

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-527899

(P2012-527899A)

(43) 公表日 平成24年11月12日(2012.11.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 101	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 115 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-513195 (P2012-513195)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月26日 (2010. 5. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年1月23日 (2012. 1. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/036170
 (87) 国際公開番号 W02010/138564
 (87) 国際公開日 平成22年12月2日 (2010. 12. 2)
 (31) 優先権主張番号 61/305, 898
 (32) 優先日 平成22年2月18日 (2010. 2. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/181, 263
 (32) 優先日 平成21年5月26日 (2009. 5. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/224, 302
 (32) 優先日 平成21年7月9日 (2009. 7. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511235962
 モウント シナイ スクール オフ メディシネ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
 29 ニューヨーク ワン グスタベ エル. レブイ プラセ
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 アドルフォ ガルシア-サストレ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101
 28 ニューヨーク アプト. 3ジー エアスト 96トフ ストリート 16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 周期的投与によって作製されたインフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体及びその使用

(57) 【要約】

同じサブタイプ又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの株と交差反応する中和するモノクローナル抗体を、周期的免疫化によって作製する方法が本明細書に提供される。また、このような抗体を含む組成物、及びこのような抗体を用いてインフルエンザウイルス疾患を診断、予防、又は治療する方法が本明細書に提供される。

【選択図】 図1

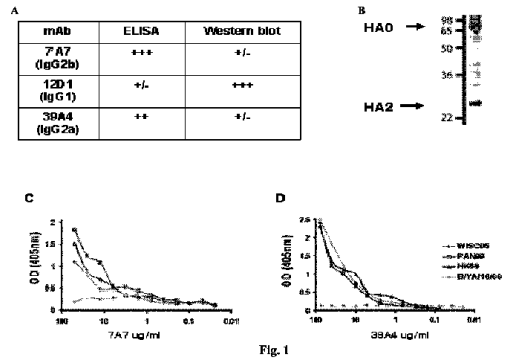


Fig. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

同じか又は異なるサブタイプのインフルエンザA型ウイルス赤血球凝集素（HA）の2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、2、3、4、又はそれより多くの免疫原性組成物を非ヒト対象に、各免疫原性組成物の投与を一定時間離して投与すること、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製すること、及び、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを選択することを含み、この中で、各免疫原性組成物が、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含み、かつこの中で、1の免疫原性組成物は、別の免疫原性組成物とは、前記インフルエンザウイルス、又は、前記HA若しくはその断片又は前記HA若しくはその断片をコードする核酸が由来し又は得られるインフルエンザウイルスが、抗原的に異なるという点において異なる、前記方法。

10

【請求項 2】

2以上のインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、2、3、4、又はそれより多くの免疫原性組成物を非ヒト対象に、各免疫原性組成物の投与を一定時間離して投与すること、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製すること、及び、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを選択することを含み、この中で、各免疫原性組成物が、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含み、かつこの中で、1の免疫原性組成物は、別の免疫原性組成物とは、前記インフルエンザウイルス、又は前記HA若しくはその断片又は前記HA若しくはその断片をコードする核酸が由来し又は得られるインフルエンザウイルスが、抗原的に異なるという点において異なる、前記方法。

20

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体を単離することをさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の方法。

30

【請求項 4】

前記2以上のインフルエンザA型ウイルスが、H3サブタイプ、又はサブタイプH1及びH3のものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記インフルエンザA型ウイルスサブタイプがH1及びH3である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、(i) 非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii) 第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；及び(iii) 第二の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し

40

50

、かつインフルエンザA型ウイルスHAの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む、前記方法。

【請求項7】

インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、(i)非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii)第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(iii)第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(iv)第三の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む、前記方法。

10

20

【請求項8】

インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、(i)非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii)第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii)第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iv)第三の時間の後、前記対象に、第四の不活性型インフルエンザウイルス、第四の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第四の生インフルエンザウイルス、第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第四の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第四のインフルエンザウイルスが、前記第一の、前記第二の、

30

40

50

及び前記第三のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに（v）第四の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む、前記方法。

【請求項 9】

前記第一の時間が2～4週間又は2～6週間であり、かつ第二の時間が2～5日間又は5～10日間である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 10】

前記第一の及び第二の時間が2～4週間又は2～6週間であり、かつ前記第三の時間が2～5日間又は5～10日間である、請求項 7 記載の方法。

10

【請求項 11】

前記第一、第二、及び第三の時間が2～4週間又は2～6週間であり、かつ第四の時間が2～5日間又は5～10日間である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

前記HAサブタイプがH3である、請求項 6、7、又は8記載の方法。

【請求項 13】

前記第一のインフルエンザウイルスが、A/香港/1/1968型であり、第二のインフルエンザウイルスが、A/アラバマ/1/1981型であり、第三のインフルエンザウイルスが、A/北京/47/1992型であり、かつ第四のインフルエンザウイルスが、A/ワイオミング/3/2003型である、請求項 8 記載の方法。

20

【請求項 14】

前記モノクローナル抗体を単離することをさらに含む、請求項 6、7、又は8記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1、6、7、又は8記載の方法によって作製される、同じサブタイプ又は異なるサブタイプのインフルエンザA型ウイルスHAの2以上の株に結合しかつ中和する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 16】

請求項 2 記載の方法によって作製される2以上のインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプ由来の株に結合しかつ中和する、単離されたモノクローナル抗体。

30

【請求項 17】

2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関（ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209）によりブダペスト条約の規定の下で保管された、7A7と指定されたハイブリドーマ（ATCC受入番号PTA 10058）。

【請求項 18】

2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関（ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209）によりブダペスト条約の規定の下で保管された、12D1と指定されたハイブリドーマ（ATCC受入番号PTA 10059）。

【請求項 19】

2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関（ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209）によりブダペスト条約の規定の下で保管された、39A4と指定されたハイブリドーマ（ATCC受入番号PTA 10060）。

40

【請求項 20】

2010年5月25日に米国培養細胞系統保存機関（ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209）により、ブダペスト条約の規定の下で保管された66A6と指定されたハイブリドーマ（ATCC受入番号PTA _____）。

【請求項 21】

請求項 17 記載のハイブリドーマによって産生される、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 22】

50

請求項 18 記載のハイブリドーマによって産生される、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 23】

請求項 19 記載のハイブリドーマによって産生される、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 24】

請求項 20 記載のハイブリドーマによって産生される、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 25】

請求項 21、22、23、又は 24 記載のモノクローナル抗体から作製される、ヒト化抗体。

10

【請求項 26】

配列番号1の配列に結合し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株を中和する、単離された抗体。

【請求項 27】

配列番号124の配列に結合し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株を中和する、単離された抗体。

【請求項 28】

配列番号125の配列に結合し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株を中和する、単離された抗体。

20

【請求項 29】

前記H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスに結合する単離された抗体であって、(a) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変重鎖(VH)ドメイン；(b) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変軽鎖(VL)ドメイン；(c) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメイン及び抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメイン；(d) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH相補性決定領域(CDR)；(e) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL CDR；あるいは(f) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH CDR及び抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL CDRを含む、前記抗体。

【請求項 30】

請求項 21、22、23、24、26、27、28、又は 29 記載の抗体を含む、組成物。

30

【請求項 31】

請求項 25 記載の抗体を含む、組成物。

【請求項 32】

対象に、請求項 21、22、23、24、26、27、28、又は 29 記載の抗体を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を予防する方法。

【請求項 33】

対象に、請求項 25 記載の抗体を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を予防する方法。

【請求項 34】

対象に、請求項 21、22、23、24、26、27、28、又は 29 記載の抗体を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を治療する方法。

40

【請求項 35】

対象に、請求項 25 記載の抗体を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を治療する方法。

【請求項 36】

(a) 請求項 21、22、23、24、26、27、28、又は 29 記載の抗体を用いて、対象の細胞又は組織試料におけるインフルエンザウイルスHAのレベルをアッセイすること；及び(b) (a)においてアッセイされた前記インフルエンザウイルスHAのレベルを、インフルエンザウイルスに感染していない正常組織試料におけるインフルエンザウイル

50

スHAのレベルと比較することを含み、この中で、インフルエンザウイルス抗原の対照レベルと比較したインフルエンザウイルスHAのアッセイしたレベルにおける増大が、インフルエンザA型ウイルスH3サブタイプの株の存在を示す、インフルエンザA型ウイルスH3の株を検出する方法。

【請求項 3 7】

インフルエンザA型ウイルスH3サブタイプの株が、A / 香港 / 1 / 1968型、A / アラバマ / 1 / 1981型、A / 北京 / 47 / 1992型、又はA / ワイオミング / 3 / 2003型である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

容器に、請求項 2 1、2 2、2 3、2 4、2 6、2 7、2 8、又は2 9 記載の抗体を含む、キット。

10

【請求項 3 9】

容器に、請求項 2 5 記載の抗体を含む、キット。

【請求項 4 0】

配列番号1の配列を含む、免疫原性組成物。

【請求項 4 1】

配列番号124の配列を含む、免疫原性組成物。

【請求項 4 2】

配列番号125の配列を含む、免疫原性組成物。

【請求項 4 3】

対象における免疫応答を誘導する方法であって、前記対象に、請求項 4 0、4 1、又は4 2 記載の免疫原性組成物を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 4 4】

検出可能な薬剤又は治療薬に抱合又は融合されたものである、請求項 2 1、2 2、2 3、2 4、2 6、2 7、2 8、又は2 9 記載の抗体。

【請求項 4 5】

検出可能な薬剤又は治療薬に抱合又は融合されたものである、請求項 2 5 記載の抗体。

【請求項 4 6】

H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスに結合する抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗体が、(a) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメインのアミノ酸配列；(b) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメインのアミノ酸配列；(c) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメイン及び抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメインのアミノ酸配列；(d) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH CDRのアミノ酸配列；(e) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL CDRのアミノ酸配列；あるいは(f) 抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH CDR及び抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL CDRを含む、前記核酸。

30

【請求項 4 7】

請求項 4 6 記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 4 8】

前記核酸の発現を調節するヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 4 7 記載のベクター。

40

【請求項 4 9】

請求項 4 6 記載の核酸又は請求項 4 7 若しくは4 8 記載のベクターを含み又は発現するよう遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項 5 0】

前記核酸が、請求項 4 9 記載の宿主細胞の培養物由来の抗体を発現及び回復させる条件下で、前記宿主細胞を培養することを含む、抗体を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

本出願は、2009年5月26日に出願された米国特許仮出願第61/181,263号、2009年7月9日に出願された米国特許仮出願第61/224,302号、及び2010年2月18日に出願された米国特許仮出願第61/305,898号の優先権の利益を要求するものであり、それらの各々は全体として引用により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号U01 A170469及びU54 A10 57158 06の下での米国政府の支持により実施された。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

(1. 序論)

同じサブタイプ又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの株と交差反応する中和するモノクローナル抗体を、周期的投与によって作製する方法が本明細書に提供される。また、このような抗体を含む組成物、及びこのような抗体を用いてインフルエンザウイルス疾患を診断、予防、又は治療する方法が本明細書に提供される。

【背景技術】

【0004】

(2. 背景)

インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科のファミリーに属する封入されたRNAウイルスである (Palese及びShaw「オルトミクソウイルス科：ウイルス及びその複製第5版、フィールズのウイルス学 (Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, 5th ed. Fields' Virology)」(B. N. Fields、D. M. Knipe、及びP. M. Howley編、Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p164 7-1689 (2007))。インフルエンザウイルスの天然の宿主は鳥類であるが、インフルエンザウイルス(鳥類起源のものを含む。)はまた、ヒト及び他の動物宿主(イヌ、ブタ、ウマ、海生哺乳類、及びイタチ)において感染させることができ、疾病を発症させることができる。例えば、アジアにおいて循環しているH5N1鳥インフルエンザウイルスは、中国及びインドネシアにおいてはブタで認められており、また、その宿主範囲を、インフルエンザA型に易罹患性とは一般的に考えられていないネコ、ヒョウ、及びトラを含むよう拡大している(CIDRAP 鳥インフルエンザ：農業の及び野生生物の考察)。動物におけるインフルエンザウイルス感染の発生は、ヒト汎発性インフルエンザ株を潜在的に生じ得る。

【0005】

インフルエンザA型及びB型ウイルスは、主要なヒト病原体であり、無症状感染から、結果的に死をもたらすことのできる原発性ウイルス性肺炎までの重症度に及ぶ呼吸器疾患を生じる。感染の臨床効果は、インフルエンザ株の病原性、並びに宿主の曝露、病歴、年齢、及び免疫状態とともに変動する。季節性インフルエンザによって引き起こされる累積的罹患率及び死亡率は、比較的高い感染率に実質的に因る。通常の間節において、インフルエンザは、300万~500万症例の重症の疾病を発症させることができ、世界規模での200,000~500,000の死亡と関連している(世界保健機構(2009年4月)インフルエンザ(季節性)ファクトシート211)。米国において、インフルエンザウイルスは、人口のおよそ10~15%に感染し(Glezen及びCouch RBの文献「1974~1976年のヒューストン地域における流行中間期インフルエンザ(Interpandemic Influenza in the Houston area, 1974-76)」(N Engl J Med 298: 587-592 (1978)); Foxらの文献「1975~1979年のシアトルの家庭におけるインフルエンザウイルス感染 II. 侵襲された世帯における感染のパターン、並びに年齢及び先行抗体と感染及び関連疾病の発症との関連性(Influenza virus infections in Seattle families 1975-1979. II. Pattern of infection in invaded households and relation of age and prior antibody to occurrence of infection and related illness)」(Am J Epidemiol 116: 228-242 (1982))、毎年およそ30,000の死亡症例と関係している(Thompson WWらの文献「米国におけるインフルエンザ及び呼吸器合胞体ウイルスと関係した死亡率(Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States)」(JAMA 289: 179-186 (2003)); Belshéの文献「

10

20

30

40

50

ワクチンに関する基礎臨床橋渡し研究：インフルエンザを一例として (Translational research on vaccines: Influenza as an example) (Clin Pharmacol Ther 82:745-749 (2007))。

【0006】

毎年の流行に加えて、インフルエンザウイルスはまれな大流行の原因である。例えば、インフルエンザA型ウイルスは、1918年、1957年、及び1968年に起こったものなどの大流行を引き起こすことができる。主要なウイルス抗原である血球凝集素 (HA) に対する予め形成された免疫を欠くために、大流行インフルエンザウイルスは単一年に50%を超える人口に罹患させることができ、しばしば季節性インフルエンザウイルスよりも重度の疾患を引き起こす。苛酷な例は1918年の大流行であり、そこでは概算5千万~1億人が死亡した (Johnson及びMuellerの文献「説明の更新：1918~1920年の「スペインの」インフルエンザ大流行に関する世界全体の死亡率 (Updating the Accounts; Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic)」 (Bulletin of the History of Medicine 76:105-115 (2002))。1990年代後期の高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスの出現以来 (Claasらの文献「高病原性鳥インフルエンザウイルスと関連したヒトインフルエンザA型H5N1ウイルス (Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian Influenza virus)」 (Lancet 351:472-7 (1998))、前記ウイルスが、ヒト間で伝染性であり得、大流行を生じ得るとの懸念がある。

10

【0007】

インフルエンザウイルス感染から保護する有効な方法は、ワクチン接種を通じてである；しかしながら、現在のワクチン接種手法は、循環している株とワクチン製剤に含まれる分離株との間で良好な一致を達成することに依存する。そのような一致は、因子の組み合わせのために、達成するのがしばしば困難である。第一に、インフルエンザウイルスは継続的に変化している：3~5年ごとに、インフルエンザA型ウイルスの優勢株は、既存の抗体応答を避けるために十分な抗原連続変異を経た変異株によって入れ替えられる。それゆえ、ワクチン製剤に含まれるべき分離株は、世界保健機構 (WHO) の共同研究センターの集中的な監視努力に基づいて毎年選択されなければならない。第二に、ワクチンの製造及び配布のために十分な時間を与えるために、株はインフルエンザの季節の開始のおよそ6ヶ月前に選択されなければならない。しばしば、ワクチン株選択委員会の予測は不正確であり、結果的に、ワクチン接種の効力のかかなりの低下をもたらす。

20

30

【0008】

インフルエンザA型ウイルスの新規サブタイプがヒト集団に入る可能性も、現在のワクチン接種戦略にかかなりの難題となっている。インフルエンザウイルスのどのサブタイプ及び株が次の大流行をもたらすかを予測することが不可能であるので、大流行インフルエンザワクチンを調製するために現在の株特異的手法を用いることができない。

【発明の概要】

【0009】

(3. 要旨)

インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法が本明細書に提供される。このようなモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス粒子におけるインフルエンザウイルス抗原、例えば、赤血球凝集素 (HA) に結合し得る。別の具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス粒子に結合する。別の具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、当前記技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、FACs、又はピアコアによって評価されるような非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原と比べて、インフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に選択的に結合する。換言すれば、前記モノクローナル抗体は、当前記技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、FACs、又はピアコアによって評価される非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原よりも高い親和性で、インフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に結合する。具体的な実施態様において、前記モ

40

50

ノクローナル抗体は、抗原的に異なるHAを発現する2以上の株のインフルエンザウイルスに結合しかつ中和する。別の実施態様において、前記モノクローナル抗体は、インフルエンザA型ウイルス赤血球凝集素(HA)サブタイプの2以上の株に結合しかつ中和する。別の実施態様において、前記モノクローナル抗体は、2以上のHAサブタイプの複数株のインフルエンザA型ウイルスに結合しかつ中和する。別の具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスのHA2領域の長いアルファヘリックスに結合する。

【0010】

一態様において、抗原的に異なるHAを発現するインフルエンザウイルスの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法が提供される。具体的な実施態様において、抗原的に異なるHAを発現するインフルエンザウイルスの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、2、3、4、又はそれより多くの免疫原性組成物を非ヒト対象に、各免疫原性組成物の一定時間離した投与を用いて投与すること、及び、抗原的に異なるHAを発現する2以上の株のインフルエンザウイルス(例えば、2以上の株のインフルエンザA型ウイルスサブタイプ、又は別個のインフルエンザA型サブタイプ由来の2以上の株)に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現する対象から、B細胞ハイブリドーマを作製することを含んでおり、この中で、各免疫原性組成物は、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス(例えば、天然のインフルエンザウイルス)、インフルエンザウイルスに由来し又はインフルエンザウイルスから得られた抗原を含んでおり、かつこの中で、1の免疫原性組成物は、別の免疫原性組成物とはインフルエンザウイルス、あるいは抗原若しくはその断片または抗原若しくはその断片をコードする核酸が、由来し又は得られるインフルエンザウイルスが、抗原的に異なるという点において異なる。具体的な実施態様において、前記方法は、抗原的に異なるHAを発現するインフルエンザウイルスの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するB細胞ハイブリドーマクローンを選択することを含む。特定の実施態様において、抗原的に異なるHAを発現する2以上の株のインフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株である。ある態様において、抗原的に異なるHAを発現する2以上の株のインフルエンザウイルスに結合するモノクローナル抗体を作製する方法を用いて、このような抗体を発現するハイブリドーマを作製することができる。

【0011】

一実施態様において、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i)非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii)第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、第二のインフルエンザウイルスは、第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；及び(iii)第二の時間の後、前記対象由来の、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するB細胞ハイブリドーマを作製することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法は、交差反応する中和するモノクローナル抗体をスクリーニングすることをさらに含む。具体的

な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプはH3である。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、2型インフルエンザウイルス（例えば、H4、H14、H3、H15、H7、又はH10サブタイプであるインフルエンザウイルス）である。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、1型インフルエンザウイルス（例えば、A/サウスカロライナ/1918年（H1）、A/ソ連/92/77（H1）、A/カリフォルニア/04/09（H1）、又はA/プリズベーン/59/07様（H1）などのH1サブタイプであるインフルエンザウイルス）である。

【0012】

別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) 非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii) 第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii) 第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(iv) 第三の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択する。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。他の実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和するモノクローナル抗体をスクリーニングする。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプはH3である。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、2型インフルエンザウイルス（例えば、H4、H14、H3、H15、H17、又はH10サブタイプであるインフルエンザウイルス）として特徴づけられる。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、1型インフルエンザウイルス（例えば、A/サウスカロライナ/1918（H1）、A/ソ連/92/77（H1）、A/カリフォルニア/04/09（H1）、又はA/プリズベーン/59/07様（H1）などのH1サブタイプであるインフルエンザウイルス）である。

【0013】

別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法であって、(i) 非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii) 第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス

10

20

30

40

50

ス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii) 第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iv) 第三の時間の後、前記対象に、第四の不活性型インフルエンザウイルス、第四の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第四の生インフルエンザウイルス、第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第四の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第四のインフルエンザウイルスが、前記第一の、前記第二の、及び前記第三のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(v) 第四の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和するモノクローナル抗体をスクリーニングすることを含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、2型インフルエンザウイルス(例えば、H4、H14、H3、H15、H17、又はH10サブタイプであるインフルエンザウイルス)として特徴づけられる。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプはH3である。具体的な実施態様において、第一のインフルエンザウイルスは、A/香港/1/1968であり、第二のインフルエンザウイルスは、A/アラバマ/1/1981であり、第三のインフルエンザウイルスは、A/北京/47/1992であり、及び第四のインフルエンザウイルスは、A/ワイオミング/3/2003である。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスは、1型インフルエンザウイルス(例えば、H1(H1a/H1b)又はH9サブタイプであるインフルエンザウイルス)である。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプはH1である。具体的な実施態様において、第一のインフルエンザウイルスは、A/サウスカロライナ/1918(H1)であり、第二のインフルエンザウイルスは、A/ソ連/92/77(H1)であり、第三のインフルエンザウイルスは、A/カリフォルニア/04/09(H1)であり、及び第四のインフルエンザウイルスは、A/プリズベーン/59/07様(H1)である。

【0014】

別の態様において、2以上のインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法が提供される。具体的な実施態様において、2以上のインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、2、3、4、又はそれより多くの免疫原性組成物を非ヒト対象に、一定時間離した各免疫原性組成物の投与で投与すること、及び2以上のインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現する、対照由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、この中で、各免疫原性組成物が、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス(例えば、天然のインフルエンザウイルス)、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含み、かつこの中で、1の免疫原性組成

10

20

30

40

50

物は、別の免疫原性組成物とは、前記インフルエンザウイルス、あるいは前記抗原若しくは前記抗原をコードする核酸が由来し又は得られるインフルエンザウイルスが、抗原的に異なるという点において異なる。いくつかの実施態様において、前記方法は、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。

【0015】

一実施態様において、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i)非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii)第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、第二のインフルエンザウイルスは、第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；及び(iii)第二の時間の後、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現する、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法は、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和するモノクローナル抗体をスクリーニングすることを含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプは、H1及びH3である。

【0016】

別の実施態様において、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i)非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii)第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(iii)第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前

10

20

30

40

50

記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに（iv）第三の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法は、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和モノクローナル抗体をスクリーニングすることを含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプは、H1及びH3である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

別の実施態様において、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、（i）非ヒト対象に、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；（ii）第一の時間の後、前記対象に、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；（iii）第二の時間の後、前記対象に、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；（iv）第三の時間の後、前記対象に、第四の不活性型インフルエンザウイルス、第四の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第四の生インフルエンザウイルス、第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHA、あるいは第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られるHAをコードする核酸を含む第四の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第四のインフルエンザウイルスが、前記第一の、前記第二の、及び前記第三のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに（v）第四の時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法は、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和モノクローナル抗体をスクリーニングすることを含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプは、H1及びH3である。

【 0 0 1 8 】

別の実施態様において、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) 非ヒト対象に、第一のHAサブタイプの第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一のHAサブタイプの第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一のHAサブタイプの第一の生インフルエンザウイルス、第一のHAサブタイプの第一のHAサブタイプの第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られるHA、あるいは第一のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第一のHAサブタイプのHAをコードする核酸を含む第一の免疫原性組成物を投与すること；(ii) 第一の時間の後、前記対象に、第二のHAサブタイプの第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二のHAサブタイプの第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二のHAサブタイプの第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来するか又はそれから得られる第二のHAサブタイプのHA、あるいは第二のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第二のHAサブタイプのHAをコードする核酸を含む第二の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii) 第二の時間の後、前記対象に、第三のHAサブタイプの第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三のHAサブタイプの第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三のHAサブタイプの第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第三のHAサブタイプのHA、あるいは第三のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第三のHAサブタイプのHAをコードする核酸を含む第三の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iv) 第三の時間の後、前記対象に、第四のHAサブタイプの第四の不活性型インフルエンザウイルス、第四のHAサブタイプの第四の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第四のHAサブタイプの第四の生インフルエンザウイルス、第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第四のHAサブタイプのHA、あるいは第四のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第四のHAサブタイプのHAをコードする核酸を含む第四の免疫原性組成物を投与し、この中で、前記第四のインフルエンザウイルスは、前記第一の、前記第二の、及び前記第三のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(v) 第四の時間の後、前記対象に、(a) 第五のHAサブタイプの第五の不活性型インフルエンザウイルス、第五のHAサブタイプの第五の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第五のHAサブタイプの第五の生インフルエンザウイルス、第五のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第五のHAサブタイプのHA、及び(b) 第六のHAサブタイプの第六の不活性型インフルエンザウイルス、第六のHAサブタイプの第六の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第六のHAサブタイプの第六の生インフルエンザウイルス、第六のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第六のHAサブタイプのHA、又は第六のインフルエンザウイルス若しくはその断片に由来し又はそれから得られる第六のHAサブタイプのHAをコードする核酸を含む第五の免疫原性組成物を投与し、この中で、第五のインフルエンザウイルスは、第一、第二、第三、及び第四のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なり、かつこの中で、第六のインフルエンザウイルスは、第一、第二、第三、第四、及び第五のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(vi) 前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつ2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、第一、第三、及び第五のHAサブタイプは同じであり(例えば、前記サブタイプはすべてH3サブタイプである。)、第二、第四、及び第六のHAサブタイプは同じである(例えば、前記サブタイプはすべてH1サブタイプである。)。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスサブタイプは、H1及びH3である。具体的な実施態様において、第一のインフルエンザ

10

20

30

40

50

ウイルスはA/香港/1/68(H3)であり、第二のインフルエンザウイルスはA/ソ連/92/77(H1)であり、第三のインフルエンザウイルスはA/カリフォルニア/1/88(H3)であり、第四のインフルエンザウイルスはA/カリフォルニア/04/09(H1)であり、第五のインフルエンザウイルスはA/プリズベーン/59/07様(H1)であり、第六のインフルエンザウイルスはA/プリズベーン/10/07様(H3)である。いくつかの実施態様において、第一、第二、第三、第四、第五、及び第六のHAサブタイプは、2、3、又はそれより多くの異なるサブタイプである。いくつかの実施態様において、前記方法は、2以上のHAサブタイプのインフルエンザA型ウイルスの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザA型ウイルスサブタイプの2以上の株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体を発現するハイブリドマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法はさらに、モノクローナル抗体を単離することを含む。いくつかの実施態様において、前記方法はさらに、交差反応する中和するモノクローナル抗体をスクリーニングすることを含む。

10

20

30

40

50

【0019】

ある実施態様において、本明細書に説明される方法において引用される非ヒト対象は、ヒト抗体を産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、トランスジェニックマウス)である。ヒト抗体を産生することのできるトランスジェニックマウスの例は、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)、Genpharm (San Jose, CA)、又はMedarex, Inc. (Princeton, NJ)から入手可能なものである。

【0020】

別の態様において、インフルエンザA型ウイルスの2以上の株に結合しかつ中和する単離された抗体(例えば、モノクローナル抗体及びその抗原結合断片)が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、前記株は、同じインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプに由来する。別の具体的な実施態様において、前記株は、異なるHAサブタイプに属するインフルエンザA型ウイルスである。ある実施態様において、このようなモノクローナル抗体はヒト化されている。

【0021】

具体的な実施態様において、抗体7A7、12D1、39A4、66A6又はそれらの断片(とくにそれらの抗原結合断片)が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変重鎖(VH)ドメインを含む、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変軽鎖(VL)ドメインを含む、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH及びVLドメインを含む、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の1、2、若しくは3のVH CDR及び/又は1、2、若しくは3のVL CDRを含む、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体が本明細書に提供される。ある実施態様において、抗体は、インフルエンザウイルスHAに結合するだけでなく、インフルエンザウイルスを中和する。

【0022】

また、本明細書に提供される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体をコードする核酸が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸は、抗体7A7、12D1、39A4、66A6、又はそれらの断片(特にそれらの抗原結合断片)をコードする。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードし、この中で、前記抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメインを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードし、この中で、前記抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメインを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードし、この中で、前記抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH及びVLドメイン

を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードし、この中で、前記抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の1、2、若しくは3のVH CDR及び/又は1、2、若しくは3のVL CDRを含む。ある実施態様において、前記核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合するだけでなく、インフルエンザウイルスを中和する抗体をコードする。

【0023】

別の態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるハイブリドーマが本明細書に提供される。一実施態様において、2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)によりブダペスト条約の規定の下で保管された、7A7と指定されたハイブリドーマ(ATCC受入番号PTA 10058)が本明細書に提供される。別の実施態様において、2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)によりブダペスト条約の規定の下で保管された、12D1と指定されたハイブリドーマ(ATCC受入番号PTA 10059)が本明細書に提供される。別の実施態様において、2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)によりブダペスト条約の規定の下で保管された、39A4と指定されたハイブリドーマ(ATCC受入番号PTA 10060)が本明細書に提供される。別の実施態様において、2010年5月25日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)により、ブダペスト条約の規定の下で保管された66A6と指定されたハイブリドーマ(ATCC受入番号PTA _____)が本明細書に提供される。

10

20

【0024】

別の態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるハイブリドーマによって産生される単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、抗体7A7、12D1、又は39A4である。ある実施態様において、このようなモノクローナル抗体はヒト化されている。

【0025】

別の態様において、配列番号1の配列に結合し、かつインフルエンザA型ウイルスHAサブタイプの2以上の株を中和する、単離された抗体が本明細書に提供される。別の態様において、本明細書に説明される抗体を含む組成物及びキットが本明細書に提供される。具体的な実施態様において、このような組成物は、患者への投与に好適な医薬組成物である。

30

【0026】

別の態様において、対象に、本明細書に説明される抗体又はその医薬組成物を投与することを含む、インフルエンザウイルス疾患を予防及び/又は治療する方法が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、対象に、本明細書に説明される抗体又はその医薬組成物を投与することを含む、インフルエンザウイルス感染を予防及び/又は治療する方法が本明細書に提供される。

【0027】

別の態様において、本明細書に説明される抗体を用いて、インフルエンザウイルスを検出する方法、又は対象におけるインフルエンザウイルス感染を検出、診断、若しくはモニターする方法が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株を検出する方法は、(a)抗体を用いて対象の細胞又は組織試料におけるインフルエンザウイルスHAのレベルをアッセイすること；及び(b)(a)においてアッセイされたインフルエンザウイルスHAのレベルを、インフルエンザウイルスに感染していない細胞又は組織試料におけるインフルエンザウイルスHAのレベル(例えば、対照レベル)と比較することを含み、この中で、インフルエンザウイルス抗原の対照レベルと比較したインフルエンザウイルスHAのアッセイされたレベルの増大は、インフルエンザA型ウイルスの株の存在を示す。具体的な実施態様において、検出されたインフルエンザA型ウイルスの株は、H3サブタイプに属する。具体的な実施態様において、検出されたインフルエンザA型ウイルスの株は、A/香港/1/1968、A/アラバマ/1/1981、A/北京/47/1992、又

40

50

はA / ワイオミング / 3 / 2003である。

【 0 0 2 8 】

(3 . 1 用語)

本明細書で使用する場合、用語「約」又は「およそ」は、数と共に使用する場合、引用される数の0.25%、0.5%、1%、5%、又は10%内の任意の数を指す。用語「約」又は「およそ」は、アミノ酸の位置に対する引用で使用する場合、N末端方向又はC末端方向のいずれかにおける、配列における特定のアミノ酸位置又は、アミノ酸位置の5、4、3、2、若しくは1の残基内である任意のアミノ酸を指す。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用する場合、用語「投与する」又は「投与」は、物質が身体の外側に存在する場合に、経粘膜、皮内、静脈内、筋肉内送達及び / 又は本明細書に説明される身体的送達若しくは当該技術分野で公知の身体的送達に関する任意の他の方法などによって、物質を注射し又はそれに代わるものとして身体的に送達する作用を指す。疾患又はその症状が治療されている途中である場合、物質の投与は典型的には、疾患又はその症状の発症後に生じる。疾患又はその症状が予防されている途中である場合、物質の投与は典型的には、疾患又はその症状の発症の前に生じる。

10

【 0 0 3 0 】

本明細書に包含される抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、多特異性抗体（二重特異性抗体を含む。）ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内抗体、一本鎖Fv (scFv)（例えば、単一特異性、二重特異性などを含む。）ラクダ化抗体、Fa b断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、抗イデオタイプ（抗Id）抗体、及び先の任意のエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない。特に本明細書に包含される抗体には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のある部分、すなわちインフルエンザウイルス抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む抗原結合ドメイン又は抗原結合分子（例えば、抗インフルエンザウイルス抗体の1以上の相補性決定領域（CDR））を含む。本明細書に包含される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、任意のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG2a及びIgG2b）であり得る。

20

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用する場合、対象への療法を投与する脈絡における用語「有効量」は、予防効果及び / 又は治療効果を有する療法の量を指す。ある実施態様において、対象への療法の投与の文脈における用語「有効量」は、以下の効果の1、2、3、4、又はそれより多くを達成するのに十分な療法の量を指す：(i) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の重症度の低下若しくは寛解；(ii) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の期間の短縮；(iii) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の進行の予防；(iv) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の退行；(v) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の発達若しくは発症の予防；(vi) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、若しくはそれらと関連した症状の再発の予防；(vii) 1つの細胞から別の細胞への、1つの組織から別の組織への、若しくは1つの臓器から別の臓器へのインフルエンザウイルスの伝播の低下若しくは予防；(viii) 1つの対象から別の対象へのインフルエンザウイルスの伝播 / 伝染の予防若しくは低下；(ix) インフルエンザウイルス感染若しくはインフルエンザウイルス疾患と関連した臓器不全の低下；(x) 対象の入院の短縮；(xi) 入院の長さの短縮；(xii) インフルエンザウイルス感染若しくはそれと関連した疾患を有する対象の生存の増大；(xiii) インフルエンザウイルス感染若しくはそれと関連した疾患の除去；(xiv) インフルエンザウイルス複製の阻害若しくは低下；(xv) 宿主細胞へのインフル

30

40

50

エンザウイルスの侵入の阻害若しくは低下；(xvii) インフルエンザウイルスゲノムの複製の阻害若しくは低下；(xviii) インフルエンザウイルスタンパク質の合成の阻害若しくは低下；(xix) インフルエンザウイルス粒子の集合の阻害若しくは低下；(xx) 宿主細胞からのインフルエンザウイルス粒子の放出の阻害若しくは低下；(xxi) インフルエンザウイルス力価の低下；(xxii) インフルエンザウイルス感染若しくはインフルエンザウイルス疾患と関連した症状の数の減少；(xxiii) 別の療法の予防効果若しくは治療効果の増強、改良、補充、相補、若しくは強化；(xxiv) インフルエンザウイルス感染と関連した二次感染の発症若しくは進行の予防；及び/又は(xxxv) インフルエンザウイルス感染に対して二次的に生じる細菌性肺炎の、発症の予防、若しくは疾患重症度の減退。いくつかの実施態様において、療法の「有効量」は、有益な効果を有するが、インフルエンザウイルス感染又はそれと関連した疾患を治癒しない。ある実施態様において、療法の「有効量」は、予防効果及び/又は治療効果を有する療法の量を達成するための、ある頻度での複数用量の療法の投与を包含し得る。他の状況において、療法の「有効量」は、ある量での単一用量の療法の投与を包含し得る。有効量の例示的な用量は、後掲の第5.5.2節に提供される。

10

20

30

40

50

【0032】

ある実施態様において、有効量は、インフルエンザウイルス疾患からの完全な保護を結果として生じないが、治療されていない対象と比較して、インフルエンザウイルスのより低い力価又は減少した数を結果として生じる。ある実施態様において、有効量は、治療されていない対象と比較して、インフルエンザウイルスの力価の0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍、又は1,000倍、又はそれより大きな低下を結果的に生じる。いくつかの実施態様において、有効量は、およそ1 log以上、およそ2 log以上、およそ3 log以上、およそ4 log以上、およそ5 log以上、およそ6 log以上、およそ7 log以上、およそ8 log以上、およそ9 log以上、およそ10 log以上、1~5 log、2~10 log、2~5 log、又は2~10 logの、治療されていない対象に対するインフルエンザウイルスの力価の低下を結果的に生じる。インフルエンザウイルスの力価、数、又は全負荷量の低下に関する利点には、より軽症な感染症状、より少数の感染症状、感染と関連した疾患の長さの短縮、及びインフルエンザウイルス感染に対して二次的に生じる細菌性肺炎の疾患重症度の発症の予防又は減退を含むが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用する場合、用語「断片」は、親配列由来の少なくとも2の保存的なアミノ酸又はヌクレオチドを含む配列を指す。具体的な実施態様において、前記用語「断片」は、親配列由来の2~10、2~15、2~30、5~30、10~60、25~50、25~100、100~175、150~250、150~300又はそれより多くの保存的なアミノ酸又はヌクレオチドを指す。

【0034】

本明細書で使用する場合、用語「赤血球凝集素」及び「HA」は、当業者に公知の任意のインフルエンザ赤血球凝集素を指す。ある実施態様において、赤血球凝集素は、インフルエンザA型赤血球凝集素、インフルエンザB型赤血球凝集素、又はインフルエンザC型赤血球凝集素などのインフルエンザ赤血球凝集素である。典型的な赤血球凝集素は、シグナルペプチド、ステムドメイン、球状ヘッドドメイン、内腔ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む、当業者に公知のドメインを含む。ある実施態様において、赤血球凝集素は、HA0など、単一ポリペプチド鎖からなる。ある実施態様において、赤血球凝集素は、例えば、第四級結合(quaternary association)における2以上のポリペプチド鎖、例えばHA1及びHA2からなる。ある実施態様において、赤血球凝集素は、赤血球凝集素単量体(HA0又はHA1/HA2)からなる。ある実施態様において、赤血球凝集素は、それがウイルス表面に発現する場合、三量体赤血球凝集素分子からなる。当業者は、未成熟のHA0が、切断されて、シグナルペプチド(およそ20のアミノ酸)を放出して、成熟赤血球凝集素HA0を生じ得ることを認めるであろう。赤血球凝集素HA0は、別の部位で切断され、HA1ポリペプチド(およそ320のアミノ酸で、球状ヘッドドメイン及び、ステムドメインの一

部を含む。)及びHA2ポリペプチド(およそ220のアミノ酸であり、ステムドメインの残り、内腔ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む。)を生じ得る。ある実施態様において、赤血球凝集素は、シグナルペプチド、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを含む。ある実施態様において、赤血球凝集素はシグナルペプチドを欠失し、すなわち、赤血球凝集素は成熟赤血球凝集素である。ある実施態様において、赤血球凝集素は、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメイン、又はその両方を欠失する。本明細書で使用する場合、用語「赤血球凝集素」及び「HA」は、シグナルペプチド切断、ジスルフィド結合形成、グリコシル化(例えば、N連結型グリコシル化)、プロテアーゼ切断、及び脂質修飾(例えば、S-パルミトイル化)などの翻訳後プロセッシングによって修飾された赤血球凝集素ポリペプチドを包含する。

10

【0035】

本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」は、任意の種類、例えば、初代細胞、又は細胞株由来の細胞を指す。具体的な実施態様において、用語「宿主細胞」は、核酸分子をトランスフェクトした細胞、及びこのような細胞の後代又は潜在的後代を指す。このような細胞の後代は、続いて生じる世代で生じ得る突然変異若しくは環境の影響、又は核酸分子の宿主細胞ゲノムへの組み込みにより、核酸分子をトランスフェクトした親細胞と同一でなくてよい。

【0036】

本明細書で使用する場合、用語「感染」は、細胞又は対象におけるウイルスによる侵入、その増殖及び/又は存在を意味する。一実施態様において、感染は「活性」感染、すなわちウイルスが細胞又は対象において複製しているものである。このような感染は、ウイルスによって最初に感染する細胞、組織、及び/又は臓器からの、他の細胞、組織、及び/又は臓器へのウイルスの伝播を特徴とする。また、感染は、潜伏性の感染、すなわちウイルスが複製していないものであってもよい。ある実施態様において、感染は、細胞又は対象におけるウイルスの存在から結果的に生じる、あるいはウイルスによる細胞又は対象への侵入による病理学的状態を指す。ある実施態様において、感染は、結果的に病理学的状態を有しない、細胞又は対象におけるウイルスの存在、あるいはウイルスによる細胞又は対象の侵入を指す。

20

【0037】

本明細書で使用する場合、用語「インフルエンザウイルス抗原」は、インフルエンザウイルスから得られ又はそれに由来する任意の抗原を指す。具体的な実施態様において、抗原は、インフルエンザウイルス又はその断片によって発現するタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドである。別の具体的な実施態様において、抗原は、インフルエンザウイルス粒子又はその断片の表面に見出されるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドである(例えば、赤血球凝集素若しくはその断片、又はノイラミニダーゼ若しくはその断片)。好ましい実施態様において、抗原は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素又はその断片である。

30

【0038】

本明細書で使用する場合、用語「インフルエンザウイルス疾患」及びインフルエンザウイルス感染と関連した疾患は、細胞若しくは対象におけるインフルエンザウイルス(例えば、インフルエンザA型又はB型ウイルス)の存在から、又はインフルエンザウイルスによる細胞若しくは対象の侵入から結果的に生じる病理学的状態を指す。具体的な実施態様において、前記用語は、インフルエンザウイルスによって生じる呼吸器疾病を指す。

40

【0039】

用語「Kabat番号付け」及び類似の用語は、当該技術分野で認識されており、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域他のアミノ酸残基よりも可変性である(すなわち高頻度可変性である)アミノ酸残基、又はその抗原結合部分を番号付けするシステムを指す(Kabatらの文献(Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391(1971))及びKabatらの文献「免疫学的関心対象のタンパク質の配列第5版(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」(U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)

50

)。重鎖可変領域について、高頻度可変性領域は典型的には、CDR1についてはアミノ酸位置31～35、CDR2についてはアミノ酸位置50～65、及びCDR3についてはアミノ酸位置95～102で変動する。軽鎖可変領域については、高頻度可変性領域は典型的には、CDR1についてはアミノ酸位置24～34、CDR2についてはアミノ酸位置50～56、及びCDR3についてはアミノ酸位置89～97で変動する。

【0040】

「単離された」又は「精製された」タンパク質（例えば、抗体）は、タンパク質の由来する細胞若しくは組織源から細胞材料若しくは他の混入タンパク質が実質的になく、又は化学的に合成される場合、化学物質前駆体若しくは他の化学物質が実質的にない。言語「細胞材料が実質的にない」には、タンパク質がそこから単離され又は組換え生成される細胞の細胞内構成要素からタンパク質が分離される、タンパク質の調製物（例えば、抗体）を含む。このように、細胞材料を実質的に含まないタンパク質（例えば、抗体）には、約30乾燥重量%未満、20乾燥重量%未満、10乾燥重量%未満、又は5乾燥重量%未満の異種性タンパク質（本明細書で「混入タンパク質」とも呼ばれる。）を有するタンパク質の調製物を含む。タンパク質が組換え生成される場合、前記タンパク質は好ましくは、培地を実質的に含まず、すなわち、培地は、タンパク質調製物の容積の約20%未満、10%未満、又は5%未満を表す。タンパク質が、化学合成によって生成される場合、タンパク質は好ましくは、化学物質前駆体又は他の化学物質を実質的に含まず、すなわちタンパク質は、タンパク質の合成に關与する化学物質前駆体又は他の化学物質から分離される。したがって、タンパク質のこのような調製は、関心対象のタンパク質以外の化学物質前駆体又は化合物の約30乾燥重量%未満、20乾燥重量%未満、10乾燥重量%未満、5乾燥重量%未満を有する。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原は精製される。別の具体的な実施態様において、本明細書に包含される抗体は精製される。

【0041】

本明細書で使用する場合、数的用語「log」は、「log₁₀」を指す。

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「管理する」、「管理すること」、及び「管理」は、関連する感染又は疾患の治癒を結果として生じない療法（例えば、予防薬又は治療薬）から対象が得る有益な効果を指す。ある実施態様において、対象は、インフルエンザウイルス疾患又はその1以上の症状を「管理する」ために1以上の療法（例えば、本明細書に包含される抗体などの予防薬又は治療薬）を投与され、それにより疾患の進行又は悪化を予防する。

【0043】

本明細書で使用する場合、用語「核酸」及び「ヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、リボヌクレオチド、及びリボ核酸、並びにそれらの多形を指し、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態を含む。ある実施態様において、このような用語には、天然のヌクレオチドの公知のアナログ、基準（reference）核酸と類似の結合特性を有するペプチド核酸（「PNA」）を含む。いくつかの実施態様において、核酸は、デオキシリボ核酸（例えば、cDNA又はDNA）を指す。他の実施態様において、核酸は、リボ核酸（例えば、mRNA又はRNA）を指す。

【0044】

本明細書で使用する場合、インフルエンザウイルス疾患を予防するための対象への療法（複数可）の投与との関連で用語「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、療法又は療法の組み合わせの投与から生じる以下の効果の1以上を指す：(i) インフルエンザウイルス疾患又はその症状（例えば、発熱、筋肉痛、浮腫、炎症性浸潤）の発達又は発症の阻害又は低下；(ii) インフルエンザウイルス疾患又はそれに付随する症状の再発の阻害又は低下；及び(iii) インフルエンザウイルスの感染及び/又は複製の減少又は阻害。

【0045】

本明細書で使用する場合、インフルエンザウイルス感染を予防するための、対象への療

10

20

30

40

50

法（複数可）の投与の脈絡における用語「予防する」、「予防すること」、及び「予防」は、以下のうちの1以上を指す：(i) 1つの細胞から別の細胞へのインフルエンザウイルスの伝播の低下若しくは阻害；(ii) 1つの臓器若しくは組織から別の臓器若しくは組織へのインフルエンザウイルスの伝播の低下若しくは阻害；(iii) 臓器若しくは組織の1つの領域から前記臓器若しくは組織の別の領域へのインフルエンザウイルスの伝播の低下若しくは阻害（例えば、上気道から下気道へのインフルエンザウイルスの伝播の低下）；(iv) インフルエンザウイルスへの曝露後の初期感染の予防；及び/又は(v) インフルエンザウイルス疾患若しくは感染と関係した1以上の症状の発症若しくは発達の予防。

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「対象」及び「患者」は、動物(鳥類、爬虫類、及び哺乳類)を指すために互換的に用いられる。具体的な実施態様において、対象は鳥類である。別の実施態様において、対象は、非霊長類（例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット、及びマウス）、及び霊長類（例えば、サル、チンパンジー、及びヒト）を含む哺乳類である。別の実施態様において、対象はヒトである。別の実施態様において、対象はヒト乳児である。別の実施態様において、対象は、ヒト子供である。別の実施態様において、対象はヒト成人である。別の実施態様において、対象はヒト高齢者である。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト乳児」は、新生児から1歳までのヒトを指す。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト子供」は、1歳から18歳までのヒトを指す。

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト幼児」は、1歳から3歳までのヒトを指す。

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト成人」は、18歳以上のヒトを指す。

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト高齢者」は、65歳以上のヒトを指す。

【0052】

本明細書で使用する場合、用語「療法（複数）」及び「療法」は、ウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の予防又は治療において用いることのできる任意のプロトコール（複数可）、方法（複数可）、化合物（複数可）、組成物（複数可）、製剤（複数可）、及び/又は薬剤（複数可）を指すことができる。ある実施態様において、用語「療法（複数）」及び「療法」は、当業者に公知であるウイルス感染又はそれに付随する疾患若しくは症状の予防又は治療において用いることのできる、生物学的療法、支持療法及び/又は他の療法を指す。一部の実施態様では、用語「療法」は、赤血球凝集素3（「H3」）サブタイプのインフルエンザウイルスを結合する抗体を指す。他の実施態様において、用語「療法」は、免疫原性組成物（例えば、インフルエンザウイルスワクチン）を指す。

【0053】

本明細書で使用する場合、対象への療法（複数可）の投与との脈絡における用語「治療する」、「治療」及び「治療すること」は、療法又は療法の組み合わせの有益な又は治療的な効果を指す。具体的な実施態様では、このような用語は、療法又は療法の組み合わせの投与から生じる以下の効果のうち1、2、3、4、5、又はそれより多くを指す：(i) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらに付随する症状の重症度の低減又は寛解；(ii) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらに付随する症状の持続期間の短縮；(iii) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらに付随する症状の進行の予防；(iv) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれに付随する症状の退行；(v) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらに付随する症状の発達又は発症の予防；(vi) インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルス疾患、又はそれらに付随する症状の再発の予防；(vii) 1つの細胞から別の細胞への

10

20

30

40

50

、1つの組織から別の組織への、又は1つの臓器から別の臓器へのインフルエンザウイルスの伝播の低下又は予防；(viii)1個体の対象から別の対象へのインフルエンザウイルスの伝播/伝染の予防又は低下；(ix)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に付随する臓器不全の低下；(x)対象の入院の減少；(xi)入院期間の短縮；(xii)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患を有する対象の生存の増加；(xiii)インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患の除去；(xiv)インフルエンザウイルス複製の阻害又は低減；(xv)宿主細胞(複数可)へのインフルエンザウイルスの宿主細胞の侵入の阻害又は低減；(xvi)宿主細胞(複数可)へのインフルエンザウイルスの侵入の阻害又は低減；(xvii)インフルエンザウイルスゲノムの複製の阻害又は低減；(xviii)インフルエンザウイルスタンパク質の合成の阻害又は低減；(xix)インフルエンザウイルス粒子の集合の阻害又は低下；(xx)宿主細胞(複数可)からのインフルエンザウイルス粒子の放出の阻害又は低減；(xxi)インフルエンザウイルスの力価の低下；(xxii)インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患に付随する症状の数の低減；(xxiii)別の療法の予防効果(複数可)又は治療効果(複数可)の増強、改良、補充、相補、若しくは強化；(xxiv)インフルエンザウイルス感染に付随する二次感染の発症又は進行の予防；並びに/あるいは(xxv)インフルエンザウイルス感染に対して二次的に生じる細菌性肺炎の発症の予防又は疾患重症度の減退。

10

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】抗インフルエンザウイルス抗体の特徴。(A)モノクローナル抗体7A7及び39A4は、ELISAによって測定されるように、インフルエンザウイルスA/香港/1/1968赤血球凝集素と反応し；及びモノクローナル抗体12D1は、ウェスタンブロット法によって測定されるようにA/香港/1/1968赤血球凝集素と反応する。(B)モノクローナル抗体12D1は、ウェスタンブロット法によって測定されるように、HA2領域におけるインフルエンザウイルス株A/パナマ/2007/1999(H3)の赤血球凝集素を結合する。(C)モノクローナル抗体7A7は、ELISAによって測定されるように、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968、A/パナマ/2007/1999、及びA/ウィスコンシン/67/2005を結合する。(D)モノクローナル抗体39A4は、ELISAによって測定されるように、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968、A/パナマ/2007/1999、及びA/ウィスコンシン/67/2005を結合する。

20

【0055】

【図2】モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4によるインフルエンザウイルス株の中和。(A)モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、微量中和(microneutralization)アッセイによって測定されるように、インフルエンザウイルス株A/香港/1968(H3)を中和する。IgGは、アイソタイプ対照抗体を表し；XY102は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)に特異的なモノクローナル抗体を表す。(B)モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、微量中和アッセイによって測定されるように、インフルエンザウイルス株A/パナマ/2007/1999(H3)を中和する。IgGは、アイソタイプ対照抗体を表し；XY102は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)に特異的なモノクローナル抗体を表す。

30

【0056】

【図3】モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、インフルエンザウイルスH3株を特異的に中和する。(A)プラーク減少アッセイによって測定されるようなモノクローナル抗体7A7による中和。(B)プラーク減少アッセイによって測定されるようなモノクローナル抗体12D1による中和。(C)プラーク減少アッセイによって測定されるようなモノクローナル抗体39A4による中和。(A~C)A/香港/1/1968(H3)、レーン1；A/北京/47/1992(H3)、レーン2；A/パナマ/2007/1999(H3)、レーン3；A/プリズベーン/10/2007(H3)、レーン4；A/ニューカレドニア/20/1999(H1)、レーン5；A/DK/1964(H4)、レーン6；A/TKY/1963(H7)、レーン7。

40

【0057】

【図4】モノクローナル抗体7A7及び12D1は、赤血球融合アッセイによって測定されるよ

50

うな、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)赤血球凝集素の低pHでの融合を阻害する。モノクローナル抗体1A7(IgG)は、インフルエンザA型ウイルスタンパク質NS1に特異的であり、ウイルス融合に影響しない。

【0058】

【図5】インフルエンザウイルス株X31による負荷の1時間前にモノクローナル抗体12D1を注射されたマウスは、PBS単独を注射されたマウスよりも長く生存する。X31は、A/PR/8背景におけるA/香港/1/1968(H3N2)由来の赤血球凝集素タンパク質及びノイラミニダーゼタンパク質を発現するキメラウイルスである(マウス適応型H1N1ウイルス)。

【0059】

【図6】Suiらの文献(Nat. Struct. Mol. Biol. 16(3):265-273, 2009)由来のインフルエンザウイルスHAサブタイプ間の系統学的関連性。

10

【0060】

【図7】モノクローナル抗体12D1及び39A4の受動転移は、抗体よりもむしろPBSを投与したマウスと比較して、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)で負荷したマウスにおける減少した体重減少を生じた。

【0061】

【図8】核酸コンストラクトによってコードされる融合タンパク質の図：緑色蛍光タンパク質に融合された赤血球凝集素切断突然変異体。

【0062】

【図9】インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素タンパク質の断片に結合するモノクローナル抗体12D1の能力を評価するウェスタンブロット。

20

【0063】

【図10】モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、ウェスタンブロット法によってH3赤血球凝集素と反応する。(A)モノクローナル抗体12D1は、HA2サブユニット内でA/パナマ/2007/1999赤血球凝集素を結合する。モノクローナル抗体7A7及び39A4は、還元条件下で赤血球凝集素と反応しない。(B)モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、非還元条件下でA/香港/1/1968赤血球凝集素と反応する。モノクローナル抗体7A7(レーン1)及び39A4(レーン3)は、HA三量体複合体を結合する。モノクローナル抗体12D1(レーン2)は、HA三量体複合体及びHA0を結合する。

【0064】

【図11】ELISAによる抗H3モノクローナル抗体の反応性。(A)モノクローナル抗体7A7及び39A4は、精製されたA/香港/1968(H3)ウイルスと反応する。(B)モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、精製されたA/アラバマ/1981(H3)ウイルスと反応する。モノクローナル抗体XY102は、A/香港/1968ウイルスの赤血球凝集素に特異的である。

30

【0065】

【図12】微量中和アッセイにおける抗H3モノクローナル抗体。モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4による(A)A/香港/1/1968ウイルス又は(B)A/パナマ/2007/1999ウイルスのいずれかに由来するHAを発現するウイルスの中和。モノクローナル抗体XY102は、A/HK/1968ウイルスに特異的である。精製されたマウスIgGは、ネガティブコントロールに用いた。

40

【0066】

【図13】MDCK細胞に関するプラーク減少アッセイにおける抗H3モノクローナル抗体の活性。モノクローナル抗体7A7(A)、12D1(B)、及び39A4(C)は、プラーク減少アッセイによって試験されたすべてのH3ウイルスを中和するが、代表するH1ウイルス、H4ウイルス、又はH7ウイルスを中和しない。精製されたマウスIgGをネガティブコントロールに用いた。プラーク減少アッセイを、複数回、かつ新たな各抗体調製物を用いて実施した。

【0067】

【図14】抗H3モノクローナル抗体は、H3ウイルスからインビボで保護する。マウスに、X31の負荷の1時間前、24時間後(12D1のみ)、又は48時間後(12D1のみ)の腹腔内注射によって、30mg/kgのモノクローナル抗体7A7、12F1、39A4、又はアイソタイプ対照を与え

50

た。1群あたりN=5である。

【0068】

【図15】抗H3モノクローナル抗体を用いた治療は、X31ウイルスによって生じたウイルス性肺炎に付随した肺の損傷を減退させる。(A、B)未処理(C、D)モノクローナル抗体39A4で処理したマウス(E、F)モノクローナル抗体12D1で処理したマウス。40倍倍率。

【0069】

【図16】抗H3モノクローナル抗体は、肺におけるH3ウイルスの複製から保護する。マウスに、A/ジョージア/1981ウイルスによる感染の1時間前に腹腔内注射によって30mg/kgモノクローナル抗体12D1、39A4、又はアイソタイプ対照を与えた。データは、感染2日後の5個体のマウスの群由来の肺の力価を表す。

10

【0070】

【図17】赤血球細胞融合アッセイ。抗H3モノクローナル抗体は、香港/68赤血球凝集素とニワトリ赤血球との低pH誘導性融合を阻害する。モノクローナル抗体はすべて、赤血球凝集素阻害活性について陰性である。モノクローナル抗体1A7は、インフルエンザウイルスNS1タンパク質に特異的である。

【0071】

【図18】モノクローナル抗体12D1は、ウェスタンブロットによって、赤血球凝集素切断突然変異体と反応する。12D1は、アミノ酸30~106の領域におけるHA2サブユニットとの優勢な接触をする(H3番号付け(例えば、Wilsonらの文献(Nature 1981; 289(5796): 366-73))。HA2 106~184切断物との結合を失うとともに、HA2 76~184及びHA2 91~184切断物におけるGFP発現の減退しない、減退した12D1結合は、結合エピトープがアミノ酸HA2 76~106由来の領域にあることを示唆する。これらの30のアミノ酸は、HA2の長いアルファヘリックスの膜遠位半分内に収まる。

20

【0072】

【図19】抗体7A7のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

【0073】

【図20】抗体7A7のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

【0074】

【図21】抗体12D1のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

30

【0075】

【図22】抗体12D1のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

【0076】

【図23】ELISAによるモノクローナル抗体66A6の反応性。(A)モノクローナル抗体66A6は、精製されたA/香港/1968(H3)ウイルスと反応する。(B)モノクローナル抗体66A6は、精製されたA/パナマ/2007/1999(H3)ウイルスと反応する。(C)モノクローナル抗体66A6は、精製されたA/プリズベーン/10/2007(H3)ウイルスと反応する。

40

【0077】

【図24】赤血球融合アッセイ。モノクローナル抗体66A6は、精製されたA/香港/1968(H3)ウイルスに対する赤血球凝集後阻害活性について陰性である。モノクローナル抗体XY102は、A/香港/1968ウイルスに特異的である。

【0078】

【図25】モノクローナル抗体66A6は、ウェスタンブロット法によってA/香港/1968(H3)ウイルスの赤血球凝集素タンパク質と反応するが、非H3ウイルス又は組換え発現した非H3赤血球凝集素と反応しない。

【0079】

【図26】MDCK細胞に関するブランク減少アッセイにおけるモノクローナル抗体66A6の活

50

性。モノクローナル抗体66A6は、ブランク減少アッセイによって、A/パナマ/2007/1999(H3)インフルエンザウイルス及びA/アラバマ/1/1981(H3)インフルエンザウイルスを中和する。

【0080】

【図27】モノクローナル抗体66A6の受動転移は、抗体よりもむしろPBSを投与したマウスと比較して、インフルエンザX31ウイルスを付加したマウスにおいて低い体重減少を生じる。「M」は、マウスを表す。

【0081】

【図28】抗体66A6のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

【0082】

【図29】抗体66A6のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列。フレームワーク領域を太字で示す。相補性決定領域に下線を付す。

【0083】

【図30】交差反応性抗H1/H3抗体についての免疫化戦略。

【0084】

【図31】抗体1、2、及び3は、免疫蛍光によって、3のH1N1ウイルス、すなわちA/ソ連/77(H1)、A/テキサス/91(H1)、及びA/カリフォルニア/09(H1)の赤血球凝集素タンパク質を認識する。抗体4は、免疫蛍光によって、2のH3N2ウイルス、すなわちA/香港/1968(H3)ウイルス及びA/ニューヨーク/08(H3)ウイルスの赤血球凝集素タンパク質を認識する。

【0085】

【図32】抗体1、3、及び4についてのウェスタンブロット法の結果：抗体1及び3は、変性条件及び還元条件下で赤血球凝集素タンパク質を認識しない。抗体4は、変性条件及び還元条件下でH3ウイルスの赤血球凝集素タンパク質を認識する。

【0086】

【図33】交差反応性抗H1抗体についての免疫化戦略。

【0087】

【図34】ELISAによる交差反応性抗H1抗体についての免疫化戦略を用いて作製した1つのハイブリドーマからの潜在的なクローンの反応性。

【発明を実施するための形態】

【0088】

(5. 詳細な説明)

(5.1 抗体の作製)

インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法が本明細書に提供される。このようなモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス粒子上のインフルエンザウイルス抗原、例えば赤血球凝集素に結合し得る。具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス粒子に結合する。別の具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタンブロット法、FACs、又はピアコアによって評価されるように、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原に対するインフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に選択的に結合する。換言すれば、モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタンブロット法、FACs、又はピアコアによって評価されるように、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素タンパク質よりも高い親和性で、インフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に結合する。

【0089】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合する、本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスの株(複数可)を中和する。別の具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合

10

20

30

40

50

し、本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、当業者に公知のアッセイ、例えば、赤血球凝集反応阻害アッセイによって測定されるように、インフルエンザウイルスの抗原的に別個の株を中和する（すなわち、交差反応する中和するモノクローナル抗体）。インフルエンザウイルスの抗原的に別個の株は、赤血球凝集素及び/又はノイラミニダーゼのサブタイプ間の系統学的関連性によって決定されるように、同じサブタイプ又は異なるサブタイプであり得る。例えば、本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じインフルエンザウイルス赤血球凝集素サブタイプの2、3、又はそれより多くの株を中和し得る（例えば、H3サブタイプ）。加えて、本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、異なるインフルエンザウイルス赤血球凝集素サブタイプの株を中和し得（例えば、H1サブタイプ及びH3サブタイプのインフルエンザウイルス株）、又は1、2、若しくはそれより多くのクラスターのインフルエンザウイルス赤血球凝集素サブタイプを中和し得る。本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスの宿主細胞への結合を阻害若しくは低減させること；及び/又はインフルエンザウイルスと宿主細胞との融合を阻害若しくは低減させることの結果としてインフルエンザウイルスを中和し得る。

10

【0090】

具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスのH3サブタイプのHA0ポリペプチドに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドの330～513、359～513、360～513、375～513、390～513、及び/又は405～513の範囲内のアミノ酸残基に結合する。別の実施態様において、本明細書に説明された方法に従って作製されたモノクローナル抗体は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドの1～184、16～184、30～184、31～184、46～184、61～184、70～110、76～106、及び/又は76～184の範囲内のアミノ酸残基に結合する（古典的なH3サブタイプ番号付けシステムについては、Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DCの文献「3A解像におけるインフルエンザウイルスの赤血球凝集素膜糖タンパク質の構造（Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution）」（Nature 289: 366-373 (1981)）参照）。

20

【0091】

具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域に結合する（A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸配列についてのGenbank受入番号AAK51718参照）。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルスのHA2の長いアルファヘリックスに結合する（例えば、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチド）。具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの長いアルファヘリックスに結合し（すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたアミノ酸76～130）、すなわち、前記抗体は、以下のアミノ酸配列内のエピトープに結合する：

30

【化1】

RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA

(配列番号125)

。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの304～513、330～513、345～513、360～513、375～513、390～513、及び/又は405～513の範囲内のアミノ酸残基に結合する。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスのH3サブタイプのHA0ポリペプチドに従って番号付けされるインフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの330～513、359～513、360～513、375～

40

50

513、390～513、及び／又は405～513の範囲内のアミノ酸残基に結合する。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたインフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドの1～184、16～184、30～184、31～184、46～184、61～184、70～110、76～106、及び／又は76～184の範囲内のアミノ酸残基に結合する（古典的なH3サブタイプ番号付けシステムについては、Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DCの文献「3A解像におけるインフルエンザウイルスの赤血球凝集素膜糖タンパク質の構造（Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution）」（Nature 289：366-373（1981））参照）。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸405～513内に位置するA／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドにおけるエピトープに結合し、すなわち、前記抗体は、以下のアミノ酸配列内のエピトープを結合する：

【化2】

RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN AELLVALENQ HTIDLTDSEM

NKLFEKTRRQ LRENAEDMGN GCFKIYHKCD NACIESIRNG TYDHDVYRDE

ALNNRFQIKG VELKSGYKD (配列番号1)

。

【0092】

一態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、2、3、4、又はそれより多くの免疫原性組成物の非ヒト対象への、ある量の時間（例えば、約2～4週間、約2～6週間、約4～6週間、約2～8週間、又は約4～8週間）によって各免疫原性組成物の投与が分離された投与を包含し、この中で、各免疫原性組成物は、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス（例えば、弱毒化した生インフルエンザウイルス）、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス（例えば、天然のインフルエンザウイルス）、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含み、かつこの中で、1の免疫原性組成物は、別の免疫原性組成物とは、前記インフルエンザウイルス、又は前記抗原若しくは前記抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスが、抗原的に異なるという点において異なる。一実施態様において、このような免疫原性組成物は、少なくとも各組成物に含まれる、インフルエンザウイルス、又は前記抗原若しくは前記抗原をコードする核酸配列が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスが、1のサブタイプ（例えば、H3サブタイプ）の抗原的に別個の株に由来するので、互いに異なる。別の実施態様において、このような免疫原性組成物は、少なくとも各組成物に含まれる、インフルエンザウイルス、又は前記抗原若しくは前記抗原をコードする核酸配列が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスが、2、3、4、5、又はそれより多くのサブタイプ（例えば、H1サブタイプ及びH3サブタイプ）の抗原的に別個の株に由来するので、互いに異なる。最後の免疫原性組成物の投与のある時間（例えば、約2～5日間、約5～10日間、又は約8～14日間）の後、ハイブリドーマを作製するのに用いることのできる細胞、例えば、脾細胞又はリンパ節細胞は、ハイブリドーマの作製のために対象から採取され得る。当該技術分野で公知の任意の技術を用いて、ハイブリドーマを作製し得る（例えば、Harlowらの文献「抗体：実験室マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988）；Hammerlingらの文献「モノクローナル抗体及びT細胞ハイブリドーマ（Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas）」（563 681（Elsevier, N.Y., 1981））において教示される技術を参照）（前記文献は、それらのすべてが引用により組み込まれる。）。作製されたハイブリドーマ由来の上清は、同じ及び／又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に対する結合、並びに後掲の実施例6に説明

10

20

30

40

50

されるような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。次に、モノクローナル抗体がハイブリドーマから単離され得る。具体的な実施態様において、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体は、このような方法に従って作製される。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は、2以上の不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス（例えば、弱毒化した生インフルエンザウイルス）、弱毒インフルエンザウイルス以外の生インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含む。

【0093】

一実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i)非ヒト対象（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）を、第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルスに由来するか若しくはそれから得られる抗原（例えば、赤血球凝集素）、又は第一のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化すること；(ii)指定された時間の後、前記対象を、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルスに由来するか若しくはそれから得られる抗原（例えば、赤血球凝集素）、又は第二のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；及び(iii)指定された時間の後、前記対象由来のB細胞ハイブリドーマを作製し、かつインフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体が単離される前に、ハイブリドーマは、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。ある実施態様において、先の免疫化(i)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含し、免疫化(ii)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含する。他の実施態様において、先の免疫化(i)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含し、免疫化(ii)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含する。具体的な実施態様において、このような方法に従って作製されたモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

【0094】

別の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i)非ヒト対象（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）を第一の不活性型インフルエンザウイルス、第一の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原（例えば、赤血球凝集素）、又は第一のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化すること；(ii)指定された時間の後、前記対象を、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルスに由来するか若しくはその断片それから得られる抗原、又は第二のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから

10

20

30

40

50

得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii) 指定された時間の後、前記対象を、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又は第三のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第二の及び前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(iv) 指定された時間の後、前記対象由来の、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するB細胞ハイブリドーマを作製することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、前記ハイブリドーマから単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体を単離する前に、ハイブリドーマが、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。ある実施態様において、先の免疫化(i)及び(ii)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含し、免疫化(iii)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含する。他の実施態様において、先の免疫化(i)及び(ii)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含し、免疫化(iii)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含する。具体的な実施態様において、このような方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

【0095】

別の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) 非ヒト対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、など)を、第一の不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第一の弱毒インフルエンザウイルス、第一の生インフルエンザウイルス、第一のインフルエンザウイルスに由来するか若しくはそれから得られる抗原(例えば、赤血球凝集素)、又は第一のインフルエンザウイルスから得られ若しくはそれに由来する抗原をコードする核酸で免疫化すること；(ii) 指定された時間の後、前記対象を、第二の不活性型インフルエンザウイルス、第二の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第二の生インフルエンザウイルス、第二のインフルエンザウイルスに由来するか若しくはそれから得られる抗原、又は第二のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第二のインフルエンザウイルスが前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iii) 指定された時間の後、前記対象を、第三の不活性型インフルエンザウイルス、第三の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第三の生インフルエンザウイルス、第三のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又は第三のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第三のインフルエンザウイルスが、前記第一の及び前記第二のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；(iv) 指定された時間の後、前記対象を、第四の不活性型インフルエンザウイルス、第四の弱毒インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス以外の第四の生インフルエンザウイルス、第四のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又は第四のインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸で免疫化し、この中で、前記第四のインフルエンザウイルスが、前記第三の、前記第二の、及び前記第一のインフルエンザウイルスとは抗原的に異なること；並びに(v) 指定された時間の後、前記対象由来の、インフルエン

10

20

30

40

50

ザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するB細胞ハイブリドーマを作製することを含む。ある実施態様において、前記方法は、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマクローンを選択することを含む。具体的実施態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体が単離される前に、ハイブリドーマは、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。ある実施態様において、先の免疫化(i)、(ii)、及び(iii)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含し、免疫化(iv)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含する。他の実施態様において、先の免疫化(i)、(ii)、及び(iii)は、不活性型インフルエンザウイルス又は弱毒インフルエンザウイルスの投与を包含し、免疫化(iv)は、抗原又は核酸コンストラクトの投与を包含する。具体的実施態様において、このような方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

10

20

30

40

50

【0096】

モノクローナル抗体が、本明細書に説明される方法に従って一旦作製されると、前記モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の方法及び本明細書に説明される方法を用いて、インフルエンザウイルスに結合する前記モノクローナル抗体の能力についてスクリーニングすることができる。また、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の方法、例えば、微量中和アッセイ、ブランク減少アッセイ、及び/又は細胞癒合アッセイ、並びに本明細書に説明される方法(後掲の第5.7節及び実施例6参照)を用いて、インフルエンザウイルスを中和する前記モノクローナル抗体の能力について試験することができる。

【0097】

本明細書に提供される方法によると、非ヒト対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、など)の、不活性型インフルエンザウイルス、弱毒インフルエンザウイルス、生インフルエンザウイルス(例えば、天然のインフルエンザウイルス)、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原(例えば、赤血球凝集素)、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸による免疫化の間の指定された時間は、前記対象が、インフルエンザウイルス又はインフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答を生じることができるのに十分な任意の時間であり得る。いくつかの実施態様において、免疫化間の指定された時間は、1週間、10日間、12日間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、10週間、12週間、14週間、16週間、又は16週間超である。他の実施態様において、免疫化間の指定された時間は、約2~4週間、約2~6週間、約2~8週間、約3~4週間、約3~5週間、約3~7週間、約4~6週間、約4~8週間、約4~12週間、及び/又は約4~16週間に及ぶ。ある実施態様において、免疫化間の指定された時間は10日間ではない。

【0098】

いくつかの実施態様において、非ヒト対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、など)の最終的な免疫化とB細胞ハイブリドーマの作製の間の指定された時間は、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、10日間、12日間、14日間、又は14日間超である。他の実施態様において、非ヒト対象の最終的な免疫化とB細胞ハイブリドーマの作製の間の指定された時間は、約1~3日間、約2~5日間、約3~7日間、約4~8日間、約5~10日間、又は約7~14日間である。ある実施態様において、非ヒト対象(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、など)の最終的な免疫化とB細胞ハイブリドーマの作製の間の指定された時間は、3日間ではない。

【0099】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(ii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/アラバマ/1/1981(H3)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/北京/47/1992(H3)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iv) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/ワイオミング/3/2003(H3)で免疫化すること；及び(v) 3日間後、マウスから採取した脾細胞由来のハイブリドーマを作製することを含む。具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ上清から採取/単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体が単離される前に、ハイブリドーマは、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに、後掲の実施例6に説明される方法のような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。具体的な実施態様において、このような方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

10

【0100】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(ii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/ソ連/92/77(H1)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/カリフォルニア/1/88(H3)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iv) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/カリフォルニア/04/09(H1)で免疫化すること；(v) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/プリズベーン/59/07様(H1)及びインフルエンザA型ウイルス株A/プリズベーン/10/07様(H3)を含む組成物で免疫化すること；並びに(vi) 3日間後、マウスから採取した脾細胞由来のハイブリドーマを作製することを含む。具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ上清から採取/単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体が単離される前に、ハイブリドーマは、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイにおける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。具体的な実施態様において、このような方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

20

30

【0101】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、(i) マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/サウスカロライナ/1918(H1)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(ii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/ソ連/92/77(H1)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iii) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/カリフォルニア/04/09(H1)由来の赤血球凝集素をコードする核酸で免疫化すること；(iv) 3週間後、マウスをインフルエンザA型ウイルス株A/プリズベーン/59/07様(H1)で免疫化すること；及び(v) 3日間後、マウスから採取した脾細胞由来のハイブリドーマを作製することを含む。具体的な実施態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ上清から採取/単離される。ある実施態様において、モノクローナル抗体が単離される前に、ハイブリドーマは、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株への結合、並びに後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイに

40

50

おける中和活性についてスクリーニングされ得る。いくつかの実施態様において、同じ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの異なる株に結合しかつ中和するモノクローナル抗体のみが単離される。具体的な実施態様において、このような方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、同じサブタイプ及び/又は異なるサブタイプのインフルエンザウイルスの2、3、又はそれより多くの株に結合しかつ中和する。

【0102】

ある実施態様において、本明細書に説明される方法に従って免疫原性組成物（複数可）を投与された非ヒト対象は、ヒト抗体を産生することのできるトランスジェニック動物（例えば、トランスジェニックマウス）である。ヒト抗体は、機能的内在性免疫グロブリンを発現することはできないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することのできるトランスジェニックマウスを用いて産生することができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、無作為に、又はマウス胚性幹細胞への相同的組換えによって導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、及び多様性領域は、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚性幹細胞へと導入され得る。マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同的組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別に又は同時に非機能的にされ得る。とくに、JH領域のホモ接合性欠失は、内在性抗体産生を防止する。修飾された胚性幹細胞を増殖し、胚盤胞へと微量注射して、キメラマウスを作出する。次に、キメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を作出する。トランスジェニックマウスによって保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成され、その後、クラスの切り替え及び体細胞性突然変異を受ける。したがって、このような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgM、及びIgE抗体を作製することは可能である。ヒト抗体を作製する本技術に関する総説については、Lonberg及びHuszarの文献（*Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)）を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を作製する本技術、並びにこのような抗体を作製するプロトコールに関する詳細な論議については、例えば、PCT公報WO98/24893；WO92/01047；WO96/34096；WO96/33735；欧州特許第0 598 877号；米国特許第5,413,923号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,569,825号；第5,661,016号；第5,545,806号；第5,814,318号；第5,885,793号；第5,916,771号；及び第5,939,598号を参照されたく、これらは全体として引用により本明細書に組み込まれる。Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.)、Genpharm (San Jose, Calif.)、及びMedarex, Inc. (Princeton, N.J.)などの企業は、選択された抗原に対して指向するヒト抗体を提供することを保証することができる。

10

20

30

【0103】

加えて、本明細書に説明される免疫原性組成物（複数可）を投与された非ヒト対象は、ヒト末梢血白血球、脾細胞、又は骨髄を移植され得（例えば、Trioma Techniques XTL）、それによりインフルエンザウイルス抗原に結合するヒト抗体が作製される。

【0104】

本明細書に提供されるモノクローナル抗体を作製する方法の工程は、任意の特定の数のインフルエンザウイルス株を用いた免疫化に限定されず、非ヒト対象の免疫化は、互いに抗原的に異なる任意の数のインフルエンザウイルス株、例えば、2の抗原的に異なるインフルエンザウイルス株、3の抗原的に異なるインフルエンザウイルス株、4の抗原的に異なるインフルエンザウイルス株、5の抗原的に異なるインフルエンザウイルス株、又は6以上の抗原的に異なるインフルエンザウイルス株を用いて反復することができる。

40

【0105】

ある実施態様において、本明細書に提供されるモノクローナル抗体を作製する方法に従って用いられる、抗原的に異なるインフルエンザウイルス株は、インフルエンザウイルス株の出現間の時間差に基づいて選択される。例えば、同じサブタイプのインフルエンザウイルスは、それらの出現間の時間差がより大きくなるにつれて、互いに抗原的に異なるようであるらしく、すなわち、1960年に出現したサブタイプH3のインフルエンザA型ウイルスは、1980年に出現したサブタイプH3のインフルエンザA型ウイルスとは抗原的に異なる見込みが高いであろう。具体的な実施態様において、抗原的に異なるインフルエンザウイ

50

ルス株には、約10年間、約15年間、約20年間、約25年間、約30年間、約40年間、又は約50年間にわたって出現した株を含む。別の具体的な実施態様において、抗原的に異なるインフルエンザウイルス株には、約10～100年間、約10～75年間、約10～50年間、約10～40年間、約10～30年間、約10～25年間、又は約10～20年間にわたって出現した株を含む。ある実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供された方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、40年間にわたって、又は40～50年間にわたって、約5年ごと、約10年ごと、又は約20年ごとに出現したウイルス株から選択される。他の実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、75～100年間にわたって、約5年ごと、約10年ごと、約20年ごと、約25年ごと、又は約30年ごとに出現したウイルス株から選択される。

10

【0106】

ある実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、約7年間にわたって出現したウイルス株から選択される。他の実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、約7年間にわたって出現したウイルス株から選択されない。ある実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、約6～8年間にわたって出現したウイルス株から選択される。他の実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられるインフルエンザウイルス株、又はインフルエンザウイルス抗原、又はインフルエンザウイルス抗原をコードする核酸は、約6～8年間にわたって出現したウイルス株から選択されない。

20

【0107】

他の実施態様において、モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って用いられる抗原的に異なるインフルエンザウイルス株は、同時に又はほぼ同時に、例えば、同年内に出現したウイルスから選択されるが、互いに抗原的に異なる。

30

【0108】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスの株である。一実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、単一のサブタイプ由来のインフルエンザA型ウイルスの株である。別の実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、2、3、又はそれより多くのサブタイプ由来のインフルエンザA型ウイルスの株である。別の実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、1、2、又はそれより多くのクラスター（例えば、H1aインフルエンザウイルス（H2、H5、H1、及びH6）及びH1bインフルエンザウイルス（H13、H16、及びH11）のH1クラスター、インフルエンザウイルス（H8、H12、及びH9）のH9クラスター、インフルエンザウイルス（H4、H14、及びH3）のH3クラスター、又はインフルエンザウイルス（H15、H7、及びH10）のH7クラスター）由来のインフルエンザA型ウイルスの株である。インフルエンザA型ウイルスの非限定的な例には、サブタイプH10N4、サブタイプH10N5、サブタイプH10N7、サブタイプH10N8、サブタイプH10N9、サブタイプH11N1、サブタイプH11N13、サブタイプH11N2、サブタイプH11N4、サブタイプH11N6、サブタイプH11N8、サブタイプH11N9、サブタイプH12N1、サブタイプH1

40

50

2N4、サブタイプH12N5、サブタイプH12N8、サブタイプH13N2、サブタイプH13N3、サブタイプH13N6、サブタイプH13N7、サブタイプH14N5、サブタイプH14N6、サブタイプH15N8、サブタイプH15N9、サブタイプH16N3、サブタイプH1N1、サブタイプH1N2、サブタイプH1N3、サブタイプH1N6、サブタイプH1N9、サブタイプH2N1、サブタイプH2N2、サブタイプH2N3、サブタイプH2N5、サブタイプH2N7、サブタイプH2N8、サブタイプH2N9、サブタイプH3N1、サブタイプH3N2、サブタイプH3N3、サブタイプH3N4、サブタイプH3N5、サブタイプH3N6、サブタイプH3N8、サブタイプH3N9、サブタイプH4N1、サブタイプH4N2、サブタイプH4N3、サブタイプH4N4、サブタイプH4N5、サブタイプH4N6、サブタイプH4N8、サブタイプH4N9、サブタイプH5N1、サブタイプH5N2、サブタイプH5N3、サブタイプH5N4、サブタイプH5N6、サブタイプH5N7、サブタイプH5N8、サブタイプH5N9、サブタイプH6N1、サブタイプH6N2、サブタイプH6N3、サブタイプH6N4、サブタイプH6N5、サブタイプH6N6、サブタイプH6N7、サブタイプH6N8、サブタイプH6N9、サブタイプH7N1、サブタイプH7N2、サブタイプH7N3、サブタイプH7N4、サブタイプH7N5、サブタイプH7N7、サブタイプH7N8、サブタイプH7N9、サブタイプH8N4、サブタイプH8N5、サブタイプH9N1、サブタイプH9N2、サブタイプH9N3、サブタイプH9N5、サブタイプH9N6、サブタイプH9N7、サブタイプH9N8、及びサブタイプH9N9を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

インフルエンザA型ウイルスの株の具体例には以下のものが含まれるが、これらに限定されない：A / ブタ / アイオワ / 15 / 30 (H1N1) ; A / WSN / 33 (H1N1) ; A / ウマ / ブラハ / 1 / 56 (H7N7) ; A / PR / 8 / 34 ; A / マガモ / ポツダム / 178-4 / 83 (H2N2) ; A / セグロカモメ / デラウェア / 712 / 88 (H16N3) ; A / ブタ / 香港 / 168 / 1993 (H1N1) ; A / マガモ / アルバータ / 211 / 98 (H1N1) ; A / 渉禽類 (shorebird) / デラウェア / 168 / 06 (H16N3) ; A / ブタ / オランダ / 25 / 80 (H1N1) ; A / ブタ / ドイツ / 2 / 81 (H1N1) ; A / ブタ / ハノーバー / 1 / 81 (H1N1) ; A / ブタ / ポツダム / 1 / 81 (H1N1) ; A / ブタ / ポツダム / 15 / 81 (H1N1) ; A / ブタ / ポツダム / 268 / 81 (H1N1) ; A / ブタ / フィニステール / 2899 / 82 (H1N1) ; A / ブタ / ポツダム / 35 / 82 (H3N2) ; A / ブタ / コートダルモール / 3633 / 84 (H3N2) ; A / ブタ / ヘント / 1 / 84 (H3N2) ; A / ブタ / オランダ / 12 / 85 (H1N1) ; A / ブタ / カレンツァイン (Karrenzien) / 2 / 87 (H3N2) ; A / ブタ / シュヴェリーン / 103 / 89 (H1N1) ; A / シチメンチョウ / ドイツ / 3 / 91 (H1N1) ; A / ブタ / ドイツ / 8533 / 91 (H1N1) ; A / ブタ / ベルギー / 220 / 92 (H3N2) ; A / ブタ / ヘント / V230 / 92 (H1N1) ; A / ブタ / ライチヒ / 145 / 92 (H3N2) ; A / ブタ / Re220 / 92hp (H3N2) ; A / ブタ / バークム / 909 / 93 (H3N2) ; A / ブタ / シュレースヴィヒホルシュタイン / 1 / 93 (H1N1) ; A / ブタ / スコットランド / 419440 / 94 (H1N2) ; A / ブタ / バークム / 5 / 95 (H1N1) ; A / ブタ / ベスト (Best) / 5C / 96 (H1N1) ; A / ブタ / イングランド / 17394 / 96 (H1N2) ; A / ブタ / イェーナ / 5 / 96 (H3N2) ; A / ブタ / ウーデンローデ / 7C / 96 (H3N2) ; A / ブタ / ローネ / 1 / 97 (H3N2) ; A / ブタ / コートダルモール / 790 / 97 (H1N2) ; A / ブタ / バークム / 1362 / 98 (H3N2) ; A / ブタ / イタリア / 1521 / 98 (H1N2) ; A / ブタ / イタリア / 1553 2 / 98 (H3N2) ; A / ブタ / イタリア / 1566 / 98 (H1N1) ; A / ブタ / イタリア / 1589 / 98 (H1N1) ; A / ブタ / バークム / 8602 / 99 (H3N2) ; A / ブタ / コートダルモール / 604 / 99 (H1N2) ; A / ブタ / コートダルモール / 1482 / 99 (H1N1) ; A / ブタ / ヘント / 7625 / 99 (H1N2) ; A / 香港 / 1774 / 99 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 5190 / 99 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 5200 / 99 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 5212 / 99 (H3N2) ; A / ブタ / イルエヴィレーヌ / 1455 / 99 (H1N1) ; A / ブタ / イタリア / 1654 1 / 99 (H1N2) ; A / ブタ / イタリア / 2034 / 99 (H1N1) ; A / ブタ / イタリア / 2064 / 99 (H1N2) ; A / ブタ / ベルリン / 1578 / 00 (H3N2) ; A / ブタ / バークム / 1832 / 00 (H1N2) ; A / ブタ / バークム / 1833 / 00 (H1N2) ; A / ブタ / コートダルモール / 800 / 00 (H1N2) ; A / ブタ / 香港 / 7982 / 00 (H3N2) ; A / ブタ / イタリア / 1081 / 00 (H1N2) ; A / ブタ / ベルチヒ / 2 / 01 (H1N1) ; A / ブタ / ベルチヒ / 54 / 01 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 9296 / 01 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 9745 / 01 (H3N2) ; A / ブタ / スペイン / 33601 / 01 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 1144 / 02 (H3N2) ; A / ブタ / 香港 / 1197 / 02 (H3N2) ; A / ブタ / ス

ペイン / 39139 / 02 (H3N2) ; A / ブタ / スペイン / 42386 / 02 (H3N2) ; A / スイス / 8808 / 2002 (H1N1) ; A / ブタ / パークム / 1769 / 03 (H3N2) ; A / ブタ / ビッセンドルフ / IDT1864 / 03 (H3N2) ; A / ブタ / エーレン (Ehren) / IDT2570 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ゲッシャー / IDT2702 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ハーゼリユンネ / 2617 / 03hp (H1N1) ; A / ブタ / レーニンゲン / IDT2530 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / IVD / IDT2674 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ノルドキルヒェン / IDT1993 / 03 (H3N2) ; A / ブタ / ノルドヴァルデ / IDT2197 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ノルデン / IDT2308 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / スペイン / 50047 / 03 (H1N1) ; A / ブタ / スペイン / 51915 / 03 (H1N1) ; A / ブタ / フェヒタ / 2623 / 03 (H1N1) ; A / ブタ / ヴィスベク / IDT2869 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ヴァルターズドルフ / IDT2527 / 03 (H1N2) ; A / ブタ / ダム / IDT2890 / 04 (H3N2) ; A / ブタ / ゲルダーン / IDT288 / 04 (H1N1) ; A / ブタ / グランステット (Granstedt) / IDT3475 / 04 (H1N2) ; A / ブタ / グレーフェン / IDT2889 / 04 (H1N1) ; A / ブタ / ゲーテンスベルク / IDT2930 / 04 (H1N2) ; A / ブタ / ゲーテンスベルク / IDT2931 / 04 (H1N2) ; A / ブタ / ローネ / IDT3357 / 04 (H3N2) ; A / ブタ / ノルトルップ / IDT3685 / 04 (H1N2) ; A / ブタ / ゼーセン / IDT3055 / 04 (H3N2) ; A / ブタ / スペイン / 53207 / 04 (H1N1) ; A / ブタ / スペイン / 54008 / 04 (H3N2) ; A / ブタ / シュトルツェナウ / IDT3296 / 04 (H1N2) ; A / ブタ / ヴェーデル / IDT2965 / 04 (H1N1) ; A / ブタ / パートグリースバッハ / IDT4191 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / クロップンブルク / IDT4777 / 05 (H1N2) ; A / ブタ / デートリンゲン / IDT3780 / 05 (H1N2) ; A / ブタ / デートリンゲン / IDT4735 / 05 (H1N2) ; A / ブタ / エックルハム / IDT5250 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / ハーケンブレック (Harkenblek) / IDT4097 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / ヘルツェン (Hertzen) / IDT4317 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / クローゲル (Krogel) / IDT4192 / 05 (H1N1) ; A / ブタ / ラエル / IDT3893 / 05 (H1N1) ; A / ブタ / ラエル / IDT4126 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / メルツェン / IDT4114 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / ミュスラリンゲン (Muesleringen) -S. / IDT4263 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / オスターホーフェン / IDT4004 / 05 (H3N2) ; A / ブタ / シュプレング (Spreng) / IDT3805 / 05 (H1N2) ; A / ブタ / シュタットローン / IDT3853 / 05 (H1N2) ; A / ブタ / フォーグラルン (Voglarn) / IDT4096 / 05 (H1N1) ; A / ブタ / ヴォーラーシュト (Wohlerst) / IDT4093 / 05 (H1N1) ; A / ブタ / パートグリースバッハ / IDT5604 / 06 (H1N1) ; A / ブタ / ヘルツラケ / IDT5335 / 06 (H3N2) ; A / ブタ / ヘルツラケ / IDT5336 / 06 (H3N2) ; A / ブタ / ヘルツラケ / IDT5337 / 06 (H3N2) ; 及びA / イノシシ / ドイツ / R169 / 2006 (H3N2) 。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 0 】

インフルエンザA型ウイルスの株の他の具体例には以下のものが含まれるが、これらに限定されない：A / トロント / 3141 / 2009 (H1N1) ; A / レーゲンスブルク / D6 / 2009 (H1N1) ; A / バイエルン / 62 / 2009 (H1N1) ; A / バイエルン / 62 / 2009 (H1N1) ; A / ブランデンブルク / 19 / 2009 (H1N1) ; A / ブランデンブルク / 20 / 2009 (H1N1) ; A / 連邦直轄区 (Distrito Federal) / 2611 / 2009 (H1N1) ; A / マトグロッセ / 2329 / 2009 (H1N1) ; A / サンパウロ / 1454 / 2009 (H1N1) ; A / サンパウロ / 2233 / 2009 (H1N1) ; A / ストックホルム / 37 / 2009 (H1N1) ; A / ストックホルム / 41 / 2009 (H1N1) ; A / ストックホルム / 45 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 1 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 14 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 2 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 21 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 22 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 23 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 24 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 25 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 3 / 2009 (H1N1) ; A / ブタ / アルバータ / OTH 33 7 / 2009 (H1N1) ; A / 北京 / 502 / 2009 (H1N1) ; A / フィレンツェ / 10 / 2009 (H1N1) ; A / 香港 / 2369 / 2009 (H1N1) ; A / イタリア / 85 / 2009 (H1N1) ; A / サントドミンゴ / 572N / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 385 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 386 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 387 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 390 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 394 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 397 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 398 / 2009 (H1N1) ; A / カタロニア / 399 / 2009 (H1N1) ; A / サンパウロ / 2303 /

2009 (H1N1) ; A / 秋田 / 1 / 2009 (H1N1) ; A / カストロ / JXP / 2009 (H1N1) ; A / 福島 / 1 / 2009 (H1N1) ; A / イスラエル / 276 / 2009 (H1N1) ; A / イスラエル / 277 / 2009 (H1N1) ; A / イスラエル / 70 / 2009 (H1N1) ; A / 岩手 / 1 / 2009 (H1N1) ; A / 岩手 / 2 / 2009 (H1N1) ; A / 鹿児島 / 1 / 2009 (H1N1) ; A / 大阪 / 180 / 2009 (H1N1) ; A / プエルトモント / Bio87 / 2009 (H1N1) ; A / サンパウロ / 2303 / 2009 (H1N1) ; A / 札幌 / 1 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 30 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 31 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 32 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 33 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 34 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 35 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 36 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 38 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 39 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 40 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 42 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 43 / 2009 (H1N1) ; A / スtockホルム / 44 / 2009 (H1N1) ; A / 宇都宮 / 2 / 2009 (H1N1) ; A / ウォータリード陸軍研究所 (WRAIR) / 0573N / 2009 (H1N1) ; 及びA / 浙江 / DTID ZJU01 / 2009 (H1N1) 。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、サブタイプH3N2ではない。いくつかの実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、H3N2株A / 愛知 / 2 / 68、H3N2株A / ビクトリア / 3 / 75、又はH3N2株A / フィリピン / 2 / 82である。他の実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、H3N2株A / 愛知 / 2 / 68、H3N2株A / ビクトリア / 3 / 75、又はH3N2株A / フィリピン / 2 / 82ではない。

【 0 1 1 2 】

他の実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、A / 香港 / 1 / 1968 (HK / 68) (H3)、A / アラバマ / 1 / 1981 (AL / 81) (H3)、A / ジョージア / 1981 (H3)、A / 北京 / 47 / 1992 (BJ / 92) (H3)、A / ワイオミング / 3 / 2003 (H3)、A / ウィスコンシン / 67 / 2005 (WI / 05) (H3)、A / プリズベーン / 10 / 2007 (BR / 07) (H3)、A / ニューヨーク / 2008 (NY08) (H3)、A / テキサス / 36 / 1991 (TX / 91) (H1)、A / ニューカレドニア / 20 / 99 (N.Cal / 99) (H1)、A / アヒル / イングランド / 1962 (Dk / 62) (H4)、A / シチメンチョウ / イングランド / 1963 (Tky / 63) (H7)、A / ウマ / ケンタッキー / 2002 (e / KY / 02) (H3)、A / アンアーパー / 6 / 1960 (AA / 60) (H2)、A / フォートモンマウス (Fort Monmouth) / 1 / 1947 (FM / 47) (H1)、A / ソ連 / 92 / 77 (H1)、A / カリフォルニア / 1 / 88 (H3)、A / カリフォルニア / 04 / 09 (H1)、A / プリズベーン / 59 / 07様 (H1)、A / プリズベーン / 10 / 07様 (H3)、及び / 又はA / サウスカロライナ / 1918 (H1) である。

【 0 1 1 3 】

現在、2の異なる群に収まるインフルエンザウイルスの16の赤血球凝集素サブタイプがあり、このようなサブタイプの任意の1、2、又はそれより多くは、本明細書に提供される方法に従って用いられ得る。赤血球凝集素サブタイプ間の系統学的関連性の表については図6を参照されたい。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、単一の赤血球凝集素サブタイプ由来のインフルエンザA型ウイルスの株に由来する (例えば、H1又はH3)。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、2、3、又はそれより多くの赤血球凝集素サブタイプ由来のインフルエンザA型ウイルスの株である (例えば、H1及びH3)。別の具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、1、2、又はそれより多くのクラスター由来のインフルエンザA型ウイルスの株である (例えば、H1aインフルエンザウイルス (H2、H5、H1、及びH6) 及びH1bインフルエンザウイルス

(H13、H16、及びH11)のH1クラスター、インフルエンザウイルス(H8、H12、及びH9)のH9クラスター、並びにインフルエンザウイルス(H4、H14、及びH3)のH3クラスター、又はインフルエンザウイルス(H15、H7、及びH10)のH7クラスター)。

【0114】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、インフルエンザB型ウイルスの株由来である。インフルエンザB型ウイルスの具体例には、愛知/5/88株、秋田/27/2001株、秋田/5/2001株、アラスカ/16/2000株、アラスカ/1777/2005株、アルゼンチン/69/2001株、アリゾナ/146/2005株、アリゾナ/148/2005株、バンコク/163/90株、バンコク/34/99株、バンコク/460/03株、バンコク/54/99株、バルセロナ/215/03株、北京/15/84株、北京/184/93株、北京/243/97株、北京/43/75株、北京/5/76株、北京/76/98株、ベルギー/WV106/2002株、ベルギー/WV107/2002株、ベルギー/WV109/2002株、ベルギー/WV114/2002株、ベルギー/WV122/2002株、ボン/43株、ブラジル/952/2001株、ブカレスト/795/03株、ブエノスアイレス/161/00株)、ブエノスアイレス/9/95株、ブエノスアイレス/SW16/97株、ブエノスアイレス/VL518/99株、カナダ/464/2001株、カナダ/464/2002株、チャコ/366/00株、チャコ/R113/00株、済州/303/03株、千葉/447/98株、重慶/3/2000株、SA1タイ/2002臨床分離株、SA10タイ/2002臨床分離株、SA100フィリピン/2002臨床分離株、SA101フィリピン/2002臨床分離株、SA110フィリピン/2002臨床分離株)、SA112フィリピン/2002臨床分離株、SA113フィリピン/2002臨床分離株、SA114フィリピン/2002臨床分離株、SA2タイ/2002臨床分離株、SA20タイ/2002臨床分離株、SA38フィリピン/2002臨床分離株、SA39タイ/2002臨床分離株、SA99フィリピン/2002臨床分離株、CNIC/27/2001株、コロラド/2597/2004株、コルドバ/VA418/99株、チェコスロバキア/16/89株、チェコスロバキア/69/90株、ダエク/10/97株、ダエク/45/97株、ダエク/47/97株、ダエク/9/97株、B/Du/4/78株、B/ダーバン/39/98株、ダーバン/43/98株、ダーバン/44/98株、B/ダーバン/52/98株、ダーバン/55/98株、ダーバン/56/98株、イングランド/1716/2005株、イングランド/2054/2005株)、イングランド/23/04株、フィンランド/154/2002株、フィンランド/159/2002株、フィンランド/160/2002株、フィンランド/161/2002株、フィンランド/162/03株、フィンランド/162/2002株、フィンランド/162/91株、フィンランド/164/2003株、フィンランド/172/91株、フィンランド/173/2003株、フィンランド/176/2003株、フィンランド/184/91株、フィンランド/188/2003株、フィンランド/190/2003株、フィンランド/220/2003株、フィンランド/WV5/2002株、福建/36/82株、ジュネーブ/5079/03株、ジェノバ/11/02株、ジェノバ/2/02株、ジェノバ/21/02株、ジェノバ/54/02株、ジェノバ/55/02株、広東/05/94株、広東/08/93株、広東/5/94株、広東/55/89株、広東/8/93株、広州/7/97株、広州/86/92株、広州/87/92株、京畿/592/2005株、ハノーバー/2/90株、ハルビン/07/94株、ハワイ/10/2001株、ハワイ/1990/2004株、ハワイ/38/2001株、ハワイ/9/2001株、河北/19/94株、河北/3/94株)、河南/22/97株、広島/23/2001株、香港/110/99株、香港/1115/2002株、香港/112/2001株、香港/123/2001株、香港/1351/2002株、香港/1434/2002株、香港/147/99株、香港/156/99株、香港/157/99株、香港/22/2001株、香港/22/89株、香港/336/2001株、香港/666/2001株、香港/9/89株、ヒューストン/1/91株、ヒューストン/1/96株、ヒューストン/2/96株、湖南/4/72株、茨城/2/85株、仁川(ncheon)/297/2005株、インド/3/89株、インド/77276/2001株、イスラエル/95/03株、イスラエル/WV187/2002株、日本/1224/2005株、江蘇/10/03株、ヨハネスブルク/1/99株、ヨハネスブルク/96/01株、門真/1076/99株、門真/122/99株、鹿児島/15/94株、カンザス/22992/99株、ハズコフ(Khazkov)/224/91株、神戸/1/2002株、高知/193/99株、ラツィオ/1/02株、リー/40株、レニングラード/129/91株、リスボン/2/90株)、ロサンゼルス/1/02株、ルサカ/270/99株、リヨン/1271/96株、マレーシア/83077/2001株、マプト/1/99株、マルデルプラタ/595/99株、メリーランド/1/01、メン

10

20

30

40

50

フィス / 1 / 01株、メンフィス / 12 / 97 MA株、ミシガン / 22572 / 99株、三重 / 1 / 93株、ミラノ / 1 / 01株、ミンスク / 318 / 90株、モスクワ / 3 / 03株、名古屋 / 20 / 99株、南昌 / 1 / 00株、ナッシュビル / 107 / 93株、ナッシュビル / 45 / 91株、ネブラスカ / 2 / 01株、オランダ / 801 / 90株、オランダ / 429 / 98株、ニューヨーク / 1 / 2002株、NIB / 48 / 90株、寧夏 / 45 / 83株、ノルウェー / 1 / 84株、オマーン / 16299 / 2001株、大阪 / 1059 / 97株、大阪 / 983 / 97 V2株、オスロ / 1329 / 2002株、オスロ / 1846 / 2002株、パナマ / 45 / 90株、パリ / 329 / 90株、パルマ / 23 / 02株、パース / 211 / 2001株、ペルー / 1364 / 2004株、フィリピン / 5072 / 2001株、釜山 / 270 / 99株、ケベック / 173 / 98株、ケベック / 465 / 98株、ケベック / 7 / 01株、ローマ / 1 / 03株、佐賀 / S172 / 99株、ソウル / 13 / 95株、ソウル / 37 / 91株、山東 / 7 / 97株、上海 / 361 / 2002株)、滋賀 / T30 / 98株、四川 / 379 / 99株、シンガポール / 222 / 79株、スペイン / WV27 / 2002株、ストックホルム / 10 / 90株、スイス / 5441 / 90株、台湾 / 0409 / 00株、台湾 / 0722 / 02株、台湾 / 97271 / 2001株、テヘラン / 80 / 02株、東京 / 6 / 98株、トリエステ / 28 / 02株、ウランウデ / 4 / 02株、イギリス / 34304 / 99株、ソ連 / 100 / 83株、ピクトリア / 103 / 89株、ウィーン / 1 / 99株、武漢 / 356 / 2000株、WV194 / 2002株、玄武 / 23 / 82株、山形 / 1311 / 2003株、山形 / K500 / 2001株、アラスカ / 12 / 96株、GA / 86株、長崎 / 1 / 87株、東京 / 942 / 96株、及びロチェスター / 02 / 2001株を含む。

10

【0115】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、インフルエンザC型ウイルスの株である。インフルエンザC型ウイルスの具体例には、愛知 / 1 / 81株、アンアーバー / 1 / 50株、青森 / 74株、カリフォルニア / 78株、イングランド / 83株、ギリシア / 79株、広島 / 246 / 2000株、広島 / 252 / 2000株、兵庫 / 1 / 83株、ヨハネスブルク / 66株、神奈川県 / 1 / 76株、京都 / 1 / 79株、ミシシッピ / 80株、宮城 / 1 / 97株、宮城 / 5 / 2000株、宮城 / 9 / 96株、奈良 / 2 / 85株、ニュージャージー / 76株、ブタ / 北京 / 115 / 81株、埼玉 / 3 / 2000株)、静岡 / 79株、山形 / 2 / 98株、山形 / 6 / 2000株、山形 / 9 / 96株、ベルリン / 1 / 85株、イングランド / 892 / 8株、五大湖 / 1167 / 54株、JJ / 50株、ブタ / 北京 / 10 / 81株、ブタ / 北京 / 439 / 82株)、テラー (TAYLOR) / 1233 / 47株及びC / 山形 / 10 / 81株を含む。

20

【0116】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスの株及びインフルエンザB型ウイルスの株である。いくつかの実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、インフルエンザA型ウイルスの株、インフルエンザB型ウイルスの株、及びインフルエンザC型ウイルスの株である。

30

【0117】

ある実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、プロメラインで治療される。他の実施態様において、インフルエンザウイルス、又は抗原若しくは抗原をコードする核酸が由来し若しくは得られるインフルエンザウイルスは、プロメラインで治療されない。

40

【0118】

具体的な実施態様において、非ヒト対象に投与されたインフルエンザウイルスは、単離又は精製される。本明細書に説明されるインフルエンザウイルスは、当業者に公知の任意の方法によって単離及び精製され得る。一実施態様において、ウイルスは、例えば、勾配遠心分離及びカラムクロマトグラフィーなどの周知の清澄手順によって、細胞培養物から取り出され、及び細胞構成要素から分離され、当業者に周知の手順、例えばブランクアッセイを用いて、所望の通りさらに精製され得る。

【0119】

具体的な実施態様において、非ヒト対象に投与されたインフルエンザウイルスの株 (複

50

数可)に由来し又はそれから得られる抗原は単離される。別の具体的な実施態様において、い非ヒト対象に投与されるインフルエンザウイルスの株(複数可)に由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸は単離される。

【0120】

cDNA分子などの「単離された」核酸は、他の細胞材料、若しくは組換え技術によって作製される場合、培地が実質的にない可能性があり、又は化学的に合成される場合、化学物質前駆体若しくは他の化学物質が実質的にない可能性がある。用語「細胞材料が実質的にない」には、細胞から単離又は組換え作製される前記細胞の細胞内構成要素から核酸が分離された前記核酸の調製物を含む。したがって、細胞材料が実質的にない核酸には、他の核酸の約30(乾燥重量)%未満、20(乾燥重量)%未満、10(乾燥重量)%未満、又は5(乾燥重量)%未満を有する核酸の調製物を含む。用語「培地が実質的にない」には、培地が調製物の容積の約50%未満、20%未満、10%未満、又は5%未満を表す核酸の調製物を含む。用語「他の化学物質前駆体又は他の化学物質が実質的にない」には、核酸の合成に関与する化学物質前駆体又は他の化学物質から核酸が分離された調製物を含む。具体的な実施態様において、核酸のこのような調製物は、関心対象の核酸以外の化学物質前駆体又は化合物の約50(乾燥重量)%未満、30(乾燥重量)%未満、20(乾燥重量)%未満、10(乾燥重量)%未満、5(乾燥重量)%未満を有する。

10

【0121】

本明細書に説明される方法によると、インフルエンザウイルス(生、不活性型、若しくは弱毒(例えば、弱毒化した生インフルエンザウイルス))、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原(例えば、赤血球凝集素)、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸は、種々の経路によって非ヒト対象に送達され得る。このような経路には、鼻内、気管内、経口、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、経皮、静脈内、結膜内、及び皮下経路を含むが、これらに限定されない。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原、又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸は、賦形剤若しくは担体を含む組成物に製剤されており、組成物は非ヒト対象に投与される。このような組成物は好ましくは、非ヒト対象への投与の経路に好適である。

20

【0122】

インフルエンザウイルス、又はウイルスベクター若しくはウイルス様粒子を用いて、インフルエンザウイルスに由来し若しくは得られる抗原をコードする核酸を投与する場合、ウイルス、ウイルスベクター、又はウイルス様粒子についての感染の天然経路を介して、ウイルス、ウイルスベクター、又はウイルス様粒子を導入することが好ましくあり得る。あるいは、抗原をコードする核酸が由来するインフルエンザウイルスの感染の天然経路を介してウイルスベクター又はウイルス様粒子を導入することが好ましくあり得る。激しい分泌性及び細胞性免疫応答を誘発する抗原、特にウイルスベクターの能力を、有利に用いることができる。例えば、インフルエンザウイルス又はウイルスベクターによる気道の感染は、インフルエンザウイルスに対する同時保護を伴い、例えば泌尿器系において強い分泌性免疫応答を誘導することができる。加えて、好ましい実施態様において、任意の好適な経路によってインフルエンザウイルスを肺に導入することが望ましくあり得る。肺投与は、例えば、吸入器又はネブライザー、及び噴霧剤として用いるためのエアゾール化剤による製剤の使用によって採用することもできる。

30

40

【0123】

モノクローナル抗体を作製するために本明細書に提供される方法に従って非ヒト対象を免疫化するために用いられるインフルエンザウイルス(生又は弱毒(たとえば、弱毒化した生インフルエンザウイルス))、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原(例えば、赤血球凝集素)、又は、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸の量は、当該技術分野で公知の方法によって決定することができる。ある実施態様において、非ヒト対象にインフルエンザウイルス(生、

50

不活性型、若しくは弱毒（例えば、弱毒化した生インフルエンザウイルス）又はインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含むウイルスベクターを投与する場合、およそ 10^4 pfu、およそ 10^5 pfu、およそ 10^6 pfu、又はおよそ 10^7 が対象に投与される。ある実施態様において、非ヒト対象にインフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を投与する場合、およそ1mg/kg、およそ1.5mg/kg、およそ2mg/kg、およそ3mg/kg、又はおよそ4mg/kgが対象に投与され得る。ある実施態様において、非ヒト対象にインフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を投与する場合、約0.1µg～約1,000µg；約0.1µg～約500µg；約0.1µg～約250µg；約0.1µg～約100µg；約0.1µg～約50µg；約0.1µg～約25µg、又は約0.1µg～約10µgの抗原が対象に投与され得る。ある実施態様において、非ヒト対象に、インフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を投与する場合、約10ng～1g、100ng～100mg、1µg～10mg、又は30～300µgの核酸が対象に投与され得る。

10

【0124】

(5.1.1 インフルエンザウイルス)

ある実施態様において、非ヒト対象に投与されるインフルエンザウイルスは不活性化される。当業者に公知の技術を用いて、ウイルスを不活性化してよい。一般的な方法は、不活性化のためにホルマリン、熱、又は界面活性剤を用いる。例えば、すべての内容が引用により本明細書に組み込まれている米国特許第6,635,246号を参照されたい。他の方法には、すべての内容が引用により本明細書に組み込まれている米国特許第5,891,705号；大5,106,619号、及び第4,693,981号において説明されたものを含む。

20

【0125】

ある実施態様において、非ヒト対象に投与されるインフルエンザウイルスは弱毒化される（例えば、弱毒化した生インフルエンザウイルス）。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスの弱毒化は、ウイルスが少なくとも部分的に感染性を残しており、及びインビボで複製することができるが、非病原性である臨床下レベルの感染を結果として生じる低い力価を生じるに過ぎないように望まれる。このような弱毒ウイルスは、本明細書に説明される実施態様に特に好適であり、この中で、ウイルス又はその免疫原性組成物が非ヒト対象に投与されて免疫応答を誘発する。インフルエンザウイルスの弱毒化は、例えば、化学的突然変異誘発によって生じたウイルス突然変異株の選択、遺伝子工学によるゲノムの突然変異、弱毒化機能を有するセグメントを含む合併結合変異（reassortant）ウイルスの選択、又は条件的ウイルス突然変異株（例えば、冷却適応型ウイルス）についての選択など、当該技術分野で公知の任意の方法に従って達成することができる。あるいは、天然弱毒インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスベクターのためのインフルエンザウイルス骨格として用いられ得る。

30

【0126】

いくつかの実施態様において、インフルエンザウイルスは、細胞内インターフェロン（IFN）応答に拮抗するウイルスの能力を損なう突然変異型NS1遺伝子を発現するようインフルエンザウイルスを操作することによって、少なくとも一部弱毒化され得る。インフルエンザウイルスNS1遺伝子に導入することができる突然変異の種類の場合には、欠失、置換、挿入、及びこれらの組み合わせを含む。1以上の突然変異は、NS1遺伝子（例えば、N末端、C末端、又はそれらの間の随所）及び/又はNS1遺伝子の調節エレメントを通じてどこにでも導入することができる。一実施態様において、弱毒インフルエンザウイルスは、NS1のC末端から5、好ましくは10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、99、100、105、110、115、120、125、126、130、135、140、145、150、155、160、165、170、若しくは175アミノ酸残基からなる欠失、又はC末端から5～170、25～170、50～170、100～170、100～160、又は105～160アミノ酸残基の欠失を結果として生じるインフルエンザウイルスNS1遺伝子における突然変異を有するゲノムを含む。別の実施態様において、弱毒インフルエンザウイルスは、アミノ酸残基1～130、アミノ酸残基1～126、アミノ酸残基1～120、アミノ酸残基1～115、アミノ酸残基1～110、アミノ酸残基1～100、アミノ酸残基1～99、アミノ酸残基1～95、アミノ酸残基1～85、アミノ酸残基1～83、

40

50

アミノ酸残基1～80、アミノ酸残基1～75、アミノ酸残基1～73、アミノ酸残基1～70、アミノ酸残基1～65、若しくはアミノ酸残基1～60のNS1タンパク質をコードするよう、インフルエンザウイルスNS1遺伝子の突然変異を有するゲノムを含み、この中で、N末端アミノ酸は番号1である。NS1突然変異及び突然変異型NS1を含むインフルエンザウイルスの例については、例えば、それらの各々が全体として引用により本明細書に組み込まれる米国特許第6,468,544号及び第6,669,943号；並びにLiらの文献（1999, J. Infect. Dis. 179: 1132-1138）を参照されたい。

【0127】

(5.1.2 インフルエンザ抗原の発現)

インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸は、例えば発現ベクターなど、ベクターの一部として非ヒト対象に投与され得る。加えて、インフルエンザウイルスに由来し又は得られる抗原は、このような抗原をコードする核酸を宿主細胞にトランスフェクトすることによって作製され得、このような核酸はベクターの一部であり得る。具体的な実施態様において、ベクターは、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸の発現を指示できる発現ベクターである。発現ベクターの非限定的な例には、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ワクシニアウイルス、及びバキュロウイルスなどのプラスミド及びウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。標準的な分子生物学技術を用いて、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸を発現ベクターに導入してよい。

【0128】

発現ベクターは、宿主細胞又は非ヒト対象における核酸の発現に好適な形態で、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸を含む。具体的な実施態様において、発現ベクターには、発現すべき核酸に作用可能に連結された、発現に用いられるべき宿主細胞を基にして選択される、1以上の調節配列を含む。発現ベクター内で、「作用可能に連結された」は、核酸の発現を可能にする様式で、関心対象の核酸が調節配列（複数可）に連結されていることを意味するよう意図する。調節配列には、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントを含む（例えば、ポリアデニル化シグナル）。調節配列には、多くの種類の宿主細胞における核酸の構成的発現を指示するもの、ある宿主細胞においてのみ核酸の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）、及び特定の薬剤による刺激の際に核酸の発現を指示するもの（例えば、誘導性調節配列）を含む。発現ベクターの設計が、例えば、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に依存し得ることは当業者によって認められるであろう。

【0129】

発現ベクターは、原核細胞（例えば、大腸菌）又は真核細胞（例えば、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる。）、酵母細胞、又は哺乳類細胞）を用いてインフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原の発現について設計することができる。哺乳類宿主細胞の例には、Crucell Per.C6細胞、Vero細胞、CHO細胞、VERY細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞、MDCK細胞、293細胞、3T3細胞、又はWI38細胞を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、宿主細胞は、ミエローマ細胞、例えば、NS0細胞、45.6TG1.7細胞、AF 2クローン9B5細胞、AF 2クローン9B5細胞、J558L細胞、MOPC315細胞、MPC 11細胞、NCI H929細胞、NP細胞、NS0/1細胞、P3 NS1 Ag4細胞、P3/NS1/1 Ag4 1細胞、P3U1細胞、P3X63Ag8細胞、P3X63Ag8.653細胞、P3X63Ag8U.1細胞、RPMI8226細胞、Sp20 Ag14細胞、U266B1細胞、X63AG8.653細胞、Y3.Ag.1.2.3細胞、及びYO細胞である。昆虫細胞の非限定的な例には、Sf9、Sf21、キンウワバ（*Trichoplusia ni*）、スポドプテラ・フルギペルダ、及びカイコを含む。特定の実施態様において、哺乳類細胞培養系（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞又はベビーハムスター腎臓細胞）は、インフルエンザ赤血球凝集素ステムドメインポリペプチドの発現に用いられる。

【0130】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、植物細胞培養系は、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原の発現に用いられる。例えば、植物細胞培養系を利用するタンパク質の産生のための植物細胞及び方法については、米国特許第7,504,560号；第6,770,799号；第6,551,820号；第6,136,320号；第6,034,298号；第5,914,935号；第5,612,487号；及び第5,484,719号、並びに米国特許出願公報第2009 / 0208477号、第2009 / 0082548号、第2009 / 0053762号、第2008 / 0038232号、第2007 / 0275014号、及び第2006 / 0204487号を参照されたい。

【0131】

ある実施態様において、植物（例えば、タバコ属の植物）は、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を発現するよう操作され得る。具体的な実施態様において、植物は、当該技術分野で公知の方法を用いたアグロインフィルトレーション（agro infiltration）手順を介してインフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を発現するよう操作される。例えば、関心対象の遺伝子、例えば、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする遺伝子をコードする核酸は、アグロバクテリウムの株へと導入される。その後、前記株を液体培養で増殖させ、結果として生じる細菌を洗浄し、緩衝溶液へと懸濁する。次に、植物をインフルエンザウイルスに由来し若しくはそれから得られる抗原をコードする核酸を含むアグロバクテリウムに曝露し（例えば、注入又は水浸を介する。）、それによりアグロバクテリウムが関心対象の遺伝子を植物細胞の一部へと形質転換するようにする。次に、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原は、植物によって一過性に発現し、当該技術分野で公知の方法及び本明細書に説明される方法を用いて単離することができる（具体例については、Shojiらの文献（2008, *Vaccine*, 26（23）：2930-2934）；及びD'Aoustらの文献（2008, *J. Plant Biotechnology*, 6（9）：930-940））。具体的な実施態様において、植物はタバコ植物である（すなわち、タバコ）。別の具体的な実施態様において、植物は、タバコ植物の類縁体である（すなわち、ベンサムアナタバコ）。他の実施態様において、藻類（例えば、コナミドリムシ）は、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を発現するよう操作され得る（例えば、Rasalaらの文献（2010, *Plant Biotechnology Journal*（2010年3月7日にオンライン公開）））。

【0132】

発現ベクターは、従来有形質転換又はトランスフェクション技術を介して宿主細胞に導入することができる。このような技術には、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、DEAE デキストラン仲介性トランスフェクション、リポフェクション、及び電気穿孔法を含むが、これらに限定されない。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするのに好適な方法は、Sambrookらの文献「分子クローニング 実験室マニュアル第2版（*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Edition）」（Cold Spring Harbor Press, New York, 1989）及び他の実験室マニュアルにおいて見出すことができる。ある実施態様において、宿主細胞は、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸を含む発現ベクターで一過性にトランスフェクトされる。他の実施態様において、宿主細胞は、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされる。

【0133】

哺乳類細胞の安定したトランスフェクションのために、用いられる発現ベクター及びトランスフェクション技術に応じて、細胞の小画分のみが外来DNAを前記細胞のゲノムへと組み込み得る。これらの組み込み体を同定及び選択するために、（例えば、抗生物質に対する耐性について）選択可能なマーカーをコードする核酸は一般的に、関心対象の核酸とともに宿主細胞へと導入される。選択可能なマーカーの例には、G418、ハイグロマイシン、及びメトトレキサートなど、薬剤に対する耐性を与えるものを含む。導入した核酸で安定してトランスフェクトした細胞は、薬剤選択によって同定することができる（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存する一方で、その他の細胞は死滅する。）。

10

20

30

40

50

【0134】

宿主細胞を用いたインフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原の組換え発現に対する代替例として、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原をコードする核酸を含む発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写及び翻訳することができる。具体的な実施態様において、Promega TNT（登録商標）などの共役転写／翻訳システム、又は転写及び翻訳に必要な構成要素を含む細胞可溶化液又は細胞抽出物を用いて、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を作製し得る。

【0135】

一旦、インフルエンザウイルスに由来し又はそれから得られる抗原を作製すると、前記抗原をタンパク質の単離又は精製のために、当該技術分野で公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティ、とくに特異的抗原に対するアフィニティ、プロテインAによる、及び分子ふるいカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差次的溶解度によって、又はタンパク質の単離若しくは精製のための任意の他の標準的な技術によって、単離又は精製し得る。

【0136】

(5.2 抗体)

インフルエンザウイルスの抗原的に異なる株に結合しかつ中和する、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体が、本明細書に提供される。具体的な実施態様において、当業者に公知の技術、例えば、結合についてのELISA又はウェスタンブロット法、及び後掲の実施例6に説明されるような微量中和アッセイによって測定されるような、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの抗原的に異なる株に結合しかつ中和する、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体が本明細書に提供される。

【0137】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスのある群、クラスター、又はサブタイプ、例えば、第2群インフルエンザウイルス又はインフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプのHA領域に結合する、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体が本明細書に提供される。ある実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルスの別の群又はサブタイプよりも、インフルエンザウイルスのある群、クラスター、又はサブタイプ（例えば、第2群インフルエンザウイルス又はインフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプ）に対する高い親和性を有する。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスのある群、クラスター、又はサブタイプ（例えば、第2群インフルエンザウイルス又はインフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプ）に対する、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナルの親和性は、インフルエンザウイルスの別の群、クラスター、又はサブタイプに対する前記モノクローナル抗体の親和性よりも1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、10倍超、1~2倍、1~5倍、1~10倍、2~5倍、2~10倍、5~10倍、10~15倍、又は10~20倍大きい。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスのある群、クラスター、又はサブタイプ（例えば、第2群インフルエンザウイルス又はインフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプ）についての、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体の親和性は、インフルエンザウイルスの別の群、クラスター、又はサブタイプに対するモノクローナル抗体の親和性よりも0.5 log、1 log、1.5 log、2 log、2.5 log、3 log、3.5 log、又は4 log大きい。

【0138】

具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタンブロット法、FACs、又はピアコアによって評価されるように、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原に対するインフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に選択的に結合する。換言すれば、前記モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の技術、例えば、ELISA、ウェスタ

10

20

30

40

50

ンプロット、FACs、又はピアコアによって評価されるように、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原よりも高い親和性を有する、インフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に結合する。具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原に結合するものよりも1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、10倍超、1~2倍、1~5倍、1~10倍、2~5倍、2~10倍、5~10倍、10~15倍、又は10~20倍大きな親和性を有する、インフルエンザウイルスの1、2、3、又はそれより多くの株によって発現する赤血球凝集素に結合する。具体的な実施態様において、前記モノクローナル抗体は、非インフルエンザウイルス赤血球凝集素抗原に結合するものよりも0.5 log、1 log、1.5 log、2 log、2.5 log、3 log、3.5 log、又は4 log大きな親和性を有する、インフルエンザ

10

20

30

40

50

【0139】

具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域に結合することができる。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、例えば、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)のHA2領域の長いアルファヘリックスに結合することができる。具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの長いアルファヘリックス(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたアミノ酸76~130)に結合し、すなわち、前記抗体は、以下のアミノ酸配列内のエピトープを結合する：

【化3】

RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA

(配列番号125)

別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの304~513、330~513、345~513、360~513、375~513、390~513、及び/又は405~513の範囲内のアミノ酸残基に結合する。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドの330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~435、及び/又は405~513の範囲内のアミノ酸残基(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされる赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1~184、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184)に結合することができる。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸405~513内に位置するA/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドにおけるエピトープに結合することができ、すなわち、前記抗体は、以下のアミノ酸配列内のエピトープを結合する：

【化4】

RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN AELLVALENQ

HTIDLTDSEM NKLFEKTRRQ LRENAEDMGN GCFKIYHKCD NACIESIRNG

TYDHDVYRDE ALNNRFQIKG VELKSGYKD (配列番号1)

。【0140】

別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされる、アミ

ノ酸76～106内に位置するA/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドにおけるエピトープに結合することができ(Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DCの文献「3A解像におけるインフルエンザウイルスの赤血球凝集素膜糖タンパク質の構造(Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution)」(Nature 289:366-373(1981)))、すなわち、前記抗体は、以下のアミノ酸配列内のエピトープを結合する：

【化5】

RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQH (配列番号124)

。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされるアミノ酸73～103、73～104、73～105、73～106、73～107、73～108、73～109、74～103、74～104、74～105、74～106、74～107、74～108、74～109、75～103、75～104、75～105、75～106、75～107、75～108、75～109、76～103、76～104、76～105、76～107、76～108、76～109、77～103、77～104、77～105、77～106、77～107、77～108、77～109、78～103、78～104、78～105、78～106、78～107、78～108、78～109、79～103、79～104、79～105、79～106、79～107、79～108、又は79～109内に位置するA/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドにおけるエピトープに結合することができる。

【0141】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるモノクローナル抗体は、7A7と指定された抗体である。別の実施態様において、本明細書に提供されるモノクローナル抗体は、12D1と指定された抗体である。別の具体的な実施態様において、提供されるモノクローナルは、39A4と指定された抗体である。別の実施態様において、提供されるモノクローナルは、66A6と指定された抗体である。7A7と指定された抗体、12D1と指定された抗体、39A4と指定された抗体、及び66A6と指定された抗体の抗原結合断片(例えば、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片)が本明細書に包含される。7A7、12D1、及び39A4の各抗体を産生するハイブリドーマは、ATCC受入番号PTA 10058、PTA 10059、及びPTA10060の下でそれぞれ、2009年5月22日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)によりブダペスト条約の規定の下で保管され、引用により本明細書に組み込まれる。66A6抗体を産生するハイブリドーマは、ATCC受入番号PTA _____の下で2010年5月25日に米国培養細胞系統保存機関(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)によりブダペスト条約の規定の下で保管され、引用により本明細書に組み込まれる。

【0142】

当業者に公知の技術を用いて決定されるように、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株に対する結合について、7A7抗体、12D1抗体、39A4抗体、又は66A6抗体と競合する(モノクローナル抗体などの)抗体が、本明細書に提供される。具体的な実施態様において、抗体は、当業者に公知の技術を用いて決定されるように、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)に対する結合について、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6と競合する。別の具体的な実施態様において、抗体は、当業者に公知の技術を用いて決定されるように、インフルエンザA型株A/アラバマ/1/1981(H3)に対する結合について、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6と競合する。別の具体的な実施態様において、抗体は、当業者に公知の技術を用いて決定されるように、インフルエンザA型ウイルス株A/北京/47/1992(H3)に対する結合について、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6と競合する。別の具体的な実施態様において、抗体は、当業者に公知の技術を用いて決定されるように、インフルエンザA型ウイルス株A/ワイオミング/3/2003(H3)に対する結合について、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6と競合する。当業者に公知の競合アッセイを用いて、インフルエンザウイルスのH3サブタイプの株に対する結合について、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6との抗体の競合を評価し得る。例えば、競合的フォーマットにおけるイムノアッセイ(例えば、ELISA)が用いられ得る。

【 0 1 4 3 】

抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変軽（VL）鎖及び／又は可変重（VH）鎖を含むインフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体が本明細書に提供される。一実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL鎖又はVH鎖を含む。別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVL鎖、及び別の抗体のVH鎖を含む。別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH鎖、及び別の抗体のVL鎖を含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7のVL鎖及び抗体12D1、39A4、又は66A6のVH鎖；抗体12D1のVL鎖及び抗体7A7、39A4、又は66A6のVH鎖；抗体39A4のVL鎖及び抗体7A7、12D1、又は66A6のVH鎖；抗体66A6のVH鎖及び抗体7A7、12D1、又は39A4のVL鎖；あるいは、抗体66A6のVL鎖及び抗体7A7、12D1、又は39A4のVH鎖を含む。具体的な実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株に結合し、ある実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株を中和する。

10

【 0 1 4 4 】

抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメイン及び／又はVHドメインを含むインフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体が、本明細書に提供される。一実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメイン又はVHドメインを含む。別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメイン、及び別の抗体のVHドメインを含む。別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメイン、及び別の抗体のVLドメインを含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7のVLドメイン及び抗体12D1、39A4、又は66A6のVHドメイン；抗体12D1のVLドメイン及び抗体7A7、39A4、又は66A6のVHドメイン；抗体39A4のVLドメイン及び抗体7A7、12D1、又は66A6のVHドメイン；抗体66A6のVHドメイン及び抗体7A7、12D1、又は39A4のVLドメイン；あるいは抗体66A6のVLドメイン及び抗体7A7、12D1、又は39A4のVHドメインを含む。具体的な実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株に結合し、ある実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株を中和する。VHドメイン又はVLドメインはそれぞれ、可変重鎖又は可変軽鎖の可変領域を指す。

20

30

【 0 1 4 5 】

抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVL鎖及び抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVHドメインを、又は抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVLドメイン及び抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVH鎖を含む。一実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6、のVL鎖、及び別の抗体のVHドメインを含む。別の実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVLドメイン、及び別の抗体のVH鎖を含む。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7のVL鎖及び抗体12D1、39A4、若しくは66A6のVHドメイン；抗体7A7のVLドメイン及び抗体12D1、39A4、若しくは66A6のVH鎖；抗体12D1のVL鎖及び抗体7A7、39A4、若しくは66A6のVHドメイン；抗体12D1のVLドメイン及び抗体7A7、39A4、若しくは66A6のVH鎖；抗体39A4のVL鎖及び抗体7A7、12D1、若しくは66A6のVHドメイン；抗体66A6のVL鎖及び抗体7A7、12D1、若しくは39A4のVHドメイン；又は抗体66A6のVLドメイン及び抗体7A7、12D1、若しくは39A4のVH鎖を含む。具体的な実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株に結合し、ある実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株を中和する。

40

【 0 1 4 6 】

50

抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変重鎖（VH CDR）1、2、又は3の相補性決定領域（CDR）及び抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の可変軽鎖（VL CDR）の1、2、又は3のCDRを含むインフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体が本明細書に提供される。ある実施態様において、インフルエンザA型ウイルスの株に結合する抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、若しくは66A6のVH CDR1及びVL CDR1；VH CDR1及びVL CDR2；VH CDR1及びVL CDR3；VH CDR2及びVL CDR1；VH CDR2及びVL CDR2；VH CDR2及びVL CDR3；VH CDR3及びVL CDR1；VH CDR3及びVL CDR2；VH CDR3及びVL CDR3；VH1 CDR1、VH CDR2、及びVL CDR1；VH CDR1、VH CDR2、及びVL CDR2；VH CDR1、VH CDR2、及びVL CDR3；VH CDR2、VH CDR3、及びVL CDR1；VH CDR2、VH CDR3及びVL CDR2；VH CDR2、VH CDR3及びVL CDR3；VH CDR1、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR1、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR2、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR2、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3及びVL CDR1；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3及びVL CDR2；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR1、VH CDR2、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR3；VH CDR2、VH CDR3、VL CDR2及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR2；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3；VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3；又はVH CDR及びVL CDRの任意の組み合わせを含む（か又はそれに代わるものとしてこれらからなる）。具体的な実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株に結合し、ある実施態様において、このような抗体は、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプの株を中和する。

【0147】

抗体7A7、12D1、39A4、及び/又は66A6の配列は、当業者に公知の標準的な技術を用いて決定することができ、VH鎖、VL鎖、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、及びVL CDRは、例えばKabat番号付けシステムを用いて決定することができる（例えば、KabatにおけるEUインデックスなど）。

【0148】

抗体7A7のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列を図19に示す。抗体7A7のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列を図20に示す。抗体12D1のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列を図21に示す。抗体12D1のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列を図22に示す。抗体66A6のVH鎖及びVL鎖の推定ヌクレオチド配列を図28に示す。抗体66A6のVH鎖及びVL鎖の推定アミノ酸配列を図29に示す。図19、20、21、22、28、及び29において、核酸配列に相応するフレームワーク及びCDR領域をそれぞれ太字及び下線で示す。当業者は、当該技術分野で公知の技術を用いて（例えば、以下のウェブサイトwww.expasy.ch/tools/dna.htmlに提供されるプログラムを用いて）、アミノ酸配列におけるフレームワーク領域及びCDRの位置を容易に決定することができる。

【0149】

本明細書に提供される、又は本明細書に提供される方法に従って作製された抗体には、すなわち前記抗体に対する任意の種類の子の共有結合によって化学的に修飾された誘導体を含む。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体には、例えば、公知の保護基/遮断基、タンパク質分解性切断、細胞リガンド若しくは他のタンパク質への連結などによるグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、誘導体化によって化学的に修飾された抗体を含む。任意の幾多の化学的修飾は、特異的的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る。加えて、誘導体は、1以上の非古典的なアミノ酸を含み得る。

【0150】

本明細書に提供される、又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、当業者に公知のフレームワーク領域を含むことができる（例えば、ヒト断片又は非ヒト断片

)。フレームワーク領域は、天然フレームワーク領域又はコンセンサスフレームワーク領域であり得る（例えば、Suiらの文献（2009, Nature Structural & Molecular Biology 16 : 265-273）参照）。

【0151】

また、本明細書に提供される抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体をコードする核酸が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体をコードする核酸分子（複数可）が単離される。他の実施態様において、本明細書に提供される抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体をコードする核酸（複数可）は単離されない。なおも他の実施態様において、本明細書に提供される抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体をコードする核酸（複数可）は、例えば、染色体DNA又は発現ベクターに組み込まれる。具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸（複数可）は、抗体7A7、12D1、39A4、66A6、又はそれらの断片（特にそれらの抗原結合断片）をコードする。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸（複数可）は、インフルエンザウイルスHAに結合する、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVHドメインを含む抗体をコードする。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸（複数可）は、インフルエンザウイルスHAに結合する、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVLドメインを含む抗体をコードする。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸（複数可）は、インフルエンザウイルスHAに結合する、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH及びVLドメインを含む抗体をコードする。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される核酸（複数可）は、インフルエンザウイルスHAに結合する、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の1、2、若しくは3のVH CDR及び/又は1、2、若しくは3のVL CDRを含む抗体をコードする。ある実施態様において、核酸は、インフルエンザウイルスHAに結合するだけでなく、インフルエンザウイルスを中和することもする抗体をコードする。

【0152】

本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、当業者に公知の技術を用いて成熟された親和性であり得る。本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、当業者に公知の技術を用いてキメラ化することができる。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を作製する方法は当該技術分野で公知である。例えば、これらのすべての内容が引用により本明細書に組み込まれるMorrisonの文献（1985, Science 229 : 1202）；Oiらの文献（1986, BioTechniques 4 : 214）；Gilliesらの文献（1989, J. Immunol. Methods 125 : 191-202）；並びに米国特許第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号、及び第6,331,415号を参照されたい。

【0153】

本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、ヒト化することができる。ヒト化抗体は、あらかじめ決めておいた抗原に結合することができかつヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域と、非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRとを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに相応し（すなわち、ドナー抗体）、かつフレームワーク領域のすべて又は実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものに相応する、少なくとも1の、典型的には2の変域ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv）の実質的にすべてを含む。好ましくは、また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものを含む。通常、抗体は、軽鎖と重鎖の少なくとも可変ドメインとの両方を含む。また、抗体は、重鎖のCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域、及びCH4領域を含み得る。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含む免疫グロブリンの任意のクラス、並びにIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含むアイ

ソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞傷害性活性を呈することが所望である相補的な固定する定常ドメインであり、クラスは典型的にはIgG1である。このような細胞傷害性活性が望ましくない場合、定常ドメインは、IgG2クラスであり得る。ある実施態様において用いることのできるVL定常ドメイン及びVH定常ドメインの例には、Johnsonらの文献 (J. Infect. Dis. 176, 1215-1224 (1997)) に説明されたC₁及びC₂ (nG1m)、並びに米国特許第5,824,307号に説明されたものを含むが、これらに限定されない。ヒト化抗体は、2以上のクラス又はアイソタイプに由来する配列を含み得、特定の定常ドメインを選択して、所望のエフェクター機能を最適化することは、当該技術分野における通常の技術内である。ヒト化抗体のフレームワーク領域及びCDR領域は、親配列に精確に相応する必要はなく、例えば、ドナーCDR又はコンセンサスフレームワークは、少なくとも1の残基の置換、挿入、又は欠失によって突然変異され得、それにより、その部位におけるCDR又はフレームワーク残基は、コンセンサス又は移入抗体のいずれにも相応しない。しかしながら、このような突然変異は広範ではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%は、親フレームワーク配列及びCDR配列の残基に相応し、より頻繁には90%、最も好ましくは95%超である。ヒト化抗体は、CDR移植 (欧州特許第EP239,400号; 国際公報第WO 91/09967号; 並びに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、及び第5,585,089号)、化粧張り (veneering) 又は表面修復 (resurfacing) (欧州特許第EP592,106号及び第EP519,596号; Padlanの文献 (Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498, 1991); Studnickaらの文献 (Protein Engineering 7(6): 805-814, 1994); 並びにRoguskaらの文献 (PNAS 91: 969-973, 1994))、鎖シャッフリング (米国特許第5,565,332号)、並びに例えば、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、WO 9317105、Tanらの文献 (J. Immunol. 169: 1119-1125 (2002))、Caldasらの文献 (Protein Eng. 13(5): 353-60 (2000))、Moreaらの文献 (Methods 20(3): 267-79 (2000))、Bacaらの文献 (J. Biol. Chem. 272(16): 10678-84 (1997))、Roguskaらの文献 (Protein Eng. 9(10): 895-904 (1996))、Coutoらの文献 (Cancer Res. 55 (23補): 5973s-5977s (1995))、Coutoらの文献 (Cancer Res. 55(8): 1717-22 (1995))、Sandhu JSらの文献 (Gene 150(2): 409-10 (1994))、及びPedersenらの文献 (J. Mol. Biol. 235(3): 959-73 (1994)) に開示された技術を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で公知の種々の技術を用いて作製することができる。また、そのすべての内容が引用により本明細書に組み込まれている米国特許公報第US2005/0042664 A1 (2005年2月24日) を参照されたい。しばしば、フレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、CDRドナー抗体由来の相応する残基と置換されて、抗原結合を変更、好ましくは改良する。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野で周知の方法によって、例えば、CDR残基及びフレームワーク残基の相互作用をモデル化して、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定すること、並びに配列比較して、特定の位置における通常ではないフレームワーク残意を同定することによって、同定される (例えば、それらのすべての内容が引用により本明細書に組み込まれるQueenらの文献 (米国特許第5,585,089号); 及びReichmannらの文献 (Nature 332: 323, 1988) 参照)。

【0154】

(5.2.1 延長した半減期を有する抗体)

インピボで延長した (extended) (又は延長した (increased)) 半減期を有するよう修飾された抗体が、本明細書に提供される。とくに、対象、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトにおける約3日間~約180日間 (又はそれより多い)、及びいくつかの実施態様において、3日間超、7日間超、10日間超、15日間超、20日間超、25日間超、30日間超、35日間超、40日間超、45日間超、50日間超、少なくとも約60日間、75日間超、90日間超、105日間超、120日間超、135日間超、150日間超、165日間超、又は180日間超の半減期を有する修飾された抗体が本明細書に提供される。

【0155】

具体的な実施態様において、インピボで延長した半減期を有する修飾された抗体は、1以上のアミノ酸修飾 (すなわち、置換、挿入、又は欠失) をIgG定常ドメイン、又はそのF

cRn結合断片（好ましくは、Fc又はヒンジ Fcドメイン断片）に導入することによって作製される。例えば、それらのすべての内容が各々、引用により本明細書に組み込まれる国際公報第WO 02/060919号；第WO 98/23289号；及び第WO 97/34631号；並びに米国特許第6,277,375号を参照されたい。具体的な実施態様において、修飾された抗体は、Kabat番号付けシステムに従った番号付け（例えば、KabatにおけるEUインデックス）による、第二の定常CH2ドメイン（ヒトIgG1の残基231～340）及び/又は第三定常CH3ドメイン（ヒトIgG1の残基341～447）における1以上のアミノ酸修飾を有し得る。

【0156】

いくつかの実施態様において、抗体のインビボでの血清循環を長期化するために、高分子量ポリエチレングリコール（PEG）などの不活性ポリマー分子を抗体に、PEGの抗体のN末端若しくはC末端への部位特異的抱合を通じて、又はリシン残基に存在するイプシロンアミノ基を介してのいずれかで多機能性リンカーを用いて又は多機能性リンカーなしで、結合させる。最小の生物学的活性の損失を結果として生じる直鎖又は分岐鎖ポリマー誘導体化が使用される。抱合の程度は、SDS PAGE及び質量分析によって密接にモニターして、PEG分子の抗体への適切な抱合を確実にすることができる。未反応のPEGは、分子ふるいクロマトグラフィーによって又はイオン交換クロマトグラフィーによって分離することができる。PEG誘導体化抗体は、当業者に周知の方法を用いて、結合活性について、及びインビボでの有効性について、例えば、本明細書に説明されるイムノアッセイによって試験することができる。

【0157】

別の実施態様において、抗体は、抗体をインビボでより安定させるために、又はインビボでより長い半減期を有するために、アルブミンに抱合される。この技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、それらがすべて引用により本明細書に組み込まれる国際公報第WO 93/15199号、第WO 93/15200号、及び第WO 01/77137号；並びに欧州特許第EP 413,622号を参照されたい。

【0158】

（5.2.2 抗体抱合体）

いくつかの実施態様において、抗体は、診断薬、検出可能薬、若しくは治療薬、又はその他の分子に抱合され又は組換え融合される。インビボでの半減期が長くなることが所望である場合、前記抗体は、修飾された抗体であり得る。抱合され又は組換え融合された抗体は、例えば、特定の療法の有効性を決定するなど、臨床試験手順の一部として、インフルエンザウイルス疾患の発症、発達、進行、及び/又は重症度をモニター又は予知するために有用であり得る。このような診断及び検出は、抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、若しくはアセチルコリンエステラーゼなどだがこれらに限定されない種々の酵素；ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンなどだがこれらに限定されない補欠分子族；ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、若しくはフィコエリトリンなどだがこれらに限定されない蛍光材料；ルミノールなどだがこれに限定されない発光材料；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンなどだがこれらに限定されない生物発光材料；ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、及び ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、及び ^{111}In ）、テクネチウム（ ^{99}Tc ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、及び ^{117}Sn などだがこれらに限定されない放射性材料；並びに、種々の陽電子放射断層撮影法を用いる陽電子放射金属、及び非放射性常磁性金属イオンに共役させることによって達成することができる。

【0159】

異種性のタンパク質又はポリペプチド（又はその断片、好ましくは約10、約20、約30、

約40、約50、約60、約70、約80、約90、若しくは約100のアミノ酸からなるポリペプチドに)に組換え融合し又は化学的に抱合して(共有抱合及び非共有抱合の両方を含む。)、融合タンパク質を生じる抗体が本明細書に包含される。特に、モノクローナル抗体の抗原結合断片(例えば、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)₂断片、VHドメイン、VH CDR、VLドメイン、又はVL CDR)と、異種性のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドとを含む融合タンパク質が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、抗体が融合する異種性のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドは、抗体を特定の細胞種に向かわせるのに有用である。

【0160】

一実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体と異種性ポリペプチドとを含む。別の実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体の抗原結合断片と異種性ポリペプチドとを含む。別の実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、若しくは66A6抗体のVHドメインのうちの任意の1のアミノ酸配列を有する1、2、又はそれより多くのVHドメイン、又は7A7、12D1、39A4、若しくは66A6抗体のVLドメインのうちの任意の1のアミノ酸配列を有する1以上のVLドメインと、異種性ポリペプチドとを含む。別の実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体のVH CDRのうちの任意の1のアミノ酸配列を有する1、2、又はそれより多くのVH CDRと、異種性ポリペプチドとを含む。別の実施態様において、融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体のVL CDRのうちの任意の1のアミノ酸配列を有する1、2、又はそれより多くのVL CDRと、異種性ポリペプチドとを含む。別の実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体の少なくとも1のVHドメイン及び少なくとも1のVLドメインと、異種性ポリペプチドとを含む。なお別の実施態様において、本明細書に提供される融合タンパク質は、7A7、12D1、39A4、又は66A6抗体の少なくとも1のVH CDR及び少なくとも1のVL CDRと、異種性ポリペプチドとを含む。ある実施態様において、先に引用された抗体は、本明細書に説明される修飾されたIgG(例えば、IgG1)定常ドメイン、又はそのFcRn結合断片(例えば、Fcドメイン又はヒンジ Fcドメイン)を含む。

【0161】

所定の生物学的応答を修飾する治療部分又は薬剤部分に抱合され又は組換え融合した抗体の使用が、本明細書に包含される。治療部分又は薬剤部分は、古典的な化学治療薬に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質、ペプチド、又はポリペプチドであってよい。このようなタンパク質には、例えば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、インターロイキン 2(「IL 2」)、インターロイキン 4(「IL 4」)、インターロイキン 6(「IL 6」)、インターロイキン 7(「IL 7」)、インターロイキン9(「IL 9」)、インターロイキン 10(「IL 10」)、インターロイキン 12(「IL 12」)、インターロイキン 15(「IL 15」)、インターロイキン 18(「IL 18」)、インターロイキン 23(「IL 23」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G CSF」)、増殖因子、又はデフェンシンを含み得る。抗体に抱合され又は組換え融合された治療部分又は薬剤は、所望の予防効果(複数可)又は治療効果(複数可)を達成するよう選択されるべきである。ある実施態様において、抗体抱合体は、本明細書で説明される予防的使用又は治療的使用のために用いられ得る。ある実施態様において、抗体は、修飾された抗体である。臨床医又は他の医学専門家は、抗体に抱合し又は組換え融合する治療部分又は薬剤をいずれにするかを決定する際に、以下を考慮すべきである:疾患の性質、疾患の重症度、及び対象の容態。

【0162】

その上、抗体は、ペプチドなどのマーカー配列に融合して、精製を容易にすることができる。好ましい実施態様において、マーカーアミノ酸配列は、pQEベクター(QIAGEN, Inc)において提供されるタグなどの、ヘキサ-ヒスチジンペプチド(すなわち、Hisタグ)で

10

20

30

40

50

あり、とりわけ、この多くは市販されている。例えば、Gentzらの文献(1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824)に説明されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製のために備える。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質(Wilsonらの文献(1984, Cell 37:767))に由来するエピトープに相応する赤血球凝集素(「HA」)タグ、及び「フラッグ(flag)」タグを含むが、これに限定されない。

【0163】

治療部分(ポリペプチドを含む)を抗体に融合又は抱合する方法は周知であり、例えば、Arnonらの文献「癌療法における薬剤のイムノターゲットイングのためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」(「モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)」Reisfeldら(編)、pp.243-56(Alan R. Liss, Inc. 1985)); Hellstromらの文献「薬剤送達のための抗体(Antibodies For Drug Delivery)」(「徐放性薬剤送達第2版(Controlled Drug Delivery (2nd Ed.))」Robinsonら(編)、pp.623-53(Marcel Dekker, Inc. 1987)); Thorpeの文献「癌療法における細胞傷害性薬剤の抗体担体:総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」(「モノクローナル抗体84:生物学的及び臨床的応用(Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications)」Pincheraら(編)、pp.475-506(1985)); 「癌療法における放射性標識した抗体の治療的使用の分析、結果、及び将来的な見込み(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」(「癌の検出及び療法のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)」Baldwinら(編)、pp.303-16(Academic Press 1985)); Thorpeらの文献(1982, Immunol. Rev. 62:119-58); --C米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、第5,723,125号、第5,783,181号、第5,908,626号、第5,844,095号、及び第5,112,946号; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT公報WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631、及びWO 99/04813; Ashkenaziらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539, 1991); Trauneckerらの文献(Nature, 331:84-86, 1988); Zhengらの文献(J. Immunol., 154:5590-5600, 1995); Vilらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341, 1992)を参照されたく; それらのすべての内容は引用により本明細書に組み込まれる。

【0164】

特に、融合タンパク質は、例えば、遺伝子 シャッフリング、モチーフ シャッフリング、エクソン シャッフリング、及び/又はコドン シャッフリングの技術を通じて作製され得る(集約的に「DNAシャッフリング」と呼ぶ。)。DNAシャッフリングは、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体の活性を変更させるために採用され得る(例えば、より高い親和性及びより低い解離速度を有する抗体)。一般的には、米国特許第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号、及び第5,837,458号; Pattenらの文献(1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33); Harayama(1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82); Hanssonらの文献(1999, J. Mol. Biol. 287:265-76); 並びにLorenzo及びBlascoの文献(1998, Biotechniques 24(2):308-313)を参照されたい(これらの特許及び刊行物の各々はそのすべての内容が引用により本明細書により組み込まれる。)。抗体又はコードされた抗体は、エラープローンPCRによる無作為な突然変異誘発、無作為なヌクレオチド挿入、又は組換え前の他の方法に供されることによって変更し得る。本明細書に説明されるモノクローナル抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、1以上の異種性分子の1以上の構成要素、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などで組換えられ得る。

【0165】

また、抗体は、二次抗体に抱合されて、そのすべての内容が引用により本明細書に組み

込まれる米国特許第4,676,980号のSegalによって説明されるような抗体ヘテロ抱合体を形成することができる。

【0166】

また、抗体は、1以上の抗体に直接的に又は間接的に連結して、二重特異性/多特異性抗体を作製することができる。

【0167】

また、抗体は、抗原のイムノアッセイ又は精製に特に有用な固相支持体に付着することができる。このような固相支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル、又はポリプロピレンを含むが、これらに限定されない。

10

【0168】

(5.3 抗体の作製)

本明細書に説明される抗体は、抗体の合成について当該技術分野で公知の任意の方法によって、特に化学合成によって、又は好ましくは組換え発現技術によって作製することができる。本明細書に提供される方法は、別段の記載がない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子分析、組換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成及び修飾、核酸ハイブリダイゼーション、並びに当該技術分野の技術内の関連分野における従来技術を包含する。これらの技術は、本明細書に引用される参考文献において説明されており、前記文献において完全に説明されている。例えば、Maniatisらの文献「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)) ; Sambrookらの文献「分子クローニング：実験室マニュアル第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) ; Sambrookらの文献「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)) ; Ausubelらの文献「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」(John Wiley & Sons (1987及び年次更新)) ; 「免疫学における最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」(John Wiley & Sons (1987及び年次更新)) Gait (編) 「オリゴヌクレオチド合成：実用的アプローチ (Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)」(IRL Press (1984)) ; Eckstein (編) 「オリゴヌクレオチド及びアナログ：実用的アプローチ (Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach)」(IRL Press (1991)) ; Birrenら (編) 「ゲノム分析：実験室マニュアル (Genome Analysis: A Laboratory Manual)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)) を参照されたい。

20

30

【0169】

抗体の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。一旦、抗体をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の作製のためのベクターは、当該技術分野で周知の技術を用いた組換えDNA法によって作製され得る。したがって、抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を調製する方法が本明細書に説明されている。当業者に周知である方法を用いて、抗体コード配列並びに適切な転写制御シグナル及び翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えを含む。したがって、プロモーターに作用可能に連結された抗体をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターが本明細書に提供される。このようなベクターには、抗体の定常領域及び抗体の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列が、全重鎖、全軽鎖、又は全重鎖及び全軽鎖の両方の発現のために、このようなベクターにクローニングされ得る。

40

【0170】

発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと転移し、トランスフェクトされた細胞は次に従来技術によって培養され、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体を産生する。したがって、本

50

明細書に説明されるモノクローナル抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体又はそれらの断片、あるいはそれらの重鎖若しくは軽鎖又はそれらの断片、あるいは本明細書に説明される一本鎖モノクローナル抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される一本鎖モノクローナル抗体をコードする、異種性プロモーターに作用可能に連結されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞が、本明細書に提供される。二本鎖抗体の発現のための好ましい実施態様において、重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターは、下記に詳述されるように、全免疫グロブリン分子の発現のために、宿主細胞において共発現し得る。

【0171】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される宿主細胞は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6をコードする核酸を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される宿主細胞は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードする核酸を含み、該抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6のVH鎖若しくはVHドメイン及び/又はVL鎖若しくはVLドメインを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される宿主細胞は、インフルエンザウイルスHAに結合する抗体をコードする核酸を含み、該抗体は、抗体7A7、12D1、39A4、又は66A6の1、2、若しくは3のVH CDR及び/又は1、2、若しくは3のVL CDRを含む。具体的な実施態様において、前記抗体は、インフルエンザウイルスHAに結合するだけでなく、インフルエンザウイルスを中和することもする。

【0172】

種々の宿主 発現ベクター系を利用して抗体を発現させてよい（例えば、米国特許第5,807,715号参照）。このような宿主 発現系は、関心対象のコード配列が作製され得るその後精製され得るビヒクルを表し、しかし、適切なヌクレオチドコード配列を形質転換又はトランスフェクトされた場合に、インサイツで抗体を発現し得る細胞も表す。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌及び枯草菌）などの微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母（例えば、サッカロミセス ピキア）；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を感染させた、又は組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換した植物細胞系（第5.3節に説明される植物細胞系を含む。）；あるいは、哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター（adenovirus late promoter）；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現コンストラクトを有する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NS0、及び3T3細胞）を含むが、これらに限定されない。好ましくは、大腸菌などの細菌細胞、より好ましくは、真核細胞、特に組換え抗体全分子の発現用は、組換え抗体分子の発現に用いられる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳類細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な前初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターとともに、抗体に有効な発現系である（Foeckingらの文献（1986, Gene 45:101）；及びCockettらの文献（1990, Bio/Technology 8:2））。具体的な実施態様において、本明細書に説明されるモノクローナル抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、又は組織特異的プロモーターによって調節される。

【0173】

細菌の系において、いくつかの発現ベクターは、抗体分子が発現するよう意図された使用に応じて有利に選択され得る。例えば、抗体分子の医薬組成物の作製のために、多量のこのような抗体が産生されるべきである場合、高レベルの融合タンパク質の発現に方向づけるベクターが望ましくあり得る。このようなベクターには、抗体コード配列がlacZコード領域とインフレーションのベクターへと個々に連結され得、それにより融合タンパク質を作

10

20

30

40

50

製する大腸菌発現ベクター-pUR278 (Rutherらの文献 (1983, EMBO 12: 1791)) ; pINベクター (Inouye & Inouyeの文献 (1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 ; Van Heeke & Schusterの文献 (1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509)) ; 及びこれらに類するものを含むが、それらに限定されない。また、pGEXベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現し得る。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着及び結合の後の遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解された細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、トロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むよう設計され、それによりクローニングされた標的遺伝子産物がGST部分から放出されることが出来る。

10

【0174】

昆虫の系において、キンウワバ科 (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) は、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして用いられる。前記ウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞において増殖する。抗体コード配列は、前記ウイルスの非必須領域 (例えば、多角体遺伝子) へと個々にクローニングされ得、AcNPVプロモーター (例えば、多角体プロモーター) の制御下に配置され得る。

【0175】

哺乳類宿主細胞において、いくつかのウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、関心対象の抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及び三者間 (tripartite) リーダー配列に連結され得る。このキメラ遺伝子は次に、インビトロ又はインビボでの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1又はE3) における挿入は結果的に、感染宿主において生存可能でありかつ抗体分子を発現させることができる組換えウイルスを生じる (例えば、Logan & Shenkの文献 (1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359) 参照)。また、具体的な開始シグナルは、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳に必要とされ得る。これらのシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接の配列を含む。さらに、開始固ドンは、全インサートの翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームを有する相になければならない。これらの外来性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の両方の種々の起源に属する。発現の効率性は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写終結因子などの封入によって高められ得る (例えば、Bittnerらの文献 (1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544) 参照)。

20

30

【0176】

加えて、挿入された配列の発現を調節し、又は所望の具体的な様式で遺伝子産物を修飾及び加工する遺伝子宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のこのような修飾 (例えば、グリコシル化) 及び加工 (例えば、切断) は、タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセッシング及び修飾に特徴的なかつ特異的な機序を有する。適切な細胞株又は宿主系は、発現した外来性タンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを確実にするよう選択することができる。この目的のために、遺伝子産物の、一次転写産物の適切なプロセッシング、グリコシル化、及びリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が用いられ得る。このような哺乳類宿主細胞には、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、Vero、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、及びT47D、NS0 (いずれの免疫グロブリン鎖も内在的に産生しないマウスミエローマ細胞株)、CRL7030、及びHsS78Bst細胞を含むが、これらに限定されない。

40

【0177】

組換えタンパク質の長期の高収量産生のために、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリアデニル化部位など) によって制御されるDNA及び選択可能なマーカーを用いて形質転換することができる。外来性DNAの導入後、操

50

作された細胞は、増菌培地 (enriched media) において1~2日間増殖させておくことができ、次に、選択培地に切り替えられ得る。組換えプラスミドにおけるこれらの選択可能なマーカーは選択に対する耐性を与え、細胞に、プラスミドを前記細胞の染色体へと安定して組み込ませ、フォーカスを形成するよう増殖させ、順に前記フォーカスが細胞株へとクローニング及び増殖することができる。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために有利に用いられ得る。このような操作された細胞株は、抗体分子と直接的に又は間接的に相互作用する組成物のスクリーニング及び評価において特に有用であり得る。組換えDNA技術の分野において普遍的に公知の方法は、所望の組換え体クローンを選択するよう定型的に適用され得、このような方法は、例えば、それらのすべての内容が引用により本明細書に組み込まれるAusubelら(編)「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」(John Wiley & Sons, NY (1993)); Krieglerrの文献「遺伝子転移及び発現実験室マニュアル (Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual)」(Stockton Press, NY (1990)); 並びに; Dracopolisら(編)「ヒト遺伝学における最新プロトコール第12章及び第13章 (in Chapters 12 and 13, Current Protocols in Human Genetics)」(John Wiley & Sons, NY (1994)); Colberre-Garapinらの文献(1981, J. Mol. Biol. 150:1)において説明されている。

10

【0178】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる(総説については、Bebington及びHentschelの文献「DNAクローニングにおける哺乳類細胞におけるクローニングされた遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づいたベクターの使用, 第3巻 (The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3)」(Academic Press, New York, 1987)参照)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物において存在する阻害薬のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させるであろう。増幅された領域は、抗体遺伝子と会合するので、抗体の産生も増大するであろう(Crouseらの文献(1983, Mol. Cell. Biol. 3:257))。

20

【0179】

宿主細胞は、本明細書に提供される2つの発現ベクターを同時にトランスフェクトされ得、第一のベクターは、重鎖由来のポリペプチドをコードし、第二のベクターは、軽鎖由来のポリペプチドをコードする。2つのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択可能なマーカーを含み得る。あるいは、重鎖及び軽鎖の両ポリペプチドをコードしかつ発現することのできる単一のベクターが使用され得る。このような状況において、軽鎖は、重鎖の前に配置されて過剰量の毒素非含有重鎖を回避すべきである(Proudfootの文献(1986, Nature 322:52); 及びKohlerの文献(1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-2199))。重鎖及び軽鎖のコード配列は、cDNA又はゲノムDNAを含み得る。

30

【0180】

一旦、抗体が組換え発現によって産生されると、免疫グロブリン分子の精製のための当該技術分野で公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティ、特にプロテインA後の特異的抗原に対するアフィニティによって、及び分子ふるいカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差次的溶解度によって、又はタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって精製され得る。さらに、抗体は、本明細書に説明される異種性ポリペプチド配列又はそれに代わるものとして当該技術分野で公知の異種性ポリペプチド配列に融合して、精製を容易にし得る。

40

【0181】

加えて、ヒト抗体は、本明細書に説明される抗体を用いて作製され得る。選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「ガイドセレクション(guided selection)」と呼ばれる技術を用いて作製することができる。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を誘導する(Jespersらの文献(Bio/technology 12:899-903(1988)))

50

）。

【0182】

(5.4 組成物)

生理学的に許容し得る担体、賦形剤、又は安定剤において所望の程度の純度を有する抗体を含む組成物が本明細書に提供される（「Remingtonの医薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」（Mack Publishing Co., Easton, PA（1990）））。具体的な実施態様において、組成物は、第5.2.2節に説明されるような部分に抱合された抗体を含む。ある実施態様において、組成物は、半減期を延長するよう修飾された抗体を含む。許容し得る担体、賦形剤、又は安定剤は、採用される薬用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化薬；保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；メチルパラベン若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；金属錯体（例えば、Zn タンパク質複合体）；並びに／あるいはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

【0183】

具体的な実施態様において、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体において、抗体、及び任意に1以上の追加的な予防薬又は治療薬を含む。具体的な実施態様において、医薬組成物は、医薬として許容し得る担体において、有効量の抗体、及び1以上の追加的な予防薬又は治療薬を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、医薬組成物に含まれる唯一の活性成分である。本明細書に説明される医薬組成物は、インフルエンザウイルス感染の予防又は治療において有用であり得る。さらに、本明細書に説明される医薬組成物は、インフルエンザウイルス疾患の予防、治療、又は管理において有用であり得る。

30

【0184】

非経口調製物において用いられる医薬として許容し得る担体には、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、局所麻酔薬、懸濁剤及び分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖剤若しくはキレート剤、及び他の医薬として許容し得る物質を含む。水性ビヒクルの例には、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張性デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース及び乳酸リンゲル注射液を含む。非水性非経口ビヒクルには、植物起源の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、及びピーナッツ油を含む。静菌性濃度又は静真菌性濃度の抗菌剤は、フェノール若しくはクレゾール、水銀、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチル及びプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、並びに塩化ベンゼトニウムを含む複数回用量で包装された非経口調製物に添加することができる。等張剤には、塩化ナトリウム及びデキストロースを含む。緩衝剤には、リン酸及びクエン酸を含む。抗酸化剤には、重硫酸ナトリウムを含む。局所麻酔薬には、塩酸プロカインを含む。懸濁剤及び分散剤には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンを含む。乳化剤には、ポリソルベート80（TWEEN（登録商標）80）を含む。金属イオンの金属イオン封鎖剤又はキレート剤には、EDTAを含む。また、医薬担体には、水混和性ビヒクルのためのエチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びプロピレングリコール；並びにpH調整のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、又は乳酸を含む。

40

【0185】

50

医薬組成物は、対象への投与の任意の経路のために製剤され得る。投与の経路の具体的な例には、鼻内、経口、肺、経皮、皮内、及び非経口を含む。皮下、筋肉内、又は静脈内注射を特徴とする非経口投与も、本明細書において熟慮される。注射剤は、液体の溶液若しくは懸濁液として、注射前に液体における溶液若しくは懸濁液に好適な固体形態、又はエマルションとしてのいずれかで従来の形態で調製することができる。また、注射剤、溶液、及びエマルションは、1以上の賦形剤を含む。好適な賦形剤は例えば、水、塩類溶液、デキストロース、グリセロール、又はエタノールである。加えて、所望の場合、投与されるべき医薬組成物はまた、湿潤剤若しくは乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度増強剤、及び他のこのような薬剤、例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、及びシクロデキストリンなど、少量の非毒性補助物質を含むことができる。

10

【0186】

抗体の非経口投与のための調製物には、注射用に準備された滅菌溶液、皮下錠剤など、使用直前に溶媒と組み合わせるよう準備された凍結乾燥粉末などの滅菌乾燥可溶性製剤、注射用に準備された滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルと組み合わせるよう準備された滅菌乾燥不溶性製剤、及び滅菌エマルションを含む。溶液は、水溶性又は非水溶性のいずれかであってよい。

【0187】

静脈内に投与する場合、好適な担体には、生理塩類溶液又はリン酸緩衝塩類溶液（PBS）、並びにグルコース、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールなどの増粘剤及び可溶化剤を含む溶液、並びにこれらの混合物を含む。

20

【0188】

抗体を含む局所混合物は、局所投与及び全身投与について説明される通り調製される。結果として生じる混合物は、溶液、懸濁液、エマルション、又はこれらに類するものであり得、クリーム、ゲル、軟膏、エマルション、液剤、エリキシル剤、ローション剤、懸濁液、チンキ剤、ペースト剤、気泡剤、エアゾール剤、灌水、スプレー剤、坐剤、包帯、皮膚パッチ、又は局所投与に好適な任意の他の製剤として製剤することができる。

【0189】

抗体は、吸入などによる局所適用のためのエアゾールとして製剤することができる（例えば、炎症性疾患、特に喘息の治療に有用なステロイドの送達のためのエアゾールを説明する米国特許第4,044,126号、第4,414,209号、及び第4,364,923号参照）。気道への投与のためのこれらの製剤は、ネブライザーのためのエアゾール若しくは溶液の形態で、又は吹送法のための微細粒子として、単独で又は乳糖などの不活性担体との併用であり得る。このような場合、製剤の粒子は、一実施態様において50ミクロン未満の、一実施態様において10ミクロン未満の直径を有する。

30

【0190】

抗体は、ゲル、クリーム、及びローションの形態における、皮膚及び眼などにおける粘膜への局所適用のためなどの局所（local）又は局所（topical）適用のために、及び眼への適用のために、又は大槽内若しくは脊髄内適用のために製剤することができる。局所投与は、経皮送達のために熟慮され、また、眼若しくは粘膜への投与のために、又は吸入療法のために熟慮される。抗体単独の又は他の医薬として許容し得る賦形剤との併用での鼻内溶液も投与することができる。

40

【0191】

イオン泳動デバイス及び電気泳動デバイスを含む経皮パッチは、当業者に周知であり、抗体を投与するために用いることができる。例えば、このようなパッチは、米国特許第6,267,983号、第6,261,595号、第6,256,533号、第6,167,301号、第6,024,975号、第6,010715号、第5,986,317号、第5,983,134号、第5,948,433号、及び第5,860,957号において開示されている。

【0192】

ある実施態様において、抗体を含む医薬組成物は、凍結乾燥粉末であり、液剤、エマル

50

ション、及び他の混合物としての投与のために再構成することができる。また、固形物若しくはゲルとして再構成及び製剤され得る。凍結乾燥粉末は、本明細書に提供される抗体又はその医薬として許容し得る誘導体を好適な溶媒に溶解することによって調製される。いくつかの実施態様において、凍結乾燥粉末は滅菌済みである。溶媒は、安定性を改良する賦形剤、又は粉末若しくは粉末から調製された再構成溶液の他の薬理的構成要素を含み得る。用いられ得る賦形剤には、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース、又は他の好適な薬剤を含むが、これらに限定されない。また、溶媒は、クエン酸、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カリウム、又は当業者に公知の他のこのような緩衝液などの緩衝液を含み得、一実施態様において、ほぼ中性のpHである。溶液のその後の濾過滅菌の後の当業者に公知の標準的な条件下での凍結乾燥は、所望の製剤を提供する。一実施態様において、結果として生じる溶液は、凍結乾燥のためにバイアルへと分注される。各バイアルは、単回薬用量又は複数回薬用量の化合物を含む。凍結乾燥した粉末は、約4 ~ 室温など、適切な条件下で保存することができる。

10

【0193】

この凍結乾燥した粉末の注射用水による再構成は、非経口投与における使用のための製剤を提供する。再構成のために、凍結乾燥した粉末を滅菌水又は他の好適な担体に添加する。精確な量は、選択された化合物による。このような量は、経験的に決定することができる。

20

【0194】

また、抗体は、例えばリポソーム中に製剤することができる。関心対象の分子を含むリポソームは、Epsteinらの文献（(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3688）；Hwangらの文献（(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4030）；並びに米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号などに説明される、当該技術分野で公知の方法によって調製される。亢進した循環時間を有するリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。一実施態様において、リポソーム懸濁液はまた、医薬として許容し得る担体として好適であり得る。これらは、当業者に公知の方法に従って調製することができる。例えば、リポソーム製剤は、米国特許第4,522,811号に説明される通り調製することができる。簡潔には、多層性ベシクル（multilamellar vesicles、MLV）などのリポソームは、フラスコの内側で卵ホスファチジルコリン及び脳ホスファチジルセリン（7：3モル濃度比）を乾燥させることによって形成され得る。本明細書に説明されるモノクローナル抗体を又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体を、二価陽イオンを欠失するリン酸緩衝塩類溶液（PBS）において含む化合物の溶液を添加し、脂質膜が分散するまでフラスコを振盪させる。結果として生じるベシクルを洗浄して、封入されていない化合物を除去し、遠心分離によりペレットにした後、PBSに懸濁する。

30

【0195】

また、抗体は、コアセルベーション（coacervation）技術によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルそれぞれにおいて、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、ミク

40

【0196】

また、持続放出調製物を調製することができる。持続放出調製物の好適な例には、マトリックスが、成形された物品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態にある、アンタゴニストを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含む。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-

50

グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT (商標) (乳酸-グリコール酸共重合体と酢酸ロイプロリドとから構成される注射可能なマイクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸共重合体、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などの重合体は100日間にわたる分子の放出が可能であるが、あるヒドロゲルは、より短い時間タンパク質を放出する。封入された抗体が長時間体内に留まる場合、前記抗体は、37 における水分への曝露の結果として変性又は凝集し得、結果として、生物活性の損失及び免疫原性の起こり得る変化を生じる。合理的な戦略は、関与する機序に応じて安定化のために考案することができる。例えば、凝集機序がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であることが発見される場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、水分含有量を制御すること、適切な添加物を用いること、及び特異的なポリマーマトリックス組成物を発達させることによって達成され得る。

10

【0197】

インビボでの投与に用いられるべき組成物は、滅菌済みであり得る。このことは、例えば、濾過滅菌膜による濾過によって容易に達成される。

【0198】

具体的な実施態様において、抗体をコードする配列を含む核酸は、遺伝子療法によって対象に投与される。遺伝子療法は、発現した又は発現可能な核酸の対象への投与によって実施される療法を指す。当該技術分野で利用可能な遺伝子療法についての任意の方法は、本明細書に包含される。遺伝子療法の方法に関する一般的な総説については、Goldspielらの文献(1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505); Wu及びWuの文献(1991, *Biotherapy* 3:87-95); Tolstoshevの文献(1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596); Mulliganの文献(1993, *Science* 260:926-932); 並びにMorgan及びAndersonの文献(1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217); Mayの文献(1993, *TIBTECH* 11(5):155-215)を参照されたい。使用することのできる組換えDNA法の分野において一般的に公知の方法は、Ausubelら(編)「分子生物学における最新プロトコール(*Current Protocols in Molecular Biology*)」(John Wiley & Sons, NY (1993)); 及びKrieglerの文献「遺伝子の転移及び発現、実験室マニュアル(*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*)」(Stockton Press, NY (1990))に説明されている。

20

【0199】

(5.5 予防的及び治療的使用)

一態様において、本明細書に説明される中和する抗体を投与することによって対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防、管理、及び/又は治療する方法が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防又は治療する方法は、対象に、有効量の本明細書に説明される中和する抗体、又はその医薬組成物を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス疾患を予防、管理、又は治療する方法は、対象に、有効量の本明細書に説明される中和する抗体、又はその医薬組成物及び別の療法を投与することを含む。特定の実施態様において、中和する抗体は、モノクローナル抗体である。具体的な実施態様において、予防、管理、又は治療されるインフルエンザウイルス疾患は、第2群インフルエンザウイルスとして特徴づけられるインフルエンザウイルスによって生じる。別の具体的な実施態様において、予防、管理、又は治療されるインフルエンザウイルス疾患は、H3サブタイプのインフルエンザウイルスとして特徴づけられるインフルエンザウイルスによって生じる。

40

【0200】

一態様において、本明細書に説明される中和する抗体を投与することによって、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、対象に、有効量の本明細書に説明される中和する抗体、又はその医薬組成物を投与することを含む。別の実施態様において、対象におけるインフルエンザウイルス感染を予防又は治療する方法は、対象に、有効量の本明細書に説明される中和する抗体、又はそ

50

の医薬組成物及び別の療法を投与することを含む。特定の実施態様において、中和する抗体は、モノクローナル抗体である。

【0201】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下における又はネガティブコントロールの存在下におけるインフルエンザウイルスの宿主細胞受容体への結合と比較して、インフルエンザウイルスがその宿主細胞受容体に結合するのを少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%予防又は阻害する。

10

【0202】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下における又はネガティブコントロールの存在下におけるインフルエンザウイルス誘発性融合と比較して、インフルエンザウイルス誘発性融合を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%予防又は阻害する。

20

【0203】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下又はネガティブコントロールの存在下における細胞へのウイルスの付着後のインフルエンザウイルス誘発性融合と比較して、細胞へのウイルス付着後のインフルエンザウイルス誘発性融合を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%予防又は阻害する。

30

【0204】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下又はネガティブコントロールの存在下におけるインフルエンザウイルスの複製と比較して、インフルエンザウイルス複製を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は低下させる。インフルエンザウイルス複製の阻害は、当該技術分野で公知の方法（例えば、ノーザンブロット分析、RT-PCR、ウェスタンブロット分析など）を用いて、対象由来の生物学的検体におけるインフルエンザウイルス力価を検出することによって決定することができる。

40

【0205】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は結果的に、対象におけるインフルエンザウイルスにおける約1倍、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約8倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約105倍、約110倍、約115倍、約120倍、約125倍又はそれより高い減少を生じる。インフルエンザウイルス力価の倍数減少は、ネガティブコントロールと比較して、別の処置と比較して、又は抗体投与前の患者における力価と比較してのものであり得る。

【0206】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は結果的に、対象におけるインフルエンザウイルス力価のおよそ1 log以上、およそ2 log以上、およそ3 log以上、およそ4 log

50

og以上、およそ5 log以上、およそ6 log以上、およそ7 log以上、およそ8 log以上、およそ9 log以上、およそ10 log以上、1~5 log、2~10 log、2~5 log、又は2~10 logの減少を生じる。インフルエンザウイルス力価のlog 減少は、ネガティブコントロールと比較して、別の処置と比較して、又は抗体投与前の患者における力価と比較してであり得る。

【0207】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下又はネガティブコントロールの存在下における対象のインフルエンザウイルス感染と比較して、対象のインフルエンザウイルス感染を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は減少させる。

10

【0208】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下又はネガティブコントロールの存在下における対象におけるインフルエンザウイルスの伝播と比較して、対象におけるインフルエンザウイルスの伝播を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は減少させる。

20

【0209】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、当業者に公知のアッセイ又は本明細書に説明されるアッセイにおける前記抗体（複数可）の不在下又はネガティブコントロールの存在下における対象と少なくとも1の他の対象の間のインフルエンザウイルスの伝播と比較して、対象と少なくとも1の他の対象の間のインフルエンザウイルスの伝播を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%阻害又は減少させる。

30

【0210】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、対象におけるインフルエンザウイルス疾患又は感染の症状の数及び/又は頻度を減少させる（インフルエンザウイルス疾患の例示的な症状には、身体痛（特に関節及び咽頭）、発熱、悪心、頭痛、刺激された眼、疲労、咽頭炎、発赤した眼又は皮膚、及び腹痛を含むが、これらに限定されない。）。

【0211】

抗体（複数可）は、単独で、又は当該技術分野で公知の別の/他の種類の療法と併用して投与され、インフルエンザウイルス感染を減少させ、対象におけるインフルエンザウイルスの力価を減少させ、対象間のインフルエンザウイルスの伝播を減少させ、インフルエンザウイルス複製を阻害し、インフルエンザウイルス誘発性融合を阻害し、及び/又はインフルエンザウイルスの宿主細胞受容体に対する結合を阻害し得る。

40

【0212】

1以上の抗体は、身体において局所的に又は全身的に予防薬又は治療薬として用いられ得る。また、抗体は、他の抗体（例えば、モノクローナル抗体若しくはキメラ抗体）との、又は例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数若しくは活性を増大させるような機能するリンホカイン若しくは造血因子（例えば、IL 2、IL 3、及びIL 7など）との併用で有利に利用され得る。

【0213】

また、1以上の抗体は、例えば抗ウイルス薬など、インフルエンザウイルス感染を治療

50

するのに用いられる1以上の薬剤との併用で有利に利用され得る。具体的な抗ウイルス薬には以下を含む：オセルタミビル (oseltamavir) (タミフル (登録商標))、ザナミビル (リレンザ (登録商標))、ヌクレオシドアナログ (例えば、ジドブジン、アシクロビル (acyclovir)、ガングシクロビル (gancyclovir)、ピダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン、及びリバビリン)、ホスカルネット、アマンタジン、リマンタジン (フルマジン (登録商標))、サキナビル、インジナビル、リトナビル、アルファ インターフェロン及び他のインターフェロン、アジドチミジン、インフルエンザウイルスワクチン (例えば、フルアリクス (登録商標)、フルミスト (登録商標)、フルビリン (登録商標)、及びフルゾン (登録商標))。

【0214】

いくつかの実施態様において、抗体は、1以上の他の療法と相乗的に作用する。一般的に、患者のものと同一種である種起源又は種反応性 (抗体の場合) の生成物の投与が好ましい。したがって、好ましい実施態様において、ヒト抗体又はヒト化抗体は、インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患の治療又は予防のために、ヒト患者に投与される。

【0215】

一実施態様において、現行療法に対する代替としての、インフルエンザウイルス疾患及びそれに関連する症状の予防、管理、治療、及び/又は寛解の方法が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、現行療法は、患者にとって毒性が高すぎることを立証しているか又は立証し得る (結果として、許容し得ない又は耐え難い副作用を生じる。)。別の実施態様において、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、現行療法と比較して副作用を低下させる。別の実施態様において、患者は、現行療法に対して不応性であることを立証している。このような実施態様において、本明細書に説明される1位以上のモノクローナル抗体の、又は他の抗感染療法を併用しない、本明細書に提供される方法に従って作製される1以上のモノクローナル抗体の投与が本明細書に包含される。

【0216】

好適な投与計画は、このような因子を考慮することによって、並びに例えば、文献で報告される及び医師の卓上参考書第58版 (Physician's Desk Reference, 58th ed.) (2004) において推奨される薬用量に従うことによって、当業者によって選択され得る。本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体の投与の例示的な薬用量及び頻度については、第5.5.2節を参照されたい。

【0217】

本明細書に包含される方法によると、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、第一、第二、第三、第四、及び/又は第五の系統の療法を含むがこれらに限定されない任意の系統の療法として用いられ得る。さらに、本明細書に包含される方法によると、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体は、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体以外の療法の任意の有害な効果又は不耐性が生じる前又は後に用いることができる。本明細書に説明される1以上のモノクローナル抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される1以上のモノクローナル抗体を投与して、インフルエンザウイルス疾患の発症を予防し及び/又はインフルエンザウイルス疾患の再発を治療し若しくは少なくする方法が、本明細書に包含される。

【0218】

具体的な実施態様において、抗体 (複数可) の投与は、前記抗体 (複数可) の投与の不在下での入院の発生率と比較して、入院の発生率を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少

10

20

30

40

50

なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%減少させる。

【0219】

具体的な実施態様において、抗体（複数可）の投与は、前記抗体（複数可）の投与の不在下での死亡率と比較して、死亡率を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%減少させる。

【0220】

他の抗ウイルス療法が利用できない、インフルエンザウイルス疾患及び/又はそれと関連する症状を予防、管理、治療、及び/又は寛解させる方法が、本明細書にさらに包含される。

10

【0221】

(5.5.1 患者集団)

一実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、未処置の対象であり、すなわち、インフルエンザウイルス感染に起因する疾患を有しない対象、又はインフルエンザウイルス感染に罹ったことがなくかつ現に感染していない対象である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染を獲得する危険にある対象である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染を獲得する危険にある未処置の対象である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患を罹患している又は罹患することが予期される患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患と診断された患者である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患のどの症状も顕在化していない、インフルエンザウイルスに感染した患者である。

20

【0222】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、第2群インフルエンザウイルスによる感染の危険にある対象である。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、第2群インフルエンザウイルスによる感染の危険にある未処置の対象である。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、第2群インフルエンザウイルスによって生じるインフルエンザウイルス疾患を罹患している又は罹患することが予期される患者である。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、第2群インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患と診断された患者である。

30

【0223】

別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス疾患の1以上の症状を経験している患者である。インフルエンザウイルス疾患の症状には、身体痛（特に関節及び咽頭）、発熱、悪心、頭痛、刺激された眼、疲労、咽頭炎、発赤した眼又は皮膚、及び腹痛を含むが、これらに限定されない。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、入院を必要とするのに十分重症である疾患の症状を顕在化していないインフルエンザウイルス疾患を有する患者である。

40

【0224】

別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、又はインフルエンザC型ウイルスに感染した患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザA型ウイルスの特定のサブタイプに感染し

50

た患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、第2群インフルエンザウイルスに感染した患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、H3サブタイプのインフルエンザウイルスと特徴づけられるインフルエンザウイルスに感染した患者である。このような実施態様によると、前記ウイルスに感染した患者は、インフルエンザウイルス疾患の症状を顕在化し得る。

【0225】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、動物である。ある実施態様において、動物は鳥類である。ある実施態様において、動物は、哺乳類、例えば、ウマ、ブタ、マウス、又は霊長類、好ましくはヒトである。

10

【0226】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒトである。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒト乳児である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒト幼児である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒト子供である。他の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒト成人である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、ヒト高齢者である。

【0227】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、妊娠中の患者である。別の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザの季節（例えば、北半球における11月～4月）の間に妊娠しているかもしれない又は妊娠するであろう患者である。

20

【0228】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染から結果として生じるインフルエンザウイルス感染又は疾患の増大した危険にある任意の対象である（例えば、免疫不全の（immunocompromised）又は免疫不全の（immunodeficient）個体）。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染から結果として生じるインフルエンザウイルス感染又は疾患の増大した危険を伴う個体と密接に接触した任意の対象である（例えば、免疫不全の又は免疫抑制性の個体）。

30

【0229】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染に対する易罹患性を増大させる任意の容態又はインフルエンザウイルス感染から結果として生じる合併症若しくは疾患によって影響される対象である。他の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、インフルエンザウイルス感染が個体の発症する別の容態の合併症を増大させる可能性を有する対象、又はその危険にある対象である。特定の実施態様において、インフルエンザウイルス合併症に対する易罹患性を増大させるような容態、又はインフルエンザウイルスが容態に付随する合併症を増大させるような容態は、例えば、嚢胞性線維症、喘息、肺気腫、若しくは細菌性感染など、肺に発症する容態；心臓脈管系疾患；又は糖尿病である。インフルエンザウイルス合併症を増大させ得る他の容態には、腎障害；血液障害（貧血若しくは鎌状赤血球症）；又は弱化した免疫系（投薬、癌などの悪性腫瘍、臓器移植、若しくはHIV感染によって生じる免疫抑制を含む。）を含む。

40

【0230】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、養護ホーム又は孤児院などのグループホームに居住する対象である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、グループホーム、例えば養護ホーム又は孤児院において勤務している、又は有意な量の時間を

50

過ごしている対象である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、医療従事者（例えば、医師又は看護師）である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、寄宿舎（例えば、大学寄宿舎）に居住する。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、軍隊の一員である。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、学校に通っている子供である。

【0231】

いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、以下を含むインフルエンザウイルス感染から合併症を発生させる増大した危険にある対象である：例えば、6ヶ月齢未満の乳児を含む家庭を含む、高い危険性の個体を有する家庭の構成員など、合併症について高い危険にあるものに対してインフルエンザウイルスを伝染させることのできる任意の個体、6ヶ月齢未満の乳児と接触している個体、又は養護ホーム若しくは他の長期ケア施設に在住する個体と接触しようとする個体；肺、心臓、若しくは循環器系の長期障害を有する個体；代謝性疾患（例えば、糖尿病）を有する個体；腎臓障害を有する個体；血液障害（貧血若しくは鎌状赤血球症を含む。）を有する個体；弱化した免疫系（投薬、癌などの悪性腫瘍、臓器移植、若しくはHIV感染によって生じる免疫抑制を含む。）を有する個体；長期アスピリン療法を受けている（及びそれゆえ、インフルエンザに感染した場合にライ症候群を発生させるより高い機会を有する）子供。

【0232】

他の実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者には、以下を実施する6ヶ月齢以上の健常な個体を含む：例えば、4月～9月の熱帯地方及び南半球など、流感の大発生が生じ得る外国及び地域に旅行することを計画する；インフルエンザウイルスが循環している世界の地域からの人間を含み得る大きな組織化された旅行者群の一部として旅行する；学校若しくは大学に通学し及び寄宿舎に在住し、又は機関の設定に在住する；又はインフルエンザウイルス疾患により病気になる危険性を低下させたいと願う。

【0233】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、従来療法に対する有害な反応を受けやすい個体である。他の実施態様において、患者は、本明細書に説明される抗体以外の又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体以外の療法に対して難治性であることを立証されているが、これらの療法にはもはやない人間であり得る。ある実施態様において、インフルエンザウイルス疾患を有する患者は、感染が有意に撲滅されなかった場合及び/又は症状が有意に緩和しなかった場合、療法に対して難治性である。患者が難治性であるかどうかの決定は、このような文脈において「難治性」の当該技術分野で許容される意味を用いて、感染のための療法の効果をアッセイするための、当該技術分野で公知の任意の方法によって、インビボ又はインビトロのいずれかで実施することができる。種々の実施態様において、インフルエンザウイルス疾患を有する患者は、ウイルス複製が低下しなかった場合、又はそれに続く療法を増大させる場合、難治性である。

【0234】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療又は予防される患者は、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、又は他の生物療法/免疫療法ですでに治療されている最中の患者である。これらの患者のうちに入るのは、難治性の患者、従来療法に対して若すぎる患者、及び既存の療法による治療にもかかわらず、インフルエンザウイルス疾患又はそれに関連する症状を再発している患者である。

【0235】

(5.5.2 投与の経路及び薬用量)

本明細書に説明される抗体又は組成物は、種々の経路によって対象に送達され得る。こ

れらには、鼻内、気管内、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、経皮、静脈内、結膜、及び皮下の経路を含むが、これらに限定されない。また、肺への投与は、例えば、吸入器又はネブライザーの使用、及びスプレーとしての使用のためのエアゾール剤を用いた製剤によって採用することができる。

【0236】

インフルエンザウイルス感染又はインフルエンザウイルス疾患の治療及び/又は予防に有効であろう抗体又は組成物の量は、前記疾患の性質に依存するであろうし、標準的な臨床技術によって決定することができる。

【0237】

また、組成物において採用されるべき精確な用量は、投与の経路、及び感染又は疾患によって生じる感染又は疾患の重篤度に依存するであろうし、実務者の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。例えば、有効な用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態(年齢、体重、健康状態を含む。)患者がヒトであるか又は動物であるか、投与される他の薬剤、及び治療が予防的であるか治療的であるかに応じて変動し得る。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類を含む非ヒト哺乳類も治療することができる。治療薬用量は、安全性及び有効性を最適にするために、最適に用量設定される。

10

【0238】

ある実施態様において、インビトロアッセイは、最適な薬用量範囲を同定するのに役立つよう採用される。有効な用量は、インビトロでの又は動物モデルでの試験系に由来する用量反応曲線から外挿され得る。

20

【0239】

抗体による受動的免疫化のために、薬用量は、約0.0001~100mg/患者の体重のkg、及びより通常には、0.01~5mg/患者の体重のkgの範囲である。例えば、薬用量は、1mg/体重kg、10mg/体重kg、又は1~10mg/kgの範囲内であり得、換言すれば、70kgの患者につき70mg又は700mg又は70~700mgの範囲内にそれぞれあり得る。いくつかの実施態様において、患者に投与される薬用量は、約3mg/患者の体重kg~約60mg/患者の体重kgである。好ましくは、患者に投与される薬用量は、0.025mg/患者の体重kg~20mg/患者の体重kgであり、より好ましくは1mg/患者の体重kg~15mg/患者の体重kgである。一般的には、ヒト抗体は、外来性ポリペプチドに対する免疫応答により、他の種に由来する抗体よりも人体内でより長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体のより少ない薬用量及びより頻度の低い投与がしばしば可能である。さらに、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の投与の薬用量及び頻度は、例えば、脂質付加などの修飾によって抗体の取り込み及び(例えば、鼻腔及び/又は肺への)組織浸透を増強することによって減少し得る。

30

【0240】

例示的な治療管理体制は、2週間ごとに1回、又は1ヶ月間に1回、又は3~6ヶ月間ごとに1回の、1年間若しくは数年間にわたる、又は数年間隔にわたる投与を必要とする。いくつかの方法において、異なる結合特異性を有する2以上の抗体は、対象に同時に投与される。抗体は通常、複数の機会に投与される。単一薬用量間の間隔は、毎週、毎月、3ヶ月間ごと、6ヶ月間ごと、又は毎年であり得る。また、間隔は、患者におけるインフルエンザウイルス抗原(例えば、赤血球凝集素)に対する抗体の血中レベルを測定することによって示されるように不規則であり得る。

40

【0241】

具体的な実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の直前に(例えば、3ヶ月間以内、2ヶ月間以内、1ヶ月間以内)、又はインフルエンザの季節の間に1ヶ月間に1回投与される。別の実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の直前に又は間に2ヶ月間ごとに投与される。別の実施態様において、本明細書

50

に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の直前に又は間に3ヶ月間ごとに投与される。具体的な実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の直前に又は間に1回投与される。別の具体的な実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の間に2回、最も好ましくは1回投与される。いくつかの実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、インフルエンザの季節の直前に又は間に、24時間ごとに、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間から最大で1週間投与される。具体的な実施態様において前記抗体又はその組成物の毎日の投与は、インフルエンザウイルス感染が患者において最初に認識された直後だが臨床的に有意な疾患の提示の前に生じる。用語「インフルエンザの季節」は、インフルエンザ感染が最も生じがちな季節を指す。典型的には、北半球におけるインフルエンザの季節は、11月に始まり、4月中続く。

10

【0242】

いくつかの実施態様において、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の患者における血漿レベルは、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物のその後の用量の投与の前に測定される。抗体の血漿レベルは、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体のその後の用量を受けるために患者の適格性を決定する上で考慮され得る。例えば、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の患者の血漿レベルは、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体を投与しないことを示唆し得；あるいは、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の患者の血漿レベルは、特定の薬用量で、特定の頻度で、及び/又はある期間、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体を投与することを示唆し得る。

20

30

【0243】

ある実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の、又はそれらの組成物の用量についての患者への投与経路は、鼻内、筋肉内、静脈内、又はそれらの組み合わせであるが、本明細書に説明される他の経路も許容され得る。各用量は、同一の投与経路によって投与されても投与されなくてもよい。いくつかの実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はそれらの組成物は、本明細書に説明される同じか若しくは異なる抗体、又は本明細書に提供される方法に従って作製される同じか若しくは異なる抗体の他の用量と同時に又は他の用量の後に、複数の投与経路を介して投与される。

40

【0244】

(5.5.3 併用療法)

種々の実施態様において、本明細書に説明される抗体若しくは本明細書に提供される方法に従って作製される抗体、又はこのような抗体をコードする核酸は、1以上の他の療法（例えば、抗ウイルス療法又は免疫調節療法）との併用で対象に投与され得る。いくつかの実施態様において、本明細書に説明される医薬組成物は、1以上の療法との併用で対象に投与され得る。1以上の他の療法は、インフルエンザウイルス疾患の治療若しくは予防において有益であり得、又はインフルエンザウイルス疾患に付随する容態を寛解させ得る。

【0245】

50

いくつかの実施態様において、疼痛緩和剤、抗発熱投薬などの支持的処置である1以上の他の療法、又は呼吸により緩和し若しくは補助する療法がある。支持的処置の具体例には、超音波ネブライザーによる空気の加湿、エアゾール化ラセミ体エピネフリン、経口デキサメタゾン、静脈内流体、挿管、解熱薬（例えば、イブプロフェン、アセトメタフィン）、並びに抗生物質及び/又は抗真菌薬療法（すなわち、二次的細菌感染及び/又は真菌感染を予防又は治療すること）を含む。

【0246】

ある実施態様において、療法は、5分未満の間隔で、30分未満の間隔で、1時間間隔で、約1時間間隔で、約1～約2時間間隔で、約2時間～約3時間間隔で、約3時間～約4時間間隔で、約4時間～約5時間間隔で、約5時間～約6時間間隔で、約6時間～約7時間間隔で、約7時間～約8時間間隔で、約8時間～約9時間間隔で、約9時間～約10時間間隔で、約10時間～約11時間間隔で、約11時間～約12時間間隔で、約12時間～18時間間隔で、18時間～24時間間隔で、24時間～36時間間隔で、36時間～48時間間隔で、48時間～52時間間隔で、52時間～60時間間隔で、60時間～72時間間隔で、72時間～84時間間隔で、84時間～96時間間隔で、又は96時間～120時間間隔で投与される。具体的な実施態様において2以上の療法は、同じ患者の訪問内に投与される。

10

【0247】

当業者に周知の任意の抗ウイルス薬は、本明細書に説明される抗体又は医薬組成物との組み合わせで用いられ得る。抗ウイルス薬の非限定例には、ウイルスのその受容体への付着、ウイルスの細胞内への内部移行、ウイルスの複製、又は細胞からのウイルスの放出を阻害及び/又は低下させるタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質抗体、核酸分子、有機分子、無機分子、および小分子を含む。特に、抗ウイルス薬には、ヌクレオシドアナログ（例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガングシクロビル（gangcyclovir）、ピダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン、及びリバビリン）、ホスカルネット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、アルファインターフェロン及び他のインターフェロン、アジドチミジン、ザナミビル、並びにオセルタミビルを含むが、これらに限定されない。他の抗ウイルス薬には、インフルエンザウイルスワクチン、例えば、フルアリクス（登録商標）（GlaxoSmithKline）、フルミスト（登録商標）（MedImmune Vaccines）、フルピリン（登録商標）（Chiron Corporation）、フルゾン（登録商標）（Aventis Pasteur）、又は後掲の第5.6節に説明されるものを含む。

20

30

【0248】

具体的な実施態様において、抗ウイルス薬は、ウイルス抗原に特異的な免疫調節薬である。特定の実施態様において、ウイルス抗原は、赤血球凝集素ポリペプチド以外のインフルエンザウイルスポリペプチドである。他の実施態様において、ウイルス抗原は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素ポリペプチドである。

【0249】

具体的な実施態様において、一次インフルエンザウイルス感染に対する二次応答を予防又は治療する1以上の療法は、本明細書に説明される1以上の抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される1以上の抗体との組み合わせで投与される。一次インフルエンザウイルス感染に対する二次応答の例には、粘膜刺激に対する喘息様応答、上昇した総呼吸耐性、二次的なウイルス感染、細菌感染、及びウイルス感染に対する増大した易罹患性、並びに細気管支炎、肺炎、クループ、及び熱病性気管支炎などだがこれらに限定されない容態の発達を含むが、これらに限定されない。

40

【0250】

いくつかの実施態様において、本明細書に説明される1以上の抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される1以上の抗体は、別の抗体（例えば、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体）又は1セットの他の抗体（例えば、1セットの抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体）と併用され、他の抗体又は1セットの他の抗体の予防効果及び/又は治療効果を増強する。

50

【0251】

いくつかの実施態様において、併用療法は、本明細書に説明される1以上の抗体の又は本明細書に提供される方法に従って作製される1以上の抗体の投与を含む。いくつかの実施態様において、併用療法は、本明細書に説明される2以上の抗体の又は本明細書に提供される方法に従って作製される2以上の抗体の投与を含む。具体的な実施態様において、併用療法は、7A7抗体、及び抗体12D1、39A4、又は66A6の1以上の投与を含む。別の具体的な実施態様において、併用療法は、12D1抗体、及び抗体7A7、39A4、又は66A6の1以上の投与を含む。別の具体的な実施態様において、併用療法は、39A4抗体、及び抗体7A7、12D1、又は66A6の1以上の投与を含む。別の具体的な実施態様において、併用療法は、66A6抗体、及び抗体7A7、39A4、又は12D1の1以上の投与を含む。

10

【0252】

(5.6 ワクチンを作製するための抗体の使用)

複数のインフルエンザウイルス株に対する免疫応答を生じることのできる免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が本明細書に提供される。操作に関する任意の特定の理論によって拘束されるよう意図するものではないが、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ抗原内の抗原結合領域は、複数のインフルエンザ株と交差反応することのできる免疫応答を生じるために、宿主免疫系に1以上の比較的保存された抗原領域を提示するのに有用であると考えられている。1以上の抗原領域が、インフルエンザサブタイプにわたって十分に保存されているので、このような免疫応答は、インフルエンザウイルスのいくつかのサブタイプと交差反応し得る。

20

【0253】

有利なことに、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ領域は、インフルエンザウイルス抗原の比較的保存された領域において1以上のエピトープを提示するので、複数のインフルエンザ株に対する免疫応答を生じるのに有用であり得る。このように、前記インフルエンザ領域は、比較的保存されたエピトープを保有する複数のインフルエンザ株に対する宿主免疫応答を生じるのに用いられ得る。したがって、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ赤血球凝集素領域は、組成物及びワクチンにおける抗原としての使用を見出す。本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ赤血球凝集素は、任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16の公知のインフルエンザA型サブタイプ又は後に同定されるインフルエンザA型サブタイプに対する宿主免疫応答を生じるのに有用であり得る。本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ赤血球凝集素領域は、任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16の公知のインフルエンザA型株又は後に同定されるインフルエンザA型株に対する宿主免疫応答を生じるのに有用であり得る。また、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ領域は、いまや公知の又は後に同定される任意のインフルエンザB型サブタイプに対する宿主免疫応答を生じるのに有用であり得る。加えて、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルスに対する広範に保護された免疫応答を仲介するインフルエンザ赤血球凝集素領域を同定するのに利用することができる。

30

40

【0254】

抗体の結合領域は、当該技術分野で公知の方法、例えば、ウェスタンブロット、及び本明細書に説明される方法(第6.3節参照)を用いて同定することができる。一旦、抗原結合領域が同定されると、抗体によって結合する特異的エピトープは、当該技術分野で公知の方法、例えば、アラニン走査突然変異誘発を用いて同定することができる(例えば、Cunninghamらの文献「アラニン走査突然変異誘発によるhGH 受容体相互作用の高解像エピ

50

トープマッピング (High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis) (Science 244: 1081 - 1085) 参照)。

【0255】

一般的に、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及びエピトープは、本明細書に説明される抗体又は本明細書に説明されるプロセスによって作製される抗体によって結合するインフルエンザ赤血球凝集素ポリペプチドの結合領域及びエピトープを含む又は本質的にそれらからなるポリペプチドである。

【0256】

本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及びエピトープは、下記に説明される技術を含む、当該技術分野に好適と考えられる任意の技術に従って調製することができる。ある実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及びエピトープが単離される。ある実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及びエピトープは、炭水化物部分を含む。

10

【0257】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、H3サブタイプのインフルエンザウイルスの赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域の長いアルファヘリックスを含む。

【0258】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)など、インフルエンザA型ウイルスの赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域の長いアルファヘリックスを含む。

20

【0259】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、H3サブタイプのインフルエンザウイルスの赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、359~514、及び/又は360~514を含む。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~435、及び/又は405~513を含む(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基1~184、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184)。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76~106を含む。別の具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたアミノ酸残基73~103、73~104、73~105、73~106、73~107、73~108、73~109、74~103、74~104、74~105、74~106、74~107、74~108、74~109、75~103、75~104、75~105、75~106、75~107、75~108、75~109、76~103、76~104、76~105、76~107、76~108、76~109、77~103、77~104、77~105、77~106、77~107、77~108、77~109、78~103、78~104、78~105、78~106、78~107、78~108、78~109、79~103、79~104、79~105、79~106、79~107、79~108、又は79~109を含む。

30

40

【0260】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、359~514、及び/又は360~514を含む。具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス結合領域は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~435、及び/又は405~513を含む(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基1~184、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184)。別の具体的な実施態様において、

50

本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域は、以下のアミノ酸配列を含む：
【化6】

RIQDLEKYVE DTKIDLWSYN AELLVALENQ HTIDLTDSEM NKLFEKTRRQ
LRENAEDMGN GCFKIYHKCD NACIESIRNG TYDHDVYRDE ALNNRFQIKG
VELKSGYKD (配列番号1)

。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域は、配列番号1の配列におけるアミノ酸配列と少なくとも99%、少なくとも98%、及び少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、
少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、
少なくとも55%、又は少なくとも50%同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0261】

別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルスエピートープは、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体によって結合する配列番号1の配列において同定されるエピートープを含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルスエピートープは、配列番号1の配列において同定されるアミノ酸エピートープと少なくとも99%、少なくとも98%、
少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、
少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、
少なくとも55%、少なくとも50%同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0262】

ある実施態様において、結合領域又はエピートープは、異種性アミノ酸配列と抱合又は融合され得る。このような抱合又は融合したポリペプチドは、本明細書に説明される使用のための免疫原性組成物において用いることができる。

【0263】

ある実施態様において、結合領域又はエピートープは、担体タンパク質、例えば、破傷風トキソイド (CRM197 非毒性ジフテリア (diphtheria) トキソイド点突然変異体) 又はキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と (リンカーによって直接的に連結されることを介して) 共役/連結し得る。

30

【0264】

また、本明細書に提供されるインフルエンザ結合領域及び/又はエピートープをコードする核酸が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968 (H3) などのインフルエンザA型ウイルスの赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域の長いアルファヘリックスを含むインフルエンザウイルス結合領域をコードする核酸が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、H3サブタイプのインフルエンザウイルスの赤血球凝集素ポリペプチドのHA2領域の長いアルファヘリックスをコードする核酸が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968 (H3) の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、359~514、及び/又は
360~514をコードする核酸が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、
インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968 (H3) の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸
残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~4
35、及び/又は405~513 (すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番
号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1~184、16~184、30~184、31~184
、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184) をコードする核酸が本明
細書に提供される。具体的な実施態様において、古典的なH3サブタイプ番号付けシステム
に従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76~106をコードする
核酸が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、古典的なH3サブタイプ番
号付けシステムに従って番号付けされたアミノ酸残基73~103、73~104、73~105、73~1

40

50

06、73～107、73～108、73～109、74～103、74～104、74～105、74～106、74～107、74～108、74～109、75～103、75～104、75～105、75～106、75～107、75～108、75～109、76～103、76～104、76～105、76～107、76～108、76～109、77～103、77～104、77～105、77～106、77～107、77～108、77～109、78～103、78～104、78～105、78～106、78～107、78～108、78～109、79～103、79～104、79～105、79～106、79～107、79～108、又は79～109をコードする核酸が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、配列番号1の配列をコードする核酸又は配列番号1の配列内に同定されるエピトープが本明細書に提供される。遺伝暗号の縮重により、配列番号1の配列をコードする任意の核酸又は配列番号1の配列内に同定されるエピトープは、本明細書に包含される。別の具体的な実施態様において、配列番号1の配列におけるアミノ酸配列と少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、又は少なくとも50%同一の結合領域をコードする核酸が本明細書に提供される。別の具体的な実施態様において、配列番号1の配列において同定されるエピトープと少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、又は少なくとも50%同一のエピトープをコードする核酸が本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、本明細書に包含される核酸が単離される。本明細書に説明される方法によると、本明細書に提供されるインフルエンザ結合領域及び/又はエピトープをコードする核酸は、患者における免疫応答を誘導するよう患者に投与することができる。

10

20

【0265】

また、本明細書に包含される結合領域及びエピトープをコードする核酸を含む、発現ベクターを含むベクターが本明細書に提供される。具体的な実施態様において、ベクターは、本明細書に包含される結合領域及び/又はエピトープをコードする核酸の発現を方向づけることのできる発現ベクターである。

【0266】

発現ベクターの非限定的な例には、複製欠損性レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、及びバキュロウイルスなどのプラスミド及びウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、本明細書に説明される結合領域又はエピトープは、インフルエンザウイルスベクターへと操作される。他の実施態様において、本明細書に説明される結合領域又はエピトープは、非インフルエンザウイルスへと操作される。ある実施態様において、本明細書に包含される結合領域及びエピトープは、ウイルス様粒子又はピロソームへと組み込むことができる。当業者に公知の技術は、発現ベクターを作製するために使用され得る。加えて、本明細書に説明される結合領域若しくはエピトープをコードする核酸、又は発現ベクターは、当該技術分野で公知の技術を用いて宿主細胞へと導入することができる（例えば、Sambrookらの文献「分子クローニング 実験室マニュアル第2版 (Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edition)」(Cold Spring Harbor Press, New York, 1989)参照)。結合領域又はエピトープの発現のために選択される発現ベクターは、選択される宿主細胞に応じて変動し得る。選択される宿主細胞は、原核細胞（大腸菌、サルモネラ、リステリア、シゲラ、など）又は真核細胞（例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、又は植物細胞）であり得る。宿主細胞は、結合領域又はエピトープを安定して又は一過性に発現するよう操作され得る（例えば、抗原の発現に関する情報については、第5.1.2節を参照されたい。）。

30

40

【0267】

したがって、インフルエンザウイルス結合領域及び/又はエピトープを産生する方法が本明細書に提供される。一実施態様において、前記方法は、好適な培地において、結合領域及び/又はエピトープをコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、それにより結合領域及び/又はエピトープが産生されることを含む。いくつかの実施態様において、前記方法

50

はさらに、結合領域及び／又はエピトープを培地又は宿主細胞から単離することを含む。

【0268】

一実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物で、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に説明されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープをコードする核酸を含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープをコードする核酸を含む発現ベクターを含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に提供されるインフル
10
エンザウイルス結合領域及び／またはエピトープを含むインフルエンザウイルス又は非インフルエンザウイルスを含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に提供されるインフル
20
エンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを発現するよう操作されたゲノムを有するインフルエンザウイルス又は非インフルエンザウイルスを含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に提供されるインフル
エンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含むウイルス様粒子又はピロソームを含む。別の
実施態様において、免疫原性組成物は、医薬として許容し得る担体との混合物における、
本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを発現する
又は発現するよう操作された細菌を含む。別の実施態様において、免疫原性組成物は、医
20
薬として許容し得る担体との混合物における、本明細書に提供されるインフルエンザウ
イルス結合領域及び／又はエピトープを用いて刺激された細胞を含む。具体的な実施態様
において、このような組成物は、意図される投与の経路のために製剤される。このような組
成物には、医薬として許容し得る担体又は賦形剤を含み得る。

【0269】

一実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又は
エピトープを含むサブユニットワクチンが、本明細書に提供される。具体的な実施態様
において、サブユニットワクチンは、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)
の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、
360~513、375~513、359~514、及び／又は360~514を含む。具体的な実施態様において
30
、サブユニットワクチンは、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球
凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513
、390~513、384~439、405~435、及び／又は405~513(すなわち、古典的なH3サブタイ
プ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1~184
、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び／又は76~1
84)を含む。具体的な実施態様において、サブユニットワクチンは、古典的なH3サブタイ
プ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76
~106を含むアミノ酸残基を含む。別の具体的な実施態様において、サブユニットワクチ
ンは、配列番号1の配列、又は配列番号1の配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施
態様において、サブユニットワクチンはさらに、1以上の表面糖タンパク質(例えば、イン
40
フルエンザウイルスノイラミニダーゼ)、他のターゲティング部分、担体タンパク質、
又はアジュバントを含む。

【0270】

別の実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／
又はエピトープを発現するよう操作された生ウイルスが本明細書に包含される。具体的な
実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエ
ピトープを含む生ウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が本明細書に提供
される。具体的な実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合
領域及び／又はエピトープは、膜結合型である。他の具体的な実施態様において、本明細
書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープは、膜結合型では
50

なく、すなわち可溶性である。特定の実施態様において、生ウイルスはインフルエンザウイルスである。他の実施態様において、生ウイルスは非インフルエンザウイルスである。いくつかの実施態様において、生ウイルスは弱毒化されている。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は、本明細書に提供される2、3、4、又はそれより多くの異なるインフルエンザウイルス結合領域及び/又はエピトープを含む又は発現するよう操作された2、3、4、又はそれより多くの生ウイルスを含む。具体的な実施態様において、生ウイルスを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、359~514、及び/又は360~514を含む。具体的な実施態様において、生ウイルスを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~435、及び/又は405~513(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1~184、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184)を含む。具体的な実施態様において、生ウイルスを含む免疫原性組成物は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76~106を含む。別の具体的な実施態様において、生ウイルスを含む免疫原性組成物は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基73~103、73~104、73~105、73~106、73~107、73~108、73~109、74~103、74~104、74~105、74~106、74~107、74~108、74~109、75~103、75~104、75~105、75~106、75~107、75~108、75~109、76~103、76~104、76~105、76~107、76~108、76~109、77~103、77~104、77~105、77~106、77~107、77~108、77~109、78~103、78~104、78~105、78~106、78~107、78~108、78~109、79~103、79~104、79~105、79~106、79~107、79~108、又は79~109を含む。具体的な実施態様において、生ウイルスを含む免疫原性組成物は、配列番号1の配列、又は配列番号1の配列をコードする核酸を含む。

【0271】

別の実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び/又はエピトープを含む不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が本明細書に提供される。具体的な実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び/又はエピトープは、膜結合型である。特定の実施態様において、不活性型ウイルスはインフルエンザウイルスである。他の実施態様において、不活性型ウイルスは、非インフルエンザウイルスである。いくつかの実施態様において、免疫原性組成物は、本明細書に提供される2、3、4、又はそれより多くの異なるインフルエンザウイルス結合領域及び/又はエピトープを含む2、3、4、又はそれより多くの不活性型ウイルスを含む。ある実施態様において、不活性型ウイルス免疫原性組成物は、1以上のアジュバントを含む。具体的な実施態様において、不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基304~513、330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、359~514、及び/又は360~514を含む。具体的な実施態様において、不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330~513、345~513、359~513、360~513、375~513、390~513、384~439、405~435、及び/又は405~513(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基1~184、16~184、30~184、31~184、46~184、61~184、70~110、76~106、及び/又は76~184)を含む。具体的な実施態様において、不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76~106を含む。別の具体的な実施態様において、不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物は、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基73~103、73~104、73~105、73~106、73~107、73~108、73

10

20

30

40

50

～109、74～103、74～104、74～105、74～106、74～107、74～108、74～109、75～103、75～104、75～105、75～106、75～107、75～108、75～109、76～103、76～104、76～105、76～107、76～108、76～109、77～103、77～104、77～105、77～106、77～107、77～108、77～109、78～103、78～104、78～105、78～106、78～107、78～108、78～109、79～103、79～104、79～105、79～106、79～107、79～108、又は79～109を含む。具体的な実施態様において、不活性型ウイルスを含む免疫原性組成物は、配列番号1の配列又は配列番号1の配列をコードする核酸を含む。

【0272】

別の実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、分断ウイルス(split virus)ワクチンである。いくつかの実施態様において、分断ウイルスワクチンは、本明細書に提供される2、3、4、又はそれより多くの異なるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む。ある実施態様において、本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープは、膜結合型である／あった。ある実施態様において、分断ウイルスワクチンは、1以上のアジュバントを含む。具体的な実施態様において、分断ウイルスワクチンは、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330～513、345～513、359～513、360～513、375～513、390～513、384～439、405～435、及び／又は405～513(すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1～184、16～184、30～184、31～184、46～184、61～184、70～110、76～106、及び／又は76～184)を含む。具体的な実施態様において、分断ウイルスワクチンは、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76～106を含む。別の具体的な実施態様において、分断ウイルスワクチンは、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基73～103、73～104、73～105、73～106、73～107、73～108、73～109、74～103、74～104、74～105、74～106、74～107、74～108、74～109、75～103、75～104、75～105、75～106、75～107、75～108、75～109、76～103、76～104、76～105、76～107、76～108、76～109、77～103、77～104、77～105、77～106、77～107、77～108、77～109、78～103、78～104、78～105、78～106、78～107、78～108、78～109、79～103、79～104、79～105、79～106、79～107、79～108、又は79～109を含む。別の実施態様において、分断ウイルスワクチンは、配列番号1の配列又は配列番号1の配列をコードする核酸を含む。

【0273】

ある実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、インフルエンザA型ウイルス(例えば、インフルエンザA型ウイルスの任意のサブタイプ又は株)に対する免疫応答を誘導するために用いることができる。他の実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、第2群インフルエンザウイルスとして特徴付けられるインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘導するために用いることができる。他の実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、H3サブタイプのインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘導するために用いることができる。

【0274】

ある実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス疾患を予防及び／又は治療するために用いることができる。

【0275】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、インフルエンザウイルス感染を予防及び／又は治療するために用いることができる。

【0276】

ある実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、別の療法との組み合わせで用いられうる（例えば、このような組み合わせにおいて用いられうる療法の種類については、第5.5.3節を参照されたい。）

10

【0277】

ある実施態様において、本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物は、任意の経路、及びおそらくは基準の種々の経路によって患者に投与することができる。これらには、鼻内、気管内、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、経皮、静脈内、結膜内、及び皮下の経路を含むが、これらに限定されない。また、肺への投与は、例えば、吸入器又はネブライザーの使用、及びスプレーとしての使用のためのエアゾール剤を用いた製剤によって採用することができる。

【0278】

本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープをコードする核酸についての例示的な用量は、患者あたり約10ng～1g、100ng～100mg、1μg～10mg、又は30～300μg核酸、例えばDNAの範囲である。

20

【0279】

本明細書に提供されるインフルエンザ結合領域及び／又はエピトープについての例示的な用量は、患者1キログラムあたり約5μg～100mg、15μg～50mg、15μg～25mg、15μg～10mg、15μg～5mg、15μg～1mg、15μg～100μg、15μg～75μg、5μg～50μg、10μg～50μg、15μg～45μg、20μg～40μg、又は25～35μgの範囲である。

【0280】

感染性ウイルスベクターについての用量は、用量あたり10～100以上のウイルス粒子で変動し得る。いくつかの実施態様において、ウイルスベクターの好適な薬用量は、 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、又は 10^{12} プラーク形成単位であり、対象に必要とされるだけしばしば、1回、2回、3回、又はそれより多くの回数ほど、間隔を空けて投与することができる。

30

【0281】

一実施態様において、不活性ワクチンは、約5μg～約50μg、約10μg～約50μg、約15μg～約100μg、約15μg～約75μg、約15μg～約50μg、約15μg～約30μg、約20μg～約50μg、約25μg～約40μg、約25μg～約35μgの本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープを含むよう製剤される。このようなワクチンは、本明細書に提供される1以上の異なる結合領域及び／又はエピトープの組み合わせを含み得る。

40

【0282】

本明細書に提供される結合領域及び／又はエピトープ並びに／あるいは本明細書に提供されるインフルエンザウイルス結合領域及び／又はエピトープを含む免疫原性組成物を投与することのできる患者には、第5.5.1節において同定されたものを含む。

【0283】

(5.7 診断的使用)

本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、インフルエンザウイルスを検出し及びインフルエンザウイルス感染を検出、診断、又はモニターする診断目的のために用いることができる。具体的な実施態様において、抗体は、特定のインフルエンザウイルスが存在するか又は特定のインフルエンザウイルスサブタイ

50

ブが生物検体（例えば、痰、鼻汁、他の流体、細胞、又は組織試料）に存在するかを決定するために用いることができる。

【0284】

以下を含む、インフルエンザウイルス感染の検出のための方法が、本明細書に提供される：(a) 対象由来の生物検体（例えば、痰、鼻汁、細胞、又は組織試料）におけるインフルエンザウイルス抗原の発現を、本明細書に説明される抗体の又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の1以上を用いてアッセイすること；及び(b) インフルエンザウイルス抗原のレベルを対照レベル、例えば、インフルエンザウイルスに感染していない対象由来の生物検体におけるレベルと比較し、この中で、インフルエンザウイルス抗原の対照レベルと比較したインフルエンザウイルス抗原のアッセイされたレベルの増大が、インフルエンザウイルス感染を示すこと。

10

【0285】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルスのサブタイプ、例えば、インフルエンザA型ウイルスのH3サブタイプは、インフルエンザウイルス感染を検出する方法に従って検出することができる。この方法によると、前記アッセイにおいて用いられる、本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、検出されるべきサブタイプに特異的に反応する。

【0286】

以下を含む、インフルエンザウイルス感染を診断する診断アッセイが、本明細書に提供される：(a) 本明細書に説明される抗体の又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体の1以上を用いて、対象由来の生物検体におけるインフルエンザウイルス抗原のレベルについてアッセイすること；及び(b) インフルエンザウイルス抗原のレベルを対照レベル、例えば、インフルエンザウイルスに感染していない対象由来の生物検体におけるレベルと比較し、この中で、インフルエンザウイルス抗原の対照レベルと比較した、アッセイされたインフルエンザウイルス抗原得ベルの増大は、インフルエンザウイルス感染を示すこと。インフルエンザウイルス感染のより確定した診断によって、健常な専門家が予防的処置又は攻撃的処置をより早期に採用することが可能となり得、それにより、インフルエンザウイルス感染の発達又はさらなる進行を予防する。

20

【0287】

(サブタイプ特異的抗体の使用による) 具体的なインフルエンザウイルスサブタイプによる感染の診断によって、特定のサブタイプの治療に最も適した抗ウイルス投薬の処方が可能となり得る。

30

【0288】

本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、本明細書に説明される古典的な免疫組織学的方法又は当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生物試料におけるインフルエンザウイルス抗原レベルをアッセイするために用いることができる（例えば、Jalkanenらの文献（1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985）；及びJalkanenらの文献（1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096）参照）。タンパク質発現を検出するのに有用な抗体ベースの方法には、固相酵素免疫検定法（ELISA）及び放射線免疫検定法（RIA）などの免疫検定法を含む。本明細書に説明される抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される抗体は、検出可能な標識で標識され得るか、又はこのような抗体に結合する二次抗体が、検出可能な標識で標識され得る。好適な抗体アッセイ標識は、当該技術分野で公知であり、グルコースオキシダーゼのような酵素標識；ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{121}In ）、及びテクネチウム（ ^{99}Tc ）などの放射性同位体；ルミノールなどの発光標識；並びにフルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、並びにビオチンを含む。

40

【0289】

また、ヒトにおけるインフルエンザウイルス感染の検出及び診断が、本明細書に提供される。一実施態様において、診断は、以下を含む：a) 対象に有効量の本明細書に説明された標識済みモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製される標識

50

済みモノクローナル抗体を（例えば、非経口的に、鼻内に、皮下に、又は腹腔内に）投与すること；b）標識済み抗体が、インフルエンザウイルス抗原の発現する対象における部位（例えば、鼻腔、肺、口腔、及び耳）において優先的に濃縮できるように（及び結合していない標識済み分子が背景レベルに対して除去されるために）、投与後のある時間間隔を待機すること；c）背景レベルを決定すること；並びにd）背景レベルを上回る標識済み抗体の検出が、対象がインフルエンザウイルス感染又はそれに関連する症状を有することを示すよう、対象における標識済み抗体を検出すること。背景レベルは、検出された標識済み分子の量を特定の系について既に決定された標準値と比較することを含む、種々の方法によって決定することができる。

【0290】

用いられる対象のサイズおよび撮像システムが、診断画像を作るのに必要とされる撮像部分の量を決定することは、当該技術分野で理解されるであろう。放射性同位体部分の場合、ヒト対象については、注射される放射能の量は通常、約5～20ミリキュリーの⁹⁹Tcに及ぶ。次に、標識済み抗体は、特異的なタンパク質を含む細胞の部位において優先的に蓄積する。インビボでの腫瘍撮像は、S. W. Burchielらの文献「放射性標識した抗体及びその断片の免疫薬物動態学（腫瘍撮像：癌の放射性化学的検出における第13章）（Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments (Chapter 13 in Tumors or Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer)）」（S. W. Burchiel及びB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)）において説明されている。

【0291】

使用される標識の種類及び投与の様式を含むいくつかの変数に応じて、対象における部位において、標識済み抗体が優先的に濃縮することができ、かつ結合していない標識済み抗体が背景レベルへと除去されるための投与後の時間間隔は、6～48時間、又は6～24時間又は6～12時間である。別の実施態様において、投与後の時間間隔は、5～20日又は5～10日である。

【0292】

一実施態様において、インフルエンザウイルス感染のモニタリングは、インフルエンザウイルス感染を診断する方法を例えば、初期診断後1ヶ月間、初期診断後6ヶ月間、初期診断後1年間など反復することによって実施される。

【0293】

標識済み分子の存在は、インビボでの走査のために当該技術分野で公知の方法を用いて対象において検出することができる。これらの方法は、使用される標識の種類による。当業者は、特定の標識を検出する適切な方法を決定することができるであろう。本明細書に提供される診断方法において用いられ得る方法及び装置には、コンピュータ断層撮影法（CT）、ポジトロン断層撮影法（position emission tomography）（PET）などの全身走査、磁気共鳴画像法（MRI）、及び超音波検査法を含むが、これらに限定されない。

【0294】

具体的な実施態様において、分子は、放射性同位体で標識され、放射線応答性外科機器を用いて患者において検出される（Thursonらの文献（米国特許第5,441,050号））。別の実施態様において、分子は、蛍光化合物で標識され、蛍光応答性走査機器を用いて患者において検出される。別の実施態様において、分子は、陽電子放射金属で標識され、ポジトロン断層撮影法を用いて患者において検出される。なおも別の実施態様において、分子は、常磁性標識で標識され、磁気共鳴画像法（MRI）を用いて患者において検出される。

【0295】

（5.8 生物学的アッセイ）

（5.8.1 抗体活性を試験するアッセイ）

抗体は、当業者に公知である種々の方法で特徴づけることができる（例えば、ELISA、表面プラズモン共鳴ディスプレイ（ピアコア動態）、ウェスタンブロット法、免疫蛍光検査、免疫染色、及び/又は微量中和アッセイ）。いくつかの実施態様において、抗体は、インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）、又はインフルエン

10

20

30

40

50

ザウイルスに結合する能力についてアッセイされる。

【0296】

インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）又はインフルエンザウイルスに対する抗体の特異性又は選択性、及び他の抗原との交差反応は、当該技術分野で公知である任意の方法によって評価することができる。特異的結合及び交差反応を分析するために用いることができるイムノアッセイには、少しだが例を挙げれば、ウェスタンブロット法、放射線免疫検定法、ELISA（固相酵素免疫検定法（enzyme linked immunosorbent assay））、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる、競合的及び非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない。このようなアッセイは常用され、当該技術分野で周知である（例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ausubelら編の文献「分子生物学における最新プロトコール第1巻（Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1）」（John Wiley & Sons社、New York、1994）参照）。

10

【0297】

インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）又はインフルエンザウイルスに対する抗体の結合親和性、及び抗体抗原相互作用の解離速度は、競合的結合アッセイによって判定することができる。競合的結合アッセイの一例は、漸増する量の非標識抗原の存在下での標識済み抗原（例えば、 ^3H 又は ^{125}I ）と関心対象の抗体とのインキュベーション、及び標識済み抗原に結合した抗体の検出を含む放射線免疫検定法である。インフルエンザウイルス抗原又はインフルエンザウイルスに対する抗体の親和性、及び結合解離速度は、スキャチャードプロット分析によるデータから判定することができる。二次抗体との競合も、放射線免疫検定法を用いて判定することができる。この場合、インフルエンザウイルス抗原又はインフルエンザウイルスは、漸増する量の非標識二次抗体の存在下で、標識済み化合物（例えば、 ^3H 又は ^{125}I ）に抱合した試験抗体と一緒にインキュベートされる。

20

【0298】

いくつかの実施態様では、表面プラズモン共鳴（例えば、ピアコア動態）分析が、インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）又はインフルエンザウイルスに対する抗体の結合速度及び解離速度を測定するために用いられる。ピアコア動態分析は、チップからのインフルエンザウイルス抗原の、チップの表面のインフルエンザウイルス抗原に対する固定化抗体との結合及び解離を分析することを含む。簡潔には、典型的なピアコア動態研究は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素ポリペプチドが固定されているセンサーチップ表面への、0.005%のTween 20を含有するHBS緩衝液中の異なる濃度の250 μL の抗体試薬（mAb、Fab）の注入を包含する。流速は、75 μL /分で一定に保たれる。解離データは、必要に応じて15分間以上収集される。各注入/解離サイクルに続いて、結合抗体は、希酸、典型的には10~100mM HClの短い1分間の投入を用いて、インフルエンザウイルス赤血球凝集素ポリペプチド表面から切り離されるが、状況が保証する場合、たの再生剤が使用される。より具体的には、結合速度 k_{on} 及び解離速度 k_{off} の測定のために、ポリペプチドは、標準のアミン結合化学作用、すなわちEDC/NHS法（EDC = N-ジエチルアミノプロピル)-カルボジイミド）を用いることにより、センサーチップ表面に直接固定化される。簡潔には、pH4又はpH5の10mM NaOAc中のポリペプチドの5~100nM溶液が調製され、およそ30~50RUの相当量のポリペプチドが固定化されるまで、EDC/NHS活性化表面に流される。この後、1MのEt-NH₂の注入によって、未反応の活性エステルが「キャップ」オフされる。参照目的のために、同一の固定化条件の下でポリペプチドが含まれないプランク表面が調製される。一旦、適切な表面が調製されると、抗体試薬の各々の好適な希釈系がHBS/Tween 20で調製され、直列に連結されているポリペプチド及び参照細胞表面の両方に流される。調製された抗体濃度の範囲は、平衡結合定数 K_D の推定値によって異なる。先に説明したように、結合抗体は適切な再生剤を用いて、各注入/解離サイクルの後に

30

40

50

切り離される。

【0299】

抗体の中和活性は、当業者に公知である任意のアッセイを利用して判定することができる。抗体は、当業者に公知である技術を用いて、インフルエンザウイルス、又は赤血球凝集素ポリペプチドなどのインフルエンザウイルス抗原を含む任意の他の組成物（例えば、ウイルス様粒子（VLP）、リポソーム若しくは界面活性剤抽出物）が宿主細胞受容体（すなわち、シアル酸）への結合を阻害する能力について分析することができる。例えば、インフルエンザウイルス受容体を発現する細胞は、抗体の存在下又は不在下でインフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）を含む組成物と接触させることができ、抗原の結合を阻害する抗体の能力は、例えばフローサイトメトリー又はシンチレーションアッセイで測定することができる。インフルエンザウイルス抗原又は抗体を含む組成物は、インフルエンザウイルス抗原を含む組成物と細胞受容体との間の相互作用の検出を可能にするために、放射性標識（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、及び ^{125}I ）又は蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒド、及びフルオレサミン）などの検出可能な化合物で標識することができる。あるいは、インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）のその受容体との結合を阻害する抗体の能力は、無細胞アッセイで判定することができる。例えば、インフルエンザウイルス抗原（例えば、赤血球凝集素ポリペプチド）を含む組成物を抗体と接触させることができ、インフルエンザウイルス抗原を含む組成物の細胞受容体との結合を阻害する抗体の能力を判定することができる。具体的な実施態様において、抗体は固体支持体上に固定化され、インフルエンザウイルス抗原を含む組成物は検出可能な化合物で標識される。あるいは、インフルエンザウイルス抗原を含む組成物は固体支持体上に固定化され、抗体は検出可能な化合物で標識される。

10

20

【0300】

具体的な実施態様において、抗体の中和活性は、後掲の第6.1.4節に説明される微量中和アッセイを用いて評価される。別の具体的な実施態様において、抗体の中和活性は、後掲の実施例6.1.5において説明されるようなブランク減少アッセイを用いて評価される。

【0301】

他の実施態様において、本明細書に説明される方法で使用するのに好適な抗体は、インフルエンザウイルスの受容体結合を阻害しないが、本明細書に説明されるアッセイにおいて中和していることがなおも見出される。いくつかの実施態様では、本明細書に説明される方法に従って使用するのに好適な抗体は、当該技術分野で公知であるか又は本明細書に説明されるアッセイにおいて、ウイルスと宿主膜との融合を低減又は阻害する。

30

【0302】

一実施態様において、ウイルスと宿主膜との融合は、リポーターを含むインフルエンザウイルス及びウイルスに感染することができる宿主細胞を用いるインビトロアッセイにおいてアッセイされる。リポーター活性が陰性対照（例えば、対照抗体の存在下又は抗体の不在下でのリポーター活性）と比較して阻害又は低減されている場合、抗体は融合を阻害する。

40

【0303】

一実施態様において、ウイルスと宿主膜との融合は、細胞融合のモデル系を用いて検出される。例示的な細胞融合アッセイでは、細胞（例えば、HeLa細胞）はインフルエンザウイルス赤血球凝集素ポリペプチドをコードするプラスミドでトランスフェクトされ、抗体の存在下で赤血球凝集素ポリペプチド融合機能を可能にする緩衝液（例えば、pH5.0緩衝液）に接触及び曝露させられる。陰性対照（例えば、対照抗体の存在下又は抗体の不在下でのシンシチウム形成）と比較して、抗体がシンシチウム形成を低減又は阻害する場合、抗体は中和性である。

【0304】

具体的な実施態様において、ウイルスと宿主膜との融合は、当該技術分野で公知の又は

50

本明細書に説明される赤血球細胞融合アッセイ（後掲の第6.1.6参照）を用いてアッセイされる。

【0305】

他の実施態様において、ウイルスと宿主膜との融合は、インビトロでのリポソームベースのアッセイを用いてアッセイされる。例示的なアッセイでは、宿主細胞受容体は、リポーターの半分を含むリポソームに再構成される。インフルエンザ赤血球凝集素ポリペプチドは、リポーターのもう半分を含む別のセットのリポソームに再構成される。2つのリポソーム集団を一緒に混合する場合、融合はリポーターの再構成、例えば比色定量的に検出することができる酵素反応によって検出される。抗体不在下で、又は対照抗体の存在下で行われるアッセイでのリポーター活性と比較して、リポーター活性が低減又は阻害される場合、抗体は融合を阻害する。

10

【0306】

(5.8.2 抗ウイルスアッセイ)

抗体又はその組成物は、抗ウイルス活性についてインビトロで評価することができる。一実施態様において、抗体又はその組成物は、インフルエンザウイルスの増殖に及ぼすこれらの効果についてインビトロで試験される。インフルエンザウイルスの増殖は、（例えば細胞培養における）当該技術分野で公知であるか又は本明細書に説明される任意の方法によって評価することができる。具体的な実施態様において、細胞は、0.0005及び0.001、0.001及び0.01、0.01及び0.1、0.1及び1、若しくは1及び10の感染効率（MOI）、又は0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5若しくは10の感染効率で感染し、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体を補充された無血清培地と一緒にインキュベートされる。ウイルス力価は、赤血球凝集素プラーク、又は本明細書に説明される任意の他のウイルスアッセイによって上清中で判定される。ウイルス力価を評価することができる細胞には、MDCK細胞、EFK 2細胞、Vero細胞、一次ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）、H292ヒト上皮細胞株、及びHeLa細胞を含むが、これらに限定されない。インビトロアッセイには、当該技術分野で周知であるか又は本明細書に説明される方法を用いて、インビトロの培養細胞における（例えば、プラーク形成で測定されるような）変化したウイルス複製、又は（例えば、ウェスタンブロット分析で測定されるような）ウイルスタンパク質の生成、又は（例えば、RT-PCR若しくはノーザンブロット分析で測定されるような）ウイルスRNAを測定するものを含む。

20

30

【0307】

非限定的な一実施例において、単層の標的哺乳類細胞株を異なる量（例えば、3プラーク形成単位（pfu）又は5pfuの多重度）のインフルエンザウイルスに感染させ、その後様々な希釈の、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体（例えば、0.1 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、又は10 µg/mL）の存在下又は不在下で37 °Cで培養する。培養物を寒天と重層し、感染から48時間後又は72時間後に収集し、適切な標的細胞株（例えば、MDCK細胞）に関する当該技術分野で公知である標準的なプラークアッセイによって滴定する。

【0308】

赤血球凝集アッセイの非限定的な実施例において、細胞を抗体と接触させ、同時に又はその後ウイルスに（例えば、1の感染効率で）感染させ、ウイルスの複製を可能にする条件下（例えば、20～24時間）でウイルスをインキュベートする。抗体は、好ましくは感染の全過程で存在する。次に、0.5%のニワトリ赤血球を用いて、ウイルスの複製及びウイルス粒子の放出が赤血球凝集アッセイによって測定される。例えば、Kashyapらの文献（PNAS USA 105:5986-5991）を参照されたい。いくつかの実施態様において、抗体又はその組成物がウイルス複製を、ウイルス力価のおよそ75%の低下に相当する少なくとも2ウェルのHA低減させる場合、抗体又はその組成物はウイルス複製の阻害剤とみなされる。具体的な実施態様において、阻害剤は、このアッセイにおけるウイルス力価を50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は

40

50

95%以上低下させる。他の具体的な実施態様では、阻害剤は、このアッセイにおけるウイルス力価を1 log以上、およそ2 log以上、およそ3 log以上、およそ4 log以上、およそ5 log以上、およそ6 log以上、およそ7 log以上、およそ8 log以上、およそ9 log以上、およそ10 log以上、1~5 log、2~10 log、2~5 log、又は2~10 log低下させる。

【0309】

(5.8.3 細胞傷害性アッセイ)

抗体又はその組成物への曝露の後の細胞（感染済み又は未感染）又は細胞株の生存度を評価し、それにしたがって抗体又はその組成物の細胞傷害性を測定するために、当該技術分野で周知の多くのアッセイを用いることができる。例えば、細胞増殖は、プロモデオキシウリジン（BrdU）の取込み（例えば、Hoshinoらの文献（1986、Int. J. Cancer 38, 369）；Campanaらの文献（1988、J. Immunol. Meth. 107:79）を参照）、(3H)チミジン取込み（例えば、Chen, J.の文献（1996、Oncogene 13:1395-403）；Jeoung, J.の文献（1995、J. Biol. Chem. 270:18367-73）参照）を測定することによって、細胞の直接計数によって、あるいは癌原遺伝子（例えば、fos、myc）などの公知の遺伝子の転写、翻訳若しくは活性の変化、又は細胞周期マーカー（Rb、cdc2、サイクリンA、D1、D2、D3、Eなど）を検出することによってアッセイすることができる。このようなタンパク質及びmRNA並びに活性のレベルは、当該技術分野で周知である任意の方法によって測定することができる。例えば、市販の抗体を含む抗体を用いて、ELISA、ウェスタンブロット法、又は免疫沈降などの公知の免疫診断方法によってタンパク質を定量化することができる。当該技術分野で周知でありかつ常用される方法を用いて、例えば、ノーザン分析、RNアーゼ保護、又は逆転写と連結したポリメラーゼ連鎖反応を用いて、mRNAを定量化することができる。細胞生存度は、トリパンブルー染色又は当該技術分野で公知である他の細胞生死マーカーを用いて評価することができる。具体的な実施態様において、細胞生存度を判定するために、細胞ATPレベルが測定される。

【0310】

具体的な実施態様において、細胞生存度は、細胞内ATPレベルを測定するCellTiter Gloアッセイキット（Promega）など、当該技術分野で標準的なアッセイを用いて、3日間及び7日間の期間で測定される。細胞ATPの低下は、細胞傷害性効果を示す。別の具体的な実施態様では、細胞生存度は、ニュートラルレッド取込みアッセイにおいて測定することができる。他の実施態様では、形態変化の目視には、肥大、粒状度、縁付きの細胞、膜状の外観、円形化、ウェル表面からの脱離、又は他の変化が含まれてもよい。これらの変化は、観察される細胞傷害性の程度に従って、T（100%毒性）、PVH（部分的毒性 非常に重い 80%）、PH（部分的毒性 重い 60%）、P（部分的毒性 40%）、Ps（部分的毒性 わずか 20%）、又は0（無毒性 0%）の等級が与えられ得る。50%細胞阻害（細胞傷害）の濃度（ IC_{50} ）は、これらのデータの回帰分析によって決定される。

【0311】

具体的な実施態様において、細胞傷害性アッセイで用いられる細胞は、初代細胞及び細胞株を含む動物細胞である。いくつかの実施態様では、細胞はヒト細胞である。ある実施態様において、細胞傷害性は、以下の細胞株の1以上で評価される：U937、ヒト単球細胞株；一次末梢血単核細胞（PBMC）；Huh7、ヒト肝芽細胞腫細胞株；293T、ヒト胚性腎臓細胞株；及びTHP-1、単球細胞。ある実施態様において、細胞傷害性は、以下の細胞株の1以上で評価される：MDCK、MEF、Huh 7.5、Detroit、又はヒト気管気管支上皮（HTBE）細胞。

【0312】

抗体又はその組成物は、動物モデルにおけるインビボ毒性について試験することができる。例えば、抗体又はその組成物の活性を試験するために用いられる、本明細書に説明される動物モデル及び/又は当該技術分野で公知である他の動物モデルは、これらの抗体のインビボ毒性を測定するために用いることもできる。例えば、動物は、様々な濃度の抗体を投与される。その後、致死率、体重減少若しくは体重増加の失敗、及び/又は組織損傷を示すことができる血清マーカーのレベル（例えば、一般的な組織損傷の指標としてのク

レアチンホスホキナーゼレベル、起こり得る肝損傷についての指標としてのグルタミン酸シュウ酸トランスアミナーゼ又はピルビン酸トランスアミナーゼのレベル)について、動物は経時的に監視される。これらのインビボアッセイは、投薬量に加えて様々な投与様式及び/又は投与計画の毒性を試験するために、応用されてもよい。

【0313】

抗体又はその組成物の毒性及び/又は有効性は、例えばLD₅₀ (集団の50%に対して致死的な用量)及びED₅₀ (集団の50%において治療的に有効な用量)を判定するための、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学手順によって判定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、それは、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。大きな治療指数を示す抗体又はその組成物が好ましい。毒性副作用を示す抗体又はその組成物が用いられてもよいが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小にし、それによって副作用を低減させるために、患部組織の部位をそのような薬剤の標的にする送達系を設計するように注意すべきである。

10

【0314】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトで使用するための抗体又はその組成物のある範囲の投薬量の処方を用いることができる。好ましくは、このような抗体の投薬量は、ほとんど又は全く毒性のないED₅₀を含むある範囲の循環濃度内に収まる。投薬量は、使用する剤形及び利用する投与経路によって、この範囲内で異なってもよい。本明細書に説明される方法において用いられる抗体又はその組成物について、有効用量は最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で判定されるようなIC₅₀ (すなわち、症状の障害の最大半量を達成する抗体の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、用量を動物モデルにおいて処方することができる。このような情報は、ヒトでの有用な用量をより正確に決定するために用いることができる。血漿レベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーによって測定することができる。投薬量の決定に関する追加的な情報が、本明細書で提供される。

20

【0315】

さらに、例えばウイルス感染又はそれに付随する容態若しくは症状を測定することによって、抗体又はその組成物の予防的及び/又は治療的有用性を評価するために、当業者に公知である任意のアッセイを用いることができる。

【0316】

30

(5.8.4 インビボ抗ウイルス活性を測定するアッセイ)

好ましくは、抗体及びその組成物は、ヒトで用いる前に所望の治療的又は予防的活性についてインビボでアッセイされる。例えば、抗体若しくはその組成物及び/又は別の療法を投与することが好ましいかどうかを判定するために、インビボアッセイを用いることができる。例えば、インフルエンザウイルス疾患を予防するための抗体又はその組成物の使用を評価するために、動物をインフルエンザウイルスに感染させる前に抗体又は組成物を投与することができる。あるいは、又は加えて、動物をインフルエンザウイルスに感染させるのと同時に、抗体又はその組成物を動物に投与することができる。インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患を治療するための抗体又はその組成物の使用を評価するために、動物をインフルエンザウイルスに感染させた後に抗体又は組成物を投与することができる。具体的な実施態様において、抗体又はその組成物は、動物に2回以上投与される。

40

【0317】

抗体及びその組成物は、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウサギ、モルモットなどを含むがこれらに限定されない動物モデル系において、抗ウイルス活性について試験することができる。具体的な実施態様では、抗体又はその組成物は、マウスモデル系において試験される。このようなモデル系は広く使われており、当業者に周知である。インフルエンザウイルスのための動物モデルの非限定的な例は、この節に提供される。

【0318】

50

一般に、動物をインフルエンザウイルスに感染させ、同時に又はその後、抗体若しくはその組成物、又はプラセボで治療する。あるいは、動物を抗体若しくはその組成物又はプラセボで治療し、その後インフルエンザウイルスに感染させる。これらの動物から得られた試料（例えば、血清、尿、痰、精液、唾液、血漿、又は組織試料）は、当該技術分野で周知である方法、例えば変化したウイルス力価（例えば、ブランク形成で測定される）、ウイルスタンパク質の生成（例えば、ウェスタンブロット法、ELISA、又はフローサイトメトリー分析で測定される）、又はウイルス核酸の生成（例えば、RT-PCR又はノーザンブロット分析で測定される）を測定するものを通じて、ウイルス複製について試験することができる。組織試料中のウイルスの定量化のために、組織試料をリン酸緩衝塩類溶液（PBS）においてホモジナイズし、清澄化されたホモジネートの希釈液を、単層の細胞（例えば、Vero細胞、CEF細胞、又はMDCK細胞）の上で37℃で1時間吸着させる。他のアッセイでは、組織病理学的評価、好ましくは、ウイルスが感染の標的にすることが知られている臓器（複数可）の評価が感染後に実施される。ウイルス特異的モノクローナル抗体を用いて、ウイルス免疫組織化学試験を実施することができる。

10

【0319】

また、感染性疾患過程又は所与のウイルスの病原性に及ぼす抗体又はその組成物の効果は、抗体又はその組成物が投与される感染対象におけるウイルスの力価、抗体又はその組成物が投与される感染対象の生存期間、抗体又はその組成物が投与される感染対象における免疫応答、抗体又はその組成物が投与される感染対象における症状の数、持続時間、及び/又は重症度、並びに/あるいは抗体又はその組成物が投与される感染対象における1

20

【0320】

インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤の試験用に開発された、フェレット、マウス、モルモット、及びニワトリなどのインフルエンザウイルス動物モデルが、説明されている。例えば、Sidwellらの文献（*Antiviral Res.*, 2000, 48:1-16）；Lowen A.C.らの文献（*PNAS.*, 2006, 103:9988-92）；及びMcCauleyらの文献（*Antiviral Res.*, 1995, 27:179-186）を参照されたい。インフルエンザのマウスモデルについては、インフルエンザ感染マウスに投与される抗体の抗ウイルス活性をアッセイするために用いることができるパラメータの非限定例には、肺炎関連死、血清 1 酸糖タンパクの増加、動物体重、赤血球凝集素によってアッセイされる肺ウイルス、ブランクアッセイによってアッセイされる肺ウイルス、及び肺の組織病理学的変化を含む。有意性を計算するために、統計的分析が実行される（例えば、0.05以下のP値）。

30

【0321】

なおも他のアッセイにおいて、動物モデル対象の感染後に、組織病理学的評価が実施される。上皮の変化及び上皮下の炎症について、鼻甲介及び気管を調べることができる。大、中、小、又は末端の気管支梢での細気管支上皮の変化及び細気管支周囲の炎症について、肺を調べることができる。炎症性変化について肺胞も評価される。中気管支梢は、以下の通りに0~3+の尺度で等級分けされる：0（正常：繊毛性先端辺縁及び基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ；最小限の炎症）；1+（輪郭が円柱状及び均一で増殖がわずかに増加した上皮層；多くの細胞で繊毛が変わらぬに見られる）；2+（減衰から顕著な増殖までの範囲の上皮層の顕著な変；無秩序な細胞及び管腔境界で不規則な層輪郭）；3+（上皮層は著しく破壊されて無秩序で、管腔には壊死性の細胞が見られる；一部の気管支梢は減衰し、他は顕著な反応性増殖）。

40

【0322】

気管は、以下の通りに0~2.5+の尺度で等級分けされる：0（正常：繊毛性先端辺縁、基底偽重層核を有する中~高円柱状上皮細胞が並ぶ。先端辺縁と核の間に明白な細胞質。時折の扁平上皮細胞を有する小病巣）；1+（上皮層の局所の扁平上皮化生）；2+（上皮層の大部分の散在性扁平上皮化生、繊毛は局所的に明白なことがある。）；2.5+（極めて少ない繊毛が明白である散在性の扁平上皮化生）。

50

【0323】

ウイルス特異的モノクローナル抗体（例えばNP、N又はHN 特異的モノクローナル抗体）を用いて、ウイルス免疫組織化学試験が実施される。染色は、以下の通りに0~3+に等級分けされる：0（感染細胞がない。）；0.5+（わずかな感染細胞）；1+（わずかな感染細胞、広範に離れた個々の細胞として）；1.5+（わずかな感染細胞、広範に離れた単一体として、及び小クラスターで）；2+（中程度の数の感染細胞、気管支梢を裏打ちする上皮層の部分において、又は肺胞の小さな小葉下の病巣において、隣接細胞のクラスターを通常侵す。）；3+（多数の感染細胞、気管支梢の上皮層の大部分を侵すか、又は肺胞の大きな小葉下の病巣に広がる。）。

【0324】

一例では、ウイルス感染動物モデルで肺病変を誘発させて、感染を引き起こす能力が、野生株ウイルス及びモックウイルスを用いて比較される。肺病変は、目視検査によって健康である肺葉の百分率として評価することができる。ペントバルビタールの静脈内投与によって感染5日後に動物を安楽死させ、前記動物の肺全体を摘出する。肉眼的病変に侵された各肺葉の表面の百分率を、視覚的に推定する。各動物の7の肺葉について平均値を得るために、百分率を平均する。他のアッセイでは、ウイルスの負荷又は力価を判定するために、鼻拭き取り検体を試験することができる。感染後のウイルス負荷を判定するために、鼻拭き取り検体を剖検の間に採取することができる。

【0325】

一実施態様では、ウイルスは組織試料において定量化される。例えば、組織試料をリン酸緩衝塩類溶液（PBS）でホモジナイズし、清澄化したホモジネートの希釈液を、単層の細胞（例えば、MDCK細胞）へと37℃で1時間吸着させる。次に、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.01%DEAE デキストラン、0.1%NaHCO₃、及び1%寒天を含有する最小必須培地の溶液を感染単層に重層する。ブランクを可視化することができるまで、プレートに2~3日間インキュベートする。PR8感染試料からウイルスを滴定する組織培養感染量（TCID₅₀）アッセイを、以下の通りに実施する。96ウェルプレート中の細胞（例えば、MDCK細胞）の集密単層を、培地中の清澄化した組織ホモジネートの対数希釈液と一緒にインキュベートする。接種の2~3日後に、赤血球凝集アッセイ（HAアッセイ）によって、各ウェルからの0.05mLの一定分量をウイルス増殖について評価する。

【0326】

具体的な実施態様において、インフルエンザウイルス感染又はそれに付随する疾患を治療する抗体又はその組成物の能力は、対象におけるインフルエンザウイルス疾患に受動免疫を与える抗体の能力を判定することによって評価される。対象におけるインフルエンザウイルス疾患に受動免疫を与える、本明細書に説明されるモノクローナル抗体又は本明細書に提供される方法に従って作製されるモノクローナル抗体の能力は、当該技術分野で公知の又は本明細書に説明される任意の方法を用いて評価することができる（例えば、後掲の第6.2節参照）。

【0327】

（5.8.5 ヒトでのアッセイ）

一実施態様では、インフルエンザウイルスの複製を調節する抗体又はその組成物が、感染ヒト対象において評価される。この実施態様によると、抗体又はその組成物がヒト対象に投与され、ウイルス複製に及ぼす抗体及び/又は組成物の効果は、例えば生体試料（例えば、血清又は血漿）中のウイルス又はウイルス核酸のレベルを分析することによって判定される。ウイルス複製を変化させる抗体又はその組成物は、対照で処置された対象又は対象群におけるウイルス複製レベルを、抗体又はその組成物で処置された対象又は対象群におけるウイルス複製レベルと比較することによって特定することができる。あるいは、ウイルス複製の変化は、抗体又はその組成物の投与の前後に対象又は対象群におけるウイルス複製レベルを比較することによって特定することができる。生体試料を得て、mRNA又はタンパク質の発現を分析するために、当業者に公知である技術を用いることができる。

【0328】

10

20

30

40

50

別の実施態様では、インフルエンザウイルス感染／疾患に付随する1以上の症状の重症度に及ぼす抗体又はその組成物の効果が、感染対象において評価される。この実施態様によると、抗体若しくはその組成物又は対照抗体が、インフルエンザウイルス感染を罹患している対象に投与され、ウイルス感染の1以上の症状に及ぼす抗体又は組成物の効果が判定される。1以上の症状を軽減させる抗体又はその組成物は、対照抗体で処置した対象を抗体又は組成物で処置した対象と比較することによって特定することができる。抗体又はその組成物がインフルエンザウイルス疾患に付随する1以上の症状を軽減させるかどうか判定するために、感染性疾患を熟知している医師に公知である技術を用いることができる。

【0329】

(5.9 キット)

本明細書で提供される1以上の抗体など、本明細書に説明される医薬組成物の成分の1以上を充填した1以上の容器を含む医薬パック又はキットが、本明細書で提供される。医薬又は生物製剤の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定される形式での通知は、このような容器（複数可）に任意に添付することができ、前記通知は、ヒト投与のために、製造、使用、又は販売の前記機関による認可を反映する。

【0330】

本明細書に包含されるキットは、先の方法において用いることができる。一実施態様では、キットは、本明細書に説明される抗体、好ましくは単離された抗体を1以上の容器に含む。具体的な実施態様では、キットは、本明細書に包含される抗体が対照と反応する（例えば、抗体が抗原に結合する。）単離されたインフルエンザウイルス抗原を含む。具体的な実施態様において、本明細書に提供されるキットは、本明細書に包含される抗体が反応するインフルエンザウイルス抗原と反応しない対照抗体（例えば、前記抗体は、抗原に結合しない。）を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるキットは、本明細書に包含される抗体が反応しないインフルエンザウイルス抗原に対する抗体の結合（例えば、前記抗体は、検出可能な基質と抱合する蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物、発光化合物、又は別の抗体などの検出可能な基質に抱合し得る（例えば、前記抗体は、第一の抗体を認識／結合する第二の抗体と抱合し得る。）。）を検出する手段を含む。具体的な実施態様において、キットには、組換え作製された又は化学的に合成されたインフルエンザウイルス抗原を含み得る。他の具体的な実施態様において、キットには、インフルエンザウイルス抗原として、インフルエンザウイルスのHA2の長いアルファヘリックス（例えば、インフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチド）を含み得る。ある具体的な実施態様において、キットには、インフルエンザウイルス抗原として、インフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドの330～513、345～513、359～513、360～513、375～513、390～513、384～439、405～435、及び／又は405～513の範囲内の残基（すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1～184、16～184、30～184、31～184、46～184、61～184、70～110、76～106、及び／又は76～184）を含み得る。具体的な実施態様において、キットは、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたインフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76～106を含む。ある実施態様において、キットには、インフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基330～513、345～513、359～513、360～513、375～513、390～513、384～439、405～435、及び／又は405～513（すなわち、古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされた赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸1～184、16～184、30～184、31～184、46～184、61～184、70～110、76～106、及び／又は76～184）、並びに／あるいは古典的なH3サブタイプ番号付けシステムに従って番号付けされたインフルエンザウイルス株A／香港／1／1968（H3）の赤血球凝集素ポリペプチドのアミノ酸残基76～106を含む／発現するよう作製されたウイルスベクターを含む。また、キットに提供されるインフルエンザウイルス抗原は、固体支持体に付着し得る。より具体的な実施態様において、先に説明さ

10

20

30

40

50

れたキットの検出手段には、インフルエンザウイルス抗原が付着する固体支持体を含む。また、このようなキットには、非付着性リポーターで標識された抗ヒト抗体を含み得る。この実施態様において、インフルエンザウイルス抗原に対する抗原の結合は、前記リポーターで標識された抗体の結合によって検出することができる。

【実施例】

【0331】

(6.実施例)

以下の実施例は、説明のために提示されるものであり、限定のために提示されるものではない。

【0332】

(6.1 交差反応する中和する抗体の作製)

(6.1.1 プラスミドの調製)

3の抗原的に異なるインフルエンザA型ウイルスH3サブタイプ：A/香港/1/1968(プラスミド1)、A/アラバマ/1/1981(プラスミド2)、及びA/北京/47/1992(プラスミド3)の各々に由来する赤血球凝集素(HA)分子をコードする3のDNAプラスミドを作製した。そうするために、各ウイルス由来のHAのオープンリーディングフレームを親ウイルス株から増幅し、哺乳類細胞におけるタンパク質発現を支持するニワトリアクチンプロモーターを含む哺乳類発現ベクターであるpCAGGS(Niwaらの文献(1991, Gene 108:1993-199))へとクローニングした。

【0333】

コンピテント細胞をプラスミド1、プラスミド2、又はプラスミド3のいずれかで形質転換し、陽性形質転換体、すなわちプラスミド1、プラスミド2、又はプラスミド3のいずれかを有する細胞を、アンピシリンに対する耐性を介して選択した。次に、陽性形質転換体を培養し、プラスミドを、Qiagen Maxiprepプラスミド精製キット(Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いて、製造元の説明書に従って精製した。次に、プラスミドDNAを、当該技術分野で公知の方法を用いて配列決定し、プラスミド1~3の各々におけるHA分子の配列同一性を確認した。

【0334】

一旦、プラスミド1~3の各々におけるHA分子をコードするヌクレオチド配列が正確であることが確認されると、プラスミドDNAをPBSにおける $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で調製した(全プラスミド)。このプラスミドDNA濃度をマウスのその後の免疫化において用いた。

【0335】

(6.1.2 免疫化)

10のC57/BL6マウス及び10のBalb/cマウスを免疫化した。第一の免疫化の3日前に、マウスにふくらはぎの筋肉において0.5%ブピバカインを注射した。各免疫化は、3週間間隔で実施し、以下の免疫化スケジュールに従って、 $100\mu\text{L}$ の各プラスミド調製物(プラスミド1~3)の筋肉(ふくらはぎの筋肉)内注射で行った：

1. プラスミド1を用いた免疫化
2. プラスミド2を用いた免疫化
3. プラスミド3を用いた免疫化。

【0336】

プラスミド3を用いた免疫化の3週間後、以下の通り調製されたインフルエンザウイルス株A/ワイオミング/3/2003を用いてマウスを免疫化した：ウイルスを10日齢野ニワトリ卵において増殖させ、その後、スクロースクッションを通じての遠心分離によって濃縮及び精製した。次に、ウイルスをPBSにおいて再懸濁した。Bradfordアッセイを用いてタンパク質濃度を決定し、全タンパク質を $250\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈した。マウスに、 $50\mu\text{g}$ の不活性型ウイルスに相当する $200\mu\text{g}$ ウイルス含有PBSを注射した。各免疫化の2週間後、各マウス由来の血清を評価して、有効な免疫化を確認した。

【0337】

(6.1.3 モノクローナル抗体の作製)

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体を、当該技術分野で公知のハイブリドーマ技術を用いて作製した（例えば、Harlowらの文献「抗体：実験室マニュアル（Antibodies; A Laboratory Manual）」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988）；Hammerlingらの文献「モノクローナル抗体及びT細胞ハイブリドーマ（Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas）」（563 681, Elsevier, N.Y., 1981）参照）。簡潔には、免疫化したマウス由来の脾臓を摘出し、脾細胞を単離した。次に、脾細胞をミエローマ細胞と融合させた。融合後、融合から結果として生じるハイブリドーマを96ウェルプレートに分配した（1のマウスあたり10のプレート、1のウェルあたりおよそ5の生ハイブリドーマ）。融合1週間後、（十分な抗体産生を可能にするために）上清を取り出し、プロット法によって及びELISAによって、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968との反応性についてスクリーニングした。スクリーニングは、プロットアッセイ又はELISAのいずれかによって測定されるように、A/香港/1/1968に対する活性を有するモノクローナル細胞集団が得られるまで、陽性ウェルのサブクロニングと交互の反復ラウンドで実施した。

10

【0338】

ELISAについては、ELISAプレートのウェルを5 µg/mLの精製済みウイルス含有PBSで被覆し、プレートを37 °Cで3時間又は4 °Cで一晩のいずれかでインキュベートした。アッセイに先立って、精製済みウイルスをウェルから取り出し、1%BSA含有PBSを室温で30分間添加した。ウェルをその後、0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄した後、ハイブリドーマ上清（1:2に希釈）を添加し、37 °Cで3時間又は4 °Cで一晩インキュベートした。ウェルをその後0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄し、1%BSA含有PBSに希釈したアルカリホスファターゼ抱合型抗マウスIgGを各ウェルに添加したのち、37 °Cで3時間又は4 °Cで一晩インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸（p-nitrophenylphosphate）基質を各ウェルに添加した。反応をウェルにおいて顕色させておき、ハイブリドーマ上清とインフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968との反応性を判定した。

20

【0339】

プロットアッセイによる反応性の評価について、精製済みウイルスをニトロセルロース膜へと吸着させた。次に前記膜を、1%BSA含有PBSを用いて室温で30分間ブロッキングしたのち、前記膜をハイブリドーマ上清（1:2に希釈）とともに室温で1時間、緩徐に揺らしながらインキュベートした。次に、前記膜を0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄したのち、前記膜を、1%BSA含有PBSに希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ抱合型抗マウスIgGとともに、室温で1時間インキュベートした。次に、前記膜を0.05%Tween 20含有PBSで3回洗浄した後、化学発光基質を添加した。次に、ハイブリドーマ上清とインフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968との反応性を、標準的な技術を用いるウェスタンブロット法によって評価した（例えば、Sean Gallagherの文献「タンパク質科学における最新プロトコル（Current Protocols in Protein Science）」（Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, 1996）参照）。

30

【0340】

A/香港/1/1968に対するいずれかのアッセイにおける活性を有する上清をサブクロニングし、モノクローナル抗体を単離した。

40

【0341】

次に、H3サブタイプの種々のインフルエンザA型ウイルス株を結合するモノクローナル抗体の能力を、ELISA又はウェスタンブロット法によって評価した。図1のAに示すように、精製済みモノクローナル抗体7A7及び39A4の両方は、ELISAによって評価されるように、A/香港/1/1968（H3）に結合する。精製済みモノクローナル抗体12D1は、ウェスタンブロット法によって評価されるように、A/香港/1/1968（H3）に結合する。加えて、精製済みモノクローナル抗体12D1は、ウェスタンブロット法によって評価されるように、株A/パナマ/2007/1999（H3）を結合し（図1のB）；並びにモノクローナル抗体7A7及び39A4は、ELISAによって評価されるように、株A/香港/1/1968（H3）、A/パナマ/2007/1999（H3）、及びA/ウィスコンシン/67/2005（H3）を結合する。

50

【0342】

(6.1.4 微量中和アッセイ)

H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスを中和する第6.1.3節において作製されたモノクローナル抗体の能力を、微量中和アッセイを用いて評価した。

【0343】

中和標的としての使用のためのウイルスを以下のとおり作製した：3の安定した細胞株を、MDCK細胞を用いて作製し、各々、以下のウイルスのうちの1の赤血球凝集素を発現した：A/香港/1/1968、A/パナマ/2007/1999、A/ウイスコンシン/67/2005。細胞株を、A/WSN/33由来の7のセグメント（HAを除く全部）及びウミシタケルシフェラーゼをコードする1のセグメント（すなわち、偽型ウイルス）を含むウイルスに感染させた。WSNルシフェラーゼウイルスによるHA発現細胞の感染は、安定した細胞株由来のHAを発現しかつ（微量中和アッセイにおける感染についての読み出しとして用いられるべき）ウミシタケルシフェラーゼをコードするウイルスを生じた。

【0344】

次に、モノクローナル抗体を、偽型ウイルスによるMDCK細胞の感染を予防する前記モノクローナル抗体の能力について評価し；読み出しは、下記に詳述されるようにルシフェラーゼ活性であった。

【0345】

96ウェルプレートにおいて、モノクローナル抗体をPBSにおける2倍希釈に連続希釈した。各ウェルにおける抗体/PBSの最終容積は55 μ Lであった。A/香港/1/1968、A/パナマ/2007/1999、又はA/ウイスコンシン/67/2005に由来するいずれかの赤血球凝集素を発現する、PBSに希釈された5 μ Lの50pfu/mLの偽型ウイルスを各ウェルに添加し、ウイルス/抗体混合物を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。30分後、50 μ Lのウイルス/抗体混合物を取り出し、MDCK細胞を集密になるまで蒔種された96ウェルプレートに添加した。細胞をウイルス/抗体混合物とともに37 $^{\circ}$ Cで8~20時間培養した。培養後、細胞をすすぎ、細胞を溶解した。次に、ルシフェラーゼ活性を、ルミノメーターを用いて相対的光単位を読み取ることによって測定した。このアッセイによると、発光の欠失は、ウイルスによる感染がなく、それによりモノクローナル抗体によるウイルスの中和がないことを示している。

【0346】

図2に示すように、モノクローナル抗体7A7、39A4、及び12D1はすべて、A/香港/1/1968インフルエンザA型ウイルス株（図2A）及びA/パナマ/2007/1999インフルエンザA型ウイルス株（図2B）の両方を中和することができる。

【0347】

(6.1.5 プラーク減少アッセイ)

H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスを中和する、第6.1.3節において作製されたモノクローナル抗体の能力を、プラーク減少アッセイを用いてさらに評価した。

【0348】

モノクローナル抗体の種々の希釈物を、ウイルス（~50pfu/ウェル）を有する96ウェルプレートにおいて1時間、緩徐に揺らしながらインキュベートした。ウイルス/抗体混合物（200 μ L）をその後、集密になるまで増殖させたMDCK細胞に添加した。細胞及びウイルス/抗体混合物を37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした後、ウイルス/抗体混合物を細胞から吸引し、細胞を、分析されるウイルス/抗体混合物中の抗体濃度と同一の抗体濃度を有する寒天に重層した。次に、プレートを37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベートし、プラーク形成をさせておいた。

【0349】

図3に示すように、モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、試験したH3サブタイプのすべてのインフルエンザA型ウイルス株、すなわちA/香港/1/1968（H3）、A/北京/47/1992（H3）、A/パナマ/2007/1999（H3）、及びBRIS/07（H3）を中和するが、試験したH3以外のサブタイプのインフルエンザA型ウイルス株、すなわち、New CAL/99（

H1)、DK/64(H4)、及びTKY/63(H7)を中和しない。

【0350】

(6.1.6 赤血球融合アッセイ)

H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスと宿主細胞との間の融合を阻害する第6.1.3節において作製されたモノクローナル抗体の能力を、赤血球融合アッセイを用いて評価した。

【0351】

ウイルスをニワトリ赤血球(0.2%終濃度の赤血球)とともに氷上で10分間インキュベートした後、モノクローナル抗体を添加した。ウイルス、細胞、及び抗体の混合物を氷上で30分間インキュベートした後、クエン酸ナトリウム緩衝液pH4.4を添加し、室温で5~30分間インキュベートした。200µLのウイルス、細胞、及び抗体混合物を種々の時点で取り出し、3000rpmで3分間遠心分離し、上清を96ウェルELISAプレートに転移し、OD₄₁₀を読み取った。陽性の読み取りは、上清中のヘムの存在を示し、このことは、赤血球の溶解が、細胞とウイルスとの間の、特にウイルスの赤血球凝集素タンパク質と細胞との間の低pH融合反応によって生じたことを示す。

10

【0352】

図4に示すように、モノクローナル抗体7A7及び12D1は、A/香港/1/1968(H3)赤血球凝集素と赤血球との低pH融合を阻害する。

【0353】

(6.1.7 結論)

本明細書に提供される交差反応する中和するモノクローナル抗体を作製する方法は、互いに抗原的に異なるH3サブタイプのインフルエンザA型ウイルス株由来の赤血球凝集素と交差反応するモノクローナル抗体の作製を成功裏に生じる。その上、これらの抗体は、複数のアッセイによって判定されるように、試験したH3サブタイプのインフルエンザA型ウイルス株すべてを中和することができる。

20

【0354】

(6.2 交差反応する中和する抗体の受動的転移によるインビボ保護)

インフルエンザA型ウイルスの負荷からマウスを保護する、本明細書に説明された方法に従って作製された交差反応する中和するモノクローナル抗体の能力を、マウスにおける抗体の受動的転移によって評価した。

30

【0355】

受動免疫を与える、本明細書に説明される方法に従って作製される交差反応する中和するモノクローナル抗体の能力は、インフルエンザウイルスに感染したマウスの生存を長期化する抗体の能力を評価することによって決定することができる。この方法によると、マウスに、インフルエンザウイルスによる負荷の前に、例えば、負荷の1時間前に交差反応する中和するモノクローナル抗体を投与する。次に、マウスの生存の期間を算出し、交差反応する中和するモノクローナル抗体よりもむしろ対照、例えば、PBSを投与された、同様に負荷したマウスの生存と比較する。

【0356】

図5に示すように、腹腔内注射によっておよそ15mg/kgのモノクローナル抗体12D1を投与した1時間後に10⁵pfu/mLのX31ウイルスを鼻内負荷した雄BALB/cマウス(1群あたり5個体、6~8週齢)は、ウイルス負荷を生き残るのに対し、PBS単独を投与したマウスは、ウイルス負荷の7日後に死亡する。

40

【0357】

受動免疫を与える、本明細書に説明される方法に従って作製される交差反応する中和するモノクローナル抗体の能力は、インフルエンザウイルスに感染したマウスの体重減少を阻害する抗体の能力を評価することによって判定することができる。この方法によると、マウスに、インフルエンザウイルスの負荷の前に、例えば、負荷の1時間前に交差反応する中和するモノクローナル抗体を投与する。次に、マウスの体重減少を経時的に測定し、交差反応する中和するモノクローナル抗体よりもむしろ対照、例えばPBSを投与した同様

50

に負荷したマウスの体重減少と比較する。

【0358】

図7に示すように、交差反応する中和するモノクローナル抗体12D1及び39A4の受動的転移は結果として、抗体よりもむしろPBSを投与したマウスと比較すると、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)を負荷したマウスにおける少ない体重減少を結果として生じ、したがって、これらのマウスにおけるA/香港/1/1968(H3)株に対する受動免疫の発生を示す。異なる群のマウス(1群あたり5個体)に、A/香港/1/1968(H3)由来の赤血球凝集素セグメント及びノイラミニダーゼ遺伝子セグメント並びにマウスインフルエンザA型ウイルスA/PR/8/34由来の6の他のインフルエンザウイルス遺伝子セグメント(赤血球凝集素及びノイラミニダーゼではない。)を含むキメラウイルスである 10^5 pFU/mLのX31による鼻内負荷の1時間前に、モノクローナル抗体12D1(30mg/kg)、モノクローナル抗体39A4(15mg/kg又は30mg/kg)、又はPBSを腹腔内注射により投与した。マウスの体重を各日に測定し、各群における5のマウスの平均体重を図7にプロットする。

【0359】

(6.2.1 結論)

本明細書に説明される方法に従って作製される交差反応する中和するモノクローナル抗体は、受動免疫をインビボで与えることができる。

【0360】

(6.3 交差反応する中和するモノクローナル抗体の結合領域の決定)

本明細書に説明される方法に従って作製される交差反応する中和するモノクローナル抗体の結合領域を決定するために、A/香港/1/1968(H3)赤血球凝集後の異なる断片に融合した緑色蛍光タンパク質(GFP)のコード配列を含む融合タンパク質をコードする核酸コンストラクトを作製した。HA断片をポリメラーゼ連鎖反応によって作製し、その後、pCAGGS-GFPベクターへとクローニングした。種々の核酸コンストラクトによってコードされた融合タンパク質の線図については図8を参照されたい。各核酸コンストラクト(50ng/6ウェル皿)を293T細胞へトリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いてトランスフェクトし、細胞によって発現する融合タンパク質に結合するモノクローナル抗体の能力を、標準的な技術を用いるウェスタンブロット法によって評価した(例えば、Sean Gallagherの文献「タンパク質科学における最新プロトコール(Current Protocols in Protein Science)」(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, 1996)参照)。

【0361】

図9に示すように、モノクローナル抗体12D1は、アミノ酸残基304~513及びその小さな断片に相当するA/香港/1/1968(H3)赤血球凝集素の領域に結合する抗体の能力によって示されるように、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素タンパク質のHA2領域に結合する(図9B、レーン5~10)。特に、モノクローナル抗体12D1は、アミノ酸405~513に相当するA/香港/1/1968(H3)赤血球凝集素の領域に結合することができる(図9B、レーン10)。予期したように、抗GFP抗体は、GFP融合を有する各コンストラクトに結合し(図9A、レーン3~10)、抗GFP抗体は、A/香港/1/1968(H3)赤血球凝集素に結合せず(図9A、レーン2)、モノクローナル抗体12D1も抗GFP抗体も、トランスフェクトされていない細胞由来の細胞溶解液に結合しなかった(図9A及びB、レーン1)。

【0362】

(6.4 広範に保護する抗インフルエンザ抗体)

(6.4.1 材料及び方法)

(6.4.1.1 動物)

Jackson Laboratory製の6週齢の雌BALB/cマウスをすべての実験に用いた。

【0363】

ATCC製のメイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞をすべての細胞ベースのアッセイに用いた。細胞を10%ウシ胎仔血清、及び100単位/mLのペニシリン 100 µg/mLのストレプト

マイシンを補充した最小必須培地において維持した。すべてのウイルスを、卵において増殖させた。種々の研究に用いたウイルス：A/香港/1/1968(HK/68)(H3)、A/アラバマ/1/1981(AL/81)(H3)、A/ジョージア/1981(H3)、A/北京/47/1992(BJ/92)(H3)、A/ワイオミング/3/2003(H3)、A/ウィスコンシン/67/2005(WI/05)(H3)、A/プリズベーン/10/2007(BR/07)(H3)、A/ニューヨーク/2008(NY08)(H3)、A/テキサス/36/1991(TX/91)(H1)、A/ニューカレドニア/20/99(N.Cal/99)(H1)、A/アヒル/イングランド/1962(Dk/62)(H4)、A/シチメンチョウ/イングランド/1963(Tky/63)(H7)、A/ウマ/ケンタッキー/2002(e/KY/02)(H3)、A/アンアーパー/6/1960(AA/60)(H2)、A/フォートモンマウス/1/1947(FM/47)(H1)。精製済みウイルスを、20%スクロースクッションを通じての尿膜液の高速遠心分離(43,000rpm、1時間)によって調製した。

10

【0364】

(6.4.1.3 抗体調製)

ハイブリドーマ上清を、固相酵素免疫検定法(ELISA)による、及びウェスタンブロット法による、反応性についてのモノクローナル抗体のスクリーニングに用いた。他のアッセイについては、受容体破壊酵素を用いて処理した精製済みモノクローナル抗体又は腹水調製物(例えば、Jordanらの文献(J Immunol, 1954; 72(3): 229-35)参照)を用いた。受容体破壊酵素で処理した腹水を、ELISAアッセイ、微量中和アッセイ、プラーク減少アッセイ、及び融合アッセイによる結合の測定に用いた。抗体を、すでに説明した方法によって精製した(例えば、Hawlow E参照の文献「レーンD 抗体：実験室マニュアル(Lane D. Antibodies: a laboratory manual)」(Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. Xiii, 726p))。アイソタイプにおける差のため、プロテインAアガロース(Roche)をモノクローナル抗体7A7及び39A4の精製に用いたのに対し、プロテインGアガロース(Roche)をモノクローナル抗体(mAb)12D1の精製に用いた。

20

【0365】

(6.4.1.4 マウスの免疫化及びハイブリドーマ作製)

6週齢のBALB/cマウスを、pCAGGSプラスミドにおけるインフルエンザウイルス赤血球凝集素のオープンリーディングフレームをコードするDNAコンストラクトで免疫化した(例えば、Baslerらの文献(Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2746-2751)参照)。個々の免疫化は、筋肉内に3週間間隔で与えられ、100 µg DNA含有100 µL PBSからなった。免疫化スケジュールにおいて利用される赤血球凝集素を、以下の親ウイルスからクローニングした一次免疫：A/香港/1/1968、二次免疫：A/アラバマ/1/1981、三次免疫：A/北京/47/1992のHA。融合3日後、マウスを50 µgの精製済みA/ワイオミング/3/2003ウイルスで追加免疫した。B細胞ハイブリドーマを、すでに説明された方法によって作製した(例えば、de StGrothらの文献(J Immunol Methods 35: 1-21)参照)。

30

【0366】

(6.4.1.5 ハイブリドーマ上清のスクリーニング)

ハイブリドーマ上清を、A/香港/1/1968ウイルスとの反応性について、プロット法によって及びELISAによってスクリーニングした。ELISAについては、5 µg/mLの精製済みウイルス(ウェルあたり50 µL)で被覆したウェルに対する直接的な結合を評価した。プロットアッセイについては、10 µgの精製済みウイルスをニトロセルロースストリップに吸着させ、個々のストリップをハイブリドーマ上清とともにインキュベートした。ELISAアッセイ及びプロットアッセイについては、ウイルスに対する抗体の結合を、ヤギ抗マウス鎖セイヨウワサビペルオキシダーゼ二次抗体(SouthernBiotech, Birmingham, Al)を用いて検出した。A/香港/1/1968ウイルスに対するいずれかのアッセイにおいて活性を有するすべてのウェルを反復してサブクローニングし、ハイブリドーマ集団の単クローニング性を確実にした。

40

【0367】

(6.4.1.6 ウェスタンブロット)

プロットを、すでに説明した方法によって作製した(例えば、Towbinらの文献(Proc N

50

atI Acad Sci U S A 1979 ; 76(9) : 4350-4) 参照)。SDS泳動緩衝液を電気泳動に用いた。非還元的ゲル条件のために、試料を、SDSを有するが還元剤を有さない深緩衝液において調製し、煮沸しなかった。

【 0 3 6 8 】

(6 . 4 . 1 . 7 免疫蛍光試験)

MDCK細胞をウイルスに1の感染効率で感染させ、37 °Cで6時間インキュベートした。感染済み細胞及び非感染細胞を1 µg / mLのモノクローナル抗体とともに室温で1時間インキュベートした。ヤギ抗マウスフルオレセイン抱合体 (SouthernBiotech) をモノクローナル抗体結合の検出に用いた。

【 0 3 6 9 】

(6 . 4 . 1 . 8 微量中和アッセイ)

A / 香港 / 1 / 1968ウイルス又はA / パナマ / 2007 / 1999ウイルスのHAを発現する2の安定した細胞株を作製した。いずれかの細胞株のHAを発現する偽型ウイルスを、A / WSN / 33ウイルス由来の7のセグメント (HAセグメントを除くすべて) 及びウミシイタケルシフェラーゼをコードする1のセグメントを有するウイルスによる細胞の感染によって作製した。A / 香港 / 1 / 1968ウイルス又はA / パナマ / 2007 / 1999ウイルスのHAを発現する偽型ウイルスを中和標的として用いた。ウイルスをモノクローナル抗体とともに室温で30分間、緩徐に揺らしながらインキュベートした。精製済みポリクローナルマウスIgG (Invitrogen) を陰性対照に用いた。次に、ウイルス及びモノクローナル抗体を含む混合物を、MDCK細胞を集密になるまで蒔種した96ウェルプレートのウェルに転移し、37 °Cで12時間インキュベートした。個々の決定要因を三つ組で実施した。インキュベーション後、細胞溶解液におけるルシフェラーゼ活性を、ウイルス感染の読み出しとして測定した (ウミシイタケルシフェラーゼアッセイシステム、Promega)。

【 0 3 7 0 】

(6 . 4 . 1 . 9 プラーク減少アッセイ)

抗体及びウイルス (~ 50pfu / ウェル) を室温で30分間緩徐に揺らしながら共インキュベートした。MDCK細胞を蒔種した6のウェルプレートPBSで1回洗浄し、200 µLのウイルス及びモノクローナル抗体を各ウェルに添加した後、37 °Cで20分間インキュベートした。ウイルスをモノクローナル抗体とともに細胞から吸引し、抗体を含む寒天重層物を各ウェルに添加した。プレートを37 °Cで3日間インキュベートし、プラークをクリスタルバイオレット染色によって計数した。精製済みマウスIgG (Invitrogen) を陰性対照に用いた。

【 0 3 7 1 】

(6 . 4 . 1 . 10 受動的転移実験)

感染の前に、マウスをケタミン (75mg / 体重kg) / キシラジン (15mg / 体重kg) の腹腔内投与によって麻酔した。6週齢のBALB / cマウスに、10LD₅₀のA / 香港 / 1 / 1968、A / PR / 8 / 34リアソータントウイルス、又は2700pfuのA / ジョージア / 1981ウイルスによる負荷の1時間前、24時間後、又は48時間後のいずれかに30mg / kgモノクローナル抗体を腹腔内で与えた (肺力価実験)。精製済みマウスIgG (Invitrogen) を陰性対照に用いた。ウイルスをPBSに懸濁し、50 µLで鼻内投与した (鼻孔あたり25 µL)。マウスを毎日体重測定し、開始体重の75%にまで減少した場合、屠殺した。肺力価実験のために、マウス肺をA / ジョージア / 1981による感染の4日後に摘出し、肺ホモジネートにおけるウイルス力価をプラークアッセイによって判定した。肺の損傷の組織学的評価のために、肺をA / 香港 / 1 / 1968 A / PR / 8 / 34リアソータントウイルスによる感染の4日後に摘出した。組織をパラフィン包埋し、切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色した。

【 0 3 7 2 】

(6 . 4 . 1 . 11 赤血球凝集素阻害アッセイ及び融合アッセイ)

マウスモノクローナル抗体を、ニワトリ赤血球及びA / 香港 / 1 / 1968ウイルスを用いる標準的な赤血球凝集阻害アッセイ (例えば、Cohenらの文献 (Virology 1963 ; 20 : 518-29) 参照) において試験した。赤血球融合アッセイのために、ウイルスをニワトリ赤血球 (2% 赤血球終濃度) とともに氷上で10分間インキュベートした。抗体の希釈物を添加し、

10

20

30

40

50

試料を氷上で30分間インキュベートした。次に、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.6) を添加して、最終的なpHを5.0にし、試料を室温で30分間インキュベートした。試料を3000rpmで3分間遠心分離して、赤血球をペレットにした後、上清をELISAプレートに転移し、工学密度測定 (340nm) によってNADPH含有量を決定した。NADPHは、融合誘発性赤血球溶解の関数として上清に存在した。

【0373】

(6.4.1.12 赤血球凝集素切断突然変異体)

緑色蛍光タンパク質に融合したA/香港/1/68ウイルス赤血球凝集素の切断物をコードするDNAコンストラクトをpCAGGSプラスミドにおいて作製した。すべてのコンストラクトを配列決定及び確認した。次に、293T細胞に、リポフェクタミン2000 (Invitrogen, Inc.) を用いてHA-GFP融合遺伝子をコードする種々のpCAGGSをトランスフェクトした。細胞溶解液を4~20% トリス-HCl SDS PAGEゲル (Bio Rad Laboratories) で分離し、タンパク質をProtranニトロセルロース膜 (Whatman) へとプロットした。GFP及び切断型HA断片を、ウサギ抗GFP (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 及び抗H3モノクローナル抗体12D1をそれぞれ用いて検出した。二次抗体は、抗ウサギIgG HRP (Dako) 及び抗マウスIg HRP (GE Healthcare) であった。

10

【0374】

(6.4.2 結果)

(6.4.2.1 広範に反応する抗H3モノクローナル抗体の単離)

交差反応性抗体の特異性の提供を高めるために、マウスを、およそ10年間隔で生じるH3ウイルス:A/香港/1/1968、A/アラバマ/1/1981、A/北京/47/1992由来の赤血球凝集素をコードするDNAによる連続投与によって免疫化した。融合3日前に、マウスをH3ウイルスA/ワイオミング/3/2003で追加免疫した。ウイルスの追加免疫直後に融合を実施することによって、赤血球凝集素特異的B細胞のみが融合時に脾臓に存在することを確実にした。選択された赤血球凝集素は、数十年間にわたって生じるウイルスに由来し、したがって、複数のH3抗原クラスターを提示した (例えば、Smithらの文献 (Science 2004; 305 (5682): 371-6) 参照)。融合後、ハイブリドーマ上清を、A/香港/1/1968を結合する能力について、ウェスタンブロット法によって又はELISA法によってスクリーニングし、サブクローニングの連続的なラウンドを、モノクローナルハイブリドーマ集団を単離するまで陽性上清に関して実施した。

20

30

【0375】

利用した免疫化スケジュールは、H3ウイルスに対する広範な反応性を有する抗体の産生を成功裏に誘発した。A/香港/1/1968と反応するおよそ120のクローンを単離し; このうち、8のモノクローナル抗体は、試験したH3赤血球凝集素すべてに対して交差反応性であった。また、特定の免疫化プロトコールは、赤血球凝集素のHA2サブユニットに特異的な抗体の産生を優先的に誘発した。同定された8のモノクローナル抗体のうち、ウェスタンブロット法によって、5のモノクローナル抗体はHA2と反応し、1のモノクローナル抗体は、HA1と反応する。残りの2のモノクローナル抗体 (7A7及び39A4) は、非還元的ゲル条件のもとで分離された精製済みH3ウイルスタンパク質のウェスタンブロット法によって検出されるように、HA三量体に存在する立体配座エピトープを結合する。すべてのモノクローナル抗体は、精製済みH3ウイルスELISAにおいて反応性であった。モノクローナル抗体のうち3、すなわち7A7、12D1、39A4はELISAによる最大活性を有しており、全体的な特徴づけのために選択された (表1、図10)。

40

表1: 抗H3モノクローナル抗体の反応性のパターン。すべてのモノクローナル抗体は、ELISAによる活性を有しており、すべてのモノクローナル抗体は、還元的条件下でウェスタンブロット法によって反応するが、例外は、モノクローナル抗体7A7及び39A4であり、これらは非還元的条件下でHA三量体と反応する。すべてのモノクローナル抗体は、50 µg/mLにおける赤血球凝集素阻害活性について陰性である。

【表 1】

	アイソタイプ	ELISA	WB	HI
7A7	IgG2b	+	三量体	-
12D1	IgG1	+	HA2	-
39A4	IgG2a	+	三量体	-
62F11	IgG2a	+	HA2	-
36A7	IgG2b	+	HA2	-
66A6	IgG1	+	HA1	-
49E12	IgG2b	+	HA2	-
21D12	IgG1	+	HA2	-

10

20

30

【 0 3 7 6 】

抗体7A7、12D1、及び39A4は、ELISAによって、精製済みA/アラバマ/1/1981ウイルス及び精製済みA/香港/1/1968ウイルスと反応する(図11)。モノクローナル抗体XY102は、A/香港/1/1968ウイルスの赤血球凝集素に特異的である。7A7、12D1、及び39A4は、40年間の漂流にわたるすべてのH3ウイルスに感染した細胞に対する免疫蛍光による広範な反応性を示す。また、モノクローナル抗体7A7及び39A4は、無作為に選択された他のインフルエンザウイルスA型と免疫蛍光によって反応し、これには、代表的なH1ウイルス、H2ウイルス、及びウマH3ウイルスを含む(表2)。

表2：無作為に選択されたウイルスのパネルに感染したMDCK細胞に対する免疫蛍光による5µg/mLでのモノクローナル抗体の反応性。モノクローナル抗体XY102は、A/HK/1968(H3)ウイルスによる免疫化によって作製され、モノクローナル抗体10C4は、A/TX/1991(H1)ウイルスによる免疫化によって作製された。

40

【表 2】

ウイルス	サブタイプ	7A7	12D1	39A4	10C4	XY102
HK/68	H3	+	+	+	-	+
AL/81	H3	+	+	+	-	-
BJ/92	H3	+	+	+	-	-
WI/05	H3	+	+	+	-	-
BR/07	H3	+	+	+	-	-
NY/08	H3	+	+	+	-	-
TX/91	H1	+	-	+	+	-
FM/47	H1	+	-	+	-	-
AA/60	H2	+	-	+	-	-
ウマ/ KY/02	H3	+	-	+	-	-

10

20

30

【0377】

(6.4.2.2 モノクローナル抗体は40年間の漂流にわたるH3ウイルスを中和する)

抗H3モノクローナル抗体をまず、H3インフルエンザウイルスを中和する能力について微量中和アッセイによって評価した。このアッセイにおいて用いられるウイルスは、ウイルス赤血球凝集素の代わりにホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子セグメントを含んでおり；赤血球凝集素は、特にH3赤血球凝集素タンパク質を安定して発現する細胞におけるウイルスの増殖によりウイルス外皮膜上に存在する。A/香港/1968又はA/パナマ/99ウイルスの赤血球凝集素を発現するルシフェラーゼウイルスを作製した。抗H3モノクローナル抗体によるウイルスの中和は、単一周期の複製後のルシフェラーゼ活性に基づいて判定された。微細中和によって、3の抗H3モノクローナル抗体は、A/香港/1968及びA/パナマ/99の両方の赤血球凝集素を中和すると判定された(図12)。

40

【0378】

次に、ブランク減少アッセイによる中和活性を評価した。抗H3モノクローナル抗体は、40年間の漂流にわたって生じるH3ウイルス：A/香港/1968、A/北京/1992、A/パナマ/99、A/プリズベーン/07、A/ニューヨーク/08によるメイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞の感染を予防することができた(単純にブランクのサイズを減少させたものではない)。モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、代表的なH4ウイルス及びH7ウイルス(第2群)並びにH1ウイルス(第1群)に対して試験され、前記抗体は、これら非H3サブタイプウイルスを中和しないと判定された(図13)。

【0379】

50

(マウスにおけるインフルエンザの治療における抗H3モノクローナル抗体)

3のモノクローナル抗体を、H3ウイルス感染によって生じた疾患における受動的転移療法としての使用のために、インビボで試験した。マウスに30mg/kgのモノクローナル抗体を、10のマウスLD₅₀リアソータントH3ウイルスによる負荷の1時間前、24時間後、又は48時間後のいずれかに腹腔内で与えた(A/香港/68リアソータントウイルスは、マウス適応性A/PR/8ウイルス由来の6の非赤血球凝集素、非ノイラミニダーゼセグメントを含んでいる)。マウスを毎日体重測定し、開始体重の75%に到達する場合に屠殺した。モノクローナル抗体12D1による予防的又は治療的のいずれかのマウスの処置は、100%保護的であった。モノクローナル抗体39A4は、予防的処置による有効性について評価され、インビボで同様に100%保護的であった。モノクローナル抗体7A7により予防的に処置されたマウスは、A/香港/68リアソータントウイルスに対して40%しか保護されなかった(図14)。

10

【0380】

次に、H3ウイルス性肺炎によって生じる肺の損傷に及ぼすモノクローナル抗体12D1又は39A4による予防的処置の効果を、A/香港/68リアソータントウイルスによる感染の4日後に採取された組織の組織学的評価によって評価した。処置なしの場合、肺は、限局性出血を伴う変性変化、高密度の好中球浸潤、及び浮腫による散在性肺胞損傷を示した。いずれかの抗H3モノクローナル抗体による処置は、病理学的変化を有意に減少させた(図15)。

【0381】

A/香港/68リアソータントウイルスに対するインビボでの保護的活性を示したので、第二のH3ウイルスA/ジョージア/1981に対するモノクローナル抗体12D1及び39A4によって仲介される交差保護を評価した。モノクローナル抗体12D1及び39A4を、先に説明する通り、BALB/cマウスへ感染1時間前に投与した。次に、マウスを2700pfuのA/ジョージア/1981で鼻内感染させ、肺の力価を感染2日後に評価した。抗H3モノクローナル抗体は、肺の力価を97.75%(12D1)又は99.03%(39A4)低下させた(図16)。

20

【0382】

(6.4.2.4 抗H3モノクローナル抗体は、ウイルス融合を阻害することによって作用する)

抗H3モノクローナル抗体によるウイルス中和の機序を決定するために、ニワトリ赤血球のウイルス赤血球凝集を阻害するモノクローナル抗体の能力を検討した。3のモノクローナル抗体のうちいずれも赤血球阻害活性を有さず、前記モノクローナル抗体が宿主細胞に対するウイルスの結合を妨害することによって作用しないことを示唆した。

30

【0383】

次に、ウイルス融合に及ぼす抗H3モノクローナル抗体の効果を試験した。モノクローナル抗体7A7、12D1、及び39A4は、10µg/mLにおいてA/香港/1968ウイルスのニワトリ赤血球細胞との低pH融合を少なくとも80%阻害すると判定された(図17)。

【0384】

(6.4.2.5 モノクローナル抗体12D1の結合エピトープ)

12D1又は39A4の特異性を反映する微細な特異性を有する抗体を誘発し得るH3赤血球凝集素の領域の同定を検討した。抗H3モノクローナル抗体12D1又は39A4の存在下でのA/香港/1968ウイルスの16の継代は、結合エピトープの同定を援助し得るエスケープ変異体を生じなかった。ブランクアッセイにおいて50µg/mLのモノクローナル抗体12D1又は39A4とのA/香港/1968ウイルスのインキュベーション後に存在する16のブランクの赤血球凝集素を配列決定し、野生型赤血球凝集素からの変化を認めなかった。モノクローナル抗体12D1インフルエンザ疾患に対する保護をインビボで仲介し、かつウェスタンブロット法による変性した赤血球凝集素単量体との反応性によって明らかにされたように、ウイルス赤血球凝集素の連続的なエピトープと反応するので(三量体構造を必要としない)、12D1結合エピトープに焦点を合わせた。GFPに融合した種々の長さの赤血球凝集素セグメントからなる赤血球凝集素切断突然変異体を作製した。GFP発現を利用して、トランスフェクト

40

50

した293T細胞におけるコンストラクトの発現を評価した。切断突然変異体の分析により、12D1パラトープが、アミノ酸30～106の領域におけるHA2サブユニットとの優勢な相互作用をすることが判定された。106～184切断による結合の損失とともに76～184切断及び91～184切断におけるGFP発現が低減しない12D1結合の低減は、12D1結合が、HA2の76～106領域におけるアミノ酸との接触に依存することを示唆した(図18)。これら30のアミノ酸は、HA2の長いアルファヘリックスの膜遠位半分内に収まる。12D1パラトープは、ウェスタンブロット法による結合に必要とされない(HA1又はHA2における)この領域の外側のアミノ酸と追加的な接触を有し得る。

【0385】

(6.4.3 結論)

インビトロ及びインビボでH3インフルエンザウイルスを広範に中和する抗体を誘発する免疫化スケジュールが開発された。

【0386】

(6.5 交差反応する抗H3モノクローナル抗体66A6)

モノクローナル抗体66A6を、抗体7A7、12D1、及び39A4の作製について用いる第6.1節に説明したのと同じアプローチを用いて作製した。

【0387】

(6.5.1 抗体66A6はH3ウイルスを結合する)

第6.1.3節に説明されるELISAアプローチを用いて、インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968、A/プリズベーン/10/2007、及びA/パナマ/2007/1999を結合するモノクローナル抗体66A6の能力を評価した。図23に示すように、モノクローナル抗体66A6は、インフルエンザウイルス株の各々を結合した。

【0388】

(6.5.2 抗体66A6の赤血球凝集阻害活性)

インフルエンザA型ウイルス株A/香港/1/1968の融合を阻害するモノクローナル抗体66A6の能力を、第6.1.6節に説明される通り評価した。図24に示すように、モノクローナル抗体66A6は、A/香港/1/1968赤血球凝集素と赤血球との低pH融合を阻害しない。

【0389】

(6.5.3 抗体66A6は、H3ウイルス赤血球凝集素のHA1部分を結合する)

モノクローナル抗体66A6の結合領域を、第6.3節に説明されたアプローチを用いて決定した。図25に示すように、モノクローナル抗体66A6は、ウェスタンブロット法によって評価されるように、インフルエンザウイルス株A/香港/1/1968(H3)の赤血球凝集素タンパク質のHA1領域に結合する。

【0390】

(6.5.4 抗体66A6はH3ウイルスを中和する)

ブランク減少アッセイを第6.1.6節に説明されるように用いて、H3サブタイプのインフルエンザA型ウイルスを中和するモノクローナル抗体66A6の能力を評価した。図26に示すように、モノクローナル抗体66A6は、インフルエンザA型ウイルス株A/パナマ/2007/1999(H3)及びA/アラバマ/1/1981(H3)を中和する。

【0391】

(6.5.5 抗体66A6の受動的転移)

インフルエンザA型ウイルスによる負荷からマウスを保護するモノクローナル抗体66A6の能力を評価した。この方法によると、5の群におけるBALB/cマウスに、20mgの66A6モノクローナル抗体(腹腔内 第1群)又は対照(PBS 第2群)を、A/香港/1/1968(H3)由来の赤血球凝集素遺伝子セグメント及びノイラミニダーゼ遺伝子セグメント並びにマウスインフルエンザA型ウイルスA/PR/8/34由来の6の他のインフルエンザウイルス遺伝子セグメント(赤血球凝集素及びノイラミニダーゼではない。)を含む10LD50 X31キメラウイルスによる負荷の1時間前に投与した。マウスの体重を毎日測定し、66A6モノクローナル抗体を投与するマウスの体重を、対照(PBS)を投与するマウスの体重と比較した。

【0392】

10

20

30

40

50

図27に示すように、交差反応する中和するモノクローナル抗体66A6の受動的転移は結果的に、PBS単独を投与したマウスと比較して、インフルエンザA型ウイルス株X31を付加したマウスにおける少ない体重減少を生じる。本結果は、X31株に対するこれらのマウスにおける受動免疫の発生を示している。各群におけるマウスの平均体重を図27にプロットする。前記マウスの開始体重の75%未満に落ち込むマウスを屠殺した。

【0393】

(6.6 交差反応する抗H1/H3モノクローナル抗体)

(6.6.1 免疫化及びハイブリドーマ作製)

周期的免疫化戦略を用いて、インフルエンザA型ウイルスの抗原的に異なるH1サブタイプ及びH3サブタイプと交差反応するモノクローナル抗体を作製した(図30)。6週齢のBALB/cマウスを、pCAGGSプラスミドにおけるインフルエンザウイルス赤血球凝集素のオープンリーディングフレームをコードするDNAコンストラクトで免疫化した(例えば、Baslerらの文献(Proc Natl Acad Sci U S A 98:2746-2751)参照)。個々の免疫化は、筋肉内に3週間間隔で与え、100µg DNA含有100µL PBSからなった。免疫化スケジュールにおいて利用される赤血球凝集素を、以下の親ウイルスからクローニングした 一次免疫:A/香港/1/1968(H3)、二次免疫:A/ソ連/92/77(H1)、三次免疫:A/カリフォルニア/1/88(H3)、四次免疫:A/カリフォルニア/04/09(H1)。最終免疫の3週間後及びハイブリドーマの作製の3日前に、マウスに50µgの精製済みA/プリズベーン/59/07様(H1)ウイルス及び50µgの精製済みA/プリズベーン/10/07様(H3)ウイルスを含む組成物を用いて、静脈内に追加免疫した。B細胞ハイブリドーマを、すでに説明した方法によって作製した(例えば、de StGrothらの文献(J Immunol Methods 35:1-21)参照)。

10

20

【0394】

(6.6.2 ハイブリドーマ上清のスクリーニング)

ハイブリドーマ上清を、第6.4.1.5節に説明されるようなELISAによって、A/香港/1/1968ウイルス及びA/カリフォルニア/04/09(H1)との反応性についてスクリーニングした。いずれかの株と反応するハイブリドーマを選択し、それには、抗体1、抗体2、抗体3、及び抗体4を産生するものを含んだ。

【0395】

(6.6.3 免疫蛍光試験)

MDCK細胞に1又は0.5の感染効率でウイルスを感染させ、37℃で12時間インキュベートし、トリプシンの不在下で固定した。感染済み細胞及び非感染細胞を1µg/mLのモノクローナル抗体とともに室温で1時間インキュベートした。ヤギ抗マウスフルオレセイン抱合体(SouthernBiotech)をモノクローナル抗体結合の検出に用いた。抗体1及び抗体2は、免疫蛍光によって3のH1インフルエンザウイルス由来のHAを認識する(図31)。抗体4は、免疫蛍光によって2のH3インフルエンザウイルス由来のHAを認識する(図31)。

30

【0396】

(6.6.4 ウェスタンブロット)

ウェスタンブロットを、すでに説明した方法によって作製した(例えば、Towbinらの文献(Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76(9):4350-4)参照)。試料を、SDS及び0.6M DTTを含む負荷緩衝液において100℃で5分間煮沸した。SDS泳動緩衝液を電気泳動に用いた。変性条件及び還元条件下で、抗体1及び抗体3はHAを認識しない(図32)。抗体4は、HAのHA2サブユニットを認識する(図32)。

40

【0397】

(6.7 交差反応する抗H1モノクローナル抗体)

(6.7.1 免疫化及びハイブリドーマ作製)

周期的な免疫化戦略を用いて、抗原的に異なるインフルエンザA型ウイルスH1サブタイプと交差反応するモノクローナル抗体を作製した(図33)。6週齢のBALB/cマウスにpCAGGSプラスミドにおけるインフルエンザウイルス赤血球凝集素のオープンリーディングフレームをコードするDNAコンストラクトで免疫化した(例えば、Baslerらの文献(Proc Na

50

t l Acad Sci U S A 98 : 2746-2751) 参照) 。 個々の免疫化は、筋肉内に3週間間隔で与え、100 μ g DNA含有100 μ L PBSからなつた。免疫化スケジュールにおいて利用される赤血球凝集素を、以下の親ウイルスからクローニングした 一次免疫 : A / サウスカロライナ / 1918 (H1) 、 二次免疫 : A / ソ連 / 92 / 77 (H1) 、 三次免疫 : A / カリフォルニア / 04 / 09 (H1) 。 最終免疫の3週間後及びハイブリドーマ作製の3日前に、マウスに50 μ gの精製済みA / ブリズベン / 59 / 07様 (H1) ウイルスを用いて静脈内に追加免疫した。B細胞ハイブリドーマを、すでに説明した方法によって作製した (例えば、de StGrothらの文献 (J Immunol Methods 35 : 1-21) 参照) 。

【 0 3 9 8 】

(6 . 7 . 2 ハイブリドーマ上清のスクリーニング)

ハイブリドーマ上清を、第6 . 4 . 1 . 5節に説明されるように、A / ソ連 / 92 / 77 (H1) ウイルス及びA / カリフォルニア / 04 / 09 (H1) ウイルスとの反応性についてELISAによってスクリーニングした。1のハイブリドーマ由来の起こり得る (potential) クローンと2のH1ウイルスとの反応性を図 3 4 に示す。

【 0 3 9 9 】

(6 . 7 . 3 ウェスタンブロット法)

交差反応する抗H1モノクローナル抗体の結合を評価するために、ウェスタンブロット法を実施することができる。ウェスタンブロットは、当該技術分野で公知の方法によって作製することができる (例えば、Towbinらの文献 (Proc Natl Acad Sci U S A 1979 ; 76(9) : 4350-4) 参照) 。 試料は、SDS及び0.6M DTTを含む負荷緩衝液において100 で5分間煮沸することができる。SDS泳動緩衝液は、電気泳動に用いることができる。

【 0 4 0 0 】

(6 . 7 . 4 免疫蛍光試験)

交差反応する抗H1モノクローナル抗体の結合を評価するために、免疫蛍光法を実施することができる。MDCK細胞に1又は0.5の感染効率でウイルスを感染させ、37 で12時間インキュベートし、トリプシンの不在下で固定することができる。感染済み細胞及び非感染細胞は、1 μ g / mLのモノクローナル抗体とともに室温で1時間インキュベートすることができる。ヤギ抗マウスフルオレセイン抱合体 (SouthernBiotech) は、モノクローナル抗体結合の検出に用いることができる。次に、ウイルスを結合する、交差反応する抗H1モノクローナル抗体の能力は、免疫蛍光アプローチを用いて評価することができる。

【 0 4 0 1 】

前記のものは、本明細書に説明される具体的な実施態様によって範囲を限定されるべきではない。実際、本明細書に提供される抗体及び方法並びにそれらの等価物に関する種々の改変は、本明細書に説明されるものに加えて、前記の明細書及び添付の図から当業者に明らかとなるであろう。このような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に収まるよう意図される。

【 0 4 0 2 】

本明細書に引用されるすべての参考文献は、そのすべての内容が引用により本明細書に、各個々の刊行物又は特許又は特許出願が、すべての目的のためにそれらに全ての内容が引用により組み込まれるよう具体的かつ個々に示され場合と同じ程度まで、組み込まれる

。

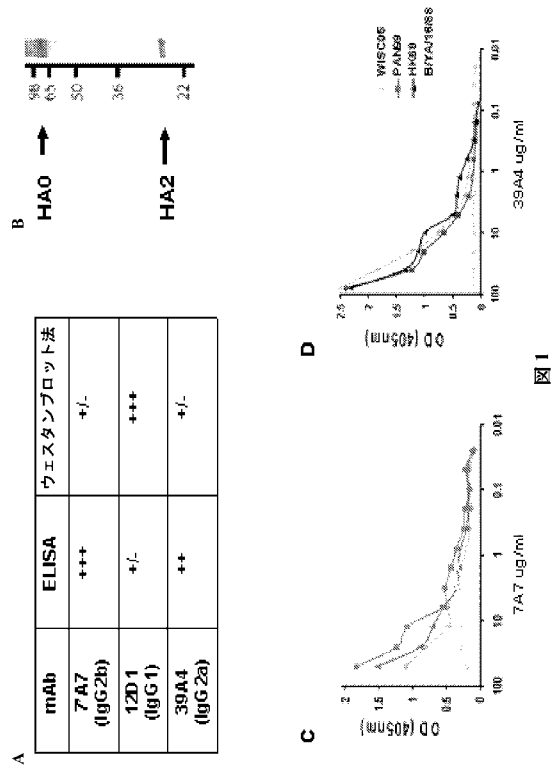
10

20

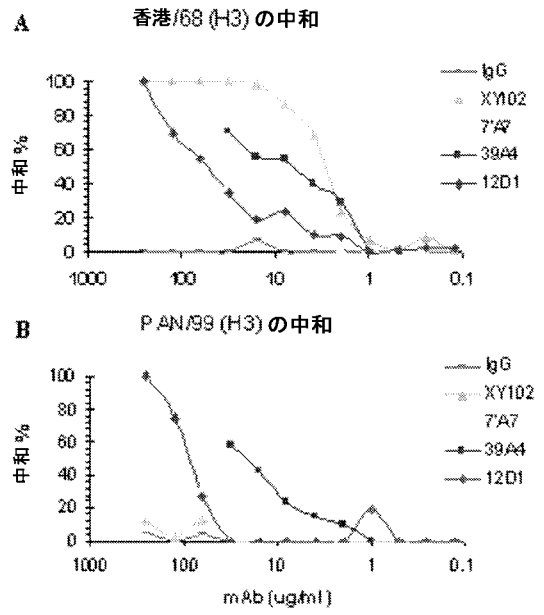
30

40

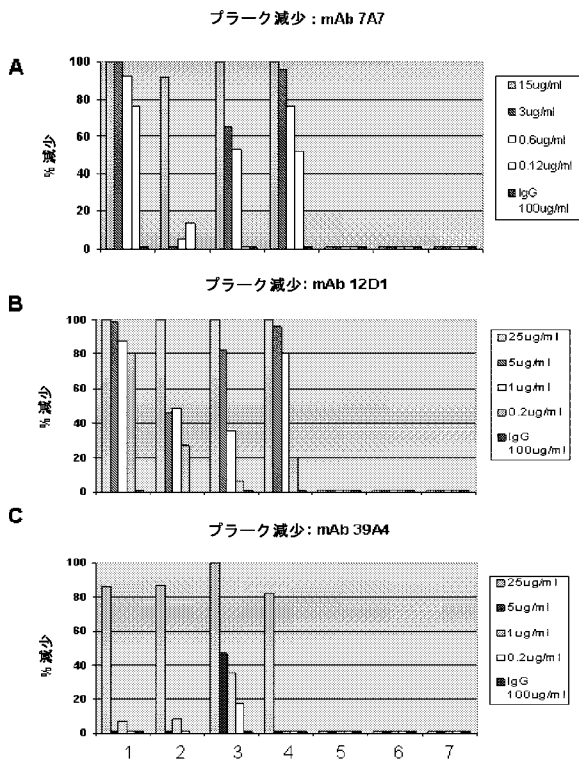
【 図 1 】



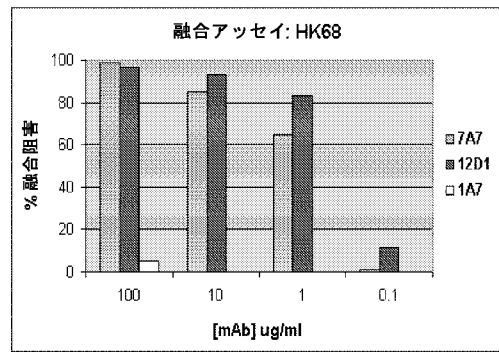
【 図 2 】



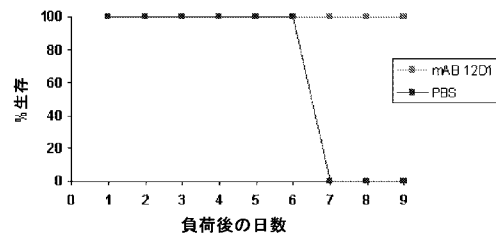
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

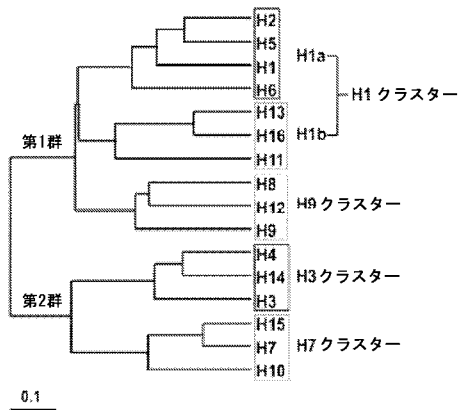


図 6

【 図 7 】

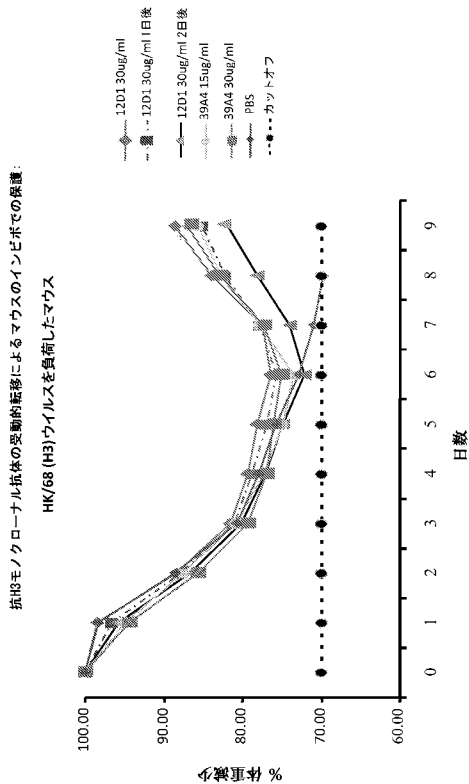


図 7

【 図 8 】

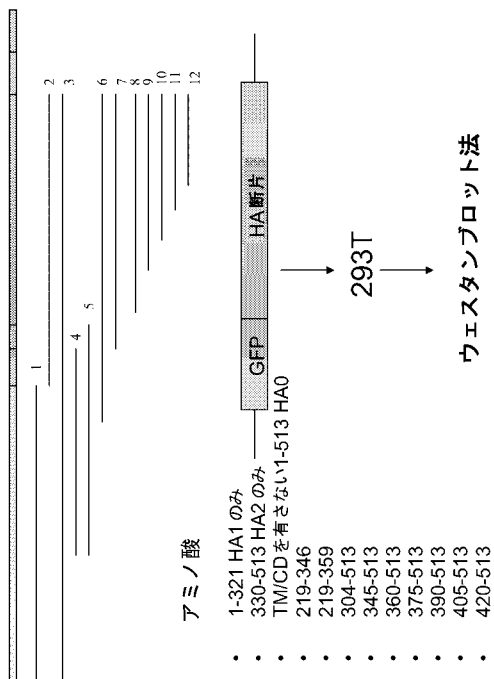


図 8

【 図 9 】

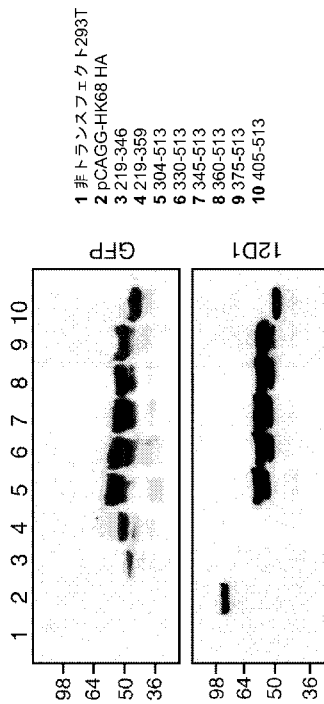


図 9

【 図 1 0 】

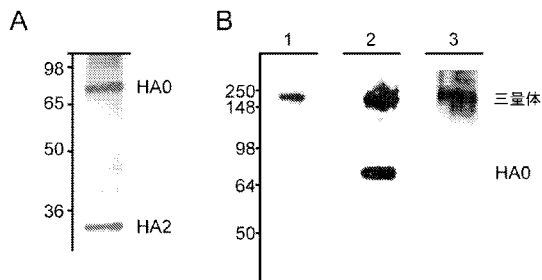


図10

【 図 1 1 】

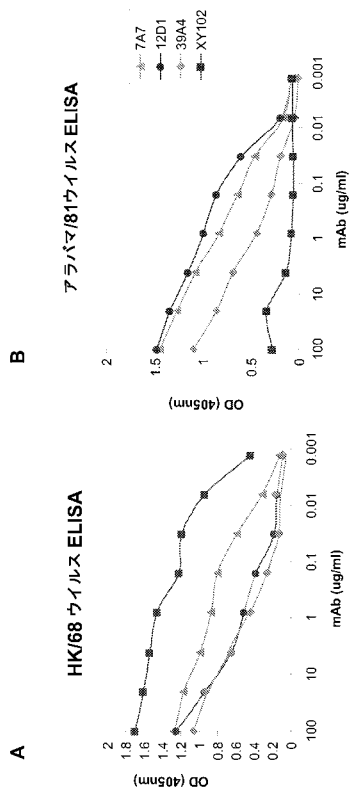


図11

【 図 1 2 】

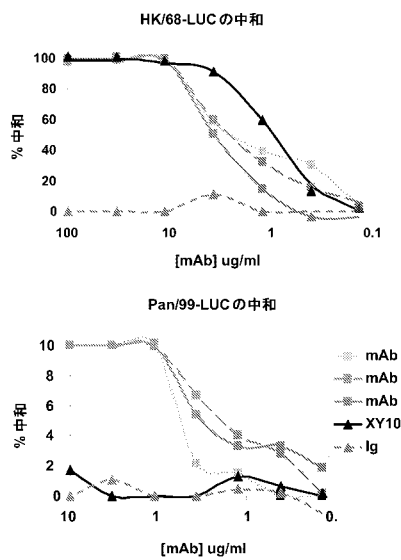


図12

【 図 1 3 】

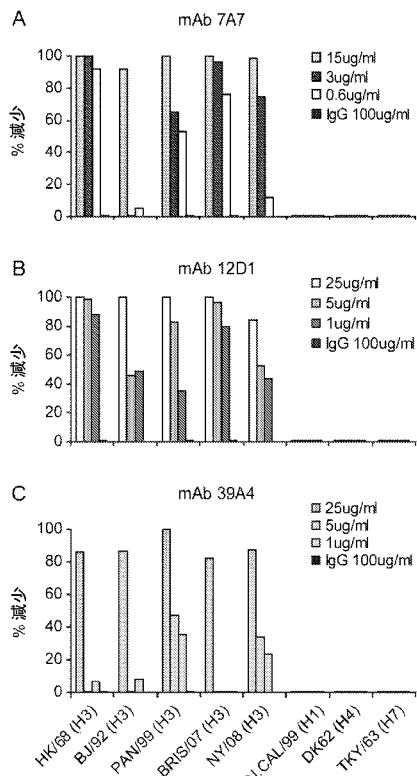


図13

【 図 1 4 】

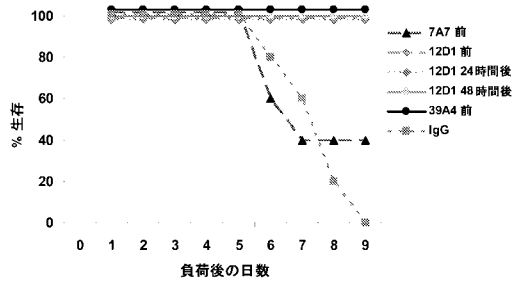


図14

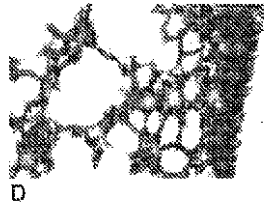
【 図 1 5 B 】



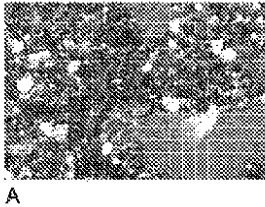
【 図 1 5 C 】



【 図 1 5 D 】



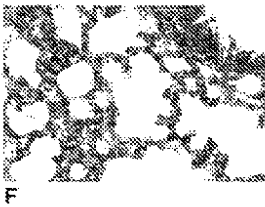
【 図 1 5 A 】



【 図 1 5 E 】



【 図 1 5 F 】



【 図 1 6 】

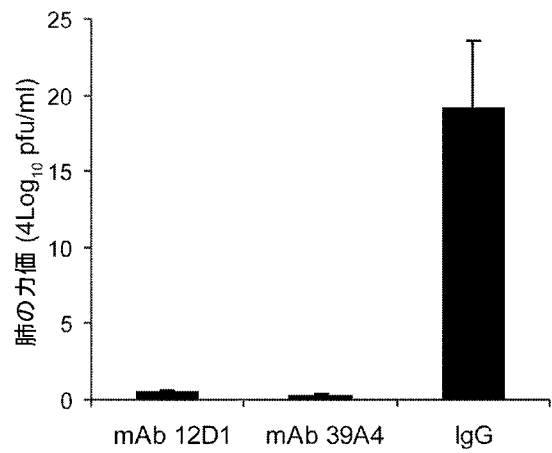


図16

【 図 1 7 】

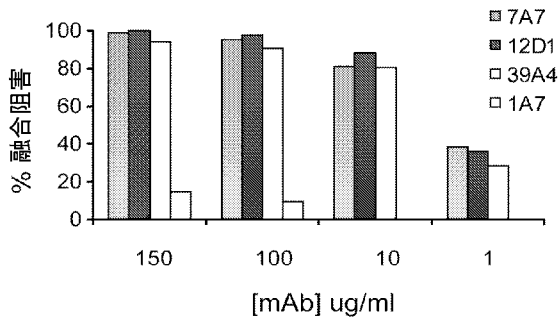


図 17

【 図 1 8 】

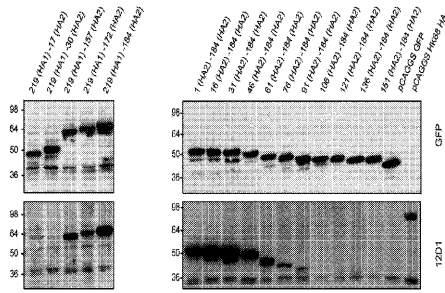


Fig 18

【 図 1 9 】

モノクローナル抗体7A7についての核酸配列を含む可変領域

7A7重鎖可変領域を含む核酸配列:

>7A7_重鎖
 ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTTGTCTTATTTTAAAAGGTGTCAGGTG
 TGATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCIGGAGGGTCC
 CCGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGC
 ACTGGGTTCTGTGCAGGCTCCAGAGAAAGGGCTGGAGTGGTTCGCAATACATTA
 GTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCCAC
 ATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACCCTGTCTCCATGCAAAATGACAGCTCTAA
 GGTCTGAGGACACGGCCATGTAATCTGTGCAAGAAATACGACGAGGACTTC
 GATGCTGGGGCCGAGGACACCGGTACCGTCTCTCAGCCAAACAACAC
 CCCATCAGTCTATCCACTGGCCCTGGGTGGAGATACAACGTGTTCTCCGT
 GACTCTGGATGCCTGGTCAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAAGTACTGTGACTTGG
 AACCTCTGGAATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCAGCTCTCTGCACTGTG
 GACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTCA
 GACCGTCACTGTGAGCTGTCTCACCAGCCAGCAGCACCCAGGTGGACAAAAA
 ACTTGAGCCCAAGCGGCCAATTCACAATCAACCCCTGCTCTCATGCAAGGAG
 TGTCAAAAATGCCAGCTCTCAACTCGAGGGTGACCATCCGCTTTCATCTTC
 (配列番号2)

接合部残基 (アミノ酸) CARNYDEDFVW (配列番号3)

7A7軽鎖可変領域を含む核酸配列:

>7A7_カッパ
 ATGAAGTTGCCTGTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAG
 TGATGTTGGTGAIGACCAAACTCCACTCTCCCTGCTGTGAGTCTTGGAGAT
 CAAGCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAAATGAAAA
 CACCTATTACATTTGGTACCTGCAAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCTCTG
 ATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTCTTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCA
 GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG
 ATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAAGTACACATGTTCCGTTGGAGCTTGGT
 GAGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGGGCTGTGCTGTCACCAACTGTATCCATC
 TTCCACCATCCAGTGCAGTAACTCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGCTCTCT
 TGAACAACCTTACCCCAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGT
 AACGACAAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCA
 CCTACAGCATGAGCAGCACCTCAGCTTGCACCAAGGACAGATGAACGACATA
 ACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCAAAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAG
 CTCAACAGGAATGAGTGTAG (配列番号4)

接合部残基 (アミノ酸): CSQSTIIVPWF (配列番号5)

図 19

【 図 2 0 】

モノクローナル抗体7A7についてのアミノ酸配列を含む可変領域

7A7重鎖可変領域を含むアミノ酸配列:

>7A7_重鎖
 MDSRIQLVFLVLLKGVQCDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGETESSEGMHW
 VROAPEKGLEWVAYISSGSSIIYADIVYKGRFISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDT
 AMIYVCARNYDEDFVWAGTIVTVSSAKTTPPSVYPLAPCGDITGSSVTLGCLV
 KGYFPEVTVTWNISGLSSVHTTTPALLQSLYTMSSSVTVPSSTWPSQVTVCSVAHP
 ASSTTVDKKLEPSGPISTNPPCKEKIICKPAPNLEGGPSVYIF (配列番号6)

7A7軽鎖可変領域を含むアミノ酸配列:

>7A7_カッパ
 MKLPVRLVLMFVWIPASSSDVVMVTQTPLSLPSVSLGDAQSISCRSSQSLVHSNGNTY
 LHWYLVQKPGQSPKLLIYKYSNRFSGVPRDFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLVYF
 CSQSTIIVPWFVGGGKLEIKRADAAPTIVIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNPFKDI
 NVKWKIDGSRQNGVLSWTDQSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHINSYTCATHTK
 STSPVIVKSFNNEC (配列番号7)

図 20

【 図 2 1 】

モノクローナル抗体12D1についての核酸配列を含む可変領域

12D1重鎖可変領域を含む核酸配列:

>12D1_重鎖

ATGGCTGTCTTGGGGTGCCTTCTGCTGGTGACATTCCTCAAGCTGTGCTCTATC
CCAGGTGCACCTGGAGCAGTCAGGACCTGGCCCTAGTGCAGCCCTCACAGAG
CTGTGTCATCACCTGCACAGTCCTGGTTCTCAITTAACAACCTATGGTGTACA
CTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGTATG
GAGAGGTGGAAGCATAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCAAT
AGCAAGGACAATTCGAAGAGCAAGTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAG
CTAATGACACAGCCATATACTGTGTCAGCAAAATGGGGTAGGTACGGATACT
TTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTACCGTCTCCTCAGCCAAAACGCA
CACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACCTCAT
GGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCTGAGT
CTGACTCTACACTGTGAGCAGTCACTGACTGTCCCTCAGCACCTGGCCAG
CGAGACCTGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGACAA
GAAAATTGTGCCAGGGATTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAGAA
GTATCATCTGTCTTACATCTCC (配列番号8)

接合部残基 (アミノ酸): CARNWGRYGYFDVW (配列番号9)

12D1軽鎖可変領域を含む核酸配列:

>12D1_カッパ

ATGGAGACAGACACACTCTGTATGGGTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCA
CAGGTGACATTTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGCTCTAGG
GCAGAGGGCCACCAATCTCTGCAGAGCCAGTGAAGAGTGTGATAGTTATGGC
AACAGTTTTATGCCATGGTACCAGCAGAAACAGGACAGCCACCCAAAGTCC
TCATCTATCTGTCATCAACCTAGAAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTACGTGG
CAGTGGGTCTAGGACAGACTTCAACCTCACCAATAATCCTGTGGAGGCTGAT
GATGTTGCAACCTATTACTGTGACGAAAGTAAATGGGGATCCTCGGACGTTCCG
TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
ATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCTGTCT
TCTTGACAACTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAG
TGAACGACAAAATGGGCTCTGAACAGTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG
CACCTACAGCATGAGCAGACCCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACA
TAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCCCAATTTGCAAG
AGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG (配列番号10)

接合部残基 (アミノ酸): CQSQNGDPRTF (配列番号11)

図 21

【 図 2 2 】

モノクローナル抗体12D1についてのアミノ酸配列を含む可変領域

12D1重鎖可変領域を含むアミノ酸配列:

>12D1_重鎖

MAVLGLLFLCLVTFPSCVLSQVHLEQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGESLTTYGVHWV
RQSPGKLEWLGVIVRGGSDYNAAFISRLSISKDNSKSOVFFKMNSLQANDTAI
YYCARNWGRYGYFDVWAGITTVVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLCGL
VKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHITPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWSPSETVTCNVA
IIPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVHF (配列番号12)

12D1軽鎖可変領域を含むアミノ酸配列:

>12D1_カッパ

METDLLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVSDSYGNSE
MHWYQQKPGQPPKVLIVRASNLESGLPARFSGSGSRITDFTLITNPVEADDVATY
CQSQNGDPRTFGGGKLEIKRADAAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI
NVKWKIDGSEKQNGVLSWTDQDSKDYTSMSSTLTLTKDEYERHINSYTCEATHKT
STSPIVKSFNRNEC (配列番号13)

図 22

【 図 2 3 】

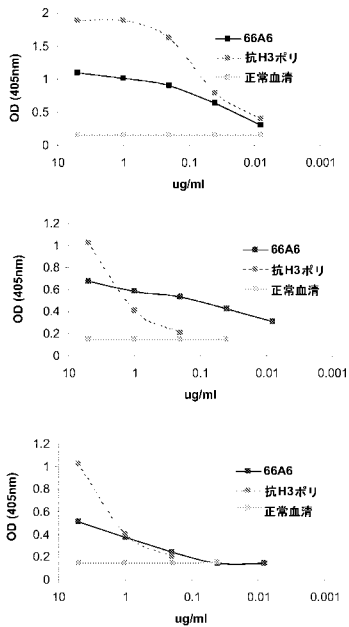


図 23

【 図 2 4 】

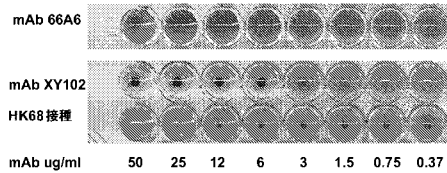


図 24

【 図 2 5 】

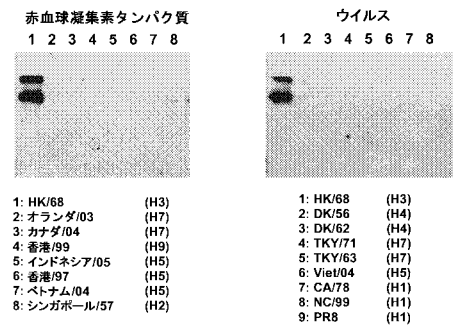


図 25

【 図 2 6 】

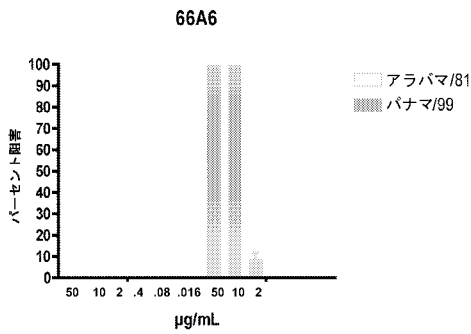


図 26

【 図 2 7 】

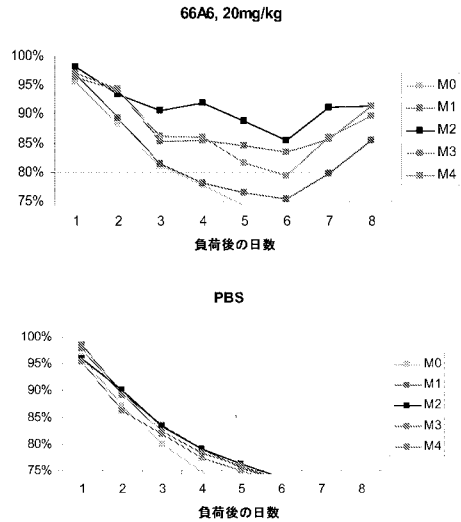


図 27

【 図 2 8 】

モノクローナル抗体66A6についての核酸配列を含む可変領域

66A6重鎖可変領域を含む核酸配列:
>66A6重鎖

```

AAGCTTGCCACCATGGAAACCGATACCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGG
TGCCGGGCAAGCTGGGCGCAGGTGAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGAAC
AAAACCGGGCGAAACCGTGAAAAATTAGCTGCAAAAGCGAGCGGCTATAC
ACCAACTATGGCAATGAACCTGGGTGAAACAGGCGCCGGGCAAGATCTGAA
GGCTGGGCTGGATTAAACACCGGATACCGGCAACCGACCTATGCGGAAGA
TAAAGGCGGCTTTGCGTTTAGCTGGAAACAGCGCGAGCACCCTGATCT
GGAAATTAACAACCTGAAAAACGAAGATGCGGCGACCTATTTTGGCGGCG
AACAAAAATATGAAGCGTGGTTTACCCATTTGGGGCCAGGGCACCCCTGG
CGTGAGCAGCGCGAAAACACCCCGCCGAGCGTGTATCCGCTGGCGCCGG
GCGCGGCGCAGACCAACAGCATGGTGACCCCTGGGCTGCCTGGTGAAAGG
TTCCGGAAACCGGTGACCTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGG
ATACCTTTCCGGCGGTGTCAGAGCGATCTGTATACCTGAGCAGCAGCGT
CGTGCCGAGCAGCACTGGCCGAGCAGACCGTGTGCAACCTGGCGCATCC
GGCAGCAGCACCAGTGGATAAAAAAATTTGTCGCGCGGATTGGCGCATCA
TCATCATCATTAAGAATTC (配列番号14)

```

66A6軽鎖可変領域を含む核酸配列:
>66A6軽鎖

```

AAGCTTGCCACCATGGAAACCGATACCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGG
TGCCGGGCAAGCTGGGCGCAGGTGAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGAAC
GGTGGGCTGGATTAAACACCGGATACCGGCAACCGACCTATGCGGAAGA
GGATAGCTATGGCAATGAACCTGGGTGAAACAGGCGCCGGGCAAGATCTG
CGCGAAACTGCTGATTATCTGGCGAGCAACCTGGAAGCGGCGTGGCGG
GGCTTTAGCGGCGAGCGGCGAGCGCACCGAATTTACCTGACCAATGATCC
GGTGGAAAGCGGATGATGGCGGACCTATTTATGTCAGCAGAAACCAAC
CCGATGTTTGGCGGCGGCAACAACTGGAATTAACCGCGGATGGCGGCG
CGACCGTGAGCATTTTCCGCGGAGCAGCGAACAGCTGACAGCGGCGGCG
GCGTGGTGTGCTTTCTGAACAACCTTTATCCGAAAGATTAACGTGAAATG
AATTGATGGCAGCAACCGCAACCGCGTGTGTAACAGCTGGACCGATCAG
TAGCAAAGATAGCAACCTATAGCATGAGCAGCACCCTGACCCGACCAAG
ATATGAAACCGCAACAGCTATACCTGCAAGCGACCCATAAAACCGACCA
CCCATTGTGAAGAGCTTTAACCGCAACGAATGCTAAGAATT (配列番号15)

```

図 28

【 図 2 9 】

モノクローナル抗体66A6についての可変領域アミノ酸配列

66A6重鎖可変領域を含むアミノ酸配列:
>66A6重鎖

```

SKLATMETDITLLLVLLWVPGSVAQVQLQSGPELKKPGETVKISCKASGYT
FNYGMNWKQAPGKDLKWLGWINTDTEFTYAEFFKGRFARFSLTSASTAYLEI
NNLKNEAAITVFCARNKKYEAFTIHWGQGTFLVYSSAKTTPPSVYPLAPGSA
QTNMVTI.GCLVKGYFPEPVTVTWNSGSI.SSGVIHTPAVLQSDIYTI.SSSV
TVPSSTWPSQTVTCNVAIIPASSTKVDKIKVPRDCG (配列番号16)

```

66A6軽鎖可変領域を含むアミノ酸配列:
>66A6軽鎖

```

SKLATMETDITLLLVLLWVPGSTGNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASEV
DVS YGTSFMHWYQQRPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRITFDITL
IDPVEADD AATYYCQQNNEIHPMFGGGTKLEIKRADAAPTVSIIFPPSSEQLT
SGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKIDGSEKRNQGVLSWTDQDQSKDSTYSMS
STLTLTKDEYERIIINSYTCETHATKSTSPIVKSFNRNEC (配列番号17)

```

図 29

【 図 3 0 】

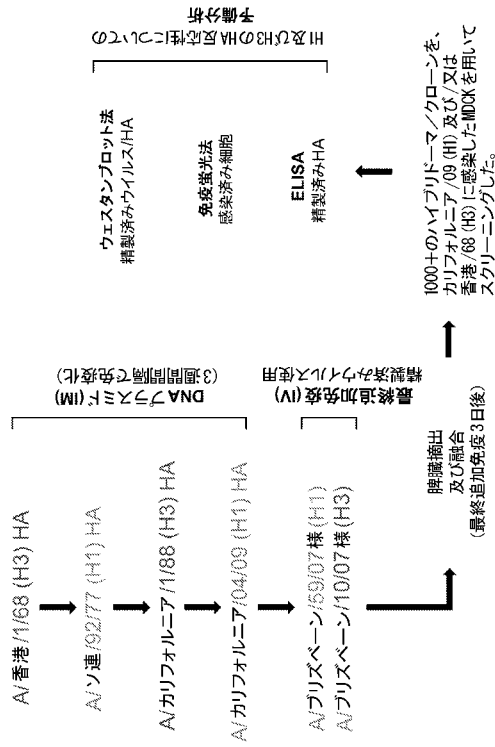


図 30

【 図 3 1 】

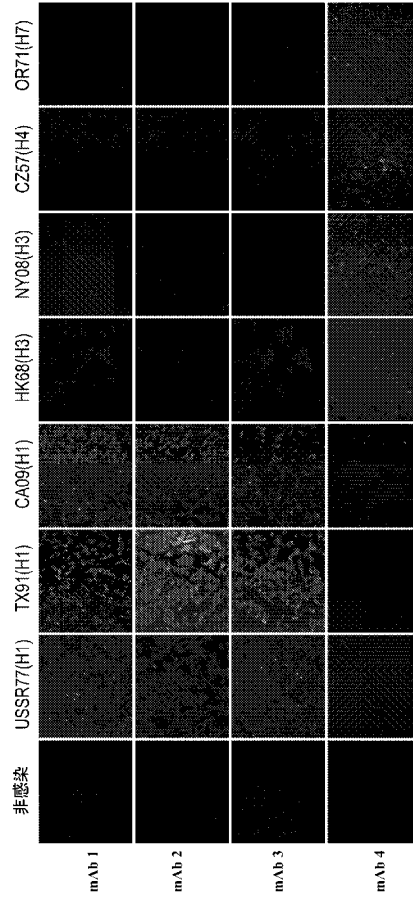


図 31

【 図 3 2 】

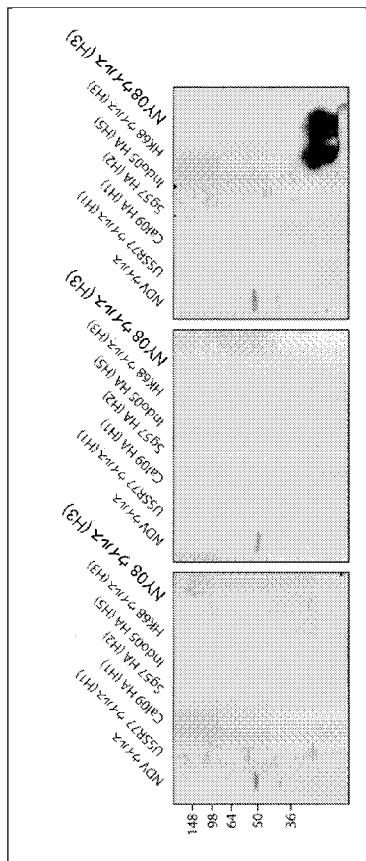


図 32

【 図 3 3 】

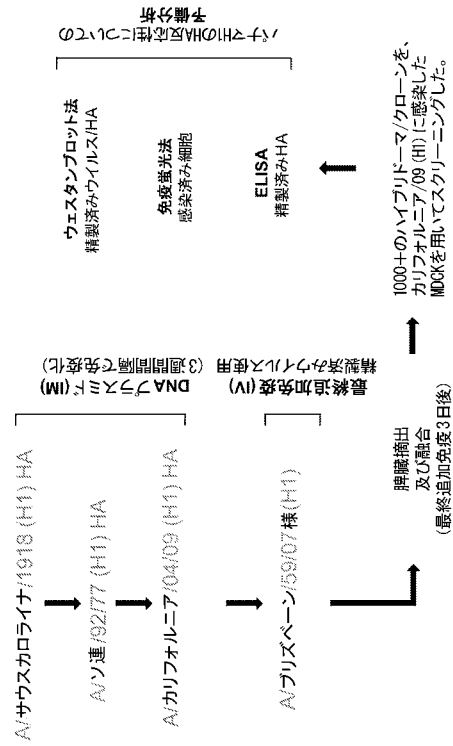


図 33

【 図 3 4 】

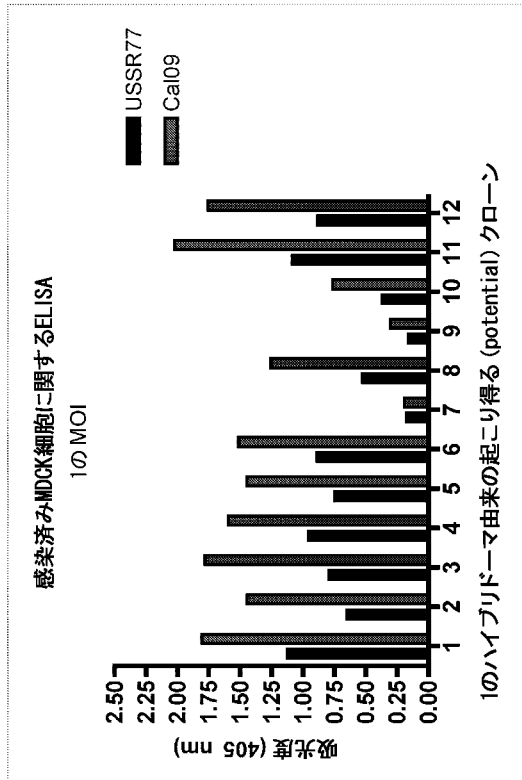


図 34

【 配 列 表 】

[2012527899000001.app](#)

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 24 年 3 月 29 日 (2012.3.29)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 追 加

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

[2012527899000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/036170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/10 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/152657 A1 (HOROWITZ LAWRENCE [US] ET AL) 26 June 2008 (2008-06-26) The whole document, in particular; paragraph [0151] - paragraph [0156]; sequence 109	26, 30, 32, 34, 36-38, 40, 43, 44
X	US 6 337 070 B1 (OKUNO YOSHINOBU [JP] ET AL) 9 May 2002 (2002-05-09) The whole document, in particular sequence 58 ----- -/-	27, 30, 32, 34, 36-38, 40, 43, 44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 July 2010		Date of mailing of the international search report 17/08/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5918 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chapman, Rob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/036170

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/134327 A2 (SEA LANE BIOTECHNOLOGIES LLC [US]; BHATT RAMESH R [US]; HOROWITZ LAWRE) 22 November 2007 (2007-11-22) The whole document, in particular sequence 9	1-50
A	US 2005/009008 A1 (ROBINSON ROBIN A [US] ET AL) 13 January 2005 (2005-01-13) the whole document	1-50
Y	WO 2009/025770 A2 (WYETH CORP [US]; CLARKE DAVID KIRKWOOD [US]; NASAR FAROOQ [US]; XU RON) 26 February 2009 (2009-02-26) The whole document, in particular p.8, 11.23-30; p.9, 11.28 - p.10, 11.8	1-50
A	LOWEN A C ET AL: "Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 83, no. 7, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 2803-2818, XP009137024 ISSN: 0022-538X The whole document, in particular ; page 2816, column 1, paragraph 2	1-50
X	WANG T T ET AL: "Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins?" NATURE STRUCTURAL AND MOLECULAR BIOLOGY 200903 US LNKD- DOI:10.1038/NSMB.1574, vol. 16, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 233-234, XP009137026 the whole document	15-50
A	KISTNER ET AL: "Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2007.05.013, vol. 25, no. 32, 20 July 2007 (2007-07-20), pages 6028-6036, XP022162338 ISSN: 0264-410X the whole document	1-50

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/036170

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LEROUX-ROELS ISABEL ET AL: "Broad Clade 2 Cross-Reactive Immunity Induced by an Adjuvanted Clade 1 rH5N1 Pandemic Influenza Vaccine" PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, SAN FRANCISCO, CA, US LNKD- DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0001665, vol. 3, no. 2, 27 February 2008 (2008-02-27), XP009111202 ISSN: 1932-6203 the whole document</p>	1-50
A	<p>SIMMONS CAMERON P ET AL: "Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza" PLOS MEDICINE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US LNKD- DOI:10.1371/JOURNAL.PMED.0040178, vol. 4, no. 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 928-936, XP002497996 ISSN: 1549-1676 [retrieved on 2007-05-29] the whole document</p>	1-50
X,P	<p>WANG T T ET AL: "Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins" PLOS PATHOGENS, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, SAN FRANCISCO, CA, US, vol. 6, no. 2, 1 January 2010 (2010-01-01) , pages 1-9, XP009137025 ISSN: 1553-7366 the whole document</p>	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/036170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008152657 A1	26-06-2008	AU 2008298939 A1 EP 2190477 A1 WO 2009036157 A1	19-03-2009 02-06-2010 19-03-2009
US 6337070 B1	08-01-2002	NONE	
WO 2007134327 A2	22-11-2007	AU 2007249160 A1 CA 2652452 A1 EP 2024393 A2 JP 2009537147 T US 2008014205 A1	22-11-2007 22-11-2007 18-02-2009 29-10-2009 17-01-2008
US 2005009008 A1	13-01-2005	AU 2004268510 A1 BR PI0412519 A CA 2532335 A1 CN 1849134 A EP 1644037 A2 JP 2007529997 T KR 20060052804 A MX PA06000469 A NZ 544580 A RU 2369405 C2 SG 131116 A1 US 2006263804 A1 WO 2005020889 A2	10-03-2005 19-09-2006 10-03-2005 18-10-2006 12-04-2006 01-11-2007 19-05-2006 23-08-2006 30-04-2009 10-10-2009 26-04-2007 23-11-2006 10-03-2005
WO 2009025770 A2	26-02-2009	US 2009092635 A1	09-04-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 6 1 K	39/145 (2006.01)	A 6 1 K	39/145	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	G
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/577	B
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		C 1 2 N	5/00	1 0 2

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

(72)発明者 ペテル パレセ
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07605 レオニア ヒグフウオオド アベニュー 4
 14

(72)発明者 タイア ティー . ワング
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10029 ニューヨーク アプト . 4 トフ 5 トフ アベニ
 ュー 1255

Fターム(参考) 4B024 HA01 HA15
 4B064 AG27 BJ12 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44
 4C085 AA14 BA55 EE01 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA29 EA53 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012527899A5	公开(公告)日	2013-07-11
申请号	JP2012513195	申请日	2010-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	西奈山伊坎医学院		
申请(专利权)人(译)	Mounto西奈学校关闭Medishine		
[标]发明人	アドルフォガルシアサストレ ペテルパレセ タイアティーワング		
发明人	アドルフォ ガルシア-サストレ ペテル パレセ タイア ティー.ワング		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/10 C12P21/08 C12N15/02 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K39/145 A61K39/395 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/1018 A61K39/145 A61K2039/505 C07K14/005 C07K2317/33 C07K2317/565 C07K2317/76 C12N7/00 C12N2760/16134 G01N33/56983 G01N2333/11		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/10 C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.101 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 A61K39/145 A61K39/395.S G01N33/569.G G01N33/577.B G01N33/53.D C12N5/00.102		
F-TERM分类号	4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/BA55 4C085/EE01 4C085 /GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	石川彻		
优先权	61/305898 2010-02-18 US 61/181263 2009-05-26 US 61/224302 2009-07-09 US		
其他公开文献	JP5941841B2 JP2012527899A		

摘要(译)

本文提供了通过循环免疫制备与相同亚型或不同亚型的流感病毒株交叉反应的中和单克隆抗体的方法。 本文还提供了包含此类抗体的组合物，以及使用此类抗体诊断，预防或治疗流感病毒疾病的方法。 [选型图]图1