

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6412107号
(P6412107)

(45) 発行日 平成30年10月24日(2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日(2018.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

請求項の数 12 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-508114 (P2016-508114)	(73) 特許権者	516257833
(86) (22) 出願日	平成26年4月14日 (2014.4.14)		ヤンセン ファッシンズ アンド プリベ ンション ベーフェー
(65) 公表番号	特表2016-521969 (P2016-521969A)		JANSSEN VACCINES & PREVENTION B. V.
(43) 公表日	平成28年7月28日 (2016.7.28)		オランダ国 2333 セーエン ライデ ン アルヒメーデスウェッハ 4
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/057499	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02014/170257		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014.10.23)	(74) 代理人	100093676
審査請求日	平成29年2月8日 (2017.2.8)		弁理士 小林 純子
(31) 優先権主張番号	61/812,098	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成25年4月15日 (2013.4.15)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100104282
(31) 優先権主張番号	13179241.8		弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成25年8月5日 (2013.8.5)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R S V Gタンパク質に結合するヒト抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

呼吸器合胞体ウイルス (R S V) の G タンパク質に特異的に結合することができ、かつ R S V A 株および B 株を中和することができるヒト抗体であって、前記抗体が、前記 R S V G タンパク質の中央保存ドメイン内のエピトープに結合し、前記エピトープが、R S V A 2 株の R S V G タンパク質のアミノ酸 1 6 1 ~ 1 6 9 の 1 つ以上のアミノ酸または他の株における対応するアミノ酸の 1 つ以上のアミノ酸を含み、

前記抗体が、

a) 配列番号 1 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 2 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 3 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 1 3 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 1 4 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 1 5 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

b) 配列番号 4 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 5 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 6 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 1 6 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 1 7 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 1 8 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

c) 配列番号 7 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 8 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 9 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 1 9 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 2 0 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 2 1 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

d) 配列番号 1 0 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 1 1 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 1 2 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 2 2 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 2 3 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 2 4 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

10

20

e) 配列番号 25 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 26 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 27 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 28 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 29 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 30 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、ならびに
 f) 配列番号 31 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 32 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 33 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 34 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 35 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 36 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体
からなる群から選択されるものである、抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体の抗原結合断片。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体および / または請求項 2 に記載の抗原結合断片を含み、少なくとも 1 つの治療剤および / または検出可能な作用物質をさらに含む、免疫複合体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体および / または請求項 2 に記載の抗原結合断片をコードする核酸分子。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の少なくとも 1 つの核酸分子を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の少なくとも 1 つのベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の抗体および / または請求項 2 に記載の抗原結合断片を産生する方法であって、

a) 前記抗体の発現を促す条件下で請求項 6 に記載の宿主細胞を培養するステップと、任意選択で、

b) 前記発現された抗体および / または抗原結合断片を回収するステップとを含む方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の抗体および / または請求項 2 に記載の抗原結合断片を含み、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、医薬組成物。

【請求項 9】

医薬としての使用のための、請求項 1 に記載の抗体および / または請求項 5 に記載の抗原結合断片または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

R S V 感染症の予防または処置またはその組み合わせにおける使用のための、請求項 1 に記載の抗体、請求項 2 に記載の抗原結合断片、または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの請求項 1 に記載の抗体、請求項 2 に記載の抗原結合断片、もしくは請求項 8 に記載の医薬組成物またはその組み合わせを含むキット。

【請求項 12】

R S V 感染症を検出する方法であって、

(a) 請求項 1 に記載の抗体、請求項 2 に記載の抗原結合断片および / または請求項 3 に記載の免疫複合体を使用してサンプル中の R S V 抗原のレベルをアッセイするステップと

(b) R S V 抗原のアッセイレベルをコントロールレベルと比較するステップであって、それによって、前記コントロールレベルと比較した前記 R S V 抗原のアッセイレベルの増加が R S V 感染症を示す、ステップと

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、医学に関する。本発明は、特に、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）の付着糖タンパク質（Gタンパク質）に特異的に結合し、かつRSVを中和する抗体および抗原結合断片に関する。本発明はまた、抗RSV抗体を使用する診断方法、予防方法、および治療方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、麻疹およびムンプスを引き起こすものなどの一般的な呼吸器ウイルスも含む、パラミクソウイルス科のマイナス鎖一本鎖RNAウイルスである。2つの主なRSVサブタイプ：サブタイプAおよびサブタイプBがある。RSVは、上気道において複製し、次いで、より下の気道に広がり、細気管支炎または肺炎に至る。ウイルスは、炎症、気道の浮腫、粘液産生の増加、および呼吸上皮の衰弱を引き起こす。

10

【0003】

世界中の呼吸器疾患の推定6400万の症例および160,000人の死亡は、RSV誘発性の疾患に起因する。重度のRSV感染症は、子供および乳児において、とりわけ早産児において、最も頻繁に生じる。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、重病の危険性を著しく増加させ得る。RSV感染症はまた、高齢者、慢性肺病を有する個人、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も、重病を引き起こし得る。

【0004】

20

RSV感染症の予防および処置に対するいくつかのアプローチが調査されてきた。ドナーから単離される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ピズマブ（SYNAGIS（登録商標））は、ハイリスク早産児におけるRSV予防法に承認された。しかしながら、RSVに対するワクチンまたは市販で入手可能な処置は、依然として利用可能ではない。RNA阻害剤であるリバビリンのみが、RSV感染症の処置に承認されている。RSV感染症の処置に有効となるために、有効性が低いことに起因して高用量、繰り返し投与、および/または多量のパリピズマブなどの抗体産物が必要とされる。

【0005】

RSVは、2つの主な表面糖タンパク質、FおよびGを有する。Fタンパク質は、融合を媒介し、インビトロにおいて、細胞の細胞質へのウイルスの侵入を可能にし、合胞体の形成を促進する。Fタンパク質配列は、RSV株の間でかなり（約90%）保存されている（Johnson and Collins, J Gen Virol. (1988) 69:2623-2628）。唯一の販売されているモノクローナル抗体パリピズマブは、RSVのFタンパク質に対して向けられる。

30

【0006】

RSVのGタンパク質は、非常にグリコシル化されており、付着タンパク質として機能する表面タンパク質である。Fタンパク質とは対照的に、Gタンパク質は、RSV A2株のGタンパク質のアミノ酸残基153~184または他の株における対応するアミノ酸残基を含む中央保存ドメイン（CCD）を除いて、株にわたってかなり変異性である。中央保存ドメインおよび隣接領域（残基145~193）の両方は、強固で重いO-グリコシル化ムチン様領域に接している。中央保存ドメインのN-末端の半分は、700を超える株の間で保存されている小さな領域を含有する。C-末端の半分は、1-4, 2-3配置でつながれた4つの保存システインを含有し、フォールドして、システインの輪なわ（cysteine noose）になる。

40

【0007】

Gタンパク質に向けられる抗体を使用する受動免疫は、株にわたる配列保存の欠如により実用的でないとして一般に考えられてきたが、RSV Gタンパク質に結合するモノクローナル抗体の中和が知られている。Anderson, L. J. et al (J. Virol. (1988) 62:4232-4238)は、FおよびGマウスモノクローナル抗体

50

の混合物の中和能力を記載し、これらのうちの1つは、RSV Gタンパク質に結合する（つまり131-2G）。この抗体の抗原部位は、その後、Sullender (Virrol. (1995) 209:70-79) によって定められた。この抗体は、RSVの主な株に相当するRSVグループAおよびBの両方に結合することが分かった。そのうえ、国際公開第2009/055711号パンフレットは、RSV A2のGタンパク質内の保存モチーフと免疫反応性であり、RSV AおよびBサブタイプに対する中和活性を有する、3D3および3G12などの抗体を開示する。これらの抗体は、中央保存ドメインの線状エピトープを認識することが示されたが、RSV抗体およびワクチンを評価するために好ましい動物モデル（つまりコットンラット）において試験されなかった。

【0008】

特に幼い子供においておよび高齢者において、RSVによって引き起こされる呼吸器疾患の重症度を考慮して、RSV感染症を予防し、処置するための有効な手段の必要性が引き続き存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、RSV Gタンパク質に特異的に結合し、かつRSVを中和することができる単離抗体およびその抗原結合断片を提供する。抗体および抗原結合断片は、好ましくは、サブタイプAおよびBの両方のRSVに特異的に結合し、中和することができる。好ましくは、抗体は、ヒト抗体である。抗体は、RSV Gタンパク質の中央保存非グリコシル化領域（中央保存ドメイン、CCDとも呼ばれる）のエピトープに結合する。

【0010】

抗体および抗原結合断片は、Gタンパク質に対して高い親和性を有し、強力な中和能力を有する。本発明の抗体および抗原結合断片は、単独でならびに他の診断剤、予防剤、および/または治療剤と組み合わせての両方で、診断剤、予防剤、および/または治療剤として有用である。

【0011】

本発明は、1つ以上の本発明の抗体および/またはその抗原結合性断片を含む組成物をさらに提供する。本発明はまた、抗RSV抗体を用いる診断方法、予防方法、および治療方法も提供する。予防方法および治療方法は、RSV感染症およびRSV媒介性の疾患もしくは状態の予防もしくは処置ならびに/またはRSV感染症の1つ以上の症状の回復のために、抗RSV抗体および/またはその抗原結合断片をヒト対象に投与するステップを含む。複数の異なる抗RSV抗体および/もしくはその抗原結合断片のならびに/または他の抗RSV抗体との組み合わせは、併用療法に使用することができる。他の予防剤または治療剤と組み合わせて抗RSV抗体および/またはその抗原結合断片を含む組成物も提供される。本発明はまた、抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸分子も提供する。

【0012】

本発明の抗体は、抗体が、少なくともインビトロ中和アッセイにおいて、あらゆる既知の抗RSV G抗体よりも、特に、既知の抗RSV Gモノクローナル抗体3D3よりも、RSV A型およびB型に対して強力であるという点で独特である。

【0013】

本発明の抗体は、RSV Gタンパク質上の独特のエピトープに結合する。

【0014】

ある実施形態では、抗体が、そのアミノ酸配列において、CXXXXCモチーフを含む重鎖CDR3を含む。

【0015】

ある実施形態では、抗体およびその抗原結合断片は、それらが抗RSV F抗体と相加的および/または相乗的に作用するという点で独特である。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0016】

【図1】図1は、RSV G aおよびRSV G bタンパク質に対する結合プロファイルを示す図である。IgGは、組換えRSV G aおよびG bタンパク質の外部ドメインに結合するそれらの能力についてELISAアッセイにおいて試験した。白丸(破線)は、G a (RSV A / Long) への結合を表し、黒丸(実線)は、G b (RSV B / B 1) への結合を表す。

【図2】図2は、RSV - AおよびRSV - B株に対する中和プロファイルを示す図である。IgGは、RSV - AおよびRSV - B株を中和するそれらの能力について中和アッセイにおいて試験した。白丸(点線)は、RSV - A (RSV A / A 2) の中和を表し、黒丸(実線)は、RSV - B (RSV B / 18537) の中和を表す。

【図3】図3は、RSV GペプチドへのRSV G特異的モノクローナル抗体の結合を示す図である(ELISA)。中央保存ドメインにまたがる短いおよび長いRSV Gペプチド(表15)を、様々な濃度のRSV G特異的mAb: CB003.1(黒色の丸、実線)、CB010.7(白抜きの黒色の丸、破線)、またはモノクローナル抗体なし(明るい灰色の丸)と共に、ELISAにおける結合実験に使用した。

【図4】図4は、PepScanによる最小エピトープマッピングを示す図である。中央領域(RSV - G A型およびB型の残基145~201)のすべての完全に重複する5アミノ酸長、8アミノ酸長、10アミノ酸長、14アミノ酸長、18アミノ酸長、25アミノ酸長、および32アミノ酸長ペプチドのRSV Gタンパク質特異的抗体の結合活性。ペプチドとの結合活性は、PepScan ELISAシグナルに比例する垂直線として示す。

【図5】図5は、PepScanによるCB003.1およびCB010.7エピトープの完全置換分析を示す図である。ペプチドとの、それぞれ100および30ng/mLのモノクローナル抗体CB003.1およびCB010.7の結合活性は、PepScan ELISAシグナルに比例した垂直線として示す。20本の線のそれぞれのグループは、もとの14アミノ酸長ペプチド(FHFVFNFPVPCVIC)におけるそれぞれのアミノ酸位置に対する完全置き換えセットに相当する。20本の線のそれぞれのグループ内で、置換は、1文字アミノ酸コード(ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY)に基づくアルファベット順になっており、もとの14アミノ酸長ペプチドの反応性は、灰色のバーとして示す。

【図6】図6は、RSV Gタンパク質中央領域のアラニンスキャニング(PepScan)を示す図である。A型(左パネル)およびB型(右パネル)のRSV - G中央ドメインの残基161~192に対応するペプチドのすべての位置でのアラニン置換。A型の180位のアラニンをグリシンと置換した。もとのペプチドの反応性は、灰色のバーとして示す。

【図7】図7は、RSV Gタンパク質中央領域の天然に存在する変異体へのモノクローナル抗体の結合を示す図である。入手可能なA型(上パネル)およびB型(下パネル)変異体に対応する様々なペプチドとのmAb CB003.1およびCB010.7の結合。野生型ペプチドの反応性は、灰色のバーとして示す。

【図8】図8は、チャレンジ(challenge)の4日後の肺および鼻甲介ウイルス負荷に対するコットンラットRSV - A / Longモデルにおける抗RSV G mAbの予防効能を示す図である。

【図9】図9は、チャレンジの4日後の肺および鼻甲介ウイルス負荷に対するコットンラットRSV - A / Longモデルにおける抗RSV G mAbの治療効能を示す図である。

【図10】図10は、チャレンジの6日後の病理組織診断スコアに対するコットンラットRSV - A / Longモデルにおける抗RSV G mAbの治療効能を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

10

20

30

40

50

本発明において使用される用語の定義を下記に示す。

【0018】

本明細書において使用される用語「含まれる」または「含む」は、語「限定を伴うことなく」が続くと見なされる。

【0019】

本明細書において使用されるように、用語「抗体」は、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体を含む免疫グロブリン分子を指す。用語「抗体」は、当技術分野において知られている免疫グロブリンクラスおよびサブクラスをすべて含む。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、抗体は、5つの主なクラスのインタクトな抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMに分けることができ、これらのいくつかのものは、サブクラス（アイソタイプ）、たとえばIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4にさらに分けられてもよい。

【0020】

抗原結合断片という用語は、免疫グロブリンの結合パートナー、つまりRSV Gタンパク質への特異的な結合について、インタクトな免疫グロブリンと競合する、免疫グロブリンの断片を含む抗原結合ドメインおよび/または可変ドメインを指す。構造にかかわらず、抗原結合断片は、インタクトな免疫グロブリンによって認識されるものと同じ抗原と結合する。抗原結合断片は、とりわけ、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域(CDR)断片、単鎖抗体(scFv)、二価単鎖抗体、(単一)ドメイン抗体、二特異性抗体、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、(ポリ)ペプチドへの特異的な抗原結合を与えるのに十分な免疫グロブリンの少なくとも断片を含有する(ポリ)ペプチド、などを含む。抗原結合断片は、抗体のアミノ酸配列の少なくとも2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、または250近接アミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを含んでもよい。抗原結合断片は、合成してまたはインタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって産生されてもよく、またはそれらは、組換えDNA技術によって遺伝子的に操作されてもよい。産生の方法は、当技術分野においてよく知られており、たとえば参照によって本明細書において組み込まれるAntibodies: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow and D, Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New Yorkにおいて記載される。抗体またはその抗原結合断片は、1つ以上の結合部位を有していてもよい。2つ以上の結合部位がある場合、結合部位は互いに同一であってもよく、またはそれらは異なってもよい。

【0021】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、単一の特異性の抗体分子を指す。モノクローナル抗体は、特定のエピトープへの単一の結合特異性および親和性を示す。したがって、用語「ヒトモノクローナル抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来するもしくはそれに基づくまたは完全合成配列に由来する可変および定常領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を指す。モノクローナル抗体を調製する方法は、結合特異性にとって重要ではない。

【0022】

本明細書において使用される用語「機能的変異体」は、参照抗体と結合パートナー、つまりRSVへの特異的な結合について競合することができる、参照抗体のヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列と比較して、1つ以上のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸が改変されたヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列を含む抗体を指す。言い換えれば、参照抗体のアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列における修飾は、ヌクレオチド配列によってコードされるまたはそのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特質に有意に影響を与えず、改変もしない、つまり、抗体はなお、その標的を特異的に認識し、それに結合することができる。機能的変異体は、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、追

10

20

30

40

50

加、および欠失を含む保存的配列修飾を有していてもよい。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発およびランダムなPCR媒介性突然変異誘発など、当技術分野において知られている標準的な技術によって導入することができ、天然および非天然ヌクレオチドおよびアミノ酸を含んでいてもよい。

【0023】

本発明の抗体に関して本明細書において使用される用語「中和する」は、中和が実現されるメカニズムに関係なく、その生物学的効果を中和するもしくは阻害することおよび/またはRSVの感染力価を低下させることによって、ウイルスによる細胞の感染を予防するまたは阻害することができる抗体を指す。中和は、たとえば、細胞表面へのウイルスの付着もしくは接着を阻害することによってまたは標的細胞へのウイルスの付着後のウイルスおよび細胞の膜の融合を阻害することによって、などで実現することができる。

10

【0024】

抗体およびその結合パートナー、たとえば抗原の相互作用に関して、本明細書において使用される用語「特異的に結合する」は、相互作用が、特定の構造、たとえば結合パートナー上の抗原決定基またはエピトープの存在に依存することを意味する。言いかえれば、抗体は、結合パートナーが他の分子または有機体の混合物中に存在する場合でさえ、結合パートナーに優先的に結合するまたはそれを認識する。結合は、共有結合もしくは非共有結合の相互作用またはその両方の組み合わせによって媒介されてもよい。さらに言いかえれば、用語「特異的に結合する」は、抗体が、抗原決定基またはエピトープと特異的に免疫反応性であり、他の抗原決定基またはエピトープと免疫反応性ではないということの意味する。抗原に(免疫)特異的に結合する抗体は、たとえばラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫吸着法(ELISA)、BIACORE、または当技術分野において知られている他のアッセイによって決定されるように、より低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドに結合してもよい。抗原に特異的に結合する抗体またはその断片は、同じエピトープを運び、関係する抗原と交差反応してもよい。好ましくは、抗原に特異的に結合する抗体またはその断片は、他の抗原と交差反応しない。

20

【0025】

本発明の詳細な説明

第1の態様では、本発明は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)のGタンパク質に特異的に結合することができ、かつRSVを中和することができる抗体および抗原結合断片を提供する。抗体は、好ましくは、サブタイプAおよびBの両方のRSVに特異的に結合し、中和することができる。好ましくは、抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。

30

【0026】

本発明によれば、抗体および抗原結合断片は、RSV Gタンパク質の中央保存ドメイン(CCD)のエピトープに結合する。中央保存ドメインは、RSV A2株のGタンパク質のアミノ酸153~184(または他の株における対応するアミノ酸残基)を含むアミノ酸配列にまたがる。ある実施形態では、抗体および抗原結合断片が、アミノ酸残基161~169を含むアミノ酸配列内の1つ以上のアミノ酸残基、特に、RSV A2株のGタンパク質のアミノ酸残基162~168(RSV株A2株に従うナンバリング)を含むアミノ酸配列内の1つ以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

40

【0027】

したがって、シスチンの輪なわのN-末端である部位に位置するGタンパク質中のエピトープに結合する抗体および抗原結合断片が、提供される。本発明によれば、本発明の中和抗体のうちの少なくともいくつかは、たとえば以前に記載されたモノクローナル抗体3D3(国際公開第2009/055711号パンフレット)のように、類似するが同一ではない線状エピトープに結合するという事実にもかかわらず、本発明の抗体は、インビトロ中和アッセイにおいて測定されるように、より高い中和効力を有することが示された。本発明によれば、本発明の抗体が独特な方法でこの線状エピトープに結合することが示された。したがって、本発明によれば、これらの抗体は、RSV A型およびB型の161~169エピトープ(RSV株A2に従うナンバリング)に対して異なる側鎖特異性を有

50

することが示された。これは、たとえば、本発明の抗体のエピトープが、たとえば3D3と比較して、異なる本質的な残基を有することを示す置換分析によって表される（実施例11を参照されたい）。

【0028】

本発明の抗体および抗原結合断片は、インビトロ中和アッセイ、特に、実施例7において記載されるインビトロアッセイにおいて、既知の抗RSV G抗体のいずれよりもRSV V A型およびB型に対して強力である、特に、既知の抗RSV Gモノクローナル抗体3D3よりも強力であることが示された。

【0029】

ある実施形態では、RSV株A/A2(ATCC Cat. No. VR-1540)に対する抗体および抗原結合断片のIC50(プラーク形成の50%の中和に有効な希釈)が、40ng/ml未満であったおよび/またはRSV株B/18537(ATCC Cat. No. VR-1589)に対するIC50が、30ng/ml未満であった。

10

【0030】

一実施形態では、抗体が、1F12、3G12、1A5、3D3、1G1、2B11、5D8、2D10、3F9、1D4、1G8、6A12、10C6(国際公開第2009/055711号パンフレットに記載される)からなる群から選択される抗体ではない。

【0031】

ある実施形態では、本発明の抗体または抗体断片が、1F12、3G12、1A5、3D3、1G1、2B11、5D8、2D10、3F9、1D4、1G8、6A12、および10C6(国際公開第2009/055711号パンフレットに記載される)からなる群から選択される抗体とRSV Gタンパク質への結合について競合する。

20

【0032】

ある実施形態では、抗体が、そのアミノ酸配列において、CXXXXCモチーフを含む重鎖CDR3を含む。

【0033】

ある実施形態では、抗体が、

- a) 配列番号1の重鎖CDR1領域、配列番号2の重鎖CDR2領域、および配列番号3の重鎖CDR3領域、
 - b) 配列番号4の重鎖CDR1領域、配列番号5の重鎖CDR2領域、および配列番号6の重鎖CDR3領域、
 - c) 配列番号7の重鎖CDR1領域、配列番号8の重鎖CDR2領域、および配列番号9の重鎖CDR3領域、
 - d) 配列番号10の重鎖CDR1領域、配列番号11の重鎖CDR2領域、および配列番号12の重鎖CDR3領域、
 - e) 配列番号25の重鎖CDR1領域、配列番号26の重鎖CDR2領域、および配列番号27の重鎖CDR3領域、または
 - f) 配列番号31の重鎖CDR1領域、配列番号32の重鎖CDR2領域、および配列番号33の重鎖CDR3領域
- を含む重鎖を含む。

30

40

【0034】

ある実施形態では、抗体が、

- a) 配列番号13の軽鎖CDR1領域、配列番号14の軽鎖CDR2領域、および配列番号15の軽鎖CDR3領域、
- b) 配列番号16の軽鎖CDR1領域、配列番号17の軽鎖CDR2領域、および配列番号18の軽鎖CDR3領域、
- c) 配列番号19の軽鎖CDR1領域、配列番号20の重鎖CDR2領域、および配列番号21の軽鎖CDR3領域、
- d) 配列番号22の軽鎖CDR1領域、配列番号23の軽鎖CDR2領域、および配列番号24の軽鎖CDR3領域、

50

e) 配列番号 28 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 29 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 30 の軽鎖 C D R 3 領域、または

f) 配列番号 34 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 35 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 36 の軽鎖 C D R 3 領域を含む軽鎖を含む。

【 0 0 3 5 】

ある実施形態では、抗体が、

a) 配列番号 1 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 2 の重鎖 C D R 2 領域、配列番号 3 の重鎖 C D R 3 領域、および配列番号 13 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 14 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 15 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

b) 配列番号 4 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 5 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 6 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 16 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 17 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 18 の軽鎖 C D R 3 領域、

c) 配列番号 7 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 8 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 9 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 19 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 20 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 21 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

d) 配列番号 10 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 11 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 12 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 22 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 23 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 24 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、

e) 配列番号 25 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 26 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 27 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 28 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 29 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 30 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体、ならびに

f) 配列番号 31 の重鎖 C D R 1 領域、配列番号 32 の重鎖 C D R 2 領域、および配列番号 33 の重鎖 C D R 3 領域、配列番号 34 の軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 35 の軽鎖 C D R 2 領域、および配列番号 36 の軽鎖 C D R 3 領域を含む抗体からなる群から選択される。

【 0 0 3 6 】

ある実施形態では、抗体が、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 43 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、または配列番号 47 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 7 】

ある実施形態では、抗体が、配列番号 38 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 40 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 42 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 46 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 48 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 8 】

ある実施形態では、抗体が、

a) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 38 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

b) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

c) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 42 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

d) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

e) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 46 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体、ならびに

f) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 48 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0039】

ある実施形態では、上記に記載される抗体の抗原結合断片が、提供される。抗原結合断片は、好ましくは、同じエピトープに結合する。

【0040】

本発明の抗体および抗原結合断片は、たとえば、これもRSV Gタンパク質の中央保存ドメインのエピトープに結合することが示された抗RSV G抗体3D3などの既知の抗RSV Gタンパク質のエピトープと比較して、異なるエピトープに結合する。異なるエピトープに結合することにより、抗体が、3D3などの既知の抗体と比較して、異なる決定的なアミノ酸残基に結合することが意味される。本発明の抗体は、インビトロ中和アッセイ、特に実施例7において記載されるインビトロ中和アッセイにおいて測定された場合

10

【0041】

ある実施形態では、抗体が、RVSFタンパク質に結合する抗体と組み合わせて使用された場合、相乗的に作用する。本明細書において使用されるように、用語「相乗的な」は、組み合わせて使用された場合の抗体または抗原結合断片の組み合わせられた効果が、個々に使用された場合のそれらの相加効果よりも大きいことを意味する。相乗作用を計算する方法は、組み合わせインデックス(combination index)によるものである。組み合わせインデックス(CI)の概念は、Chou and Talalay (Adv Enzyme Regul., 22: 27-55, 1984)によって記載

20

【0042】

ある実施形態では、抗体および抗原結合断片が、医薬としての使用のためのもの、好ましくは、RSVAおよび/またはBサブタイプによって引き起こされるRSV感染症の診断処置、治療処置、および/または予防処置における使用のためのものである。本明細書において使用されるように、用語「処置する」または「処置」は、RSVに既に感染している対象のウイルス負荷を低下させることおよび/またはそのような対象における疾患の症状を回復させることを指す。そのような症状は、たとえば細気管支炎、気道炎症、肺におけるうっ血、および呼吸困難を含む。「予防」または「予防法」は、RSVの広がりを阻害するもしくは低下させることまたはRSVによる感染症に関連する1つ以上の症状

30

【0043】

本発明はまた、本発明の少なくとも1つの抗体または抗原結合断片を含む組成物にも関する。ある実施形態では、組成物が、本発明による少なくとも1つの抗体または抗原結合断片および少なくとも薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。「薬学的に許容される賦形剤」によって、好都合な投薬形態を調製するための、抗体などの活性分子と組み合わせられる任意の不活性物質を意味する。「薬学的に許容される賦形剤」は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに無毒性であり、かつ薬剤、作用物質、または抗体を含む製剤の他の成分と適合性である賦形剤である。薬学的に許容される賦形剤は、当技術分野に広く適用され、知られている。

40

【0044】

他の実施形態では、本発明は、RSV感染症の診断、予防法、および/または処置のための医薬の調製における本発明の抗体または抗原結合断片の使用に関する。本発明はまた、その必要がある対象に治療有効量の本発明による抗体を投与することによる、RSV感染症の予防または処置の方法にも関する。用語「治療有効量」は、RSVによる感染症から結果として生じる状態を予防する、回復させる、および/または処置するのに有効である、本明細書において定義される抗体の量を指す。本明細書において使用される回復は、目に見えるまたは感知できる疾患症状、ウイルス血症、またはRSV感染症の任意の他の測定可能な症状発現の低下を指してもよい。

【0045】

50

療法における使用のために、抗体またはその断片は、適した賦形剤を使用して医薬組成物に製剤され、標準的なプロトコールに従って投与される。医薬組成物は、本発明による1つ以上の抗体または抗原結合断片を含んでいてもよい。RSVのFタンパク質と免疫反応性である1つ以上の抗体またはRSVもしくは炎症に対して有効な他の治療剤を含むさらなる治療剤が、存在してもよい。したがって、ステロイド性および非ステロイド性抗炎症化合物の両方などの抗炎症剤が、組成物中に含まれてもよい。

【0046】

ある実施形態において、完全抗体、つまり補体含有Fc領域を含有する抗体が、使用される。

【0047】

ある実施形態では、たとえば、肺における炎症応答を低下させるために、抗体の抗原結合断片のみが、使用される。免疫特異性断片および全抗体の混合物の投与も本発明の範囲内に含まれる。

【0048】

処置は、RSV感染症に感受性の患者グループを標的にしてもよい。そのような患者グループは、たとえば高齢者（たとえば50歳、60歳、好ましくは65歳）、子ども（たとえば5歳、1歳）、入院患者、免疫無防備の患者、および抗ウイルス化合物により処置されたが、不十分な抗ウイルス応答を示した患者を含むが、これらに限定されない。

【0049】

本発明の抗体組成物の投与は、典型的に注射によるもの、一般に筋肉内または静脈内注射によるものである。製剤は、抗体組成物を投与するための当技術分野において一般に知られている方法で調製される。適した製剤は、参照によって本明細書において組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PAなどの標準的な処方集において見つけられてもよい。製剤は、典型的に、非経口投与にふさわしいものであり、バッファー、酸化防止剤、およびその他同種のものを含む等張液ならびにリポソーム、ミセル、およびナノ粒子などの送達ビヒクルを含むエマルジョンを含む。所望のプロトコールおよび製剤は、主治医の判断および対象の特定の状態に依存する。投薬レベルは、適切な場合、対象の年齢、全身の健康状態、および感染症の重症度に依存するであろう。

【0050】

本発明の他の態様は、本明細書において定義される抗体の機能的変異体を含む。分子は、変異体が、「親」または「参照」抗体と、RSVまたはその断片に特異的に結合することについて競合し得る場合、本発明による抗体の機能的変異体であると考えられる。言い換えれば、分子は、機能的変異体が、RSVまたはその断片の同じまたは重複するエピトープになお結合することができる場合、本発明による抗体の機能的変異体であると考えられる。機能的変異体は、一次構造の配列において実質的に類似する誘導体を含むが、これらに限定されず、Fc受容体領域もしくはエフェクター機能に關与する他の領域において修飾を有するおよび/またはたとえば、親抗体において見つけられない化学的および/もしくは生化学的なインビトロもしくはインビボ修飾を含有するものを含む。そのような修飾は、とりわけ、アセチル化、アシル化、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、架橋、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、酸化、ペグ化、タンパク分解性プロセッシング、リン酸化、およびその他同種のものを含む。

【0051】

その代わりに、機能的変異体は、親抗体のアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失、またはその組み合わせを含有するアミノ酸配列を含む、本発明において定義される抗体とすることができる。さらに、機能的変異体は、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかまたは両方にアミノ酸配列の切断を含むことができる。本発

10

20

30

40

50

明による機能的変異体は、親抗体と比較して、同じまたは異なる、高いまたは低い結合親和性を有していてもよいが、RSVまたはその断片になお結合することができる。たとえば、本発明による機能的変異体は、親抗体と比較して、RSVまたはその断片に対する結合親和性が増加していてもよく、または減少していてもよい。本発明の範囲内にあることが意図される機能的変異体は、本明細書において定義される親抗体と、少なくとも約50%～約99%、好ましくは少なくとも約60%～約99%、より好ましくは少なくとも約70%～約99%、さらにより好ましくは少なくとも約80%～約99%、最も好ましくは少なくとも約90%～約99%、特に少なくとも約95%～約99%、特に少なくとも約97%～約99%のアミノ酸配列同一性および/または相同性を有する。当業者に知られているとりわけGapまたはBestfitなどのコンピュータアルゴリズムは、比較し、類似するまたは同一のアミノ酸残基を定めるために、アミノ酸配列を最適にアライメントするために使用することができる。機能的変異体は、エラープロードPCR、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、ならびに重鎖および/または軽鎖シャフリングを含むが、これらに限定されない、当技術分野において知られている一般的な分子生物学の方法によって、親抗体またはその一部を改変することによって、得ることができる。

【0052】

本発明はまた、免疫複合体、つまり少なくとも1つの抗体、抗原結合断片、または機能的変異体を含み、とりわけ検出可能な成分/作用物質などの少なくとも1つのタグをさらに含む分子を提供する。本発明による免疫複合体の混合物または本発明による少なくとも1つの免疫複合体および治療剤または他の抗体もしくは免疫複合体などの他の分子の混合物も本発明において企図される。さらなる実施形態では、本発明の免疫複合体が、2つ以上のタグを含んでいてもよい。これらのタグは、互いに同じまたは別個とすることができ、抗体に非共有結合でつなぐ/コンジュゲートすることができる。タグはまた、共有結合を通してヒト抗体に直接つなぐ/コンジュゲートすることができる。その代わりに、タグは、1つ以上の連結化合物によって抗体につなぐ/コンジュゲートすることができる。抗体にタグをコンジュゲートするための技術は、当業者によく知られている。本発明の免疫複合体のタグは、治療剤であってもよいが、それらはまた、検出可能な成分/作用物質とすることもできる。療法および/または予防において適したタグは、毒素またはその機能的部分、抗生物質、酵素、食作用または免疫刺激を増強する他の抗体であってもよい。検出可能な作用物質を含む免疫複合体は、たとえば、対象がRSVに感染しているかどうかを評価するためにまたは臨床試験手順の一部としてRSV感染症の発達もしくは進行をモニターするために、たとえば、所定の処置レジメンの効能を決定するために、診断的に使用することができる。しかしながら、それらはまた、他の検出および/または分析および/または診断の目的に使用されてもよい。検出可能な成分/作用物質は、酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、ポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンを含むが、これらに限定されない。検出および/または分析および/または診断の目的のために抗体を標識するために使用されるタグは、とりわけ(組織)サンプルの免疫組織化学的染色、フローサイトメトリー検出、走査レーザーサイトメトリー検出、蛍光イムノアッセイ、酵素免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、バイオアッセイ(たとえば食作用アッセイ)、ウエスタンブロットティングの適用など、使用される特定の検出/分析/診断技術および/または方法に依存する。当技術分野において知られている検出/分析/診断技術および/または方法に適した標識は、当業者の範囲内に十分にあり、

【0053】

さらに、本発明のヒト抗体または免疫複合体はまた、固体支持体に付着させることもでき、これらは、RSVまたはその断片のインビトロイムノアッセイまたは精製に特に有用である。本発明の抗体は、精製を促進するためのペプチドなどのマーカ配列に融合することができる。例として、ヘキサ-ヒスチジンタグ、赤血球凝集素(HA)タグ、mycタグ、またはフラグタグを含むが、これらに限定されない。その代わりに、抗体は、抗体

10

20

30

40

50

ヘテロコンジュゲートを形成するために第2の抗体にコンジュゲートすることができる。他の態様では、本発明の抗体が、1つ以上の抗原にコンジュゲートされてもよい/付着されてもよい。好ましくは、これらの抗原は、抗体-抗原コンジュゲートが投与される対象の免疫系によって認識される抗原である。抗原は、同一であってもよいが、また互いに異なってもよい。抗原および抗体を付着させるコンジュゲーション方法は、当技術分野においてよく知られており、架橋剤の使用を含むが、これらに限定されない。

【0054】

たとえばリンカーを介して直接または間接的にコンジュゲートすることによって免疫複合体を化学的に産生することに次いで、免疫複合体は、本発明の抗体および適したタグを含む融合タンパク質として産生することができる。融合タンパク質は、たとえば、組換え

10

【0055】

本発明は、本発明による抗体、抗原結合断片、または機能的変異体をコードする核酸分子をさらに提供する。そのような核酸分子は、上記に記載されるように、たとえば親和性成熟のプロセスにおいて、クローニングの目的のための中間体として使用することができる。好ましい実施形態では、核酸分子が、単離されるまたは精製される。当業者は、これらの核酸分子の機能的変異体も本発明の一部となることが意図されることを十分に理解するであろう。機能的変異体は、親核酸分子から翻訳されるものと同じのアミノ酸配列を提供するために、標準的な遺伝子コードを使用して直接翻訳することができる核酸配列である。好ましくは、核酸分子は、上記に記載されるCDR領域を含む抗体をコードする。さらなる実施形態では、核酸分子が、本発明の抗体の2、3、4、5、またはさらに6つすべてのCDR領域を含む抗体をコードする。

20

【0056】

ベクター、つまり、本発明による1つ以上の核酸分子を含む核酸構築物を提供することは、本発明の他の態様である。ベクターは、とりわけF、R1、RP1、Col、pBR322、TOL、Tiなどのプラスミド；コスミド；ラムダ、ラムドイド、M13、Mu、P1、P22、Q、T-even、T-odd、T2、T4、T7などのファージ；植物ウイルスに由来することができる。ベクターは、本発明の抗体のクローニングのため

30

40

【0057】

50

本発明はまた、上記に言及されるベクターの1つ以上のコピーを含有する宿主細胞も提供する。宿主細胞は、哺乳類、植物、昆虫、真菌、または細菌起源の細胞を含むが、これらに限定されない。細菌細胞は、大腸菌(E. coli)などのエシェリキア(Escherichia)属のいくつかの種およびシュードモナス(Pseudomonas)などのグラム陽性菌またはグラム陰性菌由来の細胞を含むが、これらに限定されない。真菌細胞のグループでは、好ましくは、酵母細胞が、使用される。酵母における発現は、とりわけピキア・パストリス(Pichia pastoris)、出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)、およびメタノール資化酵母(Hansenula polymorpha)などの酵母株を使用することにより実現することができる。さらに、ショウジョウバエおよびSf9由来の細胞などの昆虫細胞は、宿主細胞として使用することができる。それに加えて、宿主細胞は、とりわけ、森林植物などの作物植物由来の細胞または穀物植物もしくは薬用植物などの食物および原材料を提供する植物由来の細胞または鑑賞植物由来の細胞または球根作物(flowers bulb crop)由来の細胞などの植物細胞とすることができる。たとえば、形質転換(トランスジェニック)植物または植物細胞は、既知の方法、たとえばアグロバクテリウム媒介性の遺伝子導入、葉片の形質転換、ポリエチレングリコール誘発性のDNA移入によるプロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション、超音波処理、マイクロインジェクション、または射撃遺伝子導入(ballistic gene transfer)によって産生される。そのうえ、適した発現系は、バキュロウイルス系とすることができる。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、COS細胞、BHK細胞、NSO細胞、またはBowesメラノーマ細胞などの哺乳類細胞を使用する発現系は、本発明において好ましい。哺乳類細胞は、哺乳類起源の天然の分子に非常に類似する翻訳後修飾を有する発現タンパク質を提供する。本発明は、ヒトに投与されなければならないことがあり得る分子を扱うため、完全にヒトの発現系が、特に好ましいと思われる。そのため、さらにより好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。ヒト細胞の例は、とりわけ、HeLa、911、AT1080、A549、293、およびHEK293細胞である。好ましい実施形態では、ヒトプロデューサー細胞が、発現可能な構成をしたアデノウイルスE1領域をコードする核酸配列の少なくとも機能的部分を含む。さらに好ましい実施形態では、前記宿主細胞が、ヒト網膜に由来し、911細胞または番号96022940の下で1996年2月29日にEuropean Collection of Cell Cultures(ECACC)、CAMR、Salisbury、Wiltshire SP4 OJG、Great Britainに委託され、商標PER.C6(登録商標)(PER.C6はCrucell Holland B.V.の登録商標である)の下で販売されている細胞株などのように、アデノウイルスE1配列を含む核酸により不死化される。本出願の目的のために、「PER.C6細胞」は、番号96022940の下で委託された細胞または祖先、上流もしくは下流の継代、および委託された細胞の祖先由来の子孫ならびに前述のもののいずれかの誘導体を指す。宿主細胞における組換えタンパク質の産生は、当技術分野においてよく知られている方法によって実行することができる。関心のあるタンパク質のための産生プラットフォームとして商標PER.C6(登録商標)の下で販売されている細胞の使用は、国際公開第00/63403号パンフレットに記載され、この開示は、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

【0058】

本発明の抗体は、様々な手段によって調製することができる。本発明によって抗体を産生する方法は、本発明のさらなる一部である。方法は、a)抗体の発現を促す条件下で本発明による宿主細胞を培養するステップおよびb)任意選択で、発現された抗体を回収するステップを含む。発現された抗体は、無細胞抽出物から回収することができるが、好ましくは、それらは培養培地から回収される。産生するための上記の方法はまた、本発明の抗体および/または免疫複合体の機能的変異体を作製するために使用することもできる。無細胞抽出物または培養培地から抗体などのタンパク質を回収する方法は、当業者によく知られている。

10

20

30

40

50

【0059】

その代わりに、宿主細胞などの宿主における発現に次いで、本発明の抗体および免疫複合体は、従来のペプチドシンセサイザーによって合成してまたは本発明によるDNA分子に由来するRNA核酸を使用する無細胞翻訳系において産生することができる。本発明による抗体はまた、たとえば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスまたはウサギなどのトランスジェニック非ヒト哺乳類によって生成されてもよい。好ましくは、トランスジェニック非ヒト哺乳類は、上記に記載されるヒト抗体のすべてまたは一部分をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。トランスジェニック非ヒト哺乳類は、RSVまたはその断片の精製調製物または濃縮調製物により免疫化することができる。非ヒト哺乳類を免疫化するためのプロトコールは、当技術分野において十分に確立されている。開示が参照によって本明細書において組み込まれるUsing Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New YorkおよびCurrent Protocols in Immunology, Edited by: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., New Yorkを参照されたい。免疫化プロトコールは、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバントなどのアジュバントありまたはなしの、複数回の免疫化を含むことが多いが、また、裸のDNAによる免疫化を含んでいてもよい。他の実施形態では、ヒト抗体が、トランスジェニック動物に由来するB細胞、形質細胞、および/または記憶細胞によって産生される。他の実施形態では、ヒト抗体が、上記トランスジェニック非ヒト哺乳類から得られたB細胞の不死化細胞への融合によって調製されるハイブリドーマによって産生される。上記トランスジェニック非ヒト哺乳類から得られるB細胞、形質細胞、およびハイブリドーマならびに上記トランスジェニック非ヒト哺乳類、B細胞、形質細胞、および/または記憶細胞ならびにハイブリドーマから得られるヒト抗体も本発明の一部である。

【0060】

本発明は、少なくとも本発明による抗体、抗原結合断片、免疫複合体、機能的変異体、および/または少なくとも核酸を含むキットをさらに提供する。任意選択で、本発明のキットの上記構成成分は、適した容器に包装され、示される状態の診断、予防法、および/または処置について標識される。前述の構成成分は、水性、好ましくは滅菌溶液としてまたは還元用の凍結乾燥、好ましくは滅菌製剤として、単一または複数回用量の容器中に保管されてもよい。キットは、薬学的に許容されるバッファーを含むより多くの容器をさらに含んでいてもよい。それは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、1つ以上の適した宿主のための培養培地、およびおそらく少なくとも1つの他の治療剤、予防剤、または診断剤を含む、営利的なおよび利用者の立場から望ましい他の材料をさらに含んでいてもよい。たとえば、そのような治療薬、予防薬、または診断薬の使用に関する徴候、使用頻度、投薬量、製造、投与、禁忌、および/または警告についての情報を含有する、治療薬、予防薬、または診断薬の市販のパッケージに慣例上含まれる説明書をキットに付随させることができる。

【0061】

本発明による抗体はまた、RSVの検出のためのインビトロ方法における診断剤として好都合に使用することもできる。本発明は、したがって、サンプル中のRSVを検出する方法であって、(a)たとえば、診断的に有効な量の本発明による抗体(もしくはその断片)または免疫複合体とサンプルを接触させることによって、サンプル中のRSV抗原のレベルをアッセイするステップと、(b)RSV抗原のアッセイレベルをコントロールレベルと比較するステップであって、それによって、コントロールレベルと比較したRSV抗原のアッセイレベルの増加がRSV感染症を示す、ステップとを含む方法をさらに提供する。サンプルは、(可能性として)感染した対象由来の血液、血清、排便、痰、鼻咽頭

10

20

30

40

50

吸引液、気管支洗浄液、尿、組織、もしくは他の生体物質を含むが、これらに限定されない生物学的サンプルまたは水、飲料などの非生物学的サンプルなどであってもよい。サンプルは、それを検出の方法により適したものにするために、最初に操作されてもよい。操作は、とりわけ、ウイルスがタンパク質、(ポリ)ペプチド、または他の抗原断片などの抗原成分に分解するような方法で、ウイルスを含有することが疑われるおよび/またはそれを含有するサンプルを処置することを意味する。好ましくは、本発明の抗体または免疫複合体は、抗体およびサンプル中に存在し得るウイルスまたは抗原成分の間で免疫学的複合体の形成を可能にする条件下でサンプルと接触させられる。免疫学的複合体の形成は、もしあれば、サンプル中のウイルスの存在を示し、次いで、適した手段によって検出され、測定される。そのような方法は、とりわけ、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ELISA、免疫蛍光法、免疫組織化学的検査、FACS、BIACORE、およびウエスタンブロット分析などの均質および不均質結合イムノアッセイを含む。とりわけ患者血清および血液および血液由来産物についての大規模臨床スクリーニングのための好ましいアッセイ技術は、ELISAおよびウエスタンブロット技術である。ELISA試験は、特に好ましい。

10

【0062】

本発明は、本発明を限定するようには意図されない以下の実施例においてさらに例証される。

【実施例】

【0063】

20

実施例 1

抗原産生および標識

ウイルスの膜の表面上に発現される融合タンパク質(RSV F)とは異なり、付着タンパク質(RSV G)は、非常に変異性であり、したがって、RSVの2つの広域サブタイプ(つまりサブタイプAおよびB)が定められている。配列変異性にもかかわらず、RSV Gは、中央の高度に保存された領域を含有する。広域中和モノクローナル抗体を得ようとして、代表的なサブグループA(RSV A/Long)およびサブグループB株(RSV B/B1)に対応するRSV Gを293フリースタイル細胞において組換えで発現させ、精製し、1細胞ソーティング実験における使用のために標識した。

【0064】

30

RSV GaおよびGbの発現

本明細書においてRSV GaおよびGbと呼ばれる、RSV A/Long(受入番号P20895)およびRSV B/B1(受入番号NP_056862)に対応する組換えRSV付着タンパク質(Gタンパク質)を、Myc(EQKLISEEDL)および6xヒスチジンタグの両方と共に、CMVベースプロモーター哺乳類発現ベクター(Invitrogen Corp.、pcDNA3.1)から発現させた(表1)。ヒトVカップリングペプチドに対応するリーダー配列は、分泌を促進するためにアミノ末端に導入した。RSV GaおよびGbの両方は、膜貫通ドメインを欠いて発現させ、それぞれRSV GaおよびGbのアミノ酸65~288および65~299を含んだ。

【0065】

40

RSV GaおよびGbは、メーカーのガイドラインに従ってトランスフェクトした。組換え発現RSV GaおよびGbタンパク質は、ニッケルNTAクロマトグラフィーを使用して精製した。トランスフェクションの72時間後、上清を採取し、20mM Tris-HCl pH8および300mM NaClに対して一晩透析した。翌日、透析を新鮮なバッファーにより、さらに6時間、繰り返した。次いで、透析した上清に、5%グリセロールおよび10mMイミダゾール(VWR、Cat.No.EM-5720)を補足し、2mLのNi-NTAアガロースビーズ(Qiagen、Cat.No.30310)を詰めたカラムに装填した。結合したタンパク質は、20mM Tris-HCl、pH8、300mM NaCl、5%グリセロール、および20mMイミダゾールからなる2カラム容量の洗浄バッファーにより続いて洗浄した。次いで、タンパク質は、20m

50

M Tris - HCl、pH 8、300 mM NaCl、5%グリセロール、および50 mMイミダゾールを含有する5 mLの溶出バッファーにより溶出した。最後に、溶出物を、一晚、4 ℃で4リットルのリン酸緩衝食塩水(PBS)に対して透析した。次いで、透析したタンパク質を、30 K M WCO濃縮装置(Millipore、Amicon Ultracel濃縮装置)において0.5~1.0 mLに濃縮し、ピシンコニン酸アッセイ(BCAアッセイ; Thermo Fisher、メーカーの説明書に従って)によって定量化した。そのうえ、精製タンパク質は、それぞれ、SDS-PAGE / クーマシーによって品質を調整した。

【0066】

RSV Gaは、メーカーの説明書に従って、Alexa Fluor 647マイクロスケールタンパク質標識キット(Invitrogen Cat. No. A30009)を使用して、Alexa Fluor 647(AF 647)により蛍光標識した。精製後、標識の程度は、NanoDrop UV分光光度計(メーカー)を使用して、1モルのタンパク質当たり1.2モルのAF 647となることが決定された。同様に、RSV Gbタンパク質は、メーカーの説明書に従って、マイクロスケールタンパク質標識キット(Invitrogen Cat. No. A30006)を使用して、Alexa Fluor 488(AF 488)により標識し、最終精製後、標識の程度は、1モルのタンパク質当たり約2モルのAF 488となることがNanoDrop分光光度計を使用して決定された。

【0067】

【表1】

表1.使用した組換えRSV Gタンパク質配列

タンパク質 (受入番号)	アミノ酸配列
RSV G A/Long (P20895)	ANHKVLTLTAAIQDATSQIKNTTPTYLTDQDQLGISFNLSEITSQTTTILASTTPGV KSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPSKPTTKQRQNKPPKPNHDFHFVFNFPVPCSGNNP TCWAICKRIPNKKPGKKTTKPKTKPTFKTKKDLKPKQTTKPKVEPTTKPTEEPTINT TKTNITTTLLNTTGNPKLTSQMETFHSTSEGNLSPSQVSTSEHPSQPSSPENTT RQQAYVEQ KLISEEDLNSAVDHHHHHH (配列番号49)
RSV G B/B1 (NP_056862)	ANHKVLTLTVTVQTIKNHTEKNITTYLTQVPPERVSSKQPTTTSPIHTNSATTSFNT KSETHHTTAQTKGRITTTSTQTNKPSTKPKLNPPKPKDDYHFVFNFPVPCSGNNQ LCKSICKTIPSNKPKKPTIKPTNKPTTKTKNRDPKTPAKTKKETTNPTKPKPTLT TTERDTSTSQSTVLDTTTLEHTIQQQLSHSTTPENTPNSTQPTASEPSTSHSTQNTQ SHAQAYVE QKLISEEDLNSAVDHHHHHH (配列番号50)

【0068】

実施例 2

抗 RSV G 特異的抗体の同定

RSV Gタンパク質に対する広域中和モノクローナル抗体は、San Diego Blood Bankを通して得られた末梢血液単核細胞(PBMC)から単離された記憶B細胞(CD19+CD27+IgG+)から回収した。手短に言えば、CD22+濃縮B細胞を、記憶B細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体により染色し、RSV Ga、Gb(実施例1において記載されるように、それぞれAlexa Fluor 647および488により標識)またはRSV G中央保存ドメイン(CCD)ビオチンコンジュゲートペプチド(SYM-1706)と共にインキュベートした。CD19/CD27/IgG/RSV Ga/RSV GbまたはCD19/CD27/IgG/SYM-1706(信頼できるソーティング実験において使用)。ポジティブな細胞をソートし、単一の細胞を、FACS Aria II(BD Biosciences)またはMoFlo XDP(Beckman Coulter)を使用して、96ウェルプレートの個々のウ

エルの中に置いた。プレートは、プロセッシングまで、 -80°C で保管した。平均で、ドナー当たりおよそ $10 \sim 25 \times 10^6$ B細胞を調査した。

【0069】

実施例3

RSV G a および G b に対して特異的な単一B細胞からの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の回収

実施例2において記載されるように、RSVに対する広域中和モノクローナル抗体を、RSV G a タンパク質およびG b タンパク質またはRSV G 中央保存ドメイン(CCD)ピオチンコンジュゲートペプチド(SYM-1706)に対して反応性を有する記憶B細胞(CD19+CD27+IgG+)から単離した。次いで、重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子は、ツーステップPCRアプローチによって個々のB細胞から回収し、クローニングし、Fab抗体としてインビトロにおいて発現させた。

10

【0070】

第1鎖cDNA合成

相補的DNA(cDNA)は、InvitrogenのSuperscript II First Strand Synthesis kit(Superscript II kit, Cat No. 18080-051)を使用して、個々にソートした細胞から生成した。

【0071】

ネステッドPCRによるIgG重鎖および軽鎖増幅

20

IgG重鎖および軽鎖可変領域(カッパ鎖およびラムダ鎖の両方)は、ツーステップネステッドPCRアプローチを使用して、新たに調製したcDNAから増幅した。続いて、重鎖および軽鎖PCR断片を、オーバーラップ伸長PCRを使用し、下流のクローニングを容易にするために、単一のカセットに集めた。

【0072】

ステップI 増幅

ステップIについて、上記に言及されるように生成した $2.5 \mu\text{L}$ の新たに調製したcDNAを、重鎖、カッパ軽鎖、およびラムダ軽鎖を増幅するための鋳型として使用した。抗体重鎖(CB-5'LVHプライマー)、カッパ軽鎖(CB-5'LVkプライマー)、およびラムダ軽鎖(CB-5'LVlamプライマー)のリーダー領域に対して特異的にデザインしたプライマーのプールを使用した(表2~4)。それぞれ、重鎖、カッパ軽鎖、およびラムダ軽鎖のCH1領域、Ck、およびCL領域に対して特異的にデザインした単一のリバースプライマーを、ステップI PCR反応において使用した。

30

【0073】

【表 2】

表2.VH ステップI フォワードプライマー(5'-3')	
名称	配列
CB-5'LVH1a	ATGGACTGGACCTGGAGGTCCTC (配列番号51)
CB-5'LVH1b	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTC (配列番号52)
CB-5'LVH1c	ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTC (配列番号53)
CB-5'LVH1d	ATGGACTGGACCTGGAGCATCC (配列番号54)
CB-5'LVH2	GGACATACTTTGTTCACGCTCCTGC (配列番号55)
CB-5'LVH3a	AGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGC (配列番号56)
CB-5'LVH3b	AGGIGTCCAGTGTGAGGTGCAGC (配列番号57)
CB-5'LVH3c	AGGIGTCCAGTGTCCAGGTGCAGC (配列番号58)
CB-5'LVH4	GCAGCTCCCAGATGGGTCTCG (配列番号59)
CB-5'LVH5	TCAACCGCCATCCCTCGCCCTC (配列番号60)
CB-5'LVH6	GTCGTCTCCTTCCTCATCTCCTGC (配列番号61)
3'CgCH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC (配列番号62)

10

【 0 0 7 4 】

【表 3】

表3.Vk ステップI フォワードプライマー(5'-3')	
名称	配列
CB-5'LVk1a	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC (配列番号63)
CB-5'LVk1b	ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTC (配列番号64)
CB-5'LVk1c	ATGAGAGTCCCTCGCTCAGCTC (配列番号65)
CB-5'LVk2	TGGGGCTGCTAATGCTCTGG (配列番号66)
CB-5'LVk3	CCTCCGCTACTCTGGCTCCAG (配列番号67)
CB-5'LVk4	TCTCTGTGCTCTGGATCTCTGGTGC (配列番号68)
CB-5'LVk5	CTCCTCAGCTTCCCTCCTTTGG (配列番号69)
CB-5'LVk6	AACTCATGGGTTCTGCTGCTCTGG (配列番号70)
3'Ck-Rev494	GTGCTGTCCCTGCTGTCCCTGCTC (配列番号71)

20

30

【 0 0 7 5 】

【表 4】

表4.VL ステップI フォワードプライマー(5'-3')	
名称	配列
CB-5'LVlam1	CTCCTCGCTCACTGCACAGG (配列番号72)
CB-5'LVlam2	CTCCTCTCTCACTGCACAGG (配列番号73)
CB-5'LVlam3	CTCCTCACTCGGGACACAGG (配列番号74)
CB-5'LVlam4	ATGGCCTGGACCCCTCTCTG (配列番号75)
CB-5'LVlam5	ATGGCATGGATCCCTCTCTCCTC (配列番号76)
3'Clam-Rev	CAAGCCAACAAGCCACACTAGTG (配列番号77)

40

【 0 0 7 6 】

50

ステップ I I 増幅

1) ステップ I I について、上記の反応から生成された 2.5 μ L のステップ I PCR 産物を、重鎖、カップ軽鎖、およびラムダ軽鎖遺伝子を増幅するための鋳型として使用した。抗体重鎖、カップ軽鎖、およびラムダ軽鎖のフレームワーク 1 領域に対して特異的にデザインしたフォワードプライマーのプールを使用した(表 5 ~ 7)。重鎖ジャンクション(3' S a l I J H プライマー)、カップ軽鎖ジャンクション(3' J k プライマー)に対して特異的にデザインしたリバースプライマーおよびラムダ軽鎖に対応する 5' 領域特異的プライマー(C B - V L プライマー)のプールを使用した。さらに、ステップ I I フォワードプライマーは、S f i I 制限部位を導入するために操作し、一方、ステップ I I 重鎖リバースプライマーは、S a l I 制限部位を導入するようにデザインした。

10

【 0 0 7 7 】

【表 5】

表5.VH ステップIIプライマー(5'-3')

名称	配列
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CB-VH1a	(配列番号78)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTC
CB-VH1b	(配列番号79)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTTCCAGCTGGTGCAGTC
CB-VH1c	(配列番号80)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTC
CB-VH1d	(配列番号81)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCACCTTGAGGGAGTCTGG
CB-VH2a	(配列番号82)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCACCTTGAAGGAGTCTGG
CB-VH2b	(配列番号83)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CB-VH3a	(配列番号84)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
CB-VH3b	(配列番号85)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
CB-VH3c	(配列番号86)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG
CB-VH3d	(配列番号87)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGSTGCAGCTGCAGGAG
CB-VH4a	(配列番号88)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG
CB-VH4b	(配列番号89)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
CB-VH5	(配列番号90)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG
CB-VH6	(配列番号91)
	GCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAAATCTG
CB-VH7	(配列番号92)
3'SalI JH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG (配列番号93)
3'SalI JH3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG (配列番号94)
	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCCTG (配列番号95)
3'SalI JH6	

20

30

40

【 0 0 7 8 】

50

【表6】

表6.VK ステップIIプライマー-(5'-3')	
名称	配列
CB-VK1a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC (配列番号96)
CB-VK1b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC (配列番号97)
CB-VK1c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCC (配列番号98)
CB-VK2a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGATRTTGTGATGACTCAGTCTCCACTC (配列番号99)
CB-VK3a	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGTGACGCAGTCTCCAG (配列番号100)
CB-VK3b	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGTGACACAGTCTCCAG (配列番号101)
CB-VK3c	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATAGTGTGACGCAGTCTCCAG (配列番号102)
CB-Vk4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGACATCGTGTGACCCAGTCTCC (配列番号103)
CB-Vk5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAACGACACTCACGCAGTCTCC (配列番号104)
CB-Vk6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCGAAATGTGCTGACTCAGTCTCCAG (配列番号105)
3'Jk1/4 Rev IIa-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATYTCCACCTTGGTC (配列番号106)
3'Jk2 Rev IIb-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCAGCTTGGTC (配列番号107)
3'Jk3 Rev IIc-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATATCCACTTGGTC (配列番号108)
3'Jk5 Rev IId-L	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAACTCCAGTCGTGTC (配列番号109)

10

20

30

【0079】

【表7】

表7.VL ステップIIプライマー-(5'-3')	
名称	配列
CB-VL1	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAATTTATGCTGACTCAGCCCCACTC (配列番号110)
CB-VL2	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTCTATGTGCTGACTCAGCC (配列番号111)
CB-VL3	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGTGCTGACGCAGCC (配列番号112)
CB-VL4	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGTGCTGACGCAGCC (配列番号113)
CB-VL5	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCAGTCTGCCCTGACTCAGCC (配列番号114)
CB-VL6	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTTCTGAGCTGACTCAGGACC (配列番号115)
CB-VL7	CTACCGTGGCCTAGGCGGCCCTCTATGAGCTGACTCAGCCACC (配列番号116)
3'Clam-Step II	CTCAGAGGAGGGYGGGAACAGAGTGAC (配列番号117)

40

【0080】

50

ステップ I I I 増幅：オーバーラップ伸長 P C R

ステップ I I I について、重鎖および軽鎖 D N A 断片（ステップ I I 産物）は、1）軽鎖ステップ I I 断片の 3' エンドおよび重鎖ステップ I I 断片の 5' エンドにアニールし、カップまたはラムダ定常領域を含有する、下記に概説されるように増幅される F a b リンカー（カップまたはラムダ；表 8）、2）軽鎖の 5' エンドにアニールする S f i I 制限部位を有するフォワードオーバーラッププライマー、ならびに 3）重鎖ステップ I I 断片の 3' エンドにアニールする S a l I 制限部位を有するリバースプライマー（表 9）を使用し、オーバーラップ伸長 P C R を介して単一のカセットに連結した。この反応により、軽鎖 - リンカー - 重鎖からなる 1 2 0 0 b p 断片（つまりカセット）がもたらされる。増幅後、P C R リンカー反応産物またはオーバーラップ伸長 P C R 反応産物を、1%アガロースゲル上で分離し、メーカーの説明書に従ってゲル抽出した（Q i a g e n G e l E x t r a c t i o n K i t ; C a t . N o . 2 8 7 0 6 ）。

10

【 0 0 8 1 】

【表 8】

表8.カップおよびラムダリンカーのヌクレオチド配列

遺伝子	配列
IGKC	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGCTTAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGGCTTCTAAATAACTTCTATCCCCGTGAGGCCAAA GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTTACGCTTAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTCAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGTAAATCTAGAAATAAGGAGGAT ATAATTATGAAATACCTGCTGCCGACCGCAGCCGCTGGTCTGCTGCTGCTCGCAGCA TAGCCCGCCATGGCC (配列番号118)
IGLC2	GTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTG TGCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGC AGCCCCGTCAAGGGGGAGTGGAGACCACCACCCCTCCAACAAAGCAACAACAAG TACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGC TACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTTACA GAATGTTCATAATCTAGAAATAAGGAGGATATAATATGAAATACCTGCTGCCGACC GCAGCCGCTGGTCTGCTGCTGCTCGCAGCATAGCCGGCCATGGCC (配列番号119)

20

30

【 0 0 8 2 】

【表 9】

表9.リンカープライマー(5'-3')

名称	配列
FabLinker-F	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC (配列番号120)
FabLinker-R	GGCCATGGCCGGCTATGCTGCGAGC (配列番号121)
Lambda-Fab Linker F	GTCACTCTGTTCCCRCCCTCCTCTGAG (配列番号122)
Overlap-F	CTACCGIGGCCTAGGCGGCC (配列番号123)
Overlap-R	TGCGAAGTCGACGCTGARGAG (配列番号124)

40

【 0 0 8 3 】

消化および細菌発現ベクターの中へのクローニング

オーバーラップ伸長 P C R の P C R 精製（Q i a g e n）後に、断片を消化し、次いで、消化したオーバーラップ産物を 1%アガロースゲル上で分離した。オーバーラップカセ

50

ットに対応するバンド(約1.1kb)を、ゲル抽出(Qiagen)によって精製した。最後に、消化したオーバーラップ伸長産物をライゲーションし、pCB-Fab細菌発現ベクターの中にクローニングした。形質転換はすべて、DH5a Max Efficiency cell (Invitrogen Corp., Cat. No. 18258-012)を使用して実行した。およそ100 μ Lの回収した細胞を、20mMグルコースを補足した100 μ g/mLカルベニシリンプレート上に平板培養した。プレートは、コロニー増殖を可能にするように37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。

【0084】

実施例4

RSV Gに結合するFabおよびモノクローナル抗体救出

10

実施例3においてクローニングしたFab抗体を細菌中で発現させ、RSV Ga、RSV Gb、またはRSV G中央保存ドメイン(CCD)ペプチド(SYM-1706:アミノ酸配列:ピオチン-KQRQNKPPNKFHFVFNFPVPCSI CSNNPTCWAICKR;配列番号125)に結合するそれらの能力についてもう一度試験した。

【0085】

細菌上清を、RSV Ga、Gb、CCDペプチド、ネガティブコントロールアクチン、および抗ヒトF(ab)₂コーティングプレートに追加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした(ストレプトアビジンコーティングプレート上でインキュベートし、室温で2時間インキュベートしたCCDペプチドを除く)。CR9514(3D3をベースとする、つまり、国際公開第2009/055711号パンフレットにおいて開示される3D3の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体)を、0.4%NFDM/PBS/0.05%Tween20中0.1 μ g/mLの希釈でRSV Ga、Gb、CCDペプチド、および抗ヒトF(ab)₂コーティングプレートに対するポジティブコントロールとして使用した。マウス抗アクチン(Sigma, Cat. No. A3853)は、ウシアクチンコーティングプレートに対するポジティブコントロールとして1.25 μ g/mLで使用した。抗HA HRP(Roche, Cat. No. 12013819001)は、細菌上清に対して二次抗体として使用した。抗ヒトFab(Jackson Labs, Cat. No. 109-036-097)は、CR9514(3D3の可変領域を含む)コントロールウェルに対して使用した。最後に、ヤギ抗マウスHRP(Jackson Labs, Cat. No. 115-035-072)は、アクチンポジティブコントロールに対して使用した。インキュベーション後、プレートは、PBS/0.05%Tween20中で4回洗浄し、およそ5分間、50 μ L 1:1 v/v TMB:過酸化水素溶液(Pierce, Cat. No. 34021)により現像した。反応は、50 μ L 2N H₂SO₄の追加によって直ちに停止させ、450nmでの吸光度をELISAプレート読み取り装置を使用して測定した。ポジティブな結合は、0.5以上のOD₄₅₀(0.5~0.9は中程度の結合であり、>1は強力な結合である)およびバックグラウンドの3倍の応答によって示された。

20

30

【0086】

ELISAの結果に基づいて、抗原を標的にする反応性を有する平均約6つのクローンを選択した。それぞれのFab抗体は、フレームワーク1特異的およびジャンクション特異的プライマーのプールを使用して最初にクローニングしたため、交差プライミング(cross-priming)の可能性は、とりわけ非常に関係するプライマーについて、高かった。このため、それぞれのオーバーラップ産物に相当するいくつかの細菌クローンをシーケンシングするために選択した。プラスミドミニプレップDNAは、メーカーのガイドライン(Qiagen Miniprep kit Cat. No. 27106)に従って調製した。選択したそれぞれのクローンに対応する重鎖および軽鎖は、表10においてハイライトしたプライマーによりシーケンシングした。配列を分析し、最も近い生殖細胞系列を同定し、CDRおよびフレームワーク領域を決定した。この情報は、候補抗体をクローニングし、IgGに変換するためのプライマーをデザインするために続いて

40

50

使用した。

【 0 0 8 7 】

【 表 1 0 】

表10.細菌Fabに対するシークエンシングプライマー(5'-3')

遺伝子	配列
SeqpCBFab-HCF	TGAAATACCTGCTGCCGACC (配列番号126)
Seq-PelB-Rev	CAGCAGACCAGCGGCTGC (配列番号127)

【 0 0 8 8 】

実施例 5

I g G のクローニング、シークエンシング、および精製

実施例 4 において概説される細菌 E L I S A において同定された R S V G a、G b、および C C D ペプチドに反応性の F a b 抗体を、ヒト胚腎臓細胞 (2 9 3 - F 細胞) 中でクローニングし、I g G として発現させた。I g G は、続いて、濃度の決定、S D S - P A G E によっておよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、品質を調整した。

【 0 0 8 9 】

A . I g G クローニングおよびシークエンシング情報

細菌 E L I S A (実施例 4 において概説) において同定した F a b 抗体は、続いて、p C P 9 - カッパ (配列番号 1 2 7) および p C P 9 - ラムダ (配列番号 1 2 8) 発現ベクターの中に、制限消化によって可変重ならびに軽ドメイン (カッパおよびラムダ) をクローニングすることによって、I g G に変換した。交差プライミング (実施例 4 において前述) の可能性を想定して、I g G への変換のために選択したそれぞれの細菌クローンの F R 1 の最初のアミノ酸およびジャンクション領域の最後のアミノ酸は、その対応する生殖細胞系列配列のものと頻繁に異なるものとした。このため、それぞれの抗体に特異的なプライマーは、選択したそれぞれの細菌クローンの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の両方について F R 1 およびジャンクション領域を再建するようにデザインした。重鎖および軽鎖は、対応する細菌クローン (実施例 4 において p C B - F a b ベクターから発現) を使用して増幅し、p C P 9 発現ベクターの中に連続的な方法でクローニングした。

【 0 0 9 0 】

重鎖の増幅は、370bpの平均サイズの断片をもたらし、これを1%アガロース上で分離し、メーカーの説明書 (Q i a g e n) に従ってゲル抽出した。次いで、重鎖断片は、オーバーラップ伸長 P C R によって、H A V T 2 0 リーダー配列 (5 ' - A T G G C C T G C C C T G G C T T T C T C T G G G C A C T T G T G A T C T C C A C C T G T C T T G A A T T T C C A T G G C T - 3 ' ; M A C P G F L W A L V I S T C L E F S M A) を付着させるために使用した。

【 0 0 9 1 】

対応するオーバーラップ H A V T 2 0 - 重鎖産物は、続いて、メーカーの説明書 (Q i a g e n) に従って P C R 精製した。ラーゲ - ションを連続して実行した ; すなわち、軽鎖を最初に消化し、ライゲーションしたまたは対応する重鎖を消化し、挿入した。一旦、軽鎖または重鎖挿入をシークエンシングし、確認したら、代表的な細菌クローンを選択し、ミニプレップを調製し、第 2 の鎖をクローニングするために使用した (つまり軽鎖または重鎖、どちらが最初にクローニングされたかに依存) 。重鎖断片のクローニングのために、p C P 9 ベクターおよび P C R 精製重鎖オーバーラップ産物を、制限酵素 B a m H I H F (N E B、C a t . N o . R 3 1 3 6 L) および X h o I (N E B、C a t . N o . R 0 1 4 6 L) により消化した。消化した p C P 9 ベクターおよび重鎖オーバーラップ産物は、次いで、1%アガロースゲル上で分離し、ゲル抽出した (p C P 9 ベクターについて上の方の約 9 . 5 k B) 。ラーゲ - ションは、1 : 3 ベクター挿入比で実行し、D H 5 a M a x E f f i c i e n c y c e l l (I n v i t r o g e n C o r p .、C a t . N o . 1 8 2 5 8 - 0 1 2) の中に形質転換した。配列確認と同時に、第 2 の鎖

10

20

30

40

50

(たとえば軽鎖)をクローニングした。軽鎖断片のクローニングのために、対応する重鎖および軽鎖PCR産物を含有するpCP9クローンを、NotI HF (NEB、Cat. No. R3189L)およびXbaI (NEB、Cat. No. R0145L)により消化した。次いで、軽鎖は、対応する重鎖遺伝子を含有するpCP9ベクターの中にライゲーションし、DH5a Max Efficiency cellの中に形質転換した。いくつかのコロニーをシーケンシングのために選択し、分析した。表11および12は、抗体重鎖および軽鎖CDR領域の配列を示す。

【0092】

【表11】

クローン	VH 生殖細胞系列	CDR1	CDR2	CDR3
CB002.1	IGHV4-59	SYFWN (25)	YIYGSGSADYNPSLKS (26)	SGFCTNDACYRRGSWFDP (27)
CB003.1	IGHV1-46	TYIYH (10)	MINTGSGVTSYAQKFQG (11)	MYSGSWYFPDY (12)
CB010.7	IGHV3-30	THGMH (7)	VMSYDGTKKYHADS VKG (8)	VGELRSFDWLLADGTAYYYGMDV (9)
CB028.2	IGHV1-18	TYGIT (31)	WISGDSNTNYAQN LQG (32)	ALAKWYCSSSCFCGGGSCYSYD (33)
CB048.3	IGHV3-30	NHGMH (4)	VISYDGNKKYYADSVKG (5)	TTFYFDDSNYYEYLDY (6)
CB058.1	IGHV3-23	SYAMS (1)	AIRGSVDNTYYADSVKG (2)	DPALYCSGETCFSDLTD (3)

10

20

【0093】

【表12】

クローン	VK/VL 生殖細胞系列	CDR1	CDR2	CDR3
CB002.1	IGKV1-39	RASQSIDNYLN (28)	AASSLQS (29)	QQSYSTLT (30)
CB003.1	GKV3-20	RASQNINGNYLA (22)	EASSRAT (23)	QQYGTSPF (24)
CB010.7	IGKV4-1	KSSQSVLYSSNKNYLA (19)	WASTREF (20)	HQYYSIP (21)
CB028.2	IGKV1-39	RASQGMSNYLN (34)	AASTLQS (35)	QQSFSTP (36)
CB048.3	IGKV1-9	RASQGIRSYLA (16)	AASTLQS (17)	QQLNTSPP (18)
CB058.1	IGKV1-16	RASQGINNYLA (13)	AASTLPS (14)	QHYYRYP (15)

30

【0094】

B. IgG発現および精製

それぞれのIgGを発現させるために、関心のある重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の両方を含有するpCP9ベクターのミディプレップを調製し(Qiagen)、メーカーの説明書(Invitrogen、Cat. No. 51-0031)に従って、293fectinを使用して、293-F細胞をトランスフェクトするために使用した。トランスフェクション後、細胞は、十分なIgG産生を可能にするために72時間インキュベートした。次いで、細胞培地を採取し、細胞を取り出すために遠心分離した。精製は、プロテインAカラム(Protein A sepharose beads; Amersham、Cat. No. 17-0963-03)を使用して、カラムクロマトグラフィーによって達成した。次いで、溶出物は、4リットルの20mM Tris-HCl pH7.2、150mM NaClに対して2回透析した。最後に、透析したサンプルは、10kDa Amicon Ultra column (Millipore)により約1mLま

40

50

で濃縮した。

【0095】

一連の品質調整ステップは、濃度および純度を決定し、かつサイズを評価するためにそれぞれのIgGについて実行した。IgG濃度は、 $210,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ のIgGについてのモル吸光係数を使用して、NanoDropリーディングを介して初めに決定した。そのうえ、IgG濃度は、サプライヤーの説明書に従ってBCAアッセイ(Thermo Fisher)によっておよびOctet Red 384 (FortéBio)でプロテインAセンサーチップを使用する測定によって確認した。さらなる品質調整ステップとして、SDS-PAGEを非還元および還元条件(つまり $\pm\text{DTT}$)下で実行し、インタクトIgGまたは還元重および軽ポリペプチド鎖を視覚化するためにBio-Safe Coomassie stain (Biorad)を続けた。最後に、IgGは、Superdex 200 10/300 GL gel filtration column (Pharmacia)でサイズ排除クロマトグラフィーによって品質調整した。

10

【0096】

実施例6

IgG結合アッセイ

上記の実施例5において記載されるように生成し、品質調整したIgGおよび抗RSV G抗体CR9514(3D3の可変領域を含む)を、組換えRSV GaおよびGbタンパク質に結合するそれらの能力についてELISAアッセイにおいて試験した。手短に言えば、96ハーフウェルELISAプレート(Costar)を、一晚 $1\times\text{PBS}$ 中 $50\mu\text{L}$ の抗原によりコーティングした[RSV Ga: $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$; RSV Gb: $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$; ウシアクチン: $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma); affiniPureヤギ抗ヒトF(ab)2: $2\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jackson Immunoresearch)。プレートを4で一晚インキュベートし、翌日、PBS中 $135\mu\text{L}$ の4%無脂肪粉乳(NFDM、Biorad)により遮断し、37で2時間インキュベートした。次いで、mAbは、 $100\text{ ng}/\text{mL}$ から開始して、0.4%NFDM/PBS/0.05%Tween 20中で希釈し、5倍希釈液で滴定し、37で2時間プレートに追加した。CR9514(3D3)mAbは、RSV GaおよびGbに対するポジティブコントロールとして使用し、同様の方法で滴定した。そのうえ、マウス抗アクチン(Sigma、Cat. No. A3853)は、ウシアクチンコーティングプレートに対するポジティブコントロールとして $1.25\mu\text{g}/\text{mL}$ で使用した。インキュベーション後、プレートを、PBS/0.05%Tween 20により4回洗浄した。二次抗体を、それぞれ、0.4%NFDM/PBS/0.05%Tween 20中1:1000で追加し、37で40分間インキュベートした。抗Fc HRP(Jackson Labs、Cat. No. 109-035-008)は、mAbに対する二次抗体として使用した。最後に、ヤギ抗マウスHRP(Jackson Labs、Cat. No. 115-035-072)は、アクチンポジティブコントロールに対して使用した。インキュベーション後、プレートは、PBS/0.05%Tween 20中で4回洗浄し、およそ5分間、 $50\mu\text{L}$ 1:1 v/v TMB:過酸化水素溶液(Pierce、Cat No. 34021)により現像した。反応は、 $50\mu\text{L}$ 2N H_2SO_4 の追加によって直ちに停止させ、 450 nm での吸光度をELISAプレート読み取り装置を使用して測定した。本発明に従う抗体についての結合の推定EC50値(それぞれのIgGを滴定することによって決定)は、RSV株A/Longについて $1.0\sim 2.0\text{ ng}/\text{mL}$ 、株B/B1について $0.5\sim 2.5\text{ ng}/\text{mL}$ の範囲にわたった。

20

30

40

【0097】

実施例7

IgG中和アッセイ

抗RSV抗体は、プラーク低下アッセイによって評価されるように溶液中のRSVに結合し、中和するそれらの能力について分析した。この実験において、ウイルスおよび抗体

50

は、標的細胞の非存在下においてあらかじめインキュベートした。次いで、混合物を細胞に追加し、ウイルス感染を、本明細書において記載される標準的なブランク低下アッセイによって測定した。抗RSV抗体は、RSV A/A2 (ATCC Cat. No. VR-1540)、RSV B/18537 (ATCC Cat. No. VR-1580)、およびRSV A/Long (ATCC Cat. No. VR-26)を含むRSVのいくつかの株を中和するそれらの能力について分析した。抗体CR9514 (3D3)およびCR9505 (131-2Gをベースとする、つまり、国際公開第2009/055711号パンフレットにおいて開示されるように131-2Gの重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体)を基準として使用した。

【0098】

Ver o細胞 (ATCC、cat no: CCL-81; Manassas) を宿主細胞感染のために使用した。Ver o細胞を、1% L-グルタミン (HyClone、cat no: SH30034.01) および1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (HyClone、cat no: SV30010) を補足した、10% ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone、cat no: SH30070.03) を有するDMEM (HyClone、cat no: SH 30285.01) 中で成長させた。Ver o細胞を、5% CO₂ を有する37 °Cのインキュベーター中で維持し、1週間当たり2回継代した。

【0099】

実験の1日目に、Ver o細胞を24ウェル細胞培養プレート中で培養した。細胞は、2日目までに細胞単層の形成 (>80%コンフルエンス) を可能にする密度 (ウェル当たりおよそ 9×10^4 細胞) で平板培養した。2日目に、それぞれの抗体を、10% ベビーウサギ補体 (AbD Serotec、cat no. C12CAX) を含有したそのままのイーグル最小必須培地 (EMEM、ATCC、cat no: 30-2003) 中で段階希釈した。試験した最終抗体濃度は、10 μ g/mL、1.3 μ g/mL、156 ng/mL、19.5 ng/mL、2.4 ng/mL、および0.3 ng/mLであった (抗体濃度: 2.5 μ g/mL、312.5 ng/mL、39.1 ng/mL、4.9 ng/mL、0.61 ng/mL、および0.08 ng/mLを使用したCB010.7を除く)。ウイルスはまた、2000~3000 pfu/mL (100~150 pfu/50 μ L) の濃度までそのままのEMEM中で希釈し、85 μ Lの希釈RSVを85 μ Lのそれぞれの希釈抗体溶液に追加し、ピペティングにより混合した。ウイルスコントロールサンプルについては、85 μ Lの希釈ウイルスを85 μ LのそのままのEMEMに追加した。抗体-ウイルスまたはウイルスコントロール混合物は、2時間37 °Cでインキュベートした。インキュベーション後、培養培地を、Ver o宿主細胞を含有する24ウェル細胞培養プレートからデカントし、次いで、あらかじめインキュベートした150 μ Lのウイルス抗体またはウイルスコントロール混合物を、それぞれのウェルに移した。それぞれの試験およびコントロールサンプルを3通り調製した。次いで、細胞を、15分ごとに混合しながら1時間37 °Cでインキュベートした。

【0100】

インキュベーション期間後、1mLの重層培地 (overlay medium) を、それぞれのウェル (重層培地はEMEM、2% FBS、1% L-グルタミン、0.75% メチルセルロースを含有した) に追加した。次いで、24ウェル細胞培養プレートを、およそ96~120時間、37 °C (5% CO₂ を有する) でインキュベートした。細胞プレートは、室温で1時間、10% ホルマリンにより固定し、ddH₂Oにより10回洗浄し、1時間、37 °CでPBS中5% 無脂肪粉ミルク (NFDM) により遮断した。インキュベーション後、遮断溶液をデカントし、200 μ LのHRPコンジュゲートマウス抗RSV抗体 (ab20686、Abcam、1% NFDMにおいて1:750希釈) をそれぞれのウェルに追加した。プレートを2時間37 °Cでインキュベートし、ddH₂Oにより10回洗浄した。洗浄後、200 μ LのTrue Blue (登録商標) ペルオキシダーゼ基質 (KPL Cat. No. 50-78-02) をそれぞれのウェルに追加した。プレ

10

20

30

40

50

ートを室温で10分間現像した。プレートは、 ddH_2O により2回洗浄し、ペーパータオル上で乾燥させ、青色のプラークの数を数えた。

【0101】

IC50（プラーク形成の50%の中和に有効な希釈）は、SPSS for Windowsを利用して計算した。プラーク低下率は、以下の式に従って計算した：

プラーク低下率（百分位数）= $1 - [（それぞれの抗体希釈液中の平均プラーク数） / （ウイルスコントロールウェル中の平均プラーク数）] * 100$ 。

【0102】

表13は、RSV株A/A2（ATCC Cat. No. VR-1540）およびRSV B/18537（ATCC Cat. no. VR-1580）に対する抗体のパネル 10
についてのIC50を列挙する。

【0103】

【表13】

表13.上位のRSV Gタンパク質特異的モノクローナル抗体についての中和アッセイ結果

株 アッセイ	RSV A	RSV B
	A/A2 中和 IC50 (ng/mL)	B/18537 中和 IC50 (ng/mL)
CR9514 (3D3)	40.7	33.0
CB002.1	35.5	23.4
CB003.1	31.5	24.6
CB010.7	16.5	14.1
CB028.2	11.0	19.6
CB048.3	16.7	8.0
CB058.1	14.4	4.2

20

【0104】

表13は、RSV株A/A2（ATCC Cat. No. VR-1540）に対する抗体および抗原結合断片のIC50（プラーク形成の50%の中和に有効な希釈）が、40 ng/ml未満であったことおよび/またはRSV株B/18537（ATCC Cat. No. VR-1589）に対するIC50が、30 ng/ml未満であったことを示す 30

【0105】

そのうえ、RSV株A/Long（ATCC Cat. No. VR-26）に対する抗体CB003.1、CB010.7、ならびにコントロール抗体CR9505（131-2G）およびCR9514（3D3）についてのIC50は、それぞれ16、12、18、および17 ng/mlであった。

【0106】

実施例8

コドン最適化を含む完全ヒト免疫グロブリン分子（ヒトモノクローナル抗体）の構築およびリスク回避（de-risking）分析

上記実施例5において単離されたそれぞれの抗体クローンの重鎖および軽鎖可変領域（VHおよびVL）を、遊離システインならびにグリコシル化、脱アミド、および酸化部位を含む潜在的な翻訳後修飾部位の存在について検査した。これらの部位を除去するために、構造保存的なおよび/または生殖細胞系列ベースの置換からなるアミノ酸突然変異を使用する（表14）。可変領域中の非保存システインは、セリンに突然変異させた。グリコシル化部位については、アスパラギンの保存的グルタミンとの交換または生殖細胞系列突然変異を含むいくつかの突然変異を使用することができる。脱アミド部位に対する修飾は、アスパラギン酸のアスパラギンとのおよびセリンまたはアラニンのグリシンとの交換を含む。潜在的な酸化の部位は修飾しない。次いで、抗体クローンのそれぞれのVHおよびVLから得られたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、Gene Art/Invitrogenでヒト細胞における発現のためにコドン最適化した。これらの機能的変異体の 50

可変領域は、続いて、I g G 発現ベクター p C P 9 - カッパ (配列番号 1 2 7 を参照) および p C P 9 - ガンマ (配列番号 1 2 8 を参照) における発現のために制限消化によって直接クローニングした。B a m H I、X h o I、および / または S r f I は、可変重鎖をクローニングするために使用し、N o t I および A s c I は、可変軽鎖をクローニングするために使用した。すべての構築物についてのヌクレオチド配列は、当業者に知られている標準的な技術に従って検証した。

【 0 1 0 7 】

【 表 1 4 】

IgG同定	可変鎖	突然変異	理由
CB002.1	重	C102S C107S	遊離システイン
CB003.1	軽	N30D	脱アミド
CB010.7	NA	NA	NA
CB028.2	重	C105S C110S C112S C117S	遊離システイン
CB048.3	軽	N92D	グリコシル化
CB058.1	重	C104S C109S	遊離システイン

10

【 0 1 0 8 】

実施例 9

E L I S A および O c t e t によるペプチド結合研究

20

詳細なエピトープマッピングを、C B 0 1 0 . 7 および C B 0 3 0 . 1 などの同定された R S V G タンパク質特異的 m A b について実行した。ペプチドは、F m o c 化学によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー (H P L C) によって精製した。ペプチド - ペプチド相互作用研究のために、いくつかのペプチドは、アミノヘキサ酸 (A h x) スペーサーを介して N - 末端でビオチン化した。ペプチドは、エレクトロスプレー質量分析法によって特徴について分析した。サンプルは、C 1 8 逆相カラムを有する超高性能液体クロマトグラフィー (U P L C、A l l i a n c e、W a t e r s、M i l f o r d、M A、U S A) によって分析し、フォトダイオードアレイ検出器および質量高感度検出器により検出した。溶媒 A (H₂O + 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸 [T F A]) および溶媒 B (A C N + 0 . 0 5 % T F A) と共に 2 5 ~ 1 0 0 % のアセトニトリル (A C N) につ

30

【 0 1 0 9 】

m A b は、R S V - G A 型および B 型の中央保存領域を含有するビオチン化ペプチドへの結合について試験した (表 1 5)。アビジンコーティング 9 6 ウェルマイクロタイタープレートを洗浄し、室温で 1 時間、E L I S A バッファー (P B S + 1 % F B S + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) 中 1 0 0 μ L ビオチン化ペプチド (2 . 3 7 × 1 0⁻⁷ M) と共にインキュベートした。次に、洗浄後、ウェル当たり 1 8 0 μ L の遮断バッファー (P B S + 1 0 % F B S) を、ウェルに移し、室温で 1 時間インキュベートした。続いて、プレートを洗浄し、室温で 1 時間、抗ヒト H R P (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) と共にインキュベートした。洗浄後、1 0 0 μ L の o - フェニレンジアミンホースラディッシュペルオキシダーゼ基質 (T h e r m o S c i e n t i f i c) をそれぞれのウェルに追加した。反応を 1 0 0 μ L 1 M H₂S O₄ により 1 0 分後に停止させた。吸収を 4 9 0 n m で読み取った。

40

【 0 1 1 0 】

【表 15】

表15.抗体結合研究に使用したRSV-Gペプチド

A型中央領域

ビオチン-

Sym-1705 145KQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFEVPCISCSNNPTCWAICKRI PNKKFGKKT²⁰¹TTKPTKK₂₀₁
(配列番号129)

Sym-1706 ビオチン-145KQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFEVPCISCSNNPTCWAICKR₁₈₄ (配列番号125)

B型中央領域

ビオチン-

Sym-1788 145KPRPKSPPKKPKDDYHFEVFNFEVPCISCGNNQLCKSICKTI PSNKP²⁰¹KKPTIKFTNK₂₀₁
(配列番号130)

Sym-1789 ビオチン-145KPRPKSPPKKPKDDYHFEVFNFEVPCISCGNNQLCKSICKT₁₈₄ (配列番号131)

注:下線を引いた残基は、非グリコシル化中央保存ドメインに相当する

10

【 0 1 1 1 】

上記に記載されるmAbはすべて、RSV G aおよびG bタンパク質(実施例6)ならびに中央領域A型およびB型ペプチドに結合した(データを示さず)。抗体CB003.1およびCB010.7の滴定は、これらのmAbが4つすべてのペプチドに対して約20ng/mLのIC50を有することを示した(図3)。RSV GペプチドへのmAbの結合はまた、Octet Red 384(ForteBio)でストレプトアビジンセンサーチップを使用して決定した。さらに、mAbは、A型およびB型ペプチドの両方に対して交差反応性を示した(表16)。CB003.1は、A型およびB型ペプチドの両方に対して最も高い応答を示した。CB010.7は、A型ペプチドと比較して、B型に対してわずかに高い結合を示した。

20

【 0 1 1 2 】

【表 16】

表16.RSV-GペプチドへのRSV G特異的mAbの結合(Octet)[RU]

ペプチド	CB010.7	CB003.1
Sym-1705	1.25	3.48
Sym-1706	1.74	3.36
Sym-1788	1.94	3.28
Sym-1789	2.96	3.20

RU:応答の単位

30

【 0 1 1 3 】

実施例 10

最小エピトープのマッピング (PepScan)

mAbによって認識される最小エピトープをマッピングするために、反応性を、PepScan分析を使用し、RSV-G A型およびB型の中央領域(残基145~201)に対応する複数の長さ(5、8、10、14、18、25、または32アミノ酸長)のペプチドについて試験した。ペプチドへの抗体の結合は、PepScanベースのELISAにおいて評価した。それぞれのmAbは、最適な結合が実現され、非特異的結合が回避されたことを確実にするように滴定した。それぞれのクレジットカード型ポリプロピレンプレートは、5%ウマ血清(v/v)、5%OVA(w/v)、および1%(v/v)Tween80を含有するPBSにおいてまたは4%ウマ血清(v/v)および1%(v/v)Tween80を含有するPBSの代替の遮断バッファーにおいて、1~10ng/mLのmAbと共に4で一晚インキュベートした、共有結合したペプチドを含有した。洗浄後、プレートは、25で1時間、HRP連結ウサギ抗mAb(DakoCytomation)と共にインキュベートした。さらなる洗浄後、ペルオキシダーゼ活性は、A

40

50

B T S 基質を使用して評価し、発色現像は、電荷結合素子カメラおよび画像処理システムを使用して定量化した。

【 0 1 1 4 】

分析は、エピトープの有力なコアに対応する、抗体に結合する最小ペプチドおよびこれも結合に寄与する追加の隣接残基を含有し、完全なエピトープを含有する最も高度な結合を有するペプチドを示す。ペプチドへの抗体の反応性を表 1 7 に要約する（大文字として示す残基）。すべての抗体が中央保存ドメインに結合するが、それらの結合についての決定的な残基は異なる。2 つの抗体（C B 0 0 3 . 1 および C B 0 1 0 . 7）については、最小エピトープが、N - 末端 C C D 領域に制限される（国際公開第 2 0 0 9 / 0 5 5 7 1 1 号パンフレットにおいて開示される 3 D 3 に類似する）。

10

【 0 1 1 5 】

実施例 1 1

完全置換分析（P e p S c a n）

結合にとって決定的な側鎖を同定し、既知の R S V 株に対する認識の幅を研究するために、ペプチドの専用のセットを合成した。抗体 C B 0 0 3 . 1 および C B 0 1 0 . 7 によって認識される配列 F H F E V F N F V P C S I C（配列番号 1 3 2）のそれぞれの位置についての 2 8 0 の単一置換変異体ペプチドの専用のペプチド配列による完全置換分析を実行し、これらの抗体への結合にとって重要な残基を明らかにした（図 5）。これらの抗体のエピトープは、3 D 3 エピトープに類似するが、全く異なる方法で認識される。これは、発明者らの抗体のエピトープが、3 D 3 と比較して、全く異なる本質的な残基を有することを示す置換分析によって反映される。そのため、認識および結合のモードは非常に異なる。実施例 7 において示されるように、本発明の抗体は、3 D 3 よりも高度な中和能力を有する。

20

【 化 1 】

3D3: ¹⁵⁰FHF**EV**FNFVPC**SIC**₁₇₂
 CB010.7: ¹⁵⁹FHF**EV**FNFVPC**SIC**₁₇₂
 CB003.1: ¹⁵⁹FHF**EV**FNFVPC**SIC**₁₇₂

【 0 1 1 6 】

結合にとって重要な保存残基も表 1 7 に要約する（太字で示される決定的な残基）。

30

【 0 1 1 7 】

実施例 1 2

アラニンスキャニング（P e p S c a n）

それぞれの位置をアラニン残基によって置換したペプチドのセットを試験した（図 6）。抗体への結合にとって決定的な側鎖を表 1 7 に要約する（太字の黒色で示す）。

【 0 1 1 8 】

実施例 1 3

天然の変異体ペプチドへの結合（P e p S c a n）

次に、抗体は、R S V - G 中央ドメインの完全な多様性を包含する 3 1 のペプチドのパネルに対して、それが 2 0 1 2 年 1 月 1 日に G e n B a n k において見出されたため、試験した。図 7 において示されるように、ほとんどすべての A 型および B 型の天然に存在する変異体ペプチドが認識される。C B 0 0 3 . 1 は、B 型ペプチドよりも A 型に対してより低い結合を示す。C B 0 1 0 . 7 は、同様に十分に、A 型および B 型ペプチドの両方に結合する。A 型変異体ペプチドにおける 1 8 0 位の突然変異は抗体にとって決定的となる。S e r 1 7 0 C y s の突然変異は、C B 0 1 0 . 7 にとって決定的ではなかった。I l e 1 7 1 T h r 突然変異は C B 0 0 3 . 1 結合にとって決定的であり、G l n 1 7 5 A r g 突然変異は C B 0 0 3 . 1 にとって決定的であった。二重突然変異 I l e 1 8 1 P h e ; I l e 1 8 4 A l a も C B 0 0 3 . 1 にとって決定的であった。4 つの抗体への結合にとって決定的な天然に存在する変異体を表 1 7 に要約する（下線によって示す）。

40

50

【 0 1 1 9 】

【 表 1 7 】

表17.RSV Gタンパク質特異的モノクローナル抗体のエピトープマッピング(PepScan)

mAb	型	中央保存ドメインにおける決定的な残基	エピトープ
	RSV-A	158DFHFEVFNFPVPCSI CSNNPTCWAICKRIPNKKPGK ₁₉₂	
	RSV-B	158DYHFEVFNFPVPCSI CGNNQLCKSI CKTI PSNKKPKK ₁₉₂	
3D3	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCs-c-n-c- <u>a</u> ick- <u>i</u> -----p--	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCs-c-----c- <u>i</u> c-----	
CB002.1	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCs-c-nn-c- <u>a</u> ick-----n--p--	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCs-c-n-c- <u>a</u> ick-----	
CB003.1	RSV-A	-FHFEVFNFPVPCSI-----c-----g-	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPVPCSI-----g-----c-----	
CB010.7	RSV-A	-----FEVFNFPVPCSIc-----c- <u>a</u> i-----	I
	RSV-B	-----FEVFNFPVPCSIc-----c-----	
CB028.2	RSV-A	-----FEVFNFPVPCs-c-----c-c-----	I
	RSV-B	-----FEVFNFPVPCs-c-----c-----	
CB048.3	RSV-A	-FHFEVFNFPV-----	I
	RSV-B	-YHFEVFNFPV-si-g-nqlc--ic-t-----	
CB058.1	RSV-A	--HFEVFNFPV-----	I
	RSV-B	--HFEVFNFPVPCsicgnnqlck-ic-tip-----	

10

凡例:大文字=最小エピトープ(最も短い反応性ペプチド)、イタリック体の大文字=結合に
 寄与するさらなる残基、**白色太字**=完全置換分析を使用して同定した決定的な残基、
黒色太字=アラニンスキャニングを使用して同定した(さらなる)決定的な残基、
 下線=入手可能な中央領域変異体ペプチドを使用して同定された(さらなる)決定的な残基

20

【 0 1 2 0 】

実施例 1 4

抗 G m A b の 予 防 効 能

抗 G m A b がインビボ予防効能を示すかどうかを決定するために、m A b C B 0 0 3 . 1 および C B 0 1 0 . 7 を R S V - A / L o n g コットンラットモデルにおいて試験した。チャレンジの 2 4 時間前に、体重の範囲が 1 日 目 6 0 ~ 8 0 g、6 ~ 8 週齢、パラミクソウイルスに対して血清陰性の近交系オスコットンラットに、上部後脚(四頭筋)に 5 m g / k g の C B 0 0 3 . 1、C B 0 1 0 . 7、Synagis(登録商標)、またはビヒクル(グループ当たり n = 5)を筋肉内注射した。0 日目に、コットンラットは、1 0 0 μ L (それぞれの鼻孔に 5 0 μ L)で鼻内滴下によって 1 0 ⁵ · 4 p f u R S V - A / L o n g によりチャレンジした。9 6 時間後、肺および鼻甲介: q P C R による全ウイルス R N A 負荷決定のための全 R N A の単離のための舌区(lingual lobe)、p f u 試験による感染ウイルス負荷決定のための残りの肺および鼻甲介を収集するために動物を屠殺した。血液サンプルは、適切な投薬について確認するために、チャレンジ前の 0 日 目 (m A b 投与の 2 4 時間後)におよび研究終了(チャレンジの 9 6 時間後)時に収集した。G m A b は、ビヒクルと比較して、肺および鼻甲介の感染ウイルス力価ならびに肺 R N A ウイルス負荷を低下させた(図 8)。肺感染ウイルス力価(log₁₀ P F U / g)は、抗体 C B 0 0 3 . 1 および C B 0 1 0 . 7 によって 2 . 4 5 6 および 1 . 5 5 9 log₁₀、それぞれ低下したが、C R 9 5 1 4 (3 D 3) による予防処置は、0 . 8 0 1 log₁₀ の減少しかもたらさなかった。

30

40

【 0 1 2 1 】

実施例 1 5

抗 G m A b の 治 療 効 能

抗 G m A b がインビボ治療効能を示すかどうかを決定するために、m A b C B 0 0 3 . 1 および C B 0 1 0 . 7 を R S V - A / L o n g コットンラットモデルにおいて試験した。0 日目に、体重の範囲が 1 日 目 6 0 ~ 8 0 g、6 ~ 8 週齢、パラミクソウイルスに対して血清陰性の近交系オスコットンラットに、1 0 0 μ L (それぞれの鼻孔に 5 0 μ L)で鼻内滴下によって 1 0 ⁶ · 1 p f u R S V - A / L o n g によりチャレンジした。チャレンジの 1 日 後 に、5 0 m g / k g C B 0 0 3 . 1、C B 0 1 0 . 7、Syna

50

gis (登録商標) (グループ当たり $n = 14$)、またはビヒクル (グループ当たり $n = 23$) を、心臓内注射によって投与した。4日目に、無作為に選んだグループ当たり5匹の動物を肺および鼻甲介: qPCRによる全ウイルスRNA負荷決定のための全RNAの単離のための舌区、pfu試験による感染ウイルス負荷決定のための残りの肺および鼻甲介を収集するために屠殺した。6日目に、すべての残りの動物 (グループ当たり $n = 9$ または 18) を、肺の病理組織診断のための肺を収集するために屠殺した。血液サンプルは、適切な投薬について確認するために、チャレンジの2日後 (mAb投与の24時間後) におよび研究終了 (チャレンジの4または6日後) 時に収集した。G mAbは、ビヒクルと比較して、肺および鼻甲介の感染ウイルス力価を低下させたが、肺RNAウイルス負荷は低下させなかった (図9)。肺感染ウイルス力価 (\log_{10} PFU/g) は、抗体CB003.1およびCB010.7によって 2.348 および 1.736 \log_{10} 、それぞれ低下したが、CR9514 (3D3) による治療処置は、 1.369 \log_{10} の減少しかもたらさなかった。さらに、新しいG mAbは、細気管支周囲炎、血管周囲炎、間質肺炎、および肺肺炎についての病理組織診断スコアを低下させた (図10) が、CR9514 (3D3) は間質肺炎を低下させたのみであった。

10

【0122】

配列

【化2】

>CB058.1 VH - 配列番号37
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIRGSVDNTYYADSVKGRFT
 ISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDPALYCSGETCFSDLTDWGQGLTVTVSS

>CB058.1 VK - 配列番号38
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSTLPSGVP SRFSGSGSGTDF
 TLTISSLQPEDSATYFCQHYIRYPHTFGQGKLEIK

>CB048.3 VH - 配列番号39
 QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGNKYYADSVKGR
 FTVSRDN SKNTLSLQMDSLRAEDTAIYYCAKTTFFDSDNYEYLDYWGQGLTVTVSS

>CB048.3 VK - 配列番号40
 DIQLTQSP5FLSASVGDRTITCRASQGIRSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFT
 LTISSLQPEDSATYQCQLNTSPPYTFGQGKLEIK

>CB010.7 VH - 配列番号41
 QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFNTHGMHWVRQAPGKLEWVAVMSYDGTKKYYHADSVKGR
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAIYYCAKVGELRSFDWLLADGTAYYYYGMDVWGQGT TVTVSS

>CB010.7 VK - 配列番号42
 DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWFQQKPGQPPRLINWASTREFGVPDRFSG
 SSGSGDFTLTISSLQAEDVAIYYCHQYYSIPLTFGGGKVEIK

>CB003.1 VH - 配列番号43
 QVQLVQSGPELRKPGASVTVSCASGYFTTYYIHVWRQAPGGGLDWMGMINTGSGVTSYAQKFQGR
 VAMTRDTSTSTVFMELSLRFEDTALYYCARMYSGSWYPFDYWGQALTVTVSS

>CB003.1 VK - 配列番号44
 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQNINGNYLAWYQQKPLAPRLLIYEASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
 TLTISSLEPEDFGVYYCQYGTSPFFTFGPGTKVDIK

>CB028.2 VH - 配列番号45
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWVMGWISGSDNTNYAQN LQG
 RVTLLTIDISTRATYMELRSLKPDDTAMYYCARALAKWYCSSSCFCGGGSCYSDYWGQGLTVTVSS

>CB028.2 VK - 配列番号46
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGMNSYLNWYQQKPGKAPPELLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTINSLQPEDFATYFCQSFSTPLTFGGGKVEIK

>CB002.1 VH - 配列番号47
 QVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVSGGSTSSYFVNWIRQPPGKLEWIGYIYSGSADYNPSLKSRTISID
 TSKTQFSLKLTVAADTAVYYCARSGFCTNDACYRRGSWFDWPWGQGLTVTVSS

>CB002.1 VK - 配列番号48
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTVSSLHPEDFATYQCQSYSTLTWTFGQGKVEIK

10

20

30

【化3】

配列番号127 (pCP9-カップ配列)

TACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAT
 GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC
 CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGACGGATCGGGGAGAT
 CTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
 AGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGT
 GCGCGAGCAAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGC
 ATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTC
 AATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATA
 TTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTT
 ATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTA
 GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
 AGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCC
 AACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
 GCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGATTTACGGTAAA
 CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
 TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATG
 ACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGGTGTATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
 GTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAG
 TTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC
 CGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
 TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCA
 CGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
 CCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCTTAATTA
 CTCGAGGCCCGAGCCCGGGCGAGCCCAGACACTGGACGTGAACCTCGCG
 GACAGTTAAGAACCCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCA
 CACCGCGGTCAACATGGCACCACTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
 TCGGCTTTCCCCATGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCG
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
 GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC
 TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
 AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGA
 GGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGG
 CTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGTCTGCCTCTTCA
 CCCGGAGGCTCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGG
 CTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCTAACCCAGG
 CCCTGCACACAAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATA
 TCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCAAAGGCCAAACTCT
 CCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAACTCCC
 AATCTTCTCTGTCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCCA
 CCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGA
 CAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCT
 GACACGTCCACCTCCATCTTCTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
 TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGG
 ACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
 GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA

10

20

30

【化4】

CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCACATGGACAGAGGCCGG
 CTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCT
 ACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
 ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACGCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT
 CTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
 GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGCGAATTCACCGGTACCA
 AGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
 CCATCTGTGTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCTTACCCCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG
 AGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG
 GGAGGATGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGCTTCTGAGGCGGAAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCA
 CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
 GCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTT
 CCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG
 GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAA
 AAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGA
 CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
 GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATCTTTTGATTT
 ATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTA
 ACAAAAAATTAACCGGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG
 TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC
 TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
 AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCAGC
 CCTAACTCCGCCCTACCTCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGGCCATTCTCC
 GCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAAGAGGCCGAGGCCGCTC
 TGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
 GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGGATATCCATTTTCGGATCTGATC
 AAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC
 GCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGC
 ACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGC
 AGGGGCGCCGGTCTTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTT
 CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
 GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTATCTCACCTGTCTC
 TGCCGAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGCGCTGCATACGC
 TTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAG
 CGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGA
 CGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGG
 CGCGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCATGGCGATGCCTGC
 TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGT
 GGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCG
 TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCT
 TTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCTTCTATCGCCTTCT

10

20

30

【化5】

TGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGGTGCTACGAGATTTCGA
 TTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGA
 CGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCGC
 CCACCCCAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAG
 CATCACAAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG
 TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTT
 AGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGT
 TATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA
 AGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC
 ACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGAATTGCATGAAGA
 ATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTG
 GCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTA
 TTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGG
 CTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
 ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCG
 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACC
 CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
 GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
 CAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT
 GGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
 TGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAC
 TCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTT
 TGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCC
 ATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA
 GAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGT
 TTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGA
 ACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGATCTGCG
 GCCGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGT
 CTCCTTGCTATAAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAA
 CATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCAAAGGGCAGAACTTTGTT
 ACTTAAACACCATCTGTTTGTCTTTTCTCAGGAACTGTGGCTGCACCA
 TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
 TCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAC
 AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGACG
 CTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCA
 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
 TGTTAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACC
 GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC
 CCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTT
 CCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTA
 TTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
 CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGG
 AAAGAACCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
 TTGCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
 GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTT
 CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC

10

20

30

【化 6】

AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
 CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
 CACGAACCCCGTTACGCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
 TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
 TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
 ATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCA
 GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
 CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTG
 GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAA
 TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT
 TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG
 TCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
 GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
 ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC
 GCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
 GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTT
 GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCT
 TCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATG
 TTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGT
 AAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT
 CTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCA
 ACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
 GCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGC
 TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCG
 CTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCAACTGATCTTCA
 GCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCA
 AAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTC
 A

10

20

【化7】

配列番号 128 (pCP9-ラムダ配列)

TACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTTC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGAT
CTCCCGATCCCCATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
AGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGT
GCGCGAGCAAAAATTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGC
ATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCCTTTTGGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTC
AATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATA
TTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTT
ATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTA
GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTCCCGCTTACATAAECTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA
CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG
ACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
GTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAG
TTTGTTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC
CGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCA
CGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCTCCCGCGG
CCGGGAACGGTGCAATTGGAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCTTAATTAA
CTCGAGGCCCGAGCCCGGGCGAGCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCG
GACAGTTAAGAACCAGGGCCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCA
CACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTG
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC
TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGGA
GGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGG
CTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCCGTCTGCCTCTTCA
CCCGGAGGCCTCTGCCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGG
CTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACGGGCTAGGTGCCCTAACCAGG
CCCTGCACACAAAGGGGAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATA
TCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCCACCCAAAGGCCAAACTCT
CCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCC
AATCTTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGA
CAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCT
GACACGTCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAAGTTCAAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT

10

20

30

【化 8】

CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAAGTTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGG
 CTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCT
 ACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCTGCTCAAAGGCTTCT
 ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT
 CTATAGCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
 GAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGCGAATTCACCGGTACCA
 AGCTTAAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
 CCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGATTGTCTG
 AGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG
 GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCA
 CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
 GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTT
 CCTTCCCTTTCGCCCAGTTCGCGGCTTTCGCCGTCAAGCTCTAAATCG
 GGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAA
 AAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
 CGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCT
 GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
 ATAAGGGATTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
 ACAAAAATTTAACCGGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGCAGTTAGGGTG
 TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATC
 TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
 AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAAGTCCCGCC
 CCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCC
 GCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTC
 TGCCCTGTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCAG
 GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGGATATCCATTTTCGGATCTGATC
 AAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC
 GCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGC
 ACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGC
 AGGGGCGCCCGTCTTTTTGTC AAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGCTGGCCACGACGGGCCT
 CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
 GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
 TGCCGAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGC
 TTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAG
 CGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGA
 CGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGG
 CGGCATGCCCCAGCGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGC
 TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGT
 GGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCG
 TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCT
 TTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
 TGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGGTGCTACGAGATTCGA

10

20

30

【化9】

TTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGA
 CGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGC
 CCACCCCAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
 CATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG
 TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCT
 AGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTGTGTGAAATTGT
 TATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 AGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC
 ACTGCCCCCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGAATTGCATGAAGA
 ATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCTAGGTGGTCAATATTG
 GCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTA
 TTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGG
 CTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
 ATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCCG
 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACC
 CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
 GGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
 CAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT
 GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
 TGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGAC
 TCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT
 TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCC
 ATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA
 GAGTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGT
 TTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGA
 ACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGGCGCGCCAGATCTGCG
 GCCGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGT
 CTCCTTGCTATAAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCTAA
 CATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTT
 ACTTAAACACCACTCTGTTTGGCTTCTTTCCTCAGGTACGCCAAGGCTGCC
 CCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAG
 GCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGAATTTACCCGGGAGCCGTGACAGT
 GGCTTGGAAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC
 ACACCTCCAAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGA
 GCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC
 ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTT
 CATAGAGTTAACGGATCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAAGTTTAAAC
 CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
 CCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTT
 TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
 ATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
 ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCG
 GAAAGAACCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGG
 TTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
 GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTT
 CCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
 AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTT

10

20

30

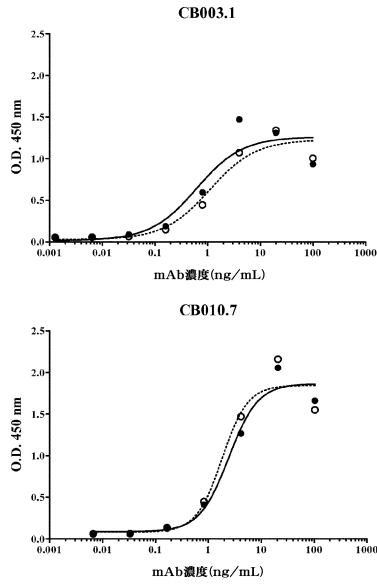
【化 1 0】

GGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
 CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
 CACGAACCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
 TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAGCAGTATTTGGTATC
 TGCCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
 ATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCA
 GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTT
 CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
 GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAAA
 TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT
 TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG
 TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
 GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
 ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC
 GCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
 GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTT
 GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT
 TCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATG
 TTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGT
 AAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT
 CTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCA
 ACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
 GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGC
 TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCG
 CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCA
 GCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCA
 AAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
 A

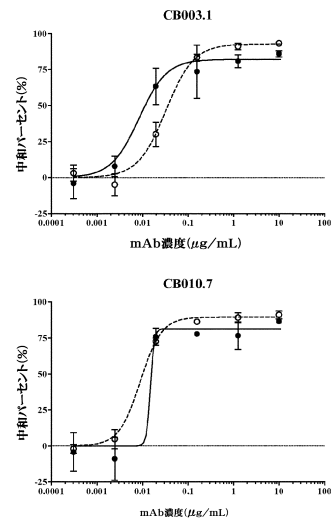
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

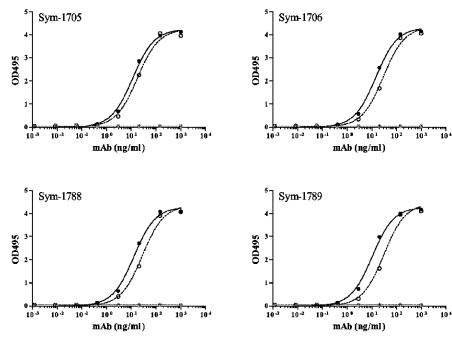
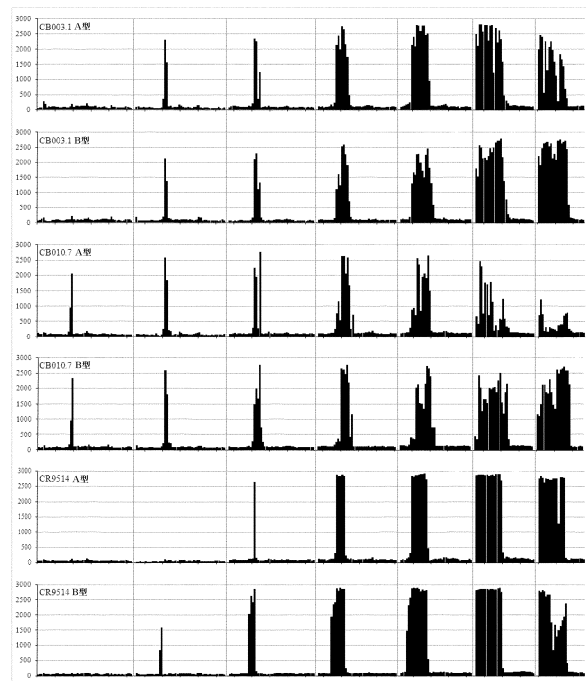


FIG. 3

【 図 4 】



【 図 5 】

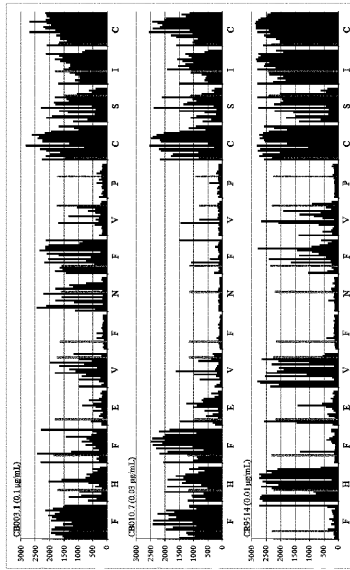


FIG. 5

【 図 6 】

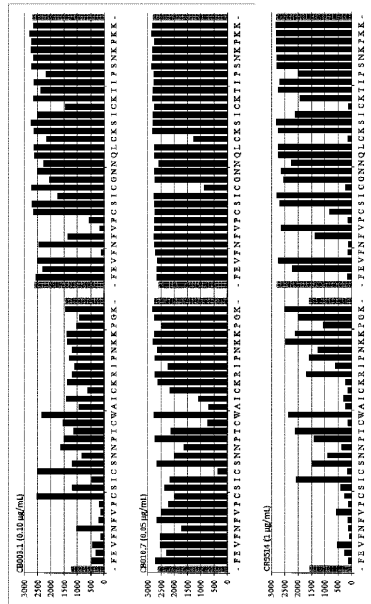
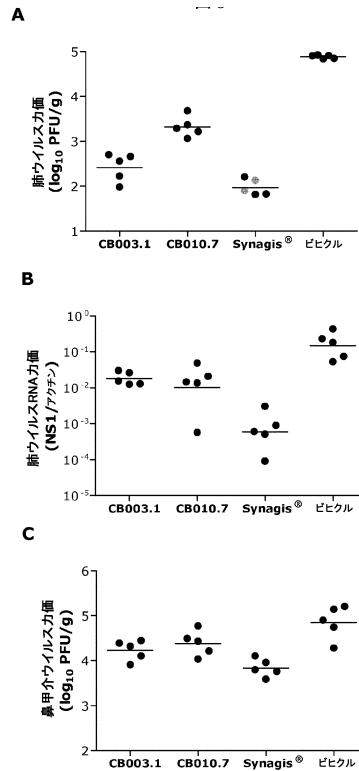


FIG. 6

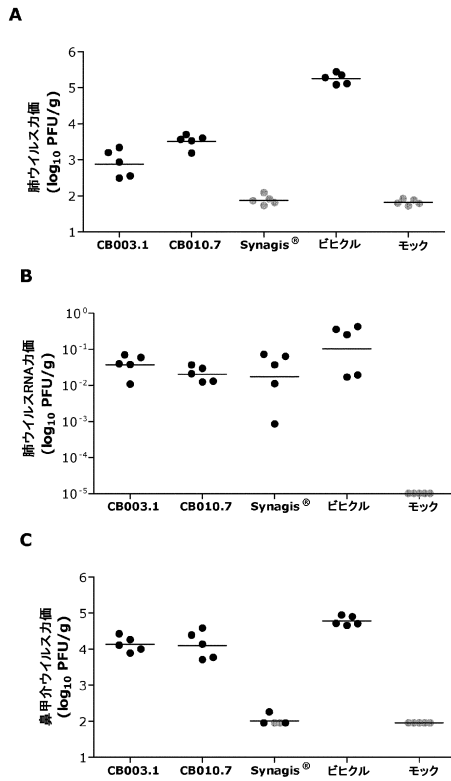
【 図 7 】



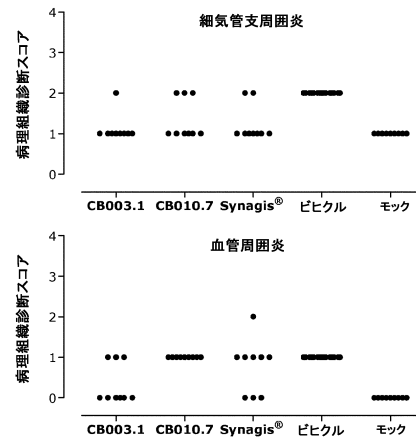
【 図 8 】



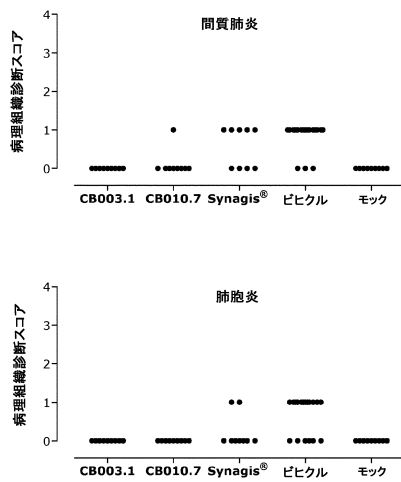
【 図 9 】



【 図 10 - 1 】



【 図 10 - 2 】



【配列表】

0006412107000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 S
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14
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 メリーフィールド ロウ 3
 2 1 0
- (72)発明者 ロバート アンソニー ウィリアムソン
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6
- (72)発明者 ヨハネス ペトリュス マリア ランゲデイク
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6
- (72)発明者 ガブリエル パスカル
 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 メリーフィールド ロウ 3
 2 1 0
- (72)発明者 アンジェリーク ヴァント ヴァウト
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6

審査官 金田 康平

- (56)参考文献 特表2011-500091(JP,A)
 米国特許出願公開第2011/0318376(US,A1)
 Walsh, E. E. et al., Comparison of antigenic sites of subtype-specific respiratory syncytial virus attachment proteins, J. Gen. Virol., 1989年, Vol. 70, pp. 2953-2961
 Anderson, L. J. et al., Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies, J. Virol., 1988年, Vol. 62, p. 4232-4238

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 UniProt/GeneSeq
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
 (S T N)
 P u b M e d

专利名称(译)	人抗体与RSVG蛋白结合		
公开(公告)号	JP6412107B2	公开(公告)日	2018-10-24
申请号	JP2016508114	申请日	2014-04-14
[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		
[标]发明人	ジャハングールワディア ロバートアンソニーウィリアムソン ヨハネスペトリユスマリアランゲデイク ガブリエルパスカル アンジェリークヴァントヴァウト		
发明人	ジャハングール ワディア ロバート アンソニー ウィリアムソン ヨハネス ペトリユス マリア ランゲデイク ガブリエル パスカル アンジェリーク ヴァント ヴアウト		
IPC分类号	C07K16/10 C12P21/08 C12N15/13 C12N15/09 C12N5/10 A61K39/395 A61P31/14 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/00 A61P31/14 A61K39/155 A61K47/6841 C07K16/1027 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/76 C07K14/115 C07K2317/24 C07K2317/50 C07K2317/565 A61K39/145 C07K14/005 G01N33/56983 G01N2333/135 G01N2469/10		
FI分类号	C07K16/10 C12P21/08 C12N15/13.ZNA C12N15/09.Z C12N5/10 A61K39/395.S A61P31/14 G01N33/53.D G01N33/569.L		
代理人(译)	小林 浩 小林顺子 铃木康仁		
审查员(译)	金田幸平		
优先权	61/812098 2013-04-15 US 2013179241 2013-08-05 EP		
其他公开文献	JP2016521969A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与RSV的G蛋白结合并能中和RSV A和B亚型的分离的抗体和抗原结合片段，及其在诊断，预防和/或治疗RSV感染中的用途。

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int. Cl.		F I	
C O 7 K	1 6 / 1 0	(2 0 0 6 . 0 1)	C O 7 K 1 6 / 1 0
C 1 2 P	2 1 / 0 8	(2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 P 2 1 / 0 8
C 1 2 N	1 5 / 1 3	(2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 5 / 1 3 Z N A
C 1 2 N	1 5 / 0 9	(2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 5 / 0 9 Z
C 1 2 N	5 / 1 0	(2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 5 / 1 0

請求項の数 12 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-508114 (P2016-508114)	(73) 特許権者	516257833
(86) (22) 出願日	平成26年4月14日 (2014.4.14)		ヤンセン ファッションズ アンド プリバ ンション パーフェー
(65) 公表番号	特表2016-521969 (P2016-521969A)		J A N S S E N V A C C I N E S & P R E V E N T I O N B . V .
(43) 公表日	平成28年7月28日 (2016.7.28)		オランダ国 2 3 3 3 セーエン ン アルヒメーデスウェッハ 4
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/057499		
(87) 国際公開番号	W02014/170257	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014.10.23)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成29年2月8日 (2017.2.8)		
(31) 優先権主張番号	61/812,098	(74) 代理人	100093676
(32) 優先日	平成25年4月15日 (2013.4.15)		弁理士 小林 純子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	13179241.8		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成25年8月5日 (2013.8.5)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R S V Gタンパク質に結合するヒト抗体