

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-508503  
(P2016-508503A)

(43) 公表日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/135 (2006.01)</b>	C07K 14/135	4B024
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00 ZNA	4B065
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4C085
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4H045
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-556154 (P2015-556154)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月31日 (2014.1.31)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月26日 (2015.8.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/014054  
 (87) 国際公開番号 WO2014/121021  
 (87) 国際公開日 平成26年8月7日 (2014.8.7)  
 (31) 優先権主張番号 61/759,664  
 (32) 優先日 平成25年2月1日 (2013.2.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/783,380  
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013.3.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504333972  
 メディミュン, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫  
 (74) 代理人 100169971  
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 呼吸器合胞体ウイルスFタンパク質エピトープ

(57) 【要約】

呼吸器合胞体ウイルスは、パラミクソウイルス科に属する風邪ウイルスである。RSVは、伝染しやすい毒性ウイルスであり、2歳未満の小児における下気道疾患の最も一般的な原因である。1回のRSVの季節に、託児所に通っている小児の最大98%が感染することになる。RSVに感染した小児の0.5%~3.2%が入院する必要がある。米国では、1年に約90,000人の入院及び4500人の死亡が報告された。RSVによる入院の主な危険因子は、早産、慢性肺疾患、先天性心疾患、免疫不全、及びその他は健康な6週齢未満の乳児である。

【選択図】 図4

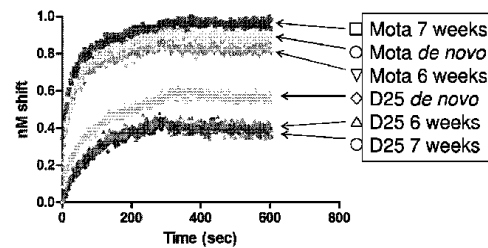


Figure 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 3 4 又は配列番号 9 のアミノ酸 1 ~ 3 4 のうちの少なくとも 6 つのアミノ酸を含む、呼吸器合胞体ウイルス融合 (RSV F) タンパク質の表面における高次構造エピトープであって、前記エピトープを含む RSV F タンパク質はモノクローナル抗体 D 2 5 又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって特異的に結合されることができ、ただし前記 RSV F タンパク質は融合前高次構造であることを条件とする、高次構造エピトープ。

## 【請求項 2】

前記エピトープを含む融合前高次構造の RSV F タンパク質が、配列番号 1 2、配列番号 1 3、又は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む RSV F タンパク質よりも少なくとも 1 0 0 倍高い親和性でモノクローナル抗体 D 2 5 又はその断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって結合され得る、請求項 1 に記載の高次構造エピトープ。

10

## 【請求項 3】

前記エピトープが、ヒト RSV 亜型 A F タンパク質の表面に存在する、請求項 1 又は 2 に記載の高次構造エピトープ。

## 【請求項 4】

前記エピトープが、ヒト RSV 亜型 B F タンパク質の表面に存在する、請求項 1 又は 2 に記載の高次構造エピトープ。

## 【請求項 5】

m A b D 2 5 による前記エピトープへの結合が、加熱、長期保存、固定、又は変性によって変更又は破壊される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の高次構造エピトープ。

20

## 【請求項 6】

前記 F タンパク質の 7 残基反復配列の C 末端である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の高次構造エピトープ。

## 【請求項 7】

単離された構造であって、

( a ) 配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 3 4 又は配列番号 9 のアミノ酸 1 ~ 3 4 のうちの少なくとも 6 つのアミノ酸 ; 及び

( b ) モノクローナル抗体 D 2 5 又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体

30

を含み、前記 ( a ) が前記 ( b ) に特異的に結合する、構造。

## 【請求項 8】

結晶構造である、請求項 7 に記載の構造。

## 【請求項 9】

単離された融合タンパク質であって、

( a ) 配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 3 4 又は配列番号 9 のアミノ酸 1 ~ 3 4 から実質的になる RSV F タンパク質断片 ; 及び

( b ) ポリペプチド足場

を含み、前記融合タンパク質が、モノクローナル抗体 D 2 5 又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって特異的に結合され得る高次構造に拘束されている、融合タンパク質。

40

## 【請求項 10】

前記足場が、表面露出外被タンパク質を含む、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 11】

前記表面露出外被タンパク質がプロテアーゼインヒビターである、請求項 10 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 12】

前記プロテアーゼインヒビターが、カボチャ属プロテアーゼインヒビターである、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

50

## 【請求項 13】

前記プロテアーゼインヒビターが、テッポウウリ (*Ecballium elaterium*) トリプシンインヒビター II (EETI-II) である、請求項 12 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 14】

前記 EETI-II のインヒビターループが、配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 34 又は配列番号 9 のアミノ酸 1 ~ 34 によって置換されている、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

## 【請求項 15】

配列番号 5 の配列を含む、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

10

## 【請求項 16】

請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 17】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

## 【請求項 18】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 17 に記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 19】

請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の融合タンパク質及び担体を含む免疫原性組成物。

20

## 【請求項 20】

抗 RSV F タンパク質抗体を同定するための方法であって、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の融合タンパク質に結合するが、足場のみには結合しない抗体について抗体ライブラリーをスクリーニングするステップを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

電子的に提出された配列表の参照

本出願と共に提出された ASCII テキストファイルで電子的に提出された配列表の内容 (名称: `sequence_listing__ascii.txt`; サイズ: 31.3 キロバイト; 及び作成日: 2013 年 3 月 14 日) は、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられるものとする。

30

本発明は呼吸器合胞体ウイルス F タンパク質エピトープに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

呼吸器合胞体ウイルス (RSV) は、パラミクソウイルス科に属する風邪ウイルスである。RSV は、伝染しやすい毒性ウイルスであり、2 歳未満の小児における下気道疾患の最も一般的な原因である。1 回の RSV の季節に、託児所に通っている小児の最大 98% が感染することになる。RSV に感染した小児の 0.5% ~ 3.2% が入院する必要がある。米国では、1 年に約 90,000 人の入院及び 4500 人の死亡が報告された。RSV による入院の主な危険因子は、早産、慢性肺疾患、先天性心疾患、免疫不全、及びその他は健康な 6 週齢未満の乳児である。十分な栄養及び酸素療法の形態の支持療法他には、RSV 陽性細気管支炎に有効な治療がない。抗ウイルス療法、例えば、リバビリンは、RSV 感染に有効であることは証明されていない。現在利用可能な RSV の予防ワクチンは存在しない。

40

## 【0003】

現在利用可能な RSV に特異的な治療は、米国食品医薬品局によって承認された、高リスクの乳児における RSV 下気道疾患の予防用のヒト化モノクローナル抗体、パリビズマブ (SYNAGIS (登録商標) と呼ばれる) のみである。しかしながら、パリビズマ

50

ブは常に有効というわけではない。別のモノクローナル抗体、本明細書では「m o t a」とも呼ばれるモタビズマブが、抗ウイルス活性が増強されたパリビズマブから得られた。パリビズマブ及びモタビズマブの両方は、抗原結合部位A、即ち、アミノ酸258~275の間のRSV-Fタンパク質における高度に保存された領域に結合する。パリビズマブ及びモタビズマブを含む殆どの抗F抗体は、RSV-Fを折り畳むことができる2つの高次構造、準安定の融合前形態及び高度に安定の融合後高次構造によって共有されているエピトープを認識することが知られている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、国際公開第2008/147196号パンフレットに開示されている、近年同定された抗RSVモノクローナル抗体D25によって認識されるRSV-Fタンパク質の融合前高次構造における高次構造エピトープ（立体構造エピトープ）を提供する。RSV-F媒介融合の阻害のための有効な標的である融合前RSV-F構造を標的とすることにより、本開示は、非生産的な結合事象を受けにくいより有効な抗RSV抗体をスクリーニングする方法も提供し、従って、RSV感染のより優れた予防又は治療を提供することができる。

【0005】

本明細書では、呼吸器合胞体ウイルス融合（RSV F）タンパク質の表面における高次構造エピトープが提供され、このエピトープは、配列番号7のアミノ酸1~34又は配列番号9のアミノ酸1~34のうち少なくとも6つのアミノ酸を含み、このエピトープを含むRSV Fタンパク質はモノクローナル抗体D25又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって特異的に結合され得る、ただしこのRSV Fタンパク質は融合前高次構造（状態）であることを条件とする。

【0006】

一態様では、このエピトープを含む融合前高次構造のRSV Fタンパク質は、モノクローナル抗体耐性変異体（MARM）に由来するFタンパク質のアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質よりも少なくとも100倍高い親和性で、モノクローナル抗体D25又はその断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって結合され得る、MARM由来のFタンパク質は、配列番号12、配列番号13、又は配列番号14のアミノ酸配列を含む。このエピトープは、ヒトRSV亜型A Fタンパク質の表面に出現し、かつヒトRSV亜型B Fタンパク質の表面にも出現し得る。

【0007】

特定の態様では、本明細書で提供される高次構造エピトープへのmAb D25の結合は、RSV Fタンパク質の融合前高次構造を破壊することが知られている様々な処置、例えば、加熱、長期保存、固定、又は変性によって変更又は破壊される。

【0008】

本明細書で提供される高次構造エピトープは、Fタンパク質の7残基反復配列（heptad repeat）のC末端に存在する。

【0009】

mAb D25又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体に特異的に結合された、上述の高次構造エピトープを含む単離された抗原-抗体構造がさらに提供される。特定の態様では、この構造は結晶構造である。

【0010】

配列番号7のアミノ酸1~34又は配列番号9のアミノ酸1~34から実質的になるRSV Fタンパク質断片；及びポリペプチド足場（スキャフォールド）を含む、単離された融合タンパク質がさらに提供され、この足場は、モノクローナル抗体D25又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって特異的に結合され得る高次構造にFタンパク質断片を拘束する。特定の態様では、足場は、表面露出外被タンパク質、例えば、プロテアーゼインヒビター、例えば、カボチャ属プロテアーゼインヒビターに由来す

10

20

30

40

50

る。ある特定の実施形態では、足場は、テッポウウリ (*Ecballium elaterium*) トリプシンインヒター I I (EETI - I I) に由来する。特定の態様では、EETI - I I のインヒターループは、配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 3 4 又は配列番号 9 のアミノ酸 1 ~ 3 4 によって置換されている。特定の態様では、融合タンパク質は、配列番号 5 の配列を含む。

【0011】

本明細書で提供される融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド、このポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び/又はこのポリヌクレオチド又はこのベクターを含む宿主細胞がさらに提供される。

【0012】

特定の態様では、本明細書で提供される融合タンパク質は、この融合タンパク質並びに担体、賦形剤、及び/又はアジュバントを含む免疫原性組成物の一部であり得る。

【0013】

さらなる態様では、本明細書で提供される融合タンパク質は、本明細書で提供される高次構造エピトープに結合する抗 R S V F タンパク質抗体を同定するための方法に使用することができ、この方法は、請求項 9 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質に結合するが、足場のみには結合しない抗体について抗体ライブラリーをスクリーニングするステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】図 1 は、パリビズマブ、モタビズマブ、及び R 3 4 7 (負の対照として) の結合と比較した、R S V A 2 ウイルス (ATCC VR - 1 5 4 0) に感染した未固定及びアセトン固定 H E p - 2 細胞への D 2 5 モノクローナル抗体の結合を示している。

【図 2】図 2 は、E u <sup>3+</sup> 標識モタビズマブ (「m o t a」) 及び D 2 5 のデノボ又は加熱処理 R S V F タンパク質への結合を示している。R S V A 2 F タンパク質で安定にトランスフェクトされた 2 9 3 細胞を氷上に維持するか、又は水槽で 1 5 分間、5 5 °C で処理した。

【図 3】図 3 は、モタビズマブ (「m o t a」) 及び D 2 5 のデノボ又は熱処理 R S V F タンパク質への結合 (図 3 B) を試験するためのバイオレイヤー干渉分析 (図 3 A) を示している。R 3 4 7 は負の対照として使用した。

【図 4】図 4 は、バイオレイヤー干渉法によって分析した、同じ条件下でのモタビズマブ (「m o t a」) の R S V F タンパク質への結合と比較して、4 °C で保存後の D 2 5 の R S V - F タンパク質への結合のゆっくりとした減少を示している。

【図 5】図 5 は、モタビズマブ及び D 2 5 のデノボ又は熱処理 R S V F タンパク質への結合、これに続くウサギ抗 6 ヘルリクスバンドルモノクローナル抗体 (図 5 B) 又は抗 R S V - F C 部位モノクローナル抗体 1 3 1 1 H (図 5 B のインサート) のいずれかへの結合を試験するためのバイオレイヤー干渉分析を示している。モタビズマブ及び D 2 5 は、抗ヒト I g G F c 捕捉センサに固定した (図 5 A)。

【図 6】図 6 は、R S V - F タンパク質における既知の抗原部位を示している。R S V - F は、部位 A / I I、B / I、及び C を含む、一般に述べられている少なくとも 6 つの異なる中和抗原部位を有する。

【図 7 - 1】図 7 は、D 2 5 エピトープを同定するために既知の抗原部位を備えた様々な抗 R S V - F 抗体を用いた競合結合アッセイを示している。1 0 0 n g / m l のビオチン標識 D 2 5 抗体を、全ての結合アッセイに使用した。図 7 A ~ 図 7 D はそれぞれ、A / I I、B / I、及び C、又は未知の部位に結合する既知の抗 R S V - F 抗体による競合を示している。

【図 7 - 2】図 7 - 1 の続きである。

【図 8】図 8 は、アミノ酸 2 0 9 が抗体 A M 2 3 の中和活性に重要であることを示している。

【図 9】図 9 は、R S V - F 野生型配列と、提案される D 2 5 抗原部位における D 2 5 モ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体耐性変異体 (MARM) とのアライメントを示している。四角で囲まれたアミノ酸は、変異を示している。

【図10】図10は、RSV-Fタンパク質におけるD25エピトープのマッピングを示している。図10Aは、同定されたD25モノクローナル抗体耐性変異体 (MARM) における3つのアミノ酸変異の位置を示す図である。図10Bは、RSV-Fタンパク質の表面における同定されたD25エピトープの位置を示す空間充填モデルである。白い太字の矢印は、D25の結合に重要な同定されたエピトープ領域を示している。

【図11】図11は、D25 MARMに対するD25の活性とモタビズマブ (「mot a」) モノクローナル抗体の活性とを比較する中和アッセイを示している。

【図12】図12は、パリビズマブ及びD25モノクローナル抗体によってD25 MARMに感染した細胞を用いた細胞ベースの中和アッセイを示している。

【図13】図13は、SKエピトープの作製を例示する図である。下線が付された配列は、RSV A2 Fタンパク質のアミノ酸195~211に一致し、二重下線が付された配列は、C212S置換を含む、RSV A2 Fタンパク質のアミノ酸212~228に一致している。

【図14】図14は、バイオレイヤー干渉法によって分析された、RSV A2 Fタンパク質のHR1領域に結合するD25又はSKエピトープに結合するD25の比較を示している。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

本開示において、「1つの(a)」又は「1つの(an)」実体という語は、1つ以上のその実体；例えば、「1つのポリヌクレオチド (a polynucleotide)」は、1つ以上のポリヌクレオチドを意味することを理解されたい。従って、「1つの(a)」(又は「1つの(an)」)、「1つ以上の」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書で互換的に使用することができる。

【0016】

さらに、「及び/又は」は、本明細書で使用される場合、2つの特定の特徴又は構成要素のそれぞれの他方を含む又は含まない特定の開示と見なされるものとする。従って、例えば、本明細書で「A及び/又はB」などの句に使用される「及び/又は」という語は、「A及びB」、「A又はB」、「A」(のみ)、及び「B」(のみ)を含むものとする。同様に、「A、B、及び/又はC」などの句に使用される「及び/又は」という語は、以下の形式のそれぞれを包含するものとする：A、B、及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A(のみ)；B(のみ)；及びC(のみ)。

【0017】

態様は、常に「含む (comprising)」という語を用いて本明細書で説明されるが、そうでない場合は、「からなる (consisting of)」及び/又は「実質的に~からなる (consisting essentially of)」という語で説明される類似の態様も提供されることを理解されたい。

【0018】

特段の記載がない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本開示が関連する技術分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及び the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、本開示に使用される多数の用語の一般的な

10

20

30

40

50

辞書を当業者に提供する。

【0019】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系（S I）の許容される形式で示される。数値範囲は、範囲を定義する数字を含む。特段の記載がない限り、アミノ酸配列は、アミノ酸が左から右にカルボキシ方向に書かれている。本明細書に記載される見出しは、本開示の様々な態様を限定するものではなく、本明細書全体の参照用に記載することができる。従って、すぐ下で定義される用語は、本明細書全体を参照することによってより詳細に定義される。

【0020】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という語は、単数の「ポリペプチド」及び複数の「ポリペプチド」を包含し、かつ2つ以上のアミノ酸の任意の1本鎖又は複数鎖を含むものとする。従って、本明細書で使用される「ペプチド」、「ペプチド断片」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、「アミノ酸配列」、又は2つ以上のアミノ酸の任意の1本鎖又は複数鎖を指すために使用されるその他の語は、一般的には、たとえこれらの語がそれぞれ、より明確な意味を有し得るとしても、「ポリペプチド」の定義に含まれる。「ポリペプチド」という語は、任意のこれらの語の代わりに、又はこれらの語と互換的に使用することができる。用語は、翻訳後修飾を受けた、又は合成後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解切断、又は非自然発生のアミノ酸による修飾を受けた「ポリペプチド」をさらに含む。

10

20

【0021】

より具体的には、本明細書で使用される「ペプチド」断片という語は、完全長未満のペプチド、又はその変異体、誘導體、もしくは類似体を包含する。本明細書で開示される「ペプチド断片」、例えば、RSV-Fペプチド断片は、追加の非RSV-Fタンパク質成分、例えば、構造的足場として使用される表面露出外被タンパク質を含む融合ポリペプチドの一部であり得る。本明細書に記載されるペプチドはまた、様々な異なる方法で誘導体化され得る。

【0022】

RSV-Fペプチド断片を指す場合の「類似体（アナログ）」、「誘導體」又は「変異体（バリエーション）」という語は、少なくとも一部の所望の活性、例えば、抗RSV抗体への結合を維持している任意のペプチド断片を含む。

30

【0023】

本明細書で使用される「変異体」という語は、アミノ酸の置換、欠失、挿入、及び/又は修飾により、列挙されるペプチドとは異なるペプチドを指す。変異体は、当技術分野で公知の変異誘発技術を用いて作製することができる。変異体はまた、又は別法では、他の修飾を含み得る。例えば、ペプチドは、例えば、半減期を延長する、溶解性を高める、又は安定性を高めるために、異種アミノ酸配列又は他の部分にコンジュゲート又は結合する、例えば、融合することができる。本明細書で提供されるペプチドにコンジュゲート又は結合する部分の例として、限定されるものではないが、アルブミン、免疫グロブリンFc領域、及びポリエチレングリコール（PEG）などが挙げられる。ペプチドは、ペプチド（例えば、6-His）の合成、精製、もしくは同定を容易にするため、又はポリペプチドの固体支持体への結合を促進するために、リンカー又は他の配列にコンジュゲート又は結合することもできる。

40

【0024】

本明細書で使用される「配列同一性」という語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係、又は2つ以上のポリペプチド配列間の関係を指す。1つの配列におけるある位置に、比較配列の対応する位置の同じ核酸塩基又はアミノ酸が存在する場合は、これらの配列は、その位置で「同一」とであると言える。パーセント「配列同一性」は、両方の配列で同一の核酸塩基又はアミノ酸が存在する位置の数を決定して、「同一」の位置の数を得ることによって計算する。次いで、「同一」の位置の数を、比較ウィンドウにおける位置の

50

合計数で除し、この値に100を乗じて「配列同一性」のパーセンテージを得る。「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウに亘って最適に整列した2つの配列を比較することによって決定される。比較用に配列を最適に整列させるために、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の一部は、基準配列が一定に維持されたまま、ギャップと呼ばれる付加又は欠失を含み得る。最適な整列は、たとえギャップがあっても、基準配列と比較配列との間の「同一」の位置の数を最大限にする整列である。2つの配列間のパーセンテージ「配列同一性」は、プログラム「BLAST 2 Sequences」のバージョンを用いて決定することができ、このプログラムは、2004年9月1日時点でNational Center for Biotechnology Informationから入手可能であり、プログラムBLASTN(ヌクレオチド配列の比較用)及びBLASTP(ポリペプチド配列の比較用)を含み、これらのプログラムは、Karlin及びAltschulのアルゴリズム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993)に基づいている。「BLAST 2 Sequences」を利用すると、語長(3)、オープンギャップペナルティー(11)、延長ギャップペナルティー(1)、ギャップドロップオフ(50)、予想値(10)、及び、限定されるものではないが、マトリックスオプションを含むその他の必要なパラメータに対して、2004年9月1日時点でデフォルトパラメータであったパラメータを使用することができる。

10

## 【0025】

「抗体」という語は、標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、又はこれらの組み合わせを認識して、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介してこれらに特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。本明細書で使用される「抗体」という語は、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗原結合抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片)、一本鎖Fv(scFv)変異体、多重特異性抗体、例えば、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質、及び抗体が所望の生物活性を示す場合の、抗原認識部位を含むその他の改変免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれ、及びμと呼ばれる重鎖定常ドメインの同一性に基づいて、免疫グロブリンの5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、又はこれらのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)のいずれかとするすることができる。免疫グロブリンの異なるクラスは、異なる周知のサブユニット構造及び3次元構造を有する。

20

30

## 【0026】

「特異的に結合する」とは、一般に、抗体が、この抗原結合部位を介してエピトープに結合し、この結合が、抗原結合部位とエピトープとの間にある程度の相補性を伴うことを意味する。この定義によると、抗体は、無作為の無関係のエピトープに結合し得るよりも容易にその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する場合にエピトープに「特異的に結合」と言える。

## 【0027】

「抗RSV抗体」又は「RSV抗体」という語は、RSVウイルスに特異的に結合することができる抗体を指す。

40

## 【0028】

「抗体断片」という語は、無傷の抗体の部分指す。特に、無傷の抗体の「抗原結合断片」は、抗原に特異的に結合し得る抗体の部分である。抗体断片の例として、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片、線状抗体、一本鎖抗体、並びに抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられる。

## 【0029】

「エピトープ」という語は、特定の抗体によって認識されて特異的に結合され得る抗原の部分指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続アミノ酸、又はタン

50

パク質の3次折り畳みによって並置された不連続アミノ酸から形成することができる。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、タンパク質変性時に維持されるが、3次折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には、タンパク質変性時に放出される。エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、より一般的には、少なくとも5つ又は8~10のユニークな空間的高次構造のアミノ酸を含む。特定の一実施形態では、エピトープは、少なくとも6つのアミノ酸を含む。

#### 【0030】

「線状エピトープ」又は「連続エピトープ」は、アミノ酸のその線状配列又は一次構造により抗体によって認識されるエピトープである。「高次構造エピトープ」又は「不連続エピトープ」は、その3次構造により抗体によって認識されるエピトープである。これらのエピトープを構成する残基は、一次アミノ酸配列で連続的でなくても良いが、この分子の3次構造で互いに近接する。線状エピトープ及び高次構造エピトープは、一般に、タンパク質が変性される、断片化される、又は還元されるときに異なって挙動する。特定の実施形態では、高次構造エピトープは、タンパク質の一形態、例えば、RSV Fタンパク質の融合前高次構造で見られることがあるが、別の高次構造、例えば、RSV Fタンパク質の融合後高次構造では見られない。タンパク質の断片化又はそのジスルフィド結合の還元は、多くの場合、高次構造エピトープを破壊する。

10

#### 【0031】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体）の1つの結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合性の相互作用全体の強度を指す。特段の記載がない限り、本明細書で使用される「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数( $K_D$ )によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性の抗体は、一般に、抗原にゆっくりと結合して容易に解離する傾向にあるが、高親和性の抗体は、一般に、抗原により迅速に結合し、結合を長く維持する傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で公知であり、いずれも本開示のために使用することができる。特定の例示的な実施形態を以下に説明する。

20

#### 【0032】

本明細書で使用される「免疫原性組成物」という語は、RSV抗体を含むあらゆる医薬組成物を指し、この組成物は、対象のRSV感染に関連した疾患及び状態を予防又は治療するために使用することができる。好ましい免疫原性組成物は、RSVに対する免疫応答を誘発する、刺激する、又は促進することができる。

30

#### 【0033】

「組成物」又は「医薬組成物」という語は、例えば、治療を必要とする対象、例えば、RSVウイルスに感染したヒト対象に投与される薬学的に許容され得る担体、賦形剤、又は希釈剤と共に、本明細書で提供される単離されたポリペプチドを含む組成物を指す。

#### 【0034】

「薬学的に許容され得る（製薬上許容可能）」という語は、妥当な利益/リスク比に見合った、過度の毒性又は他の合併症のない、ヒト及び動物の組織との接触に適した、健全な医療診断の範囲内にある組成物を指す。

40

#### 【0035】

「対象（被験体）」という語は、本明細書で提供される単離されたポリペプチドを含む組成物を用いた治療を必要とするあらゆる対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象としては、限定されるものではないが、ヒト、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、クマ、乳牛、類人猿、サル、オランウータン、及びチンパンジーなどが挙げられる。一実施形態では、対象はヒト対象である。

#### 【0036】

RSV Fタンパク質

呼吸器合胞体ウイルス(RSV)は、パラミクソウイルス(Paramyxovirus)

50

d a e ) 科のニューモウイルス ( P n e u m o v i r u s ) 属に属する。ウイルスゲノムは、11のタンパク質をコードする負の極性の一本鎖RNA分子からなる。これらのタンパク質のうち2つは、ビリオンの主要表面糖タンパク質、即ち ( i ) ウイルスの細胞表面への結合を媒介する付着タンパク質 ( G )、及び ( i i ) ウイルスの侵入の際にウイルスと細胞膜との融合を促進するとともに、感染細胞の膜と周囲細胞との融合も促進して合胞体を形成する融合タンパク質 ( F ) である。2つの主要な抗原グループ、AとBは、最も優勢なグループAと、主にGタンパク質における差異によって区別される。

【0037】

R S V - F タンパク質は、ホモ三量体として構築されるI型糖タンパク質である。各単量体は、2つの多塩基部位 ( I 及び I I ) で切断されて融合能を獲得する必要がある不活性前駆体 ( F 0 ) として合成される。Fタンパク質は、ウイルスが標的膜に結合するまで、ウイルス粒子中で準安定の融合前高次構造をとる。次いで、Fタンパク質は、活性化されて一連の高次構造の変化が開始され、これにより、適切なタイミング及び適切な場所で融合が起こる。融合後、Fタンパク質は、各単量体からの2つの7残基反復配列 ( H R 1 及び H R 2 ) の配列から構成される、6ヘリックスバンドル ( 6 H B ) の形成によって主に決定される非常に安定した融合後高次構造を獲得する。融合前構造から融合後構造へのFタンパク質の変化の際に放出される自由エネルギーが、膜融合のプロセスを促進する。

10

【0038】

「R S V - F タンパク質」という語は、R S V ウイルス、及びその断片、変異体、類似体、又は誘導體から自然発生的に又は組換え的に形成される完全長Fタンパク質を指す。R S V F タンパク質は、融合前高次構造又は融合後高次構造であり得る。特定の実施形態では、R S V ウイルスは、ヒトR S V ウイルスである。特定の実施形態では、R S V ウイルスは、亜型Aである。特定の一実施形態では、R S V 亜型AはR S V A 2 である。他の実施形態では、R S V ウイルスは、亜型Bである。特定の一実施形態では、R S V 亜型BはR S V 1 8 5 3 7 である。別の特定の実施形態では、R S V 亜型BはR S V B 9 3 2 0 である。

20

【0039】

「デノボFタンパク質」又は「融合前Fタンパク質」という語は、その融合前構造のR S V - F タンパク質を指す。未変性のトリガされていないR S V - F タンパク質が準安定状態で存在し、この状態が、熱エネルギーの増加、例えば、55 ~ 60 での10 ~ 15分間の加熱などによってより安定した融合6ヘリックスバンドル高次構造にインビトロで変換され得ることが分かっている。

30

【0040】

代表的なR S V - A ( 株 A 2 ) 及びR S V - B ( 株 1 8 5 3 7 ) F タンパク質配列を以下に示す。予想されるシグナルペプチドは、二重下線が付され、m A b D 2 5 のエピトープを含むことが確認された領域は、一重下線が付されている。

株 A 2 由来の R S V - A F タンパク質配列 ( 配列番号 1 )

> g i | 2 6 2 7 3 0 5 | g b | A A B 8 6 6 6 4 . 1 | 融合 F 糖タンパク質前駆体 [ ヒト呼吸器合胞体ウイルス ]

## 【化 1】

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRRARRE LPRFMNYTLN  
 121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVINKQ SCSISNIATV IEFQQKNNRL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STINIMITTI IIVIIVILLS  
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN

10

株 1 8 5 3 7 由来の R S V - B F タンパク質配列 ( 配列番号 2 )

> g i | 2 2 2 5 6 5 | d b j | B A A 0 0 2 4 0 . 1 | 融合タンパク質前駆体 [ ヒト呼吸器合胞体ウイルス ]

## 【化 2】

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQONITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKETKCN GTDTKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQNT PAANNRRARRE APQYMNNTIN  
 121 TTKNLNVSSIS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNIKINA LLSTNKAVVS  
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYIN NRLLPVINKQ SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTTNIKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQADTCKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYVN KLEGKSLYVK GEPIINYYDP  
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRSD ELLHNVNTGK STINIMITTI IIVIIVILLS  
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLS KDQLSGINNI AFSK

20

## 【 0 0 4 1 】

抗 R S V 抗体 D 2 5

「モノクローナル抗体 D 2 5」又は「mAb D 2 5」という語は、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 7 1 9 6 号パンフレットに既に記載されている、「D 2 5」と称される抗 R S V モノクローナル抗体並びにその抗原結合断片、変異体、誘導体、及び / 又は類似体を指す。

30

## 【 0 0 4 2 】

また、D 2 5 mAb の断片、誘導体、類似体、又は変異体、及びこれらの任意の組み合わせも含まれる。D 2 5 mAb に関する場合の「断片 ( フラグメント )」、「変異体」、「誘導体」、及び「類似体」という語は、本発明の対応する抗体又は抗体ポリペプチドの少なくとも一部の抗原結合特性を維持しているあらゆるポリペプチドを指す。断片は、本明細書の他で論じられる特定の抗体断片に加えて、タンパク分解断片及び欠失断片を含む。D 2 5 mAb の変異体は、上述の断片、及びアミノ酸の置換、欠失、又は挿入によってアミノ酸配列が変更されたポリペプチドも含む。変異体は、自然発生的又は非自然発生的に起こり得る。変異体抗体は、連続的又は不連続的なアミノ酸の置換、欠失、又は付加を含み得る。本明細書で使用される、D 2 5 mAb の「誘導体」は、官能性側基 ( functional side group ) の反応によって化学的に誘導体化された 1 つ以上の残基を有する抗体又はその断片を指す。D 2 5 mAb の類似体は、類似性を有する。これは、例えば、本明細書で提供される高次構造エピトープに結合する D 2 5 類似体のペプチドライブラリー又はファージディスプレイライブラリーのスクリーニングによって行われる。

40

## 【 0 0 4 3 】

R S V - F タンパク質のエピトープ

50

実施例で実証されるように、mAb D25は、融合前形態のRSV Fタンパク質の高次構造エピトープに結合する。D25は、可溶性Fタンパク質にはあまり結合しない。D25は、未固定RSV感染細胞の表面に結合するが、固定感染細胞には結合しない。加えて、D25は、加熱された、即ち、RSV Fタンパク質が融合後高次構造をとるようになるインビトロ処置を受けた感染細胞の表面には結合しない。

【0044】

この開示は、配列番号7のアミノ酸1~34（即ち、配列番号1のアミノ酸195~228）又は配列番号9のアミノ酸1~34（即ち、配列番号2のアミノ酸195~228）のうちの少なくとも6つのアミノ酸を含む、呼吸器合胞体ウイルス融合（RSV F）タンパク質の表面の高次構造エピトープを提供する。本明細書で提供されるように、このエピトープを含むRSV Fタンパク質は、融合前高次構造である場合は、モノクローナル抗体D25又はその抗原結合断片、類似体、変異体、もしくは誘導体によって特異的に結合され得る。

10

【0045】

特定の実施形態では、本明細書で提供される高次構造エピトープを含む融合前高次構造のRSV Fタンパク質は、配列番号12、配列番号13、又は配列番号14（MAR M変異体）のアミノ酸配列を含むRSV Fタンパク質よりも少なくとも100倍高い親和性で、モノクローナル抗体D25、又はその断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって結合され得る。

【0046】

本明細書で提供される高次構造エピトープは、例えば、RSV株A2に由来するヒトRSV亜型A Fタンパク質、又は、例えば、RSV株18537に由来するヒトRSV亜型B Fタンパク質の表面に存在し得る。

20

【0047】

また、本明細書で提供される上記の高次構造エピトープを含む単離構造も提供され、このエピトープは、モノクローナル抗体D25又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体に特異的に結合する。特定の実施形態では、この構造は結晶構造である。

【0048】

また、本明細書で提供される高次構造エピトープを含む単離された融合タンパク質も提供される。特定の実施形態では、この融合タンパク質は、配列番号7のアミノ酸1~34又は配列番号9のアミノ酸1~34及びポリペプチド足場を含む、これらからなる、又は実質的にこれらからなるRSV Fタンパク質断片を含む。特定の実施形態では、この融合タンパク質は、モノクローナル抗体D25又はその抗原結合断片、変異体、類似体、もしくは誘導体によって特異的に結合され得る高次構造に拘束される。特定の実施形態では、この足場は、表面露出外被タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、この表面露出外被タンパク質は、プロテアーゼインヒビター、例えば、Kunitz属又はカボチャ属のプロテアーゼインヒビターの1つである。特定の実施形態では、足場タンパク質は、テッポウウリ（*Ecballium elaterium*）トリプシンインヒビターII（EETI-II）である。Christmann, et al. Protein Eng. 12: 797-806 (1999)。特定の実施形態では、EETI-IIのインヒビターループは、配列番号7のアミノ酸1~34又は配列番号9のアミノ酸1~34によって置換される。特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0049】

本明細書で提供されるどのポリペプチドも、融合ペプチドの一部であり得、RSV-Fエピトープは、構造的足場に高次構造的に拘束される。融合ペプチドは、リンカー配列を含んでも良いし、又は含まなくても良い。一部の実施形態では、エピトープは、表面露出外被タンパク質に融合する。

【0050】

一実施形態では、EETI-IIのインヒビターループ（残基3~8に対応する）は、

50

配列番号 1 又は配列番号 2 の残基 195 ~ 228 によって置換される。より具体的な実施形態では、RSV-Fタンパク質の位置 212 のシステインが置換される。

【0051】

また、上述の任意の融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドも提供される。さらに、ポリヌクレオチドを含むベクター、例えば、発現ベクター、及びポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞も提供される。

【0052】

本明細書に記載される融合ペプチドを含む組換え RSV 抗原も提供される。特定の実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質は、免疫原性組成物として製剤することができ、この免疫原性組成物は、これを必要とする対象に投与されると、RSV に対する免疫応答を誘発することができる。特定の実施形態では、免疫原性組成物は、1 つ以上の担体、賦形剤、又はアジュバントを含む。

10

【0053】

本開示の組成物は、既知の方法に従って製剤することができる。適切な製剤方法は、例えば、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) に記載されている。組成物は、限定されるものではないが、水溶液、エマルジョン、ゲル、懸濁液、凍結乾燥形態、又は当技術分野で公知の任意の他の形態を含む様々な形態にすることができる。加えて、この組成物は、例えば、希釈剤、結合剤、安定剤、及び防腐剤を含む薬学的に許容され得る添加剤を含み得る。製剤されると、本明細書で提供される組成物は、対象に直接投与することができる。

20

【0054】

本明細書で提供される組成物と共に使用することができる担体は、当技術分野で周知であり、限定されるものではないが、例えば、サイログロブリン、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、及びポリアミノ酸、例えば、ポリ L-リジン、ポリ L-グルタミン酸、インフルエンザ、及び B 型肝炎ウイルスコアタンパク質などを含む。様々な水性担体、例えば、水、緩衝用水、0.8% 生理食塩水、0.3% グリシン、及びヒアルロン酸などを使用することができる。組成物は、従来周知の滅菌技術によって滅菌しても良いし、又は滅菌濾過しても良い。得られる組成物は、そのまま使用するためにパッケージングしても良いし、又は凍結乾燥しても良く、この凍結乾燥製剤は、投与の前に滅菌溶液と混合される。組成物は、生理的状态に近づけるために必要な薬学的に許容され得る補助物質、例えば、pH 調整及び緩衝剤、等張調整剤、及び湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンラウリン酸モノエステル、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含み得る。

30

【0055】

特定の実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質は、本明細書に記載される同じ高次構造エピトープに結合する、従って、D25 mAb に類似した抗 RSV-F タンパク質抗体を同定する方法に使用することができる。例えば、融合タンパク質は、この融合タンパク質には結合するが、足場タンパク質のみには結合しない抗体について、抗体ライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。特定の抗原に特異的に結合する抗体の抗体ライブラリー及びこのような抗体をパニング及び/又はスクリーニングする方法は、当業者には周知である。

40

【0056】

実施形態に使用される一部の RSV-F エピトープ配列を以下の表 1 に列記する。

【0057】

表 1 . RSV-F タンパク質構築物の 7 残基反復配列

1A . HR1 x HR2 (配列番号 3) - RSV A2 F タンパク質のアミノ酸 153 - 221 (太線) 及びアミノ酸 476 - 520 (イタリック体) を含む。

## 【化3】

- MghhhhhhhhhssghiddddkhMAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLS  
NGVSVLTSKVL~~DL~~KNYIDKOLLPIVNKOSGGSGKGGTGGGSGKNFYDPL  
 VFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGK

1 B . HR 1 ( 配列番号 4 ) - R S V A 2 F タンパク質のアミノ酸 1 5 3 - 2 2 1 ( 太線 ) を含む。

## 【化4】

- MghhhhhhhhhssghiddddkhMAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLS  
NGVSVLTSKVL~~DL~~KNYIDKOLLPIVNKOS

10

1 C . S K - エピトープ - R S V A 2 F タンパク質 HR 1 領域のアミノ酸 1 9 5 - 2 1 1 ( 太線で示され、下線が付されている )、及び E E T I - I I のインヒビターループ ( 図 8 ) を置換する、R S V F タンパク質の続くアミノ酸 2 1 2 - 2 2 8 ( 二重線、C 2 1 2 S 変異を含む ) を含む。

## 【化5】

- QPAMAMDIGINSDPGCEFLKNYIDKOLLPIVNKOSSSISNIATVIEFOQKN  
NLQCKQDSDCLAGCVCGPNGFCGVDKLAA ( 配列番号 5 )  
 - ALEHHHHHH ( 配列番号 5 に融合するリンカー及び his タグ ) ( 配列番号 6 )

20

## 【0058】

本発明の実施は、特段の記載がない限り、当業者の技術の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換え DNA、及び免疫学の従来技術を利用することになる。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. U.S. Pat. No. 4, 683, 195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I - IV; Ma

30

40

50

nipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及び in Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照されたい。

【0059】

抗体工学の一般的な原理は、Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に説明されている。タンパク質工学の一般的な原理は、Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に説明されている。抗体及び抗体とハプテンの結合の一般的な原理は、Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 及び Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.) に説明されている。加えて、当技術分野で公知であるが、具体的に記載されていない免疫学における標準的な方法は、一般に、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 及び Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY) に説明されている。

10

20

【0060】

免疫学の一般的な原理を説明する標準的な参考文献として、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kubly Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Di

30

40

50

effenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press) が挙げられる。

【0061】

上記の全ての参考文献及び本明細書で言及される全ての参考文献は、参照によりそれらの全内容が本明細書に組み入れられる。

【0062】

以下の実施例は、限定のためではなく例示のために記載される。

【実施例】

【0063】

実施例 1

D25 は融合前形態の RSV - F タンパク質を発現する細胞に結合する

抗体 D25 によって認識される中和エピトープに結合するための要件を理解するため、多数の戦略を利用した。

【0064】

まず、D25 が融合前又は融合後高次構造の RSV - F タンパク質に結合するか否かを決定するために、ELISA アッセイを行って、RSV - A2 ウイルス (ATCC VR - 1540) に感染したアセトン固定又は未固定 HEp - 2 細胞への D25 の結合を試験した。他の 2 つの抗 RSV - F タンパク質モノクローナル抗体、即ち、パリビズマブ及びモタビズマブの結合も試験した。R347 を、結合の負の対照として使用した。

【0065】

HEp2 (ATCC CCL - 23) を、96 ウェルプレートにおいて、5% FBS が添加された MEM 培地で 90% コンフルエンスになるまで増殖させた。細胞を、RSV A2 ウイルス (ATCC VR - 1540) の 0.5 ~ 1.0 (約  $5 \times 10^4$  の総細胞数 / ウェルと仮定) の複数の感染によって感染させた。感染の 24 時間後、培地を除去し、細胞を、乾燥させることによって (未固定)、又は 80% アセトンで 20 分間処置してから乾燥させることによってプレートに固定した。感染細胞の層を、1% カゼインブロック (Thermo) で 1 時間ブロックしてから、1000 ng / ml ~ 1 ng / ml の範囲のカゼインで希釈した抗体と共にインキュベートした。抗体を、室温で 1 時間インキュベートし、PBS / 0.1% Tween - 20 で洗浄し、抗ヒト HRP コンジュゲート抗体 (Jackson Immuno - research) の 1 : 10000 の希釈物と共に、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、SureBlue Reserve 試薬 (KPL) を用いて発色させた。450 nm で吸光度を測定した。

【0066】

図 1 A に示されているように、D25 は、未固定 RSV - A2 感染 HEp - 2 細胞に濃度依存的に結合したが、アセトン固定 RSV - A2 感染 HEp - 2 細胞 (図 1 B) への結合は殆ど示されず、その一方、パリビズマブ及びモタビズマブは、固定細胞及び未固定細胞の両方に同様に結合した。

【0067】

実施例 2

D25 は熱処理 RSV - F タンパク質に結合しない

D25 が、融合前 RSV - F タンパク質の高次構造エピトープのみを認識することを確認するために、Eu<sup>3+</sup> 標識 D25 の結合を、融合前形態を示す非加熱デノボ RSV - F タンパク質、又は融合後形態をとる加熱 (反転) RSV - F タンパク質について試験した。

【0068】

テトラサイクリン誘導プロモーターの下で RSV A2 F タンパク質配列を発現する安定にトランスフェクトされた 293 株 (TRE<sub>x</sub> - F 細胞) は、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる Huang, K. et al., Virus Genes 40 : 212 - 221 (2010) に既に記載されている。モタビズマブ、D25、及び R347 (負の対照として) を、Delfia Eu - N1 - ITC 標識キレートを用いて Eu<sup>3+</sup> 標識し、製造者 (Perkin Elmer) の指示に従って特徴付けた。TR

10

20

30

40

50

Ex - F細胞をコンフルエンスになるまで増殖させ、Fタンパク質の発現を、誘導後20時間、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンで誘導した。次いで、細胞を収集し、50%培地/50%LR結合バッファー(Trisベースの緩衝液系、Perkin Elmer)中、約 $1 \times 10^7$ の生細胞/mlとなるように再懸濁した。細胞を、氷上で維持するか、又は水槽で15分間、55 で処置した。約 $1 \times 10^5$ の細胞を、100  $\mu\text{l}$ の反応量のLR結合バッファー中、25 nM  $\text{Eu}^{3+}$ 標識モタビズマブ、D25、又はR347と混合した。細胞とモノクローナル抗体を、4 で1時間インキュベートし、次いで、Pall GHP真空濾過プレートに添加した。非結合モノクローナル抗体を、Delta Assay Wash Buffer(Perkin Elmer)を含む200  $\mu\text{l}$ の洗浄液で5回洗い流し、 $\text{Eu}^{3+}$ 蛍光を、200  $\mu\text{l}$ のEnhancement Solution(Perkin Elmer)の添加で放出させた。軽く振盪させながら37 で1時間インキュベートした後に、時間分解蛍光をEnvision Reader(Perkin Elmer)で測定した。 $\text{Eu}^{3+}$ カウントを、結合ng IgGに変換し、特定の結合モタビズマブ又はD25を、全ての結合からR347非特異的結合を減じることによって計算した。

#### 【0069】

図2に示されているように、RSV-F発現293細胞の55 で15分間の加熱により、D25の細胞への結合がほぼ完全に消失したが(図2B)、モタビズマブの結合の減少はほんの僅かであった(図2A)。従って、この細胞結合アッセイの結果は、融合前形態のRSV-Fタンパク質のみに存在する高次構造エピトープにD25が結合することを裏付けている。

#### 【0070】

##### 実施例3

##### バイオレイヤー干渉分析によるD25結合試験

バイオレイヤー干渉分析を使用して、D25のRSV-Fタンパク質への結合に対する、加熱又は4 での長期保存によるRSV-Fタンパク質の高次構造の変化の影響を決定した。

#### 【0071】

図3Aに例示されているように、加熱の影響を試験するために、RSV-Fタンパク質の規定C部位に反応するモノクローナル抗体1331H(Yunus et al., Virology, 396(2):226-237(2010); Beeler and Coelingh, Journal of Virology, 63(7):2941-2950(1989))を、抗マウスFc捕捉センサ(ForteBio)に結合させた。このセンサをまず、60 で10分間加熱されたRSV-Fタンパク質又は非加熱(デノボ)のRSV-Fタンパク質と共にインキュベートし、次いで、モタビズマブ、R347(負の対照)を含むウェルに移した。抗体のセンサ+1331H+sFの複合体への結合は、nmの光の変化(nm)である信号測定値の振れとして検出した。

#### 【0072】

図3Bに示されているように、実施例2の細胞結合の結果に一致して、RSV-Fタンパク質に結合するD25は、Fタンパク質が加熱されるとほぼ完全に消失したが、モタビズマブは、デノボ及び加熱RSV-Fタンパク質の両方に結合した。

#### 【0073】

同様に、4 での長期保存の影響を試験するために、センサ+1331Hの複合体をまず、CD CHO培地中、4 で6~7週間保存したRSV-Fタンパク質又は保存しなかったRSV-Fタンパク質と共にインキュベートし、次いで、D25又はモタビズマブを含むウェルに移し、nmを測定した。

#### 【0074】

図4は、CD CHO培地中、4 で保存したときに、恐らくFタンパク質の高次構造の変化により、D25のRSV-Fタンパク質への結合がゆっくりと減少したことを示している。対照的に、モタビズマブは、4 で7週間の保存後も結合の減少を示さず、モタ

10

20

30

40

50

ビズマブが非高次構造エピトープを認識するという知見に一致していた。

【0075】

総合すると、これらのバイオレイヤー干渉分析実験は、D25が、融合前形態のRSV-Fタンパク質で存在する高次構造エピトープに反応することをさらに裏付けている。

【0076】

#### 実施例4

D25は抗6ヘリックスバンドル抗体と競合しない

特に、D25が、十分に特徴付けられたエピトープ領域を有する他のRSV抗体と競合するか否かを試験するために、バイオレイヤー干渉分析を使用して、D25エピトープの位置をさらに決定した。

10

【0077】

図5Aに例示されているように、D25、モタビズマブ、又は負の対照抗体R347が、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で抗ヒトIgG Fc捕捉センサ(ForteBio)に結合した。センサを、キネティックバッファー(kinetics buffer)(ForteBio)を含むウェルに移して基準値を定めてから、60に10分間加熱されたsF含有CHO培地又は未処理のsF含有CHO培地のいずれかを含むウェルに移した。センサを、融合後形態のRSV-Fタンパク質の6ヘリックスバンドルに反応する $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティー精製ウサギポリクローナルIgG、又は $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb 1331H、即ち、RSV-Fタンパク質の規定C部位に反応する抗体を含む次のウェルに移した(Yunus et al., *Virology*, 396(2):226-237(2010); Beeler and Coelingh, *Journal of Virology*, 63(7):2941-2950(1989))。全ての結合曲線は、負の対照抗体に対して減じられた基線とした。タンパク質のセンサへの結合は、nmの光の変化(nm)である信号測定値の振れとして検出した。

20

【0078】

図5Bに示されている結果は、D25が非加熱(融合前)RSV-Fタンパク質には結合するが、ウサギ抗6ヘリックスバンドル(6xHB)抗体に対して強い結合性を有する加熱処理(融合後)Fタンパク質には結合しないことを裏付けている。図5Bのインサートは、D25と1331Hとが、融合前形態のRSV-Fタンパク質における異なるエピトープを認識することを示している。

30

【0079】

#### 実施例5

D25は抗原部位A、B、又はCに結合する抗体と競合しない

RSV-Fタンパク質は、一般に述べられている少なくとも6つの異なる中和抗原部位を有する。既に同定された抗RSVモノクローナル抗体、パリビズマブ(SYNAGIS(登録商標))、モタビズマブ、1153、1121、13/19、92-11C、131-2A、1331H、及び1308Fは、図6に例示されているように十分に特徴付けられた抗原部位A/II、B/I、又はCに結合する。

【0080】

D25が、これらの十分に特徴付けられた抗原領域のうちのいずれか1つに結合するか否かを決定するために、競合結合アッセイを行って、前述の抗RSV抗体のいずれかが、その抗原部位についてD25と競合するか否かを試験した。 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ のビオチン標識D25抗体を、全ての結合アッセイに使用した。非標識D25を正の対照として使用し、R347を負の対照として使用した。吸光度を $450 \text{ nm}$ で測定した。

40

【0081】

図7A~図7Cに示されているように、抗原部位A、B、又はCに結合することが知られている抗体のいずれも、RSV-Fタンパク質へのその結合についてD25と競合することができず、D25が部位AB、又はCに結合しないことを示唆した。他方、図7Dに示されているように、未知の抗原部位、即ち、AM22及びAM23を含む少数の抗RSV-F抗体は、結合アッセイでD25と効果的に競合し、AM22及びAM23のエピト

50

ープとのD25のエピトープの重複を示唆した。AM23は、AM22よりもD25とより効果的に競合し、AM23のエピトープがD25のエピトープにより類似している可能性を示唆した。

#### 【0082】

AM22及びAM23はそれぞれ、米国特許出願公開第2012/0070446 A1号明細書及び同第2010/0239593 A1号明細書に既に開示されていた。AM23は、1つの臨床分離株(CP096-B15)を除き、どのRSV-B株も中和しないことが既に分かっていた。また、アミノ酸209は、AM23の中和活性に重要であることも分かっていた(図8)。総合すると、これらの結果は、D25が、アミノ酸209を含む抗原性領域に結合し得ることを示唆している。

10

#### 【0083】

##### 実施例6

##### D25エピトープのマッピング

この実施例は、RSF-Fタンパク質のどのアミノ酸がD25の結合にとって重要であるかをさらに決定するために、D25によって中和され得ない一連のモノクローナル抗体耐性変異体(MARM)の作製を報告する。

#### 【0084】

この分析は、RSVウイルスのA分離株及びB分離株に対して行った。簡単に述べると、 $1 \sim 5 \times 10^6$  pfu/mlのRSV A2ウイルス又はRSV B18537ウイルスを、 $450 \text{ ng/ml}$  ( $200 \times \text{IC}_{50}$ )のD25 mAbで1時間インキュベートしてから、24ウェルプレートのコンフルエントHe p2細胞に感染させた。感染から最大6日後、プレートを凍結させ、そして解凍してウイルスを放出させ、このプロセスの上清を、新しいHe p2細胞のコンフルエント層で継代し、 $450 \text{ ng/ml}$ のD25と共に2時間インキュベートした。上記のように第2の継代に対して第3の継代を行った。3回の選択後のウイルス収量は、A2ウイルスで $8 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ であり、Bウイルスで $1.3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ であった。第3の継代後、細胞を保持し、溶解し、全RNAを細胞から単離した。Fタンパク質遺伝子をPCRによって増幅し、配列決定した。

20

#### 【0085】

8つのD25 MARMs (RSV MARM A1~A5及びB1~B3)を単離した。MARM A1~A5は、同じ変異を有することが分かった(図9)。MARM B2及びB3は、同じ変異を有することが分かった(図9)。

30

#### 【0086】

RSV MARM A1、B1、及びB2の変異Fタンパク質は、以下及び図10Aに示される。シグナルペプチドには、二重下線が付され、野生型RSV F A2タンパク質の高次構造エピトープを含む領域には下線が付されている。各変異についての変異アミノ酸は、太字で示されている。

##### MARM A1 Fタンパク質配列(配列番号12)

#### 【化6】

```

1  MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRLFLG LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVGSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPVYKQ SCSISNIATV IEFQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVITPVSTY MLTNSSELLSL INDMPTINDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTNTKEGS NICLTRIDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNGR IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLTLYVN KQEGKSLYVK GEPINIFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STINIMITTI IIVIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLN KDQLSGINNI AFSN

```

40

##### MARM B1 Fタンパク質配列(配列番号13)

## 【化7】

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQNITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKETKCN GTDTKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQNT PAANNRARRR APQYMNNTIN  
 121 TTKNLNVVIS KKKRRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKNA LLSTNKAVVS  
 181 LSNQVSVLTS KVLDLKYNIN **DRLLPIVNQ** SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPLSTY MLTNSELLSL INDMPTINDQ KKLMSNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTTNIKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQADTKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KLEGKNLYVK GEPIINYDF  
 481 LVFPPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRSD ELLHNVNTGK STTNIMITTI IIVIIIVLLS  
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLK KDQLSGINNI AFSK

10

## MARM B2 Fタンパク質配列(配列番号14)

## 【化8】

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQNITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE  
 61 LSNIKETKCN GTDTKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQNT PAANNRARRR APQYMNNTIN  
 121 TTKNLNVVIS KKKRRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKNA LLSTNKAVVS  
 181 LSNQVSVLTS KVLDLKYNIN **NRLVPIVNQ** SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN  
 241 AGVTTPLSTY MLTNSELLSL INDMPTINDQ KKLMSNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV  
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTTNIKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQADTKV  
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT  
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KLEGKNLYVK GEPIINYDF  
 481 LVFPPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRSD ELLHNVNTGK STTNIMITTI IIVIIIVLLS  
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLK KDQLSGINNI AFSK

20

## 【0087】

変異は、MARM A1変異ウイルスのアミノ酸N208Y、MARM B1変異ウイルスのアミノ酸N201D、及びMARM B2ウイルスのアミノ酸L204Vに位置していた。この領域(上記の配列の下線が付された部分)は、C末端から、タンパク質の融合プロセスに重要なFタンパク質の規定7残基反復配列までである。この同定されたD25エピトープ領域(図10Bに太い白の矢印で示されている部分)は、RSV-Fタンパク質の表面上にある。

## 【0088】

配列を以下の表2で比較する。

30

## 【0089】

表2: D25 MARM 配列の野生型RSV-Fタンパク質配列との比較  
(変異残基は太線であり、下線が付されている)

ペプチド	配列	配列番号
RSV-F 野生型 A (195-228)	LKNYI DKQLL PIVNK QSCSI SNIET VIEFQ QKNN	7
RSV-F D25 MARM A1 (195-228)	LKNYI DKQLL PIV <b><u>Y</u></b> K QSCSI SNIET VIEFQ QKNN	8
RSV-F 野生型 B (195-228)	LKNYI NNRL <b><u>L</u></b> L PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	9
RSV-F D25 MARM B1 (195-228)	LKNYI <b><u>N</u></b> DRLL PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	10
RSV-F D25 MARM B2 (195-228)	LKNYI NNRL <b><u>V</u></b> PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	11

40

50

## 【0090】

## 実施例7

## D25 MARMの中和アッセイ

単離されたD25 MARMを試験するためにRSVマイクロ中和アッセイを行った。この試験は、細胞ベースのELISAアッセイであり、このアッセイでは、感染HEp-2細胞を野生型又は変異Fタンパク質の発現に対して染色し、抗体の結合について試験した。

## 【0091】

まず、モノクローナル抗体モタビズマブを、全ての同定されたD25 MARMに対する中和活性についてD25と比較した。D25又はモタビズマブの希釈物(1~1000 ng/ml)を中和アッセイに使用し、野生型RSVウイルスを正の対照として使用した。図11に示されているように、モタビズマブは、100 ng/ml以下のモタビズマブを用いると、野生型RSVウイルス及び全てのD25 MARMの両方を中和することができたが(図11C及び図11D)、D25は、1~1000 g/mlの量を使用すると、野生型ウイルスのみを中和することができたが、いずれのMARMも中和することができなかった(図11A及び図11B)。

10

## 【0092】

D25とパリビズマブとの中和活性を比較する同様の実験を行った。D25又はパリビズマブの希釈物(0.01 µg/ml~10 mg/ml)をマイクロ中和アッセイに使用し、野生型RSVウイルスを正の対照として使用した。図12に示されているように、約1 µg/mlのD25は、野生型RSVウイルスを中和することができ、約100 µg/mlのパリビズマブは、3つ全てのD25 MARMを中和することができた。D25 MARM B1及びMARM B2の両方は、D25の中和に対して完全に感受性がなく(図13B及び図13C)、位置201及び204のアミノ酸がD25の結合に重要であることを示唆した。他方、D25は、A2 MARMを中和できたが、野生型A2を中和するために必要な濃度よりも、最小でも100倍高い濃度であった。

20

## 【0093】

## 実施例8

## HR1及びSKエプトープの作製

実施例5で言及したように、D25の結合に重要な同定された領域は、C末端から、タンパク質の融合プロセスに重要なFタンパク質の規定HR1までである。従って、HR1領域(図1B)を含む構築物を、D25の結合を試験するために作製した。

30

## 【0094】

さらに、拘束された構造における7残基反復配列のC末端の延長及びN末端の切断は、D25エプトープの融合前構造をより反映し得ると思われる。SKエプトープと呼ばれるこの構築物は、図13に例示されているように、テッポウリ(Ecballium elaterium)トリプシンインヒビターII(EETI-II)のスカッシュノット(squash knot)(SK)構築物の第1のループにおけるA2由来のRSV-Fタンパク質のアミノ酸195~228を含む。RSV-Fタンパク質の位置212のシステインは、セリンによって置換されていた。

40

## 【0095】

これらの構築物を、大腸菌(E.coli)で発現させ、タンパク質を結合アッセイのために精製した。

## 【0096】

## 実施例9

## D25はHR1領域よりもSKエプトープにより強く結合する

D25のSKエプトープに対する結合親和性とHR1領域に対する結合親和性を比較するために、バイオレイヤー干渉分析を行った。D25を、1.5625 nM~100 nMの範囲の濃度で抗ヒトIgG Fc捕捉センサに適用した。センサをキネティックバッファーに移して基準値を設定し、次いで、HR1断片又はSKエプトープ構築物のいずれ

50

かを含むウェルに移した。

【0097】

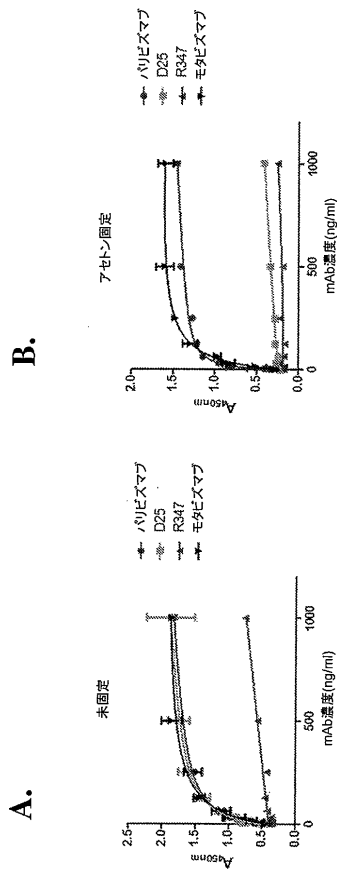
図14に示されているように、D25は、濃度依存的にHR1及びSKエピトープの両方に結合した。しかしながら、D25は、計算したK<sub>D</sub>値によって示されているように、HR1よりもSKエピトープに対して高い親和性を示した(SKエピトープの58.5pMに対してHR1の1.9nM)。

【0098】

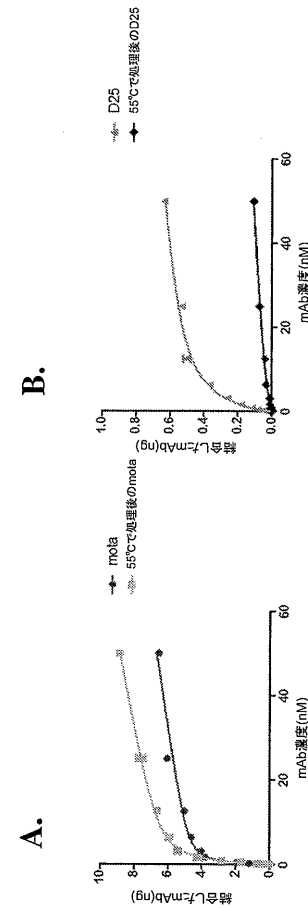
本開示は、その個々の態様の1つの例示であることを意図した、記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるものではなく、機能的に均等である全ての組成物又は方法は、本開示の範囲内である。実際、本明細書に図示及び記載されているものだけでなく、本開示の様々な変更形態が、前述の説明及び添付の図面から当業者には明らかになるであろう。このような変更形態は、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

10

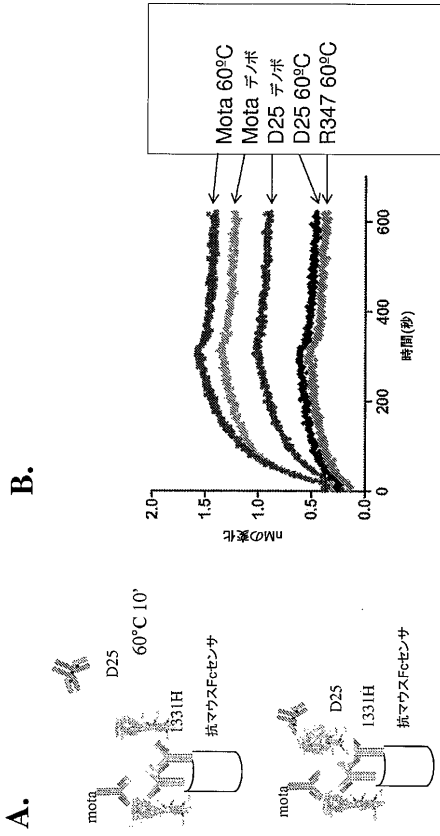
【図1】



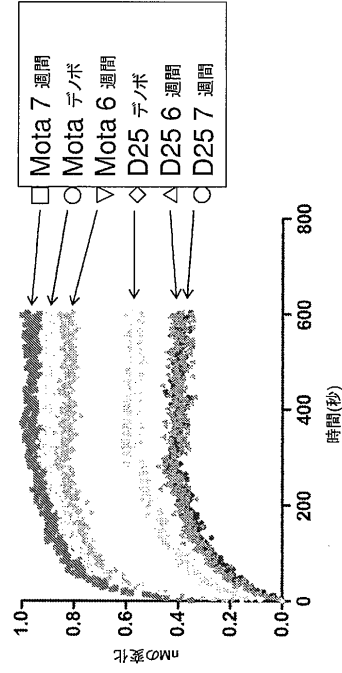
【図2】



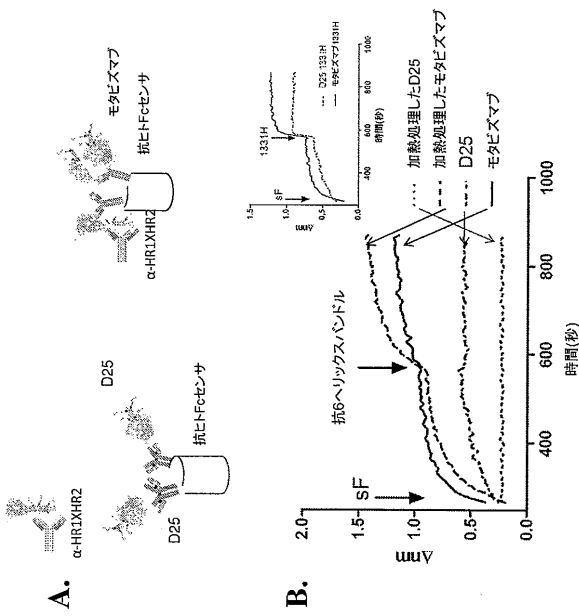
【 図 3 】



【 図 4 】

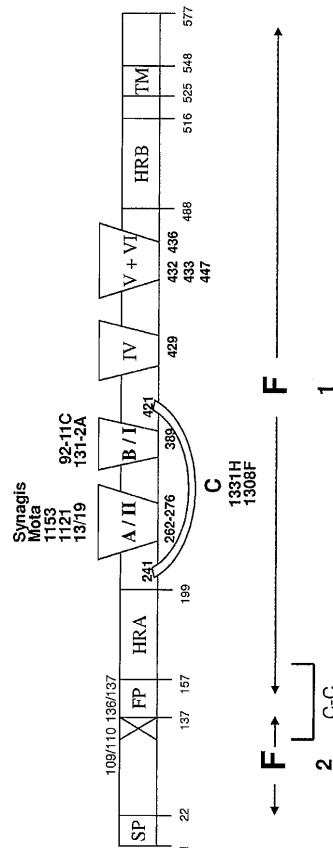


【 図 5 】



【 図 6 】

RSV-Fにおける抗原部位

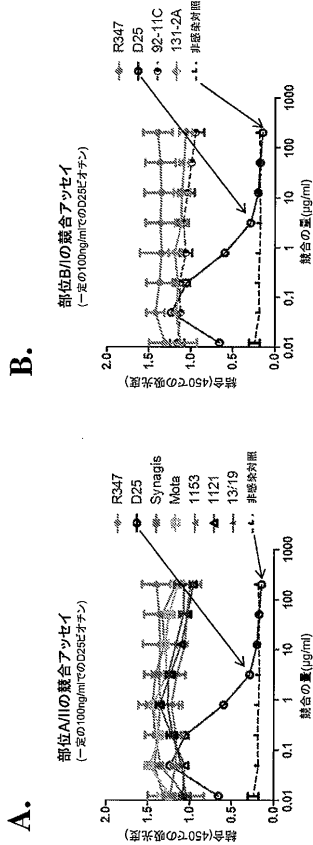


AM23結合部位

	F2		欠失ペプチド										F1					
	45	67	79	115	118	124	125	152	197	202	209	215	226	276	278	326	470	517
9320	F	T	I	M	T	N	L	I	S	Q	Q	S	K	S	V	I	K	N
18537	F	T	I	M	T	N	L	I	N	R	Q	S	M	S	V	I	K	N
B1					I			N	Q			K						
B5						N	Q					K		A	T			
B15						N	Q	K				K		A	T			
B28						N	Q					K		A	T			
B31						N	Q					K						
A2	L	N	I	M	T	K	T	V	N	Q	K	S	K	N	V	T	K	N

【 図 8 】

【 図 7 - 1 】

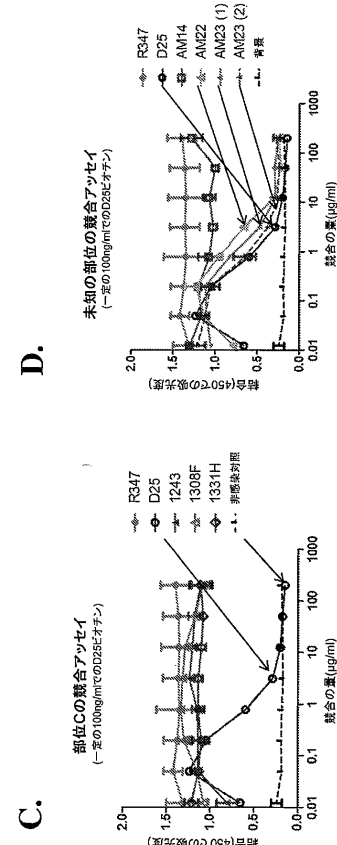


【 図 9 】

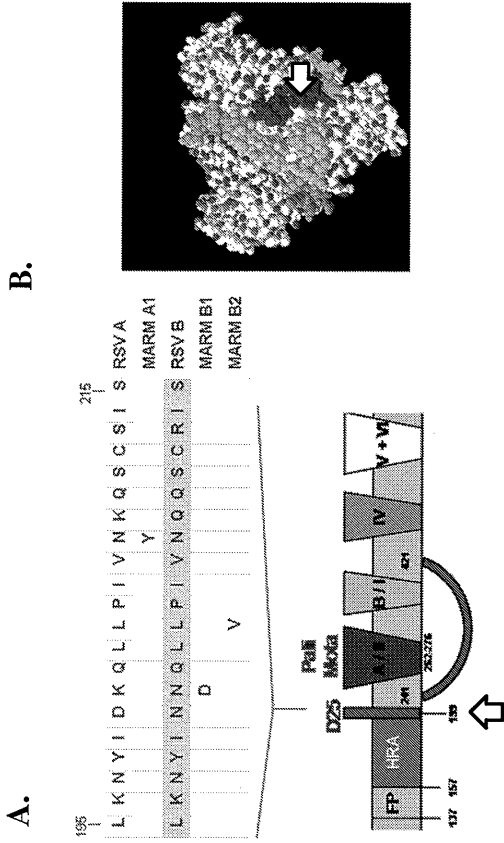
提案される抗原部位におけるRSV配列

195-L	K	N	Y	I	D	K	Q	L	L	P	I	V	N	K	Q	S	C	S	I	S	-215	<b>RSV-A2</b>
L	K	N	Y	I	D	K	Q	L	L	P	I	V	N	K	Q	S	C	S	I	S		RSV MARM5
L	K	N	Y	I	N	D	R	L	L	P	I	V	N	Q	Q	S	C	R	I	S		A1-A5
L	K	N	Y	I	N	R	L	V	P	I	V	N	Q	Q	Q	S	C	R	I	S		RSV MARM B1
195-L	K	N	Y	I	N	R	L	L	P	I	V	N	Q	Q	Q	S	C	R	I	S	-215	RSV MARM B2/B3
																						RSV-B1&537

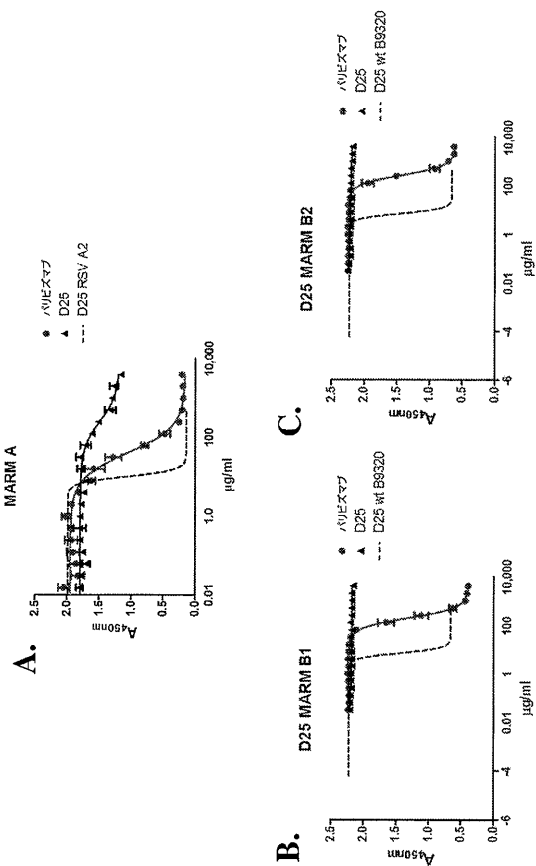
【 図 7 - 2 】



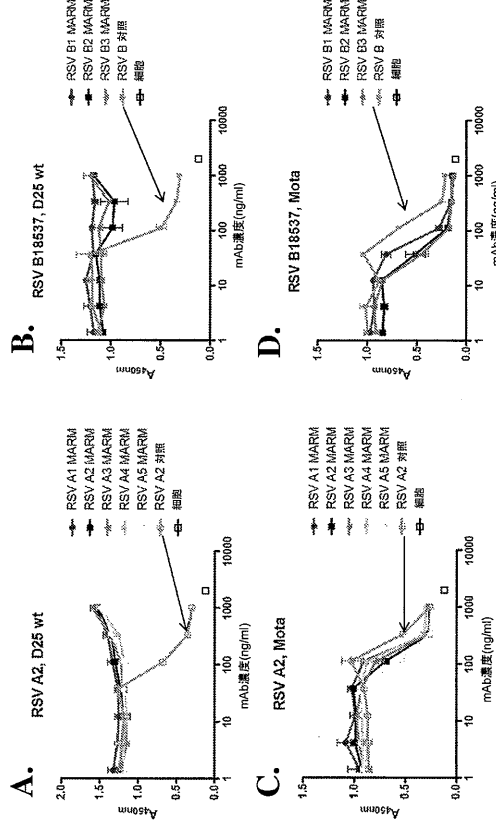
【 図 1 0 】



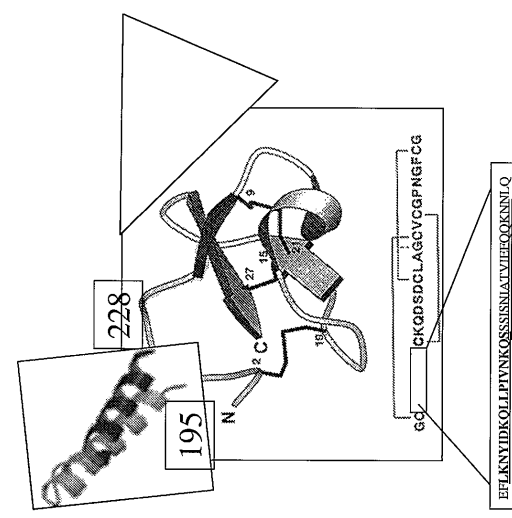
【 図 1 2 】



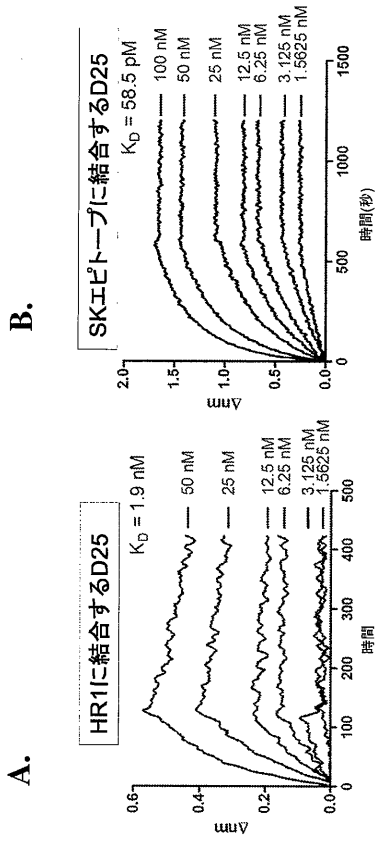
【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2016508503000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/014054

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61P 31/14 (2014.01) USPC - 424/186.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/155; A61P 31/14; C12N 15/86 (2014.01) USPC - 424/147.1, 184.1, 186.1, 193.1; 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 39/12, 39/155, 2039/53; C07K 14/005; C12N 27/10/10343, 2760/18522, 2760/18534, 2800/22, 2840/20 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCLELLAN et al. "Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab," Nature Structural & Molecular Biology, 24 January 2010 (24.01.2010); Vol. 17, No. 2, Pgs. 248-250 and Supplemental Materials. entire document	1, 3, 7, 8 4
Y	US 2002/0018780 A1 (KOENIG et al) 14 February 2002 (14.02.2002) entire document	4, 9-14, 16-20
Y	WO 2012/089231 A1 (VITELLI et al) 05 July 2012 (05.07.2012) entire document	9-14, 16-20
A	WO 2009/128951 A2 (PRICE et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document	1-4, 7-20
P, X	MCLELLAN et al. "Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody," Science, 25 April 2013 (25.04.2013), Vol. 340, No. 6136, Pgs. 1113-1117 and Supplementary Materials. entire document	1-4, 7-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 April 2014		Date of mailing of the international search report <b>17 APR 2014</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSF: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/014054

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper  
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, and 14 were searched.

**PCT/US2014/014054 17.04.2014****INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2014/014054

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 5, 6  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>		
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>		
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/155</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>39/155</b>		
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>		N
<b>C 4 0 B</b>	<b>30/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 4 0 B</b>	<b>30/04</b>		
<b>C 4 0 B</b>	<b>60/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 4 0 B</b>	<b>60/10</b>		

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

(74)代理人 100182992

弁理士 江島 孝毅

(72)発明者 ウルブラント, ナンシー

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 DA06 HA01

4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 CA24 CA44 CA46

4C085 BA57 DD62 EE01

4H045 AA11 BA10 BA41 CA01 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	呼吸道合胞病毒F蛋白表位		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016508503A</a>	公开(公告)日	2016-03-22
申请号	JP2015556154	申请日	2014-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
[标]发明人	ウルブラントナンシー		
发明人	ウルブラント,ナンシー		
IPC分类号	C07K14/135 C07K19/00 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/155 G01N33/53 C40B30/04 C40B60/10		
CPC分类号	A61P31/14 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2760/18534 A61K39/155 C07K16/1027 C07K2317/34 C07K2317/76 C12N7/00		
FI分类号	C07K14/135 C07K19/00.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/155 G01N33/53.N C40B30/04 C40B60/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/DA06 4B024/HA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/BA57 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/759664 2013-02-01 US 61/783380 2013-03-14 US		
其他公开文献	JP2016508503A5 JP6450688B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

呼吸道合胞病毒是一种属于副粘病毒科的感冒病毒。RSV是一种传染性强的病毒，是2岁以下儿童下呼吸道疾病的最常见原因。在单个RSV季节中，多达98%的参加日托的儿童将被感染。感染RSV的儿童中有0.5%至3.2%需要住院。在美国，每年报告约90,000例住院治疗及4500例死亡。RSV住院的主要危险因素是早产，慢性肺病，先天性心脏病，免疫缺陷以及其他6周以下的健康婴儿。[选择图]图4

(21) 出願番号	特願2015-556154 (P2015-556154)	(71) 出願人	50433972
(86) (22) 出願日	平成26年1月31日 (2014.1.31)		メディムーン, エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月26日 (2015.8.26)		アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディムーン ウエイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/014054		
(87) 国際公開番号	W02014/121021	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成26年8月7日 (2014.8.7)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	61/759,664	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成25年2月1日 (2013.2.1)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122389
(31) 優先権主張番号	61/783,380		弁理士 新井 栄一
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)	(74) 代理人	100111741
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100169971
			弁理士 菊田 尚子