性および／または多価誘導抗体は、58c5またはsc5によって認識されるに示されるエピトープに対して免疫特異的である。

【0358】

いくつかの例では、多重特異性および／または多価抗体は、配列番号2、10、405、411、417、423、429、435～441、458、464、470または482～484に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR1、配列番号3、11、406、412、418、424、430、459、465または471に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR2、配列番号4、12、407、413、419、425、431、460、466または472に示されるアミノ酸配列を有するV_H CDR3、配列番号6、14、408、414、420、426、432、461、467または473に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR1、配列番号7、15、409、415、421、427、433、462、468または474に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR2、配列番号8、16、410、416、422、428、434、463、469または475に示されるアミノ酸配列を有するV_L CDR3またはそれらの任意の組合せを含む。

【0359】

いくつかの例では、R S V Fタンパク質（例えば、配列番号282、382または485に示されるアミノ酸配列を有するR S V Fタンパク質）の2種以上のエピトープと免疫特異的に結合する多重特異性抗体を作製できる。例えば、多重特異性抗体は、R S V Fタンパク質のA、BまたはC抗原領域中の2種以上の異なるエピトープと免疫特異的に結合し得る。いくつかの例では、R S V Fタンパク質のエピトープと、別のR S Vエピトープと免疫特異的に結合する多重特異性抗体を作製できる。例えば、多重特異性抗体は、R S V Fタンパク質のエピトープと、別のR S V表面糖タンパク質のエピトープと免疫特異的に結合し得る。いくつかの例では、多重特異性抗体は、R S V Fタンパク質のエピトープと、R S V結合タンパク質（例えば、配列番号275に示されるアミノ酸配

列を有する)、RSV RNAポリメラーゼβサブユニットラージ構造タンパク質(Lタンパク質)(例えば、配列番号276に示されるアミノ酸配列を有する)、RSVヌクレオカプシドタンパク質(例えば、配列番号277に示されるアミノ酸配列を有する)、RSV核タンパク質(N)(例えば、配列番号278に示されるアミノ酸配列を有する)、RSVホスホプロテインP(例えば、配列番号279に示されるアミノ酸配列を有する)、RSVマトリックスタンパク質(例えば、配列番号280に示されるアミノ酸配列を有する)、RSV小疎水性(SH)タンパク質(例えば、配列番号281に示されるアミノ酸配列を有する)、RSV RNA依存性ポリメラーゼ、RSV Gタンパク質(例えば、配列番号282に示されるアミノ酸配列を有する)または上記のいずれかの対立遺伝子変異体の中から選択されるRSVタンパク質のエピトープと免疫特異的に結合し得る。いくつかの例では、多重特異性抗体は、RSV Fタンパク質のエピトープと、RSV Gタンパク質のエピトープと免疫特異的に結合し得る。

10

【0360】

いくつかの例では、多重特異性抗体は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6に由来する抗RSV抗原結合断片と、別の抗RSV抗体に由来する抗RSV抗原結合断片とを含む。例えば、他の抗RSV抗体は58c5またはsc5に由来する抗体または抗原結合断片であり得る。いくつかの例では、多重特異性抗体は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6に由来する抗RSV抗原結合断片と、パリビズマブ(SYNAGIS(登録商標))およびそれだけには限らないが、モタビズマブ(NUMAX(登録商標))、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S(例えば、米国特許第5,824,307号および同6,818,216号参照のこと)などのその誘導体の中から選択される抗RSV抗体に由来する抗RSV抗原結合断片とを含有する。いくつかの例では、多重特異性抗体は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6に由来する抗RSV抗原結合断片と、それだけには限らないが、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19(すなわち、Fab19)、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1およびRF-2(例えば、米国特許第6,685,942号および同5,811,524号参照のこと)などのヒト抗RSV抗体に由来する抗RSV抗原結合断片とを含有する。いくつかの例では、多重特異性抗体は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6に由来する抗RSV抗原結合断片と、それだけには限らないが、MAb1153、1142、1200、1214、1237、1129、1121、1107、1112、1269、1269、1243 [Beeler et al. (1989) J. Virology 63(7):2841-2950]、MAb151 [Mufson et al. (1987) J. Clin. Microbiol. 25:1635-1539]、MAb43-1および13-1 [Fernie et al. (1982) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171:266-271]、MAb1436C、1302A、1308Fおよび1331H [Anderson et al. (1984) J. Clin. Microbiol. 19:934-936]などの抗RSVマウスモノクローナル抗体およびそのヒト化誘導体に由来する抗RSV抗原結合断片とを含有する。30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6に由来する抗RSV抗原結合断片を含有する多重特異性抗体を作製するために使用できるさらなる例示的抗体またはその抗原結合断片として、それだけには限らないが、例えば、米国特許第6,413,771号、同5,840,298号、同5,811,524号、同6,656,467号、同6,537,809号、同7,364,742号、同7,070,786号、同5,955,364号、同7,488,477号、同6,818,216号、同5,824,307号、同7,364,737号、同6,685,942号および同5,762,905号および米国特許出願公開第2007-0082002号、同2005-0175986号、同2004-02345

20

30

40

50

28号、同2006-0198840号、同2009-0110684号、同2006-0159695号、同2006-0013824号、同2005-0288491号、同2005-0019758号、同2008-0226630号、同2009-0137003号および同2009-0092609号に記載されている抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。下記の表2Aおよび2Bは、抗RSV抗体の重鎖（表2A）および軽鎖（表2B）についての配列番号を説明する。重鎖および軽鎖の全長配列、重鎖および軽可変ドメインについての配列、およびCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2および/またはCDRL3の配列も含まれ、そこに示さる。

【0361】

【表 2 A】

表 2 A. 抗 R S V 抗体重鎖配列番号					
	重鎖	可変ドメイン	CDR1	CDR2	CDR3
シナジス	103	104	105	106	107
AFFF	113	114	115		116
P1212	122	123	124	125	126
P12f4	131	132		133	
P11d4	137	138			139
A1e9	144	145			
A12a6	149	150		151	
A13c4	155	156		157	
A17d4	161	162		163	
A4B4	167	168			
A8c7	172	173			
IX-493L1FR	176	232			
M3H9	179				
Y10H6	185				
DG	186	187			188
AFFF (1)	190				
6H8	194				
L1-7E5	198				
L2-15B10	201				
A13a11	205	206			
A1h5	210				
A4B4 (1)	215				
A4B4L1	219				
A4B4-F25S	222				
H3-3F4	226	227			
A3e2	233	234		235	
A14a4	239	240			241
A16b4	246	247			
A17b5	252	253			
A17f5	257	258		259	
Rsv6/11/21/22	362		363	364	365
Rsv13/19H	366		367	368	369
Rsv23	362		363	364	365

【 0 3 6 2 】

【表 2 B】

表 2 B. 抗 R S V 抗体軽鎖配列番号					
	軽鎖	可変ドメイン	CDR1	CDR2	CDR3
シナジス	108	109	110	111	112
AFFF	117	118	119	120	121
P1212	127	128	129	130	
P12f4	134	135		136	
P11d4	140	141	142	143	
A1e9	146	147		148	
A12a6	152	153	154		
A13c4	158	159		160	
A17d4	164	165	166		
A4B4	169	170		171	
A8c7	174	175			
IX-493L1FR	177	178			
M3H9	180	181		231	
Y10H6	183	184		185	
DG	189				
AFFF (1)	191	192			193
6H8	195	196		197	
L1-7E5	199	200			
L2-15B10	202	203		204	
A13a11	207	208		209	
A1h5	211	212	213	214	
A4B4 (1)	216	217		218	
A4B4L1	220	221			
A4B4-F25S	223	224		225	
H3-3F4	228	229			
A3e2	236	237		238	
A14a4	242	243	244	245	
A16b4	248	249	250	251	
A17b5	254	255		256	
A17f5	260	261		262	
A17h4	263	264	265	266	
Rsv6/11/21/22	370		371	372	373
Rsv13/19H	378		379	380	381
Rsv23	374		375	376	377

【 0 3 6 3 】

いくつかの例では、多重特異性抗体または抗原結合断片は、R S V F タンパク質のエピトープおよび別の異種ポリペプチドのエピトープまたは例えば、固相支持体物質などのその他の抗原物質と免疫特異的に結合し得る（例えば、国際 P C T 公開番号 W O 9 3 / 1 7 7 1 5、W O 9 2 / 0 8 8 0 2、W O 9 1 / 0 0 3 6 0 および W O 9 2 / 0 5 7 9 3；米国特許第 4, 4 7 4, 8 9 3 号、同 4, 7 1 4, 6 8 1 号、同 4, 9 2 5, 6 4 8 号、同 5, 5 7 3, 9 2 0 号および同 5, 6 0 1, 8 1 9 号；Tutt、et al., (1991) J. Immu

10

20

30

40

50

nol. 147:60-69およびKostelny et al., (1992) J. Immunol. 148:1547-1553参照のこと。

【0364】

(1) ペプチドリinkerによる多量体化

【0365】

ペプチドリinkerを使用して、例えば、1種の多量体化パートナーが、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片である多量体などの多価抗体を製造できる。一例では、ペプチドリinkerは、第1のポリペプチドのC末端および第2のポリペプチドのN末端に融合され得る。この構造は、少なくとも1つの、例えば、2、3、4またはそれ以上の可溶性ポリペプチドが、そのそれぞれの末端でペプチドリinkerによって互いに連結されるように多数回反復され得る。例えば、多量体ポリペプチドは、配列 Z_1-X-Z_2 {式中、 Z_1 および Z_2 は、各々、抗RSV抗原結合断片の配列（例えば、抗RSV一本鎖抗体；例えば、一本鎖抗体の多量体化を記載する米国特許第6,759,518号参照のこと）であり、Xは、ペプチドリinkerの配列である} を有し得る。いくつかの例では、 Z_1 および/または Z_2 は、本明細書において提供される抗RSV抗原結合断片である。別の例では、 Z_1 および Z_2 は、異なる抗RSV抗原結合断片（ここで、少なくとも Z_1 または Z_2 は、本明細書において提供される抗RSV抗体または抗原結合断片に由来する）である。いくつかの例では、多量体ポリペプチドは、 $Z_1-X-Z_2-(X-Z)_n$ の配列（式中、「n」は任意の整数、すなわち、一般に、1または2である）を有する。通常、ペプチドリinkerは、各抗RSV抗原結合断片が、抗体の結合特異性に干渉することなく、そのそれぞれのエピトープと結合するのを可能にするよう十分な長さのものである。

【0366】

(2) ヘテロ二官能性連結物質による多量体化

【0367】

多価抗体を作製するための、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の、別の抗RSV抗体または抗原結合断片との連結は、直接的である場合も、間接的である場合もある。例えば、2種以上の抗RSV抗体または抗原結合断片の連結は、化学結合によって達成され得るか、または当技術分野で公知のいずれかもしくは本明細書において提供されるいずれかなどのヘテロ二官能性リンカーによって容易にされ得る。

【0368】

アミノ基およびチオール基間に共有結合を形成するために、また、タンパク質にチオール基を導入するために使用される多数のヘテロ二官能性架橋試薬は、当業者に公知である [例えば、このような試薬の調製および使用を記載し、このような試薬の商業的供給源を提供する PIERCE CATALOG, ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993参照のこと；例えば、Cumber et al., (1992) Bioconjugate Chem. 3:397-401; Thorpe et al., (1987) Cancer Res. 47:5924-5931; Gordon et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:308-312; Walden et al., (1986) J. Mol. Cell Immunol. 2:191-197; Carlsson et al., (1978) Biochem. J. 173: 723-737; Mahan et al., (1987) Anal. Biochem. 162:163-170; Waryznaczak et al., (1992) Br. J. Cancer 66:361-366; Fattom et al., (1992) Infection & Immun. 60:584-589も参照のこと]。これらの試薬を使用して、2種の抗体間または各抗体とリンカー間に共有結合を形成できる。例示的試薬として、それだけには限らないが：N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアト (SPDP; ジスルフィドリinker)；スルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアト (スルホ-LC-SPDP)；スクシンイミジロキシカルボニル- α -メチルベンジルチオスルファート (SMBT、ヒンダードジスルファートリンカー)；スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノアト (LC-SPDP)；スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシラート (スルホ-SMCC)；スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)ブチラート (SPDB; ヒンダードジスルフィド結合リン

カー) ; スルホスクシンイミジル 2- (7-アジド-4-メチルクマリリン-3-アセトアミド) エチル-1, 3'-ジチオプロピオナート (SAED) ; スルホスクシンイミジル 7-アジド-4-メチルクマリリン-3-アセタート (SAMCA) ; スルホスクシンイミジル-6- [α-メチル-α- (2-ピリジルジチオ) トルアミド] -ヘキサノアート (スルホ-LC-SMPT) ; 1, 4-ジ- [3'- (2'-ピリジルジチオ) プロピオン-アミド] ブタン (DPDPB) ; 4-スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチル-α- (2-ピリジルチオ) トルエン (SMPT、ヒンダードジスルファートリンカー) ; スルホスクシンイミジル-6- [α-メチル-α- (2-ピリミルジ (pyrimidyldi) -チオ) トルアミド] ヘキサノアート (スルホ-LC-SMPT) ; m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) ; m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ-MBS) ; N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾアート (SIAB; チオエーテルリンカー) ; スルホスクシンイミジル- (4-ヨードアセチル) アミノベンゾアート (スルホ-SIAB) ; スクシンイミジル-4- (p-マレイミドフェニル) ブチラート (SMPB) ; スルホスクシンイミジル 4- (p-マレイミドフェニル) ブチラート (スルホ-SMPB) およびアジドベンゾイルヒドラジド (ABH) が挙げられる。いくつかの例では、リンカーは、柔軟性または溶解度を高めるものまたは立体障害を提供するものもしくは排除するものなどのペプチドリンカーと組み合わせて使用してよい。ポリペプチド分子を別の分子と連結するための当業者に公知の任意のその他のリンカーを使用してよい。

【0369】

(3) ポリペプチド多量体化ドメイン

【0370】

多価および／または多重特異性誘導抗体を形成するための2種以上の抗原結合断片の相互作用は、それ自体が相互作用して安定な構造を形成できる、任意の部分またはその他のポリペプチドとの直接的または間接的いずれかのその連結によって容易にされ得る。例えば、多量体化によって別個のコードされたポリペプチド鎖を接続してもよく、それによって、ポリペプチドの多量体化は、多量体化ドメインによって媒介される。通常、多量体化ドメインは、第1のキメラポリペプチドと第2のキメラポリペプチド間の安定なタンパク質間相互作用の形成を提供する。キメラポリペプチドは、例えば、抗体またはその抗原結合断片の1つの鎖 (例えば、可変重鎖ドメインまたは可変軽鎖ドメイン) の、多量体化ドメインとの連結 (直接的または間接的) を含む。通常、多量体化ドメインは、抗体またはその抗原結合断片の重鎖ドメインと連結される。このようなキメラポリペプチドは、抗体鎖をコードする核酸を多量体化ドメインをコードする核酸と融合するための組換え技術を使用して融合タンパク質として作製され得る。

【0371】

本明細書において提供される多価および／または多重特異性誘導抗体にとって、少なくとも1種の多量体化パートナーは、多量体化ドメインと直接的または間接的に連結している抗RSV抗体またはその抗原結合断片である。ホモまたはヘテロ多量体ポリペプチドは、別個のキメラポリペプチドの同時発現から作製され得る。第1および第2のキメラポリペプチドは、同一であっても異なってもよい。

【0372】

一般に、多量体化ドメインは、別のポリペプチドと、安定なタンパク質間相互作用を形成できる任意のポリペプチドを含む。多量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリン配列 (例えば、Fcドメイン)、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域またはホモまたはヘテロ多量体のキメラ分子間に分子間ジスルフィド結合を形成する遊離チオールを介して相互作用し得る。さらに、多量体化ドメインは、例えば、米国特許第5, 731, 168号に記載されるものなどの、孔またはポケットを含むアミノ酸配列に対して相補的である突出部分を含むアミノ酸配列を含み得る。このような多量体化領域は、立体的相互作用が安定な相互作用を促進するだけでなく、キメラモノマーの混合物からホモ二量体を上回

るヘテロ二量体の形成をさらに促進するように操作され得る。

【0373】

いくつかの例では、多価および／または多重特異性抗体は、多量体化ドメインを介した2つの抗RSV抗原結合断片の連結によって作製される。このような例では、抗原結合断片のうち少なくとも1つは、例えば、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6などの本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片に由来する。

【0374】

キメラポリペプチドを形成するために、例えば、抗RSV抗原結合断片などの抗原結合ポリペプチドを、多量体化ドメインにコンジュゲートできる。2種以上の鎖（例えば、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン）を含有する抗RSV抗原結合断片については、多量体化ドメインが、鎖、通常、重鎖の一方にコンジュゲートされ得る。抗原結合断片は、通常、多量体化ドメインのNまたはC末端のそのNまたはC末端を介して連結される。通常、多量体化ドメインは、抗原結合断片のC末端（例えば、一本鎖抗体のC末端または抗原結合断片の一方の鎖のC末端）にコンジュゲートされる。連結は、直接的である場合も、リンカーを介して間接的である場合もある。また、キメラポリペプチドは、融合タンパク質である場合も、共有結合または非共有結合相互作用などによる化学結合によって形成される場合もある。例えば、多量体化ドメインを含有するキメラポリペプチドを調製する場合には、抗RSV抗原結合断片のすべてまたは一部をコードする核酸は、多量体化ドメイン配列をコードする核酸に、直接的にか、または間接的に、または所望により、リンカードメインを介して機能し得る形で連結され得る。通常、コンストラクトは、抗RSV抗原結合断片（または抗原結合断片の一本鎖）のC末端が、多量体化ドメインのN末端と接続しているキメラタンパク質をコードする。

【0375】

本明細書において提供される多価抗体は、2つの同一または異なる抗RSV抗原結合断片を、直接的または間接的に、多量体化ドメインに直接的または間接的に連結することによって作製された、2種のキメラタンパク質を含有する。多量体化ドメインがポリペプチドであるいくつかの例では、抗RSV抗原結合断片（または抗原結合断片の一本鎖）多量体化ドメインキメラポリペプチドをコードする遺伝子融合物が、適当な発現ベクター中に挿入される。得られた抗RSV抗原結合断片多量体化ドメインキメラタンパク質は、組換え発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞中で発現され、多量体に組み立てることが可能となり得、ここで、多量体化ドメインが相互作用して、多価抗体を形成する。多量体化ドメインの、抗RSV抗原結合断片との化学結合はまた、上記で論じられるヘテロ二官能性リンカーを使用して達成され得る。いくつかの例では、多価抗体は、異なるエピートープと結合する2種以上の抗RSV抗原結合断片に由来する多重特異性抗体である。

【0376】

得られたキメラポリペプチドおよびそれから形成される多価抗体は、当技術分野で公知の任意の適した方法によって、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラムでのアフィニティークロマトグラフィーなどによって精製され得る。異なる抗RSV抗原結合キメラポリペプチドをコードする2種の核酸分子が、細胞中に形質転換される場合には、ホモおよびヘテロ二量体の形成が起こる。発現のための条件は、ヘテロ二量体形成が、ホモ二量体形成を上回って好まれるよう調整され得る。

【0377】

(a) 免疫グロブリンドメイン

【0378】

多量体化ドメインは、さらなるアミノ酸配列の多量体化ドメインと、分子間ジスルフィド結合を形成するよう反応できる遊離チオール部分を含むものを含む。例えば、多量体化ドメインは、免疫グロブリン分子の一部、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgD、IgMおよびIgEに由来するものを含み得る。一般に、多量体化ドメインとして使用するために選択される免疫グロブリンの一部は、定常領域（Fc）

である。Fcドメインをはじめとする抗体由来ポリペプチドの種々の部分と融合しているポリペプチドを含有する融合タンパク質の調製は、記載されている〔例えば、Ashkenazi et al. (1991) PNAS 88: 10535; Byrn et al. (1990) Nature, 344:677およびHollenbaugh and Aruffo, (1992) 「Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins」, in Current protocols in Immunology, Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11参照のこと〕。

【0379】

ヒトでは、デルタ (δ)、ガンマ (γ)、ミュー (μ)、アルファ (α) およびイプシロン (ϵ) として示される、その重鎖に基づいて分類された5種の抗体アイソタイプがあり、それぞれ、抗体のIgD、IgG、IgM、IgAおよびIgEクラスを生じさせる。IgAおよびIgGクラスは、サブクラスIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含有する。免疫グロブリン重鎖間の配列の相違のために、種々のアイソタイプは、例えば、定常(C)ドメインの数、ヒンジ領域の存在ならびに鎖間ジスルフィド結合の数および位置において異なる。例えば、IgMおよびIgE重鎖は、ヒンジ領域に取って代わる余分のCドメイン(C4)を含有する。IgG、IgDおよびIgAのFc領域は、そのC γ 3、C δ 3およびC α 3ドメインによって互いに対を形成するが、IgMおよびIgEのFc領域は、そのC μ 4およびC ϵ 4ドメインによって二量体化する。IgMおよびIgAは、それぞれ、10および4の抗原結合部位を有する多価構造を形成する。

【0380】

本明細書において提供される抗原結合キメラポリペプチドは、全長免疫グロブリンポリペプチドを含む(すなわち、全長免疫グロブリンのすべてのドメインを含む)。いくつかの例では、抗原結合キメラポリペプチドは、全長未満である(例えば、キメラポリペプチドは、抗原結合ドメインと、多量体化のための1つまたは複数の免疫グロブリンドメインを含有し得、キメラポリペプチドは、全長免疫グロブリンではない)。いくつかの例では、抗RSV抗原結合キメラポリペプチドは、一価またはヘテロもしくはホモ多価抗体、例えば、二価、三価、四価、五価、六価、七価またはそれ以上の結合価の抗体として組み立てられる。変動する構造の鎖または基本単位(例えば、もう1つの異種定常領域またはドメイン)を利用して、一価ならびにヘテロおよびホモ多価抗体を組み立てることができる。抗RSV抗原結合キメラポリペプチドは、適当な核酸分子を用いて形質転換された哺乳類細胞によって容易に産生され、分泌され得る。いくつかの例では、1または2以上の核酸融合分子を宿主細胞中に形質転換して、多価抗体を製造でき、多価抗体の抗RSV抗原結合部分は、同一であるか、または異なっている。通常、多価抗体の少なくとも1つの抗RSV抗原結合部分は、例えば、58c5、sc5、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6などの本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片に由来する。

【0381】

(i) Fcドメイン

【0382】

本明細書において提供される抗RSV抗原結合断片を含有する多価および/または多重特異性抗体を作製するために使用できる例示的多量体化ドメインとして、選択された免疫グロブリン分子の重鎖定常領域またはドメインに由来するポリペプチドが挙げられる。ヒトIgGサブタイプの重鎖定常領域の例示的配列は、配列番号356(IgG1)、配列番号357(IgG2)、配列番号358(IgG3)および配列番号359(IgG4)に示されている。例えば、配列番号356に示される例示的重鎖定常領域について、C_H1ドメインは、アミノ酸1~103に対応し、ヒンジ領域は、アミノ酸104~119に対応し、C_H2ドメインは、アミノ酸120~223に対応し、C_H3ドメインは、アミノ酸224~330に対応する。

【0383】

一例では、免疫グロブリンポリペプチドキメラタンパク質は、免疫グロブリンポリペプチドのFc領域を含み得る。通常、このような融合物は、少なくとも1つの機能的に活性

なヒンジ、免疫グロブリン重鎖の定常領域の C_H2 および C_H3 ドメインを保持する。例えば、IgG1の全長Fc配列は、配列番号356に示される配列のアミノ酸104～330を含む。hIgG1の例示的Fc配列は、配列番号360に示されており、配列番号356のアミノ酸104～119に対応するヒンジ配列ならびに配列番号356に示される C_H2 および C_H3 ドメインの完全配列を含有する。別の例示的Fcポリペプチドは、PCT出願WO93/10151に示されており、N末端ヒンジ領域からヒトIgG1抗体のFc領域の天然C末端に延びる一本鎖ポリペプチド（配列番号361）である。連結が作製される正確な部位は、決定的なものではなく、特定の部位が当技術分野で周知であり、抗RSV抗原結合キメラポリペプチドの生物活性、分泌または結合特徴を最適化するように選択され得る。例えば、その他の例示的Fcポリペプチド配列は、配列番号356に示される配列のアミノ酸C109またはP113で始まる（例えば、US2006/0024298参照のこと）。

10

【0384】

hIgG1 Fcに加えて、その他のFc領域もまた、本明細書において提供される抗RSV抗原結合キメラポリペプチド中に含まれ得る。例えば、Fc融合物は、それだけには限らないが、IgG（ヒトサブクラスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む）、IgA（ヒトサブクラスIgA1およびIgA2を含む）、IgD、IgEおよびIgMクラスの抗体をはじめとするいずれかの抗体クラスに属する免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる免疫グロブリン配列を含有し得る。

【0385】

20

いくつかの例では、Fcドメインは、例えば、免疫応答の媒介におけるFcドメインのエフェクター機能などのドメインの機能特性に基づいて選択され得る。例えば、Fc/FcγR相互作用によって媒介されるエフェクター機能が最小化される場合には、補体またはエフェクター細胞を不十分にしか動員しないIgGアイソタイプ、例えば、IgG2またはIgG4のFcとの融合物が使用され得る。

【0386】

抗RSV抗原結合断片とのキメラにおいて使用するために、改変されたFcドメインもまた、本明細書において考慮される。例示的改変については、例えば、米国特許第7,217,797号および米国特許出願公開第2006/0198840号、同2006/0024298号および同2008/0287657号および国際特許公開番号WO2005/063816参照のこと。Fcドメインの例示的アミノ酸改変はまた、本明細書において他の部分で提供される。

30

【0387】

通常、二価抗体は、2つの同一または異なる抗RSV抗原結合断片をFcポリペプチドと直接的または間接的に連結することによって作製された2種のキメラタンパク質の二量体である。いくつかの例では、キメラタンパク質をコードする遺伝子融合物は、適当な発現ベクター中に挿入される。得られたキメラタンパク質は、組換え発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞中で発現され得、Fc部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成される場合には、組み立てて、二価抗RSV抗体を得ることが可能となる。通常、宿主細胞および発現系は、キメラタンパク質のグリコシル化を可能にする哺乳類発現系である。Fc部分

40

【0388】

50

あるいは、ヘテロ二量体の形成は、抗 R S V 抗原結合断片と、それに続く h I g G の F c ドメインと、それに続く c - j u n または c - f o s ロイシンジッパーのいずれかを含有する抗 R S V 抗原結合融合分子を遺伝子操作することおよび発現させることによって偏らせることができる。ロイシンジッパーはヘテロ二量体を主に形成するので、必要な場合には、それらを使用してヘテロ二量体の形成を駆動することができる。F c 領域を含有する抗 R S V キメラポリペプチドはまた、金属キレートまたはその他のエピトープを含むタグを含むよう操作できる。金属キレートクロマトグラフィーによる、および／または抗体による迅速な精製のためにタグのついたドメインを使用して、ウエスタンブロットの検出、免疫沈降またはバイオアッセイにおける活性枯渇／ブロッキングが可能となる。

【0389】

10

D. 抗 R S V 抗体のさらなる改変

【0390】

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、さらに改変してもよい。抗 R S V 抗体または抗原結合断片の改変によって、それだけには限らないが、タンパク質分解に対する感受性を低減することおよび／または酸化に対する感受性を低減することおよび抗体またはその抗原結合断片の結合特性を変更または改善することなど、抗体または抗原結合断片の免疫原性の低減、抗体または抗原結合断片の半減期の改善をはじめとする抗体の 1 つまたは複数の特性が改善され得る。例示的改変として、それだけには限らないが、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の一次アミノ酸配列の改変および抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の翻訳後修飾の変更が挙げられる。例示的翻訳後修飾として、例えば、グリコシル化、アセチル化、ベグ化、リン酸化、アミド化、保護基／ブロッキング基 (blocking group) を用いる誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたはその他のタンパク質との連結が挙げられる。その他の例示的改変として、抗体またはその抗原結合断片の 1 つまたは複数の特性を変更または改善するための、1 種もしくは複数の異種ペプチドの、抗 R S V 抗体または抗原結合断片との結合が挙げられる。

20

【0391】

一般に、改変は、抗体またはその抗原結合断片の免疫原性の増大をもたらさないか、または抗体またはその抗原結合断片の R S V との結合に大きく悪影響を与えない。改変された抗体またはその抗原結合断片の、R S V F タンパク質との結合を評価する方法は、本明細書において提供され、当技術分野で公知である。例えば、改変された抗体またはその抗原結合断片は、R S V F タンパク質との結合について、それだけには限らないが、E L I S A、表面プラズモン共鳴 (S P R) などの方法によってか、またはインビトロマイクログラフ中和アッセイによってアッセイされ得る。

30

【0392】

任意の抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の半減期を改善する方法が、本明細書において提供される。本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の半減期を増大することによって、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の治療的有効性を増大し、予防および／または治療のための、例えば、R S V 感染を防止もしくは治療する、R S V 感染の 1 種または複数の症状を予防、治療および／もしくは軽減する、または R S V 感染期間を低減するための、抗体またはその抗原結合断片のあまり頻繁でない投与が可能となる。

40

【0393】

本明細書において製造される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の改変は、親抗体からの天然突然変異またはヒトの操作のいずれかからの 1 つまたは複数のアミノ酸置換、欠失または付加を含み得る。抗体などのポリペプチドを改変する方法は、当技術分野で公知であり、本明細書において提供される任意の抗体またはその抗原結合断片の改変のために使用できる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の薬物動態特性は、当業者に公知の技術による F c 改変によって、増強できる。当業者に公知の標準技術を使用して、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片をコードするヌクレオチド分子中に突然変異を導入して、1 つまたは複数のアミノ酸

50

置換を有するポリペプチドを製造できる。突然変異を導入するための例示的技術として、それだけには限らないが、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発が挙げられる。

【0394】

本明細書において提供される抗RSV抗体およびその抗原結合断片は、精製を容易にするために、異種ペプチドの結合によって改変できる。一般に、このようなペプチドは、抗体またはその抗原結合断片のCまたはN末端でペプチドと融合している抗体を含有する融合タンパク質として発現される。精製のためによく使用される例示的ペプチドとして、それだけには限らないが、ヘキサヒスチジンペプチド、血球凝集素(HA)ペプチドおよびfla g タグペプチドが挙げられる[例えば、Wilson et al. (1984) Cell 37:767; Witz gall et al. (1994) Anal Biochem 223:2, 291-8参照のこと]。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカーペプチドを介して生じる場合もある。いくつかの例では、リンカーペプチドは、プロテアーゼ切断部位を特異的に認識するプロテアーゼでの切断による、精製後の精製ペプチドの除去を可能にするプロテアーゼ切断部位を含有する。

【0395】

本明細書において提供される抗RSV抗体およびその抗原結合断片はまた、インビトロまたはインビボいずれかでの、抗体または抗原結合断片をターゲッティングする異種ポリペプチドの、特定の細胞種(例えば、呼吸上皮細胞)との結合によって改変できる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、特定の細胞表面受容体に特異的な抗体または特異的細胞受容体と相互作用するその他のポリペプチドと融合またはコンジュゲートすることによって、抗体またはその抗原結合断片を特定の細胞種にターゲッティングできる。

【0396】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、抗体またはその抗原結合断片を、タンパク質トランスダクションドメイン(例えば、TATペプチド)などの細胞表面糖タンパク質と結合するペプチドと融合またはコンジュゲートすることによって、標的細胞表面にターゲッティングできる、および/または標的細胞によって取り込まれる。例示的タンパク質トランスダクション(transduction)ドメインとして、それだけには限らないが、ヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)TATなどのタンパク質に由来するPTD[Ruben et al. (1989) J. Virol. 63:1-8; 例えば、配列番号326~337、例えば、GRKKRRQR RR(TAT48~57)配列番号330)など]、ヘルペスウイルステグメントタンパク質VP22[Elliott and O'Hare (1997) Cell 88:223-233; 例えば、配列番号342]、キイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)のホメオティックタンパク質アンテナペディア(Antp)タンパク質(Penetratin PTD; Derossi et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:18188-18193; 例えば、配列番号311~314)、プロテグリン1(PG-1)抗菌ペプチドSynB[例えば、SynB1、SynB3およびSynB4; Kokryakov et al. (1993) FEBS Lett. 327:231-236; 例えば、それぞれ、配列番号323~325]および塩基性線維芽細胞増殖因子[Jans (1994) FASEB J. 8:841-847; 例えば、配列番号307]が挙げられる。PTDはまた、それだけには限らないが、ポリアルギニンペプチド[Futaki et al. (2003) J. Mol. Recognit. 16:260-264; Suzuki et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:5836-5840; 例えば、配列番号315~316]、トランスポートタンパク質[Pooga et al. (1988) FASEB J. 12:67-77; Pooga et al. (2001) FASEB J. 15:1451-1453; 例えば、配列番号338~341]、MAP[Oehlke et al. (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1414:127-139; 例えば、配列番号305]、KALA[Wyman et al. (1997) Biochemistry 36:3008-3017; 例えば、配列番号303]およびその他のカチオン性ペプチド、例えば、種々のβ-カチオン性ペプチド[Akkarawongsa et al. (2008) Antimicrob. Agents and Chemother. 52(6):2120-2129]などといった合成PTDも含む。

【0397】

本明細書において提供される抗RSV抗体およびその抗原結合断片は、抗体またはその

抗原結合断片に診断用および／または治療用部分を結合することによって改変できる。本明細書において提供される抗RSV抗体およびその抗原結合断片は、共有結合が、抗体またはその抗原結合断片がその対応するエピトープと結合するのを妨げないように、抗体またはその抗原結合断片に、任意の種類の分子、例えば、診断用または治療用分子を共有結合することによって改変できる。例えば、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、共有結合が、抗体またはその抗原結合断片がRSVと結合するのを妨げないように、分子を共有結合することによってさらに改変できる。いくつかの例では、抗体またはその抗原結合断片は、N末端またはC末端で異種ポリペプチドと組換えによって融合できるか、または異種ポリペプチドもしくはその他の組成物と、共有結合および非共有コンジュゲーションを含めて、化学的にコンジュゲートできる。例えば、異種ポリペプチドまたは組成物は、診断用ポリペプチドもしくはその他の診断用部分または治療用ポリペプチドもしくはその他治療用部分であり得る。例示的診断用および治療用部分として、それだけには限らないが、薬物、放射性ヌクレオチド、毒素、蛍光分子が挙げられる（例えば、国際PCT公開番号WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；米国特許第5,314,995号およびEP396,387を参照のこと）。診断用ポリペプチドまたは診断用部分は、例えば、インビボまたはインビトロ検出のための標識として使用できる。治療用ポリペプチドまたは治療用部分は、例えば、RSV感染などのウイルス感染の治療のために、またはウイルス感染の1種もしくは複数の(one or more)症状の治療のために使用できる。

【0398】

遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリングおよび／またはコドンシャッフリング（まとめて「DNAシャッフリング」と呼ばれる）の技術によって、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片のさらなる融合タンパク質を作製できる。DNAシャッフリングを使用して、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の活性を変更、例えば、高い親和性および低い解離速度を有する抗体またはその抗原結合断片を製造できる〔概して、米国特許第5,605,793号；同5,811,238号；同5,830,721号；同5,834,252号および同5,837,458号およびPatten et al. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Harayama (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76；およびLorenzo and Blasco (1998) Biotechniques 24(2):308-13参照のこと〕。

【0399】

提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、標的抗原のイムノアッセイまたは精製にとって有用である固相支持体と結合させてもよい。例示的固相支持体として、それだけには限らないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

【0400】

1. 免疫原性を低下するための改変

【0401】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片は、ヒト対象などの対象において免疫原性を低下させるようにさらに改変できる。例えば、抗体またはその抗原結合断片中の1個または複数のアミノ酸は、対象の免疫系に対して曝された場合に、抗体またはその抗原結合断片の免疫原性を排除または低下させるために、ヒトT細胞の潜在的なエピトープを変更するように改変できる。例示的改変として、抗体またはその抗原結合断片の免疫原性を排除または低下させる、1個または複数のアミノ酸の置換、欠失および挿入が挙げられる。一般に、このような改変は、抗体またはその抗原結合断片の、そのそれぞれの抗原に対する結合特異性を変更しない。抗体またはその抗原結合断片の免疫原性を低下させることは、例えば、抗体もしくはその抗原結合断片の治療効力を改善することおよび／またはインビボでの抗体もしくはその抗原結合断片の半減期を増大することなど、抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数の特性を改善し得る。

【0402】

2. Fc 改変

【0403】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、野生型または改変されたFc領域を含有し得る。本明細書において他の部分で記載されるように、Fc領域を、例えば、58c5、sc5、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9もしくは69F6などの本明細書において提供される抗RSV抗原結合断片または58c5、sc5、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9もしくは69F6に由来する抗原結合断片に連結してもよい。いくつかの例では、Fc領域を改変して、Fcポリペプチドの1つまたは複数の特性を変更できる。例えば、Fc領域を改変して、エフェクター機能を、野生型免疫グロブリン重鎖のFc領域のエフェクター機能と比較して変更（すなわち、多くまたは少なく）できる。抗体のFc領域は、いくつかのFc受容体およびリガンドと相互作用し、エフェクター機能と呼ばれる数々の重要な機能を付与する。Fcエフェクター機能として、例えば、Fc受容体結合、補体結合およびT細胞枯渇活性が挙げられる（例えば、米国特許第6,136,310号参照のこと）。T細胞枯渇活性、Fcエフェクター機能および抗体安定性をアッセイする方法は、当技術分野で公知である。例えば、IgG分子のFc領域は、FcγRと相互作用する。これらの受容体は、例えば、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、肥満細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞およびγδT細胞をはじめとする種々の免疫細胞において発現される。Fc/FcγR複合体の形成は、これらのエフェクター細胞を、結合している抗原の部位に動員し、通常、細胞内のシグナル伝達事象ならびに炎症メディエーターの放出、B細胞活性化、エンドサイトーシス、食作用および細胞傷害性攻撃などの重要なその後の免疫応答をもたらす。細胞傷害性および食作用性エフェクター機能を媒介する能力は、抗体が標的とされる細胞を破壊する潜在的機序である。FcγRを発現する細胞傷害性細胞による、標的細胞上に結合している抗体の認識および溶解は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）と呼ばれる。種々の抗体アイソタイプのその他のFc受容体として、Fc(R(IgE))、Fc(R(IgA))およびFcμR(IgM)が挙げられる。

【0404】

したがって、改変されたFcドメインは、それだけには限らないが、Fc受容体の増大した親和性または低い親和性または親和性がないことを含めた変更された親和性を有し得る。例えば、異なるIgGサブクラスは、FcγRに対して異なる親和性を有し、IgG1およびIgG3は、通常、IgG2およびIgG4よりも実質的に良好に受容体と結合する。さらに、異なるFcγRは、異なるエフェクター機能を媒介する。FcγR1、FcγRIIa/cおよびFcγRIIIaは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を有する細胞内ドメインを有することを特徴とする免疫複合体によって誘発される活性化の正の制御因子である。しかし、FcγRIIbは、免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を有し、したがって、阻害性である。したがって、受容体のFc領域の親和性を変更することによって、Fcドメインによって誘発されるエフェクター機能を調節できる。

【0405】

一例では、例えば、抗体依存性細胞傷害、ADCCなどのエフェクター機能を良好に媒介するよう、特定のFcγRとの最適化された結合のために改変されているFc領域が使用される。このような改変されたFc領域は、それだけには限らないが、アミノ酸位置249、252、259、262、268、271、273、277、280、281、285、287、296、300、317、323、343、345、346、349、351、352、353および424をはじめとする1個または複数のアミノ酸残基での改変を含有し得る [Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human S

10

20

30

40

50

ervices]。例えば、Fc領域中の改変は、配列番号356に示される例示的IgG1配列のG119S、G119A、S122D、S122E、S122N、S122Q、S122T、K129H、K129Y、D132Y、R138Y、E141Y、T143H、V147I、S150E、H151D、E155Y、E155I、E155H、K157E、G164D、E166L、E166H、S181A、S181D、S187T、S207G、S307I、K209T、K209E、K209D、A210D、A213Y、A213L、A213I、I215D、I215E、I215N、I215Q、E216Y、E216A、K217T、K217F、K217AおよびP279Lのうちいずれか1種または複数またはそれらの組合せに対応して行うことができる。これらの突然変異を含有する改変されたFcは、例えば、活性化受容体FcγRIIIaなどのFcRとの増強された結合を有し得る、および／または阻害性受容体FcγRIIbとの減少した結合を有し得る（例えば、US2006/0024298参照のこと）。FcRとの増大した結合を有するよう改変されたFc領域は、患者におけるウイルス（例えば、RSV）感染細胞の破壊の促進においてより有効であり得る。

【0406】

いくつかの例では、抗体またはその抗原結合断片のインビボ半減期および薬物動態を増大するために、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片を、抗体またはその抗原結合断片の、FcRn受容体との相互作用を改善するようさらに改変できる（例えば、米国特許第7,217,797号、米国特許出願公開第2006/0198840および同2008/0287657号参照のこと）。FcRnは、新生児FcRであり、その結合によって、エンドサイトーシスされた抗体またはその抗原結合断片がエンドソームから血流へ戻って再利用される。このプロセスは、全長分子の大きな大きさによる腎臓濾過の妨害と相まって、1～3週間の範囲の好都合な抗体血清半減期をもたらす。Fcの、FcRnとの結合は、抗体輸送において役割を果たす。

【0407】

Fc領域の例示的改変として、それだけには限らないが、米国特許第7,217,797号；米国特許出願公開第2006/0198840号、同2006/0024298号および同2008/0287657号ならびに国際特許公開番号WO2005/063816に記載されるFcの突然変異、Fc重鎖定常領域の、CH2ドメイン中の1つまたは複数のアミノ酸残基[Kabat番号付け、Kabat et al. (1991)]251～256、285～90、308～314および／またはCH3ドメイン中のアミノ酸残基385～389および428～436での突然変異などが挙げられ、これでは、改変は、改変されていない抗体またはその抗原結合断片に対して、Fc受容体結合親和性および／または血清半減期を変更する。いくつかの例では、IgG定常ドメインは、IgG重鎖定常領域の、CH2ドメイン中の1つまたは複数のアミノ酸位置250、251、252、254、255、256、263、308、309、311、312および314および／またはCH3ドメイン中のアミノ酸位置385、386、387、389、428、433、434、436および459でFc領域において改変される。このような改変は、配列番号356に示される例示的IgG1配列中の、CH2ドメイン中のアミノ酸Gly120、Pro121、Ser122、Phe124、Leu125、Phe126、Thr133、Pro174、Arg175、Glu177、Gln178およびAsn180ならびにCH3ドメイン中のアミノ酸Gln245、Val246、Ser247、Thr249、Ser283、Gly285、Ser286、Phe288およびMet311に相当する。いくつかの例では、改変は、1個または複数の表面に曝露された残基においてであり、改変は、置換される残基と同様の荷電、極性または疎水性の残基を用いる置換である。

【0408】

特定の例では、Fc重鎖定常領域は、1つまたは複数のアミノ酸位置251、252、254、255および256(Kabat番号付け)で改変され、これでは、位置251は、LeuまたはArgで置換され、位置252は、Tyr、Phe、Ser、Trpま

10

20

30

40

50

たはThrで置換され、位置254は、ThrまたはSerで置換され、位置255は、Leu、Gly、IleまたはArgで置換され、および／または位置256は、Ser、Arg、Gln、Glu、Asp、Ala、AspまたはThrで置換される。いくつかの例では、Fc重鎖定常領域は、1つまたは複数のアミノ酸位置308、309、311、312および314で改変され、これでは、位置308は、ThrまたはIleで置換され、位置309は、Proで置換され、位置311は、セリンまたはGluで置換され、位置312は、Aspで置換され、および／または位置314は、Leuで置換される。いくつかの例では、Fc重鎖定常領域は、1つまたは複数のアミノ酸位置428、433、434および436において改変され、これでは、位置428は、Met、Thr、Leu、PheまたはSerで置換され、位置433は、Lys、Arg、Ser、Ile、Pro、GlnまたはHisで置換され、位置434は、Phe、TyrまたはHisで置換され、および／または位置436は、His、Asn、Asp、Thr、Lys、MetまたはThrで置換される。いくつかの例では、Fc重鎖定常領域は、1つまたは複数のアミノ酸位置263および459において改変され、ここで、位置263は、GlnまたはGluで置換され、および／または位置459は、LeuまたはPheで置換される。

【0409】

いくつかの例では、Fc重鎖定常領域は、補体タンパク質C1qとの結合を増強するように改変できる。FcRと相互作用することに加えて、Fcはまた、補体タンパク質C1qと相互作用し、補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介する。C1qは、セリンプロテアーゼC1rおよびC1sとの複合体を形成して、C1複合体を形成する。C1qは、6種の抗体と結合できるが、2種のIgGとの結合が、補体カスケードを活性化するのに十分である。FcRとのFc相互作用と同様に、異なるIgGサブクラスは、C1qに対して異なる親和性を有し、IgG1およびIgG3は、通常、IgG2およびIgG4よりも実質的に良好に結合する。したがって、C1qとの増大された結合を有する改変されたFcは、増強されたCDCを媒介し得、ウイルス(例えば、RSV)感染細胞の破壊を増強し得る。C1qとの結合を増大するFc領域における例示的改変として、それだけには限らないが、位置345および353(Kabat番号づけ)でのアミノ酸の改変が含まれる。例示的改変として、配列番号356に示される例示的IgG1配列中のK209W、K209Y、およびE216Sに相当するものが含まれる。

【0410】

別の例では、FcγRとの結合を低減または切断するための置換を含む種々のFc突然変異体も知られている。このような突然変異体は、Fcによって媒介されるエフェクター機能の低減または排除が必要である場合には有用である。これは、拮抗作用が望ましいが、標的抗原を保有する細胞の死滅は望ましくない場合にはよくある。このようなFcの例示として、アミノ酸位置248、249および251(Kabat番号づけ)で改変されている、米国特許第5,457,035号に記載されるFcムテインがある。配列番号356に示される例示的IgG1配列では、アミノ酸117は、LeuからAlaに改変され、アミノ酸118は、LeuからGluに改変され、アミノ酸120は、GlyからAlaに改変される。同様の突然変異は、例えば、例示的Fc配列などの任意のFc配列において行われ得る。このムテインは、Fc受容体に対する親和性の低減を示す。

【0411】

本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片は、改変されたFc領域を含有するよう操作され得る。例えば、ポリペプチドを、抗体の定常領域と融合またはコンジュゲートする(すなわち、Fc融合タンパク質を製造する)方法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,336,603号、同5,622,929号、同5,359,046号、同5,349,053号、同5,447,851号、同5,723,125号、同5,783,181号、同5,908,626号、同5,844,095号および同5,112,946号;EP307,434;EP367,166;EP394,827;PCT公開WO91/06570、WO96/04388、WO96/22024

10

20

30

40

50

、WO 97/34631 および WO 99/04813 ; Ashkenazi et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 ; Traunecker et al. (1988) Nature 331:84-86 ; Zheng et al. (1995) J. Immunol. 154:5590-5600 ; および Vil et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (1992) に記載されており、本明細書において他の部分で記載されている。いくつかの例では、FcRn 結合親和性を増大する、および／または半減期を改善する、1つまたは複数の改変を有する改変されたFc領域を、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と融合できる。

【0412】

3. ペグ化

【0413】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、高分子量ポリエチレングリコール (PEG) などの高分子とコンジュゲートして、半減期を増大および／またはその薬物動態プロファイルを改善できる。コンジュゲーションは、当業者に公知の技術によって行うことができる。治療用抗体の、PEG とのコンジュゲーションは、機能に干渉しないで、薬動力学を増強することがわかっている (例えば、Deckert et al., Int. J. Cancer 87: 382-390, 2000 ; Knight et al., Platelets 15: 409-418, 2004 ; Leong et al., Cytokine 16: 106-119, 2001 ; および Yang et al., Protein Eng. 16: 761-770, 2003 参照のこと)。PEG を抗体または抗原結合断片と、抗体または抗原結合断片のN-またはC-末端へのPEGの部位特異的コンジュゲーションによってか、またはリシン残基上に存在するεアミノ基を介して、多機能性リンカーを用いてか、または用いずに、結合できる。生物活性の最小の喪失しかもたらさない直鎖または分岐ポリマー誘導体化を使用できる。コンジュゲーションの程度は、SDS-PAGE および質量分析によってモニタリングし、PEG分子の、抗体との適切なコンジュゲーションを確実にすることができる。未反応のPEGを、例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって抗体-PEGコンジュゲーションから分離できる。PEG誘導体化された抗体またはその抗原結合断片は、当業者に公知の方法を使用して、例えば、本明細書に記載されるイムノアッセイによって、RSV抗原との結合活性について、ならびにインビボ有効性について試験できる。

【0414】

4. 検出可能な部分のコンジュゲーション

【0415】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体および抗体断片を、検出可能な部分とのコンジュゲーションによってさらに改変できる。検出可能な部分は、直接的にまたは間接的に検出され得る。選択された検出可能な部分に応じて、検出可能な部分をインビボおよび／またはインビトロで検出できる。検出可能な部分は、例えば、RSVに対する曝露もしくはRSVの局在性を検出するための診断法または抗RSV抗体もしくはその抗原結合断片のRSVに対する結合親和性を調べるための結合アッセイにおいて使用できる。検出可能な部分はまた、例えば、抗体またはその抗原結合断片の精製などの抗RSV抗体を調製する方法において使用できる。通常、検出可能な部分は、検出可能な部分のコンジュゲーションが、抗体またはその抗原結合断片の標的エピトープとの結合に干渉しないように選択される。一般に、検出可能な部分の選択は、必要な感度、化合物とのコンジュゲーションの容易さ、安定性必要条件、利用可能な計測手段および処分規定に応じて変わる。当業者ならば、標識に精通しており、使用されるアッセイに適した、適合する検出可能な標識を同定できる。検出可能な部分を用いて抗体を標識する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、組換えおよび化学法が挙げられる。

【0416】

検出可能な部分は、検出可能な物理的または化学的特性を有する任意の物質であり得る。このような検出可能な標識は、イムノアッセイの分野において十分に開発されており、一般に、このような方法において有用なほとんどのいずれの標識も、適用される方法において適用できる。したがって、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫学的、電気

10

20

30

40

50

的、光学的または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。有用な標識として、それだけには限らないが、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P ）、特にガンマおよび陽電子放出放射性同位体（例えば、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr および ^{56}Fe ）、金属イオン（例えば、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr および ^{201}Tl ）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびE L I S Aにおいてよく使用されるその他のもの）、電子移動剤（例えば、金属結合性タンパク質および化合物を含む）、発光および化学発光標識（例えば、ルシフェリンおよび2, 3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノール）、磁性ビーズ（例えば、D Y N A B E A D S（商標））およびコロイド金または着色ガラスまたはプラスチックビーズ（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）などの比色分析標識が挙げられる。使用できる種々の標識またはシグナル生成システムの概説については、例えば、米国特許第4, 391, 904号を参照のこと。

【0417】

5. 治療用成分のコンジュゲーション

【0418】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗R S V抗体および抗原結合断片を、治療用部分とのコンジュゲーションによってさらに改変できる。例示的治療用部分として、それだけには限らないが、細胞毒素（例えば、細胞分裂阻害剤または細胞破壊剤）、治療薬または放射性金属イオン（例えば、 α -エミッター）が挙げられる。例示的細胞毒素または細胞傷害性薬剤として、それだけには限らないが、細胞にとって有害である任意の薬剤、例えば、それだけには限らないが、パクリタキソール (paclitaxol)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。例示的治療薬として、それだけには限らないが、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (B S N U) およびロムスチン (C C N U)）、シクロスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金 (I I) (D D P) シスプラチン)、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (A M C)）、有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）および抗ウイルス剤、例えば、それだけには限らないが、ジドブジン、アシクロビル、ガングシクロビル (gancyclovir)、ピダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジンおよびリバビリンなどのヌクレオシド類似体；ホスカメット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビルおよび α -インターフェロンが挙げられる。

【0419】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗R S V抗体および抗原結合断片を、治療用ポリペプチドである治療用部分とのコンジュゲーションによってさらに改変できる。例示的治療用ポリペプチドとして、それだけには限らないが、アブリン、リシンA、シェードモナス外毒素もしくはジフテリア毒素などの毒素またはサイトカイン、例えば、それだけには限らないが、インターフェロン（例えば、I F N- α 、 β 、 γ 、 ω ）、リンホカイン、造血増殖因子、例えば、G M- C S F（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）、インターロイキン-2 (I L-2)、インターロイキン-3 (I L-3)、インター

10

20

30

40

50

ロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-14 (IL-14) および腫瘍壊死因子 (TNF) などといった免疫刺激薬が挙げられる。

【0420】

6. 結合特異性を改善するための改変

【0421】

提供される抗RSV抗体および抗体断片の結合特異性を、ファージディスプレイなどの技術によって変更または改善できる。ファージディスプレイのための方法は、一般に、ライブラリーの抗体種をクローニングおよび発現するために、繊維状ファージ（ファージミド）表面発現ベクター系の使用を含む。コンビナトリアルライブラリーを製造するための種々のファージミドクローニング系が他者によって記載されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Kang et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366; Barbas et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982; Zebedee et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179; Kang et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123; Barbas et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461; およびGram et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580によって記載されるようなファージミドでのコンビナトリアル抗体ライブラリーの調製を参照のこと。

【0422】

特定の例では、 V_H および V_L ドメインをコードするDNA配列を、動物cDNAライブラリー（例えば、リンパ組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリー）から増幅する。 V_H および V_L ドメインをコードするDNAを、PCRによって、scFvリンカーと一緒に組換え、ファージミドベクター（例えば、pCANTAB 6またはpComb3 HSS）中にクローニングする。ベクターを、大腸菌にエレクトロポレーションし、大腸菌をヘルパーファージに感染させる。これらの方法において使用されるファージは、通常、fdおよびM13をはじめとする繊維状ファージであり、普通、 V_H および V_L ドメインを、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのいずれかと組換えによって融合する。RSV抗原、例えば、RSV Fタンパク質と結合する抗原結合ドメインを発現するファージを、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズと結合しているか、もしくは捕獲されている抗原を使用して、選択または同定できる。ファージディスプレイによって抗体を製造するために使用できるファージディスプレイ法の例として、例えば、その各々が、その全文が参照によって本明細書に組み込まれる、Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 187:9-18; Burton et al. (1994) Advances in Immunology 57:191-280; PCT公開番号WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/11236、WO95/15982、WO95/20401およびWO97/13844; ならびに米国特許第5,698,426号、同5,223,409号、同5,403,484号、同5,580,717号、同5,427,908号、同5,750,753号、同5,821,047号、同5,571,698号、同5,427,908号、同5,516,637号、同5,780,225号、同5,658,727号、同5,733,743号および同5,969,108号に開示されるものが挙げられる。

【0423】

上記の参考文献に記載のとおり、ファージ選択後、ファージから抗体コーディング領域を単離し、ヒト抗体をはじめとする全抗体または任意のその他の所望の抗原結合断片を複製するために使用でき、例えば、本明細書において記載されるような哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌をはじめとする任意の所望の宿主において発現させることができる。Fab、Fab' および $F(ab')_2$ 断片を組換えによって製造する技術も、PCT公開番号WO92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12(6)

:864-869 ; Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34 ; および Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043に開示されるものなどの当技術分野で公知の方法を使用して使用できる。

【0424】

得られたファージミドライブラリーを、抗体または抗原結合断片の免疫特異性を増大および／または変更するよう操作し、標的抗原との増大した結合などの特性の改善されたさらなる抗体を製造し、続いて、同定できる。例えば、重鎖および軽鎖のいずれかまたは両方をコードするDNAを、免疫グロブリンポリペプチドの可変領域の相補性決定領域(CDR)において突然変異誘発し、続いて、所望の免疫反応および中和能についてスクリーニングしてもよい。次いで、得られた抗体を、中和能を決定するために本明細書において記載される1つまたは複数のアッセイにおいてスクリーニングできる。

10

【0425】

ヒトおよびインビボ検出アッセイにおける、抗体のインビボ使用をはじめとするいくつかの使用については、ヒトまたはキメラ抗体を使用する。完全ヒト抗体は、ヒト対象の治療的処理にとって特に望ましい。ヒト抗体は、上記のファージディスプレイ法をはじめとする、ヒト免疫グロブリン配列またはヒト免疫グロブリン配列と相同である合成配列に由来する抗体ライブラリーを使用する当技術分野で公知の種々の方法によって製造できる。その各々がその全文が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,444,887号および同4,716,111号；ならびにPCT公開番号WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741参照のこと。

20

【0426】

E. 抗RSV抗体を単離する方法

【0427】

抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、それだけには限らないが、マウスハイブリドーマ[例えば、Olsson and Kaplan (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:5429-5431参照のこと；このような抗体は、ヒトにおける使用について本明細書において他の部分で記載されるようにヒト化できる]、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウス[例えば、Kellerman and Green (2000) Curr. Opin Biotechnol. 13:593-597参照のこと]、ファージディスプレイ[例えば、Mancini (2004) New Microbiol. 27:315-28参照のこと]およびB細胞などの成熟ヒト免疫細胞からの単離物[例えば、Banchereau and Rousset (1992) Adv Immunol. 52: 125-262、Crotty and Ahmed (2004) Semin Immunol. 16: 197-203、Carsetti (2004) Methods Mol Biol. 271: 25-35、McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams (2005) Annu Rev Immunol. 23:487-513参照のこと]をはじめとする当技術分野で周知の種々の技術によって同定および単離できる。本明細書において提供される例示的方法では、本明細書において提供されるヒト抗RSV抗体およびその抗原結合断片は、ヒトB細胞から同定および単離される。

30

【0428】

ヒト抗体分泌細胞から安定なハイブリドーマを得ることにおける難しさを考えると、ヒト抗体分泌細胞を製造および単離するために広く使用されてきた例示的方法として、エプスタイン・バーウイルス(EBV)を用いるヒトB細胞の不活化があり、エプスタイン・バーウイルス(EBV)は、ポリクローナルB細胞活性化および増殖も誘導することがわかっている[例えば、Sugimoto et al., (2004) Cancer Res. 64:3361-3364 ; Bishop and Busch (2002) Microbes Infect. 4:853-857参照のこと]。抗体分泌細胞は、例えば、患者または抗原に曝露されたかもしれないその他の個体または標識された抗原を使用して事前に選択された健常な被験体から得た、末梢血、リンパ節、脾臓、扁桃腺または胸腔液などのヒトB細胞のEBV不活化によって製造されている[例えば、Casali et al. (1986) Science 234:476-9、Yamaguchi et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:2416-2420、Posner et al. (1991) J Immunol. 146:4325-4332、Raff et al. (1988) J Exp Med. 168:905-917、Steenbakkers et al. (1993) Hum Antibod Hybrid. 4:166-173、Steenbakkers et al. (1994) Mol Biol Rep. 19:125-134、Evans et al. (1988) J Immunol 140:941

40

50

-943およびWallis R et al. (1989) J Clin Invest 84:214-219参照のこと]。

【0429】

E B V 感染ヒト B 細胞の低い形質転換性、低いクローン化性および固有の不安定性および不均一性のために [Chan et al. (1986) J Immunol 136:106-112およびJames and Bell (1987) J Immunol Methods. 100:5-40]、例えば、骨髄腫細胞株を用いるといった細胞融合などの既知技術を使用してもよい [例えば、Bron et al. (1984) PNAS 81:3214-3217; Yamaguchi et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:2416-2420; Posner et al. (1991) J Immunol. 146:4325-4332、Niedbala and Stott (1998) Hybridoma 17:299-304; Li et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:3557-62参照のこと]。E B V 不死化を改善するためのさらなる技術として、例えば、腫瘍ウイルスを用いる不死化、癌遺伝子を用いる形質転換、ミニ電気融合および単一プロセスでのマウスーヒトヘテロ融合が挙げられる [例えば、米国特許第 4, 997, 764 号; Steenbakkers et al. (1993) Hum Antibod Hybrid. 4:166-173; Dessain et al. (2004) J Immunol Methods. 291:109-22参照のこと]。ヒトモノクローナル抗体は、当技術分野で記載されるように、細胞培養物において種々の操作を組み合わせることによって、抗原の存在下または不在下で活性化および不死化されている B 細胞から単離できる [例えば、Borrebaeck et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 3995-3999、Davenport et al. (1992) FEMS Microbiol Immunol. 4:335-343、Laroche-Traineau et al. (1994) Hum Antib Hybrid. 5:165-177、Morgenthaler et al. (1996) J. Clin Endocrinology. 81:3155-3161、Niedbala and Kurpisz (1993) Immunol Lett. 35:93-100、Mulder et al. (1993) Hum Immunol. 36:186-192、Hur et al. (2005) Cell Prolif. 38:35-45、Traggiai et al. (2004) Nat Med 10:871-875、Tsuchiyama et al. (1997) Hum Antibodies 8:43-47; および PC T 公開番号 WO 91109115、WO 041076677、WO 88101642、WO 90102795、WO 96140252 および WO 02146233 参照のこと]。

【0430】

成熟 B 細胞からヒト抗体を単離する方法は、一般に、成熟 B 細胞集団の単離および特定の抗原に対して B 細胞によって発現された抗体をスクリーニングすることを含む。抗体分泌細胞の種々の異なる集団を、特定のプロフィールを有するヒトドナー（例えば、ナイーブ、ワクチン接種された、程度の差はあるが最近感染した、および血清陽性の個体）から、および B 細胞が存在し、その活性を発揮する種々の組織（例えば、血液、扁桃腺、脾臓、リンパ節）から単離してもよい [Viau and Zouali (2005) Clin Immunol. 114:17-26]。本明細書において提供される例示的方法では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体は、ヒトドナーから、および／または医療従事者などの R S V に曝露されている高い可能性を有していたか、もしくは有する健康なヒトから単離された、B 細胞を含有する末梢血単核細胞 (P B M C) のサンプルから単離できる。

【0431】

生体サンプルから P B M C を単離した後、当技術分野で記載されている種々の方法のうち 1 種を使用して、その表面上の細胞表面マーカーの、必要に応じて、その他のタンパク質の発現ならびに増殖活性、細胞の代謝状態および／または形態学的状態に基づいて、抗体分泌細胞の特定の選択を実施できる。特に、ヒトサンプルから抗体分泌細胞を精製するための種々の技術は、正または負の選択のために異なる手段および状態を使用する。これらの細胞は、抗体を発現および分泌する細胞（例えば、ヒト B 細胞）に特異的な細胞表面マーカーを発現するものを物理的に分離することによって、より容易に、より効率的に選択される。特定のプロトコールが知られており、文献中に見出すことができる [例えば、Callard and Kotowicz 「Human B-cell responses to Cytokines」 in Cytokine Cell Biology: A practical Approach. Balkwill F. (ed.) Oxford University Press, 2000, 17-31 参照のこと]。

【0432】

B 細胞などの特定の免疫細胞の選択は、通常、B 細胞特異的な細胞表面タンパク質と特異的に結合し、固相支持体（例えば、マイクロビーズまたはプラスチックプレート）に連結

され得るか、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）を使用して検出され得る蛍光色素で標識され得る抗体を使用して実施される。例えば、ヒトB細胞は、CD19、CD27、および／またはCD22マイクロビーズを結合している支持体（マイクロビーズなど）に対するその親和性に基づいて、または特定のアイソタイプに対して特異的な抗体に対して結合親和性がないことについて選択され、その後EBV不死化する〔例えば、Li et al. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 207:985-993、Bernasconi et al. (2003) *Blood* 101:4500-4504およびTraggiai et al. (2004) *Nat Med* 10:871-875参照のこと〕。精製のための細胞マーカーの選択は、例えば、選択プロセスによって誘発され、細胞成長および生存力を変更してよい細胞内シグナルのために、不死化プロセスの効率に影響を及ぼし得る。例えば、抗原認識およびB細胞活性化と関連しているシグナル伝達経路を制御するB細胞に限定された膜貫通タンパク質であるCD22は、最初のB細胞選択のための例示的分子である。CD22陽性集団は、異なるアイソタイプおよび特異性を有する抗体を発現する細胞を含有するので、刺激相の前または後のいずれかで細胞を選択するために、その他の細胞表面マーカーも使用してよい。

【0433】

いくつかの例では、CD22に基づいた選択に加えてCD27に基づいた選択を適用することによって、抗体分泌細胞の特異的濃縮物を得ることができる。CD27は、体細胞突然変異された可変領域遺伝子を有するヒトB細胞のマーカーであることがわかっている〔Borst J et al. (2005) *Curr Opin Immunol.* 17:275-281〕。CD5、CD24、CD25、CD86、CD38、CD45、CD70またはCD69などのさらなるマーカーも、細胞の所望の集団の枯渇または濃縮のいずれかのために使用できる。したがって、ドナーの抗原（例えば、RSV抗原）に対する曝露歴および抗体力価などの因子に応じて、総CD22濃縮されたB細胞、またはCD27陽性B細胞などのさらに濃縮されたB細胞亜集団を選択できる。

【0434】

細胞選択後、細胞の不死化前に、細胞の集団を適当な刺激物質に曝露してもよい。例示的刺激物質として、例えば、ポリクローナルB細胞アクチベーター、例えば、それだけには限らないが、自然免疫応答のアゴニスト（例えば、CpGオリゴヌクレオチドなどのToll様受容体アゴニスト〔Bernasconi et al. (2003) *Blood* 101:4500-4504、Bernasconi et al. (2002) *Science* 298:2199-2202、Bourke et al. (2003) *Blood* 102:956-63；例えば、CpGヌクレオチド、例えば、Cell Sciences、Canton、MAから入手可能なCpG2006、CpG2395およびCpG2395など〕およびサイトカインなどの免疫調節性分子（例えば、免疫賦活活性を有するとわかっているインターロイキン、例えば、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10およびIL-13〔Caillard and Kotowicz 「Human B-cell responses to cytokines」 in *Cytokine Cell Biology: A practical Approach*. Balkwill F (ed.) Oxford University Press, 2000, 17-31参照のこと〕およびTNF受容体ファミリーの細胞膜受容体のアゴニスト、特に、NF-κB経路およびB細胞における増殖を活性化するもの、例えば、それだけには限らないが、APRIL、BAFF、CD40リガンド（CD40L）〔例えば、Schneider (2005) *Curr Opin Immunol.* 17:282-289、He et al. (2004) *J Immunol.* 172:3268-3279、Craxton et al. (2003) *Blood* 101:4464-4471およびTangye et al. (2003) *J Immunol.* 170:261-269参照のこと〕が挙げられる。EBV不死化を、1種もしくは複数のポリクローナルアクチベーターと組み合わせて、または逐次使用してB細胞を刺激する例示的方法は、当技術分野で公知である〔例えば、Traggiai et al. (2004) *Nat Med* 10:871-875、Tsuchiyama et al. (1997) *Hum Antibodies* 8:43-47、Imadome et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7836-7840およびPCT公開番号WO 07/068758、WO 04/76677、WO 91/09115およびWO 94/24164参照のこと〕。刺激物質の組合せを、不死化相の前に、同時または逐次（例えば、最初の細胞選択の直後に第1の刺激物質を加え、第2の刺激物質を数時間または数日後に加える）細胞培養培地に加えることができる。刺激物質は、希釈された保存溶液から細胞培養培地中に直接加えてもよく、または

例えば、リポソームもしくはその取り込みおよび免疫賦活活性を改善し得るその他の化合物を使用して適宜製剤化された後に加えてもよい [Gursel et al. (2001) J Immunol. 167:3324-3328]。刺激物質はまた、固体マトリックス（マイクロビーズまたは直接、細胞培養プレート上に）と結合させてもよく、これによって、その物質（単数または複数）の有効な除去が可能となり得る。細胞は、新鮮な培地で1回または複数回洗浄してもよく、所望により、刺激物質のあらゆる残存する効果をさらに希釈または排除するために正常な細胞培養培地で維持してもよい（例えば、1日から最大6日）。また、細胞培養物中に特定の化合物を加えることによって、刺激物質（単数または複数）を阻害してもよい。

【0435】

細胞を、細胞を刺激した後および前記の選択された、刺激された細胞を、不死化物質に曝露する前（すなわち、刺激相と不死化相の間）に、発現された抗体のアイソタイプに基づいてさらに選択してもよい。細胞のアイソタイプベースの選択は、正の（特定の細胞の単離を可能にする）または負の（不要の細胞の排出を可能にする）選択のいずれかのための手段を適用することによって実施できる。例えば、刺激されたIgG陽性細胞の集団は、正に（FACSまたは磁気細胞分離装置によって）、または細胞の集団からIgMを発現する細胞を枯渇させ、結果としてIgGを発現する細胞を濃縮することによって選択できる。蛍光活性化分離装置または磁気細胞分離装置を使用する抗体分泌細胞の分離技術が、文献において知られている [例えば、Li et al. (1995) Biochem Biophys Res Commun 207:985-993, Traggiai et al. (2004) Nat Med 10:871-875参照のこと]。抗体分泌細胞の供給源および最終用途に応じて、IgDまたはIgA発現細胞などの、その他のアイソタイプを発現する細胞の枯渇（または濃縮）も実施できる。このような正確な選択が望まれる場合（例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4抗体を発現するヒトB細胞の選択）には、特定のサブクラスに基づいて細胞を単離するために、同様のアプローチを使用できる。

【0436】

種々のウイルス不死化物質が当技術分野で公知であり、抗体分泌細胞で使用する、不死化抗体分泌細胞を得ることができる。抗体分泌細胞に感染し、不死化するウイルスは、リンパ球向性ウイルスとして一般に知られている。このようなウイルスの例示として、ヘルプスウイルスのγクラス中に含まれるものがある。このウイルスファミリーのメンバーは、種特異的にリンパ球に感染し、リンパ球増殖性障害および重篤な悪性腫瘍の発生と関連している [Nicholas (2000) J. Mol Pathol. 53:222-237およびRickinson (2001) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356:595-604]。提供される方法において不死化物質として使用するための例示的ウイルスとして、ヒトリンパ球に関連し、不死化し得るEBV（ヘルペスウイルス4としても知られるエプスタインバーウイルス）およびHHV-8（KSHV、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスとしても知られるヒトヘルペスウイルス8）が挙げられる。本方法において使用するためのその他の例示的ウイルスとして、それだけには限らないが、MHV-68（ネズミヘルペスウイルス68）、HVS（ヘルペスウイルスサミリ (Samiri)）、RRV（アカゲザルラジノウイルス）、LCV（霊長類リンホクリプトウイルス）、EHV-2（ウマヘルペスウイルス2）HVA（ヘルペスウイルスアテレス）およびAHV-1（アルセラフィン (Alcelaphine) ヘルペスウイルス1）が挙げられ、これらは、それらの中で保存されたいくつかの共通の遺伝的特徴および種々の哺乳類宿主細胞において同様の病原性効果を有する、発癌性、リンパ球向性ヘルペスウイルスである。

【0437】

不死化に使用されるウイルスに由来する特定のウイルスタンパク質を含有する組換えDNAコンストラクトもまた、B細胞を不死化するために使用されてきた [Damania (2004) Nat Rev Microbiol. 2:656-668 and Kilger et al. (1998) EMBO J. 17:1700-1709参照のこと]。提供される方法において、ウイルス遺伝子を含有する同様のベクターを細胞中に形質導入できる。このようなコンストラクトを製造する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、レトロウイルス系またはウイルス様粒子およびこのような粒子の形成にトラ

ンスに必要な因子をすべて提供するパッケージング細胞株の使用が挙げられる。

【0438】

不死化相は1時間から数時間の間、最大2～4日持続し得る。不死化相の長さは、細胞生存力および不死化の効率などの種々の因子に応じて調整してよい。いくつかの例では、EBVを用いて、約4～約24時間の期間、細胞を不死化する。特定の例では、EBVを用いて、約16時間の期間、細胞を不死化する。

【0439】

B細胞のEBVによって媒介される不死化は、主要なEBV受容体と考えられている細胞表面受容体CD21の発現を必要とする。CD21は、ほとんどのB細胞亜集団上に存在し、CD19およびB細胞抗原受容体と複合体を形成することによって、B細胞反応を調節する [Fearon and Carroll (2000) Ann Rev Immun. 18:393-422]。EBVを用いて細胞を形質転換する能力は、B細胞刺激物質の添加によって増強できるが、条件は、CD21が細胞表面上で維持され、高効率でのEBV不死化を可能にすることを確実にしなければならない。

【0440】

不死化相後、不死化された細胞をフィーダー細胞層上で低密度で培養できる。フィーダー層は、照射された非同種異系の末梢血細胞調製物、リンパ芽球様または線維芽細胞細胞株、臍帯血リンパ球または異なる種類の胚細胞によって構成され得る。このような特性を有する細胞株の一例として、B細胞の成長および増殖を効率的に支持する、EL4-B5、突然変異EL4胸腺腫細胞株がある。その他の例示的フィーダー細胞として、本明細書において他の部分で記載される、照射されたB細胞枯渇PMBCフィーダー細胞が挙げられる。B細胞集団を刺激するために使用されるものなどの成長促進剤も、不死化後に不死化されたB細胞集団を維持するために使用してよい。

【0441】

不死化された細胞の集団を、特に、抗体単離、特性決定および製造と関連している、一連の適用に使用してよい。いくつかの例では、細胞によって発現される抗体またはこのような抗体の断片をコードするDNAライブラリーは、一般的な組換え技術を使用して、細胞のバルク集団から単離されたDNAから構築できる。いくつかの例では、本明細書において記載されるように、不死化された細胞をさらに培養し、抗体分泌細胞のプールに分割できる。細胞のプールは、例えば、フィード細胞層上で培養できる。

【0442】

いくつかの例では、細胞のプールから得た細胞培養上清を、特定の抗原特異性を有する抗体（例えば、RSVFタンパク質と免疫特異的に結合する抗体）を発現する細胞を同定するために、1回または複数回のラウンドでスクリーニングする。抗体をスクリーニングし、結合特異性を測定するための例示的方法は、本明細書において他の部分で記載されており、当技術分野で公知である。特定の抗体が同定されると、周知の組換え法を使用して、細胞のプールから抗体またはその抗原結合部分をコードするDNAを単離できる。本明細書において記載されるように、細胞のプールから単離されたDNAを、次いで、発現させることができ（例えば、原核生物または真核細胞の宿主細胞において）、所望の抗体またはその抗原結合断片を発現する個々のクローンを同定するために再スクリーニングできる。抗体の発現および精製の方法は、当技術分野において熟練した者によく知られており、セクションFに説明する。

【0443】

本明細書において記載されるいくつかの例では、不死化される細胞は、標識された抗原を使用し、セルソーター（例えば、FACS）を使用して選別された単細胞であり得る。特定の例では、抗RSV抗体を発現する細胞を、Alexa Fluor 647を用いて標識されたRSVF抗原を使用して単離し、所望細胞を標識できる。選別後、次いで、抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードするDNAを、周知の組換え法を使用して単離できる。細胞のプールから単離されたDNAは、発現させ（例えば、原核細胞または真核細胞の宿主細胞において）、RSV抗原との結合を確認できる。

【0444】

通常、特定の抗原と結合する個々の抗体の同定のために使用されるスクリーニング法は、このような抗体の抗原結合部分の同定をもたらす。抗原結合断片から全長またはその他の誘導抗体を作製するために、 V_H および／または V_L 鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離し、それぞれ、 V_H 定常領域（例えば、ヒト $\gamma 1$ 定常領域）、 V_L 定常領域（例えば、ヒト κ または λ 定常領域）を発現するベクター中にクローニングできる。 V_H および V_L ドメインはまた、選択された定常領域を発現するベクター中にクローニングしてもよい。次いで、当業者に公知の技術を使用して、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターを、細胞株中に同時トランスフェクトして、全長抗体、例えば、IgGを発現する、安定な、または一時的な細胞株を作製する。

10

【0445】

F. 抗RSV抗体およびその改変体または変異体および抗体をコードする核酸を製造する方法

【0446】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、化学合成および組換え発現技術をはじめとする、抗体の調製のための当技術分野で公知の任意の適した方法によって作製できる。宿主細胞およびベクターの種々の組合せを使用して、核酸（例えば、提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片などの抗体をコードする核酸）を、授受、維持、複製および増幅でき、核酸によってコードされるポリペプチドを発現できる。一般に、宿主細胞およびベクターの選択は、増幅、ポリペプチド発現および／またはファージなどの遺伝子パッケージ上のディスプレイが望ましいかどうかに応じて変わる。宿主細胞を形質転換する方法は周知である。任意の既知形質転換法（例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションおよびソノポレーション）を使用し、核酸を用いて宿主細胞を形質転換できる。モノクローナル抗体および抗体断片などの抗体、例えば、それだけには限らないが、Fab断片および一本鎖抗体の製造のための手順は、当技術分野で周知である。

20

【0447】

モノクローナル抗体は、それだけには限らないが、ハイブリドーマの使用、組換え発現、ファージディスプレイ技術またはそれらの組合せをはじめとする当技術分野で公知のさまざまな技術を使用して調製できる。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 5630681 (Elsevier N.Y. 1981)において教示される、当技術分野で公知のものをはじめとするハイブリドーマ技術を使用して製造できる。

30

【0448】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片をはじめとする、本明細書において示される任意のものなどのポリペプチドは、インビボおよびインビトロ法を含めた当業者に公知の任意の方法によって製造できる。所望のポリペプチドを、例えば、分析、投与および治療のために必要とされるなど、必要な量および形態のタンパク質を製造するのに適した任意の生物において、発現させることができる。発現宿主として、原核生物ならびに大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞株およびトランスジェニック動物（例えば、ウサギ、マウス、ラットおよび家畜、例えば、それだけには限らないが、ヤギ、ヒツジおよびウシ）をはじめとする哺乳類細胞などの真核生物が挙げられ、血清、乳および卵中での産生を含む。発現宿主は、そのタンパク質産生レベルならびに発現されたタンパク質上に存在する翻訳後修飾の種類が異なり得る。発現宿主の選択は、これらおよび法的考察および安全性考察、製造コストおよびニーズおよび精製方法などのその他の因子に基づいて行うことができる。

40

【0449】

1. 核酸

【0450】

50

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子が、本明細書において提供される。いくつかの例では、単離された核酸分子は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6である抗体をコードする。いくつかの例では、単離された核酸分子は、30D8、104E5、38F10、14G3、90D3、56E11、17C9または69F6の抗体形態または他の抗原結合断片形態をコードする。

【0451】

いくつかの例では、ここで提供される単離された核酸分子は、配列番号396、398、400、402、404、452、454または456に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離された核酸分子は、配列番号443、445、447、449、451、477、479または481に示されるヌクレオチドの配列を有する核酸を含有する。

10

【0452】

いくつかの例では、ここに提供される単離核酸分子は、配列番号395、397、300、401、403、453、455または457に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号442、444、446、448、450、476、478または480に示されるヌクレオチドの配列を有する核酸を含有する。

【0453】

いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号405、411、417、423、429、437～441、458、464、470または482～484に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号406、412、418、424、430、459、465または471に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号407、413、419、425、431、460、466または472に示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。

20

【0454】

いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号408、414、420、426、432、461、467または473に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号409、415、421、427、433、462、468または474に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。いくつかの例では、提供される単離核酸分子は、配列番号410、416、422、428、434、463、469または475に示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片をコードする。

30

【0455】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸分子は、核酸分子の操作のための周知の組換え技術を使用して調製できる [例えば、Sambrook et al. (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.およびAusubel et al., eds. (1998) Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載されている技術を参照のこと]。いくつかの例では、それだけには限らないが、組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などの方法を使用して、異なるアミノ酸配列を有する改変された抗体またはその抗原結合断片を作製できる、例えば、アミノ酸置換、欠失および／または挿入を作製できる。

40

【0456】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のCDRを、日常的な組換えDNA技術を使用してフレームワーク領域

50

内に挿入する。フレームワーク領域は、ヒトフレームワーク領域をはじめとする、天然に存在するフレームワーク領域またはコンセンサスフレームワーク領域から選択できる〔例示的フレームワーク領域については、例えば、Chothia et al. (1998) J. Mol. Biol. 278:457-479参照のこと〕。一般に、フレームワーク領域およびCDRの組合せによって作製されたポリヌクレオチドは、親の抗RSV抗体またはその抗原結合断片の抗原結合特異性を維持する抗体またはその抗原結合断片をコードする。コードされる抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数の特性を改善するために、ポリヌクレオチドへの変更を行うことができ、その変更は当業者の範囲内である。いくつかの例では、フレームワーク領域内でポリヌクレオチドの1つまたは複数の改変を行って、アミノ酸置換を引き起こし、これは、例えば、抗体またはその抗原結合断片の、その抗原との結合を改善してもよい。さらに、このような方法を使用して、鎖内ジスルフィド結合に関与している1個または複数の可変領域システインのアミノ酸置換または欠失を行って、1つまたは複数の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を作製することができる。

10

【0457】

2. ベクター

【0458】

抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸または核酸（重鎖および軽鎖をコードする）を含むベクターが、本明細書において提供される。一大抵は、抗体の重鎖をコードする核酸はベクター中にクローニングされ、および抗体の軽鎖をコードする核酸はベクター中にクローニングされる。遺伝子はそのデュアル発現のために単一ベクター中に、または別々のベクター中にクローニングされる。所望の場合、ベクターはまた、他の抗体形態を生成するために、定常領域（群）またはヒンジ領域をコード化する更なる配列を含むことができる。

20

【0459】

多数の発現ベクターが、利用可能であり、当業者に公知であり、ポリペプチドの発現のために使用できる。発現ベクターの選択は、宿主発現系の選択によって影響を受ける。このような選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。一般に、発現ベクターは、転写プロモーターおよび所望により、エンハンサー、翻訳シグナルならびに転写および翻訳終結シグナルを含み得る。安定な形質転換に使用される発現ベクターは、通常、形質転換された細胞の選択および維持を可能にする選択マーカーを有する。いくつかの場合には、複製起点を使用して、細胞中のベクターのコピー数を増幅できる。

30

【0460】

ベクターはまた、連結される核酸分子と機能し得る形で連結されているさらなるヌクレオチド配列、例えば、局在性などのためのエピトープタグ、例えば、ヘキサhisタグもしくはmycタグまたは精製のためのタグ、例えば、GST融合ならびにタンパク質分泌および／または膜結合に向けさせるための配列などを含有し得る。

【0461】

抗体またはその抗原結合断片の発現は、当技術分野で公知の任意のプロモーター／エンハンサーによって制御され得る。適した細菌プロモーターは、当技術分野で周知であり、本明細書において以下に記載されている。哺乳類細胞、酵母細胞および昆虫細胞のためのその他の適したプロモーターが、当技術分野で周知であり、一部が以下に例示されている。異種核酸の直接発現のために使用されるプロモーターの選択は、特定の適用に応じて変わり、当業者の技術のレベルの範囲内である。使用できるプロモーターとして、それだけには限らないが、SV40初期プロモーターを含有する真核生物の発現ベクター [Bernoi st and Chambon, (1981) Nature 290:304-310]、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復配列中に含有されるプロモーター [Yamamoto et al. (1980) Cell 22:787-797]、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター [Wagner et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 78:1441-1445]、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 [Brinster et al., (1982) Nature 296:39-42]； β -ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物の発現ベクター [Jay e t al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543] またはtacプロモーター [DeBo

40

50

er et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25] ; Scientific American 242:79-94 (1980)中の「Useful Proteins from Recombinant Bacteria」も参照のこと；ノパリンシンセターゼプロモーターを含有する植物発現ベクター [Herrera-Estrella et al., (1984) Nature 303:209-213] またはカリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター [Gardner et al., (1981) Nucleic Acids Res. 9:2871] および光合成酵素リブロース二リン酸カルボキシラーゼのプロモーター [Herrera-Estrella et al., (1984) Nature 310:115-120] ; 酵母およびその他の真菌に由来するプロモーターエレメント、例えば、Gal 4 プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターおよび組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されている以下の動物転写制御領域：膵腺房細胞において活性であるエラスターゼ I 遺伝子制御領域 [Swift et al., (1984) Cell 38:639-646; Ornitz et al., (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, (1987) Hepatology 7:425-515] ; 膵β細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域 [Hanahan et al., (1985) Nature 315:115-122] 、リンパ球細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 [Grosschedl et al., (1984) Cell 38:647-658; Adams et al., (1985) Nature 318:533-538; Alexander et al., (1987) Mol. Cell Biol. 7:1436-1444] 、精巣、乳房、リンパ系および肥満細胞において活性であるマウス乳癌ウイルス制御領域 [Leder et al., (1986) Cell 45:485-495] 、肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域 [Pinckert et al., (1987) Genes and Devel. 1:268-276] 、肝臓において活性であるα-フェトプロテイン遺伝子制御領域 [Krumlauf et al., (1985) Mol. Cell Biol. 5:1639-403; Hammer et al., (1987) Science 235:53-58] 、肝臓において活性であるα-1アンチトリプシン遺伝子制御領域 [Kelsey et al., (1987) Genes and Devel. 1:161-171] 、骨髄系細胞において活性であるβグロビン遺伝子制御領域 [Magram et al., (1985) Nature 315:338-340; Kollias et al., (1986) Cell 46:89-94] 、脳の乏突起神経膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 [Readhead et al., (1987) Cell 48:703-712] 、骨格筋において活性であるミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 [Shani (1985) Nature 314:283-286] および視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞において活性である性腺刺激ホルモン (gonadotrophic) 放出ホルモン遺伝子制御領域 [Mason et al., (1986) Science 234:1372-1378] が挙げられる。

【0462】

プロモーターに加えて、発現ベクターは、通常、宿主細胞における抗体またはその一部の発現のために必要なさらなるエレメントのすべてを含有する転写ユニットまたは発現カセットを含有する。通常の発現カセットは、抗体鎖をコードする核酸配列と機能し得る形で連結されているプロモーターおよび転写物の効率的なポリアデニル化に必要なシグナル、リボソーム結合部位および翻訳終結を含有する。カセットのさらなるエレメントは、エンハンサーを含み得る。さらに、カセットは、通常、効率的な終結を提供するために構造遺伝子の下流に転写終結領域を含有する。終結領域は、プロモーター配列と同一の遺伝子から得てもよく、または異なる遺伝子から得てもよい。

【0463】

いくつかの発現系は、チミジンキナーゼおよびジヒドロホレートダクターゼなどの遺伝子増幅を提供するマーカーを有する。あるいは、多角体プロモーターまたはその他の強力なバキュロウイルスプロモーターの指示に従って生殖系列抗体鎖をコードする核酸配列とともに、昆虫細胞においてバキュロウイルスベクターを使用するものなどの遺伝子増幅を含まない高収率発現系も適している。

【0464】

本明細書での目的のために、ベクターを提供し、それは抗RSV抗体の重鎖および／または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチドの配列を含む。いくつかの例では、本明細書で提供されるベクターは、抗体の可変領域をコードする核酸配列に作動可能に連結する抗体の定常領域をコードするヌクレオチドの配列を含む。ベクターは、C_H1、C_H2、ヒンジ、C_H3またはC_H4および／またはC_Lのいずれか1つ、またはすべてについての

配列を含むことができる。概して、F a bの発現のようなもののために、ベクターはC_H1またはC_L（カッパまたはラムダ軽鎖）のための配列を含む。定常領域またはヒンジ領域の配列は、当業者に知られ（例えば、米国特許出願公開第20080248028号参照）およびここで説明する。

【0465】

ベクターへのDNA断片の挿入のための当業者に公知の任意の方法を使用して、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含有する発現ベクターを構築できる。これらの方法は、インビトロ組換えDNAおよび合成技術およびインビボ組換え体（遺伝子組換え）を含み得る。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な突出末端を有するクローニングベクター中にDNA断片を連結することによって達成できる。DNAを断片化するために使用される相補的制限部位が、クローニングベクター中に存在しない場合は、DNA分子の末端を酵素的に改変してもよい。あるいは、DNA末端にヌクレオチド配列（リンカー）を連結することによって所望の任意の部位を製造でき、これらの連結されたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学的に合成された核酸を含有し得る。

【0466】

本明細書において提供される抗体または抗原結合断片を製造するために有用な例示的プラスミドベクターは、HCMV前初期エンハンサー／プロモーターまたはMHCクラスIプロモーターなどの強力なプロモーター、HCMV前初期遺伝子イントロンAなどの転写物のプロセッシングを増強するためのイントロンおよび後期SV40ポリAシグナルなどのポリアデニル化（ポリA）シグナルを含有する。プラスミドは、抗体の全長重鎖および軽鎖、一本鎖Fv断片またはその他の免疫グロブリン断片の発現を可能にするようマルチシストロン性であり得る。

【0467】

3. 細胞発現系

【0468】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸は、適した宿主において発現させることができる。ベクターおよび本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含有する細胞が提供される。一般に、異種DNAを発現するよう操作され得る、分泌経路を有する任意の細胞種が適している。発現宿主として、原核生物および真核生物、例えば、細菌細胞（例えば、大腸菌）、酵母細胞、真菌細胞、古細菌、植物細胞、昆虫細胞およびヒト細胞を含めた動物細胞が挙げられる。発現宿主は、タンパク質産生レベルならびに発現されたタンパク質に存在する翻訳後修飾の種類において異なり得る。さらに、発現宿主の選択は、使用されるベクターならびに転写および翻訳エレメントの選択と関連していることが多い。例えば、発現宿主の選択は、使用される前駆体配列の選択に応じて変わることが多いが、常にではない。例えば、多数の異種シグナル配列は、同一種の宿主細胞においてのみ発現され得る（すなわち、昆虫細胞シグナル配列は、昆虫細胞において最適に発現される）。対照的に、例えば、酵母、昆虫または哺乳類宿主細胞において良好に働くヒト血清アルブミン（hHSA）シグナル配列ならびに昆虫および哺乳類細胞において機能的であると実証されている組織プラスミノゲン活性化因子プレ／プロ配列 [Tan et al., (2002) Protein Eng. 15:337] などのその他のシグナル配列は、異種宿主において使用できる。発現宿主の選択は、これらおよび法的考察および安全性考察、製造コストおよびニーズおよび精製方法などのその他の因子に基づいて行うことができる。したがって、ベクター系は、使用される宿主細胞と適合しなくてはならない。

【0469】

真核生物宿主における発現は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）およびピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）などの酵母、ショウジョウバエ（*Drosophila*）細胞および鱗翅目細胞などの昆虫細胞、タバコ、トウモロコシ、コメ、藻類およびアオウキクサ属などの植物および植物細胞における発現を含み得る。発現のための真

核細胞としてまた、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはベビーハムスター腎臓（BHK）細胞などの哺乳類細胞株が挙げられる。真核細胞発現宿主としてまた、例えば、血清、乳および卵における製造を含めた、トランスジェニック動物における製造が挙げられる。

【0470】

組換え分子は、遺伝子配列の多数のコピーが生じるように、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションおよびソノポレーションによって宿主細胞中に導入できる。一般に、標準トランスフェクション法を使用して、多量の抗体鎖を発現する、細菌、哺乳類、酵母または昆虫細胞株を製造し、次いで、これを標準技術を使用して精製する〔例えば、Colley et al. (1989) J. Biol. Chem., 264:17619-17622; Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed.), 1990参照のこと〕。真核細胞および原核細胞の形質転換は、標準技術に従って実施する〔例えば、Morrison (1977) J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss and Curtiss (1983) Methods in Enzymology, 101, 347-362参照のこと〕。例えば、宿主細胞中に外来ヌクレオチド配列を導入するための周知の手順のいずれかを使用してよい。これらとして、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター（plasma vector）、ウイルスベクター（例えば、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスおよびその他のウイルス）および任意のその他の、宿主細胞にクローニングされたゲノムDNA、cDNA、プラスミドDNA、コスミドDNA、合成DNAまたはその他の外来遺伝物質を導入するためのその他の周知の方法の使用が挙げられる。

【0471】

概して、本明細書での目的のために、宿主細胞は、抗RSV抗体の少なくともVH鎖または重鎖をコードする第一のベクターおよび少なくとも抗RSV抗体のVL鎖または軽鎖をコードする第二のベクターでトランスフェクトされる。宿主細胞はまた、重鎖および軽鎖またはその部分の両方をコードする単一ベクターでトランスフェクトすることができる。

【0472】

一例では、抗体の重鎖をコードする核酸は第一の発現ベクターに連結され、および抗体の軽鎖をコードする核酸第二の発現ベクターに連結される。発現ベクターは、同一または異なっているが、概して、それらはそこからのタンパク質（重鎖および軽鎖）の比較可能な発現を可能にするのに十分に適合性である。第一および第二の発現ベクターは、大抵、典型的に1:1の比率で、宿主細胞に同時トランスフェクトされる。ベクターの模範的なものには、制限されないが、pλ1HCおよびpκLCが含まれる〔Tiller（ティラー）ら（2008）Journal of Immunological Methods（ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド）、329:112-24〕。他の発現ベクターには、L鎖発現ベクターpAG462および重鎖発現ベクターpAH4604が含まれる〔Coloma（コロマ）ら（1992）J Immunol. Methods. 152:89-104〕。pAG4622ベクターには、ヒトκL鎖およびgp1の選択可能なマーカーのC領域ドメインをコードするゲノム配列が含まれる。pAH4604ベクターには、hisD選択可能マーカーおよびヒトH鎖γ1C領域ドメインをコードする配列が含まれる。

【0473】

別の例において、重鎖および軽鎖は、重鎖および軽鎖の両方のための発現カセットを有する単一ベクターにクローニングすることができる。一例では、重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は、哺乳動物発現ベクターpTT5〔NRC Biotechnology Research（バイオテクノロジー・リサーチ）〕中にクローニングすることができる。別の例では、重鎖および軽鎖、またはその一部分をコードする遺伝子は、pCALM（配列番号102）中にクローニングすることができる。

【0474】

全長Igの発現のために、V_H-C_H1-ヒンジ-C_H2-C_H3をコードする配列は

10

20

30

40

50

第一発現ベクター中にクローニングすることができ、および $V_L - C_L$ ドメインをコードする配列は第二の発現ベクターにクローニングすることができる。F a b を生成するには、 $V_H - C_H 1$ をコードする配列は第一の発現ベクター中にクローニングすることができ、および $V_L - C_L$ ドメインをコードする配列は第二の発現ベクター中にクローニングすることができる。慣習的な抗体については、重鎖は軽鎖とのペアを作り、および F a b モノマーが生成される。

【0475】

発現は、当業者に既知の任意の細胞発現システムであることができる。発現のための模範的な細胞には、制限されないが、293FS細胞、HEK293-6E細胞またはCHO細胞が含まれる。他の発現ベクターおよび宿主細胞が以下に説明される。発現の際、全長抗体またはその断片を形成するために抗体の重鎖および軽鎖はジスルフィド結合によってペアを形成する。

10

【0476】

a. 原核生物の発現

【0477】

原核生物、特に、大腸菌は、多量のタンパク質を製造するための系および提供された抗RSV抗体またはその抗原結合断片を発現するために使用できる系を提供する。通常、提供された変異体ポリペプチドの増幅および発現のために、大腸菌宿主細胞が使用される。大腸菌の形質転換は、当業者に周知の簡単で、迅速な技術である。大腸菌の発現ベクターは、誘導プロモーターを含有する場合があります、このようなプロモーターは、高レベルのタンパク質発現を導入するのに、また、宿主細胞に対して幾分かの毒性を示すタンパク質を発現するのに有用である。誘導プロモーターの例として、lacプロモーター、trpプロモーター、ハイブリッドtacプロモーター、T7およびSP6 RNAプロモーターおよび温度調節性λPLプロモーターが挙げられる。

20

【0478】

本明細書において提供される任意のものなどのタンパク質は、大腸菌の細胞質環境中に発現させることができる。いくつかのポリペプチドには、細胞質環境は、タンパク質の凝集物を含有する不溶性封入体の形成をもたらす得る。ジチオトレイトールおよびβ-メルカプトエタノールおよび変性剤、例えば、グアニジン-HClおよび尿素などの還元剤を使用して、タンパク質を再可溶化し、それに続いて、可溶性タンパク質を続いて再折りたたみできる。代替アプローチとして、酸化環境およびシャペロン様およびジスルフィドイソメラーゼを提供し、可溶性タンパク質の産生につながり得る細菌の細胞膜周辺腔におけるタンパク質の発現がある。例えば、タンパク質のファージディスプレイのために、タンパク質は、それらがファージに組み立てられ得るよう周辺質に輸送される。通常、リーダー配列が、発現されるタンパク質と融合され、これが、タンパク質を周辺質へ方向付ける。次いで、リーダーは、周辺質の内側でシグナルペプチダーゼによって除去される。周辺質をターゲティングするリーダー配列の例として、ペクチン酸リアーゼ遺伝子に由来するpelBリーダーおよびアルカリホスファターゼ遺伝子に由来するリーダーが挙げられる。いくつかの場合には、周辺質の発現によって、発現されたタンパク質の培養培地への漏出が可能となる。タンパク質の分泌によって、培養上清からの迅速かつ簡単な精製が可能となる。分泌されないタンパク質は、浸透圧溶解によって周辺質から得ることができる。細胞質発現と同様に、いくつかの場合には、タンパク質は不溶性になる場合があります、変性剤および還元剤を使用して、可溶化および再折りたたみを促進できる。誘導および成長の温度も、発現レベルおよび溶解度に影響を及ぼす場合があります、通常、25℃から37℃の間の温度が使用される。通常、細菌は、非グリコシル化タンパク質を産生する。したがって、タンパク質が、機能のためにグリコシル化を必要とする場合には、宿主細胞からの精製後、インビトロでグリコシル化を加えてもよい。

30

40

【0479】

b. 酵母細胞

【0480】

50

サッカロミセス・セレベシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母は、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を発現させるために使用できる、周知の酵母発現宿主である。酵母は、エピソード複製するベクターを用いてか、または相同組換えによる安定な染色体組込みによって形質転換できる。通常、誘導プロモーターを使用して、遺伝子発現を調節する。このようなプロモーターの例として、G A L 1、G A L 7 および G A L 5 ならびに C U P 1、A O X 1 などのメタロチオネインプロモーターまたはその他のピキアもしくはその他の酵母プロモーターが挙げられる。発現ベクターは、形質転換された D N A の選択および維持のために、L E U 2、T R P 1、H I S 3 および U R A 3 などの選択マーカーを含むことが多い。酵母中で発現されるタンパク質は、可溶性であることが多い。B i p などのシャペロニンおよびプロテインジスルフィドイソメラーゼとの同時発現によって、発現レベルおよび溶解度を改善できる。さらに、酵母中で発現されるタンパク質は、サッカロミセス・セレベシエ由来の酵母接合型 α -因子分泌シグナルなどの分泌シグナルペプチド融合および A g a 2 p 接合接着受容体またはアークスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*) グルコアミラーゼなどの酵母細胞表面タンパク質との融合を使用して、分泌に向けることができる。それらは、分泌経路から出て行くので、K e x - 2 プロテアーゼに対するものなどのプロテアーゼ切断部位を操作して、発現されたポリペプチドから融合した配列を除去してもよい。酵母はまた、A s n - X - S e r / T h r モチーフでグリコシル化できる。

【0481】

c. 昆虫細胞

【0482】

特に、バキュロウイルス発現を使用する昆虫細胞を使用して、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を発現させることができる。昆虫細胞は、高レベルのタンパク質を発現し、高等真核生物によって使用されるほとんどの翻訳後修飾が可能である。バキュロウイルスは、安全性を改善し、真核生物発現の法的懸念を低減する限定された宿主域を有する。通常の発現ベクターは、バキュロウイルスなどのポリヘドリンプロモーターなどの高レベル発現のためのプロモーターを使用する。よく使用されるバキュロウイルス系として、オートグラフ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多核体病ウイルス (A c N P V) などのバキュロウイルスを含む。カイコ (*Bombyx mori*) 核多核体病ウイルス (B m N P V) およびヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) に由来する S f 9 などの昆虫細胞株、シューダレチア・ユニプンクタ (*Pseudaletia unipuncta*) (A 7 S) およびオオカバマダラ (*Danaus plexippus*) (D p N 1) が挙げられる。高レベル発現のために、発現される分子のヌクレオチド配列を、ウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合する。ヒト抗体を発現させることのできるバキュロウイルス組換え体を生成するには、デュアル発現トランスファーで、p A c U W 5 1 (PharMingen) のようなものが利用される。哺乳類分泌シグナルは、昆虫細胞において正確にプロセシングされ、これを使用して、発現されたタンパク質を培養培地中に分泌させることができる。さらに、細胞株シューダレチア・ユニプンクタ (A 7 S) およびオオカバマダラ (D p N 1) は、哺乳類細胞系と同様のグリコシル化パターンを有するタンパク質を産生する。

【0483】

昆虫細胞における代替発現系は、安定に形質転換された細胞の使用である。Schnieder 2 (S 2) および K c 細胞 (キイロショウジョウバエ) および C 7 細胞 [ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)] などの細胞株を発現のために使用できる。ショウジョウバエメタロチオネインプロモーターを使用して、カドミウムまたは銅を用いる重金属誘導の存在下で高レベルの発現を誘導できる。発現ベクターは、ネオマイシンおよびハイグロマイシンなどの選択マーカーの使用によって維持する。

【0484】

抗体の発現のための模範的なバキュロウイルスベクターは、バイシストロンベクター p A

c-κ-Fc (Progen、Biotechnik；商品番号PR3001)；pAc-λ-Fc (Progen；PR3003)；pAc-κ-CH3 (Progen；PR3000) および pAc-λ-CH3 (Progen；PR3002) である。

【0485】

d. 哺乳類細胞

【0486】

哺乳類発現系を使用して、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を発現させることができる。発現コンストラクトは、それだけには限らないが、アデノウイルスまたはワクシニアウイルスなどのウイルス感染によってか、またはリポソーム、リン酸カルシウム、DEAEデキストランなどの直接DNA移行によって、およびエレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションなどの物理的手段によって、哺乳類細胞に移行することができる。哺乳類細胞の発現ベクターは、通常、mRNAキャップ部位、TATAボックス、翻訳開始配列(Kozakコンセンサス配列)およびポリアダニル化エレメントを含む。このようなベクターは、高レベル発現のための転写プロモーター-エンハンサー、例えば、SV40プロモーター-エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターおよびラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列を含むことが多い。これらのプロモーター-エンハンサーは、多数の細胞種において活性である。組織および細胞種プロモーターおよびエンハンサー領域もまた、発現のために使用できる。例示的プロモーター/エンハンサー領域は、それだけには限らないが、エラスターゼI、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳癌ウイルス、アルブミン、αフェトプロテイン、α1アンチトリプシン、βグロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖2および性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御などの遺伝子に由来するものを含む。選択マーカーを使用して、発現コンストラクトを有する細胞を選択し、維持できる。選択マーカー遺伝子の例として、それだけには限らないが、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロホレートレダクターゼおよびチミジンキナーゼが挙げられる。抗体はNEO^R/G418システム、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)システムまたはグルタミン合成酵素(GS)システムを用いて生産することができる。GSシステムは、重鎖および軽鎖の両方を発現するために、そのようなpEE12/pEE6として、ジョイント発現ベクターを用いる。TCR-ζおよびFcεRI-γなどの細胞表面シグナル伝達分子との融合によって、細胞表面で活性状態のタンパク質の発現を指示することができる。

【0487】

多数の細胞株を、マウス、ラット、ヒト、サル、ニワトリおよびハムスター細胞をはじめとする哺乳類発現のために利用可能である。例示的細胞株として、それだけには限らないが、CHO、Balb/3T3、BHK、HeLa、MDCK、MT2、マウスNS0(非分泌性)およびその他の骨髓腫細胞株、ハイブリドーマおよびヘテロハイブリドーマ細胞株、リンパ球、線維芽細胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、W138、BT483、HS578T、HTB2、BT20、T47D、293S、2B8およびHKB細胞が挙げられる。細胞培養培地から分泌されたタンパク質の精製を容易にする血清不含培地に適応した細胞株もまた、利用可能である。1つのこのような例として、血清不含EBNA-1細胞株が挙げられる[Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42]。

【0488】

抗体の発現のための模範的哺乳類ベクターには、pTT5 [NRC Biotechnology Research Institute (バイオテクノロジー・リサーチ・インスティテュート)] およびpCALM(配列番号102で示される)が含まれる。

【0489】

e. 植物

【0490】

10

20

30

40

50

トランスジェニック植物細胞および植物は、本明細書に記載される任意のものなどのポリペプチドを発現するためのものであり得る。発現コンストラクトは、通常、プロトプラストへの微粒子銃およびPEGによって媒介される移行などの直接DNA移行を使用して、また、アグロバクテリウム媒介性形質転換を用いて植物に移行される。発現ベクターは、プロモーターおよびエンハンサー配列、転写終結エレメントおよび翻訳制御エレメントを含み得る。発現ベクターおよび形質転換技術は、普通、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) およびタバコなどの双子葉植物宿主と、トウモロコシおよびコメなどの単子葉植物宿主の間に分けられる。発現に使用される植物プロモーターの例として、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、リボース二リン酸カルボキシラーゼプロモーターならびにユビキチンおよびUBQ3プロモーターが挙げられる。形質転換された細胞の選択および維持を容易にするために、ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの選択マーカーが使用されることが多い。形質転換された植物細胞は、細胞、凝集体（カルス組織）として培養物中で維持されるか、または全植物に再生され得る。トランスジェニック植物細胞としてまた、プロテアーゼまたは改変されたプロテアーゼを産生するよう操作された藻類も挙げられる [例えば、Mayfield et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:438-442 参照のこと]。植物は、哺乳類細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これは、これらの宿主において産生されたタンパク質の選択に影響を及ぼし得る。

【0491】

4. 抗体の精製

【0492】

宿主細胞から、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含めたポリペプチドを精製する方法は、選択された宿主細胞および発現系に応じて変わる。分泌された分子については、タンパク質は、通常、細胞を除去した後に培養培地から精製される。細胞内発現については、細胞を溶解し、タンパク質を抽出物から精製すればよい。一例では、ポリペプチドを、遠心分離および細胞溶解（例えば、ドライアイス／エタノール浴中での反復される凍結－解凍によって）と、それに続く、遠心分離およびポリペプチドを含有する上清の保持によって、宿主細胞から単離する。トランスジェニック植物および動物などのトランスジェニック生物が、発現のために使用され、組織または臓器を、溶解された細胞抽出物を作製するための出発物質として使用できる。さらに、トランスジェニック動物製造は、乳または卵におけるポリペプチドの製造を含み得、これを集めることができ、必要に応じて、当技術分野における標準法を使用して、さらなるタンパク質を抽出し、さらに精製できる。

【0493】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片などのタンパク質を、それだけには限らないが、SDS-PAGE、サイズ分画およびサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿および陰イオン交換などのイオン交換クロマトグラフィーをはじめとする当技術分野で公知の標準タンパク質精製技術を使用して、例えば、溶解した細胞抽出物から精製できる。また、アフィニティー精製技術を使用して、調製物の効率および純度を改善できる。アフィニティー精製では、例えば、プロテアーゼと結合する抗体、受容体およびその他の分子を使用できる。発現コンストラクトはまた、タンパク質に、mycエピトープ、GST融合物またはHis₆などの親和性タグを付加するよう操作でき、それぞれ、myc抗体、グルタチオン樹脂およびNi樹脂を用いてアフィニティー精製できる。純度は、ゲル電気泳動および染色および分光光度的技術をはじめとする当技術分野で公知の任意の方法によって評価できる。

【0494】

典型的に、抗体およびその部分は、当業者に既知の任意の手順によって精製される。抗体は当該分野で既知の標準的なタンパク質精製技術で、制限されないが、SDS-PAGE、サイズ分画およびサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸沈殿、キレートクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはカラムクロマトグラフィーを含めたものを用いて実

質的な純粋さに精製することができる。例えば、抗体をカラムクロマトグラフィーによって精製することができる。抗体を精製するための模範的な方法は、カラムクロマトグラフィーを使用することによるものであり、そこでは、固体支持体カラム物質は、プロテイン G、連鎖球菌からの細胞表面結合タンパク質に連結され、それは高い親和性で免疫グロブリンを結合する。抗体は 60%、70%、80% の純粋さ、そして典型的には少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の純粋さに精製することができる。純度は、SDS-PAGE およびクマシー染色によるような、標準的な方法によって評価することができる。

【0495】

次いで、例えば、ゲル（例えば、SDS-Page ゲル）での分離、サイズ分画（例えば、Sephacryl（商標）S-200 HiPrep（商標）16x60 サイズ排除カラム（Amersham from GE Healthcare Life Sciences、Piscataway、NJ）での分離によって、単離されたポリペプチドを分析できる。単離されたポリペプチドはまた、結合アッセイ、通常、固相支持体、例えば、プレート（例えば、ELISA をベースとする結合アッセイ）またはビーズと結合している結合パートナーを使用する結合アッセイにおいて分析して、その所望の結合パートナーと結合する能力を調べることができる。沈殿した、ポリペプチドをディスプレイするファージを評価するために使用される、以下の節に記載される結合アッセイはまた、宿主細胞溶解物から直接単離されたポリペプチドを評価するために使用できる。例えば、結合アッセイを実施して、例えば、アッセイプレートのウェルなどの固相支持体上に抗原をコーティングすることと、固相支持体上の単離されたポリペプチドをインキュベートすることと、それに続いて洗浄することおよび二次試薬、例えば、酵素標識抗体および基質を用いて検出することによって、抗体ポリペプチドが 1 種または複数の抗原と結合するかどうかを調べることができる。

【0496】

G. 抗 RSV 抗体特性および活性を評価すること

【0497】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片は、当業者に周知の種々の方法で特性決定できる。例えば、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）の F タンパク質と免疫特異的に結合する能力についてアッセイできる。このようなアッセイは、例えば、溶液中で [例えば、Houghten (1992) Bio/Techniques 13:412-421]、ビーズ上で [Lam (1991) Nature 354:82-84]、チップ上で [Fodor (1993) Nature 364:555-556]、細菌で（米国特許第 5,223,409 号）、胞子で（米国特許第 5,571,698 号；同 5,403,484 号；および同 5,223,409 号）、プラスミドで [Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869] またはファージで [Scott and Smith (1990) Science 249:386-390；Devlin (1990) Science 249:404-406；Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382；および Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310] 実施できる。RSV 抗原またはその断片と免疫特異的に結合すると同定されている抗体またはその抗原結合断片はまた、RSV 抗原に対するその特異性および親和性についてアッセイできる。結合特異性またはエピトープは、例えば、その他の抗 RSV 抗体との競合アッセイおよび／またはモノクローナル抗体耐性突然変異体（MARM）を使用するウイルス中和アッセイによって決定できる。さらに、抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片の接触または投与によって達成される RSV 中和のレベルを測定するために、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を使用するインビトロアッセイおよびインビボ動物モデルを使用してもよい。

【0498】

1. 結合アッセイ

【0499】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、当業者に公知の

任意の方法によって、選択された標的（例えば、RSVウイルスまたは単離されたRSV Fタンパク質）と結合するその能力およびこのような標的に対する特異性について評価できる。例示的アッセイは、実施例において提供され、本明細書において以下に記載されている。結合アッセイは、溶液、懸濁液中、または固相支持体上で実施してよい。例えば、標的抗原を、固相支持体（例えば、炭素またはプラスチック表面、組織培養ディッシュまたはチップ）へと固定化し、抗体またはその抗原結合断片と接触させてもよい。結合していない抗体または標的タンパク質を洗浄除去し、次いで、結合している複合体を検出してもよい。結合アッセイは、非イオン性界面活性剤（例えば、0.1% Triton X-100またはTween 20）および／またはブロックタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンまたはゼラチン）を含む高イオン強度バッファー（例えば、0.3~0.4 M NaCl）を使用するなどによって、非特異的結合を低減する条件下で実施してもよい。このようなアッセイ中に、バックグラウンド結合の尺度として陰性対照も含めることができる。結合親和性は、スキッチャード解析法 [Munson et al., (1980) Anal. Biochem., 107:220]、表面プラズモン共鳴、等温熱量測定または当業者に公知のその他の方法を使用して決定できる。

【0500】

免疫特異的結合および交差反応性を分析するために使用できる例示的イムノアッセイとして、それだけには限らないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、メソスケールディスカバリー（Meso Scale Discovery）（MSD, Gaithersburg, Maryland）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、ELISPOT、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を使用する、それだけには限らないが、競合および非競合アッセイ系が挙げられる。このようなアッセイは、日常的なものであって、当技術分野で周知である（例えば、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Ausubel et al, eds, 1994, Current protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York参照のこと）。その他のアッセイ形式として、特定の分子（例えば、抗体）と結合し、封入された試薬またはマーカーを放出するよう設計されたリポソームを使用するリポソームイムノアッセイ（LIA）が挙げられる。次いで、放出された化学物質を、標準技術に従って検出する [Monroe et al., (1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5:34-41参照のこと]。制限によって意図されない例示的イムノアッセイを、以下に簡単に記載する。

【0501】

免疫沈降プロトコールは、一般に、タンパク質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼ阻害剤（例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジウム酸ナトリウム）を補給した、RIPAバッファー（1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15 M NaCl、pH 7.2の0.01 M リン酸ナトリウム、1% トラジロール）などの溶解バッファー中に細胞の集団を溶解することと、細胞溶解物に、注目する抗体またはその抗原結合断片を加えること、40℃で一定期間（例えば、1~4時間）インキュベートすること、細胞溶解物にプロテインAおよび／またはプロテインGセファロースビーズを加えること、40℃で、約1時間またはそれ以上インキュベートすること、溶解バッファー中でビーズを洗浄することおよびSDS／サンプルバッファー中にビーズを再懸濁することを含む。注目する抗体またはその抗原結合断片の、特定の抗原を免疫沈降させる能力を、例えば、ウエスタンブロット解析によって評価できる。当業者は、抗原に対する抗体またはその抗原結合断片の結合を増大し、バックグラウンドを低減する（例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を事前に清澄化する）ように改変できるパラメータについての知識が豊富である。免疫沈降プロトコールに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1参照のこと。

【0502】

ウエスタンブロット解析は、一般に、タンパク質サンプルを調製することと、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じた8%～20% SDS-PAGE）におけるタンパク質サンプルの電気泳動と、ポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、PVDfまたはナイロンなどのメンブレンへタンパク質サンプルを転写することと、ブロッキング溶液（例えば、3% BSAまたは脱脂乳を含むPBS）中でメンブレンをブロッキングすることと、メンブレンを洗浄バッファー（例えば、PBS-Tween 20）で洗浄することと、ブロッキングバッファーで希釈された、一次抗体またはその抗原結合断片（すなわち、注目する抗体またはその抗原結合断片）を用いてメンブレンをブロッキングすることと、メンブレンを洗浄バッファーで洗浄することと、メンブレンを、ブロッキングバッファーで希釈された、酵素の基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射活性分子（例えば、 ^{32}P または ^{125}I ）とコンジュゲートしている二次抗体（一次抗体、例えば、抗ヒト抗体を認識する）を用いてブロッキングすることと、メンブレンを洗浄バッファーで洗浄することと、抗原の存在を検出することを含む。当業者は、検出されるシグナルを増大し、バックグラウンドノイズを低減するように改変され得るパラメータについての知識が豊富である。ウエスタンブロットプロトコールに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1参照のこと。

【0503】

ELISAは、抗原を調製することと、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを、抗原を用いてコーティングすることと、ウェルに酵素の基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物とコンジュゲートしている注目する抗体またはその抗原結合断片を加えることと、一定期間インキュベートすることと、抗原の存在下で検出することを含む。ELISAでは、注目する抗体またはその抗原結合断片は、検出可能な化合物とコンジュゲートされなくてもよく、代わりに、検出可能な化合物とコンジュゲートしている第2の抗体（注目する抗体を認識する）をウェルに加えてもよい。さらに、抗原を用いてウェルをコーティングする代わりに、ウェルに抗体をコーティングしてもよい。この場合には、コーティングされたウェルに注目する抗原を添加した後、検出可能な化合物とコンジュゲートしている第2の抗体を加えてもよい。当業者は、検出されるシグナルを増大するように改変できるパラメータならびに当技術分野で公知のELISAのその他の変法について知識が豊富である。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1参照のこと。実施例5および8は、RSVタンパク質との抗RSV抗体の結合についての結合アッセイを例示する。

【0504】

抗原に対する抗体またはその抗原結合断片の結合親和性および抗体-抗原相互作用の解離速度は、例えば、競合結合アッセイによって決定できる。競合結合アッセイの一例として、漸増量の標識されていない抗原の存在下で、注目する抗体またはその抗原結合断片とともに、標識された抗原（例えば、 ^3H または ^{125}I ）をインキュベートすることと、標識された抗原と結合している抗体またはその抗原結合断片を検出することを含む、ラジオイムノアッセイがある。RSV抗原に対する、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の親和性および結合解離速度は、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定できる。第2の抗体との競合も、ラジオイムノアッセイを使用して決定できる。この場合には、RSV抗原を、漸増量の標識されていない第2の抗体の存在下、標識された化合物（例えば、 ^3H または ^{125}I ）とコンジュゲートしている本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片とともにインキュベートする。いくつかの例では、表面プラズモン共鳴 [例えば、Biacore 2000, Biacore AB, Uppsala, SwedenおよびGE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27:335] 動態解析を使用して、RSV抗原との、抗体またはその抗原結合断片の結

10

20

30

40

50

合速度および解離速度を決定できる。表面プラズモン共鳴動態解析は、その表面に抗体またはその断片が固定化されたチップからのRSV抗原の結合および解離を分析することを含む。

【0505】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、当業者に公知の技術を使用して、RSVの、その宿主細胞受容体との結合を阻害するその能力についてアッセイできる。例えば、抗体またはその抗原結合断片の存在下または不在下で、RSVの受容体を発現する細胞を、RSVと接触させることができ、抗体またはその断片の、RSVの結合を阻害する能力を、例えば、フローサイトメトリーまたはシンチレーションアッセイによって測定できる。RSV（例えば、F糖タンパク質またはG糖タンパク質などのRSV抗原）または抗体もしくは抗体断片を、RSVおよびその宿主細胞受容体間の相互作用の検出を可能にする、放射性標識（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S および ^{125}I ）または蛍光標識 [例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、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 (o-phthalaldehyde) およびフルオレサミン] などの検出可能な化合物を用いて標識できる。

10

【0506】

抗体またはその抗原結合断片の、RSVを、その受容体との結合から阻害する能力はまた、細胞不含アッセイにおいて決定できる。例えば、RSVまたはF糖タンパク質などのRSV抗原を、抗体またはその断片と接触させることができ、抗体または抗体断片の、RSVまたはRSV抗原を、その宿主細胞受容体との結合から阻害する能力を決定できる。いくつかの例では、抗体または抗原結合断片を、固相支持体上に固定化し、RSVまたはRSV抗原を、検出可能な化合物を用いて標識する。いくつかの例では、RSVまたはRSV抗原を、固相支持体上に固定化し、抗体またはその断片を、検出可能な化合物を用いて標識する。RSVまたはRSV抗原は、部分的にまたは完全に精製できる（例えば、その他のポリペプチドまたは細胞溶解物の一部を部分的にまたは完全に含まない）。いくつかの例では、RSV抗原は、RSV抗原と、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのドメインとを含む融合タンパク質であり得る。いくつかの例では、RSV抗原を、当業者に周知の技術を使用してビオチン化できる（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals ; Rockford, Ill）。

20

【0507】

2. 結合特異性

【0508】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の結合特異性またはエピトープを、それだけには限らないが、表面プラズモン共鳴アッセイ、競合アッセイおよびモノクローナル抗体耐性突然変異体 (MARM) を使用するウイルス中和アッセイをはじめとする当業者に公知の任意のアッセイによって決定できる。エピトープは、単離されたタンパク質、すなわち、単離されたFタンパク質またはウイルス中のタンパク質中にあり得る。2種の抗体の、同一エピトープと結合する能力は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイおよび抗体競合アッセイなどの当技術分野で公知のアッセイによって決定できる。通常、同一のエピトープと免疫特異的に結合する抗体は、エピトープとの結合について競合し得、これは、例えば、当技術分野で公知の技術を使用して、インビトロ結合競合アッセイ（例えば、競合ELISA）によって測定できる。通常、第2の抗体と同一のエピトープと免疫特異的に結合する第1の抗体は、約または30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%までエピトープとの結合について競合し得、ここで、競合パーセンテージは、第1の抗体の結合を、エピトープと置換する第2の抗体の測定された能力である。例示的競合アッセイでは、抗原を、標識された抗体の所定の制限希釈（例えば、50~70%飽和濃度）および標識されていない競合抗体の段階希釈の存在下でインキュベートする。競合は、競合抗体の存在下での結合の任意の低減について、標識された抗体の、抗原との結合を測定することによって決定する。種々の標識技術および例えば、放射測定、蛍光、

30

40

50

酵素および比色分析検出を含めた検出法をはじめとするこのようなアッセイの変法は、当技術分野で公知である。例えば、以下の実施例 10 において例示されるように、抗体 30 D 8 およびモタビズマブは、R S V F タンパク質との結合について競合せず、したがって、抗体 30 D 8 は、モタビズマブとは異なるエピトープと結合することを示す。

【0509】

第 1 の抗体の、第 2 の抗体と同一のエピトープと結合する能力もまた、例えば、モノクローナル抗体耐性突然変異体を使用するウイルス中和アッセイによって決定できる。MARM は、野生型 R S V ウイルスを中和するモノクローナル抗体によって中和されない突然変異体呼吸器合胞体ウイルス (R S V) である。すなわち、MARM は、R S V エスケープ突然変異体である。MARM は、ウイルス複製の各連続ラウンド後に、抗体によって中和されない突然変異体ウイルスが生じるまで、漸増濃度の抗体の存在下で細胞変性効果 (CPE) が観察されるよう、抗体の存在下でのウイルス複製の連続ラウンドの間、モノクローナル抗体の存在下で野生型 R S V を培養することによって作製する。第 1 の抗体が、第 2 の抗体に対して作製した MARM を中和できる場合には、抗体は、異なるエピトープと特異的に結合するか、または相互作用すると結論づけることができる。例えば、第 1 の抗 R S V 抗体が、野生型 R S V を中和するが、特定の突然変異体 R S V (すなわち、MARM) を中和しない場合には、野生型 R S V を中和するが、特定の突然変異体 R S V を中和しない第 2 の抗体は、通常、第 1 の抗体と同一の R S V 上のエピトープと結合する。第 1 の抗 R S V 抗体が、野生型 R S V を中和するが、特定の突然変異体 R S V を中和しない場合には、野生型 R S V および特定の突然変異体 R S V を中和する第 2 の抗体は、通常、第 1 の抗体と同一の R S V 上のエピトープと結合しない。

【0510】

例えば、以下の例 9 において例示されるように、本明細書において提供される 58c5 は、MAb 1129 に対して作製した MARM 1129、パリビズマブおよびモタビズマブの親抗体 [Johnson et al. (1997) J. Infect. Diseases 176:1215-1224 および米国特許第 5,824,307 号参照のこと]、Fab 19 に対して作製した MARM 19 [Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10164-10168 参照のこと] および MAb 151 に対して作製した MARM 151 [Mufson et al., (1985) J. Gen. Virol., 66:2111-2124 参照のこと] をはじめ、種々の抗 R S V 抗体に対して予め作製した MARM を中和できる。したがって、58c5 は、抗体 Fab 19、MAb 151 および MAb 1129 とは異なる F タンパク質上のエピトープと結合する。

【0511】

以下の例 11 において例示されるように、MARM を、モタビズマブおよび 58c5 の IgG 形態に対して作製した。5~7 ラウンドの選択後に作製されたモタビズマブ MARM は、野生型 R S V F タンパク質と比較して、単一のアミノ酸突然変異 (K272E、配列番号 486) を含有する。アミノ酸 K272 での突然変異は、モタビズマブの親抗体の結合を乱す公知の突然変異と一致する [Zhao et al., (2004) J. Infectious Disease 190:1941-1946 参照のこと]。10 ラウンドの選択後に作製された 58c5 MARM は、野生型 R S V F タンパク質と比較して、3つのアミノ酸突然変異 (N63K、M115K および E295G、配列番号 487) を含有する。58c5 MARM 中のエスケープを達成する突然変異は、R S V F タンパク質と免疫特異的に結合する種々のモノクローナル抗体の抗原部位としては、これまで同定されていない [例えば、Beeler et al. (1989) J. Virology 63(7):2841-2950、Crowe et al. (1998) Virology 252:373-375; Zhao et al., (2004) J. Infectious Disease 190:1941-1946; Liu et al., (2007) Virology Journal 4:71 参照のこと]。30D8 の IgG 形態の存在下においてウイルス複製の 12 ラウンドの後に、R S V ウイルスは中和をエスケープすることが不可能であった (以下の例 11 参照)。抗体 30D8 が MARMs の生成を制限する能力は、30D8 がエスケープ変異の生成の影響を受けにくいエピトープに結合することを意味し、そして結果として、抗体 30D8 は R S V 感染の処置のための治療上の抗体として有用である。

【0512】

さらに、以下の例 1 1 に示されるように、3 0 D 8 は、モタビズマブ M A R M および 5 8 c 5 M A R M の両方を中和し、5 8 c 5 は、モタビズマブ M A R M を中和し、そしてモタビズマブは、5 8 c 5 M A R M を中和する。したがって、3 0 D 8 は、5 8 c 5 およびモタビズマブとは異なる、R S V F タンパク質のエピトープと結合する。さらに、5 8 c 5 は、3 0 D 8 およびモタビズマブとは異なる、R S V F タンパク質のエピトープと結合する。

【0 5 1 3】

3. 抗体のウイルス中和効果を分析するためのインビトロアッセイ

【0 5 1 4】

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、ウイルス中和の検出のための当技術分野で公知の任意の適した方法によって分析できる。ウイルス中和の検出法として、それだけには限らないが、プラークアッセイおよび合胞体形成の阻害についてのアッセイが挙げられる。このようなアッセイを使用して、例えば、ウイルス結合、ウイルス侵入およびウイルスの細胞間伝播の阻害を評価できる [例えば、Burioni et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:355-359; Sanna et al. (2000) Virology 270:386-396; および De Logu et al., (1998) J Clin Microbiol 36:3198-3204 参照のこと]。当業者ならば、ウイルス中和を測定できる任意のアッセイを同定できる。

【0 5 1 5】

標準プラークアッセイとして、例えば、プラーク減少アッセイ、プラークサイズ減少アッセイ、中和アッセイおよび中和動態アッセイが挙げられる。これらのアッセイは、ウイルスによる標的細胞単層の感染後の、ウイルスプラークの形成（すなわち、溶解した細胞の面積）を測定する。プラーク減少アッセイにおいて使用できる例示的標的細胞株として、それだけには限らないが、V e r o 細胞、M R C - 5 細胞、R C - 3 7 細胞、B H K - 2 1 / C 1 3 細胞および H E p - 2 細胞が挙げられる。当業者ならば、プラークアッセイにおいて使用するための適当な標的細胞株を同定できる。プラークアッセイのための適当な細胞株の選択は、公知の因子、例えば、細胞感染力およびウイルスの、標的細胞において増殖し、標的細胞を溶解する能力などに応じて変わり得る。実施例 6 および 9 には、インビトロ中和アッセイが例示されている。

【0 5 1 6】

プラーク減少アッセイを使用して、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の、溶液中でウイルス中和を達成する能力を測定できる。例示的プラーク減少アッセイでは、抗体またはその抗原結合断片およびウイルスを、プレインキュベートし、その後、標的細胞を加える。次いで、標的細胞を抗体／ウイルス混合物に感染させ、所定の感染期間後にプラークアッセイを実施する。当業者ならば、当技術分野で公知の例に基づいて、必要なインキュベーション時間を決定できる。標的細胞の感染後に生じたウイルスプラークの数の減少が、標的細胞との抗体またはその抗原結合断片の結合および／または抗体、もしくはその抗原結合断片、内部移行とは無関係に、抗体またはその抗原結合断片の、ウイルスの標的細胞との結合を防ぐ能力を示す。

【0 5 1 7】

プラークサイズ減少アッセイを使用して、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の、ウイルスの細胞間伝播を阻害する能力を測定できる。例示的プラークサイズ減少アッセイでは、標的細胞をまずウイルスに、所定の感染期間、感染させ、次いで、感染細胞に、抗体またはその抗原結合断片を加える。当業者ならば、当技術分野で公知の例に基づいて、必要なインキュベーション時間を決定できる。ウイルスプラークのサイズ（すなわち、直径）の減少が、抗体またはその抗原結合断片が、ウイルスの細胞間伝播を防ぐことができることを示す。

【0 5 1 8】

ウイルス中和アッセイを使用して、ウイルス曝露に先立つ、抗体またはその抗原結合断片の標的細胞との結合によって、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の、標的細胞表面でウイルスの中和を達成する能力を測定できる。例示的ウイルス中和アッセイでは、抗体

またはその抗原結合断片および標的細胞を所定の期間プレインキュベートし、抗体またはその抗原結合断片の、標的細胞との結合を可能にする。プレインキュベーション期間の後、結合していない抗体を除去し、標的細胞をウイルスに感染させる。このアッセイにおけるプラークの数の減少は、抗体またはその抗原結合断片の、標的細胞との結合および／または内部移行に依存して、抗体またはその抗原結合断片の、ウイルス感染を防ぐ能力を示す。このアッセイを使用して、抗体または抗原結合断片濃度およびプレインキュベーション時間を変更することによって中和動態を測定できる。

【0519】

合胞体形成の阻害のための例示的アッセイを使用して、融合性ウイルス株を使用する場合に合胞体の形成を妨げることによる、ウイルスの細胞変性効果の抗体媒介性阻害を測定できる。当業者ならば、アッセイにおいて使用するための適当な融合性ウイルス株を同定できる。

10

【0520】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、当業者に公知の技術を使用して、RSV複製を阻害またはダウンレギュレートするその能力についてアッセイできる。例えば、RSV複製を、例えば、Johnson et al. (1997) Journal of Infectious Diseases 176:1215-1224などによって記載されるプラークアッセイによってアッセイできる。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、RSVポリペプチドの発現を阻害またはダウンレギュレートするその能力についてアッセイできる。それだけには限らないが、ウェスタンブロット解析、ノーザンブロット解析およびRT-PCRをはじめとする当業者に公知の技術を使用して、RSVポリペプチドの発現を測定できる。

20

【0521】

4. 抗RSV抗体の有効性を評価するためのインビボ動物モデル

【0522】

動物モデルを使用するインビボ研究を実施して、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の有効性を評価できる。動物モデルを使用するインビボ研究を実施して、このような抗体またはその抗原結合断片の投与の任意の毒性を評価できる。インビボ動物モデルを使用するものなどの種々のアッセイが、抗RSV抗体の、RSVウイルス感染を阻害または治療する能力を評価するために、また、任意の毒性をアッセイするために当業者にとって利用可能である。抗RSV抗体の治療効果は、ウイルス感染の動物モデルをはじめとする病原体感染の動物モデルを使用して評価できる。このような動物モデルは、当技術分野で公知であり、それだけには限らないが、RSV感染の動物モデル、それだけには限らないが、コットンラット、近交系マウス、ウシ、フェレット、ハムスター、モルモット、チンパンジー、ヨザル、アカゲザル、アフリカミドリザル、フサオマキザル、リスザル、ボンネットモンキー、ヒヒなどが挙げられる[RSV感染の例示的モデルについては、例えば、Prince et al. (1978) Am. J. Pathol. 93:771-791; Prince et al. (1979) Infect. Immunol. 26:764-766; Byrd and Prince (1997) Clinical Infectious Diseases 25:1363-1368 (それに引用される参考文献を含む) 参照のこと]。抗体または抗原結合断片または組成物の毒性のインビボ試験には、それだけには限らないが、ラット、マウス、ウシ、サルおよびウサギをはじめとする当技術分野で公知の任意の動物モデル系を使用できる。

30

40

【0523】

5. 抗体有効性を測定するためのインビトロおよびインビボアッセイ

【0524】

ウイルス感染の治療または予防における有効性は、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の、ウイルスの複製を阻害し、感染を阻害するか、もしくはウイルスがその宿主において自身を確立するのを防ぎ、RSV感染の罹患率を低下させ、またはRSV感染と関連している1つもしくは複数の症状を予防、寛解もしくは軽減する能力を検出することによって実証できる。治療は、例えば、ウイルス量の低減、1種ま

50

たは複数の症状の寛解、R S V感染期間の低減または本明細書において提供される抗体または組成物の投与後の死亡率および／または罹病率の低下がある場合に、治療的であると考えられる。さらに、治療は、1種または複数のR S V抗原と免疫特異的に結合する1種または複数の抗体またはその抗原結合断片の投与後に、免疫応答の増大がある場合に、治療的であると考えられる。

【0525】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、I F N- α 、I F N- β 、I F N- γ 、I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-9、I L-10、I L-12およびI L-15などのサイトカインの発現を誘導する能力について、インビトロおよびインビボで試験できる。当業者に公知の技術を使用して、サイトカインの発現のレベルを測定できる。例えば、サイトカインの発現のレベルを、サイトカインのRNAのレベルを分析することによって、例えば、R T-P C Rおよびノーザンブロット分析によって、サイトカインのレベルを分析することによって、例えば、免疫沈降とそれに続くウェスタンブロット解析またはE L I S Aによって測定できる。

10

【0526】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、ヒト免疫細胞（例えば、T細胞、B細胞およびナチュラルキラー細胞）をはじめとする免疫細胞の生物活性を調節するその能力について、インビトロおよびインビボで試験できる。抗R S V抗体または抗原結合断片の、免疫細胞の生物活性を調節する能力は、抗原の発現を検出すること、免疫細胞の増殖を検出すること、シグナル伝達分子の活性化を検出すること、免疫細胞のエフェクター機能を検出することまたは免疫細胞の分化を検出することによって評価できる。これらの活性を測定するために、当業者に公知の技術を使用できる。例えば、³H-チミジン取り込みアッセイおよびトリパンプルー細胞カウントによって細胞増殖をアッセイできる。抗原発現は、例えば、それだけには限らないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学ラジオイムノアッセイ、E L I S A（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイおよびF A C S分析などの技術を使用する競合および非競合アッセイ系をはじめとするイムノアッセイによってアッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイおよび電気泳動シフトアッセイ（E M S A）によってアッセイできる。

20

30

【0527】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片はまた、ウイルス複製を阻害するか、またはインビトロ、エキソビボ（ex vivo）およびインビボアッセイにおいてウイルス量を低減するその能力について試験できる。抗R S V抗体またはその抗原結合断片はまた、R S V感染の経時的推移を低減するその能力についてアッセイできる。抗R S V抗体またはその抗原結合断片はまた、R S V感染を患っているヒトの生存期間を、少なくとももしくはは約25%、少なくとももしくはは約50%、少なくとももしくはは約60%、少なくとももしくはは約75%、少なくとももしくはは約85%、少なくともまたは約95%または少なくとももしくはは約99%増大するその能力についてアッセイできる。さらに、抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、R S V感染を患っているヒトの入院期間を、少なくとももしくはは約60%、少なくとももしくはは約75%、少なくとももしくはは約85%、少なくとももしくはは約95%または少なくとももしくはは約99%減少させるその能力についてアッセイできる。当業者に公知の技術を使用して、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片の機能をインビボで分析できる。

40

【0528】

本明細書において提供される方法および使用に一致して、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片の予防的および／または治療的効力を実証するために、ヒト対象を用いる臨床試験が実施される必要はない。本明細書において提供される抗

50

R S V抗体またはその抗原結合断片を使用するインビトロおよび動物モデル研究を、ヒトに外挿でき、抗R S V抗体または抗原結合断片の予防的および／または治療的有用性を実証するのに十分である。

【0529】

H. 診断的使用

【0530】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、R S Vの検出、精製および／または中和のための診断アッセイにおいて使用できる。例示的診断アッセイとして、R S Vのインビトロおよびインビボ検出が挙げられる。例えば、単離された生体サンプル（例えば、痰）において、またはインビボでR S Vのレベルを定性的および定量的に測定するための、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を使用するアッセイが提供される。

10

【0531】

本明細書において記載されるように、インビトロまたはインビボ検出のために、抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、検出可能な部分にコンジュゲートしてよい。このような抗体を使用して、例えば、粘膜部位などのインビボ部位での、例えば、抗R S V抗体またはその抗原結合断片の局在性および／または残留性を評価できる。検出可能な部分にカップリングされている抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、当技術分野で公知の任意の適した方法によってインビボで検出できる。検出可能な部分にカップリングされている抗R S V抗体またはその抗原結合断片はまた、抗体またはその抗原結合断片の投与後に対象から得られた組織または体液サンプルなどの単離された生体サンプルにおいて検出できる。

20

【0532】

1. 病原体感染のインビトロ検出

【0533】

一般に、R S Vは、対象または患者から得た生体サンプル（例えば、血液、血清、痰尿および／またはその他の適当な細胞もしくは組織）における、1種または複数のR S Vタンパク質および／またはこのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在に基づいて、対象または患者において検出できる。このようなタンパク質を、対象または患者におけるR S Vの有無を示すマーカーとして使用できる。本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、生体サンプルにおいて薬剤と結合する抗原および／またはエピトープのレベルの検出のために使用できる。

30

【0534】

サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するために抗R S V抗体またはその抗原結合断片を使用するための種々のアッセイ形式が、当業者に公知である（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照のこと）。一般に、対象または患者におけるR S Vの有無は、対象または患者から得られた生体サンプルを本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片と接触させることおよびサンプルにおいて抗R S V抗体またはその抗原結合断片と結合するポリペプチドのレベルを検出することによって決定できる。

40

【0535】

いくつかの例では、アッセイは、標的ポリペプチドと結合し、サンプルの残部から標的ポリペプチドを回収するための、固相支持体上に固定化されている本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片の使用を含む。次いで、リポーター基を含有し、抗体／ポリペプチド複合体と特異的に結合する検出試薬を使用して、結合しているポリペプチドを検出できる。このような検出試薬は、例えば、ポリペプチドまたは抗体または結合剤と特異的に結合するその他の薬剤と特異的に結合する結合剤を含有し得る。

【0536】

いくつかの例では、ポリペプチドが、リポーター基で標識され、抗R S V抗体またはその抗原結合断片をサンプルとともにインキュベートした後に、固定化された抗R S V抗体

50

またはその抗原結合断片と結合することが可能となる競合アッセイを利用できる。サンプルの成分が標識されたポリペプチドの、抗RSV抗体またはその抗原結合断片との結合を阻害する程度は、サンプルの固定化された抗RSV抗体またはその抗原結合断片との反応性を示す。このようなアッセイ内で使用するための適したポリペプチドとして、上で記載される、抗RSV抗体またはその抗原結合断片が結合する、全長RSV Fタンパク質およびRSV Fタンパク質の細胞外ドメインをはじめとするその一部が挙げられる。

【0537】

固相支持体は、タンパク質が結合され得る、当業者に公知の任意の物質であり得る。例えば、固相支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウェルまたはニトロセルロースもしくはその他の適したメンブレンであり得る。支持体はまた、ガラス、ガラスファイバー、ラテックスまたはポリスチレンもしくはポリビニルクロリドなどのプラスチック物質などのビーズまたはディスクであり得る。支持体はまた、例えば、米国特許第5,359,681号に開示されるものなどの磁性粒子または光ファイバーセンサーであり得る。抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、当業者に公知の種々の技術を使用して固相支持体上に固定化してもよい。抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、マイクロタイタープレート中のウェルに、またはメンブレンに、吸着によって固定化してもよい。このような場合には、吸着は、抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、適したバッファー中で、固相支持体と適した時間量、接触させることによって達成され得る。接触時間は、温度につれて変わるが、通常、約1時間から約1日の間である。一般に、プラスチックマイクロタイタープレート（ポリスチレンまたはポリビニルクロリドなど）のウェルを、約10ngから約10μg、通常、約100ngから約1μgの範囲の量の抗RSV抗体またはその抗原結合断片と接触させることが、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の適当な量を固定化するのに十分である。

【0538】

抗RSV抗体またはその抗原結合断片の固相支持体との共有結合は、一般に、まず支持体を、支持体および抗RSV抗体またはその抗原結合断片上のヒドロキシルまたはアミノ基などの官能基と反応する二官能性試薬と反応させることによって達成できる。例えば、抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、ベンゾキノンを使用して、または支持体上のアルデヒド基の、結合パートナー上のアミンおよび活性水素との縮合によって、適当なポリマーコーティングを有する支持体と共有結合によって結合できる（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13参照のこと）。

【0539】

いくつかの例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、ニトロセルロースなどのメンブレン上に固定化されている、フロースルーまたはストリップ試験形式においてアッセイを実施する。フロースルー試験では、サンプル内のポリペプチドは、サンプルがメンブレンを通過するときに、固定化された抗RSV抗体またはその抗原結合断片と結合する。第2の標識された結合剤は、次いで、第2の結合剤を含有する溶液がメンブレンを流れるときに、抗RSV抗体またはその抗原結合断片-ポリペプチド複合体と結合する。

【0540】

提供されるRSVタンパク質または抗RSV抗体またはその抗原結合断片とともに使用するのに適しているさらなるアッセイプロトコルが、当技術分野に存在する。上記の説明は、単に例示的なものであると意図される。例えば、当業者には、上記のプロトコルを、生体サンプル中のこのようなポリペプチドと結合する抗体を検出するためにRSVポリペプチドを使用するために、容易に改変できることは明らかであろう。このようなタンパク質に特異的な抗体の検出によって、RSV感染の同定が可能となり得る。

【0541】

感受性を改善するために、複数のRSVタンパク質マーカーを所与のサンプル内でアッセイできる。異なるRSVポリペプチドに対して特異的な抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、単一のアッセイ内で組み合わせることができることは明らかであろう。さらに、複数のプライマーまたはプローブを同時に使用できる。最適の感受性をもたらす組合せ

を決定するための、R S Vタンパク質マーカーの選択は、日常的な実験に基づいたものであり得る。さらに、またはあるいは、本明細書において提供されるR S Vタンパク質のアッセイを、その他の公知のR S V抗原のアッセイと組み合わせてもよい。

【0542】

2. 病原体感染のインビボ検出

【0543】

本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、インビボ診断薬として使用できる。例えば、抗R S V抗体またはその抗原結合断片は、例えば、磁気共鳴イメージング、X線イメージング、コンピューター化放射トモグラフィおよびその他のイメージング技術などの検出法を使用して感染組織（例えば、肺におけるR S V感染）の像を提供できる。R S V感染組織のイメージングには、例えば、抗R S V抗体の抗体部分は、一般に、R S Vと結合し（例えば、R S V Fタンパク質エピトープと結合する）、造影剤は、抗R S V抗体またはその抗原結合断片とカップリングされる常磁性物質、放射活性物質または蛍光物質などのイメージングの際に検出可能な物質となる。一般に、診断薬として使用するには、抗R S V抗体またはその抗原結合断片を、造影剤と直接的または間接的にカップリングする。

【0544】

多数の適当な造影剤が、当技術分野で公知であり、抗R S V抗体または抗原結合断片とのそれらの結合のための方法も同様である（例えば、米国特許第5, 021, 236号および同4, 472, 509号参照のこと）。例示的結合法は、例えば、抗体またはその抗原結合断片と結合しているD T P Aのような有機キレート化剤を使用する、金属キレート複合体の使用を含む（米国特許第4, 472, 509号）。抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させることができる。フルオレセインマーカーとのコンジュゲートは、このようなカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって調製する。

【0545】

インビボ画像診断法には、所与の放射性同位元素を選択する場合に利用可能な検出機器の種類が考慮される。選択される放射性同位元素は、所与の種類の機器にとって検出可能である減衰の種類を有する。インビボ診断のための放射性同位元素の選択におけるもう1つの因子は、放射性同位元素の半減期が、標的による最大の取り込み時間で依然として検出可能であるよう十分に長い、宿主に対する有害な放射が最小にされるよう十分短いことである。通常、インビボイメージングに使用される放射性同位元素は、粒子放出を欠くが、140~250 keVの範囲で多数の光子を生じ、これは、従来のガンマカメラによって容易に検出できる。

【0546】

インビボ診断には、放射性同位元素を、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片と直接的または中間体官能基を使用することによって間接的にのいずれかで結合できる。金属イオンとして存在する放射性同位元素を抗体と結合するために使用できる例示的中間体官能基として、二官能性キレート化剤、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸（D T P A）およびエチレンジアミン四酢酸（E D T A）および同様の分子が挙げられる。提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片と結合できる金属イオンの例として、それだけには限らないが、⁷²ヒ素、²¹¹アスタチン、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、⁶⁷銅、¹⁵²ユーロピウム、⁶⁷ガリウム、⁶⁸ガリウム、³水素、¹²³ヨウ素、¹²⁵ヨウ素、¹³¹ヨウ素、¹¹¹インジウム、⁵⁹鉄、³²リン、¹⁸⁶レニウム、¹⁸⁸レニウム、⁹⁷ルテニウム、⁷⁵セレン、³⁵硫黄、^{99m}テクニシウム、²⁰¹タリウム（Thalium）、⁹⁰イットリウムおよび⁸⁹ジルコニウムが挙げられる。

【0547】

磁気共鳴画像（M R I）または電子スピン共鳴（E S R）におけるように、インビボ診断の目的のために、本明細書において提供される抗R S V抗体またはその抗原結合断片を

10

20

30

40

50

、常磁性同位元素を用いて標識できる。一般に、画像診断を可視化するための任意の従来法を利用できる。一般に、カメライメージングには、 γ および陽電子放出放射性同位元素が、MRIには常磁性同位元素が使用される。このような技術において特に有用である元素として、それだけには限らないが、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr および ^{56}Fe が挙げられる。

【0548】

例示的常磁性イオンとして、それだけには限らないが、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)が挙げられる。例えば、X線イメージングにおいて有用なイオンとして、それだけには限らないが、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)およびビスマス(III)が挙げられる。

10

【0549】

投与される検出可能に標識された抗RSV抗体またはその抗原結合断片の濃度は、RSVとの結合が、バックグラウンドと比較して検出可能であるよう十分である。さらに、検出可能に標識された抗RSV抗体またはその抗原結合断片が、最良の標的対バックグラウンドシグナル比を得るよう、循環系から迅速に除去されることが望ましい。

【0550】

インビボ診断のための検出可能に標識された抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与量は、個体の年齢、性別および疾患の程度といった因子に応じて変わる。ヒトモノクローナル抗体の投与量は、例えば、約 $0.01\text{mg}/\text{m}^2$ ～約 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $0.1\text{mg}/\text{m}^2$ ～約 $200\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $0.1\text{mg}/\text{m}^2$ ～約 $10\text{mg}/\text{m}^2$ で変わり得る。このような投与量は、例えば、複数の注射が与えられるかどうか、組織および当業者に公知のその他の因子に応じて変わり得る。

20

【0551】

3. 感染のモニタリング

【0552】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、インビトロおよびインビボで使用して、病原性疾患の治療の経過をモニタリングできる。したがって、例えば、RSVに感染した細胞数の増大もしくは減少または身体もしくは種々の体液中に存在するRSVウイルス粒子の濃度の変化を測定できる。このような方法を使用して、抗RSV抗体またはその抗原結合断片を使用して、病原性疾患を寛解することを目的とする特定の治療レジメンが有効であるかどうかを決定できる。

30

【0553】

I. 予防的および治療的使用

【0554】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片および本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する医薬組成物は、予防および治療のために対象に投与できる。例えば、提供される抗体またはその抗原結合断片を、RSV感染などの疾患または状態の治療のために投与できる。いくつかの例では、提供される抗体またはその抗原結合断片を、それだけには限らないが、宿主におけるRSV感染の確立の阻害または対象間のRSV伝染の阻害をはじめとするRSV感染の防止および／または伝播などの予防的使用のために対象に投与できる。いくつかの例では、提供される抗体またはその抗原結合断片を、対象におけるRSVウイルス量の低減のために対象に投与できる。抗体またはその抗原結合断片はまた、RSV感染の1種または複数の症状の予防、治療および／もしくは軽減またはRSV感染期間の低減のために対象に投与できる。

40

【0555】

いくつかの例では、本明細書で提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与は、RSV感染の罹患率を、抗RSV抗体または抗原結合断片の不在下でのRSV感染の

50

罹患率に対して、少なくとももしくは約 99%、少なくとももしくは約 95%、少なくとももしくは約 90%、少なくとももしくは約 85%、少なくとももしくは約 80%、少なくとももしくは約 75%、少なくとももしくは約 70%、少なくとももしくは約 65%、少なくとももしくは約 60%、少なくとももしくは約 55%、少なくとももしくは約 50%、少なくとももしくは約 45%、少なくとももしくは約 40%、少なくとももしくは約 35%、少なくとももしくは約 30%、少なくとももしくは約 25%、少なくとももしくは約 20%、少なくとももしくは約 15%または少なくとももしくは約 10%阻害する。いくつかの例では、本明細書で提供される抗 RSV 抗体または抗原結合断片の投与は、RSV 感染の 1 種または複数の症状の重篤度を、抗 RSV 抗体または抗原結合断片の不在下での RSV 感染の 1 種または複数の症状の重篤度に対して、少なくとももしくは約 99%、少なくともしくは約 95%、少なくともしくは約 90%、少なくともしくは約 85%、少なくともしくは約 80%、少なくともしくは約 75%、少なくともしくは約 70%、少なくともしくは約 65%、少なくともしくは約 60%、少なくともしくは約 55%、少なくともしくは約 50%、少なくともしくは約 45%、少なくともしくは約 40%、少なくともしくは約 35%、少なくともしくは約 30%、少なくともしくは約 25%、少なくともしくは約 20%、少なくともしくは約 15%または少なくともしくは約 10%低下させる。

10

【0556】

1. 治療の対象

【0557】

20

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を用いる治療のための対象または候補として、それだけには限らないが、RSV ウイルスに曝露されたヒト患者などの対象、RSV 感染の 1 種または複数の症状を示すヒト患者などの対象および RSV 感染のリスクがあるヒト患者などの対象が挙げられる。例示的 RSV ウイルス感染症として、それだけには限らないが、例えば、細気管支炎および肺炎をはじめとする急性 RSV 疾患、RSV 上気道感染 (URI) および／または RSV 下気道感染 (LRI) などの RSV ウイルスによって引き起こされたものが挙げられる。

【0558】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を用いる治療のための対象は、哺乳類である。いくつかの例では、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を用いる治療のための対象は、霊長類である。特定の例では、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を用いる治療のための対象は、ヒトである。

30

【0559】

提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、任意の RSV 媒介性疾患の治療のためにヒト患者などの対象に投与できる。例えば、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、対象に投与して、それだけには限らないが、喘息、喘鳴音、反応性気道疾患 (RAD) および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) をはじめとする、RSV ウイルス感染と関連している 1 種または複数の症状または状態を軽減できる。このような疾患および状態は、医師または当業者に周知であり、容易に診断される。

40

【0560】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、再発性 RSV ウイルス媒介性疾患の維持または抑制治療のために、RSV ウイルス感染を有するヒト患者のような対象に投与できる。

【0561】

提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片を、それだけには限らないが、未熟児で生まれた (早産) 乳児 (例えば、38 週の妊娠期間未満、例えば、29 週、30 週、31 週、32 週、33 週、34 週、35 週、36 週または 37 週の妊娠期間などで生まれたヒト乳児) ; 乳児 (例えば、37 週を超える妊娠期間で生まれたヒト乳児)、嚢胞性線維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症または後天性免疫不全 (例えば

50

、A I D S 患者）、白血病、非ホジキンリンパ腫を有する対象、免疫抑制された患者、例えば、移植（例えば、骨髄移植または腎臓移植）のレシピエントなど、または老人ホームもしくはリハビリテーションセンターにいる個人を含めた高齢の対象をはじめとする、R S V ウイルス感染のリスクにあるヒト患者などの対象に投与できる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、それだけには限らないが、デイケアに参加すること、学齢のきょうだいを有すること、環境的大気汚染物質に対する曝露、先天性気道異常および／または重篤な神経筋疾患などの1種または複数の環境的危険因子に対して曝露された早産乳児または乳児などの対象に投与できる。いくつかの例では、提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、慢性肺疾患または鬱血性心不全、肺高血圧症およびチアノーゼ性心疾患をはじめとする先天性心疾患を有する、乳児または2歳未満の小児などの対象に投与できる。

10

【0562】

種々の病原体および病原体感染についての試験は、当技術分野で公知であり、対象が、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を用いる治療の候補であるかどうかを評価するために使用できる。例えば、R S V ウイルス感染についての試験は公知であり、これとして、例えば、ウイルス培養プラークアッセイ、抗原検出試験、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）試験および種々の抗体血清学的試験が挙げられる。ウイルス感染についての試験は、組織から得られたサンプルまたは髄液、血液または尿などの体液サンプルで実施できる。さらなる試験として、それだけには限らないが、肺炎の徴候を示し得る胸部 X 線、化学スクリーニング、全血球計算または動脈血ガス（A B G）分析などのその他の血液試験および血液中の酸素量を測定するための酸素測定が挙げられる。

20

【0563】

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、1年の特定の時間の間、R S V 感染のリスクが高い対象に投与できる。R S V の季節は、通常、10月から5月に及ぶ。乳児、高齢者または免疫不全の患者などのこの時間の間にウイルス感染に対する感受性の増大を示す対象は、R S V の季節の直前および／またはその間に、R S V 感染の予防および／または治療のために、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を投与されてもよい。いくつかの例では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、R S V の季節の間に1回、2回、3回、4回または5回投与する。いくつかの例では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、R S V の季節の前、1ヶ月、2ヶ月または3ヶ月以内に、1回、2回、3回、4回または5回投与する。

30

【0564】

2. 投与量

【0565】

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、治療される患者に対する望ましくない副作用の不在下で、治療上有効な効果を発揮するのに十分な量で投与する。抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な濃度は、本明細書において提供されるか、または当技術分野で公知のアッセイを使用することなどによって、公知のインビトロおよびインビボ系においてポリペプチドを試験することによって経験的に決定できる。

40

【0566】

治療的に投与される有効量の抗体またはその抗原結合断片は、例えば、治療目的、投与経路および患者の状態に応じて変わる。さらに、主治医は、疾患の重篤度および種類、患者の健康、体重、性別、食事、投与時間および投与経路、その他の投薬治療およびその他の関連臨床因子をはじめとする、薬物の作用を改変すると分かっている種々の因子を考慮する。したがって、治療専門家にとって、抗体またはその抗原結合断片の投与量を滴定することおよび最適な治療効果を得るために必要に応じて投与経路を改変することが必要となる。通常、臨床医は、所望の効果を達成する投与量に到達するまで、抗体またはその抗原結合断片を投与する。この治療の進捗は、従来のアッセイによって容易にモニタリング

50

される。ウイルス感染の治療をモニタリングするための例示的アッセイは、当技術分野で公知であり、これとして、例えば、ウイルス力価アッセイが挙げられる。

【0567】

一般に、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与の投与量範囲は、病原体媒介性疾患（例えば、ウイルス疾患）の症状（単数または複数）が寛解されるか、またはウイルス感染の可能性が低下する所望の効果を引き起こすのに十分に多いものである。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、対象において免疫応答を誘導するための有効な量で投与される。投与量は、過粘稠度症候群、肺水腫または鬱血性心不全などの有害な副作用を引き起こすほど多量ではない。一般に、投与量は、患者における年齢、状態、性別および疾患の程度によって変わり、当業者によって決定できる。有害な副作用が出現した場合には、投与量は、個々の医師によって調整できる。RSV感染の予防もしくは治療および／またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の寛解のための例示的投与量として、それだけには限らないが、約0.01もしくは0.01mg/kg～約300もしくは300mg/kg、例えば、約0.01もしくは0.01mg/kg、約0.1もしくは0.1mg/kg、約0.5もしくは0.5mg/kg、約1もしくは1mg/kg、約5もしくは5mg/kg、約10もしくは10mg/kg、約15もしくは15mg/kg、約20もしくは20mg/kg、約25もしくは25mg/kg、約30もしくは30mg/kg、約35もしくは35mg/kg、約40もしくは40mg/kg、約45もしくは45mg/kg、約50もしくは50mg/kg、約100もしくは100mg/kg、約150もしくは150mg/kg、約200もしくは200mg/kg、約250もしくは250mg/kgまたは約300もしくは300mg/kgなどが挙げられる。

【0568】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、所望の血清力価を達成するのに有効な投与量で対象に投与する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、抗体またはその抗原結合断片の第1の用量の投与後、1日もしくは約1日、2日もしくは約2日、3日もしくは約3日、4日もしくは約4日、5日もしくは約5日、6日もしくは約6日、7日もしくは約7日、8日もしくは約8日、9日もしくは約9日、10日もしくは約10日、15日もしくは約15日、20日もしくは約20日、25日もしくは約25日、30日もしくは約30日、35日もしくは約35日または40日もしくは約40日および抗体またはその抗原結合断片のその後の用量の前に、少なくともまたは約1μg/ml、少なくともまたは約2μg/ml、少なくともまたは約3μg/ml、少なくともまたは約4μg/ml、少なくともまたは約5μg/ml、少なくともまたは約6μg/ml、少なくともまたは約7μg/ml、少なくともまたは約8μg/ml、少なくともまたは約9μg/ml、少なくともまたは約10μg/ml、少なくともまたは約15μg/ml、少なくともまたは約20μg/ml、少なくともまたは約25μg/ml、少なくともまたは約30μg/ml、少なくともまたは約40μg/ml、少なくともまたは約50μg/ml、少なくともまたは約60μg/ml、少なくともまたは約70μg/ml、少なくともまたは約80μg/ml、少なくともまたは約90μg/ml、少なくともまたは約100μg/mlの血清力価を達成するのに有効な量で、RSV感染の予防もしくは治療および／またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の寛解のために投与する。

【0569】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、挿管サンプル、痰または肺から得た洗浄において所望の力価を達成するのに有効な投与量で肺デリバリーによって対象に投与する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSV感染の予防もしくは治療および／またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の寛解のために、抗体またはその抗原結合断片の第1の用量の投与後10日もしくは約10日、15日もしくは約15日、20日もしくは約20日、25日もしくは約25日、30日もしくは約30日、35日もしくは約35日

または40日もしくは約40日および抗体またはその抗原結合断片のその後の用量の前に、挿管サンプルまたは肺から得た洗浄において10 ng/mg（肺タンパク質1 mgあたり、ngの抗RSV抗体またはその抗原結合断片）もしくは約10 ng/mg、15 ng/mgもしくは約15 ng/mg、20 ng/mgもしくは約20 ng/mg、25 ng/mgもしくは約25 ng/mg、30 ng/mgもしくは約30 ng/mg、40 ng/mgもしくは約40 ng/mg、50 ng/mgもしくは約50 ng/mg、60 ng/mgもしくは約60 ng/mg、70 ng/mgもしくは約70 ng/mg、80 ng/mgもしくは約80 ng/mg、90 ng/mgもしくは約90 ng/mg、100 ng/mgもしくは約100 ng/mg、110 ng/mgもしくは約110 ng/mg、120 ng/mgもしくは約120 ng/mg、130 ng/mgもしくは約130 ng/mg、140 ng/mgもしくは約140 ng/mgまたは150 ng/mgもしくは約150 ng/mgの力価を達成するのに有効な量で投与する。

10

【0570】

ウイルス感染の治療については、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与量は、疾患の種類および重篤度に応じて変わり得る。抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、単回用量、複数の別個の投与で、または連続注入によって投与できる。数日にわたるか、またはそれより長い反復投与については、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が生じるか、または患者の状態において所望の改善が達成されるまで治療を反復してよい。反復投与は、治療の進捗に応じて、増大または減少した量の抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含み得る。その他の投与レジメンも考慮される。

20

【0571】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、1日あたり、または数日にわたって、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上投与する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSV感染の予防もしくは治療および/またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の寛解のために、抗体またはその抗原結合断片の第1の用量、第2の用量、第3の用量、第4の用量、第5の用量、第6の用量、第7の用量、第8の用量、第9の用量、第10の用量の投与後1日もしくは約1日、2日もしくは約2日、3日もしくは約3日、4日もしくは約4日、5日もしくは約5日、6日もしくは約6日、7日もしくは約7日、8日もしくは約8日、9日もしくは約9日、10日もしくは約10日、15日もしくは約15日、20日もしくは約20日、25日もしくは約25日、30日もしくは約30日、35日もしくは約35日または40日もしくは約40日および抗体またはその抗原結合断片のその後の用量の前に、少なくともまたは約1 μg/ml、少なくともまたは約2 μg/ml、少なくともまたは約3 μg/ml、少なくともまたは約4 μg/ml、少なくともまたは約5 μg/ml、少なくともまたは約6 μg/ml、少なくともまたは約7 μg/ml、少なくともまたは約8 μg/ml、少なくともまたは約9 μg/ml、少なくともまたは約10 μg/ml、少なくともまたは約15 μg/ml、少なくともまたは約20 μg/ml、少なくともまたは約25 μg/ml、少なくともまたは約30 μg/ml、少なくともまたは約40 μg/ml、少なくともまたは約50 μg/ml、少なくともまたは約60 μg/ml、少なくともまたは約70 μg/ml、少なくともまたは約80 μg/ml、少なくともまたは約90 μg/ml、少なくともまたは約100 μg/mlの血清力価を達成するのに有効な量で、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上投与する。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSV感染の予防もしくは治療および/またはRSV感染の1種もしくは複数の症状の寛解のために、抗体またはその抗原結合断片の第4の用量の投与後1日もしくは約1日、2日もしくは約2日、3日もしくは約3日、4日もしくは約4日、5日もしくは約5日、6日もしくは約6日、7日もしくは約7日、8日もしくは約8日、9日もしくは約9日、10日もしくは約10日、15日もしくは約15日、20日もしくは約20日、25日もしくは約25日、30日もしくは約30日、35日もしくは約35日または40日もしくは約40日および

30

40

50

抗体またはその抗原結合断片のその後の用量の前に、少なくともまたは約 $72 \mu\text{g}/\text{ml}$ の血清力価を達成するのに有効な量で、4回投与する。

【0572】

いくつかの例では、抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、一連の2回以上の投与において投与し、ここで、投与は、選択された期間、間隔を置いている。いくつかの例では、選択された期間は、少なくとももしくはは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1ヶ月、2ヶ月または3ヶ月である。

【0573】

いくつかの例では、本明細書において提供される予防的に有効な量の抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSVの季節の直前に1回または複数回投与する。いくつかの例では、本明細書において提供される予防的に有効な量の抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSVの季節の直前に1回または複数回および／またはRSVの季節の間に1回または複数回投与する。

【0574】

特定の投与量または投与レジメンの治療効力も、例えば、1回または複数回用量の抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与の前後の対象におけるウイルス力価の測定によって評価できる。投与量および／または投与の頻度は、所望の、対象におけるウイルスのクリアランスの速度に応じて変更してよい。

【0575】

当業者には理解されるであろうが、最適治療レジメンは変動し、1回または複数回の治療サイクルの前後に、治療中の疾患の状態および患者の全身の健康を評価して、最適治療投与量および投与の頻度を決定することは治療法の範囲内である。任意の特定の対象には、特定の投与レジメンを、個々の必要性および医薬製剤の投与を施しているか、または監督している人の専門家としての判断に応じて経時的に調整できること、および本明細書に示される投与量は、単に例示的なものであり、その範囲を制限しようとするものではないということはさらに理解されるべきである。疾患または状態、例えば、ウイルス感染（例えば、RSVウイルス感染）の治療のために投与される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の量は、標準臨床技術によって決定できる（例えば、ウイルス力価または抗原検出アッセイ）。さらに、インビトロアッセイおよび動物モデルを使用して、最適投与量範囲の同定を補助できる。このようなアッセイは、ヒトなどの対象への投与に外挿できる投与量の範囲を提供し得る。動物モデルに基づいて最適投与量範囲を同定する方法は、当業者によく知られている。

【0576】

3. 投与経路

【0577】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、例えば、全身投与または局所投与を含めた、ポリペプチドの投与のための当技術分野で公知の任意の方法によって対象に投与してよい。抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、非経口（例えば、皮内、筋肉内の、腹腔内、静脈内の、皮下または腔内）、局所、硬膜外または粘膜に（例えば、鼻腔内または経口）などの経路によって投与できる。抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、局所または経皮作用の発揮のために疾患の部位で対象に外部から投与してもよい。抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する組成物は、任意の都合のよい経路、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮もしくは皮膚粘膜層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸管粘膜）を通る吸収によって投与してよい。抗RSV抗体または抗原結合断片を含有する組成物は、その他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与してよい。投与様式は、RSVウイルスなどのウイルスに感染している、それで汚染されているまたはそれと関連している流体、細胞または組織と接触することになるかもしれない身体の領域中または領域の周囲への組成物の局所投与またはその他の投与を含み得る。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、肺などの標的臓器へ直接デリバリーするための局所経路またはエアゾール経路によって（例えば、肺のエアゾールによ

て) 投与してよい。いくつかの例では、提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、ポンプによって [例えば、Langer (1990) Science 249:1527-1533 ; Sefton (1987) C RC Crit. Ref. Biomed. Eng.14:20 ; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507 ; および Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574参照のこと] または当技術分野で公知であり、本明細書において他の部分で記載される種々のポリマーの使用などによるような放出制御製剤として投与できる。いくつかの例では、放出制御または徐放系を治療標的、例えば、肺の近くに配置してもよく、したがって、全身用量のごく一部しか必要としない [例えば、Goodson、in Medical Applications of Controlled Release, 前掲, vol. 2, pp . 115-138(1984)参照のこと] 。

【0578】

特定の例では、提供された抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、肺デリバリーによって投与する (例えば、米国特許 6, 019, 968 号、同 5, 985, 320 号、同 5, 985, 309 号、同 5, 934, 272 号、同 5, 874, 064 号、同 5, 855, 913 号、同 5, 290, 540 号および同 4, 880, 078 号 ; ならびに PCT 公開番号 WO 92 / 19244、WO 97 / 32572、WO 97 / 44013、WO 98 / 31346 および WO 99 / 66903)。肺デリバリーの例示的方法は、当技術分野で公知であり、これとして、それだけには限らないが、吸入器などのエアゾール法 (例えば、加圧定量吸入器 (MDI)、ドライパウダー吸入器 (DPI)、噴霧器 (例えば、ジェットまたは超音波噴霧器) およびその他の単回呼吸液体系)、気管内点滴および吹送が挙げられる。いくつかの例では、肺デリバリーは、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を含有する共製剤 (c o o - f o r m u l a t i o n) ならびに、例えば、界面活性剤などの透過促進剤、脂肪酸、糖類、キレート化剤およびプロテアーゼ阻害剤などの酵素阻害剤の同時投与または投与によって増強できる。

【0579】

当業者ならば、肺デリバリーなどの適当なデリバリー方法を、抗 R S V 抗体もしくはその抗原結合断片または抗体もしくはその抗原結合断片を含有する医薬組成物の投与量の特性に基づいて選択できる。このような特性として、それだけには限らないが、溶解度、吸湿性、結晶化特性、融点、密度、粘度、流動、安定性および分解プロフィールが挙げられる。

【0580】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、ウイルスに対する粘膜免疫有効性を増大する。したがって、特定の例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、粘膜表面に投与する。例えば、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、経口 (例えば、口内、舌下)、眼への (例えば、角膜、結膜、硝子体内、眼房内 (intra-aqueous) 注射)、鼻腔内への、生殖器への (例えば、膣への)、直腸への、肺への、胃へのまたは腸管への経路などによってデリバリーできる。本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、非経口的になど、全身に、例えば、注射によって、もしくは漸進的注入によって経時的に、または経腸的に (すなわち、消化管) 投与できる。本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片はまた、例えば、液体溶液、ゲル、軟膏、散剤の局所設置または適用 (例えば、気管支鏡またはその他の人工気道を使用する気管内点滴および吹送) によって、または吸入 {例えば、鼻腔スプレー、吸入器 (例えば、加圧定量吸入器 (MDI)、ドライパウダー吸入器 (DPI)、噴霧器 (例えば、ジェットまたは超音波噴霧器) およびその他の単回呼吸液体系} によってなど、局所的に投与できる。投与は、ウイルスに対する曝露に先立って、またはウイルスに対する曝露に続いて達成してよい。

【0581】

4. 併用療法

【0582】

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、疾患または状態の予防および / または治療のために、単独で、または 1 種もしくは複数の治療薬または治

10

20

30

40

50

療と組み合わせて投与できる。例えば、提供された抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、予防のために 1 種または複数の抗ウイルス薬と組み合わせて投与することができる。別の例において、提供された抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、治療呼吸器ウイルス感染などのウイルス感染の処置のために 1 種または複数の抗ウイルス薬と組み合わせて投与できる。いくつかの例では、呼吸器ウイルス感染は、R S V 感染である。抗ウイルス薬は、病原体感染を低減および／または排除するための薬剤または病原体感染の 1 種または複数の症状を軽減する薬剤を含み得る。いくつかの例では、少なくとも 1 種の抗体が、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片である、複数の抗体またはその抗原結合断片（例えば、1 種または複数の抗ウイルス抗体）も、組み合わせて投与できる。いくつかの例では、少なくとも 1 種の抗体が、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片である、複数の抗体を、予防のために組み合わせて投与できる。他の例では、少なくとも 1 種の抗体が、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片である、複数の抗体を、R S V 感染または複数のウイルス感染の処置のために組み合わせて投与できる。いくつかの例では、提供される抗 R S V 抗体を、R S V などのウイルスと結合し、それを中和する 1 種または複数の抗ウイルス抗体と組み合わせて投与できる。いくつかの例では、提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、R S V 感染などのウイルス感染の 1 種または複数の症状を抑制または軽減できる 1 種または複数の抗体と組み合わせて投与できる。いくつかの例では、本明細書において提供される 2 種以上の抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を、組み合わせて投与する。

10

20

【0583】

1 種または複数の (one or more) さらなる薬剤を、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片と同時に、逐次または断続的に投与してもよい。薬剤は、例えば、同一医薬組成物または同一デリバリー方法の一部として、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片と同時に投与してもよい。いくつかの例では、薬剤を、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片と同時に投与するが、異なるデリバリー手段によって、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片と同時に投与してもよい。薬剤はまた、組み合わせた予防上または治療上の効果を有するよう、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の投与とは異なる時間であるが、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の投与と十分に近い時間で投与してもよい。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる薬剤を、選択された時間、間隔を置いて、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の投与に続いて、またはそれに先だって投与する。いくつかの例では、時間は、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、1 週、2 週、3 週、1 ヶ月、2 ヶ月または 3 ヶ月である。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる薬剤を複数回投与し、かつ／または本明細書において提供される抗 R S V 抗体もしくはその抗原結合断片を複数回投与する。

30

【0584】

いくつかの例では、組合せの投与は、R S V 感染の罹患率を、組合せの不在下での R S V 感染の罹患率に対して、少なくとももしくは約 99 %、少なくとももしくは約 95 %、少なくとももしくは約 90 %、少なくとももしくは約 85 %、少なくとももしくは約 80 %、少なくとももしくは約 75 %、少なくとももしくは約 70 %、少なくとももしくは約 65 %、少なくとももしくは約 60 %、少なくとももしくは約 55 %、少なくとももしくは約 50 %、少なくとももしくは約 45 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくとももしくは約 35 %、少なくとももしくは約 30 %、少なくとももしくは約 25 %、少なくとももしくは約 20 %、少なくとももしくは約 15 % または少なくとももしくは約 10 % 阻害する。いくつかの例では、組合せの投与は、R S V 感染の 1 種または複数の症状の重篤度を、組合せの不在下での R S V 感染の 1 種または複数の症状の重篤度に対して、少なくとももしくは約 99 %、少なくとももしくは約 95 %、少なくとももしくは約 90 %、少なくとももしくは約 85 %、少なくとももしくは約 80 %、少なくとももしくは約 75 %、少なくとももしくは約 70 %、少なくとももしくは約 65 %、少なくとももしくは約 60 %、少なくとももしくは約 55 %、少なくとももしくは約 50 %、少なくとももしくは約 45 %、少なくとももしくは約 40 %、少なくとももしくは約 35 %、少なくとももし

40

50

くは約30%、少なくとももしくはは約25%、少なくとももしくはは約20%、少なくともしくは約15%または少なくともしくは約10%低下させる。

【0585】

いくつかの例では、組合せは、RSVの、その宿主細胞受容体との結合を、組合せの不在下でのRSVのその宿主細胞受容体との結合と比較して、少なくともしくは約99%、少なくともしくは約95%、少なくともしくは約90%、少なくともしくは約85%、少なくともしくは約80%、少なくともしくは約75%、少なくともしくは約70%、少なくともしくは約65%、少なくともしくは約60%、少なくともしくは約55%、少なくともしくは約50%、少なくともしくは約45%、少なくともしくは約40%、少なくともしくは約35%、少なくともしくは約30%、少なくともしくは約25%、少なくともしくは約20%、少なくともしくは約15%または少なくともしくは約10%阻害する。いくつかの例では、組合せは、RSV複製を、組合せの不在下でのRSV複製に対して、少なくともしくは約99%、少なくともしくは約95%、少なくともしくは約90%、少なくともしくは約85%、少なくともしくは約80%、少なくともしくは約75%、少なくともしくは約70%、少なくともしくは約65%、少なくともしくは約60%、少なくともしくは約55%、少なくともしくは約50%、少なくともしくは約45%、少なくともしくは約40%、少なくともしくは約35%、少なくともしくは約30%、少なくともしくは約25%、少なくともしくは約20%、少なくともしくは約15%または少なくともしくは約10%阻害する。

【0586】

RSV感染もしくはその1種もしくは複数の症状の予防、管理、治療もしくは寛解にとって、有用であると分かっているか、または使用されるか、もしくは使用されている任意の治療を、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用できる[RSV感染またはその1種もしくは複数の症状を予防、治療、管理または寛解するために使用されてきた治療(例えば、予防薬または治療薬)に関する情報については、例えば、Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M. D. et al. (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, N.J., 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996参照のこと]。このような薬剤の例として、それだけには限らないが、免疫調節薬、抗炎症薬[例えば、アドレノコルチコイド、副腎皮質ステロイド(例えば、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルチカゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン)、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド系抗炎症薬(例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナクおよびCOX-2阻害剤)]、鎮痛剤、ロイコトリエンおよびアゴニスト(例えば、モンテルカスト、メチルキサンチン、ザフィルルカストおよびジレウトン)、 β 2-アゴニスト[例えば、バンブテロール、ビトルテロール、クレンプテロール、フェノテロール、フォルモテロール、インダカテロール、イソエタリン、メタプロテレノール、ビルブテロール、プロカテロール、レプロテロール、リミテロール、サルブタモール(アルブテロール、ベントリン)、レボサルブタモール、サルメテロール、ツロブテロールおよびテルブタリン]などの気管支拡張剤および抗コリン作用薬(例えば、臭化イプラトロピウムおよび臭化オキシトロピウム)、スルファサラジン、ペニシラミン、ダブソン、抗ヒスタミン薬、抗マラリア薬(例えば、ヒドロキシクロロキン)および抗ウイルス薬が挙げられる。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、RSV感染の治療のために、それだけには限らないが、免疫グロブリンの静脈内注入を施すこと、酸素および液体補給または補助された呼吸を施すことをはじめとする1種または複数の治療と組み合わせて投与できる。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、それだけには限らないが、グルココルチコイド、PPAR γ リガンドおよび血管内皮細胞増殖因子(VEG

10

20

30

40

50

F)などの肺成熟および肺サーファクタントタンパク質発現を調節する1種または複数の薬剤と組み合わせて投与できる。

【0587】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片との併用療法のために選択できる例示的抗ウイルス薬として、それだけには限らないが、抗ウイルス化合物、抗ウイルス性タンパク質、抗ウイルス性ペプチド、抗ウイルス性タンパク質コンジュゲートおよび抗ウイルス性ペプチドコンジュゲートが挙げられ、それだけには限らないが、ヌクレオシド類似体、ヌクレオチド類似体、免疫調節物質（例えば、インターフェロン）および免疫賦活薬を含む。抗体ならびに／または本明細書とともに提供される抗RSV抗体および抗原結合断片を使用する併用療法は、その他の抗RSV抗体ならびに抗RSV抗体および抗原結合断片を用いる、抗体ならびに／または本明細書において提供される抗RSV抗体および抗原結合断片との組合せと同様に考慮される。

10

【0588】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与できる、ウイルス感染の治療のための例示的抗ウイルス薬として、それだけには限らないが、アシクロビル、ファムシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビル、バラシクロビル、バルガンシクロビル、イドクスウリシン、トリフルリジン、ブリブジン、シドホビル、ドコサノール、ホミビルセン、ホルカルネット、トロマンタジン、イミキモド、ポドフィロトキシン、エンテカビル、ラミブジン、テルビブジン、クレブジン、アデホビル、テノホビル、ボセプレビル (boceprevir)、テラプレビル、プレコナリル、アルビドール (arbidol)、アマンタジン、リマンタジン、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、イノシン、インターフェロン（例えば、インターフェロン $\alpha-2b$ 、Pegインターフェロン $\alpha-2a$ ）、リバビリン／タリバビリン (taribavirin)、アバカビル、エムトリシタビン、ラミブジン、ジダノシン、ジドブジン、アプリシタビン (apricitabine)、スタンピジン (stampidine)、エルブシタビン (elvucitabine)、ラシビル (racivir)、アムドキシビル、スタブジン、ザルシタビン、テノホビル、エファビレンツ、ネビラピン、エトラビリン、リルピビリン (rilpivirine)、ロビリド (loviride)、デラビルジン、アタザナビル、ホスアンプレナビル、ロピナビル、ダルナビル、ネルフィナビル、リトナビル、サキナビル、チプラナビル、アンプレナビル、インジナビル、エンフビルチド、マラビロク、ビクリビロク、PRO140、イバリズマブ、ラルテグラビル、エルビテグラビル (elvitegravir)、ベビリマット (bevirimat)、ビベコン (vivecon) が挙げられ、その互変異性形態、類似体、異性体、多形、溶媒和物、誘導体または塩を含む。

20

30

【0589】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与できる、RSV感染症の予防および／または治療のための例示的抗ウイルス薬として、それだけには限らないが、リバビリン、NIH-351 (Gemini Technologies)、組換えRSVワクチン (Aviron)、RSVf-2 (Intracel)、F-50042 (Pierre Fabre)、T-786 (Trimeris)、VP-36676 (ViroPharma)、RFI-641 (American Home Products)、VP-14637 (ViroPharma)、PFP-1およびPFP-2 (American Home Products)、RSVワクチン (Avant Immunotherapeutics)、F-50077 (Pierre Fabre) およびその他の抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

40

【0590】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片はまた、細胞粘膜免疫などの1種または複数の細胞性免疫を刺激できる薬剤と組み合わせて投与できる。細胞性免疫を刺激できる任意の薬剤を使用してよい。例示的免疫刺激薬として、それだけには限らないが、インターフェロン（例えば、IFN- α 、 β 、 γ 、 ω ）などのサイトカイン、リンホカインおよび例えば、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）などの造血成長因子、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-3 (IL

50

ー 3)、インターロイキンー 4 (IL-4)、インターロイキンー 7 (IL-7)、インターロイキンー 10 (IL-10)、インターロイキンー 12 (IL-12)、インターロイキンー 14 (IL-14) および腫瘍壊死因子 (TNF) が挙げられる。

【0591】

抗病原体剤との併用療法のための、このような化合物の投与のための投与量は、当技術分野で公知であり、公知の臨床因子（例えば、対象の種、大きさ、体表面積、年齢、性別、免疫能力および全身の健康、投与期間および投与経路、疾患の種類および段階およびその他の抗病原体剤などのその他の治療が同時に投与されているかどうか）に従って当業者によって決定され得る。

【0592】

a. 併用療法のための抗ウイルス抗体

【0593】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片は、1 種または複数のさらなる抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与できる。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、抗ウイルス抗体である。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、ウイルス抗原と結合する。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、ウイルスカプシドタンパク質またはウイルスエンベロープタンパク質などの表面タンパク質であるウイルス抗原と結合する。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、感染細胞の表面に発現されるウイルス抗原と結合する。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、細胞内（すなわち、感染細胞内）に発現されるウイルス抗原と結合する。いくつかの例では、1 種または複数のさらなる抗体は、呼吸器疾患を引き起こすウイルス、それだけには限らないが、RSV、パラインフルエンザウイルス (PIV) またはヒトメタニューモウイルス (hMPV) と結合する。抗体の混合物を含有する組成物もまた、本明細書において提供される。

【0594】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体として、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、合成抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内抗体、一本鎖 Fv (scFv)、一本鎖抗体、Fab 断片、F(ab') 断片、ジスルフィド結合 Fv (sdFv) および抗イデオタイプ (抗 Id) 抗体（例えば、本明細書において提供される抗体に対する抗 Id 抗体を含む）および上記のいずれかのエピトープと結合する断片が挙げられる。本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体は、免疫グロブリン分子の任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA および IgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ および IgA₂）またはサブクラスのものであり得る。

【0595】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体は、鳥類および哺乳類（例えば、ヒト、ネズミ、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリ）をはじめとする任意の動物に由来するものであり得る。通常、本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはより高い多重特異性であり得る。

【0596】

本明細書において提供される抗 RSV 抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための抗体は、例えば、共有結合などによる抗体またはその抗原結合断片への任意の種類の分子の結合によって改変されている誘導抗体を含み得る。例示的抗体またはその抗原結合断片誘導体として、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結によって改変されており、FcRN 受容体に対して

高い親和性を有する異種Fcドメインを含有する抗体が挙げられる（例えば、米国特許第7,083,784号参照のこと）。それだけには限らないが、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化またはツニカマイシンの存在下での合成をはじめとする公知の技術によって任意の数の化学修飾を実施できる。さらに、誘導体は、1個または複数の非古典的アミノ酸を含有し得る。

【0597】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて使用するための1種または複数のさらなる抗体は、抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同時に、逐次または断続的に投与できる。1種または複数のさらなる抗体は、例えば、同一医薬組成物または同一デリバリー方法の一部として、抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同時に投与してよい。いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗体は、抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同時にであるが、異なるデリバリー手段によって、抗RSV抗体またはその抗原結合断片と同時に投与してもよい。1種または複数のさらなる抗体はまた、組み合わせた予防上または治療上の効果を有するよう、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与とは異なる時間であるが、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与と十分に近い時間で投与してもよい。いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗体を、選択された時間で分離された抗RSV抗体またはその抗原結合断片の投与に続いて、またはそれに先だって投与する。いくつかの例では、時間は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1ヶ月、2ヶ月また3ヶ月である。いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗体を複数回投与し、かつ／または本明細書において提供される抗RSV抗体もしくはその抗原結合断片を複数回投与する。

【0598】

i. 抗RSV抗体

【0599】

いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、抗RSV抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を、RSV感染の予防および／または治療のために、1種または複数のさらなる抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与する。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための例示的抗RSV抗体またはその抗原結合断片として、RSVと免疫特異的に結合し、それを中和する抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗RSV抗体またはその抗原結合断片として、RSV Aサブタイプおよび／またはRSV Bサブタイプと免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

【0600】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体または抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、RSV結合タンパク質（例えば、配列番号276に示されるアミノ酸配列を有する）、RSV RNAポリメラーゼβサブユニットラージ構造タンパク質（Lタンパク質）（例えば、配列番号276に示されるアミノ酸配列を有する）、RSVヌクレオカプシドタンパク質（例えば、配列番号277に示されるアミノ酸配列を有する）、RSV核タンパク質（N）（例えば、配列番号278に示されるアミノ酸配列を有する）、RSVホスホプロテインP（例えば、配列番号279に示されるアミノ酸配列を有する）、RSVマトリックスタンパク質（例えば、配列番号280に示されるアミノ酸配列を有する）、RSV小疎水性（SH）タンパク質（例えば、配列番号281に示されるアミノ酸配列を有する）、RSV RNA依存性ポリメラーゼ、RSV Fタンパク質（例えば、配列番号282に示されるアミノ酸配列を有する）、RSV Gタンパク質（例えば、配列番号283に示されるアミノ酸配列を有する）または上記のいずれかの対立遺伝子変異体と結合する抗RSV抗体が挙げられる。特定の例では、1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、RSV Fタンパク質と結合する抗RSV抗体が挙げられる。特定の例では、RSV Fタンパク

質と結合する1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、RSV F糖タンパク質のA、B、C、I、II、IV、VまたはVI抗原部位と結合する〔例えば、Lopez et al. (1998) J. Virol. 72:6922-6928参照のこと〕。

【0601】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、それだけには限らないが、パリビズマブ(SYNAGIS(商標))、モタビズマブ(NUMAX(商標))、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S、(米国特許第5,824,307号および同6,818,216号参照のこと)、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23(米国特許第6,685,942号参照のこと)、RF-1、RF-2(米国特許第5,811,524号参照のこと)またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、パリビズマブ(SYNAGIS(商標))、モタビズマブ(NUMAX(商標))、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1またはRF-2のV_H鎖および／またはV_L鎖のアミノ酸配列を有するV_H鎖および／またはV_L鎖を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、パリビズマブ(Synagis(商標))、モタビズマブ(Numax(商標))、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28R、A4B4-F52S、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1またはRF-2の1種または複数のCDRを含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、それだけには限らないが、MAb1153、1142、1200、1214、1237、1129、1121、1107、1112、1269、1269、1243 [Beeler et al. (1989) J. Virology 63(7):2841-2950]、MAb151 [Mufson et al. (1987) J. Clin. Microbiol. 25:1635-1539]、MAb43-1および13-1 [Fernie et al. (1982) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171:266-271]、MAb1436C、1302A、1308Fおよび1331H [Anderson et al. (1984) J. Clin. Microbiol. 19:934-936]などの抗RSVマウスモノクローナル抗体に由来する1種または複数のCDRを含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。本明細書において提供される抗RSV抗体または抗原結合断片を用いる併用療法のために使用できるさらなる例示的抗体またはその抗原結合断片として、それだけには限らないが、例えば、米国特許第6,413,771号、同5,840,298号、同5,811,524号、同6,656,467号、同6,537,809号、同7,364,742号、同7,070,786号、同5,955,364号、同7,488,477号、同6,818,216号、同5,824,307号、同7,364,737号、同6,685,942号および同5,762,905号ならびに米国特許出願公開第2007-0082002号、同2005-0175986号、同2004-0234528号、同2006-0198840号、同2009-0110684号、同2006-0159695号、同2006-0013824号、同2005-02

10

20

30

40

50

88491号、同2005-0019758号、同2008-0226630号、同2009-0137003号および同2009-0092609号に記載される抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

【0602】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号103、113、122、131、137、144、149、155、161、167、172、176、179、182、186、190、194、198、201、205、210、215、222、226、233、239、246、252、257、362、および366のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_H鎖を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号104、114、123、132、138、145、150、156、162、168、173、187、206、277、232、234、240、247、253、および258のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_Hドメインを含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号105、115、124、363、および367のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列TSGMSVG（配列番号105）、TAGMSVG（配列番号115）、AYAMS（配列番号363）またはGYTMH（配列番号367）を有するV_HCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号106、125、133、157、236、259、364、および368のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列DIWWDDKKDYNPSLKS（配列番号106）、DIWWDDKKHYNPSLKD（配列番号125）、GISGSGDSTDYADSVKG（配列番号364）またはSITGGSNFINYSDSVKG（配列番号368）を有するV_HCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号107、116、126、139、188、241、365、および369のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列SMITNWFYFDV（配列番号107）、DMIFNFYFDV（配列番号126）、HLPDYWNLDYTRFFYYMDV（配列番号365）、またはAPIAPPYFDH（配列番号369）を有するV_HCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

【0603】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号108、117、127、134、140、146、152、158、164、169、174、177、180、183、191、195、199、202、207、211、216、220、223、228、236、242、248、254、260、263、370、374、および378のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_L鎖を含有す

10

20

30

40

50

る抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号109、118、128、135、141、147、153、159、165、170、175、178、181、184、192、196、200、203、208、212、217、221、224、229、237、243、249、255、261および264のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_Lドメインを含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号110、119、129、142、154、166、244、250、265、371、375、および379のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列KCQLSVGYMH（配列番号110）、SASSRVGYMH（配列番号154）、RATQSISSNYLA（配列番号371）、KASQNIINDNLA（配列番号375）またはRATQSVSNFLN（配列番号379）を有するV_LCDR1を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号111、120、136、143、160、171、185、218、225、230、238、245、251、256、262、266、372、376、および380のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列DTSKLAS（配列番号111）、DTLL LDS（配列番号218）、GASN RAT（配列番号372）、GASS RAT（配列番号376）またはDASTSQS（配列番号380）を有するV_LCDR2を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、配列番号112、121、193、373、377、および381のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。特定の例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、アミノ酸配列FQGS GYPFT（配列番号112）、QQYDISPYT（配列番号373）、QQYGGSPYT（配列番号377）、またはQASINTPL（配列番号381）を有するV_LCDR3を含有する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

【0604】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、例えば、RSV過免疫グロブリン[RSV I V I G; RespiGam（登録商標）; MedImmune Inc, Gaithersburg, MD; 例えば、Groothuis et al. (1993) New Eng. J. Med 329:1524-1530参照のこと]などの、抗RSV抗体に対して濃縮された過免疫血清または免疫グロブリンと組み合わせて投与できる。

【0605】

i i. その他の呼吸器ウイルスに対する抗体

【0606】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体として、例えば、抗ヒトメタニューモウイルス(hMPV)抗体、抗パラインフルエンザウイルス(PIV)抗体、抗鳥類ニューモウイルス(APV)抗体または当技術分野で公知のその他の抗ウイルス抗体の中から選択されるRSV以外の呼吸器ウイルスに対する抗体もしくはその抗原

10

20

30

40

50

結合断片が挙げられる。

【0607】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、抗PIV抗体、すなわち、例えば、PIVヌクレオカプシドホスホプロテイン、PIV融合(F)タンパク質、PIVホスホプロテイン、PIVラージ(L)タンパク質、PIVマトリックス(M)タンパク質、PIV血球凝集素ノイラミニダーゼ(HN)糖タンパク質、PIV RNA依存性RNAポリメラーゼ、PIV Y1タンパク質、PIV Dタンパク質、PIV Cタンパク質または上記のいずれかの対立遺伝子変異体などのPIV抗原と免疫特異的に結合する抗体である。特定の例では、PIV抗原は、PIV Fタンパク質である。いくつかの例では、抗PIV抗体は、ヒトPIV1型、ヒトPIV2型、ヒトPIV3型および／またはヒトPIV4型の抗原と免疫特異的に結合する抗体である。

10

【0608】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を用いる併用療法のための1種または複数のさらなる抗ウイルス抗体は、抗hMPV抗体、すなわち、例えば、hMPV核タンパク質、hMPVホスホプロテイン、hMPVマトリックスタンパク質、hMPV小疎水性タンパク質、hMPV RNA依存性RNAポリメラーゼ、hMPV Fタンパク質、hMPV Gタンパク質または上記のいずれかの対立遺伝子変異体などのhMPV抗原と免疫特異的に結合する抗体である。特定の例では、hMPV抗原は、PIV Fタンパク質である。いくつかの例では、抗hMPV抗体は、hMPV A型および／またはhMPV B型の抗原と免疫特異的に結合する抗体である。いくつかの例では、抗hMPV抗体は、hMPVサブタイプA1および／またはA2および／またはhMPVサブタイプB1および／またはB2の抗原と免疫特異的に結合する抗体である。

20

【0609】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与される抗体は、任意の種類当技術分野で公知の抗体または抗原結合断片であり得る。例えば、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と組み合わせて投与される抗体またはその抗原結合断片として、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、非ヒト抗体、組換えによって製造された抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、細胞内抗体およびそれだけには限らないが、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、Fd断片、Fd'断片、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖Fab(scFab)、ダイアボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体または上記のいずれかの抗原結合断片などの抗体断片が挙げられる。本明細書において提供される抗RSV抗体と組み合わせて投与される抗体として、任意の免疫グロブリン種(例えば、IgG、IgM、IgD、IgE、IgAおよびIgY)、任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラス(例えば、IgG2aおよびIgG2b)のメンバーを挙げることができる。

30

【0610】

いくつかの例では、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せの投与は、RSV感染の罹患率を、抗RSV抗体または抗原結合断片の不在下でのRSV感染の罹患率に対して少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%阻害する。いくつかの例では、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せの投与は、RSV感染の1種または複数の

40

50

症状の重篤度を、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せの存在下でのRSV感染の1種または複数の症状の重篤度に対して少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%低下させる。

【0611】

いくつかの例では、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せは、RSVの、その宿主細胞受容体との結合を、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せの不在下でのRSVのその宿主細胞受容体との結合と比較して、少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%阻害する。いくつかの例では、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せは、RSV複製を、抗ウイルス抗体または抗原結合断片の組合せの不在下でのRSV複製に対して少なくとももしくは約99%、少なくとももしくは約95%、少なくとももしくは約90%、少なくとももしくは約85%、少なくとももしくは約80%、少なくとももしくは約75%、少なくとももしくは約70%、少なくとももしくは約65%、少なくとももしくは約60%、少なくとももしくは約55%、少なくとももしくは約50%、少なくとももしくは約45%、少なくとももしくは約40%、少なくとももしくは約35%、少なくとももしくは約30%、少なくとももしくは約25%、少なくとももしくは約20%、少なくとももしくは約15%または少なくとももしくは約10%阻害する。

【0612】

5. 遺伝子療法

【0613】

いくつかの例では、抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする配列を含む核酸を投与して、遺伝子療法によって、RSV感染と関連している1種または複数の症状を治療、予防または寛解する。遺伝子療法とは、発現された核酸または発現可能な核酸の対象への投与によって実施される治療を指す。この例では、核酸は、そのコードされる抗体またはその抗原結合断片を生成し、これが予防的または治療的効果を媒介する。

【0614】

当技術分野で利用可能な遺伝子療法のための方法のいずれも、抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸の投与のために使用できる。例示的方法を以下に記載する。

【0615】

遺伝子療法の方法の一般的な概説については、例えば、Goldspiel et al. (1993) *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu (1991) *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev (1993) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) *Science* 260:926-932; Morgan and Anderson (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; およびTIBTECH 11(5):155-215を参照のこと。使用できる組換えDNA技術の技術分野で一般に知られる方法は、Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。

【0616】

いくつかの例では、本明細書において提供される組成物は、抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸を含有し、これでは、核酸は、適した宿主において、抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、抗体コーディング領域と機能し得る形で連結されている異種プロモーターなどのプロモーターを有し、前記プロモーターは誘導可能か、または構成的であり、所望により、組織特異的である。別の特定の実施形態では、抗体コード配列および任意のその他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域によってフランキングされており、したがって、抗体をコードする核酸の染色体内発現を提供する核酸分子を使用する [Koller and Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al. (1989) Nature 342:435-438]。いくつかの例では、発現された抗体分子は、一本鎖抗体である。いくつかの例では、核酸配列は、抗体の重鎖および軽鎖またはその断片をコードする配列を含む。特定の例では、核酸配列は、抗RSV Fab断片をコードする配列を含む。特定の例では、核酸配列は、全長抗RSV抗体をコードする配列を含む。いくつかの例では、コードされる抗RSV抗体は、キメラ抗体である。

10

【0617】

対象への核酸のデリバリーは、対象が、核酸または核酸を保持するベクターに対して直接的に曝露される直接、または細胞を、インビトロで核酸を用いて、まず形質転換し、次いで、対象に移植する間接のいずれかであり得る。これら2つのアプローチは、それぞれ、インビボまたはエキソビボ遺伝子療法として知られている。

20

【0618】

いくつかの例では、核酸配列は、インビボで直接的に投与され、そこで、発現され、コードされた生成物を生成する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれかによって、例えば、それらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築することおよびそれを、例えば、欠陥のある、または弱毒化されたレトロウイルスまたはその他のウイルスベクターを使用する感染によって（米国特許第4,980,286号）、または裸のDNAの直接注射によって、または微粒子銃（例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont）、または脂質もしくは細胞表面受容体を用いてコーティングすることもしくは薬剤をトランスフェクトすること、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル中へのカプセル封入の使用によって、またはそれらを、核に入ることが分かっているペプチドと連結して投与することによって、受容体媒介性エンドサイトーシス [例えば、Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432参照のこと] を受けるリガンドと連結して、例えば、受容体を特異的に発現する標的細胞種に投与することによって、それらが細胞内になるように投与することによって達成できる。いくつかの例では、リガンドが、融合性ウイルスペプチドを含有し、エンドソームを破壊する核酸-リガンド複合体が形成され、核酸がリソソーム分解を避けることが可能となり得る。いくつかの例では、特定の受容体をターゲティングすることによって、細胞特異的取り込みおよび発現のために、インビボで核酸をターゲティングできる（例えば、PCT公開番号WO92/06180; WO92/22635; WO92/20316; WO93/14188およびWO93/20221参照のこと）。あるいは、核酸を、細胞内に導入し、相同組換えによって、発現のために宿主細胞DNA内に組み込んでもよい [Koller and Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; およびZijlstra et al. (1989) Nature 342:435-438]。

30

40

【0619】

いくつかの例では、抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸配列を含有するウイルスベクターを使用する。例えば、レトロウイルスベクターを使用できる [例えば、Miller et al. (1993) Meth. Enzymol. 217:581-599参照のこと]。レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みのために必要な成分を含有する。遺伝子療法において使用される抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸配列を、1種または複数のベクター中にクローニ

50

ングし、これによって、対象への遺伝子のデリバリーが容易になる。レトロウイルスベクターについてのより詳細は、例えば、Boesen et al. (1994) *Biotherapy* 6:291-302において見出すことができる。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を示すその他の参考文献として、例えば、Clowes et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein et al. (1994) *Blood* 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg (1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141; および Grossman and Wilson (1993) *Curr. Opin. in Genetics and Development* 3:110-114が挙げられる。

【0620】

アデノウイルスもまた、遺伝子療法において使用できるウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸器上皮へ遺伝子をデリバリーするための特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、呼吸器上皮に天然に感染し、そこで、軽度の疾患を引き起こす。アデノウイルスベースのデリバリー系のその他の標的として、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉が挙げられる。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染できるという利点を有する。Kozarsky and Wilson (1993) *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503に、アデノウイルスベースの遺伝子療法の概説が示されている。Bout et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:3-10は、アカゲザルの呼吸器上皮へ遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用のその他の例は、例えば、Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155; Mastrangeli et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:225-234; PCT公開WO 94/12649; および Wang et al. (1995) *Gene Therapy* 2:775-783に見出すことができる。特定の例では、アデノウイルスベクターを使用して、本明細書において提供される抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸をデリバリーする。

【0621】

アデノ随伴ウイルス (AAV) もまた、遺伝子療法において使用できる [Walsh et al. (1993) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300; および米国特許第5,436,146号]。特定の例では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使用して、本明細書において提供される抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸をデリバリーする。

【0622】

遺伝子療法の別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクションまたはウイルス感染といった方法によって、組織培養において遺伝子を細胞に移入することを含む。一般に、移入する方法は、細胞への選択マーカーの移入を含む。次いで、細胞を選択下におき、取り上げられ、移入された遺伝子を発現する細胞を単離する。次いで、遺伝子を発現する細胞を対象にデリバリーする。

【0623】

いくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸を、細胞に導入し、その後、得られた組換え細胞をインビボで投与する。このような導入は、それだけには限らないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターを用いる感染、細胞融合、染色体媒介性遺伝子導入、マイクロセル媒介性遺伝子導入およびスフェロプラスト融合をはじめとする当技術分野で公知の任意の方法によって実施できる。外来遺伝子を細胞に導入するための多数の技術が当技術分野で公知であり [例えば、Loeffler and Behr (1993) *Meth. Enzymol.* 217:599-618; Cohen et al. (1993) *Meth. Enzymol.* 217:618-644; Cline (1985) *Pharmacol. Ther.* 29:69-92参照のこと]、レシピエント細胞の必要な発達および生理学的機能が破壊されないならば、本明細書において提供される抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸の投与のために使用できる。技術は、細胞への核酸の安定な移入を提供し、その結果、核酸は、細胞によって発現可能であり、通常、遺伝的であり、その細胞後代によって発現可能である。

【0624】

得られた組換え細胞は、当技術分野で公知の種々の方法によって対象にデリバリーできる。組換え血液細胞（例えば、造血幹または前駆細胞）を、静脈内に投与してよい。投与のための細胞量は、例えば、所望の予防的および／または治療的効果および患者の状態をはじめとする種々の因子に応じて変わり、当業者によって決定され得る。

【0625】

遺伝子療法を目的として、核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の利用可能な細胞種を包含し、これとして、それだけには限らないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；種々の幹または前駆細胞、特に、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血および胎児肝臓から得られるような造血幹または前駆細胞が挙げられる。特定の例では、遺伝子療法のために使用される細胞は、対象にとって自己である。

10

【0626】

遺伝子療法において組換え細胞を使用するいくつかの例では、本明細書において提供される抗RSV抗体、その抗原結合断片および／または誘導体をコードする核酸配列を、それらが細胞またはその後代によって発現可能であるように細胞に導入し、次いで、治療効果のために組換え細胞をインビボで投与する。特定の例では、幹または前駆細胞を使用する。インビトロで単離および維持できる任意の幹および／または前駆細胞を使用できる〔例えば、PCT公開WO 94/08598；Stemple and Anderson (1992) Cell 71:973-985；Rheinwald (1980) Meth. Cell Bio. 21A:229；およびPittelkow and Scott (1986) Mayo Clinic Proc. 61:771参照のこと〕。

20

【0627】

特定の例では、遺伝子療法を目的として導入される核酸は、核酸の発現が、適当な転写の誘導物質の有無を制御することによって制御可能であるようにコーディング領域と機能し得る形で連結されている誘導プロモーターを含有する。

【0628】

J. 医薬組成物、組合せおよび製造品／キット

【0629】

1. 医薬組成物

30

【0630】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する医薬組成物が、本明細書において提供される。医薬組成物は、治療的、予防的および／または診断的適用に使用できる。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、医薬上許容される担体または希釈液とともに製剤され得る。一般に、このような医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片の生物学的特性、例えば、その特異的エピトープとの結合（例えば、RSV Fタンパク質上のエピトープとの結合）を大幅に損なわない成分を利用する。各成分は、その他の成分と適合しており、患者にとって有害ではないという意味で医薬上および生理学上許容される。製剤は、それだけには限らないが、錠剤、丸剤、散剤、液体溶液または懸濁液（例えば、注射用、摂取用および局所製剤（例えば、点眼薬、ゲルまたは軟膏）を含む）、エアゾール（例えば、鼻腔スプレー）、リポソーム、坐剤、注射用および不溶解性溶液および徐放形態をはじめとする、単位投与形で提示され得、薬学の技術分野で周知の方法によって調製され得ることが好都合である。例えば、Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press；およびRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990)、Mack Publishing Co., Easton, Pa.；Avis, et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, NY；Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, NY；およびLieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, NY参照のこと。全身に投与される場合には、治療用組成物は、無菌であり、発熱物質不含であり、一

40

50

般に、微粒子状物質を含まず、pH、等張性および安定性を十分に考慮した非経口的に許容される溶液中にある。これらの条件は、当業者には公知である。非経口的に投与可能な組成物を調製する方法は、当業者には周知であるか、明らかとなり、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Formerly Remington's Pharmaceutical Sciences)」, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)により詳細に記載されている。

【0631】

本明細書において提供される医薬組成物は、種々の形態で、例えば、固体、半固体、液体、粉末、水性または凍結乾燥した形態であり得る。適した薬剤担体の例は、当技術分野で公知であり、中でも、それだけには限らないが、水、緩衝剤、生理食塩水溶液、リン酸緩衝生理食塩水溶液、種々の種類の湿潤剤、滅菌溶液、アルコール、アラビアガム、植物油、ベンジルアルコール、ゼラチン、グリセリン、炭水化物、例えば、ラクトース、スクロース、アミロースまたはデンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、粉末が挙げられる。本明細書において提供される医薬組成物は、例えば、抗酸化剤、保存料、抗菌薬、鎮痛薬、結合剤、崩壊剤、着色剤、希釈剤、賦形剤、増量剤、流動促進剤、可溶化剤、安定化剤、等張化剤、媒体(vehicle)、粘性剤、香味剤、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、乳化剤および沈殿防止剤、溶媒および結晶性セルロース、微晶質セルロース、クエン酸、デキストリン、デキストロース、液状グルコース、乳酸、ラクトース、塩化マグネシウム、メタリン酸カリウム、デンプンなどの種々の成分をはじめとするその他の添加物を含有し得る〔一般に、Alfonso R. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins参照のこと〕。このような担体および／または添加剤は、従来の方法によって製剤でき、適した用量で対象に投与できる。脂質などの安定化剤、ヌクレアーゼ阻害剤、ポリマーおよびキレート化剤は、組成物を体内での分解から保存し得る。

【0632】

使用するのに適した医薬組成物として、1種または複数の抗RSV抗体が、その意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物が挙げられる。治療上有効な量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。治療上有効な投与量は、本明細書において記載されるインビトロおよびインビボ法を使用することによって決定できる。したがって、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、医薬品中では、投与のために単位用量形態で存在し得る。

【0633】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、保存のために凍結乾燥し、使用前に適した担体中で再構成してもよい。この技術は、従来の免疫グロブリンおよびタンパク質調製物に関して有効であることがわかっており、当技術分野で公知の凍結乾燥および再構成技術を使用できる。

【0634】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、制御放出または徐放組成物として提供できる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片の制御放出または徐放を達成できる丸剤およびカプセル剤の製剤用のポリマー材料は、当技術分野で公知である〔例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas (1983) J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61参照のこと; Levy et al. (1985) Science 228:190; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105; 米国特許第5,679,377号、同5,916,597号、同5,912,015号、同5,989,463号、同5,128,326号; PCT公開番号WO99/15154およびWO99/2

0253も参照のこと]。徐放製剤において使用されるポリマーの例として、それだけには限らないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセタート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルが挙げられる。一般に、徐放製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、浸出可能な不純物を含まず、保存に対して安定であり、無菌であり、生分解性である。徐放製剤の製造のための当技術分野で公知の任意の技術を使用して、本明細書において提供される1種または複数の抗RSV抗体または抗原結合断片を含有する徐放製剤を製造できる。

10

【0635】

いくつかの例では、医薬組成物は、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と、1種または複数のさらなる抗体とを含有する。いくつかの例では、1種または複数のさらなる抗体として、それだけには限らないが、パリビズマブ(SYNAGIS(登録商標))およびその誘導体、例えば、それだけには限らないが、モタビズマブ(NUMAX(登録商標))、AFFF、P12f2、P12f4、P11d4、A1e9、A12a6、A13c4、A17d4、A4B4、A8c7、1X-493L1、FRH3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF(1)、6H8、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1h5、A4B4(1)、A4B4L1FR-S28RおよびA4B4-F52S(米国特許第5,824,307号および同6,818,216号参照のこと)、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19、rsv21、rsv22、rsv23(例えば、米国特許第5,824,307号、同6,685,942号および同6,818,216号)、ヒト抗RSV抗体、例えば、それだけには限らないが、rsv6、rsv11、rsv13、rsv19(すなわち、Fab19)、rsv21、rsv22、rsv23、RF-1、RF-2(例えば、米国特許第6,685,942号および同5,811,524号参照のこと)、抗RSVマウスモノクローナル抗体に由来するヒト化抗体、例えば、それだけには限らないが、MAb1153、1142、1200、1214、1237、1129、1121、1107、1112、1269、1269、1243[Beeler et al. (1989) J. Virology 63(7):2841-2950]、MAb151[Mufson et al. (1987) J. Clin. Microbiol. 25:1635-1539]、MAb43-1および13-1[Fernie et al. (1982) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171:266-271]、MAb1436C、1302A、1308Fおよび1331H[Anderson et al. (1984) J. Clin. Microbiol. 19:934-936]またはそれらのその抗原結合断片が挙げられる。本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含有する医薬組成物において使用され得るさらなる例示的抗体またはその抗原結合断片として、それだけには限らないが、例えば、米国特許第6,413,771号、同5,840,298号、同5,811,524号、同6,656,467号、同6,537,809号、同7,364,742号、同7,070,786号、同5,955,364号、同7,488,477号、同6,818,216号、同5,824,307号、同7,364,737号、同6,685,942号および同5,762,905号ならびに米国特許出願公開第2007-0082002号、同2005-0175986号、同2004-0234528号、同2006-0198840号、同2009-0110684号、同2006-0159695号、同2006-0013824号、同2005-0288491号、同2005-0019758号、同2008-0226630号、同2009-0137003号および同2009-0092609号に記載される抗RSV抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

20

30

40

【0636】

2. 製造品/キット

【0637】

50

抗 R S V 抗体または抗 R S V 抗体をコードする核酸またはその誘導体もしくは生物学的に活性な部分の医薬組成物を、パッケージング物質と、R S V 媒介性疾患もしくは障害の予防（すなわち、ワクチン接種、受動免疫）および／または治療にとって有効である医薬組成物と、抗体もしくは核酸分子が、疾患もしくは障害のワクチン接種および／または治療のために使用されることを示す標識とを含有する製造品としてパッケージングできる。医薬組成物は、単回用量または複数回用量のための一定量の医薬組成物を含有する単位投与形でパッケージングできる。パッケージングされた組成物は、提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を含有する医薬組成物の凍結乾燥粉末を含有してもよく、これは、投与の前に再構成できる（例えば、水または生理食塩水を用いて）。

【0638】

10

本明細書において提供される製造品は、パッケージング物質を含有する。医薬製剤のパッケージングにおいて使用するためのパッケージング物質は、当業者に周知である。薬剤パッケージング物質の例として、それだけには限らないが、ブリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、吸入器（例えば、加圧定量吸入器（MDI）、ドライパウダー吸入器（DPI）、噴霧器（例えば、ジェットまたは超音波噴霧器）およびその他の単回呼吸液体系）、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ、ボトルおよび選択された製剤および意図される投与様式および治療様式に適した任意のパッケージング物質が挙げられる。医薬組成物はまた、感染からの避妊のために使用されるバリアまたはその他の保護装置に組み込むことができる、それに適用できる、またはそれにコーティングできる。

【0639】

20

本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片、その抗体をコードする核酸分子、医薬組成物または組合せはまた、キットとして提供され得る。キットは、所望により、使用のための説明書、装置およびさらなる試薬（例えば、組成物の希釈および／または凍結乾燥タンパク質の再構成のための滅菌水または生理食塩水溶液）などの 1 種または複数の成分と、方法を実施するための、チューブ、容器およびシリンジなどの成分とを含み得る。例示的キットは、本明細書において提供される抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を含むことができ、所望により、使用のための説明書、対象に抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を投与するための装置、対象において、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を検出するための装置、対象から得られたサンプルにおいて、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を検出するための装置および対象にさらなる治療薬を投与するための装置を含み得る。

30

【0640】

キットは、所望により、説明書を含み得る。説明書は、通常、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片、所望により、キットに含まれるその他の成分および抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片を投与するための、対象の適切な状態、適切な投与量、投与レジメンおよび適切な投与法を決定する方法を含めた投与する方法を説明する有形の表現を含む。説明書はまた、治療時間の期間にわたって対象をモニタリングするためのガイダンスを含み得る。

【0641】

キットはまた、診断のための本明細書に記載される医薬組成物および品目を含み得る。例えば、このようなキットは、対象において選択された抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片の濃度、量または活性を測定するための品目を含み得る。

40

【0642】

いくつかの例では、抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片は、単離された生体サンプル（例えば、対象から得られた血液、痰、洗浄、肺挿管サンプル、唾液、尿またはリンパなどの液体サンプル）において R S V を検出するための診断キットにおいて提供される。いくつかの例では、診断キットは、1 種または複数の抗 R S V 抗体またはその抗原結合断片および／または 1 種または複数の対照抗体（すなわち、非 R S V 結合抗体）のパネルを含有し、これでは、パネル中の 1 種または複数の抗体は、本明細書において提供される抗 R S V 抗体または抗原結合断片である。

50

【0643】

本明細書において提供されるキットはまた、対象に抗RSV抗体またはその抗原結合断片を投与する装置も含み得る。対象に医薬を投与するための当技術分野で公知の種々の装置のいずれも、本明細書において提供されるキットに含まれ得る。例示的装置として、それだけには限らないが、吸入器（例えば、加圧定量吸入器（MDI）、ドライパウダー吸入器（DPI）、噴霧器（例えば、ジェットまたは超音波噴霧器）およびその他の単回呼吸液体系）、皮下針、静脈針、カテーテルおよび点眼器などの液体ディスペンサーが挙げられる。通常、キットの抗RSV抗体またはその抗原結合断片を投与するための装置は、抗RSV抗体またはその抗原結合断片の所望の投与方法と適合する。例えば、肺投与によってデリバリーされる抗RSV抗体またはその抗原結合断片は、吸入器または噴霧器とともに、または吸入器または噴霧器中に含有されてキット中に含まれ得る。

10

【0644】

3. 組合せ

【0645】

本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片と、第2の抗RSV抗体もしくはその抗原結合断片またはその他の治療薬または診断薬などの第2の薬剤との組合せが提供される。組合せは、本明細書において提供される方法に従って、その治療を達成するための任意の抗RSV抗体またはその抗原結合断片または試薬を含み得る。例えば、組合せは、任意の抗RSV抗体またはその抗原結合断片と、抗ウイルス薬とを含み得る。組合せはまた、1種または複数のさらなる治療用抗体とともに、本明細書において提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片を含み得る。提供される抗RSV抗体またはその抗原結合断片の組合せはまた、抗RSV抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において記載される抗RSV抗体もしくはその抗原結合断片をコードする核酸を含有する宿主細胞を含有する医薬組成物を含有し得る。本明細書において提供される組合せは、単一組成物として、または別個の組成物において製剤できる。

20

【実施例】

【0646】

K. 実施例

【0647】

以下の実施例は、単に例示目的で含まれるものであって、本発明の範囲を制限しようとするものではない。

30

【0648】

例1

RSV Fタンパク質の発現

【0649】

この実施例では、呼吸器合胞体ウイルスA2株由来のRSV融合タンパク質（Fタンパク質）を発現させ、融合糖タンパク質のF0およびF1サブユニットの両方を認識する抗RSVモノクローナル抗体クローン2F7を使用してELISAプレート上で捕獲することによって精製した。第1の実施例では、組換えRSV Fタンパク質をクローニングし、293F細胞において発現させた。第2の実施例では、HEp-2細胞をRSV A2株に感染させることによって、天然RSV Fタンパク質を発現させた。

40

【0650】

A. 組換えRSV Fタンパク質

【0651】

この実施例では、A2 RSV株由来のRSV Fタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、発現させた。細胞外ドメインのみを含有するRSV A2 F遺伝子（配列番号21）を、GeneArt（Burlingame, CA）によって標準DNA合成プロトコールに従って合成した。RSV A2 F遺伝子を、Kozak配列（配列番号21のヌクレオチド7～16）、c-myc配列（配列番号21のヌクレオチド1600～1629）および6X-Hisタグ（配列番号21のヌクレオチド1645～417）を含有するよう操作した

50

。さらに、発現ベクターへのクローニングを可能にするために、Nhe I（配列番号22）およびHind III（配列番号23）制限部位を、それぞれ、5'および3'末端に操作した。標準分子生物学技術を使用してDNAを消化し、同様に消化した哺乳類発現ベクター-pcDNA（商標）3.1/myc-His（-）C（配列番号24、Invitrogen）中にライゲーションした。RSV A2 F遺伝子を含有するベクターを、エレクトロコンピテントXL1-Blue細胞（Stratagene）中に形質転換した。個々のコロニーを選択し、増殖させ、プラスミドDNAを精製した。単離されたベクター中のRSV A2 F遺伝子インサートの存在を、DNA塩基配列決定法によって確認し、インサートを含有するクローンを使用して、DNAの大規模調製物を製造した（Megaprepキット、Qiagen）。

【0652】

RSV A2 Fタンパク質を、製造業者の説明書に従って、FreeStyle（商標）293発現系（Invitrogen）を使用して哺乳類細胞において発現させた。手短には、 3×10^7 個の細胞を、30 μ gのRSV A2 F/pcDNA3.1/myc-His（-）CプラスミドDNAおよび5 μ gのpAdVantage（Promega）とともに同時トランスフェクトし、37℃で72時間インキュベートした。細胞を、遠心分離によってペレットにし、3mLの冷溶解バッファー（300mM NaCl、50mM NaH₂PO₄、1%Triton X-100、Complete（商標）プロテアーゼ阻害薬カクテル（カタログ番号sc-29131、Santa Cruz）、pH8）を、 3×10^7 個のRSV Fトランスフェクトされた293-F細胞ごとに加えた。混合物を、4℃で30分間振盪させ、続いて、14,000rpm、4℃で30分間遠心分離した。清澄化された上清を、新しいチューブに移し、使用の準備まで-80℃で凍結させた。ELISAプレート上での捕獲に先立って、上清を解凍し、短時間遠心分離し、0.8%脱脂粉乳（0.4%脱脂粉乳の終濃度）を含有するPBSを用いて1:1v/v希釈した。

【0653】

B. 天然(native) RSV Fタンパク質

【0654】

この実施例では、RSV A2株由来の天然RSV Fタンパク質（配列番号382）を、以下のように、RSVに感染したHEp-2細胞から精製した。手短には、HEp-2細胞を、完全EMEM（ATCC30-2003；10%FBS、1%L-グルタミンおよび1%pen-Strepを含有）を使用して10層細胞培養スタッカー（Corning3270）に播種し、37℃および5%CO₂でインキュベートした。細胞が80%コンフルエンスに達すると、HEp-2単層を、RSV A2ウイルス（ATCC VR-1540）に、0.01~0.1の多重感染度（MOI）で感染させた。感染細胞を、明らかな細胞合胞体が観察されるまで、3~5日間培養した。感染細胞をPBSで1回洗浄し、培養スタッカーに、5mM EDTAを含む500mLのPBSを加えることによって細胞を採取し、37℃で1時間インキュベートした。細胞を50mLのコニカルチューブ（チューブあたり 5×10^7 個細胞）に回収し、遠心分離によってペレットにした。細胞ペレットをPBSで2回洗浄し、1200rpmで5分間遠心分離した。さらに処理されるまで、細胞ペレットを-20℃で保存した。凍結細胞を解凍し、各細胞ペレットに、3mLの冷溶解バッファー〔300mM NaCl、50mM NaH₂PO₄、1%Triton X-100、Complete（商標）プロテアーゼ阻害薬カクテル（カタログ番号sc-29131、Santa Cruz）、pH8〕を加えた。細胞を、4℃で30分間振盪し、続いて、超音波処理（10%出力で各10秒間に3パルス）し、最後に、4℃、14,000rpmで30分間遠心分離した。清澄化された上清を、新しいチューブに移し、使用の準備まで-80℃で凍結させた。ELISAプレート上での捕獲に先立って、上清を解凍し、短時間遠心分離し、1:2000希釈した。

【0655】

C. 抗RSV mAbを用いる捕獲

【0656】

ELISAプレートを、PBS中、抗RSV mAb（カタログ番号NB110-37

10

20

30

40

50

246、クローン2F7、Novus Biologicals) の1:400希釈の50 μ L/ウェルを使用して、コーティングした。結合していない抗体を除去し、プレートを直ちにELISAに使用した(実施例2および4参照のこと)。あるいは、プレートを-20℃で最大2週間凍結した。使用の直前に、プレートを、1×PBS中の、4%脱脂粉乳を用いて、37℃で2時間ブロッキングした。プレートを、0.05%Tween-20を含有するPBS(洗浄バッファー)で2回洗浄し、その後、溶解物を加えた。RSV Fタンパク質(組換えまたは天然のいずれか)の捕獲は、抗RSV mAb ELISAプレートの各ウェルに、上記の調製した溶解物のいずれか50 μ Lを加えることおよび37℃で2時間インキュベートすることによって達成する。

例2

10

【0657】

EBVによって形質転換されたB細胞からの抗RSV Fab抗体の単離

【0658】

この実施例では、RSV Fタンパク質との結合、続いて、インビトロ抗体生成についてスクリーニングされた、刺激されたエプスタイン・バーウイルスによって形質転換されたドナー記憶B細胞から抗RSV抗体を単離した。セクション(節)AおよびBは、EBV形質転換B細胞の生成およびクローニングのための、およびRSV Fタンパク質への結合についてのスクリーニングのためのわずかに異なる2つの手順について説明する。相違は次のとおりである。(1)ステップ1でのPMBCsの供給源、(2)ステップ2でのIgG+B細胞の分離(セクションAでのIgM、IgDおよびIgA発現細胞の枯渇およびセクションBでのCD3陽性細胞の枯渇)、および(3)ステップ3. aでの照射B細胞枯渇フィーダー細胞の調製である。

20

【0659】

A. EBV形質転換B細胞の生成およびクローニングおよびRSV Fタンパク質への結合についてのスクリーニング(手順A)

【0660】

末梢血単核細胞(PMBCs)を、小児との接触を介してRSVに曝露されている可能性がある保育者から入手した。PBMCを、製造業者の説明書に従って、フィコールハイパックでの密度遠心分離によって単離した。

【0661】

30

1. CD22+単離およびCD22+B細胞の活性化

【0662】

3. 2×10^6 個CD22+B細胞を、CD22磁性ビーズ(Miltenyi、カタログ番号130-046-401)およびLSカラム(Miltenyi、カタログ番号130-042-401)を使用してドナーPBMCから単離した。単離されたCD22+B細胞を、10%熱不活化低IgGウシ胎児血清(FBS、Invitrogen、カタログ番号16250-078)、1%抗生物質(Hyclone、カタログ番号SV30010)、1%ピルビン酸ナトリウム(Hyclone、カタログ番号SH30239.01)および1%L-グルタミン(Hyclone、カタログ番号SH30034.01)を含有するRPMI(Hyclone、カタログ番号SH30096.01)中、48ウェルプレートで、ウェルあたり 1×10^6 個細胞で培養した。単離されたB細胞を、ポリクローナルB細胞刺激物質の選択によって活性化して、増殖および抗体産生を誘導した。

40

【0663】

2. IgG+B細胞のEBV媒介性不死化

【0664】

4. 5×10^6 個の活性化されたCD22+B細胞を洗浄し、40 μ LのFITCがコンジュゲートされている抗IgM(BD Biosciences、カタログ番号555782)、40 μ LのFITCがコンジュゲートされている抗IgD(BD Biosciences、カタログ番号555778)および4 μ LのFITCがコンジュゲートしている抗IgA(Jacksons Immunoresearch、カタログ309-096-043)抗体とともに、4℃で15分間インキ

50

ュベートした。細胞を、PBS (0.5% BSAおよび2 mM EDTA含有)で1回洗浄し、90 μ Lの同バッファーに再懸濁した。IgG+B細胞を、10 μ Lの抗FITC磁性ビーズ (Miltenyi、カタログ番号130-048-701) およびLSカラム (Miltenyi、カタログ番号130-042-401) を使用し、製造業者の説明書に従って、IgM、IgD、IgA発現細胞の負の選択によって濃縮した。

【0665】

B細胞のバルク不死化を、 1.87×10^6 個のIgG+、CD22+濃縮B細胞を、0.5 ml EBV上清 (10% FCSを含むRPMI-1640中、50% v/v、B95-8細胞由来のATCCカタログ番号VR-1492) とともに16時間インキュベートすることによって実施した。感染させた後、細胞を洗浄し、24ウェルプレートのウェルあたり 0.5×10^6 個の照射したフィーダー細胞とともに、10% 熱不活化低IgGウシ胎児血清 (Invitrogen、カタログ番号16250-078)、1% 抗生物質 (Hyclone、カタログ番号SV30010)、1% ピルビン酸ナトリウム (Hyclone、カタログ番号SH30239.01) および1% L-グルタミン (Hyclone、カタログ番号SH30034.01)、200 IU/ml rhIL-2 (R&D Systems# 202-IL-50) を含有するRPMI (Hyclone、カタログ番号SH30096.01) 中で、2ウェルのうち各々において 10^6 個/mLで、さらに9日間培養した。

【0666】

3. B細胞クローニング

【0667】

a. B細胞のクローニングのための、照射されたB細胞が枯渇したフィーダー細胞の調製

【0668】

照射されたB細胞が枯渇したフィーダー細胞を使用して、EBVによって形質転換されたB細胞の増殖を維持するのを補助した。3人の健常ドナーの混合物に由来するPBMCを、フィコール分離によって得、3250ラドで照射し (UCSD Moore's Cancer Centerにて)、抗CD19磁性ビーズ (Miltenyi Biotec、カタログ番号130-050-301) およびLDカラム (Miltenyi Biotec、カタログ番号130-091-509) を使用してB細胞を枯渇させた。手短には、フィコール分離から得られた、凍結され、照射されたPBMCを解凍し、2回洗浄し、カウントした。次いで、細胞を、300 gで10分間遠心分離し、上清を吸引した。細胞ペレットを、 10^7 個の細胞ごとに80 μ l MACSバッファー (0.5% BSAおよび2 mM EDTAを含むPBS) に再懸濁し、20 μ lのCD19マイクロビーズ (10^7 個の細胞ごとに) を加えた。完全に混合した後、細胞を4℃で15分間インキュベートした。次いで、1~2 mLのバッファー (10^7 個の細胞ごとに) を加えることによって細胞を洗浄し、続いて、300 gで10分間遠心分離し、上清を吸引した。次いで、最大 10^8 個の細胞を500 μ lのバッファーに再懸濁した。磁性分離は、MACS分離装置の磁場においてLDカラム (細胞の迅速で穏やかな分離を可能にするよう、プラスチックコーティングで覆われた強磁性球からなる) を設置することによって達成した。LDカラムを2 mLのバッファーで洗浄し、細胞懸濁液をカラムの頂部にアプライした。非B細胞は、2 $\times$ 1 mLのバッファーを添加した後にそれらがカラムを通過するので回収した。

【0669】

b. B細胞クローニング

【0670】

約20個のEBVによって形質転換されたB細胞を、ポリクローナルB細胞刺激物質および96ウェルプレート中のウェルあたり、50,000個の照射されたB細胞が枯渇したフィーダー細胞とともに同時培養し、13日間増殖させた。合計120枚の96ウェルプレートを作製した。

【0671】

5. RSV Fタンパク質との結合についてのB細胞上清のスクリーニング

【0672】

各ウェルから得た上清を、新規96ウェルプレートに移し、細胞を、PBSで1回洗浄し、 $10\mu\text{L}/\text{mL}$ 2-メルカプトエタノールを含有するRLTバッファ（Qiagen、カタログ番号79216） $100\mu\text{L}$ 中、 -80°C で凍結した。上清をELISAにおいて使用し、どのウェルが、RSVタンパク質と結合できる抗体を産生しているかを決定した。手短には、ELISAを以下のとおりに実施した。（1）RSVタンパク質ELISAプレートを、以下の修飾を加えて、96ウェルハーフエリアプレートを使用し、実施例1に記載されるように調製した。抗RSV mAb（クローン2F7、マウス腹水、カタログ番号ab43812、Abcam）を、捕獲抗体として使用し、RSVタンパク質を、捕獲抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。（2）96ハーフウェルELISAプレートに、2つのウェルの各々から得た $10\mu\text{L}$ のB細胞上清（合計プールされた $20\mu\text{L}$ ）を加え、 37°C で2時間インキュベートした。血液バンクドナーのプールから得た血漿（フィコールハイパック分離後に回収され、凍結され、 $1:1000$ 希釈された）を、陽性対照として使用した。（3）プレートを上記のように4回洗浄し、各ウェルに $50\mu\text{L}$ のヤギ抗ヒトFc IgG HRPがコンジュゲートしている抗体（ 0.05% Tween20を含むPBSで $1:1000$ 希釈した）を加え、プレートを 37°C で1時間インキュベートした。（4）プレートを、上記のように6回洗浄し、 $50\mu\text{L}$ の $1:1\text{v}/\text{v}$ TMB：過酸化水素溶液（Pierce、カタログ番号34021）基質を使用して発色させ、7分間発色させた。 $50\mu\text{L}$ の $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ を添加することによって反応を直ちに停止させ、ELISAプレートリーダーを使用して 450nm での吸光度を測定した。 0.5 を超える（ $0.5\sim 0.9$ は中程度の結合、 >1 は強い結合） OD_{450} およびバックグラウンドを3倍上回る反応によって正の結合が示された。

10

20

【0673】

2種のプールされたウェルのうちどちらが、抗RSV抗体を含有していたかを調べるために、各ウェルから $20\mu\text{L}$ のB細胞上清（PBS/ 0.05% Tween20を用いて $1:2\text{v}/\text{v}$ 希釈した）を、捕獲されたRSVタンパク質に対して個々に再試験した。

【0674】

合計18プレート（すなわち1080ウェル）を、RSV F溶解物（実施例1において精製したような）との結合についてスクリーニングした。6種のウェルを、RSV F溶解物との結合剤として同定した。6種のウェルのうち5種が、さらなるELISAによって再確認され、これらを使用して、PCRによって抗RSV抗体を作製した（以下に記載する）。

30

【0675】

B. EBV形質転換B細胞の生成およびクローニングおよびRSV Fタンパク質への結合についてのスクリーニング（手順B）

【0676】

末梢血単核細胞（PMBCs）を、サンディエゴ血液バンクのドナーから入手した。PBMCを、製造業者の説明書に従って、フィコールハイパックでの密度遠心分離によって単離した。

40

【0677】

1. CD22+単離およびCD22+B細胞の活性化

【0678】

10.5×10^6 個CD22+B細胞を、CD22磁性ビーズを使用してドナーPBMCから単離し、単離されたCD22+B細胞を、上記セクションA. 1に説明したように、24ウェルプレートで養って、活性化した。

【0679】

2. IgG+B細胞のEBV媒介性不死化

【0680】

a. IgG+B細胞の単離

【0681】

50

11. 3×10^6 個の活性化された CD 22 + B 細胞を洗浄し、 $110 \mu\text{L}$ のビオチンがコンジュゲートされている抗 Ig M (BD Biosciences、カタログ番号 555781)、 $22 \mu\text{L}$ のビオチンコンジュゲートの抗 Ig D (BD Biosciences、カタログ番号 555777) および $22 \mu\text{L}$ のビオチンコンジュゲートの抗 Ig A (Invitrogen、カタログ番号 62-7440) および $220 \mu\text{L}$ のビオチンコンジュゲートの抗 CD 3 (BD Biosciences、カタログ番号 555331) 抗体とともに、 4°C で 15 分間インキュベートした。細胞を、PBS (0.5% BSA および 2 mM EDTA 含有) で 1 回洗浄し、 1.045 mL の同バッファーに再懸濁した。Ig G + B 細胞を、 $55 \mu\text{L}$ の抗ビオチン磁性ビーズ (Miltenyi、カタログ番号 130-090-485) および LD カラム (Miltenyi、カタログ番号 130-042-901) を使用し、製造業者の説明書に従って、Ig M、Ig D、Ig A および CD 3 発現細胞の負の選択によって濃縮した。

10

【0682】

b. EBV 形質転換細胞の培養のための照射されたフィーダー細胞の調製

【0683】

照射されたフィーダー細胞を使用して、EBV によって形質転換された B 細胞の増殖を維持するのを補助した。2-3 体の健常ドナーの混合物に由来する PBMCs を、フィコール分離によって得、3300 ラドで照射し (UCSD Moore's Cancer Center にて)、10% ジメチルスルホキシド (Sigma 社、カタログ番号 D2650-100) を含む FBS 中バイアルあたり 5×10^6 個の細胞で凍結した。使用前に、細胞の 1 バイアルを解凍し、そして 10% 熱不活性化低 Ig G ウシ胎仔血清 (Invitrogen 社、カタログ番号 16250-078)、1% 抗生物質 (Hyclone 社、カタログ番号 SV30010)、1% ピルビン酸ナトリウム (Hyclone、カタログ番号 SH30239.01) および 1% L-グルタミン (Hyclone、カタログ番号 SH30034.01) を含有する RPMI (Hyclone、カタログ番号 SH30096.01) で 3 回洗浄した。細胞をカウントし、 1×10^6 個の細胞/mL で再懸濁し、そして 48 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 0.25×10^6 個の細胞でプレート培養した。

20

【0684】

c. EBV 媒介不死化

【0685】

B 細胞のバルク不死化を、 0.58×10^6 個の Ig G +、CD 22 + 濃縮 B 細胞を、 0.5 mL の EBV 上清 (10% FCS を含む RPMI-1640 中、50% v/v、B95-8 細胞由来の ATCC カタログ番号 VR-1492) とともに 16 時間インキュベートすることによって実施した。感染させた後、細胞を洗浄し、48 ウェルプレートのウェルあたり 0.5×10^6 個の照射したフィーダー細胞とともに、10% 熱不活性化低 Ig G ウシ胎仔血清 (Invitrogen、カタログ番号 16250-078)、1% 抗生物質 (Hyclone、カタログ番号 SV30010)、1% ピルビン酸ナトリウム (Hyclone、カタログ番号 SH30239.01) および 1% L-グルタミン (Hyclone、カタログ番号 SH30034.01) を含有する RPMI (Hyclone、カタログ番号 SH30096.01) 中で、1 ウェルにおいて (0.58×10^6 個/ 0.5 mL) で培養した。48 時間後、 200 IU/mL r h IL-2 (R&D Systems # 202-IL-50) を加え、細胞をさらに 7 日間培養した。

30

40

【0686】

3. B 細胞クローニング

【0687】

a. B 細胞のクローニングのための、照射された B 細胞が枯渇したフィーダー細胞の調製

【0688】

照射された B 細胞が枯渇したフィーダー細胞を B 細胞のクローニングのために調製した。5-6 体の健常ドナーに由来する軟膜を得、そして周囲温度で一昼夜貯蔵した。PBMC を、フィコール分離によって分離し、抗 CD 19 磁性ビーズ (Miltenyi Biotec、カタ

50

ログ番号130-050-301) およびLDカラム (Miltenyi Biotec、カタログ番号130-042-901) を使用してB細胞を枯渇させた。

【0689】

手短には、フィコール分離から得られた、凍結され、照射されたPMBCを解凍し、2回洗浄し、カウントした。次いで、細胞を、300gで10分間遠心分離し、そして上清を吸引した。細胞ペレットを、 10^7 個の細胞ごとに80 μ lのMACSバッファー (0.5% BSAおよび2mM EDTAを含むPBS) に再懸濁し、20 μ lのCD19マイクロビーズ (10^7 個の細胞ごとに) を加えた。完全に混合した後、細胞を4℃で15分間インキュベートした。次いで、1~2mLのバッファー (10^7 個の細胞ごとに) を加えることによって細胞を洗浄し、続いて、300gで10分間遠心分離し、上清を吸引した。次いで、最大 10^8 個の細胞を500 μ lのバッファーに再懸濁した。磁性分離は、MACS分離装置の磁場においてLDカラム (細胞の迅速で穏やかな分離を可能にするよう、プラスチックコーティングで覆われた強磁性球からなる) を設置することによって達成した。LDカラムを2mLのバッファーで洗浄し、細胞懸濁液をカラムの頂部にアプライした。非B細胞は、2×1mLのバッファーを添加した後にそれらがカラムを通過するとき回収した。細胞を10分間、300gで遠心分離し、2%低IgGウシ胎仔血清を含むPBS中の 5×10^6 個の細胞/mLで再懸濁した。細胞を、4000ラドで照射し (UCSD Moore's Cancer Centerにて)、300gで6分間遠心分離し、90%低IgGのFBSおよび10%ジメチルスルホキシド (DMSO、 25×10^6 個の細胞/mL) において再懸濁し、そして液体窒素において凍結保存した。

10

20

【0690】

使用前に、細胞を解凍し、そして10%熱不活性化低IgGウシ胎仔血清 (Invitrogen社、カタログ番号16250-078)、1%抗生物質 (Hyclone社、カタログ番号SV30010)、1%非必須アミノ酸 (Hyclone、カタログ番号SH30238.01) および1%L-グルタミン (Hyclone、カタログ番号SH30034.01) を含有するIscove's Modified Dulbeccos Medium (イスコフ改変ダルベッコ培地) (IMDM、Hyclone、番号SH30228.01) で3回洗浄した。

【0691】

b. B細胞クローニング

【0692】

約100個のEBV形質転換されたB細胞を、ポリクローナルB細胞刺激物質および96ウェルプレート中のウェルあたり、50,000個の照射されたB細胞が枯渇したフィーダー細胞とともに同時培養し、10%熱不活性化低IgGウシ胎仔血清 (Invitrogen社、カタログ番号16250-078)、1%抗生物質 (Hyclone社、カタログ番号SV30010)、1%非必須アミノ酸 (Hyclone、カタログ番号SH30238.01) および1%L-グルタミン (Hyclone、カタログ番号SH30034.01) を含有するIMDM (Hyclone、番号SH30228.01) において13日間増殖させた。合計120枚の96ウェルプレートを作製した。

30

【0693】

4. RSV Fタンパク質への結合のためのB細胞上清のスクリーニング

40

【0694】

各ウェルから得た上清を、ELISAによって、どのウェルが、RSV Fタンパク質と結合できる抗体を産生しているかを決定するためにスクリーニングした。ELISAは上記セクションA. 5に説明するように、RSV Fタンパク質をコートした96ウェルハーフエリアプレートにおいて実施した (例1に記載される)。上述のように、2つのプールされたウェルのうちどちらが、抗RSV抗体を含有していたかを調べるために、各ウェルから20 μ LのB細胞上清 (PBS/0.05% Tween20を用いて1:2 v/v希釈した) を、捕獲されたRSV Fタンパク質に対して個々に再試験した。

【0695】

合計120プレート (すなわち7200ウェル) を、RSV F溶解物 (例1において

50

精製したようなもの)との結合についてスクリーニングした。29のウェルを、RSV F溶解物に対するバインダー(結合剤)として確認した。25のウェルのうち10を、さらなるELISAによって再確認し、これらを使用して、PCRによって抗RSV抗体を作製した(以下に記載する)。

【0696】

C. PCRによる抗RSV抗体の生成

【0697】

EBVによって形質転換されたB細胞の、RSV Fタンパク質と結合する抗体の産生についての最初のスクリーニング後、個々の抗体をコードする遺伝子を、B細胞RNAからPCRによって増幅した。上記セクションAからヒットとして同定された5つのウェルを、クローニングのために選択した。上記セクションBからヒットとして同定された10のウェルをクローニングのために選定した。

10

【0698】

1. RNA抽出

【0699】

RNAを、RNeasy Microキット(Qiagen、カタログ番号1402-2408)を、製造業者の説明書に従い、以下の修飾を加えて使用して、B細胞(RSV Fタンパク質との正の結合剤に対応する各ウェルの)から抽出した。1) B細胞を、 β -メルカプトエタノール(バッファー1 mLあたり10 μ L)を含むRLTバッファー100 μ L中で凍結し、2) 細胞はホモジナイズせず、3) RNAを70%エタノール(RNアーゼ不含有水中)で沈殿させ、そして4) DNアーゼ処理を、製造業者の補足プロトコールに従って「カラム中」で実施した。RNAを、最終容量26 μ Lに溶出した。

20

【0700】

2. 第1鎖cDNA合成

【0701】

RNA抽出後、cDNAを、スーパースクリプトIII(Invitrogen; カタログ番号19090-051)第1鎖合成プロトコールに従って作製した。手短には、8 μ L RNA(上記のように単離された)、1 μ L オリゴdTプライマーおよび1 μ L のdNTPを、滅菌0.2 mLチューブ中で組み合わせ、65°Cで5分間インキュベートし、続いて、氷上で1分間インキュベートした。続いて、チューブに、2 μ L の0.1 mM DTT、4 μ L の25 mM MgCl₂、2 μ L のRTバッファー、1 μ L のRNase Outおよび1 μ L のスーパースクリプトIII RTを加え、反応混合物を50°Cで50分間インキュベートし、続いて、85°Cで15分間インキュベートした。cDNAは直ちに使用するか、または長期間保存のために-80°Cで凍結した。

30

【0702】

3. PCR増幅によるIgG重鎖ならびに κ および λ 軽鎖遺伝子の単離

【0703】

IgG重鎖ならびに κ および λ 軽鎖を、B細胞第1鎖cDNA合成反応からPCR増幅によって作製した(上記参照のこと)。 κ 軽鎖遺伝子は一段階PCRによって増幅したが、重鎖遺伝子および λ 軽鎖遺伝子は、二段階、ネステッドPCRアプローチを使用して増幅した。続いて、増幅した重鎖および軽鎖遺伝子を、「オーバーラップPCR」を使用して単一カセットに連結した。

40

【0704】

工程I. 増幅またはIgG重鎖遺伝子および λ 軽鎖遺伝子

【0705】

工程(ステップ)Iでは、重鎖A、2 μ Lの第1鎖合成によって作製したcDNA(上記参照のこと)を鋳型として使用して、PCRによってIgG重鎖を個々に増幅した。この工程では、工程Iプライマーのプールを利用した(表3A参照のこと)。反応条件は以下のとおりとした。

【0706】

50

PCR工程I：重鎖A：

試薬	μL
H ₂ O	16
10×バッファー	2.5
10×エンハンサーバッファー	2.5
dNTP (各10mM)	0.75
cDNA	2.0
VHプールリーダー (各9 μM)	0.5
VHリバースプール (20 μM)	0.25
Pfx 50	0.5
	25

10

【0707】

代わりに、工程Iでは、重鎖B、2.5 μL の第1鎖合成によって作製したcDNA（上記参照）を鋳型として使用して、PCRによってIgg重鎖を個々に増幅した。この工程では、工程Iプライマーの同じプールを、フォワードプライマーのために利用し、そしてpCALCL(T)-Rをリバースプライマーとして用いた（下記表3A参照）。反応条件は以下のとおりとした。

【0708】

PCR工程I：重鎖B：

試薬	μL
H ₂ O	15.5
10×バッファー	2.5
10×エンハンサーバッファー	2.5
dNTP (各10mM)	0.75
cDNA	2.5
VHプールリーダー (各9 μM)	0.5
VH-g1(a/b)-REV (20 μM)	0.25
Pfx 50	0.5
	25

20

30

【0709】

工程Iでは、 λ 軽鎖、2.5 μL の第1鎖合成によって作製したcDNA（上記参照のこと）を鋳型として使用して、PCRによってIgg重鎖を個々に増幅した。この工程では、フォワードプライマーのために工程Iプライマーのプールを利用し、リバースプライマーとしてpCALCL(T)-Rを使用した（以下の表3B参照のこと）。反応条件は以下のとおりとした。

【0710】

PCR工程I：ラムダ軽鎖：

試薬	μL
H ₂ O	16
10×バッファー	2.5
10×エンハンサーバッファー	2.5
dNTP (各10mM)	0.75
cDNA	2.0
V λ プール (各14.2 μM)	0.5
pCALCL(T)-R (20 μM)	0.25
Pfx 50	0.5
	25

40

50

【0711】

PCR反応のために、反応増幅に特異性を加えるためにタッチダウンアプローチを実行した。各タッチダウン工程で、どのサイクルでもアニーリング温度を1℃低下させる。PCRサーモサイクラー条件は以下のとおりとした。

【0712】

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；62℃で20秒（タッチダウン）；68℃で1分間の10サイクル
- 3) 94℃で15秒；52℃で20秒；68℃で1分間の25サイクル
- 4) 68℃で3分間
- 5) 4℃で維持

10

【0713】

得られた反応混合物を、いかなるさらなる精製も行わずに工程IIの鋳型DNAとして使用した（以下参照のこと）。

【0714】

【表3A】

表 3A. 工程 I I g G重鎖遺伝子の増幅のためのプライマー		
VH フォワードプライマープール：		配列番号
VH1a	GGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAG	26
VH1b	GCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCAC	27
VH1c	GGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAG	28
VH1d	GGATCCTCTTCTTGGTGGGAGCAG	29
VH2a	CTGACCATCCCTTCATGGCTCTTG	30
VH2b	CTGACCACCCCTTCCTGGGTCTTG	31
VH3a	GCTATTTTARAAGGTGTCCAGTGT	32
VH3b	GCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT	33
VH3c	GCTATTTAAAAAGGTGTCCAATGT	34
VH4a	CTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTC	35
VH5a	CTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTC	36
VH リバースプライマープール：		配列番号
VH-g 1- REV	ACAAGATTGCGCTCAACTTTCTTGTC	37
VH-g 2- REV	TTTGCGCTCAACTGTCTTGTCACCTTG	38
VH-g 3- REV	TTTGAGCTCAACTCTCTTGTCACCTTG	39
VH-g 4- REV	ATATTGGACTCAACTCTCTTGTCACC	40
リバースプライマー：		配列番号
VH-g1(a/b)-REV	ACAAGATTGCGCTCAACTYTCTTGTC	383

20

30

40

【0715】

【表 3 B】

表 3B. 工程 I ラムダ軽鎖遺伝子の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール：		配列番号
5' L Vλ 1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG	384
5' L Vλ 2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG	385
5' L Vλ 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	386
5' L Vλ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	387
5' L Vλ 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	388
5' L Vλ 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	389
5' L Vλ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	390
リバースプライマー：		配列番号
pCALCL(T)-R	CTCCTTATTAATTAATTATGAGCATTCTGYAKGGGCM AYTGTC	80

10

【0716】

工程 I I. I g G 重鎖およびλ 軽鎖遺伝子の増幅

【0717】

20

工程 I I では、工程 I から得た重鎖およびλ 軽鎖反応混合物を、各鎖のフレームワーク 1 領域から定常領域（重鎖の C_H 1、軽鎖の C_L）の最後まで増幅する、フォワードおよびリバースプライマーのプールとともに第 2 ラウンド P C R 反応の鋳型として使用した。

【0718】

重鎖フォワードプライマー（表 4 参照のこと）は、S f i I 制限部位を導入するよう設計した（配列番号 4 1）。反応条件は、以下のとおりとした。

【0719】

P C R I I : 重鎖

試薬	μ L
H ₂ O	12.75
10×バッファー	2.5
10×エンハンサー	2.5
dNTP (各 10mM)	0.75
工程 I 反応物	2.5
pCAL24VH-F プール (2 μM)	2.5
CH1-R プール-S f i (20 μM)	1
P f x 50	0.5
25	

30

【0720】

40

λ 軽鎖フォワードプライマー（表 6 参照のこと）は、S f i I 制限部位を導入するよう設計した（配列番号 4 1）。反応条件は、以下のとおりとした。

【0721】

PCR I I : ラムダ軽鎖

試薬	μ L
H ₂ O	15.5
10×バッファー	2.5
10×エンハンサー	2.5
dNTP (各10mM)	0.75
工程 I 反応物	2.5
V λ プライマープール (各2 μ M)	2.5
pCALCL (T) -R (20 μ M)	1
Pfx 50	0.5
	25

10

【0722】

工程 I I 反応の PCR サーマサイクラー条件は、以下のとおりとした。

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；52℃で20秒；68℃で1分間の30サイクル
- 3) 68℃で3分間
- 4) 4℃で維持

【0723】

カップ軽鎖遺伝子の増幅のために、2 μ Lの第1鎖合成(上記参照のこと)によって作製したcDNAを鋳型として使用して、PCRによってIgGカップ軽鎖を個々に増幅した。軽鎖 κ フォワードプライマー(表5参照のこと)をプライマープールとして使用し、SfiI制限部位を導入するよう設計した(配列番号41)。

20

【0724】

反応条件は以下のとおりとした。

PCR I I : カップ軽鎖

試薬	μ L
H ₂ O	16
10×バッファー	2.5
10×エンハンサー	2.5
dNTP (各10mM)	0.75
第1鎖cDNA	2
V κ プライマープール (9.1 μ M)	0.5
pCALCK (G) L (20 μ M)	0.25
Pfx 50	0.50
	25

30

【0725】

工程 I I 反応の PCR サーマサイクラー条件は以下のとおりとした。

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；54℃で20秒；68℃で1分間の35サイクル
- 3) 68℃で3分間
- 4) 4℃で維持

40

【0726】

増幅後、PCR反応生成物を、1%アガロースゲルで分離し、重鎖(675bp)および軽鎖(650bp)に対応するバンドを、ゲル抽出(Qiagenゲル抽出キット；カタログ番号28706)によって精製した。PCR産物は、30 μ lに溶出した。

【0727】

【表 4】

表4 I g G重鎖遺伝子の増幅のためのプライマー		配列番号
フォワードプライマープール		
pCal30 VH1a	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGGTCAGCTGG TGCAG	42
pCal30 VH1b	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGGTCCAGCTTG TGCAG	43
pCal30 VH1c	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCASAGGTCCAGCTGG TACAG	44
pCal30 VH1d	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACARATGCAGCTGG TGCAG	45
pCal30 VH2a	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGATCACCTTGA AGGAG	46
pCal30 VH3a	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCAGARGTGCAGCTGG TGGAG	47
pCal30 VH4a	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGSTGCAGCTGC AGGAG	48
pCal30 VH4b	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGGTGCAGCTAC AGCAG	49
pCal30 VH5a	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCAGARGTGCAGCTGG TGCAG	50
pCal30 VH6	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGGTACAGCTGC AGCAG	51
pCal30 VH7	ggctttgctaccgtacgcCAGGCGGCCGCACAGGTSCAGCTGG TGCAA	52
リバースプライマープール		配列番号
VHII-g1-Rev	TGCGGCCGGCCTGGCCGACCACAAGATTTGGGCTC AACTTTC	53
VHII-g2-Rev	TGCGGCCGGCCTGGCCGACCTTTGCGCTCAACTGT CTTGTCC	54
VHII-g3-Rev	TGCGGCCGGCCTGGCCGACCTTTGAGCTCAACTCT CTTGTCC	55
VHII-g4-Rev	TGCGGCCGGCCTGGCCGACCATATTTGGACTCAAC TCTCTTG	56

【 0 7 2 8 】

【表 5】

表5 κ 軽鎖遺伝子の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
VK1a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGACATCCAGATGACCCAG	57
VK1b	AAGggccagccggccatggccgcccgtGACATCCAGTTGACCCAG	58
VK1c	AAGggccagccggccatggccgcccgtGCCATCCGGTTGACCCAG	59
VK2a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGATATTGTGATGACYCAG	60
VK3a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGTTGACGCAG	61
VK3b	AAGggccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGTTGACACAG	62
VK3c	AAGggccagccggccatggccgcccgtGAAATAGTGATGACGCAG	63
VK4a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGACATCGTGATGACCCAG	64
VK5a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGAAACGACACTCACGCAG	65
VK6a	AAGggccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGCTGACTCAG	66
VK6b	AAGggccagccggccatggccgcccgtGATGTTGTGATGACACAG	67
リバープライマー		配列番号
pCALCK (G) L	CTCCTTATTAATTAATTAGCACTCTCCCCTGTTGAAGCT CTTTG	68

10

【0729】

【表 6】

表6 λ 軽鎖遺伝子の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
VL1-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TCTGTGCTGACKCAGCC	69
VL2-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TCTGCCCTGACTCAGCC	70
VL3A-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TATGAGCTGACWCAGCY	71
VL3B-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TCTGAGCTGACTCAGGAC	72
VL3C-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TATGWGCTGACTCAGCC	73
VL4A-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG CCTGTGCTGACTCAGCCC	74
VL4B-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG CYTGTGCTGACTCAATCR	75
VL5/9-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG SCTGTGCTGACTCAGCCR	76
VL6-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG TTTATGCTGACTCAGCCC	77
VL7/8-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG RCTGTGGTGACTCAGGAG	78
VL10-F	AAGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGGTGTTCAG GCAGGGCTGACTCAGCCA	79
リバープライマー		配列番号
pCALCL(T)-R	CTCCTTATTAATTAATTATGAGCATTCTGYAKGGG CMAYTGTC	80

20

30

40

【0730】

工程 I I I . オーバーラップPCR

【0731】

50

工程 I I I では、工程 I I で作製した重鎖および軽鎖 DNA セグメントを、1) オーバーラップ反応において、軽鎖の 3' 末端および重鎖の 5' 末端とアニーリングする F a b リンカー（以下の表 7 参照のこと）と連結し、2) S f i フォワードおよびリバースプライマー（以下の表 7 参照のこと）を用いて増幅し、それによって、軽鎖ーリンカーー重鎖を含有する 1 2 0 0 塩基対 (b p) の抗体断片の増幅が可能となった。

【0732】

F a b κ リンカーを、2 g 1 2 / p C A L ベクター（配列番号 8 1）から、いずれかの F a b リンカー R e v または F a b リンカー R e v I T * プライマー（以下の表 7 参照）を用いて増幅した。F a b カップリンカーの形成の P C R 反応条件は、以下のとおりとした。

10

【0733】

F a b カップリンカー

試薬	μ L
H ₂ O	19.75
10×バッファー	2.5
dNTP (各 10 mM)	0.75
2 g 1 2 / p C A L ベクター (10 ng)	1
F a b リンカー C K - F w d (20 μ M)	0.25
リバースプライマー (20 μ M)	0.25
P f x 5 0	0.5
	25

20

【0734】

F a b λ リンカーを、2 8 d 1 1 / p C A L ベクター（配列番号 1 6 3 6）から増幅した。F a b カップリンカーの形成の P C R 反応条件は以下のとおりとした。

【0735】

F a b ラムダリンカー

試薬	μ L
H ₂ O	35.5
10×バッファー	5
10×エンハンサー	5
dNTP (各 10 mM)	1.5
2 8 d 1 1 / p C A L ベクター (10 ng)	1
F a b リンカー C λ - F w d (20 μ M)	0.5
F a b リンカー - R e v I T * (20 μ M)	0.5
P f x 5 0	0.5
	25

30

40

【0736】

F a b リンカーの形成の P C R サーモサイクラー条件は、以下のとおりとした。

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；54℃で20秒；68℃で1分間の30サイクル
- 3) 68℃で3分間
- 4) 4℃で維持

【0737】

P C R 反応を 1 % アガロースゲルで実施し、1 2 0 b p のリンカーを、Qiagen ゲル抽出プロトコールに従ってゲル抽出した。各オーバーラップ反応に 2 μ l の精製リンカーを使

50

用した。

【0738】

オーバーラップのPCR反応条件は以下のとおりとした（最初の15サイクルの後にPCR反応物にSfiF/Rプライマーを加えた）。

【0739】

PCR III : オーバーラップ

試薬	μ L
H ₂ O	24.5
10×バッファー	5
10×エンハンサー	5
dNTP (各10mM)	1.5
軽鎖生成物	5
重鎖生成物	5
リンカー	2
SfiF/Rプライマー (20 μ M)	1
Pfx50	1
	50

10

【0740】

PCRサーモサイクラー条件は以下のとおりとした。

20

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；68℃で1分間の15サイクル
- SfiF/Rプライマー (1 μ L) を加え、次いで
- 3) 94℃で2分間
- 4) 94℃で15秒；60℃で20秒；68℃で2分間の30サイクル
- 5) 68℃で3分間
- 6) 4℃で維持

【0741】

増幅後、10 μ lの全50 μ lのPCRオーバーラップ反応生成物軽鎖ーリンカーー重鎖を、1%アガロースゲルで分離して、サイズを決定し、PCR産物の残りの40 μ lを、Qiagen PCR精製キット (Qiagen；カタログ番号28106) によって精製し、30 μ lの総容量とした。手短には、PBIバッファーの5倍のPCR反応容量をPCR産物に加える。混合物をQIASpinカラムと結合させ、PEバッファーで2回洗浄した。サンプルを30 μ lに溶出し、最高速度で1.5分間回転させて、30 μ lすべてを溶出した。約1 μ gのオーバーラップ産物が、50 μ lのオーバーラップ反応あたりの通常の収量であった。

30

【0742】

【表 7】

表 7. 工程 III オリゴヌクレオチド		
オリゴヌクレオチド		配列番号
Fab リンカー CK-Fwd	GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAATTAATTAATAAG GAG	82
Fab リンカー -Rev	TGCGGCCGCCTGCGCTACGGTAGCAAAGCCAGCCAGT GCCAC	83
Fab リンカー Cλ-Fwd	GACARTKGCCCMTRCAGAATGCTCATAATTAATTAAT AAGGAGGATATAATTATGAAAAAG	392
Fab リンカー -Rev-IT*	TGCGGCCGCCTACGCTACGGTAGCAAAGCCAGCCAGT GCCAC	393
Sfi フォワー ド	TCGCggcccagccggccatggc	84
Sfi リバース	TGCGGCCGCCTGGCCGA	85

【0743】

工程 IV. Sfi を用いる消化および pCAL または pCAL IT* 発現ベクターの
いずれかへのクローニング

【0744】

オーバーラップ PCR 反応および PCR 産物の精製後、反応生成物を、Sfi I を用い
て消化した。30 μl の溶出液（上記参照のこと）に、消化のために以下を加えた。

【0745】

4 μl	反応バッファー 2 (New England Biolabs)
0.4 μl	BSA
1.6 μl	Sfi I 酵素 (New England Biolabs)
4 μl	H ₂ O
40 μl	総容量

【0746】

反応物を、37℃で1時間インキュベートした。消化後、消化したオーバーラップ産物
を1%アガロースゲルで分離し、抗体に対応するバンド（約1.45 k B）を、ゲル抽出
（Qiagenゲル抽出精製キットカタログ番号28706）によって精製した。手短には、ゲ
ル切片を、500 μl のバッファーQC（Qiagen）を用いて消化した。150 μl のイソ
プロパノールを加えて消化し、サンプルをQiaSpinカラムにアプライした。カラム
をバッファーPE（Qiagen）を用いて2回洗浄し、サンプルを30 μl のEBバッファー
（Qiagen）に溶出する。約15 ng / μl の消化されたサンプルが、約1 μg のPCRオ
ーバーラップ産物から回収される。

【0747】

最後に、消化されたオーバーラップ産物を、そのpCAL（配列番号86）またはpC
AL IT*（配列番号394）細菌発現ベクター中にライゲーションした。ライゲーション
反応条件は、以下のとおりとした。

【0748】

25 ng SfiI 消化された pCAL または pCAL IT*ベクター
 25 ng 消化されたオーバーラップ産物
 2 μ l T4 リガーゼ反応バッファー
 1 μ l T4 リガーゼ (NEB カタログ番号 MC202L、400,000 ユニット/ml)

H₂Oを用いて20 μ l 総容量に調整

【0749】

サンプルを、室温で1時間ライゲーションした。ライゲーションの1 μ l を、4 μ l の H₂O で希釈し、その後、形質転換に進んだ。

【0750】

工程 V. 大腸菌への形質転換

【0751】

ライゲーション後、ライゲーション産物を、DH5 α 最大効率細胞 (Invitrogen; カタログ番号 18258; 遺伝子型: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1) に形質転換した。手短には、1 μ l のライゲーション産物 (1/5 希釈) を 50 μ l の DH5 α に加え、氷上で30分間インキュベートした。形質転換は、42 $^{\circ}$ C で45秒の熱ショックと、それに続く、氷上で2分間によって達成した。0.9 mL の SOC 培地を加え、細胞を、振盪しながら37 $^{\circ}$ C で1時間回復させた。細胞を、カルベニシリン (100 μ g/mL) および20 mM グルコースを補給した LB プレート上に播種した。プレートを、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

【0752】

工程 VI. 個々のコロニーの選択

【0753】

各抗体増幅のために、合計88の個々のコロニーを選択し、96ウェルプレート中の1カルベニシリン (100 μ g/mL) を補給した Super Broth (SB) 1 mL 中、37 $^{\circ}$ C で2時間増殖させた。各培養物の500 μ l を、40 mM グルコース (最終20 mM) および100 μ g/mL のカルベニシリンを補給した SB 500 μ l とともに、別の96ウェル形式細菌プレートに移すことによって娘プレートを作製した。元のプレートすなわち母プレートに、100 μ g/mL カルベニシリンを補給した SB 500 μ l を供給した。元のプレートを、30 $^{\circ}$ C で一晩増殖させ、娘プレート (グルコースを含有する) を37 $^{\circ}$ C で一晩増殖させた。30 $^{\circ}$ C のプレートから得た細胞溶解物を、細菌 ELISA に使用し (以下の実施例4を参照のこと)、37 $^{\circ}$ C のプレート培養物を、mini-prep DNA 調製 (Qiagen) に使用した。

【0754】

要約

【0755】

上記セクション A からヒットと同定された5種のウェルを、 κ 軽鎖プライマーを使用して、増幅させ、pCAL 発現ベクター中にクローニングした。上記セクション B においてヒットと同定された10のウェルを、 κ 軽鎖プライマーを使用して増幅させ、pCAL IT* 発現ベクター中にクローニングした。1つのウェルを、ラムダ軽鎖プライマーを使用して増幅させ、pCAL IT* 発現ベクター中にクローニングした。

【0756】

例 3

単細胞選別による抗 RSV Fab 抗体の単離

【0757】

この実施例では、抗 RSV 抗体を CD19/CD27/IgG 陽性細胞から単離した。CD19/CD27/IgG 陽性細胞は、1) B 細胞単離および2) FACS 単細胞選別によって得た。次いで、選別された細胞を使用して、RNA を単離し、これは Fab 抗体のインビトロ製造のための鋳型としての役割を果たした。

【0758】

B細胞単離

【0759】

B細胞をPBMC（匿名の血液バンクドナーから採取した）からB細胞単離キット（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-091-151）を使用して単離した。キットを使用して、CD2、CD14、CD16、CD36、CD43およびCD235a発現細胞（活性化されたB細胞、血漿細胞およびCD5⁺B-1a細胞）および非B細胞（例えば、T細胞、NK細胞、樹状細胞、マクロファージ、顆粒球および赤血球細胞）を磁性標識することおよび枯渇させることによって高度に純粋なB細胞を単離した。製造業者のプロトコールに従って、非B細胞を、一次標識試薬としてビオチンがコンジュゲートしているモノクローナル抗体のカクテル（ビオチン-抗体カクテル）および二次標識試薬としてマイクロビーズとコンジュゲートしている抗ビオチンモノクローナル抗体（抗ビオチンマイクロビーズ）を使用することによって、間接的に磁性標識した。次いで、磁性分離によって非B細胞を純粋な休止B細胞から除去した。

10

【0760】

手短には、フィコール分離から得られた凍結PBMCを解凍し、2回洗浄し、カウントした。次いで、細胞を300gで10分間遠心分離し、上清を吸引した。細胞ペレットを40μlのMACSバッファーに再懸濁し（10⁷個の細胞ごとに）、10μlのビオチン-抗体カクテル（10⁷個の細胞ごとに）を加えた。完全に混合した後、細胞を4℃で10分間インキュベートした。インキュベーション期間の後、30μlのバッファー（10⁷個の細胞ごとに）および20μlの抗ビオチンマイクロビーズ（10⁷個の細胞ごとに）を加えた。完全に混合した後、細胞を4℃で15分間インキュベートした。次いで、1~2mLのバッファーを加えることによって細胞を洗浄し（10⁷個の細胞ごとに）、続いて、300gで10分間遠心分離し、上清を吸引した。次いで、最大10⁸個の細胞を500μlのバッファーに再懸濁した。

20

【0761】

磁性分離は、MACS分離装置の磁場においてLSカラム（細胞の迅速で穏やかな分離を可能にするよう、プラスチックコーティングで覆われた強磁性球からなる）を設置することによって達成した。LSカラムを3mLのバッファーで洗浄し、細胞懸濁液をカラムの頂部にアプライした。非標識B細胞は、3×3mLのバッファーを添加した後にそれらがカラムを通過する時に回収した。

30

【0762】

単細胞選別

【0763】

この実施例では、FACSAriaフローサイトメーター（BD Biosciences）を使用し、抗原特異性によって単離されたB細胞を選別した。選択された細胞は、CD19/CD27/IgG陽性であった。RSV-F抗原を、Alexa Fluor 647を用い、製造業者の説明書に従って（Molecular Probes、A-20186）標識した。

【0764】

手短には、単離されたB細胞を16本の別個のチューブ中に分注した。14本のチューブには、1×10⁵個の細胞を与え、これらを使用して、FACSAriaでの光電子増倍管設定およびソートパラメータを決定した。残存する1.8×10⁶個の細胞をAlexa Fluor 647/RSV-Fを、20nMの終濃度で用いて標識した。標識されたタンパク質をサンプルに15分間加え、その後、抗体を加えた。CD19およびCD27抗体を1:20の希釈で使用したのに対し、IgG抗体は1:50の希釈で使用した。Alexa Fluor 647/RSV-Fタンパク質および抗体を添加した後、チューブを氷上で30分間インキュベートし、続いて、2回洗浄した。単細胞選別は、FACSAriaフローサイトメーター（BD Biosciences）を使用して達成した。標識は、PE-Cy5（抗ヒトCD19）、PE-Cy7（抗ヒトCD27）、PE（ヤギ抗ヒトIgG Fcγ）、Pacific Blue（マウス抗ヒトCD3）、FITC（マウス抗ヒト

40

50

I g D、マウス抗ヒト I g M、マウス抗ヒト I g Aおよびマウス抗ヒト C D 1 4)、ヨウ化プロビジウムおよび A l e x a F l u o r 6 4 7 (標識された R S V - F タンパク質)を含んでいた。

【0765】

まず、死細胞を排除することと、それに続いて、C D 3 陽性細胞を排除することによって細胞選別を実施した。C D 1 9 および C D 2 7 陽性細胞をさらに同定し、この集団内で、細胞を I g G F c γ 発現についてゲート開閉した。I g D、I g M および I g A を発現する細胞を、残存する細胞から排除した。最後に、C D 1 9 / C D 2 7 / I g G F c γ 陽性細胞を R S V - F 結合について選別し、各陽性 B 細胞を、2 μ l の c D N A 反応バッファー (スーパースクリプト I I I 1 0 × バッファー、Invitrogen; カタログ番号 1 9 0 9 0 - 0 5 1)、0. 5 μ l R N a s e O U T および 7. 5 μ l 滅菌水を含有する 9 6 ウェルプレートの個々のウェル中に入れた。プレートをさらに処理されるまで - 8 0 °C で保存した。

【0766】

第 1 鎖 c D N A 合成

【0767】

選別後、c D N A を、Invitrogen 第 1 鎖合成プロトコールに従って、各ウェル中で個々に作製した。手短には、各ウェルに、0. 5 μ l 1 0 % N P - 4 0、1 μ l オリゴ d T プライマーおよび 1 μ l d N T P を加え、プレートを 6 5 °C で 5 分間インキュベートし、続いて、氷上で 1 分間インキュベートした。続いて、2 μ l D T T、4 μ l M g C l₂ および 1 μ l スーパースクリプト I I I R T を加え、反応混合物を 5 0 °C で 1 時間インキュベートし、続いて、8 5 °C で 5 分間インキュベートした。c D N A は直ちに使用するか、または長期間保存のために - 8 0 °C で凍結した。

【0768】

I g G 重鎖および κ 軽鎖増幅

【0769】

I g G 重鎖および κ 軽鎖を、続いて、P C R の 4 つの連続工程によって作製した。

【0770】

工程 I . 増幅

【0771】

工程 I において、第 1 鎖合成 (上記を参照のこと) によって作製した 2. 5 μ L の c D N A を鋳型として使用して、P C R によって κ 軽鎖および I g G 重鎖を個別に増幅した。この工程では、工程 I プライマーのプールを利用した (以下の表 8 および 9 を参照のこと)。反応条件は以下のとおりとした。

【0772】

PCR 工程 I :

H ₂ O	1 6
1 0 × バッファー	2. 5
1 0 × エンハンサーバッファー	2. 5
d N T P (各 1 0 mM)	0. 7 5
c D N A	2. 5
工程 I プール (各 2 0 μ M)	0. 2 5
リバースプライマー (2 0 μ M)	0. 2 5
P f x 5 0	0. 2 5
	2 5 μ L

【0773】

P C R サーマサイクラー条件は以下のとおりとした。

1) 9 4 °C で 2 分間

2) 9 4 °C で 1 5 秒 ; 6 2 °C で 2 0 秒 (タッチダウン) ; 6 8 °C で 1 分間の 1 0 サイク

ル

3) 94℃で15秒; 52℃で20秒; 68℃で1分間の40サイクル

4) 68℃で3分間

5) 4℃で維持

【0774】

反応混合物を、いかなるさらなる精製も行わずに工程IIの鋳型DNAとして使用した(以下参照のこと)。

【0775】

【表8】

表8. 工程I κ軽鎖の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
5'LVκ1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	87
5'LVκ3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG	88
5'LVκ4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	89
リバースプライマー		配列番号
VK-Rev	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	90

10

【0776】

【表9】

表9. 工程I IgG重鎖の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
5'L-VH1	ACAGGTGCCCCACTCCCAGGTGCAG	91
5'L-VH3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	92
5'L-VH4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG	93
5'L-VH5	CAAGGAGTCTGTTCGAGGTGCAG	94
リバースプライマー		配列番号
3'CγCH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	95

20

30

【0777】

工程II. 増幅

【0778】

工程IIでは、工程Iから得た反応混合物を、それぞれ、軽鎖または重鎖いずれかのフォワードおよびリバースプライマーのプールとともに、第2のPCR反応の鋳型として使用した。これらの反応によって、各鎖のフレームワーク1領域からDNAを増幅した。軽鎖フォワードプライマー(表10参照のこと)を、SfiI制限部位(配列番号41)を導入するよう設計した。反応条件は以下のとおりとした。

【0779】

PCR II: 軽鎖

H₂O 15.75

10×バッファー 2.5

10×エンハンサー 2.5

dNTP (各10mM) 0.75

工程I反応 2.5

Vκプライマープール (9.1 μM) 0.5

pCALCK (G) L (20 μM) 0.25

Pfx 50 0.25

25 μL

40

50

【0780】

重鎖フォワードプライマー（表11参照のこと）を、SalI制限部位（配列番号96）を導入するよう設計した。反応条件は以下のとおりとした。

【0781】

PCR II：重鎖

H ₂ O	14.25
10×バッファー	2.5
10×エンハンサー	2.5
dNTP（各10mM）	0.75
工程I反応	2.5
pCAL24VH-Fプール（2μM）	2
SalI JH-Revプール（20μM）	0.25
Pfx50	0.25
	25μL

10

【0782】

PCRサーモサイクラー条件は以下のとおりとした。

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；54℃で20秒；68℃で1分間の50サイクル
- 3) 68℃で3分間
- 4) 4℃で維持

20

【0783】

増幅後、PCR反応生成物を、1%アガロースゲルで分離し、重鎖（400bp）および軽鎖（650bp）に対応するバンドを、ゲル抽出（Qiagen）によって精製した。

【0784】

【表 10】

表 10. κ 軽鎖の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
VK1a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGACATCCAGATGACCC AG	57
VK1b	AAggcccagccggccatggccgcccgtGACATCCAGTTGACCC AG	58
VK1c	AAggcccagccggccatggccgcccgtGCCATCCGTTGACCC AG	59
VK2a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGATATTGTGATGACYC AG	60
VK3a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGTTGACGC AG	61
VK3b	AAggcccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGTTGACAC AG	62
VK3c	AAggcccagccggccatggccgcccgtGAAATAGTGATGACG CAG	63
VK4a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGACATCGTGATGACCC AG	64
VK5a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGAAACGACACTCACG CAG	65
VK6a	AAggcccagccggccatggccgcccgtGAAATTGTGCTGACTC AG	66
VK6b	AAggcccagccggccatggccgcccgtGATGTTGTGATGACAC AG	67
リバースプライマー		配列番号
pCALCK (G)L	CTCCTTATTAATTAATTAGCACTCTCCCCTGTTGA AGCTCTTTG	68

【0785】

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1. I g 重鎖の増幅のためのプライマー		
フォワードプライマープール		配列番号
pCal30 VH1a	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGGTCAGCT GGTGCAG	42
pCal30 VH1b	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGGTCCAGCT TGTGCAG	43
pCal30 VH1c	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCASAGGTCCAGCT GGTACAG	44
pCal30 VH1d	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACARATGCAGCT GGTGCAG	45
pCal30 VH2a	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGATCACCTT GAAGGAG	46
pCal30 VH3a	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCAGARGTGCAGCT GGTGGAG	47
pCal30 VH4a	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGSTGCAGCT GCAGGAG	48
pCal30 VH4b	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGGTGCAGCT ACAGCAG	49
pCal30 VH5a	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCAGARGTGCAGCT GGTGCAG	50
pCal30 VH6	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGGTACAGCT GCAGCAG	51
pCal30 VH7	ggctttgctaccgtagcgCAGGCGGCCGCACAGGTSCAGCT GGTGCAA	52
リバースプライマープール		配列番号
3' SalIJH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG	97
3' SalIJH3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG	98
3' SalIJH6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG	99

【0786】

工程 I I I . オーバーラップ P C R

【0787】

工程 I I I では、工程 I I で作製した重鎖および軽鎖 D N A セグメントを、1) オーバーラップ反応において、軽鎖の 3' 末端および重鎖の 5' 末端とアニーリングする F a b リンカー（以下の表 1 2 参照のこと）と連結し、2) 軽鎖の 5' 末端とアニーリングする S f i フォワードプライマー（以下の表 1 2 参照のこと）および重鎖の 3' 末端とアニーリングする J H リバースプライマー（上記の表 1 1 参照のこと）を用いて増幅し、それによって、軽鎖ーリンカーー重鎖を含有する 1 2 0 0 塩基対（b p）の抗体断片の増幅が可能となった。反応条件は以下のとおりとした（リンカーは、上記の実施例 2 に記載されるように作製した）。

【0788】

10

20

30

40

H ₂ O	24.5
10×バッファー	5
10×エンハンサー	5
dNTP (各10mM)	1.5
軽鎖	5
重鎖	5
リンカー	2
SfiI/F/JH-Rプライマー (20μM)	1
Pfx50	1
	50μL

10

【0789】

PCRサーモサイクラー条件は以下のとおりとした。

リンカーを用いるオーバーラップ

1) 94℃で2分間

2) 94℃で15秒；68℃で1分間の15サイクル

プライマーを加える

3) 94℃で2分間

4) 94℃で15秒；60℃で20秒；68℃で1分間の30サイクル

20

5) 68℃で3分間

6) 4℃で維持

【0790】

増幅後、PCR反応生成物軽鎖ーリンカーー重鎖を、1%アガロースゲルで分離し、ゲル抽出 (Qiagen) によって精製した。

【0791】

工程IV. C_H1領域の導入

【0792】

オーバーラップ後、増幅された軽鎖ーリンカーー重鎖を、SalIを用いて消化し、SalI消化された重鎖定常領域1 (CHγ1領域) とライゲーションし、重鎖定常領域の3'末端にSfiI制限部位を導入した。ライゲーション反応条件は以下のとおりとした。

30

2μlのライゲーション反応バッファー

2μlのC_H1

5μlの、工程IIIから得られた1.2kBのゲル精製された生成物

10μlの水

1μlのT4リガーゼ

【0793】

ライゲーション反応混合物を、室温で30分間インキュベートした。

【0794】

ライゲーション後、SfiIフォワードおよびリバースプライマー (以下の表12参照のこと) を用いてPCRによって全長Fabを増幅し、その結果、1.45kbの断片が得られた。反応条件は以下のとおりとした。

40

【0795】

H ₂ O	31.5
10×バッファー	5
10×エンハンサー	5
dNTP (各10mM)	1.5
ライゲーション反応混合物	5
Sfi F/Rプライマー (20 μM)	1
Pfx 50	1
50 μL	

10

【0796】

PCRサーモサイクラー条件は以下のとおりとした。

- 1) 94℃で2分間
- 2) 94℃で15秒；60℃で20秒；68℃で1分間の30サイクル
- 3) 68℃で3分間
- 4) 4℃で維持

【0797】

反応生成物は、軽鎖および重鎖が単一カセット中に一緒に連結した1.45 k Bの断片であった。

【0798】

20

【表12】

表12. 工程IIIおよび工程IV オリゴヌクレオチド		
オリゴヌクレオチド		配列番号
Fab リンカー	GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAATTAATTAAT AAGGAGGatataattatgaaaaagacagctatcgcatgcaGTGGC ACTGGCTGGCTTTGCTACCGTAGCGCAGGCGGCC GCA	100
Sfi フォワード	TCGCggcccagccggccatggc	84
Sfi リバース	TGCGGCCGGCCTGGCCGA	85
CHI 断片	gtcgaccaaaggtcgcgtgtttcccgctggctcgtcttctaatctaccttgg tggtaccgctgctctgggttgccgtgtaagactacttcccggaaccgggtacc gtttcttggaactctggtgctctgacctctgggtttcacaccttcccgctgtctg cagtcttctgggtgtactctctgtcttctgttaccgttcgcttcttctctgggt accagacctacatctgcaacgttaaccacaaccgtetaacaccaaagttgac aagaaagttgaaccgaaatcttgccctgcgatcgccgagggccgcgcacc atcaccatcaccatggcgcataccggtacgacgttccggactacgcttctactag t	101

30

【0799】

工程V. Sfiを用いる消化およびpCAL発現ベクターへのクローニング

40

【0800】

オーバーラップPCR反応およびPCR産物の精製後、反応生成物をSfi Iを用いて消化した。30 μlの溶出液（上記を参照のこと）に、消化のために以下を加えた。

【0801】

4 μ l	反応バッファー2 (New England Biolabs)
0. 4 μ l	BSA
1. 6 μ l	SfiI 酵素 (New England Biolabs)
4 μ l	H ₂ O
40 μ l	総容量

【0802】

反応物を 37℃で1時間インキュベートした。消化後、消化されたオーバーラップ産物を1%アガロースゲルで分離し、抗体(約1.45kB)に対応するバンドを、ゲル抽出(Qiagenゲル抽出精製キットカタログ番号28706)によって精製した。手短には、ゲル切片を、500 μ lのバッファーQC (Qiagen)を用いて消化した。150 μ lのイソプロパノールを加えて消化し、サンプルをQiaspinカラムにアプライした。カラムをバッファーPE (Qiagen)を用いて2回洗浄し、サンプルを30 μ lのEBバッファー(Qiagen)に溶出する。約15 ng/ μ lの消化されたサンプルが、約1 μ gのPCRオーバーラップ産物から回収される。

10

【0803】

最後に、消化されたオーバーラップ産物を、pCAL細菌発現ベクター(配列番号86)中にライゲーションした。ライゲーション反応条件は、以下のとおりとした。

【0804】

20

25 ng	SfiI 消化された pCAL ベクター
25 ng	消化されたオーバーラップ産物
1 μ l	T4 リガーゼ (NEB カタログ番号 MC202L、400,000 ユニット/ml)
20 μ l	総容量

【0805】

サンプルを室温で1時間ライゲーションした。ライゲーションの1 μ lを、4 μ lのH₂Oで希釈し、その後形質転換に進んだ。

【0806】

30

工程VI. 大腸菌への形質転換

【0807】

ライゲーション後、ライゲーション産物を、DH5 α 最大効率細胞(Invitrogen; カタログ番号18258; 遺伝子型: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1)に形質転換した。手短には、1 μ lのライゲーション産物(1/5希釈)を50 μ lのDH5 α に加え、氷上で30分間インキュベートした。形質転換は、42℃で45秒の熱ショックと、それに続く、氷上で2分間によって達成した。0.9 mLのSOC培地を加え、細胞を、振盪しながら37℃で1時間回復させた。細胞を、カルベニシリン(100 μ g/mL)および20 mMグルコースを補給したLBプレート上に播種した。プレートを、37℃で一晩インキュベートした。

40

【0808】

工程VII. 個々のコロニーの選択

【0809】

合計88の個々のコロニーを選択し、96ウェルプレート中の1カルベニシリン(100 μ g/mL)を補給したSuper Broth (SB) 1 mL中、37℃で2時間増殖させた。各培養物の500 μ lを、40 mMグルコース(最終20 mM)および100 μ g/mLのカルベニシリンを補給したSB500 μ lとともに、別の96ウェル形式細菌プレートに移すことによって娘プレートを作製した。元のプレートすなわち母プレートに、100 μ g/mLカルベニシリンを補給したSB500 μ lを供給した。元のプレー

50

トを、30℃で一晩増殖させ、娘プレート（グルコースを含有する）を37℃で一晩増殖させた。30℃のプレートから得た細胞溶解物を、細菌ELISAに使用し（以下の実施例4を参照のこと）、37℃のプレート培養物を、mini-prep DNA調製（Qiagen）に使用した。

【0810】

例4

RSV Fタンパク質との抗体結合

【0811】

この例では、例2および3で作製したFab抗体を、精製RSV F1溶解物と結合するその能力についてELISAによって試験した。手短には、50μLの、PBS/3% BSA/0.01%Tween20を用いて1容量を合計3容量に希釈した、細菌細胞溶解物を、RSV F1溶解物を用いて予めコーティングした96ウェルELISAプレートに加えた（上記の実施例1参照のこと）。プレートを37℃で2時間、あるいは、4℃で一晩インキュベートし、続いて、洗浄バッファー（PBS/0.05%Tween20）で4回洗浄した。50μLの、PBS/3%BSA/0.01%Tween20で1:1000希釈した、ヤギ抗ヒトIgGF(ab)-HRP抗体（Jackson Labsカタログ番号109-036-097）を加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。洗浄バッファーで6回洗浄した後、50μLの1:1v/v TMB:過酸化水素溶液（Pierce、カタログ番号34021）を加え、7分間発色させた。50μLの2N H₂SO₄を添加することによって反応を直ちに停止させ、ELISAプレートリーダーを使用して450nmでの吸光度を測定した。0.5を超える（0.5~0.9は中程度の結合、>1は強い結合）OD₄₅₀およびバックグラウンドを3倍上回る反応によって正の結合が示された。

【0812】

RSV F1溶解物との結合に加えて、いくつかの陽性および陰性対照抗原も使用した。血液バンクドナーのプールから得た血漿（フィコールハイパック分離後に回収および凍結され、1:1000希釈された）を、RSV F1溶解物結合の陽性対照として使用した。各細菌細胞溶解物が無傷のFabを含有することを調べるための陽性対照として、Afinipureヤギ抗ヒトF(ab)₂抗体（1μg/ml Jackson Immunoresearchカタログ番号109-006-097）を使用して、無傷のFabを捕獲するために96ウェルELISAプレートをコーティングした。この抗体は、IgG抗体のF(ab)部分とのみ結合する。次いで、抗HAペルオキシダーゼ（Roche、カタログ番号12013819001；細菌性発現されたFabは、HAタグを有する）を使用することによってFab発現を検出した。任意のタンパク質とのFab結合の陰性対照としてアクチン（1μg/ml、Sigmaカタログ番号A3653）を使用し、ELISA反応の陽性対照として、マウス抗アクチン抗体（1.25μg/ml、Sigmaカタログ番号A3853）およびヤギ抗マウスIgGF(ab)-HRP抗体（Santa Cruz Biotechカタログ番号SC3697）を使用した。マウス抗RSV mAb（クローン2F7、マウス腹水、カタログ番号ab43812、Abcam）も、ELISAプレートにRSV Fタンパク質を結合するためにこの抗体が使用され、したがって、ヒト抗RSV抗体のスクリーニングの際にELISAプレート上に存在したので、RSV Fタンパク質との結合の特異性についての陰性対照として含めた。

【0813】

A. EBVによって形質転換されたB細胞から作製されたFabに対する細胞溶解物の結合（例2、セクションAおよびC、カップ軽鎖、pCALベクター中にクローニングを参照）

【0814】

上記の実施例2において作製した88種の細胞溶解物を、その1)抗Fab抗体と結合する能力および2)RSV F1溶解物と結合する能力についてELISAによって試験した。ELISAによって、88種の細胞溶解物のうち76種が、Fab産生について陽性であるのに対し、88種の細胞溶解物のうち59種がRSV F溶解物と結合すること

10

20

30

40

50

が確認された。確認 E L I S A によって、76種の細胞溶解物のうち72種が実際に F a b を産生しており、最初の59種の陽性ヒットのうち46種が、R S V F 溶解物との結合剤として再確認されることが示された。

【0815】

陽性結合剤のうち3種を、対応する D N A 調製物の D N A 塩基配列決定によって同定した。配列決定によって、それらはすべて、以下の軽鎖および重鎖を有する F a b 58c5として同定された同一配列を有することが示された。

【0816】

F a b 58c5

軽鎖

10

EIVMTQSPSSLSASIGDRVITITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVPSRFTGSGYGTDFSVTISSLQP
EDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号5)

重鎖

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNTYYTPSLKSRLSMSLETQSQF
SLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDSWGQTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号1
)

【0817】

B. 単細胞選別 (実施例3参照のこと) から作製された F a b に対する、細胞溶解物の結合

20

【0818】

結果は、例3において作製した88種の細胞溶解物のうち64種が、R S V F 1 タンパク質と結合することを示した。対応する D N A 調製物の D N A 塩基配列決定によって、24種の陽性結合剤を同定した。

【0819】

同定された陽性結合剤のうち1種が、以下の軽鎖および重鎖を有する F a b s c 5 であった。

【0820】

F a b s c 5

軽鎖

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQNIKNYLNWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYSCQQSYNNQLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号13)

重鎖

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCTVSGDSISGSNWWNVWRQPPGKGLEWIGEIIYRGTTNYKSSLKGRVTMSVDTSKNQFS
LKLTSVTAADTAVYYCARGGRSTFGPDYIIYMDVWGRGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号9
)

【0821】

40

C. E B V 形質転換 B 細胞から作製された F a b に対する細胞溶解物の結合 (例2、セクション B および C、カップまたはラムダ軽鎖、p C A L I T * ベクター中にクローニングを参照)

【0822】

次の実験のために、E L I S A アッセイを以下の修飾と共に上述のように実施した: 58c5 および s c 5 F a b を発現する細菌上清を、R S V F 1 溶解物 (組換え供給源) および H E p 2 溶解物 (天然 R S V F 供給源) に、それぞれ結合させるために、3% B S A および 0.01% Tween20 を含有する P B S において 1:3 希釈で陽性コントロールとして用いた。

【0823】

50

F a b 3 0 D 8

3 0 D 8 について、上記例 2 において作製した細胞溶解物を、それらの 1) 抗 F a b 抗体と結合する能力、および 2) R S V F 1 溶解物と結合する能力について E L I S A によって試験した。E L I S A によって、7 0 の細胞溶解物が、F a b 産生について陽性であるのに対し、7 7 の細胞溶解物のうち 6 3 が R S V F 溶解物と結合することが確認された。8 のクローンでの確認 E L I S A によって、8 つの細胞溶解物のうち 8 つが実際に F a b を産生しており、試験した 8 つのヒットのうち 6 つが、R S V F 溶解物とのバインダー（結合剤）として再確認されることが示された。陽性バインダーのうち 3 つを配列決定し、すべてが次の軽鎖および重鎖を有する同じ抗体（3 0 D 8）を包含した。

軽鎖

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRRDRPSGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAG
DEADYYCQVWDSSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS（配列番号 395）

重鎖

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHITIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNGNTEYAQKIQRVTMTMDTSTSTVY
MELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHWGQGTLTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC（配列番号 396）

【0 8 2 4】

F a b 1 0 4 E 5

1 0 4 E 5 について、上記例 2 において作製した 8 8 の細胞溶解物を、それらの 1) 抗 F a b 抗体と結合する能力、および 2) R S V F 1 溶解物と結合する能力について E L I S A によって試験した。E L I S A によって、1 5 の細胞溶解物が、F a b 産生について陽性であるのに対し、8 8 の細胞溶解物のうち 4 つが R S V F 溶解物と結合することが確認された。2 4 のクローンでの確認 E L I S A によって、2 4 の細胞溶解物のうち 1 0 が実際に F a b を産生しており、試験した 2 4 のヒットのうち 7 つが、R S V F 溶解物とのバインダーとして再確認されることが示された。陽性バインダーのうち 2 つは、配列決定され、次の軽鎖および重鎖を有する同じ抗体（1 0 4 E 5）を包含した。

軽鎖

DIQMTQSPSSLPASVGDRVITICRASQNIKTYLNWYQQKPGRAPKLLISAVSNLQSGVPSRFSGTGSGTDFTLTISLQ
EDFATYYCQQSFISPLTFGGGAKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号 397）

重鎖

QVQLEQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGFTFDYITISWVRQAPGQRLEWLGRIIPSLGETNYAHKLQGRVTITADKATSVVY
MDLSDLTSEDAVYYCAFRITGPVDWVWDYGMVDVWGQGTTSVSSASSKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC（配列番号 398）

【0 8 2 5】

F a b 3 8 F 1 0

3 8 F 1 0 について、上記例 2 において作製した 8 8 の細胞溶解物を、それらの 1) 抗 F a b 抗体と結合する能力、および 2) R S V F 1 溶解物と結合する能力について E L I S A によって試験した。E L I S A によって、6 5 の細胞溶解物が、F a b 産生について陽性であるのに対し、8 8 の細胞溶解物のうち 4 0 が R S V F 溶解物と結合することが確認された。1 6 のクローンでの確認 E L I S A によって、1 6 の細胞溶解物のうち 1 3 が実際に F a b を産生しており、試験した 1 6 の陽性ヒットのうち 1 3 が、R S V F 溶解物とのバインダーとして再確認されることが示された。陽性バインダーのうち 5 つは、配列決定され、すべてが次の軽鎖および重鎖を有する同じ抗体（3 8 F 1 0）を包含した。

軽鎖

DIQLTQSPPTLSASVGRVSMTCRASQISINWLAWYQQKPGKAPKLLIQKASNLEDGVPSRFTASGFGTEFTLTISLQ
DDFATYYCQQYNSYSGLSFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNS

QESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (配列番号399)

重鎖

EVQLLESGGDVVQPGKSLRLSCTASGFSITDFGIHWVRQAPGKGLEWVALISYNEVNIHYGESVRGRFTISRDIKNTVY
LQMNGLRPEDTGVYFCARDVWEDSWLSLACFQEWGQGSLLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号400)

【0826】

F a b 1 4 G 3

1 4 G 3について、上記例2において作製した88の細胞溶解物を、それらの1) 抗F a b抗体と結合する能力、および2) R S V F 1溶解物と結合する能力についてE L I S Aによって試験した。E L I S Aによって、71の細胞溶解物が、F a b産生について陽性であるのに対し、88の細胞溶解物のうち13がR S V F溶解物と結合することが確認された。16のクローンでの確認E L I S Aによって、16の細胞溶解物のうち14が実際にF a bを産生しており、試験した16の陽性ヒットのうち5つが、R S V F溶解物とのバインダーとして再確認されることが示された。陽性バインダーのうち4つは、配列決定され、すべれが次の軽鎖および重鎖を有する同じ抗体(1 4 G 3)を包含した。

10

軽鎖

DVVMQTPTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLASYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEADDVGIIYYCMQRMFPFTFGQGTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (配列番号401)

20

重鎖

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGASISSDNHYWSWIRQPPGKGLEWIASIYYTGGTNYNPSLKSRLALSIDTSGDQF
SLKLSSVTAADTAVYYCVRGLFFITARPYYFDLWGRGTLVAVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC (配列番号402)

【0827】

F a b 9 0 D 3

9 0 D 3について、上記例2において作製した88の細胞溶解物を、それらの1) 抗F a b抗体と結合する能力、および2) R S V F 1溶解物と結合する能力についてE L I S Aによって試験した。E L I S Aによって、80の細胞溶解物が、F a b産生について陽性であるのに対し、88の細胞溶解物のうち2つがR S V F溶解物と結合することが確認された。8つのクローンでの確認E L I S Aによって、8つの細胞溶解物のうち7つが実際にF a bを産生しており、試験した8つの陽性ヒットのうち3つが、R S V F溶解物とのバインダーとして再確認されることが示された。陽性バインダーのうち2つは、配列決定され、すべれが次の軽鎖および重鎖を有する同じ抗体(9 0 D 3)を包含した。

30

軽鎖

AIRLTQSPSSLSASVGDVRSITCRASQSI SNFLNWWYQQKPGRAPKLLISAASSLQGGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQTYSISLYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (配列番号403)

重鎖

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVSGSFTLKNYEMNWVRQAPGQGLQYISYISSSGNVVKYVDSVQGRFTISRDN
AGNSLYLQMNLR AEDTATYYCVRGFSIDKYDSSVDEYWGQGI AVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号404)

40

【0828】

D. 追加の抗R S V抗体

【0829】

3つの追加の抗体、F a b 5 6 E 1 1、1 7 C 9および6 9 F 6を、上記例2、セクションBおよびCに記載するように分離し、カッパまたはラムダ軽鎖の双方のためのプライマーを用いて増幅した。これらの重鎖および軽鎖の配列を以降に示す。

【0830】

50

F a b 5 6 E 1 1

軽鎖

QAVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPRLIISEVTKRPSGVPGRFSGSKSGNTASLTVSGL
 QAEDEADYYCSSYAGSRHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
 AGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPAEC (配列番号453)

重鎖

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGVSINSNNYFWAWIRQPPGKGLEWIGNIYYGGSTHYNASLQSRVTISVDTSKSQF
 SLKLNSVTSADTAVYYCAASESIFWDYYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号452)

10

【0831】

F a b 1 7 C 9

軽鎖

EIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNLQP
 EDFATYFCQQANSFPRTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号455)

重鎖

QVQLQWAGAGLVRPSETLSLTCAVYGDSFNDYFWTWIRQTPGKGLEWIGEISHSGSTNYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSL
 KLSAVTAADTTVYFCARGVRSRPPPSYRGSGSPPIYHYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (配
 列番号454)

20

【0832】

F a b 6 9 F 6

軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTISQCASQDISNYLNWYQQKPGKAPRLIIYDASYLDTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP
 EDFATYYCQYDDLGGFTFGPGTKVDVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号457)

重鎖

QMQLVQSGAEVRKPGESLKIACKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEWLGIIFPNDSDATYSPSFQGVMTMSVDKSI STAY
 LQWNSLKASDTAVYFCARQYYLGSFESWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号456)

30

【0833】

単離された F a b の抗体ドメインおよび C D R 領域を、以下の表 1 3 A ~ 1 3 C に提供
 する。

【0834】

【表 1 3 A】

表 13A. 分離 Fab の抗体ドメインおよび VH CDR 領域					
Ab	重鎖	VH ドメイン	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
58c5	配列番号 1	配列番号 1 のアミノ酸 1-125	GASINSDNYY WT (配列番号 2)	HISYTGNTYYT PSLKS (配列番号 3)	CGAYVLISNCG WFDS (配列番号 4)
sc5	配列番号 9	配列番号 9 のアミノ酸 1-125	GDSISGSNWW N (配列番号 10)	EIYYRGTTNYK SSLKG (配列番号 11)	GGRSTFGPDYY YYMDV (配列番号 12)
30D8	配列番号 396	配列番号 396 のアミノ酸 1-121	GFTFSGHTIA (配列番号 405)	WVSTNNGNTEY AQKIQG (配列番号 406)	EWLVMGGFAFD H (配列番号 407)
104E5	配列番号 398	配列番号 398 のアミノ酸 1-125	GGTFDITYTIS (配列番号 411)	RIIPSLGETNY AHKLQG (配列番号 412)	RITGPVDVWWD YGMDV (配列番号 413)
38F10	配列番号 400	配列番号 400 のアミノ酸 1-124	GFSITDFGIH (配列番号 417)	LISYNEVNIHY GESVRG (配列番号 418)	DVWEDSWLSLA CFQE (配列番号 419)
14G3	配列番号 402	配列番号 402 のアミノ酸 1-125	GASISSDNHY WS (配列番号 423)	SIYYTGGTNYN PSLKS (配列番号 424)	GLFFITARPYW YFDL (配列番号 425)
90D3	配列番号 404	配列番号 404 のアミノ酸 1-123	GFTLKNYEMN (配列番号 429)	YISSSGNVVKY VDSVQG (配列番号 430)	GFSIDKYDSSV DEY (配列番号 431)
56E11	配列番号 452	配列番号 452 のアミノ酸 1-124	GVSINSNNYF WA (配列番号 458)	NIYYGGSTHYN ASLQS (配列番号 459)	SESIFWDYYYG LDV (配列番号 460)
17C9	配列番号 454	配列番号 454 のアミノ酸 1-133	GDSFNDYFWT (配列番号 464)	EISHSGSTNYS PSLKS (配列番号 465)	GVRSRPPPSYR GSGSPYYHYG MDV (配列番号 466)
69F6	配列番号 456	配列番号 456 のアミノ酸 1-118	GYSFTSYWIA (配列番号 470)	IIFPNDSDATY SPSFQG (配列番号 471)	QYYLGSEFES (配列番号 472)

【表 1 3 B】

表 13B. 分離 Fab の抗体ドメインおよび VL CDR 領域					
Ab	軽鎖	VL ドメイン	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
58c5	配列番号 5	配列番号 5 のアミノ酸 1-107	QASQDISTYLN (配列番号 6)	GASNLET (配列番号 7)	QQYQYLPYT (配列番号 8)
sc5	配列番号 13	配列番号 13 のアミノ酸 1-107	RASQNIKNYLN (配列番号 14)	AASLTQS (配列番号 15)	QQSYNNQLT (配列番号 16)
30D8	配列番号 395	配列番号 395 のアミノ酸 1-110	GANNIGSQNVH (配列番号 408)	DDRDRPS (配列番号 409)	QVWDSSRDQAV I (配列番号 410)
104E5	配列番号 397	配列番号 397 のアミノ酸 1-107	RASQNIKTYLN (配列番号 414)	AVSNLQS (配列番号 415)	QQSFSIPLT (配列番号 416)
38F10	配列番号 399	配列番号 399 のアミノ酸 1-108	RASQSISNWL (配列番号 420)	KASNLED (配列番号 421)	QQYNSYSGLS (配列番号 422)
14G3	配列番号 401	配列番号 401 のアミノ酸 1-113	RSSQSLLDSDD GNTYLD (配列番号 426)	TLSYRAS (配列番号 427)	MQRMEFPFT (配列番号 428)
90D3	配列番号 403	配列番号 403 のアミノ酸 1-107	RASQSISNFLN (配列番号 432)	AASSLQG (配列番号 433)	QQTYISLYT (配列番号 434)
56E11	配列番号 453	配列番号 453 のアミノ酸 1-111	TGTSSDVGGYN YVS (配列番号 461)	EVTKRPS (配列番号 462)	SSYAGSRHVV (配列番号 463)
17C9	配列番号 455	配列番号 455 のアミノ酸 1-107	RASQNINTWLA (配列番号 467)	AASFLQS (配列番号 468)	QQANSFPRT (配列番号 469)
69F6	配列番号 457	配列番号 457 のアミノ酸 1-109	QASDISNYLN (配列番号 473)	DASYLDT (配列番号 474)	QQYDDLRRGGFT (配列番号 475)

【表 1 3 C】

表 13C. 重鎖 CDR1 (カバトナンバリング)			
Ab	VH CDR1	Ab	VH CDR1
58C5	SDNYWT (配列番号 435)	14G3	SDNHYWS (配列番号 440)
sc5	GSNWWN (配列番号 436)	90D3	NYEMN (配列番号 441)
30D8	GHTIA (配列番号 437)	56E11	SNNYFWA (配列番号 482)
104E5	TYTIS (配列番号 438)	17C9	DYFWT (配列番号 483)
38F10	DFGIH (配列番号 439)	69F6	SYWIA (配列番号 484)

10

【0 8 3 7】

例 5

単離 F a b の発現および精製

【0 8 3 8】

この実施例では、R S V F 溶解物と結合すると、細胞溶解物を使用する E L I S A に
よって決定された個々の F a b 抗体を、続いて、発現させ、カラムクロマトグラフィーを
使用して細菌細胞から精製した。

20

【0 8 3 9】

個々の F a b 抗体各々をコードする D N A を、発現のために T o p 1 0 細胞 (Invitrog
en) に形質転換した。各 F a b 抗体を、2 L の S B 中、3 7 ° C で 0 . 8 の O D₆₀₀ まで
増殖させた。1 mM I P T G の添加によってタンパク質発現を誘導し、3 0 ° C で一晩生
じさせた。発現後、細菌培養物を遠心分離し、細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害剤 (完
全プロテアーゼ阻害薬カクテル、Santa Cruz Biotech、カタログ番号 s c - 2 9 1 3 1)
を含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 1 0 m L に再懸濁した。再懸濁した細胞にリゾチ
ーム (0 . 2 m g) を加え、混合物を室温で 1 5 分間インキュベートした。細胞を 2 回の
凍結／解凍サイクルによって溶解した。手短には、再懸濁した細菌細胞を、エタノール／
ドライアイス浴中で凍結し、続いて、3 7 ° C の水浴中で解凍した。溶解すると、細菌溶解
物を 1 8 0 0 0 r p m で遠心分離し、上清を濾過し、0 . 4 ミクロンフィルターを通すこ
とによって滅菌した。

30

【0 8 4 0】

次いで、各個々の F a b 抗体を、アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精
製した。手短には、濾過した上清を、抗 F a b / プロテイン A カラム上をゆっくりと通し
、F a b タンパク質が結合するのを可能にした。5 0 m L P B S を用いて洗浄した後、
9 m L の 0 . 2 M グリシン、p H 2 . 2 を用いて結合している F a b を溶出し、1 m L の
2 M T r i s を含有するコニカルチューブに回収し、それによって、溶出されたタンパ
ク質を中和した。次いで、溶出した F a b を、1 0 K M W C O 透析カセット (Pierce)
を使用して 4 L の P B S に対して透析した。タンパク質を 4 ° C で一晩保存し、続いて、1
0 k D a A m i c o n U l t r a F i l t e r (Millipore) を使用して容量 1 m L に
濃縮した。次いで、精製 F a b 抗体各々の、R S V F 溶解物 (組換え供給源、実施例 1
A) および H E p 2 溶解物 (天然供給源、実施例 1 B) との結合を E L I S A によって再
確認した (上記の実施例 4 参照のこと)。さらに、精製 F a b 抗体各々を、R S V を中和
するその能力について、実施例 6 に記載されるアッセイを使用して試験した。

40

【0 8 4 1】

F a b 5 8 c 5 および s c 5 の、R S V F 溶解物および精製 R S V F タンパク質との
結合

50

【0842】

抗体58C5およびsc5の、トランスフェクトされた293細胞から得られた捕獲されたRSV Fタンパク質（組換え型）またはRSV A2感染He p 2細胞から得られた精製RSV Fタンパク質（天然）のいずれかとの結合を、ELISAによって測定した。結果は、Fab 58c5およびFab sc5は、RSV Fタンパク質（組換え型）と用量依存的に結合するが、sc5だけが、精製Fタンパク質（天然）を認識できたことを示す（以下の表14～15参照）。

【0843】

【表14】

表14. Fab sc5および58c5の、捕獲されたRSV F溶解物（組換え型）との結合		
Fab [μ g/ml]	sc5	58c5
2	2.963	2.9165
0.4	2.827	2.9705
0.08	2.151	2.518
0.016	0.651	1.433
0.0032	0.3205	0.5905
0.00064	0.284	0.415
0.000128	0.337	0.3785
0.0000256	0.22	0.2485

【0844】

【表15】

表15. Fab sc5および58c5の、精製RSV Fタンパク質（天然）との結合		
Fab [μ g/ml]	sc5	58c5
2	2.623	0.417
0.4	2.704	0.2665
0.08	2.744	0.1505
0.016	2.66	0.098
0.0032	1.7685	0.0805
0.00064	0.6035	0.087
0.000128	0.2325	0.1065
0.0000256	0.1445	0.13

【0845】

RSV F溶解物および精製されたRSV Fタンパク質へのFab 30D8、104E5、38F10、90D3および14G3の結合

【0846】

Fab 30D8、104E5、38F10、90D3および14G3の結合についての推定EC50sを以下の表16に記載する。Fab 30D8および14G3の両方は、およそ5 nM（3.8 nMおよび8.2 nM、それぞれ）のEC50でRSV F1溶解物（組換え）と結合した。Fab 104E5および90D3は、RSV株A2のFタンパク質と約80 pMのEC50で結合すると共に、38F10は天然RSV株A2のFタンパク質と177 pMのEC50で結合した。

【0847】

【表 1 6 A】

表 16. F a b 3 0 D 8、1 0 4 E 5、3 8 F 1 0、9 0 D 3 および 1 4 G 3 についての推定 E C 5 0		
精製 Fab	EC50	抗原供給源
30D8	3.8 nM	RSV F1 溶解物(組換え)
104E5	80 pM	HEp2 溶解物(天然)
38F10	177 pM	HEp2 溶解物(天然)
90D3	72 pM	HEp2 溶解物(天然)
14G3	8.2 nM	RSV F1 溶解物(組換え)

10

【0 8 4 8】

精製された R S V F タンパク質への F a b 5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 の結合

【0 8 4 9】

F a b 5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 の結合についての推定 E C 5 0 s を以下の表 1 6 B (1 6) に記載する。F a b 5 6 E 1 1 は、5 4 5 p M の E C 5 0 で R S V F 1 溶解物(組換え)と結合した。F a b 1 7 C 9 および 6 9 F 6 は、R S V F 1 溶解物(組換え)と 1 3 6 p M および 1 3 5 p M のそれぞれの E C 5 0 で結合した。

20

【0 8 5 0】

【表 1 6 B】

表 16. F a b 3 0 D 8、1 0 4 E 5、3 8 F 1 0、9 0 D 3 および 1 4 G 3 についての推定 E C 5 0		
精製 Fab	EC50	抗原供給源
56E11	545 pM	RSV F1 溶解物(組換え)
17C9	136 pM	RSV F1 溶解物(組換え)
69F6	135 pM	RSV F1 溶解物(組換え)

30

【0 8 5 1】

例 6

R S V 中和アッセイ

【0 8 5 2】

この例では、抗 R S V 抗体を、プラーク減少アッセイによって評価される、溶液中で R S V ウイルスと結合し、中和するその能力について分析した。この実験では、R S V ウイルスおよび抗体を標的細胞の不在下でプレインキュベートした。次いで、細胞に混合物を加え、本明細書に記載される標準プラーク減少アッセイによってウイルス感染を測定した。抗 R S V 抗体を、R S V A 2 (A T C C カタログ番号 V R - 1 5 4 0)、R S V B - w a s h (A T C C カタログ番号 V R - 1 5 8 0、1 8 5 3 7 株) および R S V B - 1 (A T C C カタログ番号 1 4 0 0) を含めた R S V ウイルスの数種の株を中和するその能力について分析した。

40

【0 8 5 3】

V e r o 細胞 (A T C C、カタログ番号 C C L - 8 1 ; Manassas, VA) を、宿主細胞感染に使用した。V e r o 細胞を、1 % L - グルタミン (HyClone、カタログ番号 S H 3 0 0 3 4 . 0 1) および 1 % ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 (HyClone、カタログ番号 S V 3 0 0 1 0) を補給した、1 0 % ウシ胎児血清 (F B S) (HyClone、カタログ番号 S H 3 0 0 7 0 . 0 3) を含む D M E M (HyClone、カタログ番号 S H 3 0 2 8 5 . 0 1) で増殖させた。V e r o 細胞を、5 % C O 2 を含む 3 7 ° C のインキュベーター中で維

50

持し、週に2回継代した。

【0854】

実験の1日目に、24ウェル細胞培養プレートにおいてV e r o細胞を培養した。細胞を、2日目までに細胞単層の形成(>90%コンフルエンス)を可能にする密度(ウェルあたり、およそ 1×10^6 個の細胞)で播種した。2日目に、各抗体を簡素なE a g l eの最小必須培地(EMEM、ATCC、カタログ番号30-2003)で段階希釈した(試験した最終抗体濃: $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$)。RSVウイルスはまた、簡素なEMEMで、 $2 \times 10^3 \text{ pfu}/\text{ml}$ ($100 \text{ pfu}/50 \mu\text{l}$)の濃度に希釈した。そして希釈したRSVウイルスの $110 \mu\text{l}$ を、 $110 \mu\text{l}$ の希釈した抗体溶液各々に加え、ピペティングによって混合した。ウイルス対照サンプルについては、 $110 \mu\text{l}$ の希釈したRSVウイルスを、 $110 \mu\text{l}$ の簡素なEMEMに加えた。抗体-ウイルスまたはウイルス対照混合物を、 37°C で2時間インキュベートした。インキュベーション後、V e r o宿主細胞を含有する24ウェル細胞培養プレートから培養培地をデカントし、次いで、 $100 \mu\text{l}$ のプレインキュベートしたウイルス-抗体またはウイルス対照混合物を各ウェルに移した。各試験および対照サンプルは3連で調製した。次いで、細胞を、15分ごとに混合しながら、 37°C で1時間インキュベートした。

10

【0855】

インキュベーション期間の後、ウイルス-抗体またはウイルス対照混合物を含有する培養培地を吸引し、各ウェルに 1 ml のオーバーレイ培地を加えた(オーバーレイ培地は、EMEM、2%FBS、1%L-グルタミン、0.75%メチルセルロースを含有していた)。次いで、24ウェル細胞培養プレートを、 37°C で(5% CO_2 を用いて)約72時間インキュベートした。細胞プレートを、10%ホルマリンを用いて室温で1時間固定し、 ddH_2O を用いて10回洗浄し、0.05%Tween20を含むPBS中、5%脱脂粉乳(NFDM)を用いて 37°C で1時間ブロッキングした。

20

【0856】

インキュベーション後、ブロッキング溶液をデカントし、各ウェルに $200 \mu\text{L}$ のマウス抗RSV抗体(a b 10018、A b c a m、5%NFDMで1:1000希釈)を加えた。プレートを 37°C で2時間インキュベートし、 ddH_2O で10回洗浄し、各ウェルに $200 \mu\text{L}$ のヤギ抗マウスHRPがコンジュゲートしているIgG(P i e r c e、カタログ番号31432、5%NFDMで1:1000希釈)を加えた。プレートを 37°C で2時間インキュベートした。プレートを ddH_2O で10回洗浄し、各ウェルに $200 \mu\text{L}$ のT r u e B l u e(商標)ペルオキシダーゼ基質(K P Lカタログ番号50-78-02)を加えた。プレートを室温で10分間発展させた。プレートを ddH_2O で2回洗浄し、ペーパータオル上で乾燥させ、青色プラークの数をカウントした。P r i s m(G r a p h P a d)を使用してED50(50%中和の有効希釈)を算出した。次式に従ってプラーク減少率を算出した。

30

プラーク減少率(パーセンタイル) = $(1 - \text{各抗体希釈における平均プラーク数} / \text{ウイルス対照ウェルにおける平均プラーク数}) \times 100$

【0857】

40

データは、以下の表17~19に示されている。表17には、種々のRSV株の各F a bのED₅₀が列挙されている。表18には、F a b 58c5の変動する濃度での、種々のRSV株のプラーク数が列挙されている。表19には、F a b 58c5のプラーク減少率が列挙されている。表20には、F a b 56E11、17C9、69F6および30D8のためのRSV A2のプラーク減少率が列挙されている。結果は、F a b 58c5および30D8が、RSVの3種の株すべてを中和できるが、F a b s c5は、かなり高い抗体濃度であってもRSV A2およびRSV B-1のみを中和することを示す。中和アッセイにおいて得られたデータおよびF a b断片の分子量(約50kDa)に基づいて、RSV A2のインビトロ中和についてのF a b 58c5のED₅₀を約320pMであり、その一方、RSV A2のインビトロ中和についてのF a b 30D8

50

の ED_{50} をおよそ 3 倍低い (107 pM) であると推定した。Fab 30D8 は、RSV B-1 および RSV B/ワッシュに対して Fab 58c5 よりも効果的である。

【0858】

【表17】

表 17. Fab 中和 ED_{50} データ			
抗原	RSV A2	RSV B-1	RSV B/ワッシュ
58c5	320 pM (0.016 $\mu\text{g/mL}$)	840 pM (0.042 $\mu\text{g/mL}$)	500 pM (0.025 $\mu\text{g/mL}$)
sc5	0.016 μM (0.8 $\mu\text{g/mL}$)	0.042 μM (2.1 $\mu\text{g/mL}$)	> 0.2 μM (>10 $\mu\text{g/mL}$)
30D8	107 pM (5.35 ng/mL)	51 pM (2.55 ng/mL)	112 pM (5.6 ng/mL)
104E5	580 pM (29 ng/mL)	ND	ND
38F10	800 pM (40 ng/mL)	ND	ND
14G3	3400 pM (172 ng/mL)	ND	ND
90D3	800 pM (40 ng/mL)	560 pM (28 ng/mL)	660 pM (33 ng/mL)
56E11	930 pM (46.5 ng/mL)	ND	ND
17C9	352 pM (17.6 ng/mL)	ND	ND
69F6	260 pM (13 ng/mL)	ND	ND

NDは未検出

【0859】

【表18】

表 18. Fab 58c5 での中和についての平均プラークカウント							
抗原	10 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	0.4 $\mu\text{g/mL}$	0.08 $\mu\text{g/mL}$	0.016 $\mu\text{g/mL}$	0.003 $\mu\text{g/mL}$	0 $\mu\text{g/mL}$
RSV A2	0	0	0	5.7	28.7	52.3	57.7
RSV B/ ワッ シ ュ	1.3	0.7	0	5	16.3	23.3	26.3
RSV B-1	0.3	0	0	4.7	8.7	11.7	12.3

【0860】

【表19】

表 19. Fab 58c5 での中和についてのプラーク減少率(%)							
抗原	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.003 μg/ml	0 μg/ml
RSV A2	100	100	100	90	50	9.4	0
RSV B/ ワッシ ユ	95	97	100	81	38	11	0
RSV B-1	97.6	100	100	62	29	5	0

10

【0861】

【表20】

表 20. RSV A2 の Fab 56E11、17C9 および 69F6 での中和についてのプラーク減少率(%)							
抗体	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.0032 μg/ml	0.00064 μg/ml
56E11	100	100	98.5	65.98	20.8	0	----
17C9	100	100	99.9	91.2	46.7	3.4	----
69F6	99.7	99.8	99.6	97.5	63.0	2.3	----
30D8	100	100	100	96.1	60.7	31.5	0.8

20

* 30D8を陽性コントロールとして用いた。

【0862】

例7

30

I g G のクローニングおよび発現

【0863】

この例では、RSVを中和する可能性を示したFab抗体を、pCALM哺乳類発現ベクター（配列番号102）へのクローニングによってIgGに変換した。各抗体に対して特異的なプライマーを作製し、最初はpCALベクター（実施例2参照のこと）にクローニングされたような各Fabの重鎖および軽鎖を、PCRによって増幅した。軽鎖増幅の結果、650bpの断片が得られ、重鎖増幅の結果、400bpの断片が得られた。さらに、重鎖および軽鎖のオーバーラップを可能にするリンカーを作製した。リンカーにはまた、標準の重鎖定常領域を含めた。重鎖および軽鎖のオーバーラップの結果、その両端にSfiI制限部位（配列番号41）を有する各抗体の2.1kBのカセットが得られた。各カセットを、SfiIを用いて消化し、pCALMベクター中にクローニングした。細菌における正しい配列を確認した後、Maxi Prepキット（Qiagen）を使用して哺乳類トランスフェクションのためのDNAを単離した。

40

【0864】

各IgGを発現させるために、各pCALMベクターを使用して、約2億個の293F細胞に感染させた結果、約200マイクログラムのIgGが得られた。293fectin（Invitrogen、カタログ番号51-0031）を用いて、293F細胞をトランスフェクトし、IgGを72時間産生させた。トランスフェクションの72時間後、細胞培地を採取し、遠心分離して細胞を除去し、0.4ミクロンフィルターユニットによって濾過滅菌した。精製は、プロテインAカラムを使用してカラムクロマトグラフィーによって達成

50

した。発現された I g G を含有する濾過された培地を、プロテイン A カラムを 2 回通過させた。50 mL の P B S で洗浄した後、I g G を、9 mL の p H 2 . 2 の 0 . 2 M グリシンを用いて溶出し、2 M T r i s に回収し、中和を達成した。溶出物を、10 k D a 透析カセット (Pierce) を使用して 4 リットルの P B S に対して透析した。サンプルを、10 k D a A m i c o n U l t r a (Millipore) を用いて 1 mL に濃縮した。

【0865】

例 8

I g G 結合実験

【0866】

この例では、上記の例 7 で作製した 58c5、30D8、104E5、38F10、14G3、56E11、17C9 および 69F9 の I g G 形態および抗 R S V 抗体モタビズマブ [Wu et al. (2007) J. Mol. Biol. 368(3):652-665] を、R S V F タンパク質 (組換え型) または R S V F タンパク質 (天然) 溶解物と結合するその能力について E L I S A によって試験した (上記の実施例 4 を参照のこと)。結合の推定 E C ₅₀ (各 I g G を滴定することによって決定される) が、以下の表 21 に示されている。30D8 の I g G 形態は、58c5、104E5、38F10、56E11、17C9 および 69F9 の I g G 形態との最も高い親和性を有し、約 10 倍より低い親和性を有した。追加的に 30D8 の I g G 形態は、モタビズマブのものよりも約 10 倍高い R S V A 2 株 F タンパク質に対する親和性を有する。

【0867】

【表 21】

表 21. RSV F タンパク質への IgG 結合		
抗原	IgG EC ₅₀ (推定)	抗原供給源
58c5 の IgG 形態	24 pM	RSV F1 溶解物 (組換え)
30D8 の IgG 形態	2.5 pM	RSV F1 溶解物 (組換え)
104E5 の IgG 形態	14.5 pM	HEp2 溶解物 (天然)
38F10 の IgG 形態	35 pM	HEp2 溶解物 (天然)
14G3 の IgG 形態	251 pM	RSV F1 溶解物 (組換え)
56E11 の IgG 形態	73 pM	RSV F1 溶解物 (組換え)
17C9 の IgG 形態	59 pM	HEp2 溶解物 (天然)
69F6 の IgG 形態	63 pM	RSV F1 溶解物 (組換え)
モタビズマブ	27 pM	HEp2 溶解物 (天然)

【0868】

例 9

I g G R S V 中和アッセイ

【0869】

この例では、上記の例 7 において作製した 58c5、30D8、104E5、38F10、14G3、56E11、17C9 および 69F9 の I g G 形態および R S V 抗体モタビズマブ [Wu et al. (2007) J. Mol. Biol. 368(3):652-665] を、R S V の種々の株を中和するその能力について試験した。さらに、58c5 の I g G 形態を、種々のモノクローナル抗体耐性 R S V エスケープ突然変異体 (M A R M) を中和するその能力について分析した。M A R M は、それに対して作製された抗体によってはもはや中和され得ない突然変異体 R S V 株である。したがって、58c5 の特定の M A R M を中和する能力は、58c5 の結合エピトープが、M A R M が生じた抗体のものとは異なっていることを示す。

【0870】

A. RSVの中和

【0871】

58c5、30D8、104E5、38F10、14G3、56E11、17C9および69F9のIgG形態を、RSVを中和するその能力について試験した（上記の実施例6に記載されるような）。以下の表22～24にデータを示す。表22には、各RSV株のED50（50%中和のための有効希釈）が列挙されている。表23には、種々のRSV株のプラーク数および58c5のIgGの形態の変動する抗体濃度でのものが列挙されている。表24には、変動する抗体濃度での種々のRSV株のプラーク減少率が列挙されている。結果は、58c5、30D8、104E5、38F10、14G3、56E11、17C9および69F9のIgG形態が、種々の濃度でもかかわらずRSVの3種の株すべてを中和できることを示す。69F6のIgG形態はRSV A2株に選択的である。中和アッセイにおいて得られたデータおよびIgG断片の分子量（約150kDa）に基づいて、RSV A2のインビトロ中和の58c5のIgG形態のEC₅₀は、約133pMである。30D8および14G3のIgG形態についての、RSV A2のインビトロ中和のEC₅₀は、それぞれ、89pMおよび106pMである。

10

【0872】

30D8のIgG形態および抗RSV抗体のモタビズマブ [Wu et al. (2007) J. Mol. Biol. 368(3):652-665] の中和活性をRSVの3株について比較すると、IgGの30D8がより一層強力な中和抗体であることが示される。RSV A2株について、30D8のIgG形態は中和においての4倍向上を示す（89pM対360pM）。30D8のIgG形態はモタビズマブよりRSV B-1株を中和することで15倍優れている。RSV B/ワッシュ株について、30D8のIgG形態は中和において25倍の増加を示す（115pM対2.9nM）。追加的に、30D8のIgG形態は、RSVのロングおよびB/9320株の両方を中和することが示された。

20

【0873】

【表 2 2】

表 22. IgG 中和データ (ED ₅₀)					
抗原	RSV A2	RSV B-1	RSV B/ワッ シュ	RSV ロング	RSV B/9320
58c5 の IgG 形 態	133 pM (0.02 μg/mL)	280 pM (0.042 μg/mL)	193 pM (0.029 μg/mL)	ND	ND
30D8 の IgG 形 態	89 pM (13.3 ng/mL)	55 pM (8.3 ng/mL)	115 pM (17.2 ng/mL)	95 pM	85 pM
104E5 の IgG 形態	800 pM (122 ng/mL)	1.7 nM (253 ng/mL)	8 nM (1.2 μg/mL)	ND	ND
38F10 の IgG 形態	553 pM (83 ng/mL)	1.4 nM (212 ng/mL)	5.3 nM (789 ng/mL)	ND	ND
14G3 の IgG 形 態	106 pM (16 ng/mL)	10.7 nM (1.6 μg/mL)	4.5 nM (683 ng/mL)	ND	ND
90D3 の IgG 形 態	1.8 nM (263 ng/mL)	1.4 nM (211 ng/mL)	1.4 nM (207 ng/mL)	ND	ND
56E11 の IgG 形態	853 pM	295 pM	282 pM	ND	ND
17C9 の IgG 形 態	363 pM	329 pM	860 pM	ND	ND
69F6 の IgG 形 態	225 pM	>67 nM	>67 nM	ND	ND
モタビズマブ	360 pM	833 pM	2.9 nM	ND	ND

【 0 8 7 4 】

【表 2 3】

表 23. 58c5 の IgG 形態での中和についての平均プラークカウン ト							
抗原	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.003 μg/ml	0 μg/ml
RSV A2	0.3	0	0.7	16.3	31	40.3	57.7
RSV B/ワ ツシュ	0	0	1.3	7.7	16.3	20.7	26.3
RSV B-1	0	0	0.3	4	9.3	11.7	12.3

10

【0 8 7 5】

【表 2 4】

表 24. 58c5 の IgG 形態での中和についてのプラーク減少率(%)							
抗原	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.003 μg/ml	0 μg/ml
RSV A2	99.5	100	99	72	46	30	0
RSV B/ワツ シュ	100	100	95	71	38	21	0
RSV B-1	100	100	97.6	67.5	24	5	0

20

【0 8 7 6】

B. RSVモノクローナル抗体耐性RSVエスケープ突然変異体の中和

【0 8 7 7】

58c5のIgG形態をまた、上記の実施例6に記載されるような、いくつかのモノクローナル抗体耐性RSVエスケープ突然変異体(Dr.James Crowe,Vanderbilt Universityによって提供された)を中和するその能力について試験した。以下の表23に列挙されるMRMSは、RSV野生型A2株から誘導された。ヒトFab19に対して作製されたMAR19[例えば、Crowe et al., Virology, 252:373-375 (1998)参照のこと]は、イソロイシン266のメチオニンへのアミノ酸突然変異を含有する。マウスmAb151に対して作製されたMAR151は、リシン272からアスパラギンへのアミノ酸突然変異を含有する。パリビズマブ(SYNAGIS)の親抗体であるマウスmAb1129に対して作製されたMAR1129は、セリン275からフェニルアラニンへのアミノ酸突然変異を含有する。

30

【0 8 7 8】

58c5のIgG形態をまた、いくつかのRSVモノクローナル抗体耐性突然変異体(MARM)を中和するその能力について試験した。データを、以下の表25~26に示す。表25には、変動する抗体濃度での種々のMARMに対する中和のプラーク数が列挙されている。表26には、変動する抗体濃度での種々のMARMに対する中和のプラーク減少率が列挙されている。結果は、58c5のIgG形態が3種のRSVMARMすべてを中和できることを示す。したがって、58c5のIgG形態は、Fab19、マウスmAb1129およびマウスmAb151とは異なるRSVA2株のエピトープと結合する。

40

【0 8 7 9】

【表 2 5】

表 25. 58c5 対 RSV MARMS の IgG 形態での中和についての平均プラークカウント							
MARM	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.003 μg/ml	0 μg/ml
MARM 19	0.7	16.7	72	89.3	135	143	156
MARM 151	0	15.3	64.7	112	128	151	151
MARM 1129	0	0	2.3	5.7	11.7	17.7	22.3

10

【0 8 8 0】

【表 2 6】

表 26. 58c5 対 RSV MARMS の IgG 形態での中和についてのプラーク減少率							
MARM	10 μg/ml	2 μg/ml	0.4 μg/ml	0.08 μg/ml	0.016 μg/ml	0.003 μg/ml	0 μg/ml
MARM 19	100	89	53.8	42.7	14	8	0
MARM 151	100	90	57	26	15	0	0
MARM 1129	100	100	90	74	47	21	0

20

【0 8 8 1】

例 1 0

競合アッセイ

【0 8 8 2】

この例では、競合アッセイを実行し、F a b s 5 8 c 5、3 0 D 8、1 0 4 E 5、3 8 F 1 0、1 4 G 3、5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 9 が、モタビズマブ I g G [Wu et al. (2007) J. Mol. Biol. 368(3):652-665] に対して、R S V F タンパク質との結合について競合するそれらの能力について試験した。F a b s 5 8 c 5 および 3 0 D 8 を追加的に、1 7 C 9 および 6 9 F 9 の I g G 形態に対して、R S V F タンパク質との結合について競合するそれらの能力について試験した。F a b s 5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 を追加的に、5 8 c 5 および 3 0 D 8 の I g G 形態に対して、R S V F タンパク質との結合について競合するそれらの能力について試験した。競合のための陽性対照として、種々の抗体の I g G 形態を同じ抗体のそれぞれの F a b 形態に対して競合するそれらの能力について試験した。

30

【0 8 8 3】

手短には、組換え型または天然 R S V A 2 株 F タンパク質のいずれかを含む E L I S A プレートを、上記の実施例 1 に記載されるように調製した。プレートを、1 × P B S 中の 4 % 脱脂粉乳を用いて、3 7 °C で 2 時間ブロッキングし、続いて、洗浄バッファー (P B S / 0 . 0 5 % Tween20) を用いて 4 回洗浄した。F a b s を、P B S / 3 % B S A / 0 . 0 1 % Tween20 中、9 μg / mL ~ 0 . 0 0 0 1 μg / mL (試験された実際の濃度 : 9、3、1、0 . 3、0 . 1、0 . 0 3、0 . 0 1、0 . 0 0 3、0 . 0 0 1、0 . 0 0 0 3、0 . 0 0 0 1 μg / mL) で滴定した。試験した抗体の I g G 形態およびモタビズマブは、0 . 5 μg / mL、0 . 1 μg / mL、0 . 0 5 μg / mL および 0 . 0 1 μg / mL のいずれかの固定濃度で加えた (以下の表 2 7 に示されるように)。以下の表 2 7 に示されるように、プレートの各ウェルに、希釈された F a b および固定濃度の I g G の各 5 0 μL を、2 連で同時に加え、プレートを 3 7 °C で 2 時間インキュベートし、続い

40

50

て、洗浄バッファーを用いて4回洗浄した。ヤギ抗ヒトIgG Fc-γHRP (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-035-098、1:1000希釈を加え、プレート、37℃で1時間インキュベートした。洗浄バッファーを用いて6回洗浄した後、50 μLの1:1 v/v TMB:過酸化溶液 (Pierce、カタログ番号34021) を加え、7分間発展させた。50 μLの2N H₂SO₄を添加することによって反応を直ちに停止させ、ELISAプレートリーダーを使用して450 nmでの吸光度を測定した。

【0884】

【表27】

表 27. 競合アッセイ		
	抗原	
	組換え F タンパク質	天然 F タンパク質
Fab 30D8 (9~0.0001 μg/mL)	0.05 μg/mL 30D8 の IgG 形態	0.5 μg/mL 30D8 の IgG 形態
	0.05 μg/mL 58c5 の IgG 形態	0.05 μg/mL 58c5 の IgG 形態
	0.1 μg/mL モタビズマブ IgG	0.01 μg/mL モタビズマブ IgG
Fab 58c5 (9~0.0001 μg/mL)	0.5 μg/mL 30D8 の IgG 形態	0.5 μg/mL 30D8 の IgG 形態
	0.05 μg/mL 58c5 の IgG 形態	0.05 μg/mL 58c5 の IgG 形態
	0.1 μg/mL モタビズマブ IgG	0.01 μg/mL モタビズマブ IgG

【0885】

結果は、以下の表28に要約されている。Fabs 58C5、30D3、56E11、17C9および69F9は、モタビズマブでのRSV A2株Fタンパク質への結合について競合しなかった。30D8は、試験した抗体のいずれの結合についても競合しなかった。Fab 58C5は、RSV Fタンパク質への結合について69F6のIgG形態と競合した。Fabs 56E11および69F9は双方とも、RSV Fタンパク質への結合について58c5のIgG形態と競合した。抗体58C5、69F6および56E11は、RSV融合タンパク質上で共通のエピトープ結合部位を共有する。

【0886】

【表28】

表 28. 競合アッセイの概略					
	58C5 Fab	30D8 Fab	56E11 Fab	17C9 Fab	69F6 Fab
モタビズマブ IgG	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
58C5 の IgG 形態	はい	いいえ	はい	いいえ	はい
30D8 の IgG 形態	いいえ	はい	いいえ	いいえ	いいえ
56E11 の IgG 形態	はい	いいえ	ND	ND	ND
17C9 の IgG 形態	いいえ	いいえ	ND	はい	ND
69F6 の IgG 形態	はい	いいえ	ND	ND	はい

NDは未検出

【0887】

例11

RSV MARM作製および中和アッセイ

【0888】

この例では、モタビズマブおよび58c5のIgG形態のモノクローナル抗体耐性RSVエスケープ突然変異体(MARM)を作製した。30D8のIgG形態について、12ラウンドの選択を実行して、エスケープ変異のないことを確認した。モタビズマブ、58c5および30D8およびFab 56E11、17C9および69F6のIgG形態を、新規に作製されたMARMsを中和するそれらの能力についてさらに分析した。

【0889】

A. MARM作製

【0890】

1. モタビズマブ

【0891】

RSVウイルス力価を3log低減する(中和アッセイによるRSV A2ウイルスの99.9%阻害に相当する)モタビズマブIgGの濃度を、3.2 μg/mLであると予め決定した。RSV A2ウイルス粒子(2×10^6)を、モタビズマブIgGの希釈物とともにプレインキュベートし、この混合物を使用して、Vero細胞単層(上記の実施例6に記載されるような)に感染させた。依然として細胞傷害性効果を示す最高抗体濃度を有するウェルを、選択のさらなるラウンドのために選択した。10ラウンドの選択後、8 μg/mLモタビズマブの存在下で増殖させたウイルスからプラークを得た。これらのプラークに由来するウイルス粒子を、中和アッセイ(上記の実施例6に記載されるような)において試験し、RNeasy抽出キット(Qiagen)を使用して陽性粒子からRNAを調製した。6種のエスケープ突然変異体を選択し、PCRによってF遺伝子を増幅させた。DNAを配列決定し、6種のクローンすべてが、親RSV A2株(配列番号485に示される)と比較して、位置272でのグルタミン酸のリシンとの単一のアミノ酸置換(K272E、配列番号486)をコードしていた。

【0892】

以下の表29には、選択の各ラウンドの細胞変性効果(CPE)を示す最高抗体濃度が示されている。以下の表29に示されるように、モタビズマブエスケープ突然変異体は、中和アッセイによって決定されるRSV A2ウイルスの99.9%阻害に相当するモタビズマブの濃度より高いCPE(すなわち、 $> 3.2 \mu\text{g/mL}$)を示す抗体濃度によって同定されるように、7ラウンドの選択後に同定された。

【0893】

【表29】

表 29. モタビズマブMARM選択	
選択ラウンド	抗体濃度(μg/mL)
1	0.5
2	0.5
3	0.75
4	1
5	2
6	3
7	4
8	8
9	8
10	8

【0894】

2. 58c5

【0895】

R S V ウイルス力価を 3 l o g 低減する（中和アッセイによる R S V A 2 ウイルスの 99.9% 阻害に相当する）58c5 の I g G 形態の濃度を、0.8 μg/mL であると決定した。R S V A 2 ウイルス粒子（ 2×10^6 ）を、58C5 の I g G 形態の希釈物とともにプレインキュベートし、この混合物を使用して、V e r o 細胞単層（上記の実施例 6 に記載されるような）に感染させた。依然として細胞傷害性効果を示す最高抗体濃度を有するウェルを、選択のさらなるラウンドのために選択した。12 ラウンドの選択後、2 μg/mL の 58c5 の I g G 形態の存在下で増殖させたウイルスからプラークを得た。これらのプラークに由来するウイルス粒子を、中和アッセイ（上記の実施例 6 に記載されるような）において試験し、R N e a s y 抽出キット（Qiagen）を使用して陽性粒子から R N A を調製した。5 種のエスケープ突然変異体を選択し、P C R によって F 遺伝子を増幅させた。D N A を配列決定し、5 種のクローンすべてが、親 R S V A 2 株（配列番号 485 に示される）と比較して、3 つのアミノ酸置換（N 6 3 K、M 1 1 5 K および E 2 9 5 G；配列番号 487）をコードしていた。

10

【0896】

以下の表 30 には、選択の各ラウンドの細胞変性効果（C P E）を示す最高抗体濃度が示されている。以下の表 30 に示されるように、58c5 のエスケープ突然変異体は、中和アッセイによって決定される R S V A 2 ウイルスの 99.9% 阻害に相当する 58c5 の I g G 形態の濃度より高い C P E（すなわち $> 0.8 \mu\text{g/mL}$ ）を示す抗体濃度によって同定されるように、10 ラウンドの選択後に同定された。

20

【0897】

【表 30】

表 30. 58C5 MARM 選択	
選択ラウンド	抗体濃度 (μg/mL)
1	0.2
2	0.2
3	0.3
4	0.4
5	0.6
6	0.6
7	0.6
8	0.6
9	0.6
10	1.2
11	1.6
12	2

30

40

【0898】

3. 30D8

【0899】

R S V ウイルス力価を 3 l o g 低減する 30D8 の I g G 形態の濃度を、1 μg/mL であると決定した。R S V A 2 ウイルス粒子（ 2×10^6 ）を、30D8 の I g G 形態の希釈物とともにプレインキュベートし、この混合物を使用して、V e r o 細胞単層（上記の例 6 に記載されるような）に感染させた。依然として細胞傷害性効果を示す最高抗体濃度を有するウェルを、選択のさらなるラウンドのために選択した。12 ラウンドの選択

50

後、以下の表 3 0 に示されるように、3 0 D 8 のエスケープ突然変異体は、何も確認されなかった。

【0 9 0 0】

【表 3 1】

表 31. 30D 8 MARM選択	
選択ラウンド	抗体濃度 (μg/mL)
1	0.2
2	0.2
3	0.3
4	0.4
5	0.4
6	0.4
7	0.4
8	0.4
9	0.4
10	0.4
11	0.4
12	0.4

【0 9 0 1】

B. 中和アッセイ

【0 9 0 2】

モタビズマブ、5 8 C 5 および 3 0 D 8 の I g G 形態および F a b s 5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 を、R S V A 2 親ウイルス株、モタビズマブ M A R M および 5 8 C 5 の I g G 形態の M A R M を中和するその能力について試験した。中和アッセイ手順は、上記の例 6 に記載されている。データは、以下の表 3 2 ～ 3 5 に示されている。表 3 2 には、R S V A 2 親ウイルスに対する中和のプラーク減少率が列挙されている。表 3 3 には、モタビズマブ M A R M に対する中和のプラーク減少率が列挙されている。表 3 4 には、5 8 c 5 M A R M に対する中和のプラーク減少率が列挙されている。表 3 5 は、中和データ (E D 5 0 値) の概略である。

【0 9 0 3】

結果は、すべての抗体が、親 R S V A 2 株を中和できことを示し、5 8 c 5 および 3 0 D 8 の I g G 形態が最強の活性を示される (表 3 2 および 3 5 参照)。試験した抗体のすべては、5 8 c 5 の I g G 形態は、モタビズマブ M A R M を強力に中和し、親株と比較して相違がない (表 3 3 および 3 5 参照)。予想されるように、モタビズマブは、試験された濃度のいずれでもモタビズマブ M A R M を中和できない。モタビズマブ、3 0 D 8 の I g G 形態および F a b 1 7 C 9 は、5 8 c 5 の I g G 形態の M A R M を強力に中和し、中和効力に相違はない (表 3 4 および 3 5 参照)。予想されるように、5 8 c 5 の I g G 形態は、試験された濃度のいずれでも 5 8 c 5 の I g G 形態の M A R M を中和できない。結果は、5 8 c 5 および 3 0 D 8 の I g G 形態および F a b s 5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 がすべて、モタビズマブ M A R M を中和し、競合を示さないことを示す。このように、5 8 c 5、3 0 D 8、5 6 E 1 1、1 7 C 9 および 6 9 F 6 のエピトープは、何ら競合が観察されず (上記表 2 8 参照)、そしてすべての抗体がモタビズマブ M A R M を中和するので、モタビズマブのものとは重複しない。

【0 9 0 4】

F a b 6 9 F 6 は、R S V F タンパク質への結合について 5 8 c 5 の I g G 形態と競合した（上記表 2 8 参照）が、それでも親の A 2 株の中和のためのものより若干高い E D₅₀ を有するとはいえ（3 5 3 p M 対 2 5 6 p M）、5 8 c 5 M A R M をまだ中和した。これとは対照的に、F a b 5 6 E 1 1 は 5 8 c 5 の I g G 形態での R S V F タンパク質への結合について競合した（上記表 2 8 参照）が、試験した濃度のいずれでも 5 8 c 5 M A R M を中和しなかった。したがって、5 6 E 1 1 エピトープは 5 8 c 5 と重複し、それは二つの抗体間の競合が観察されるからであり、そして 5 6 E 1 1 F a b は 5 8 C 5 M A R M を中和することができなかった。抗体 6 9 F 6 および 1 7 C 9 は、5 8 c 5 M A R M を中和し、それらのエピトープが抗体 5 8 c 5 のものと重複していないことが示される。しかし、競合は 5 8 c 5 および 6 9 F 6 の間で観察され（表 2 8 参照）、それでも 6 9 F 6 は 5 8 c 5 M A R M を中和するため、観測された競合がおそらく立体障害によるものである可能性が高い。

【0905】

【表 3 2】

表 32. RSV A2 親ウイルスの中和についてのプラーク減少率						
抗体	10000 ng/ml	2000 ng/ml	400 ng/ml	80 ng/ml	16 ng/ml	3.2 ng/ml
モタビズマブ	100.0	98.87	82.27	50.40	19.25	0.40
58C5 の IgG 形態	100.0	100.0	99.6	87.0	49.2	6.1
30D8 の IgG 形態	100.0	100.0	96.2	81.0	58.2	11.9

【0906】

【表 3 3】

表 33. モタビズマブ MARM の中和についてのプラーク減少率						
抗体	10000 ng/ml	2000 ng/ml	400 ng/ml	80 ng/ml	16 ng/ml	3.2 ng/ml
モタビズマブ	13.3	1.7	0.0	0.2	3.3	0.0
58C5 の IgG 形態	97.6	95.8	92.0	74.6	43.0	1.5
30D8 の IgG 形態	98.7	98.6	98.2	91.8	55.7	8.7

【0907】

【表 3 4】

表 34. 58C5 MARM の中和についてのプラーク減少率						
抗体	10000 ng/ml	2000 ng/ml	400 ng/ml	80 ng/ml	16 ng/ml	3.2 ng/ml
モタビズマブ	94.8	92.9	83.9	47.1	6.5	0.0
58C5 の IgG 形態	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30D8 の IgG 形態	93.6	87.7	83.9	80.0	58.1	8.4

【0908】

【表 3 5】

表 35. 中和の概略(ED ₅₀)値			
	RSV A2 親(ED ₅₀)	モタビズマブ MARM (ED ₅₀)	58C5 MARM (ED ₅₀)
モタビズマブ IgG	519 pM	>66.7 nM	641 pM
58C5 の IgG 形態	115 pM	173 pM	>66.7 nM
30D8 の IgG 形態	96 pM	93 pM	113 pM
56E11	1 nM	1.6 nM	>200 nM
17C9	436 pM	356 pM	353 pM
69F6	256 pM	266 pM	353 pM

10

【0909】

例 1 2

58C5 および 30D8 結合エピトープのマッピング

【0910】

この例では、抗体 58C5 および 30D8 の結合に関与する RSV F タンパク質の残基を、抗体 58C5 または 30D8 への結合について RSV F タンパク質の単一変異ライブラリーをスクリーニングすることによって決定した。

20

【0911】

RSV F タンパク質変異ライブラリーはIntegral Molecular (インテグラル・モレキュラー) [Philadelphia (フィラデルフィア)、PA (ペンシルバニア州)] からのショットガン突然変異誘発マッピング技術を使用して生成した。要するに、この技術は、真核細胞内で変異した標的タンパク質の大きなライブラリーの発現および分析を可能にする。標的タンパク質のあらゆる残基は、個別に、通常は複数の他のアミノ酸に変異させ、それはモノクローナル抗体の変化 (MAb) の結合または機能をアッセイするためである。タンパク質は、哺乳動物細胞系内で発現され、それで、真核生物の翻訳または翻訳後プロセッシングを必要とする複雑なタンパク質でさえ、エピトープはマップ (対応) させることもできる。

30

【0912】

ヒト RSV F A2 株 (NCBI 参照番号 FJ614814) を、RSV F タンパク質のために親プラスミドとして用いた。C 末端 V5 タグは、スクリーニングを可能にするために含めた。F タンパク質は、HEK293 細胞で発現させ、そして結合を免疫発光 (immunoluminescence) を用いて決定した。ランダム変異戦略を用いて、1029 の変異クローンを含む RSV F タンパク質のライブラリーを生成した。F タンパク質のすべての 549 のアミノ酸は、クローンあたり 1.34 の変異の平均およびアミノ酸残基あたり 2.46 の変異の平均で変異させた。あらゆるアミノ酸は、少なくとも一度 (100%) は変異させ、少なくとも 457 のアミノ酸 (83.2%) は二回変異させた。モタビズマブ (Motivizumab) および F タンパク質を結合するポリクローナル血清を発現 F タンパク質が正しく折りたたまれたかどうかを決定するための陽性対照として用いた。モタビズマブは、RSV F タンパク質のプレおよびポスト融合コンフォメーションの両方を結合することが知られている。加えて、58C5 および 30D8 の両方がコンフォメーション変化に敏感であり、従って、58C5 はまた 30D8 用のコントロールとして使用し、そして 30D8 は 58C5 用のコントロールとして使用した。上記例 10 に示すように、58C5 および 30D8 は、RSV F タンパク質の 2 つの独立した部位に結合し、さらに加えて、双方はコンフォメーション変化に敏感である。

40

【0913】

50

スクリーニングを、トランスフェクタントの二つの独立ミニプレップで数回（５、６回）行った。抗体結合に寄与する残基の評価のための選択基準は次のようであった。

３０Ｄ８への結合についてのシグナルよりも２倍未満である５８Ｃ５への結合についてのシグナルにおける変異残基の結果、

５８Ｃ５への結合についてのシグナルよりも２倍未満である３０Ｄ８への結合についてのシグナルにおける変異残基の結果、

陽性コントロール（ポリクローナル血清またはモタビズマブ）＞２０％発光、および好ましくはまた同じサイトでは別の置換。

識別された各クローンはまた、ポリクローナル抗体を用いて、表面発現について検証した。サンプルは少なくとも３回試験した。

10

【０９１４】

１．抗体５８Ｃ５への結合

【０９１５】

結果を、以下の表３６～３７に示し、それは、５８Ｃ５および３０Ｄ８のそれぞれＦタンパク質変異への結合、モタビズマブおよび／またはポリクローナル（多クローン）血清の結合のため少なくとも３つのサンプル（Ｓ１、Ｓ２およびＳ３）の免疫発光、５８Ｃ５および３０Ｄ８の値の平均、３０Ｄ８／５８Ｃ５への結合およびＦタンパク質の変異の割合を説明する。以下の表３６～３７に示すように、Ｆタンパク質における残基Ｎ６３、Ｅ８２、Ｙ８６、Ｋ１６８、Ｖ２０７、Ｎ３７１、Ｓ４０５および／またはＥ４６３の変異は、抗体５８Ｃ５の減少した結合をもたらした。残基Ｅ８２はミニプレップスクリーンの両方において確認された。残基Ｎ６３は、以前に５８Ｃ５について、エスケープ変異体、またはＭＡＲＭにおいて確認された。この変異はまた、ＦＡＣＳ分析によって確認された。結合し識別された残基がプレ融合ＲＳＶ－Ｆの３Ｄモデル上に表示されたとき、それらは、スパイクの頂部においてエスケープ変異体の同じエリアにてスパイクの制限されたエリア上にクラスターし、およびＭａｂ ５８Ｃ５の抗体フットプリントを示す（図１参照）。したがって、５８Ｃ５は、コンフォメーション（立体配座）エピトープに結合する。

20

【０９１６】

これらの残基がポスト融合ＲＳＶ－Ｆタンパク質三量体スパイクのＸ線構造上に表示されるとき、これらの残基は、抗体フットプリントの一部分であることは不可能であろうとされるタンパク質表面の広いエリアにわたって分布する〔図２、およびMorton（モートン）ら、(2003年)、Virology（ヴァイロロジー）311：275-288；McLellan（マクレラン）ら、(2010年)、J Virology（ジャーナル・オブ・ヴァイロロジー）、84(23)：12236-12244；およびMcLellan ら、(2011年)、J Mol Biol（ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー）、409:853-866参照〕。５８Ｃ５のエピトープは、それがプレ融合からポスト融合の状態に移動したとき、Ｆタンパク質の中で最も劇的なコンフォメーション変化を通るドメインに位置する。プレ融合スパイクでのクラスター領域のみが抗体のフットプリントと一致する。したがって、エピトープの位置は５８Ｃ５がプレ融合の立体配座に特異的であり、それはまたモタビズマブ、Ｆ１０１および３０Ｄ８との競合の欠如が確認されているデータと一致する。このように、５８Ｃ５はモタビズマブまたは３０Ｄ８と同じエピトープに結合しない。

30

40

【０９１７】

【表 3 6】

58C5			30D8			多クロー ン	58C5	30D8		
S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	平均	平均	変異	割合 30D8/58C 5
7.6	4.8	4.8		50. 7	55. 7	64.7	5.8	53.2	K168E	9.2
13. 2	4.8	4.6	22. 6	20. 8	27. 1	68.0	7.5	23.5	N63H	3.1
22. 4	10. 0	11. 0	17. 5	27. 9	36. 6	60.5	14.5	27.3	V207D	1.9
50. 7	30. 7	33. 9	59. 8	87. 9	80. 0	82.3	38.4	75.9	S405A	2.0
5.4	1.6	3.6	9.7	20. 7	12. 5	18.9	3.6	14.3	E82G	4.0

【0918】

【表 3 7】

表 37. 第2 ミニプレップを含むライブラリーでの 58C5 のスクリーニング					
抗体					
58C5	S1	8.6	55.6	13.1	11.1
	S2	8.9	16.1	10.2	7.2
	S3	7.9	25.3	10.2	6.3
	S4	2.1	54.5	1.2	2.4
30D8	S1	35.7	74.9	9.3	17.2
	S2	12	111.1	42.1	12.1
	S3	12	52.3	36.6	12.1
	S4	15.2	80	2.4	19.7
モタビズマ ブ	平均	42.1	100.9	26.9	24.8
多クローン	S1	37.1	137.1	14.4	7.7
58C5	平均	6.9	37.9	8.7	6.8
30D8	平均	18.7	79.6	22.6	15.3
変異		E82G	E463A	N371D	Y86C
割合 30D8/58C5		2.7	2.1	2.6	2.3

【0919】

2. 抗体 30D8 への結合

10

20

30

40

50

【0920】

結果を、以下の表38～39に示し、それは、58C5および30D8のそれぞれFタンパク質変異への結合、モタビズマブおよび／または多クローン血清の結合のため最低3サンプル（S1、S2およびS3）についての免疫発光、58C5および30D8の値の平均、30D8／58C5への結合およびFタンパク質の変異の割合を説明する。以下の表38～39に示すように、Fタンパク質における残基V278、R339、F351、P353、M370、N371、C382、D392、M396 および／またはS403の変異は、抗体30D8の結合の減少をもたらした。残基R339はミニプレップスクリーンの両方において確認された。M370およびC382の両方の2つの異なる変異は、抗体30D8のRSV Fタンパク質への結合の減少をもたらした。58C5について 10
上記に示したように、確認された残基は、RSV Fタンパク質の1つのドメインに制限される。結合についてすべての確認した残基が組み合わされるとき、それらはすべて、D1ドメインにおいて、ステム／ストーク領域のちょうど上のロリポップの基部にクラスターする。いくつかの残基は3Dモデルに従い内部にあるが、露出している他の残基は、プレ融合三量体（トリマー）モデルにおける異なるプロトマーのD1ドメイン間のクレパス（裂け目）でのインターフェイスでクラスターする（図3参照）。残基がポスト融合三量体において表示されるとき、すべての識別された残基が内部にある。D1領域のコンフォメーション変化がプレおよびポスト融合のコンフォメーションの間に極めて限定されることが期待されるが、プロトマーサブユニットは、プレおよびポスト融合の間で再配列され、より一層集中して、あまり開かれていないポスト融合構造がもたらされる。D1の領域 20
へ30D8 Mabのマッピングは、本発明者らの結果と一致し、それはRSV Fタンパク質構造の立体配座に依存している。また、まさに58C5について、エピトープは、58C5、モタビズマブまたは抗体101Fと競合しない。このことは3Dモデル上の位置と一致する。したがって、30D8はモタビズマブまたは58C5と同じエピトープに結合しない。

【0921】

【表 38】

表 38. 第 1 ミニプレップを含むライブラリーでの 30D8 のスクリーニング							
抗体							
58C5	S1	28.3	10	32.4	18.1	13.8	2.9
	S2						
	S3	28.7	23.5	31.5	43.2	26.4	6.1
	S4	44.1	13.9	32.7	26.3	13.2	14.7
30D8	S1	16.8	7.3	20.1	14.1	9.3	1.4
	S2	6.6	4.9	3.3	10.7	3.1	-1.4
	S3	1.9	1.1	2.3	7.2	1.5	-1.3
	S4	12.2	11.3	23.7	17.2	19.4	5
モタビ ズマブ	平均			28			
多クロ ーン	S1	24.8	76.3	3	75.9	13.1	3.8
58C5	平均	32.4	17.7	33.8	32.7	19.9	7.4
30D8	平均	9.4	6.2	12.4	12.3	8.3	0.9
変異		C382R	R339W	S403A	P353S	C382S	F351S
割合 58C5/30D8		3.5	2.9	2.7	2.7	2.4	8.2

【0922】

10

20

【表 3 9】

58C5			30D8			多クロ ーン	58C5	30D8		
S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	平均	平均	変異	割合 58C5 /30D8
27.1	29. 0	41.7	10. 3	9.0	3.6	118.7	32.6	7.6	R339Q	4.3
26.0	37. 6	43.5	16. 8	3.1	9.0	61.2	35.7	9.7	M370R	3.7
93.0	47. 6	46.1	38. 8	10. 1	6.7	35.2	62.2	18.5	M370T	3.4
45.2	66. 4	133. 6	46. 6	11. 8	16. 6	69.1	81.7	25.0	N371Y	3.3
13.0	39. 4	43.9	15. 3	8.3	6.4	73.5	32.1	10.0	M396V	3.2
86.1	51. 2	63.6	44. 0	11. 2	10. 3	66.8	67.0	21.9	D392N	3.1
122. 1	97. 6	79.6	63. 6	21. 0	11. 6	57.5	99.8	32.1	V278M	3.1

【0 9 2 3】

修飾は当業者には明らかであるので、本発明は添付の請求の範囲によってだけ制限されるものとする。

10

20

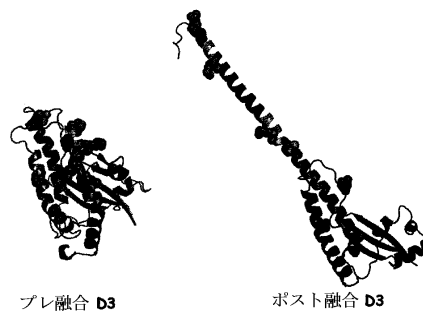
30

【図 1】



FIGURE 1

【図 2】



【図 3】

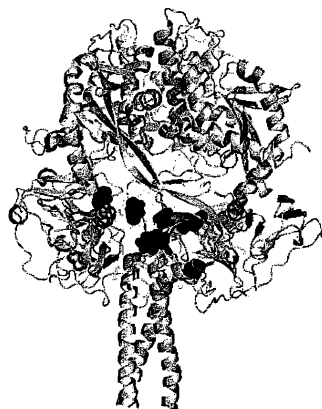


FIGURE 3

【配列表】

0005744196000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N 33/569 (2006.01) G 0 1 N 33/569 L

(72)発明者 ジャハンギール ワディア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ パスアーリン ウェイ 1 0
6 8 6

(72)発明者 ガブリエル パスクアル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ホーヤ カミノ イーストブラフ 3 3 2
4 ナンバー 1 6 0

(72)発明者 エリッサ キオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ カミニート ディア 7 9 9 9
ナンバー 2

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 2 8 8 2 8 (JP, A)
特表平 1 0 - 5 0 4 1 9 5 (JP, A)
Mol.Med.,1999,5(1),p.35-45

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C a p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (STN)
T h o m s o n I n n o v a t i o n

专利名称(译)	抗人呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗体和使用方法		
公开(公告)号	JP5744196B2	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	JP2013518872	申请日	2011-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	克鲁塞尔荷兰公司		
申请(专利权)人(译)	基于荷兰 - KLUCEL Weserblick		
当前申请(专利权)人(译)	基于荷兰 - KLUCEL Weserblick		
[标]发明人	ロバートアンソニーウィリアムソン ジャハンギールワディア ガブリエルパスクアル エリッサキオ		
发明人	ロバート アンソニー ウィリアムソン ジャハンギール ワディア ガブリエル パスクアル エリッサ キオ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/08 C07K19/00 A61K39/395 A61P31/14 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/1027 C07K16/468 C07K2317/31 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 A61K31/7056 A61P11/00 A61P31/12 A61P31/14 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/55 C07K2317 /76 A61K39/42 A61K45/06 A61K2039/507 A61K2300/00 C07K16/10 C07K2317/14 C07K2317/24 C07K2317/35 C12N7/00 C12N2760/18534 C12N2760/18571 G01N33/56983 G01N2333/135		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/08 C07K19/00 A61K39/395.N A61P31/14 G01N33/53.D G01N33/569.L		
代理人(译)	杉村健二		
优先权	61/456454 2010-11-05 US 61/399310 2010-07-09 US		
其他公开文献	JP2013539357A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了免疫特异性结合呼吸道合胞病毒 (RSV) の融合 (F) 蛋白的抗体或其抗原结合片段。还提供了用于预防，治疗和诊断病毒感染和/或治疗RSV介导的疾病的另一种症状的方法。还提供了产生免疫特异性结合RSV F蛋白的抗体的方法。

(21) 出願番号	特願2013-518872 (P2013-518872)	(73) 特許権者	301065549
(86) (22) 出願日	平成23年7月8日 (2011. 7. 8)		クルセル ホランド ベー ヴェー
(65) 公表番号	特表2013-539357 (P2013-539357A)		オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイダ
(43) 公表日	平成25年10月24日 (2013. 10. 24)		ン アルキメダスウェツハ 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/043463	(74) 代理人	100147485
(87) 国際公開番号	W02012/006596		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開日	平成24年1月12日 (2012. 1. 12)	(74) 代理人	100119530
審査請求日	平成25年5月16日 (2013. 5. 16)		弁理士 富田 和幸
(31) 優先権主張番号	61/456, 454	(74) 代理人	100174001
(32) 優先日	平成22年11月5日 (2010. 11. 5)		弁理士 結城 仁美
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロバート アンソニー ウィリアムソン
(31) 優先権主張番号	61/389, 310		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
(32) 優先日	平成22年7月9日 (2010. 7. 9)		0 3 7 ラ ホーヤ チェルシー ストリ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ート 5 3 2 9

最終頁に続く