

(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2018-527924

(P2018-527924A)

(43) 公表日 平成30年9月27日 (2018.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-509904 (P2018-509904)	(71) 出願人	504333972
(86) (22) 出願日	平成28年8月23日 (2016.8.23)		メディミュン、エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月21日 (2018.2.21)		アメリカ合衆国 20878 メリーランド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミュン ウェイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/048221		
(87) 国際公開番号	W02017/035154	(74) 代理人	110002572
(87) 国際公開日	平成29年3月2日 (2017.3.2)		特許業務法人平木国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	62/208, 975	(72) 発明者	ワン, クン
(32) 優先日	平成27年8月24日 (2015.8.24)		アメリカ合衆国 20878 メリーランド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミュン ウェイ, メディミュン, エルエルシー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/238, 828		
(32) 優先日	平成27年10月8日 (2015.10.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MR K Aポリペプチド、抗体、およびその使用

(57) 【要約】

本開示は、M r k Aに結合し、かつクレブシエラ（例えば、肺炎桿菌）のオプソニン作用による死滅を誘導するM r k A結合タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合断片を提供する。本開示はまた、クレブシエラ（例えば、肺炎桿菌）を低減するか、または対象においてクレブシエラ（例えば、肺炎桿菌）感染症を治療もしくは予防する方法であって、M r k A結合タンパク質、例えば抗体もしくはその抗原結合断片、M r k Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはM r k Aもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを対象に投与するステップを含む方法も提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Mrk A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質であって、a) 少なくとも 2 つの肺炎桿菌 (K. pneumoniae) 血清型に結合するか、b) 肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅 (OPK) を誘導するか、または c) 少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型に結合し、かつ肺炎桿菌の OPK を誘導する、単離抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

O1 : K2、O1 : K79、O2a : K28、O5 : K57、O3 : K58、O3 : K11、O3 : K25、O4 : K15、O5 : K61、O7 : K67、および O12 : K80 からなる群から選択される、少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型に結合する、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 3】

O1 : K2、O1 : K79、O2a : K28、O5 : K57、O3 : K58、O3 : K11、O3 : K25、O4 : K15、O5 : K61、O7 : K67、および O12 : K80 からなる群から選択される、少なくとも 1 つまたは 2 つの肺炎桿菌血清型において OPK を誘導する、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

生物発光 OPK アッセイを使用して測定されるように、肺炎桿菌株 9148 (O2a : K28)、9178 (O3 : K58)、および 9135 (O4 : K15) において 100 % の OPK を誘導し、かつ / または肺炎桿菌株 29011 (O1 : K2) において 80 % の OPK を誘導する、請求項 3 に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 5】

Kp29011、Kp9178、および Kp43816 からなる群から選択される肺炎桿菌株に暴露された動物において延命効果を与える、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

クレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる、Mrk A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

クレブシエラ細胞吸着を阻害するかまたは低下させる、Mrk A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

30

【請求項 8】

相補性決定領域 (CDR) : HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、および LCDR3 のセットを含む、Mrk A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質であって、

HCDR1 が配列番号 1 のアミノ酸配列を有し、

HCDR2 が配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、

HCDR3 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、

LCDR1 が配列番号 7 のアミノ酸配列を有し、

LCDR2 が配列番号 8 のアミノ酸配列を有し、および

LCDR3 が配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、単離抗原結合タンパク質。

40

【請求項 9】

配列番号 13 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 同一な重鎖可変領域 (VH) および / または配列番号 15 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 同一な軽鎖可変領域 (VL) を含む、Mrk A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 10】

配列番号 13 を含む VH および配列番号 15 を含む VL を含む、請求項 9 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

50

配列番号 13 を含む V H を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

配列番号 15 を含む V L を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 13】

相補性決定領域 (C D R) : H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 のセットを含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質であって、

H C D R 1 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、

H C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有し、

H C D R 3 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、

L C D R 1 が配列番号 10 のアミノ酸配列を有し、

L C D R 2 が配列番号 11 のアミノ酸配列を有し、および

L C D R 3 が配列番号 12 のアミノ酸配列を有する、単離抗原結合タンパク質。

【請求項 14】

配列番号 14 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 同一な重鎖可変領域 (V H) および / または配列番号 16 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 同一な軽鎖可変領域 (V L) を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 15】

配列番号 14 を含む V H および配列番号 16 を含む V L を含む、請求項 14 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 16】

配列番号 14 を含む V H を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

配列番号 16 を含む V L を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 18】

配列番号 17 のアミノ酸 1 ~ 40 および 171 ~ 202 中のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

M r k A (配列番号 17) に特異的に結合するが、配列番号 26 または配列番号 27 のいずれにも結合しない、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 20】

配列番号 17 のアミノ酸 1 ~ 40 および 171 ~ 202 中のエピトープに結合する、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 21】

M r k A (配列番号 17) に特異的に結合するが、配列番号 26 または配列番号 27 のいずれにも結合しない単離抗原結合タンパク質。

【請求項 22】

(i) それぞれ配列番号 29 ~ 31 および 41 ~ 43、

(i i) それぞれ配列番号 32 ~ 34 および 44 ~ 46、

(i i i) それぞれ配列番号 35 ~ 37 および 47 ~ 49、ならびに

(i v) それぞれ配列番号 38 ~ 40 および 50 ~ 52

からなる群から選択される相補性決定領域 (C D R) : H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 のセットを含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 23】

配列番号 53、54、55、もしくは 56 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一な重鎖可変領域 (VH) および / または配列番号 57、58、59、もしくは 60 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一な軽鎖可変領域 (VL) を含む、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 24】

配列番号 53、54、55、または 56 を含む VH および配列番号 57、58、59、または 60 を含む VL を含む、請求項 23 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 25】

配列番号 53、54、55、または 56 を含む VH を含む、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

10

【請求項 26】

配列番号 57、58、59、または 60 を含む VL を含む、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 27】

(a) 配列番号 13 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 15 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(b) 配列番号 14 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 16 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(c) 配列番号 53 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 57 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

20

(d) 配列番号 54 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 58 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(e) 配列番号 55 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 59 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、ならびに

(f) 配列番号 56 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 60 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片

からなる群から選択される抗体と同じ MrkA エピトープに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質。

【請求項 28】

30

MrkA への参照抗体の結合を競合的に阻害する単離抗原結合タンパク質であって、前記参照抗体が、

(a) 配列番号 13 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 15 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(b) 配列番号 14 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 16 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(c) 配列番号 53 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 57 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

(d) 配列番号 54 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 58 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、

40

(e) 配列番号 55 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 59 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片、ならびに

(f) 配列番号 56 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 60 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体またはその抗原結合断片

からなる群から選択される、単離抗原結合タンパク質。

【請求項 29】

前記抗原結合タンパク質またはその抗原結合断片がオリゴマー MrkA に結合する、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 30】

オリゴマー MrkA に特異的に結合するが、単量体 MrkA に結合しない単離抗原結合

50

タンパク質。

【請求項 3 1】

マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、リサーフェシング、またはヒトである、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 2】

抗体である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 3】

抗体の抗原結合断片である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 4】

モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、またはその抗原結合断片である、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 5】

F a b、F a b'、F (a b') 2、F d、単鎖 F v もしくは s c F v、ジスルフィド連結 F v、V - N A R ドメイン、I g N a r、イントラボディ、I g G C H 2、ミニボディ、F (a b') 3、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、D V D - I g、F c a b、m A b 2、(s c F v) 2、または s c F v - F c を含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 6】

約 1 . 0 ~ 約 1 0 n M の K d で M r k A に結合する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 7】

1 . 0 n M 以下の K d で M r k A に結合する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 8】

結合親和性がフローサイトメトリー、B i a c o r e、K i n E x a、ラジオイムノアッセイ、またはバイオレイヤー干渉法 (B L I) によって測定される、請求項 3 6 または 3 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 9】

a) 少なくとも 2 つの肺炎桿菌 (K . p n e u m o n i a e) 血清型に結合するか、b) 肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅 (O P K) を誘導するか、または c) 少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型に結合し、かつ肺炎桿菌の O P K を誘導する、請求項 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4 0】

前記抗原結合タンパク質がクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる、請求項 1 ~ 5 または 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 1】

前記抗原結合タンパク質がクレブシエラ細胞吸着を阻害するかまたは低下させる、請求項 1 ~ 6 または 8 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 2】

- (a) I g A 定常ドメイン、
- (b) I g D 定常ドメイン、
- (c) I g E 定常ドメイン、
- (d) I g G 1 定常ドメイン、
- (e) I g G 2 定常ドメイン、
- (f) I g G 3 定常ドメイン、
- (g) I g G 4 定常ドメイン、および
- (h) I g M 定常ドメイン

10

20

30

40

50

からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 3】

前記抗原結合タンパク質が、

(a) I g カッパ定常ドメイン、および

(b) I g ラムダ定常ドメイン

からなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 4】

前記抗原結合タンパク質がヒト I g G 1 定常ドメインおよびヒトラムダ定常ドメインを含む、請求項 4 2 または 4 3 に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

10

【請求項 4 5】

前記抗原結合タンパク質が I g G 1 定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 6】

前記抗原結合タンパク質が I g G 1 / I g G 3 キメラ定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体。

【請求項 4 7】

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体を産生するハイブリドーマ。

20

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体を産生する単離宿主細胞。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体を作製する方法であって、(a) 前記抗原結合タンパク質または抗体を発現する宿主細胞を培養するステップ、および(b) 前記抗原結合タンパク質または抗体を前記培養宿主細胞から単離するステップを含む方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の方法を使用して産生される抗原結合タンパク質または抗体。

30

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 4 6 または 5 0 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体および薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 5 2】

前記薬学的に許容可能な賦形剤が保存剤、安定剤、または酸化防止剤である、請求項 5 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 3】

医薬として使用される、請求項 5 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 4】

標識基またはエフェクター基をさらに含む、請求項 1 ~ 4 6 もしくは 4 9 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質もしくは抗体または請求項 5 1 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 5 5】

前記標識基が、同位体標識、磁気標識、レドックス活性成分、光学色素、ビオチン化基、ビオチンシグナル伝達ペプチド、緑色蛍光タンパク質(G F P)、青色蛍光タンパク質(B F P)、シアン蛍光タンパク質(C F P)、および黄色蛍光タンパク質(Y F P) などの蛍光成分、ならびにヒスチジンペプチド(h i s)、ヘマグルチニン(H A)、金結合ペプチド、および F l a g などの二次レポーターによって認識されるポリペプチドエピトープからなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の抗原結合タンパク質、抗体、または医薬組成物。

50

【請求項 56】

前記エフェクター基が、放射性同位体、放射性核種、毒素、治療薬、および化学療法剤からなる群から選択される、請求項 54 に記載の抗原結合タンパク質、抗体、または医薬組成物。

【請求項 57】

クレブシエラ感染症に関連する状態を治療または予防するための、請求項 1 ~ 46 または 50 ~ 56 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、抗体、または医薬組成物の使用。

【請求項 58】

クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、または回復を、それを必要としている対象において行う方法であって、有効量の請求項 1 ~ 46 または 50 ~ 56 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、抗体、または医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

10

【請求項 59】

対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 46 または 50 ~ 56 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、抗体、または医薬組成物を、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 60】

クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、または回復を、それを必要としている対象において行う方法であって、有効量の抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を前記対象に投与するステップを含む方法。

20

【請求項 61】

対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、有効量の抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 62】

前記抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片が肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および / または K . グラニュロマティス M r k A に特異的に結合する、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片が肺炎桿菌 M r k A に特異的に結合する、請求項 62 に記載の方法。

30

【請求項 64】

前記状態が、肺炎、尿路感染症、敗血症、新生児敗血症、下痢、軟部組織感染症、臓器移植後の感染症、外科手術による感染症、創傷感染症、肺感染症、化膿性肝膿瘍 (P L A)、眼内炎、髄膜炎、壊死性髄膜炎、強直性脊椎炎、および脊椎関節症からなる群から選択される、請求項 57、58 または 60 のいずれか一項に記載の使用または方法。

【請求項 65】

前記状態が院内感染症である、請求項 57、58、60 または 64 のいずれか一項に記載の使用または方法。

【請求項 66】

前記クレブシエラが肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および / または K . グラニュロマティスである、請求項 57 ~ 65 のいずれか一項に記載の使用または方法。

40

【請求項 67】

前記クレブシエラがセファロsporin、アミノグリコシド、キノロン、および / またはカルバペネムに対して抵抗性である、請求項 57 ~ 66 のいずれか一項に記載の使用または方法。

【請求項 68】

抗生物質を投与するステップをさらに含む、請求項 58 ~ 67 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 69】

前記抗生物質がカルバペネムまたはコリスチンである、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

請求項 1～46 または 50 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質または抗体をコードする単離核酸分子。

【請求項 71】

配列番号 13、14、53、54、55、および 56 からなる群から選択される重鎖可変領域 (VH) 配列をコードする単離核酸分子。

【請求項 72】

配列番号 15、16、57、58、59、および 60 からなる群から選択される軽鎖可変領域 (VL) 配列をコードする単離核酸分子。

【請求項 73】

制御配列に作動可能に連結される、請求項 70～72 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 74】

請求項 70～73 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 75】

請求項 70～73 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 74 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 76】

請求項 71 に記載の核酸ならびに配列番号 15、16、57、58、59、および 60 からなる群から選択される VL 配列をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞。

【請求項 77】

哺乳類宿主細胞である、請求項 75 または 76 に記載の宿主細胞。

【請求項 78】

NS0 マウス骨髓腫細胞、PER.C6 (登録商標) ヒト細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 77 に記載の哺乳類宿主細胞。

【請求項 79】

MrkA、その免疫原性断片、または MrkA もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

【請求項 80】

MrkA、その免疫原性断片、または MrkA もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン。

【請求項 81】

免疫学的有効量の前記 MrkA、その免疫原性断片、または MrkA もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 79 または 80 に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 82】

アジュバントを含む、請求項 79～81 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 83】

前記 MrkA またはその免疫原性断片が単量体である、請求項 79～82 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 84】

前記 MrkA またはその免疫原性断片がオリゴマーである、請求項 79～82 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 85】

前記 MrkA が肺炎桿菌 MrkA である、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 86】

10

20

30

40

50

前記 M r k A もしくはその免疫原性断片が、配列番号 17 において示される配列と少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % 同一な配列を含むか、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 17 において示される前記配列と少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % 同一な配列をコードする、請求項 79 ~ 84 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 87】

前記 M r k A もしくはその免疫原性断片が、配列番号 17 において示される配列を含むか、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 17 において示される前記配列をコードする、請求項 79 ~ 84 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 88】

対象においてクレブシエラに対する免疫応答を誘導する方法であって、請求項 79 ~ 87 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチンを前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 89】

前記免疫応答が抗体応答を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記免疫応答が細胞媒介性免疫応答を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 91】

前記免疫応答が細胞媒介性免疫応答および抗体応答を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 92】

前記免疫応答が粘膜免疫応答である、請求項 88 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記免疫応答が防御免疫応答である、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 94】

クレブシエラに対して対象にワクチン接種する方法であって、請求項 79 ~ 87 のいずれか一項に記載の医薬組成物またはワクチンを前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 95】

クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、またはその発生率の低下を、それを必要としている対象において行う方法であって、M r k A、その免疫原性断片、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 96】

対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、M r k A、その免疫原性断片、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 97】

前記クレブシエラが肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および / または K . グラニューロマトリスである、請求項 88 ~ 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記クレブシエラが肺炎桿菌である、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

前記 M r k A またはその免疫原性断片が単量体である、請求項 95 ~ 98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

前記 M r k A またはその免疫原性断片がオリゴマーである、請求項 95 ~ 98 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 101】

前記 M r k A が肺炎桿菌 M r k A である、請求項 95 ~ 100 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子的に提出された配列表に対する参照

本出願と共に提出され、A S C I I テキストファイル M R K A - 100 - W O - P C T _ S e q L i s t i n g . t x t (サイズ : 42 , 157 バイト ; および作成日 : 2016 年 8 月 16 日) で電子的に提出された配列表の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

10

【0002】

本発明の分野は、概して、クレブシエラ感染症の予防または治療のための M r k A ポリペプチド、M r k A コードポリヌクレオチド、および抗 M r k A 抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

クレブシエラは、肺炎、尿路感染症、新生児敗血症、および外科手術による創傷感染症を含む、見通しが甘いことによる感染および院内感染の原因病原体として临床上の重要性が急速に増しているグラム陰性菌である。そのうえ、化膿性肝膿瘍 (P L A)、眼内炎、髄膜炎、および壊死性髄膜炎などのクレブシエラ感染症に関連する、出現しつつある症候群がある。

20

【0004】

過去 20 年間にわたり、抗生物質抵抗性が、細菌感染への対処における重大な課題の 1 つとして出現してきた。薬剤抵抗性の黄色ブドウ球菌に対していくらかの進歩が得られたが、多薬剤抵抗性 (M D R) グラム陰性日和見感染症は、非常に問題であり、新規な抗菌薬剤を必要とする (例えば、X u e t a l . , E x p e r t o p i n i o n o n i n v e s t i g a t i o n a l d r u g s 2014 ; 23 : 163 - 82 を参照されたい)。これらの中で、日和見感染症および院内感染症についての原因病原体である肺炎桿菌 (B r o b e r g e t a l . , F 1000 P r i m e R e p 2014 ; 6 : 64) は、多薬剤抵抗性株が広範にわたって広まっており、特に厄介なものとなってきた。広域スペクトルベータラクタマーゼ (E S B L)、肺炎桿菌カルバペネマーゼ (K P C)、およびニューデリーメタロベータラクタマーゼ 1 (N D M - 1) などのクレブシエラ感染症は、世界中に拡散し、現在の抗生物質の分類は主として不適切なものになった。このような現実、抗生物質流通ルートの縮小と合わさって、臨床医にわずかな治療の選択肢のみを残す (M u n o z - P r i c e e t a l . , L a n c e t I n f e c t D i s 2013 ; 13 : 785 - 96)。最近、いくつかの注目を集める感染が発生しており、これは肺炎桿菌抗生物質抵抗性に関する緊急性を強調する。M c K e n n a , N a t u r e 2013 ; 499 : 394 - 6 または S n i t k i n e t a l . , S c i T r a n s l M e d 2012 ; 4 : 148 r a 16 を参照されたい。そのうえ、抵抗性の異種間での拡散は、抗生物質を補完するかまたは浪費しないための、抗体およびワクチンなどの代替の病原体特異的な戦略の必要性を指摘する。細菌感染症に対する種特異的な防御抗体は、急速に進化する抗生物質抵抗性メカニズムの影響を受けないであろう。また、前臨床データは、種特異的な防御抗体が補助的な使用において患者に対して有益性をさらに提供し得ることを実証した。例えば、D i G i a n d o m e n i c o e t a l . , J E x p M e d 2012 ; 209 : 1273 - 87 ; D i G i a n d o m e n i c o e t a l . , S c i T r a n s l M e d 2014 ; 6 : 262 r a 155 を参照されたい。

30

40

【0005】

複数の毒性因子が肺炎桿菌の病原に関係してきた (P o d s c h u n e t a l . , C l i n M i c r o b i o l R e v 1998 ; 11 : 589 - 603)。荚膜多糖

50

(CPS) およびリポ多糖 (LPS) が最もよく特徴付けられている。LPS および CPS に向けられるポリクローナル抗体は、致命的な肺炎桿菌感染症の前臨床モデルにおいて防御的である (Ahmad et al., Vaccine 2012; 30: 2411 - 20; Rukavina et al., Infect Immun 1997; 65: 1754 - 60; Donta et al., J Infect Dis 1996; 174: 537 - 43)。しかしながら、抗体によりまたはワクチン候補における免疫原としてそれらを使用してこれらの2つの抗原を標的にすることにより、株の対象範囲に関して重大な課題が生じる。77を超える既知の莢膜血清型および8つのO抗原血清型があり、いずれが最も一般的であるかおよび/または病原に最も関連しているかは明らかでない。血清型特異的モノクローナル抗体は、LPS および莢膜血清型が明確な肺炎桿菌に対して防御を与えることができるが (Mandine et al., Infect Immun 1990; 58: 2828 - 33)、多価の抗原および/または抗体の組み合わせが広範な株を対象としかつ防御するのに必要とされる (Campbell et al., Clin Infect Dis 1996; 23: 179 - 81)。血清型非依存性交差防御抗原の同定は、今もなお非常に厄介である。例えば、血清型を越えて存在する保存コアLPSエピトープを標的にするモノクローナル抗体は、動物モデルにおいてほとんどまたは全く防御をもたらさなかった (Brade et al., 2001, J Endotoxin Res, 7 (2): 119 - 24)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0006】

肺炎桿菌についての交差防御標的を同定するために、ゲノミクスおよびプロテオミクスのアプローチを含む複数の戦略が使用されてきた (Lundberg et al., Hum Vaccin Immunother 2012; 9: 497 - 505; Meinke et al., Vaccine 2005; 23: 2035 - 41; Maroncle et al., Infection and immunity 2002; 70: 4729 - 34)。多くの標的がこれらの研究から提案されたが、その後の調査を通して検証されたものはほとんどない。注意すべきことに、そのようなアプローチを通して同定された有望な標的の大部分は、代謝経路に関与するタンパク質であり、これらは、入手しづらいために抗体標的として適していないことがあり得る。アンチゲノム戦略は、抗体応答を誘起することができる抗原を直接同定するための新規なアプローチに相当する (Meinke et al., 2005, Vaccine, 23 (17 - 18): 2035 - 41)。肺炎桿菌調査に対するその影響は現在のところ不明である。したがって、肺炎桿菌感染症に対して防御効果を有する抗体および/または免疫原性ポリペプチド/ワクチンを同定および開発する必要がある。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

抗生物質抵抗性の肺炎桿菌感染症の出現および増えつつある症例は、予防および治療のための抗体療法および/またはワクチンなどの代替のアプローチを開発する十分な理由となる。しかしながら、様々な異なる臨床株によって共有される検証済み標的が不足していることにより、重大な課題が生じる。機能的標的非依存性 (target-agnostic) スクリーニングアプローチが新規な標的に対する防御抗体を同定するために採用された。いくつかのモノクローナル抗体は、オプソニン作用による死滅 (OPK) に関する全細菌の結合およびスクリーニングを介してファージディスプレイおよびハイブリドーマのプラットフォームから同定された。これらの活性を有する抗体による肺炎桿菌細胞溶解物の免疫沈降、その後続く質量分析法により、それらの標的抗原が、III型フィンブリリア複合体中の主なタンパク質であるMrkAであることを同定した。III型フィンブリリアは、生物および非生物の表面上でのバイオフィーム形成を媒介し、成熟したバイオフィームの成長に必要とされる。3型フィンブリリアの様々な構成成分は、mrkA B C D F オペロンによってコードされ、これは、主なピリンサブユニットMrkA、シャペロンM

40

50

rkB、外膜アッシャー (outer membrane usher) MrkC、アドヘシン MrkD、および MrkF を産生する。Yang et al. PLoS One. 2013 Nov 14; 8(11): e79038 を参照されたい。クレブシエラの宿主細胞粘着およびバイオフィーム形成は、そのような MrkA ピリンによって媒介される。Chan et al., Langmuir 28: 7428 - 7435 (2012) を参照されたい。これらの血清型非依存性 MrkA 抗体はまた、マウス肺炎モデルでもバイオフィーム形成を低下させ、防御を与えた。重要なことに、精製 MrkA タンパク質により免疫化されたマウスは、肺炎桿菌感染症に際して臓器負担の低下を示した。したがって、本開示は、クレブシエラに結合し、クレブシエラのオプソニン作用による死滅 (OPK) を誘導する MrkA 結合タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合断片を提供する。本開示はまた、MrkA 結合タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合断片、MrkA ポリペプチド、その免疫原性断片、および MrkA ポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを使用してクレブシエラ感染症を治療する方法も提供する。

10

20

30

【0008】

1つの事例では、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、抗原結合タンパク質が、a) 少なくとも2つの肺炎桿菌 (K. pneumoniae) 血清型に結合するか、b) 肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅 (OPK) を誘導するか、または c) 少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合し、かつ肺炎桿菌の OPK を誘導する。1つの事例では、抗原結合タンパク質は、O1:K2、O1:K79、O2a:K28、O5:K57、O3:K58、O3:K11、O3:K25、O4:K15、O5:K61、O7:K67、および O12:K80 からなる群から選択される、少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合する。1つの事例では、抗原結合タンパク質は、O1:K2、O1:K79、O2a:K28、O5:K57、O3:K58、O3:K11、O3:K25、O4:K15、O5:K61、O7:K67、および O12:K80 からなる群から選択される、少なくとも1つまたは2つの肺炎桿菌血清型において OPK を誘導する。1つの事例では、抗原結合タンパク質は、生物発光 OPK アッセイを使用して測定されるように、肺炎桿菌株 9148 (O2a:K28)、9178 (O3:K58) および 9135 (O4:K15) において 100% の OPK を誘導し、かつ/または肺炎桿菌株 29011 (O1:K2) において 80% の OPK を誘導する。1つの事例では、抗原結合タンパク質は、Kp29011、Kp9178、および Kp43816 からなる群から選択される肺炎桿菌株に暴露された動物において延命効果を与える。

【0009】

1つの事例では、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、抗原結合タンパク質がバイオフィーム形成を阻害する。

【0010】

1つの事例では、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、抗原結合タンパク質が細胞吸着を阻害する。

【0011】

1つの事例では、相補性決定領域 (CDR): HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、および LCDR3 のセットを含む、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、HCDR1 が配列番号1のアミノ酸配列を有し、HCDR2 が配列番号2のアミノ酸配列を有し、HCDR3 が配列番号3のアミノ酸配列を有し、LCDR1 が配列番号7のアミノ酸配列を有し、LCDR2 が配列番号8のアミノ酸配列を有し、および LCDR3 が配列番号9のアミノ酸配列を有する。

40

【0012】

1つの事例では、MrkA に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99% 同一な重鎖可変領域 (VH) および/または配列番号15と

50

少なくとも 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一な軽鎖可変領域 (V L) を含む。1 つの実例では、その抗原結合タンパク質が、配列番号 13 を含む V H および配列番号 15 を含む V L を含む。

【0013】

1 つの実例では、配列番号 13 を含む V H を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0014】

1 つの実例では、配列番号 15 を含む V L を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0015】

1 つの実例では、相補性決定領域 (C D R) : H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 のセットを含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、H C D R 1 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、H C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有し、H C D R 3 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、L C D R 1 が配列番号 10 のアミノ酸配列を有し、および L C D R 2 が配列番号 11 のアミノ酸配列を有し、L C D R 3 が配列番号 12 のアミノ酸配列を有する。

【0016】

1 つの実例では、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 14 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一な重鎖可変領域 (V H) および / または配列番号 16 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一な軽鎖可変領域 (V L) を含む。1 つの実例では、抗原結合タンパク質が、配列番号 14 を含む V H および配列番号 16 を含む V L を含む。

【0017】

1 つの実例では、配列番号 14 を含む V H を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0018】

1 つの実例では、配列番号 16 を含む V L を含む、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0019】

1 つの実例では、抗原結合タンパク質が配列番号 17 のアミノ酸 1 ~ 40 および 171 ~ 202 中のエピトープに結合する。1 つの実例では、抗原結合タンパク質が M r k A (配列番号 17) に特異的に結合するが、配列番号 26 (配列番号 17 のアミノ酸 1 ~ 40 を欠く M r k A) または配列番号 27 (配列番号 17 のアミノ酸 171 ~ 202 を欠く M r k A) のいずれにも結合しない。

【0020】

1 つの実例では、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、抗原結合タンパク質が配列番号 17 のアミノ酸 1 ~ 40 および 171 ~ 202 中のエピトープに結合する。

【0021】

1 つの実例では、M r k A (配列番号 17) に特異的に結合するが、配列番号 26 および / または配列番号 27 に結合しない単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0022】

1 つの実例では、(i) それぞれ配列番号 29 ~ 31 および 41 ~ 43、(i i) それぞれ配列番号 32 ~ 34 および 44 ~ 46、(i i i) それぞれ配列番号 35 ~ 37 および 47 ~ 49、ならびに (i v) それぞれ配列番号 38 ~ 40 および 50 ~ 52 からなる群から選択される相補性決定領域 (C D R) : H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 のセットを含む、M r k A に特異的に結合する

10

20

30

40

50

単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0023】

1つの事例では、Mrk Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、前記抗原結合タンパク質が、配列番号53、54、55、もしくは56と少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一な重鎖可変領域(VH)および/または配列番号57、58、59、もしくは60と少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一な軽鎖可変領域(VL)を含む。1つの事例では、抗原結合タンパク質が、配列番号53、54、55、または56を含むVHおよび配列番号57、58、59、または60を含むVLを含む。

【0024】

1つの事例では、配列番号53、54、55、または56を含むVHを含む、Mrk Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0025】

1つの事例では、配列番号57、58、59、または60を含むVLを含む、Mrk Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。1つの事例では、

(a) 配列番号13を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号15を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(b) 配列番号14を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号16を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(c) 配列番号53を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号57を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(d) 配列番号54を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号58を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(e) 配列番号55を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号59を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、ならびに(f) 配列番号56を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号60を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片からなる群から選択される抗体またはその抗原結合断片と同じMrk Aエピトープに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。1つの事例では、Mrk Aへの参照抗体の結合を競合的に阻害する単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供され、前記参照抗体が、(a) 配列番号13を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号15を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(b) 配列番号14を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号16を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(c) 配列番号53を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号57を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(d) 配列番号54を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号58を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、(e) 配列番号55を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号59を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片、ならびに(f) 配列番号56を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号60を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体またはその抗原結合断片からなる群から選択される。

【0026】

1つの事例では、抗原結合タンパク質またはその抗原結合断片がオリゴマーMrk Aに結合する。

【0027】

1つの事例では、オリゴマーMrk Aに特異的に結合するが、単量体Mrk Aに結合しない単離抗原結合タンパク質が本明細書において提供される。

【0028】

1つの事例では、抗原結合タンパク質がマウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、リサーフェシング、またはヒトである。

【0029】

1つの事例では、抗原結合タンパク質が抗体である。いくつかの実施形態では、抗原結

10

20

30

40

50

合タンパク質がモノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、またはその抗原結合断片である。

【0030】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が抗体の抗原結合断片である。1つの実例では、抗原結合タンパク質がFab、Fab'、F(ab')₂、Fd、単鎖FvもしくはscFv、ジスルフィド連結Fv、V-NARドメイン、IgNar、イントラボディ、IgG₁CH₂、ミニボディ、F(ab')₃、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、DVD-Ig、mAb₂、(scFv)₂、またはscFv-Fcを含む。1つの実例では、抗原結合タンパク質がFab、Fab'、F(ab')₂、単鎖FvもしくはscFv、ジスルフィド連結Fv、イントラボディ、IgG₁CH₂、ミニボディ、F(ab')₃、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、(scFv)₂、またはscFv-Fcを含む。

10

【0031】

1つの実例では、抗原結合タンパク質が約1.0nM~約10nMのK_dでMrkAに結合する。1つの実例では、抗原結合タンパク質が1.0nM以下のK_dでMrkAに結合する。1つの実例では、結合親和性がフローサイトメリー、Biacore、KinExa、ラジオイムノアッセイ、またはバイオレイヤー干渉法(BLI)によって測定される。

【0032】

1つの実例では、抗原結合タンパク質が、a)少なくとも2つの肺炎桿菌(K.pneumoniae)血清型に結合するか、b)肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅(OPK)を誘導するか、またはc)少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合し、かつ肺炎桿菌のOPKを誘導する。

20

【0033】

1つの実例では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。一部の態様では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がKp43816バイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

【0034】

1つの実例では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がクレブシエラ細胞吸着を阻害するかまたは低下させる。一部の態様では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がヒト細胞へのクレブシエラ(例えば、Kp43816を含む)細胞吸着を阻害するかまたは低下させる。一部の態様では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がヒト上皮細胞へのクレブシエラ(例えば、Kp43816を含む)細胞吸着を阻害するかまたは低下させる。一部の態様では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)が肺上皮細胞へのクレブシエラ(例えば、Kp43816を含む)細胞吸着を阻害するかまたは低下させる。一部の態様では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む)がA549細胞へのクレブシエラ(例えば、Kp43816を含む)細胞吸着を阻害するかまたは低下させる。

30

40

【0035】

1つの実例では、抗原結合タンパク質が、(a)IgA定常ドメイン、(b)IgD定常ドメイン、(c)IgE定常ドメイン、(d)IgG1定常ドメイン、(e)IgG2定常ドメイン、(f)IgG3定常ドメイン、(g)IgG4定常ドメイン、および(h)IgM定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。1つの実例では、抗原結合タンパク質が、(a)Igカッパ定常ドメイン、および(b)Igラムダ定常ドメインからなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。1つの実例では、抗原結合タンパク質がヒトIgG1定常ドメインおよびヒトラムダ定常ドメインを含む。

50

【0036】

1つの事例では、抗原結合タンパク質がIgG1定常ドメインを含む。

【0037】

1つの事例では、抗原結合タンパク質がIgG1/IgG3キメラ定常ドメインを含む。

【0038】

1つの事例では、抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を産生するハイブリドーマが本明細書において提供される。

【0039】

1つの事例では、抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を産生する単離宿主細胞が本明細書において提供される。

10

【0040】

1つの事例では、抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を作製する方法であって、（a）前記抗原結合タンパク質を発現する宿主細胞を培養するステップ、および（b）前記抗原結合タンパク質を前記培養宿主細胞から単離するステップを含む方法が本明細書において提供される。1つの事例では、その方法を使用して産生される抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体またはその抗原結合断片を含む）が本明細書において提供される。

【0041】

本開示はまた、抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体またはその抗原結合断片を含む）および薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。1つの事例では、薬学的に許容可能な賦形剤が保存剤、安定剤、または酸化防止剤である。1つの事例では、医薬組成物が医薬として使用するためのものである。

20

【0042】

1つの事例では、抗原結合タンパク質または医薬組成物が標識基またはエフェクター基をさらに含む。1つの事例では、標識基が、同位体標識、磁気標識、レドックス活性成分、光学色素、ビオチン化基、ビオチンシグナル伝達ペプチド、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、および黄色蛍光タンパク質（YFP）などの蛍光成分、ならびにヒスチジンペプチド（his）、ヘマグルチニン（HA）、金結合ペプチド、およびFlagなどの二次レポーターによって認識されるポリペプチドエピトープからなる群から選択される。1つの事例では、エフェクター基が、放射性同位体、放射性核種、毒素、治療薬、および化学療法剤からなる群から選択される。

30

【0043】

1つの事例では、クレブシエラ感染症に関連する状態を治療または予防するための、本明細書において提供される抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体もしくはその抗原結合断片を含む）または医薬組成物の使用が本明細書において提供される。

【0044】

本開示はまた、クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、または回復を、それを必要としている対象において行う方法であって、本明細書において提供される有効量の抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体もしくはその抗原結合断片を含む）または医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法も提供する。

40

【0045】

1つの事例では、対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、本明細書において提供される抗原結合タンパク質（例えば、抗MerkA抗体もしくはその抗原結合断片を含む）または医薬組成物を、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

【0046】

1つの事例では、クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、または回復を、それを必要としている対象において行う方法であって、有効量の抗MerkA抗体またはその

50

抗原結合断片を前記対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、状態が、肺炎、尿路感染症、敗血症、新生児敗血症、下痢、軟部組織感染症、臓器移植後の感染症、外科手術による感染症、創傷感染症、肺感染症、化膿性肝膿瘍（P L A）、眼内炎、髄膜炎、壊死性髄膜炎、強直性脊椎炎、および脊椎関節症からなる群から選択される。1つの事例では、状態が院内感染症である。1つの事例では、クレブシエラが肺炎桿菌、K．オキシトカ、K．ブランチコラ、および／またはK．グラニューロマトリスである。1つの事例では、クレブシエラがセファロsporin、アミノグリコシド、キノロン、および／またはカルバペネムに対して抵抗性である。1つの事例では、方法が抗生物質を投与するステップをさらに含む。1つの事例では、抗生物質がカルバペネムまたはコリスチンである。

10

【0047】

1つの事例では、対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、有効量の抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、抗M r k A抗体またはその抗原結合断片が肺炎桿菌、K．オキシトカ、K．ブランチコラ、および／またはK．グラニューロマトリスM r k Aに特異的に結合する。1つの事例では、抗M r k A抗体またはその抗原結合断片が肺炎桿菌M r k Aに特異的に結合する。

【0048】

本開示はまた、本明細書において提供される抗原結合タンパク質をコードする単離核酸分子も提供する。

20

【0049】

1つの事例では、配列番号13、14、53、54、55、および56からなる群から選択される重鎖可変領域（V H）配列をコードする単離核酸分子が本明細書において提供される。1つの事例では、配列番号15、16、57、58、59、および60からなる群から選択される軽鎖可変領域（V L）配列をコードする単離核酸分子が本明細書において提供される。

【0050】

1つの事例では、核酸分子が制御配列に作動可能に連結される。1つの事例では、本明細書において提供される核酸分子を含むベクターが本明細書において提供される。1つの事例では、本明細書において提供される核酸分子または本明細書において提供されるベクターで形質転換された宿主細胞が本明細書において提供される。

30

【0051】

1つの事例では、配列番号13、14、53、54、55、および56からなる群から選択される重鎖可変領域（V H）配列をコードする核酸ならびに配列番号15、16、57、58、59、および60からなる群から選択されるV L配列をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞が本明細書において提供される。

【0052】

1つの事例では、宿主細胞が哺乳類宿主細胞である。1つの事例では、宿主細胞がN S 0マウス骨髄腫細胞、P E R．C 6（登録商標）ヒト細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞である。

40

【0053】

本開示はまた、M r k A、その免疫原性断片、またはM r k Aもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物も提供する。1つの事例では、本開示は、M r k A、その免疫原性断片、またはM r k Aもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物またはワクチンが、免疫学的有効量のM r k A、その免疫原性断片、またはM r k Aもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む。1つの事例では、医薬組成物またはワクチンがアジュバントを含む。1つの事例では、医薬組成物またはワクチンのM r k Aまたはその免疫原性断片が単量体である。1つの事例では、医薬組成物またはワクチンのM r k Aまたはその免疫原性断片がオリゴマーである。1つの事例では、M r k A

50

が肺炎桿菌 M r k A である。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、M r k A もしくはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一な配列を含むか、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 7 において示される配列と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一な配列をコードする。1 つの実例では、M r k A もしくはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列を含むか、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 7 において示される配列をコードする。

10

【 0 0 5 5 】

本開示はまた、対象においてクレブシエラに対する免疫応答を誘導する方法であって、本明細書において提供される医薬組成物、M r k A もしくはその免疫原性断片、またはワクチンを対象に投与するステップを含む方法も提供する。1 つの実例では、免疫応答が抗体応答を含む。1 つの実例では、免疫応答が細胞媒介性免疫応答を含む。1 つの実例では、免疫応答が細胞媒介性免疫応答および抗体応答を含む。1 つの実例では、免疫応答が粘膜免疫応答である。1 つの実例では、免疫応答が防御免疫応答である。

【 0 0 5 6 】

20

加えて、クレブシエラに対して対象をワクチン接種する方法であって、本明細書において提供される医薬組成物、M r k A もしくはその免疫原性断片、またはワクチンを対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。1 つの実例では、クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、またはその発生率の低下を、それを必要としている対象において行う方法であって、M r k A、その免疫原性断片、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを前記対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。1 つの実例では、対象におけるクレブシエラの増殖を阻害する方法であって、M r k A、その免疫原性断片、または M r k A もしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。本明細書において提供される方法の 1 つの実例では、クレブシエラが肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および / または K . グラニュロマトリスである。1 つの実例では、クレブシエラが肺炎桿菌である。本明細書において提供される方法の 1 つの実例では、M r k A またはその免疫原性断片が単量体である。本明細書において提供される方法の 1 つの実例では、M r k A またはその免疫原性断片がオリゴマーである。本明細書において提供される方法の 1 つの実例では、M r k A が肺炎桿菌 M r k A である。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 7 】

【図 1 - 1】図 1 A - 1 F : ファージおよびハイブリドーマのプラットフォームを通して単離されたモノクローナル抗体 (m A b) の肺炎桿菌への結合および強力な O P K 活性を示す。A : 全細胞 E L I S A アッセイにおける K p 2 9 0 1 1 への抗体の結合 : 2 つのハイブリドーマクローン (8 8 D 1 0 および 8 9 E 1 0) ならびに 2 つのファージ抗体 (K p 3 および K p 1 6) が、実施例 2 において記載されるように E L I S A アッセイにおいて肺炎桿菌株 2 9 0 1 1 に結合する。予想通り、コントロール抗体 h I g G コントロールは、肺炎桿菌株 2 9 0 1 1 に結合しなかった。B : 抗体は、肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅 (O P K) を誘導する。ファージ (K p 3 および K p 1 6) ならびにハイブリドーマ (8 8 D 1 0 および 8 9 E 1 0) 由来の抗体を、仔ウサギ血清、H L 6 0、および肺炎桿菌株 2 9 0 1 1、l u x と共にインキュベートした。細菌の死滅について、抗体を欠くコントロールと比較して計算した。C : ファージ抗体 (K p 3 および K p 1 6) は、肺炎桿菌への結合について競合する。1 μ g / m l のビオチン標識 K p 3 を、示されるよう

40

50

に、増加性の量の非標識ファージ抗体およびコントロール抗体と混合し、肺炎桿菌株 29011 へのその結合について試験した。ストレプトアビジン - HRP を検出剤として使用した。Kp3 および Kp16 は共に、肺炎桿菌株 29011 へのビオチン標識 Kp3 の結合を妨げた。D : ファージ抗体 (Kp3 および Kp16) ならびにハイブリドーマ抗体 (88D10) は肺炎桿菌への結合において競合する。1 μ g/ml のハイブリドーマクローン 88D10 を、増加性の量のファージ抗体およびコントロール抗体 (hIgG) と混合し、肺炎桿菌株 29011 へのその結合について試験した。抗マウス IgG - HRP を検出剤として使用した。ELISA シグナルの低下を阻害のパーセンテージとして表現した。Kp3 および Kp16 は共に、肺炎桿菌株 29011 への 88D10 の結合を妨げた。E . ファージ (Kp3 および Kp16) 抗体ならびにハイブリドーマ (21G10、22B12、88D10、および 89E10) 抗体は、様々な血清型の肺炎桿菌株に結合する。「+」は、結合を示す。F . 抗 MrkA mAb Kp3 は、様々な血清型の肺炎桿菌に対して強力な OPK 活性を示す。

【図 1 - 2】図 1 - 1 の続き。

【図 1 - 3】図 1 - 2 の続き。

【図 2 A - 2 D】本明細書において生成される肺炎桿菌特異的抗体が結合する抗原として MrkA を同定する実験の結果を示す。A : 肺炎桿菌の表面への Kp3 抗体結合を示す共焦点顕微鏡画像。B : 非反応性 (1899) および反応性 (43816DM) 肺炎桿菌株由来の細胞溶解物からの Kp3、88D10、およびアイソタイプコントロール抗体による免疫沈降。免疫沈殿したポリペプチドに対応する付番したバンド (1 ~ 4) を LC - MS 分析にかけた。C : 免疫沈降産物のウエスタンブロット分析。図 2 B および C のレーンは以下の通りであった : レーン 1 - あらかじめ染色した分子量マーカー、レーン 2 - Kp3 非反応性株 1899 由来の細胞溶解物、レーン 3 - Kp3 反応性株 43816DM 由来の細胞溶解物、レーン 4 - アイソタイプコントロールによる免疫沈降にかけた 1899 溶解物、レーン 5 - Kp3 による免疫沈降にかけた 1899 溶解物、レーン 6 - 88D10 による免疫沈降にかけた 1899 溶解物、レーン 7 - アイソタイプコントロールによる免疫沈降にかけた 43816DM 溶解物、レーン 8 - Kp3 による免疫沈降にかけた 43816DM 溶解物、およびレーン 9 - 88D10 による免疫沈降にかけた 43816DM 溶解物。D : 図 2 B のゲルバンド番号 3 の LC - MS 結果。質量分析法を通して同定されたペプチドを肺炎桿菌株 MGH 78578 MrkA 配列 (配列番号 17) に関して太字にし、下線を引く。

【図 3 A - 3 B】MrkA が、本明細書において生成される肺炎桿菌特異的抗体が結合する共通の抗原であることを示す。A : 抗 his タグ (左のパネル) 抗体および Kp3 (右のパネル) 抗体を使用するウエスタンブロット分析による MrkA の組換え発現。レーン 1 : 宿主細胞のみ ; レーン 2 : 空のベクターで形質転換した宿主細胞 ; レーン 3 : his タグ付加 MrkA ORF を有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞 ; およびレーン 4 : 株 43816DM から調製した溶解物。これらの結果は、Kp3 が組換え MrkA に結合することを示す。B : MrkA のインビトロにおける転写および翻訳ならびに Kp3 (左のパネル) 抗体、抗 Myc タグ (右のパネル) 抗体を使用するウエスタンブロット分析。試料 1 : ポジティブ細菌細胞溶解物 ; 2 : ネガティブ細胞溶解物 ; 3 : シグナルペプチドなし / ジスルフィド結合エンハンサーありの、インビトロにおいて発現された MrkA ; 4 : シグナルペプチドあり / ジスルフィド結合エンハンサーあり ; 5 : シグナルペプチドもジスルフィド結合エンハンサーもなし ; 6 : シグナルペプチドあり、ジスルフィド結合エンハンサーなし ; および 7 : MrkA ORF なしのインビトロ発現系ネガティブコントロール。これらの結果は、Kp3 がインビトロにおいて翻訳された MrkA に結合することを示す。図 3 A および 3 B の両方の左側の数値は、kDa でのタンパク質の分子量である。

【図 4 A - 4 D】様々なインビボモデルにおける Kp3 mAb の防御活性を示す。A および B : Kp3 は、それぞれ Kp29011 (O1 : K2) および Kp9178 (O3 : K38) に対する鼻内肺感染症モデルにおける臓器負担を低下させる。無関係のヒト Ig

G 1 抗体 (h I g G 1) および K p 4 3 8 1 6 に対するウサギポリクローナル抗体 (R a b I g G) は、コントロールとして使用した。抗体は、すべて 1 5 m g / k g の用量で使用した。これらの結果は、細菌による攻撃前に投与された場合に抗 M r k A 抗体 K p 3 が臓器負担を低下させたことを示す。C : K p 3 は、K p 4 3 8 1 6 (O 1 : K 2) を使用する致命的な細菌性肺炎モデルにおいて生存を強化した。無関係のヒト I g G 1 (h I g G 1) 抗体は、コントロールとして使用した。両方の抗体を 1 5 m g / k g の用量で使用した。D : K p 3 は、多薬剤抵抗性 (M D R) 株である K p 9 8 5 0 4 8 を使用する致命的な細菌性肺炎モデルにおいて生存を有意に増強した。無関係のヒト I g G 1 (h I g G 1) 抗体は、コントロールとして使用した。両方の抗体を 5 m g / k g の用量で使用した。これらの結果は、細菌による攻撃の 2 4 時間前に投与された場合に抗 M r k A 抗体 K p 3 が生存を増強することを示す。

10

【図 5】腸内細菌科メンバー間の M r k A の保存を示す。保存残基は上に示し、異なる残基はボックスでマークする。M r k A は、大部分の腸内細菌科メンバー間で保存されている。

【図 6】M r k A 結合アッセイの結果を示す。完全長 M r k A (「M r k A - W T」; 配列番号 1 7)、4 0 アミノ酸 N 末端欠失を有する M r k A (「M r k A - N - d l t」; すなわち配列番号 1 7 のアミノ酸 4 1 ~ 2 0 2 (すなわち配列番号 2 6))、3 2 アミノ酸 C 末端欠失を有する M r k A (「M r k A - C - d l t」; すなわち配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 1 7 0 (すなわち配列番号 2 7))、N および C 末端欠失の両方を有する M r k A (「M r k A - N / C - d l t」; すなわち配列番号 1 7 のアミノ酸 4 1 ~ 1 7 0 (すなわち配列番号 2 8))、ならびに空のベクター (「T o p 1 0 c o n t」) を細胞において発現させた。細胞溶解物を E L I S A プレート上に直接コーティングし、K p 3 およびコントロール M r k A 抗体との結合についてアッセイした。ヒト I g G 1 はまた、コントロールとしての役割も果たした。K p 3 が完全長 M r k A のみを検出したのに対して、コントロール抗体は、完全長 M r k A および N 末端欠失を有する M r k A を検出した。これらの結果は、K p 3 が立体エピトープを認識することを示す。

20

【図 7】単量体 M r k A およびオリゴマー M r k A の精製を示す。単量体 M r k A およびオリゴマー M r k A の画分を発現させ、精製し、還元条件および非還元条件下で S D S - P A G E ゲルによって分析し、青色の染色剤により視覚化した。M : 分子量マーカー。レーン 1 および 4 は、プール 1 由来の単量体 M r k A を含有する。レーン 2 および 5 は、プール 2 由来の単量体 M r k A を含有する。レーン 3 および 6 は、オリゴマー M r k A を含有する。

30

【図 8 A - 8 B】M r k A ワクチン接種が肺の負担を低下させることを示す。単量体 M r k A またはオリゴマー M r k A により免疫化した C 5 7 / b 1 6 マウスに、K p 2 9 0 1 1 (O 1 : K 2) を鼻腔内に抗原投与した。肺および肝臓における細菌の存在を感染の 2 4 時間後に分析した。単量体 M r k A は、肺において細菌を有意に低下させ (図 8 A)、オリゴマー M r k A は、肺および肝臓の両方において細菌を有意に低下させた (図 8 B)。(*) は、スチューデントの t 検定 p 値 < . 0 5 を示す。

【図 9】K p 3 がクレブシエラバイオフィルム形成を阻害することを示す。K p 4 3 8 1 6 を、抗 M r k A 抗体 K p 3 (黒三角) または h I g G 1 (アイソタイプコントロール抗体、白三角、「R 3 4 7」) の存在下において F a l c o n プラスチックプレートに追加した。バイオフィルム形成の阻害をグラフで示した。(* *) は、アイソタイプコントロールと比べた K p 3 の値についての、スチューデントの t 検定 p 値 < 0 . 0 1 を示す。

40

【図 1 0】K p 3 が上皮細胞へのクレブシエラの結合を阻害することを示す。K p 4 3 8 1 6 を、抗 M r k A 抗体 K p 3 (黒三角) または h I g G 1 (白三角、「R 3 4 7」) の存在下において A 5 4 9 細胞 (2×10^5 / ウェル) に追加した。試料は、二通りで実行し、グラフは、3 つの別々の実験の代表である。(*) は、アイソタイプコントロールと比べた K p 3 の値についての、スチューデントの t 検定 p 値 < . 0 5 を示す。エラーバーが見えない場合、エラーバーは記号の幅よりも小さい。

【図 1 1】実施例 1 0 において記載されるファージバニングのアウトプットスクリーニン

50

グカスケードを示す。ファージパニング、s c F v . F c 変換、および形質転換後、4 0 0 0 を超えるコロニーをハイスループットスクリーニングのために選んだ。クローン 1、4、5、および 6 を含む 4 つのクローンをさらなる特徴付けのために選択した。

【図 1 2】M r k A バインダーのスクリーニングに使用される、構成要素が 4 つの均一性時間分解蛍光法 (homogeneous time resolved FRET) (H T R F) の概略図を示す。構成要素 A は、ストレプトアビジン - E u (K) クリプタートであり、かつエネルギードナーとしての役割を果たすが、構成要素 B および C 間の相互作用により、構成要素 D と隣接した状態になり、構成要素 D は、抗 h u F c - a l e x a f l u o r 6 4 7 であり、かつエネルギーアクセプターとしての役割を果たす。B は、ビオチン標識 M r k A であり、C は、M r k A に特異的な s c F v - F c である。

【図 1 3】抗 M r k A 抗体を使用する結合アッセイを示す。M r k A タンパク質は、E L I S A プレート (右のパネル) 上に直接コーティングしたまたはビオチン化後にストレプトアビジンによって捕捉した (左のパネル)。M r k A タンパク質は、これらの異なる抗原提示フォーマットにおいて抗 M r k A 抗体によって異なって認識された。

【図 1 4】抗 M r k A 抗体が、大腸菌 (E) において発現させた組換え M r k A と比較して、むしろ K P 株 (K) から直接調製したオリゴマー M r k A に結合することをウエスタンブロット分析において示す。クローン 1 は、K P 由来の単量体 M r k A を検出することができる唯一の抗体である (矢印によって示す)。

【図 1 5】エピトープ結合アッセイの結果を示す。エピトープピニングは、3 つの被験物質: K P 3、クローン 4、およびクローン 5 に対して実行した。

【図 1 6】O P K 活性がインビボ防御活性にとって重要であることを示す。K P 3 - T M 突然変異を生成し、インビトロ O P K アッセイ (上のパネル) およびインビボ攻撃アッセイ (下のパネル) の両方において試験した。著しい低下が O P K アッセイにおいて見られ、有意な傾向がインビボ攻撃アッセイにおいて見られた。

【図 1 7】抗 M r k A 抗体による K P 株への血清型非依存性の結合を示す。フローサイトメトリー実験は、異なる血清型の 3 つの W T K P 株に対する 4 つの抗 M r k A 抗体の結合を測るために使用した。R 3 4 7 は、ヒト I g G アイソタイプコントロールとする。

【図 1 8】抗 M r k A 抗体による血清型非依存性の O P K 活性を示す。L P S 血清型 O 1 および O 2 の 2 つの株を O P K アッセイにおいて使用した。抗 M r k A 抗体クローン 1、クローン 4、クローン 5、およびクローン 6 は、K P 3 と同等の O P K 活性を示した。R 3 4 7 は、ヒト I g G アイソタイプコントロールとする。

【図 1 9】予防インビボ攻撃モデルの結果を示す。抗体は、K P 攻撃の 2 4 時間前に与えた。

【図 2 0】治療インビボ攻撃モデルの結果を示す。抗体は、K P 攻撃の 1 時間後に与えた。

【図 2 1】個々の抗体が、治療モデルにおいて抗体の組み合わせと同程度に有効であることを示す。K P 3 は、示されるように等量でクローン 1 またはクローン 5 と組み合わせ、治療モデルにおいて試験した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 5 8】

本開示は、M r k A に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、単離結合タンパク質を提供する。関連するポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、および抗体またはその抗原結合断片を含む M r k A 結合タンパク質を含む医薬組成物も提供される。本明細書において開示される、抗体または抗原結合断片を含む M r k A 結合タンパク質を作製および使用方法も提供される。本開示はまた、本明細書において開示される、抗体または抗原結合断片を含む M r k A 結合タンパク質を投与することにより、クレブシエラ感染症に関連する状態を予防および / または治療する方法も提供する。

【0 0 5 9】

本開示がより容易に理解されるために、ある用語について最初に定義する。さらなる定義は詳細な説明の全体にわたって示される。

10

20

30

40

50

【0060】

I. 定義

用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明確に示さない限り、複数の指示物を含む。例えば、「抗原結合タンパク質」は、1つ以上の抗原結合タンパク質を示すことが理解される。用語「1つの(a)」（または「1つの(an)」）ならびに用語「1つ以上」および「少なくとも1つ」は、本明細書では同義的に使用することができる。さらに、「および/または」は、本明細書で使用される場合、2つの指定される特徴または構成要素の各々の、他方を伴うまたは伴わない具体的な開示と解釈されるべきである。したがって、用語「および/または」は、本明細書で「Aおよび/またはB」などの語句で用いられるとき、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(単独)、および「B」(単独)を含むことが意図される。同様に、用語「および/または」は、「A、B、および/またはC」などの語句で用いられるとき、以下の態様の各々を包含することが意図される：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；およびC(単独)。

10

【0061】

用語「含む」は、全般的に、包含するという意味で使用される、すなわち、1つ以上の特徴または構成要素の存在を許可する。本明細書において態様が用語「含む」を用いて記載される場合は常に、「からなる」および/または「から本質的になる」の用語で記載される他の点で類似の態様も提供される。

20

【0062】

本明細書および請求項の全体にわたって数値に関連して使用される用語「約」は、当業者によく知られており、許容され得る精度の幅を意味する。一般に、そのような精度の幅は±10%である。

【0063】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei - Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press が、本開示で使用される用語の多くの一般的な辞書を当業者に提供する。

30

【0064】

単位、接頭辞、および記号は、それらの国際単位系(SI)で認められている形式で示される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。特に指示されない限り、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシ方向に記載する。本明細書に提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって有され得る種々の態様または本開示の態様の限定ではない。従って、この直後に定義する用語は、本明細書を全体として参照することによってさらに十全に定義される。

40

【0065】

用語「抗原結合タンパク質」は、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片など、標的、例えばMrkAを認識し、特異的に結合する1つ以上のポリペプチドから構成される分子を指す。

【0066】

用語「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介してタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述の組み合わせなどの標的を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を

50

意味する。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、その抗体が所望の生物学的活性を呈する限りにおいて、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から作成された二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体を含む融合タンパク質、および任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれ、 α 、 β 、 γ 、および μ と称されるその重鎖定常ドメインのアイデンティティに基づき、5つの主要な免疫グロブリンクラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg M、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1およびIg A 2）のいずれかのものであり得る。異なる免疫グロブリンクラスは異なる周知のサブユニット構造および三次元配置を有する。抗体は、ネイキッドであってもよく、または毒素、放射性同位体等の他の分子にコンジュゲートしてもよい。

10

【0067】

用語「抗体断片」または「その抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分を指す。「抗原結合断片」または「その抗原結合断片」は、抗原に結合するインタクトな抗体の一部分を指す。抗原結合断片は、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を含有することができる。抗体断片の例としては、限定はされないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、線状抗体、scFv、ならびに一本鎖抗体が挙げられる。

【0068】

元の抗体または断片の特異性を保持する他の抗体またはキメラ分子またはその断片を産生するために、モノクローナル抗体および他の抗体またはその断片を得て、組換えDNA技術の技術を使用することが可能である。そのような技術は、異なる免疫グロブリンの定常領域または定常領域およびフレームワーク領域に抗体の免疫グロブリン可変領域または相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを導入することを含むことができる。例えば、欧州特許出願公開第A-184187号明細書、英国特許第2188638A号明細書、または欧州特許出願公開第A-239400号明細書および多くのそれに続く文献を参照されたい。抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞は、遺伝子突然変異または他の変化を受けることがあり、これにより、産生される抗体またはその断片の結合特異性が改変されてもまたは改変されなくてもよい。

20

【0069】

抗体工学の技術において利用可能なさらなる技術は、ヒト抗体およびヒト化抗体またはその断片を単離することを可能にした。例えば、ヒトハイブリドーマは、Kontermann and Sefan, Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals (2001)によって記載されるように作製することができる。抗原結合タンパク質を生成するための別の確立された技術、ファージディスプレイは、Kontermann and Sefan, Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals (2001)および国際公開第92/01047号パンフレットなどの多くの刊行物に詳細に記載された。マウス抗体遺伝子が不活性化され、かつヒト抗体遺伝子と機能的に置き換えられているが、マウス免疫系のインタクトな他の構成要素が残っているトランスジェニックマウスは、ヒト抗原に対するヒト抗体を単離するために使用することができる。

30

40

【0070】

合成抗体分子またはその断片は、例えばKnappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86またはKrebs et al., Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84によって記載されるように、適した発現ベクター内で合成され、アセンブルされるオリゴヌクレオチドによって生成される遺伝子からの発現によって作り出すことができる。

【0071】

全抗体の断片が抗原に結合する機能を実行し得ることが示された。結合断片の例は、(i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなるFab断片；(ii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインからな

50

るFv断片；(iv)VHドメインからなるdAb断片(Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554)；(v)単離CDR領域；(vi)2つの連結されたFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片、(vii)単鎖Fv分子(scFv)、VHドメインおよびVLドメインは、2つのドメインが結び付いて、抗原結合部位を形成するのを可能にするペプチドリンカーによって連結されている(Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988)；(viii)二重特異性単鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)、ならびに(ix)遺伝子融合によって構築される多価または多重特異性断片である「ダイアボディ」(国際公開第94/13804号パンフレット；P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993)である。Fv、scFv、またはダイアボディ分子は、VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みによって安定化されてもよい(Y. Reiter et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996)。CH3ドメインにつながれたscFvを含むミニボディも作製されてもよい(S. Hu et al, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996)。

【0072】

二重特異性抗体が使用されることになる場合、これらは、従来の二重特異性抗体であってもよく、これらは、様々な方法で製造することができ(Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993))、例えば、化学的にもしくはハイブリッドハイブリドーマから調製することができるかまたは上記に言及される二重特異性抗体断片のいずれかであってもよい。二重特異性抗体の例は、異なる特異性を有する2つの抗体の結合ドメインを使用し、短い可動性のペプチドを介して直接連結することができるBiTE(商標)技術のものを含む。これは、短い単一ポリペプチド鎖上で2つの抗体を組み合わせる。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを使用して、Fc領域なしで構築し、抗イデオタイプ反応の影響を可能性として低下させることができる。二重特異性ダイアボディはまた、二重特異性全抗体とは対照的に、それらを容易に構築することができ、大腸菌において発現させることができるため、特に有用であり得る。適切な結合特異性のダイアボディ(および抗体断片などの他の多くのポリペプチド)は、ライブラリからファージディスプレイ(国際公開第94/13804号パンフレット)を使用して容易に選択することができる。ダイアボディの一方のアームが、例えばMrkAに対して特異的な特異性を有するように一定に保たれることになる場合、他方のアームが多種多様であるライブラリを作製することができ、適切な特異性の抗体を選択することができる。二重特異性全抗体は、ノブイントゥホール(knobs-into-holes)遺伝子操作によって作製されてもよい(J. B. B. Ridgeway et al, Protein Eng., 9, 616-621, 1996)。多重特異性および/または多価分子を作り出した免疫グロブリン様ドメインベースの技術は、dAb、TandAb、ナノボディ(nanobody)、BiTE、SMIP、DNL、アフィボディ(affibody)、フィノマー(Fynomer)、Kunitzドメイン、Albu-dab、DART、DVD-IG、Covxボディ、ペプチボディー(peptibody)、scFv-Ig、SVD-Ig、dAb-Ig、ノブインホール(Knobs-in-Holes)、DuoBodies(商標)、およびtriomAbを含む。二重特異性二価抗体およびそれらを作製する方法は、例えば米国特許第5,731,168号明細書；米国特許第5,807,706号明細書；米国特許第5,821,333号明細書；ならびに米国特許出願公開第2003/020734号明細書および米国特許出願公開第2002/0155537号明細書において記載され、これらのすべての開示は、本明細書において参照により援用される。二重特異性四価抗体およびそれらを作製する方法は、例えば国際公開第02/096948号パンフレットおよび国際公開第00/44788号パンフレットにおいて記載

10

20

30

40

50

され、これらの両方の開示は、本明細書において参照により援用される。一般に、国際公開第93/17715号パンフレット；国際公開第92/08802号パンフレット；国際公開第91/00360号パンフレット；国際公開第92/05793号パンフレット；Tutt et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991)；米国特許第4,474,893号明細書；米国特許第4,714,681号明細書；米国特許第4,925,648号明細書；米国特許第5,573,920号明細書；米国特許第5,601,819号明細書；Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)を参照されたい。

【0073】

語句「エフェクター機能」は、Fc受容体または補体成分との抗体のFc構成要素の相互作用から結果として生じる抗体の活性を指す。これらの活性は、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)、および抗体依存性細胞食作用(ADCP)を含む。したがって、エフェクター機能が改変された抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合断片)は、少なくとも1つのエフェクター機能(例えば、ADCC、CDC、および/またはADCP)の活性を変えるFc領域における改変(例えば、アミノ酸置換、欠失、追加、またはオリゴ糖の変化)を含有する抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合断片)を指す。エフェクター機能が改善された抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合断片)は、少なくとも1つのエフェクター機能(例えば、ADCC、CDC、および/またはADCP)の活性を増加させるFc領域における改変(例えば、アミノ酸置換、欠失、追加、またはオリゴ糖の変化)を含有する抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合断片)を指す。

【0074】

用語「特異的な」は、特異的な結合ペアのあるメンバーがその特異的な結合パートナー以外の分子にいかなる有意な結合も示さないであろう状態を指すために使用されてもよい。用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多くの抗原が有する特定のエピトープに対して特異的である場合にも適用可能であり、この場合、抗原結合ドメインを有する抗原結合タンパク質は、そのエピトープを有する様々な抗原に結合することができるであろう。

【0075】

「特異的に結合する」により、抗体またはその抗原結合断片を含む抗原結合タンパク質がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合することならびに結合が抗原結合ドメインおよびエピトープ間のいくらかの相補性を必要とすることを一般に意味する。この定義に従って、抗体が偶然の関係がないエピトープに結合するよりも容易にその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する場合、抗体は、そのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。

【0076】

「親和性」は、リガンド結合反応の本質的な結合強度の尺度である。例えば、抗体(Ab)-抗原(Ag)相互作用の強度の尺度は、結合親和性を通して測定され、これは、解離定数 K_d によって定量化されてもよい。解離定数は、結合親和性定数であり、

【数1】

$$K_d = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg \text{ 複合体}]}$$

によって与えられる。親和性は、例えば、BIAcore(登録商標)、KinExA親和性アッセイ、フローサイトメトリー、および/またはラジオイムノアッセイを使用して測定されてもよい。

【0077】

「効力」は、定められた強度の効果をもたらすために必要とされる化合物の量で表現される化合物の薬理活性についての尺度である。それは、明確な生物学的効果を実現するために必要とされる化合物の量を指し、必要とされる用量が少ないほど、その薬剤は強力で

ある。Mrk Aに結合する抗原結合タンパク質の効力は、例えば、本明細書において記載されるようにOPKアッセイを使用して決定されてもよい。

【0078】

「オプソニン作用による死滅」または「OPK」は、免疫細胞による食作用の結果として生じる、細胞、例えばクレブシエラの死を指す。OPK活性を実証するために使用することができるアッセイは、実施例において使用される生物発光OPK活性または寒天プレート上の細菌コロニーを数えることによるものを含む。さらなるアッセイは、例えばDi Giandomenico et al., J. Exp. Med. 209: 1273 - 87 (2012)において提供され、これは、参照により本明細書に援用される。

【0079】

抗体またはその抗原結合断片を含む抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質がエピトープへの参照抗体または抗原結合断片の結合をある程度ブロックする場合、定められたエピトープへの参照抗体もしくはその抗原結合断片の結合を競合的に阻害するか、または参照抗体もしくは抗原結合断片と「競合する」と言われる。競合的阻害は、当技術分野において知られている任意の方法、例えば競合ELISAアッセイによって決定することができる。結合分子は、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、定められたエピトープへの参照抗体もしくは抗原結合断片の結合を競合的に阻害するか、または参照抗体もしくはその抗原結合断片と競合すると言うことができる。

【0080】

用語「競合する」は、抗原結合タンパク質（例えば、中和抗原結合タンパク質または中和抗体）に関して使用される場合、試験下の抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその免疫学的機能的断片）が、共通抗原（例えば、Mrk Aタンパク質またはその断片）への参照抗原結合タンパク質（例えば、リガンドまたは参照抗体）の特異的な結合を妨げるかまたは阻害するアッセイによって決定されるように、抗原結合タンパク質の競合を意味する。多数のタイプの競合的結合アッセイ、例えば、固相直接的または間接的ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接的または間接的酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 92: 242 - 253を参照されたい）；固相直接的ビオチン - アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137: 3614 - 3619を参照されたい）、固相直接的標識アッセイ、固相直接的標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）；1 - 125標識を使用する固相直接的標識RIA（例えば、Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25: 7 - 15を参照されたい）；固相直接的ビオチン - アビジンEIA（例えば、Cheung, et al., 1990, Virology 176: 546 - 552を参照されたい）；および直接的標識RIA（Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77 - 82）を使用することができる。典型的に、そのようなアッセイは、これら非標識試験抗原結合タンパク質および標識参照抗原結合タンパク質のいずれかを有する固体表面またはセルに結合した精製抗原の使用を伴う。

【0081】

競合的阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下において固体表面またはセルに結合した標識の量を決定することによって測定することができる。通常、試験抗原結合タンパク質は、過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗原結合タンパク質（競合抗原結合タンパク質）は、参照抗原結合タンパク質と同じエピトープに結合する抗原結合タンパク質および立体障害が生じるほど、参照抗原結合タンパク質が結合するエピトープに限りなく近い隣接するエピトープに結合する抗原結合タンパク質を含む。通常、競合抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、競合抗原結合タンパク質は、少なくとも40%、4

10

20

30

40

50

5 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、または75 %、共通抗原への参照抗原結合タンパク質の特異的な結合を阻害するであろう。一部の事例では、結合が、少なくとも80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれを超えて阻害される。

【0082】

本明細書において開示される抗原結合タンパク質、抗体、またはその抗原結合断片は、抗原、例えばそれらが認識するかまたは特異的に結合する標的ポリペプチドのエピトープまたは一部分に関して説明するかまたは特徴付けることができる。例えば、本明細書において開示される抗原結合ポリペプチドまたはその断片の抗原結合ドメインと特異的に相互作用するMark Aの一部は、「エピトープ」である。エピトープは、連続するアミノ酸またはタンパク質の三次フォールディングによって並ぶようになる連続していないアミノ酸の両方から形成することができる。連続するアミノ酸から形成されるエピトープは、変性溶媒への接触に際して典型的に保持されるのに対して、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、変性溶媒による処置に際して典型的に失われる。立体エピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続なセクションで構成され得る。線状エピトープは抗原の連続したアミノ酸配列によって形成される。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基を含んでいてもよく、特定の三次元構造特性および/または特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、ユニークな空間的コンホメーションに少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35のアミノ酸を典型的に含む。エピトープは、当技術分野において知られている方法を使用して決定することができる。

10

20

【0083】

アミノ酸は、本明細書において、その一般に知られている三文字記号によるか、あるいはIUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)が推奨する一文字記号により参照される。ヌクレオチドも同様に、その一般に認められている一文字コードによって参照される。

【0084】

本明細書において使用されるように、用語「ポリペプチド」は、アミド結合(ペプチド結合としても知られている)によって直線的に連結される単量体(アミノ酸)から構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖を指し、特定の長さの産物を指すものではない。本明細書において使用されるように、用語「タンパク質」は、いくつかの実例ではアミド結合以外の結合によって結び付けることができる1つ以上のポリペプチドから構成される分子を包含することが意図される。他方では、タンパク質はまた、単一ポリペプチド鎖とすることができる。この後者の事例では、単一ポリペプチド鎖は、いくつかの実例では、タンパク質を形成するために互いに融合された2つ以上のポリペプチドサブユニットを含むことができる。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」はまた、限定を伴うことなくグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、知られている保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含む発現後修飾の産物も指す。ポリペプチドまたはタンパク質は、天然の生物学的な供給源に由来するかまたは組換え技術によって産生することができるが、示される核酸配列から必ずしも翻訳されるわけではない。ポリペプチドまたはタンパク質は、化学合成によるものを含む任意の方法で生成することができる。

30

40

【0085】

用語「単離」は、本開示の抗原結合タンパク質またはそのような結合タンパク質をコードする核酸が全般的に本開示に従うであろう状態を指す。単離タンパク質および単離核酸は、それらが自然環境またはそのような調製物がインビトロにおいてもしくはインビボにおいて実施される組換えDNA技術によるものである場合にそれらが調製される環境(例えば、細胞培養)において見つけられる、他のポリペプチドまたは核酸など、それらが自然に関連している物質がないかまたは本質的にないであろう。タンパク質および核酸は、

50

希釈剤またはアジュバントと共に製剤されてもよく、なお実質的な目的のために単離されてもよく、例えば、タンパク質は、イムノアッセイで使用するマイクロタイタープレートにコーティングするために使用される場合、ゼラチンまたは他の担体と通常混合されるか、または診断もしくは療法において使用される場合、薬学的に許容可能な担体もしくは希釈剤と混合されるであろう。抗原結合タンパク質は、天然にまたは異種真核細胞（例えば、CHOもしくはNS0（ECACC 85110503）細胞）の系によってグリコシル化されてもよく、またはそれらは非グリコシル化であってもよい（例えば、原核細胞における発現によって産生される場合）。

【0086】

「単離される」ポリペプチド、抗原結合タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、自然界で見つけられない形態のポリペプチド、抗原結合タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離ポリペプチド、抗原結合タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、それらがもはや自然界で見つけられる形態でない程度まで精製されたものを含む。いくつかの実施形態では、単離される抗原結合タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物が本質的に純粋である。

10

【0087】

「組換え」ポリペプチド、タンパク質、または抗体は、組換えDNA技術によって産生されるポリペプチドまたはタンパク質または抗体を指す。宿主細胞で発現する組換え産生ポリペプチド、タンパク質、および抗体は、任意の好適な技術によって分離され、分画され、または部分的もしくは実質的に精製されている天然または組換えポリペプチドと同様に、本開示の目的のために単離されていると見なされる。

20

【0088】

ポリペプチドの断片、変異体、または誘導体およびその任意の組み合わせも本開示に含まれる。用語「断片」は、本開示のポリペプチドおよびタンパク質を指す場合、参照ポリペプチドまたはタンパク質の特性の少なくともいくつかを保持する任意のポリペプチドまたはタンパク質を含む。ポリペプチドの断片は、タンパク分解断片および欠失断片を含む。

【0089】

用語「変異体」は、本明細書において使用されるように、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって親の抗体またはポリペプチド配列と異なる抗体またはポリペプチド配列を指す。本開示の抗体またはポリペプチドの変異体は、アミノ酸置換、欠失、または挿入によりアミノ酸配列が改変された断片およびさらに抗体またはポリペプチドを含む。変異体は、天然に存在し得るかまたは天然に存在し得ない。天然に存在しない変異体は、当技術分野において知られている突然変異誘発技術を使用して産生することができる。変異ポリペプチドは、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失、または追加を含むことができる。

30

【0090】

抗体またはポリペプチドに適用される用語「誘導体」は、天然のポリペプチドまたはタンパク質上に見つけられないさらなる特徴を示すように改変された抗体またはポリペプチドを指す。「誘導体」抗体の1つの例は、第2のポリペプチドもしくは他の分子（例えば、PEGなどのポリマー、発色団、もしくはフルオロフォア）または原子（例えば、放射性同位体）との融合物またはコンジュゲートである。

40

【0091】

用語「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド」は、本明細書において使用されるように、単数の核酸および複数の核酸を包含することが意図され、単離核酸分子または構築物、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）、相補的DNA（cDNA）、またはプラスミドDNA（pDNA）を指す。ある種の態様では、ポリヌクレオチドが、従来のホスホジエステル結合または従来のものではない結合（ペプチド核酸（PNA）で見つけられるものなどのアミド結合）を含む。

【0092】

50

用語「核酸」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えばDNA、cDNA、またはRNA断片を指す。核酸またはポリヌクレオチドに適用される場合、用語「単離」は、その天然の環境から取り出された核酸分子、DNA、またはRNAを指し、例えば、ベクターに含有される抗原結合タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチドは、本開示のために単離されていると見なされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例は、異種宿主細胞中に維持されるかまたは溶液中の他のポリヌクレオチドから精製された（部分的にもしくは実質的に）組換えポリヌクレオチドを含む。単離RNA分子は、本開示のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写物を含む。本開示による単離ポリヌクレオチドまたは核酸は、合成して産生されたそのような分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、または転写終結シグナルなどの調節エレメントを含むことができる。

10

【0093】

本明細書において使用されるように、用語「宿主細胞」は、組換え核酸を有するかまたは有することができる細胞または細胞の集団を指す。宿主細胞は、原核細胞（例えば、大腸菌）またはその代わりに、宿主細胞は、真核生物、例えば真菌細胞（例えば、サッカロミセス・セレビシエ、ピキア・パストリス、もしくは分裂酵母などの酵母細胞）および昆虫細胞（例えば、Sf-9）または哺乳類細胞（例えば、HEK293F、CHO、COS-7、NIH-3T3、NS0マウス骨髄腫細胞、PER.C6（登録商標）ヒト細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、もしくはハイブリドーマ）などの様々な動物細胞とすることができる。

20

【0094】

用語「アミノ酸置換」は、親配列に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えることを指す。アミノ酸は、親配列において、例えば化学的ペプチド合成を用いるか、または当技術分野において公知の組換え方法で置換することができる。従って、「X位での置換」と言う場合、X位に存在するアミノ酸を代替的なアミノ酸残基で置換することを指す。一部の実施形態において、置換パターンは、スキーマAXYに従い記述することができ、ここでAは、天然でX位に存在するアミノ酸に対応する一文字コードであり、Yは置換するアミノ酸残基である。他の態様において、置換パターンはスキーマXYに従い記述することができ、ここでYは、天然でX位に存在するアミノ酸を置換するアミノ酸残基に対応する一文字コードである。

30

【0095】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。従って、ポリペプチドのアミノ酸が同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸に置き換えられる場合、この置換は保存的であると見なされる。別の態様では、一続きのアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順番および/または組成が異なる構造的には同様の一続きによって保存的に置き換えることができる。

40

【0096】

非保存的置換は、(i)電気陽性側鎖を有する残基（例えば、Arg、HisまたはLys）が電気陰性残基（例えば、GluまたはAsp）に代えて、またはそれによって置換されているか、(ii)親水性残基（例えば、SerまたはThr）が疎水性残基（例えば、Ala、Leu、Ile、PheまたはVal）に代えて、またはそれによって置換されているか、(iii)システインまたはプロリンが任意の他の残基に代えて、またはそれによって置換されているか、または(iv)かさ高い疎水性または芳香族側鎖を有

50

する残基（例えば、V a l、H i s、I l eまたはT r p）がより小さい側鎖を有するもの（例えば、A l a、S e r）または側鎖を有しないもの（例えば、G l y）に代えて、またはそれによって置換されているものを含む。

【0097】

当業者は他の置換を容易に特定することができる。例えば、アミノ酸アラニンについて、置換は、D - アラニン、グリシン、 α - アラニン、L - システインおよびD - システインのいずれか1つから選択することができる。リジンについて、置換は、D - リジン、アルギニン、D - アルギニン、ホモアルギニン、メチオニン、D - メチオニン、オルニチン、またはD - オルニチンのいずれか1つであってもよい。概して、単離ポリペプチドの特性の変化を引き起こすと予想し得る機能的に重要な領域の置換は、(i) 極性残基、例えば、セリンまたはスレオニンが疎水性残基、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、またはアラニンに代えて（またはそれによって）置換されるか、(i i) システイン残基が任意の他の残基に代えて（またはそれによって）置換されるか、(i i i) 電気陽性側鎖を有する残基、例えば、リジン、アルギニンまたはヒスチジンが電気陰性側鎖を有する残基、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸に代えて（またはそれによって）置換されるか、または(i v) かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、かかる側鎖を有しないもの、例えばグリシンに代えて（またはそれによって）置換されるものである。前述の非保存的置換の1つがタンパク質の機能特性を変化させ得る可能性はまた、タンパク質の機能的に重要な領域に対する置換の位置にも関連する。従って一部の非保存的置換は、生物学的特性に対する効果をほとんどまたは全く有しない。

10

20

【0098】

用語「アミノ酸挿入」は、親配列に存在する2つのアミノ酸残基間に新規アミノ酸残基を導入することを指す。アミノ酸は、例えば、化学的ペプチド合成を用いるか、または当技術分野において公知の組換え方法で親配列に挿入することができる。従って本明細書で使用されるとき、語句「X位とY位との間への挿入」または「K a b a t X位とY位との間への挿入」（ここでXおよびYはアミノ酸位置に対応する）は（例えば、239位と240位との間へのシステインアミノ酸挿入）、X位とY位との間へのアミノ酸の挿入を指し、また、核酸配列における、X位およびY位のアミノ酸をコードするコドン間への、あるアミノ酸をコードするコドンの挿入も指す。挿入パターンは、スキーマA X i n s に従い記述することができ、ここでAは、挿入されるアミノ酸に対応する一文字コードであり、およびXは挿入前の位置である。

30

【0099】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の「パーセント配列同一性」または「パーセント同一性」という用語は、2つの配列の最適アラインメントのため導入しなければならない付加または欠失（即ちギャップ）を考慮した、比較ウィンドウにわたって配列が共有される同一のマッチ位置の数を指す。マッチ位置は、標的配列と参照配列との両方で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸が提供される任意の位置である。ギャップはヌクレオチドまたはアミノ酸ではないため、標的配列に提供されるギャップはカウントしない。同様に、カウントするのは標的配列のヌクレオチドまたはアミノ酸であり、参照配列のヌクレオチドまたはアミノ酸ではないため、参照配列に提供されるギャップもカウントしない。配列同一性のパーセンテージは、両方の配列に同一のアミノ酸残基または核酸塩基が存在する位置の数を決定してマッチ位置の数を求め、そのマッチ位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除し、その結果に100を乗じて配列同一性パーセンテージを求めることにより計算される。2つの配列間の配列の比較およびパーセント配列同一性の決定は、容易に利用可能なソフトウェアプログラムを用いて達成することができる。好適なソフトウェアプログラムは、様々な供給元から、タンパク質配列およびヌクレオチド配列の両方のアラインメントについて利用可能である。パーセント配列同一性を決定するための1つの好適なプログラムは、米国政府の国立バイオテクノロジー情報センター（N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n）のB L A S Tウェブサイト（b l a s t . n c b i . n l m . n i h . g o v）から

40

50

入手可能なBLASTプログラムスイートの一部であるbl2seqである。bl2seqは、BLASTNまたはBLASTPのいずれかのアルゴリズムを使用して2つの配列間の比較を行う。BLASTNは核酸配列の比較に用いられ、一方、BLASTPはアミノ酸配列の比較に用いられる。他の好適なプログラムは、例えば、EMBOSSバイオインフォマティクスプログラムスイートの一部であって、かつ欧州バイオインフォマティクス研究所(European Bioinformatics Institute: EBI)、www.ebi.ac.uk/Tools/psaからも入手可能なニードル(Needle)、ストレッチャー(Stretcher)、ウォーター(Water)、またはマッチャー(Matcher)である。

【0100】

「特異的な結合メンバー」は、互いに結合特異性を有する分子のペアのメンバーを示す。特異的な結合ペアのメンバーは、天然に由来してもよく、または全体的もしくは部分的に合成して産生されてもよい。分子のペアの一方のメンバーは、その表面上に、あるエリアまたはくぼみを有し、これは、分子のペアの他方のメンバーに特異的に結合し、そのため、その特定の空間的な正反対の構造に対して相補的である。したがって、ペアのメンバーは、互いに特異的に結合する特性を有する。特異的な結合ペアのタイプについての例は、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、受容体-リガンド、酵素-基質である。本開示は、抗原-抗体タイプの反応に関する。

【0101】

本明細書において使用される用語「IgG」は、認められている免疫グロブリンガンマ遺伝子によって実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを指す。ヒトでは、このクラスは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む。マウスでは、このクラスは、IgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3を含む。

【0102】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部またはすべてに特異的に結合し、相補的であるエリアを含む、抗体分子の一部を示す。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の一部分にのみ結合してもよく、この一部は、エピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、1つ以上の抗体可変ドメインによってもたらされてもよい(例えば、VHドメインからなる、いわゆるFd抗体断片)。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域(VL)および抗体重鎖可変領域(VH)を含んでいてもよい。

【0103】

用語「抗原結合タンパク質断片」または「抗体断片」は、インタクトな抗原結合タンパク質または抗体の一部分を指し、インタクトな抗原結合タンパク質または抗体の抗原決定可変領域を指す。当技術分野において、抗体の抗原結合機能が完全長抗体の断片によって果たされ得ることは公知である。抗体断片の例としては、限定はされないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、線状抗体、一本鎖抗体、および抗体断片で形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0104】

用語「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基またはエピトープの高度に特異的な認識および結合に関与する均質な抗体集団を指す。これは、典型的には異なる抗原決定基に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体と対照的である。用語「モノクローナル抗体」は、インタクトなモノクローナル抗体および完全長モノクローナル抗体の両方、ならびに抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど)、単鎖(scFv)突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、限定はされないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物によることを含めた、任意の方法で作製されたかかると抗体を指す。

【0105】

用語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体、または当技術分野において公知の任意の技法を用いて作製されるヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有

10

20

30

40

50

する抗体を指す。ヒト抗体のこの定義には、インタクトなまたは完全長の抗体、その断片、および／または少なくとも1つのヒト重鎖および／または軽鎖ポリペプチドを含む抗体、例えば、マウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などが含まれる。用語「ヒト化抗体」は、最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含むように改変された非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンに由来する抗体を指す。

【0106】

用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、親和性、および能力を有する哺乳動物の1つの種（例えば、マウス、ラット、ウサギ等）に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域が、別の種（通常はヒト）に由来する抗体の配列と同種であり、その種における免疫応答の誘発が回避される。

10

【0107】

用語「抗体結合部位」は、相補的な抗体が特異的に結合する連続または不連続な部位（すなわちエピトープ）を含む抗原（例えば、MrkA）内の領域を指す。したがって、抗体結合部位は、抗原内に、エピトープを越えた、結合親和性および／または安定性などの特性を決定し得るかまたは抗原酵素活性または二量化などの特性に影響を与え得る追加的な範囲を含み得る。したがって、2つの抗体が抗原内の同じエピトープに結合する場合であっても、抗体分子がエピトープ外のアミノ酸との個別的な分子間接触を確立する場合、かかる抗体は個別的な抗体結合部位に結合すると見なされる。

20

【0108】

Kabat付番方式は、概して、可変ドメインの残基（およそ軽鎖の残基1～107および重鎖の残基1～113）を参照するときに用いられる（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

【0109】

語句「Kabatにある通りのアミノ酸位置付番」、「Kabat位置」、およびその文法上の変化形は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)における抗体の編成の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに用いられる付番方式を指す。この付番方式を用いると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFWまたはCDRの短縮、またはそれへの挿入に対応するより少ないかまたは追加的なアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入（Kabatによる残基52a）を含み、および重鎖FW残基82の後に挿入された残基（例えば、Kabatによる残基82a、82b、および82c等）を含み得る。

30

【0110】

残基のKabat付番は、所与の抗体について、相同性領域において抗体の配列を「標準」Kabat付番配列とアラインメントすることにより決定し得る。Chothiaは、その代わりに構造ループの位置を参照する（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。Kabat付番規則を用いて付番したときのChothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32～H34で異なる（これは、Kabat付番スキームがH35AおよびH35Bに挿入を置くためであり、35Aも35Bも存在しない場合、ループは32で終わり、35Aのみが存在する場合、ループは33で終わり、35Aおよび35Bの両方が存在する場合、ループは34で終わる）。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとの妥協案に相当し、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアによって用いられている。CDRのIMGT（LeFranc, M. - P. et al. Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 (20

40

50

03))分類も使用することができる。

【0111】

用語「Kabat中のEUインデックス」は、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)において記載されるヒトIgG1 EU抗体の付番方式を指す。本出願で参照されるアミノ酸の位置はすべてEUインデックスの位置を指す。例えば、「L234」および「EU L234」は共に、Kabatに示されるEUインデックスに従って234位のアミノ酸ロイシンを指す。

【0112】

10

本明細書において使用される用語「Fcドメイン」、「Fc領域」、および「IgG Fcドメイン」は、IgG分子のパパイン消化によって得られる結晶化可能断片に対応する、免疫グロブリン、例えばIgG分子の一部を指す。Fc領域は、ジスルフィド結合によって連結される、IgG分子の2つの重鎖のC末端半分を含む。それは、抗原結合活性を有していないが、炭水化物成分ならびに補体およびFcRn受容体を含むFc受容体に対する結合部位を含有する。例えば、Fcドメインは、第2の定常ドメインCH2(ヒトIgG1のEU231~340位の残基)および第3の定常ドメインCH3(ヒトIgG1のEU341~447位の残基)全体を含有する。

【0113】

20

Fcとは、独立してこの領域を指し得るか、または抗体、抗体断片、もしくはFc融合タンパク質に関連してこの領域を指し得る。多型は、EU270、272、312、315、356、および358位を含むが、これらに限定されない、Fcドメイン中の多くの位置に観察される。したがって、「野生型IgG Fcドメイン」または「WT IgG Fcドメイン」は、任意の天然に存在するIgG Fc領域(すなわち任意の対立遺伝子)を指す。数限りないFc突然変異体、Fc断片、Fc変異体、およびFc誘導体が、例えば米国特許第5,624,821号明細書;米国特許第5,885,573号明細書;米国特許第5,677,425号明細書;米国特許第6,165,745号明細書;米国特許第6,277,375号明細書;米国特許第5,869,046号明細書;米国特許第6,121,022号明細書;米国特許第5,624,821号明細書;米国特許第5,648,260号明細書;米国特許第6,528,624号明細書;米国特許第6,194,551号明細書;米国特許第6,737,056号明細書;米国特許第7,122,637号明細書;米国特許第7,183,387号明細書;米国特許第7,332,581号明細書;米国特許第7,335,742号明細書;米国特許第7,371,826号明細書;米国特許第6,821,505号明細書;米国特許第6,180,377号明細書;米国特許第7,317,091号明細書;米国特許第7,355,008号明細書;米国特許出願公開第2004/0002587号明細書;ならびに国際公開第99/058572号パンフレット、国際公開第2011/069164号パンフレット、および国際公開第2012/006635号パンフレットにおいて記載される。

30

【0114】

40

ヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4の重鎖の配列は、多くの配列データベースにおいて、例えばUniProtデータベース(www.uniprot.org)でそれぞれ受託番号P01857(IHHG1_HUMAN)、P01859(IHHG2_HUMAN)、P01860(IHHG3_HUMAN)、およびP01861(IHHG1_HUMAN)の下で見つけることができる。

【0115】

用語「YTE」または「YTE突然変異体」は、ヒトFcRnへの結合の増加をもたらす、かつ突然変異を有する抗体の血清半減期を改善するIgG1 Fcドメイン中の突然変異のセットを指す。YTE突然変異体は、IgGの重鎖中に導入される3つの「YTE突然変異」の組み合わせ:M252Y、S254T、およびT256Eを含み、付番は、KabatのEUインデックスに従う。参照により本明細書に援用される米国特許第7,

50

658, 921号明細書を参照されたい。YTE突然変異体は、同じ抗体の野生型バージョンと比較して、抗体の血清半減期を増加させることが示された。例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用されるDall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24(2006)および米国特許第7,083,784号明細書を参照されたい。「Y」突然変異体は、M256Y突然変異のみを含み、同様に、「YT」突然変異は、M252YおよびS254Tのみを含み、「YE」突然変異は、M252YおよびT256Eのみを含む。他の突然変異がEU252位および/または256位に存在してもよいことが明確に企図される。特定の態様では、EU252位の突然変異が、M252F、M252S、M252W、もしくはM252Tであってもよく、および/またはEU256位の突然変異が、T256S、T256R、T256Q、もしくはT256Dであってもよい。

10

【0116】

用語「天然に存在するMrkA」は、一般に、MrkAタンパク質またはその断片が存在し得る状態を指す。天然に存在するMrkAは、組換え技術を使用するコード核酸の導入なしで、細胞によって天然に産生されるMrkAタンパク質を意味する。したがって、天然に存在するMrkAは、天然に、例えば肺炎桿菌によって産生されるものであってもよく、および/またはクレブシエラ属の様々なメンバーから単離されるものであってもよい。

【0117】

用語「組換えMrkA」は、MrkAタンパク質またはその断片が存在してもよい状態を指す。組換えMrkAは、組換えDNAにより、例えば異種宿主において産生されるMrkAタンパク質またはその断片を意味する。組換えMrkAは、グリコシル化によって天然に存在するMrkAと異なってもよい。

20

【0118】

原核生物の細菌発現系において発現される組換えタンパク質は、グリコシル化されないが、哺乳類細胞または昆虫細胞などの真核生物の系において発現されるものは、グリコシル化される。昆虫細胞において発現されるタンパク質は、しかしながら、哺乳類細胞において発現されるタンパク質とグリコシル化において異なる。

【0119】

本明細書において使用される用語「半減期」または「インビボにおける半減期」は、所与の動物の血液循環中の本開示の特定のタイプの抗体、抗原結合タンパク質、またはポリペプチドの生物学的半減期を指し、動物に投与された量の半分が動物の血液循環および/または他の組織から取り除かれるのに必要とされる時間によって示される。

30

【0120】

本明細書において使用される用語「対象」は、限定はされないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、雌ウシ、クマ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含めた、特定の治療のレシピエントとなる任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。本明細書において使用される用語「対象」および「患者」は、クレブシエラ感染症に関連する状態の診断、予後診断、または療法のための任意の対象、特に哺乳類対象を指す。本明細書において使用されるように、「クレブシエラ感染症に関連する状態を有する患者」などの語句は、クレブシエラ感染症に関連するその状態のための療法の投与、画像処理手順もしくは他の診断手順、および/または予防的治療から利益を得るであろう哺乳類対象などの対象を含む。

40

【0121】

「クレブシエラ」は、腸内細菌科のグラム陰性条件的嫌気性桿菌の属を指す。クレブシエラは、例えば肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、およびK. グラニュロマトリスを含む。

【0122】

クレブシエラ属のメンバーは、典型的に、それらの細胞表面上に2つのタイプの抗原：O抗原およびK抗原を発現する。O抗原はリボ多糖であり、K抗原は莢膜多糖である。こ

50

これらの抗原の構造のばらつきは、抗原をクレブシエラ「血清型」に分類するための基準となる。したがって、Mrk A 結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合断片）が、複数の血清型に結合する能力は、様々なO抗原および/またはK抗原を有するクレブシエラに結合するその能力を指す。

【0123】

本明細書において使用される用語「医薬組成物」は、活性成分の生物学的活性が有効となるのを可能にするような形態の調製物であって、その組成物を投与しようとする対象にとって許容できない毒性がある追加的な構成成分を含有しない調製物を指す。そのような組成物は無菌とすることができる。

【0124】

ポリペプチド、例えば、本明細書において開示される抗原結合タンパク質（抗体もしくはその抗原結合断片を含む）、Mrk A ポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドの「有効量」は、特に記載される目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、記載される目的に関して実験的に常法で決定することができる。本明細書において使用される用語「治療有効量」は、対象または哺乳類における疾患または状態を「治療する」のに有効である、ポリペプチド、例えば抗体を含む抗原結合タンパク質または他の薬剤の量を指し、クレブシエラ媒介性の疾患または状態を有する対象に対していくらかの改善または有益性をもたらす。したがって、「治療有効」量は、クレブシエラ媒介性の疾患または状態の、少なくとも1つの臨床症状におけるいくらかの軽減、緩和、および/または減少をもたらす量である。本開示の方法および系によって治療することができる、クレブシエラ媒介性の疾患または状態に関連する臨床症状は、当業者によく知られている。さらに、当業者は、いくらかの有益性が対象に対してもたらされる限り、治療効果が完全であるかまたは根治的である必要がないことを十分に理解するであろう。いくつかの実施形態では、用語「治療有効」は、それを必要としている患者においてMrk A 活性を低下させることができる治療剤の量を指す。投与される実際の量ならびに投与の速度および時間的経過は、治療されているものの性質および重症度に依存するであろう。治療についての処方せん、例えば投薬量に関する決定などは、開業医および他の医師の責任の範囲内にある。抗体およびその抗原結合断片の適切な用量は、当技術分野においてよく知られている。Ledermann J. A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659 - 664; Bagshawe K. D. et al. (1991) Antibody, Immunoc conjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915 - 922を参照されたい。

【0125】

本明細書において使用されるように、「十分な量」またはクレブシエラ媒介性の疾患または状態を有する患者において特定の結果を実現する「のに十分な量」は、任意選択で治療効果である、所望の効果をもたらすのに有効である、治療剤（例えば、本明細書において開示される抗体を含む抗原結合タンパク質）の量を指す（すなわち治療有効量の投与によるもの）。いくつかの実施形態では、そのような特定の結果が、それを必要としている患者におけるMrk A 活性の低下である。

【0126】

本明細書において使用される用語「標識」は、「標識」ポリペプチドまたは抗体を生成するために、ポリペプチド、例えば抗体を含む抗原結合タンパク質に直接または間接的にコンジュゲートされる検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的改変を触媒することができる。

【0127】

「治療する」または「治療」または「治療すること」または「軽減する」または「軽減すること」または「回復させること」または「回復させる」などの用語は、診断された病的状態または障害を治癒し、減速させ、その症状を和らげ、および/またはその進行を止

10

20

30

40

50

める治療手段を指す。「予防する」などの用語は、標的にされる病的状態または障害の発症を予防しかつ／または遅らせる予防または防止手段を指す。したがって、治療を必要としている人は、疾患または状態をすでに有している人を含む。予防を必要としている人は、疾患または状態を起こしやすい人および疾患または状態を予防すべき人を含む。例えば、語句「クレブシエラ媒介性の疾患または状態を有する患者を治療する」は、好ましくは、対象がもはやそれによって不快感および／または機能異常を被らない程度まで、クレブシエラ媒介性の疾患または状態の重症度を低下させることを指す（例えば、未治療患者と比較した場合の喘息増悪における相対的な低下）。語句「クレブシエラ媒介性の疾患または状態を予防する」は、クレブシエラ媒介性の疾患もしくは状態の可能性を低下させることおよび／またはクレブシエラ媒介性の疾患もしくは状態の発生を低下させることを指す。

10

【0128】

MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドの「免疫学的有効量」は、クレブシエラに対する対象自身の免疫応答を増強するのに十分な量である。誘導される免疫のレベルは、例えば、中和分泌抗体および／または血清抗体の量を測定することにより、例えば補体結合、酵素結合免疫吸着、血清殺菌アッセイ、オプソニン作用による死滅アッセイ、またはバイオフィルム形成阻害アッセイによりモニターすることができる。

【0129】

用語「免疫原性断片」は、単独でまたは任意選択で適したアジュバントと共に対象に投与された場合に免疫応答を生成する（すなわち、免疫原性活性を有する）断片を意味する。

20

【0130】

本発明による「ワクチン」組成物は、その免疫活性切断型、一部分、断片、およびセグメントを含むMrkAまたはその免疫活性切断型、一部分、断片、およびセグメントを含むMrkAをコードするポリヌクレオチドの免疫有効量をその任意のおよびすべての活性な組み合わせで含む組成物であり、前記ポリペプチドまたは活性断片または断片またはポリヌクレオチドは、適した希釈剤または賦形剤をすべて含む薬理学的に許容可能な担体中に懸濁される。

【0131】

本明細書において使用されるように、「免疫応答」は、これらに限定されないが抗体および／またはT細胞の産生に通常特徴付けられる、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドの導入に対する対象における応答を指す。通常、免疫応答は、クレブシエラに対して特異的である、CD4+T細胞もしくはCD8+T細胞もしくはその両方の誘導もしくは活性化などの細胞応答、抗クレブシエラ抗体の産生の増加といった体液性応答、または細胞応答および体液性応答の両方であってもよい。免疫応答はまた、粘膜応答、例えば粘膜抗体応答、例えばS-IgA産生または粘膜細胞媒介性応答、例えばT細胞応答を含むこともできる。

30

【0132】

「防御免疫応答」は、対象がクレブシエラに暴露された場合に防御する、対象によって示される免疫応答を指す。いくつかの実例では、クレブシエラがなお感染症を引き起こす場合があるが、クレブシエラは、重篤な感染症を引き起こすことができない。典型的に、防御免疫応答は、インピトロおよびインピボにおいてクレブシエラを中和することができる、検出可能なレベルの、宿主から生じる血清および抗体をもたらす。

40

【0133】

用語「アジュバント」は、（１）特定の抗原に対する免疫応答を改変するかもしくは増加させるか、または（２）薬理学的作用物質の効果を増加させるかもしくは支援する能力を有する任意の物質を指す。本明細書において使用されるように、本明細書において提供されるMrkAポリペプチドまたはその免疫原性断片の発現、抗原性、または免疫原性を

50

増加させ得る任意の化合物は、有望なアジュバントである。

【0134】

本明細書において使用されるように、用語「クレブシエラ感染症に関連する状態」は、疾患または状態を有する対象における、クレブシエラ感染症（例えば、肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、および/またはK. グラニューロマトリスによる感染症）によって引き起こされる（単独もしくは他の媒介物質と共同して）、それによって悪化するか、それに関連するか、またはそれによって長引く任意の病態を指す。クレブシエラ感染症に関連する状態の非限定的な例は、肺炎、尿路感染症、敗血症、新生児敗血症、下痢、軟部組織感染症、臓器移植後の感染症、外科手術による感染症、創傷感染症、肺感染症、化膿性肝膿瘍、眼内炎、髄膜炎、壊死性髄膜炎、強直性脊椎炎、および脊椎関節症を含む。いくつかの実施形態では、クレブシエラ感染症が、院内感染症である。いくつかの実施形態では、クレブシエラ感染症が、日和見感染症である。いくつかの実施形態では、クレブシエラ感染症が、臓器移植の結果として生じる。いくつかの実施形態では、対象が、例えば人工呼吸器、カテーテル、または静脈内カテーテルを含む、クレブシエラに汚染された医療デバイスに暴露される。

10

【0135】

C D RまたはC D Rのセットを有する構造は、一般に、C D RまたはC D Rのセットは、再編成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる天然に存在するV HおよびV L抗体可変ドメインのC D RまたはC D Rのセットに対応する位置に位置する抗体の重鎖配列もしくは軽鎖配列またはその実質的な一部分でできているであろう。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、（参照により本明細書において援用されるK a b a t , E . A . e t a l , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 4 t h E d i t i o n , U S D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , 1 9 8 7およびその最新版、現在はインターネットで入手可能（<http://immunobme.nwu.edu>）または任意の検索エンジンを使用して「K a b a t」を検索）を参照することによって決定されてもよい。C D Rはまた、フィブロネクチンまたはシトクロムBなどの他の足場によって運ぶこともできる。

20

【0136】

C D Rアミノ酸配列は、実質的に本明細書において説明されるように、ヒト可変ドメインまたは実質的なその一部分中にC D Rとして有することができる。H C D R 3配列は、実質的に本明細書において説明されるように、本開示の実施形態を示し、これらのそれぞれは、ヒト重鎖可変ドメインまたは実質的なその一部分中にH C D R 3として担持され得る。

30

【0137】

本開示において用いられる可変ドメインは、任意の生殖系もしくは再編成されたヒト可変ドメインから得ることができるか、または知られているヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づいた合成可変ドメインとすることができる。C D R配列（例えば、C D R 3）は、組換えDNA技術を使用して、C D R（例えば、C D R 3）を欠く可変ドメインのレパートリーに導入することができる。

40

【0138】

例えば、M a r k s e t a l . (B i o / T e c h n o l o g y , 1 9 9 2 , 1 0 : 7 7 9 - 7 8 3 ; 参照により本明細書に援用される) は、可変ドメインエリアの5'末端に向けられるかまたはそれに近接するコンセンサスプライマーが、C D R 3を欠くV H可変ドメインのレパートリーをもたらすために、ヒトV H遺伝子の第3のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと共に使用される、抗体可変ドメインのレパートリーを産生する方法を提供する。M a r k s e t a l . は、このレパートリーを特定の抗体のC D R 3と組み合わせることができる方法をさらに記載する。類似した技術を使用して、本開示のC D R 3由来の配列を、C D R 3を欠くV HまたはV Lドメインのレパートリーとシャッフルすることができ、シャッフルして完成したV HまたはV Lドメインを

50

、抗原結合タンパク質をもたらすために、同種のV LまたはV Hドメインと組み合わせることができる。次いで、レパートリーは、適した抗原結合タンパク質が選択されるために、国際公開第92/01047号パンフレットのファージディスプレイ系またはKay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Pressを含む、それに続く多くの文献のいずれかなどの適した宿主系においてディスプレイすることができる。レパートリーは、104以上のいずれの個々のメンバーからも、例えば106~108または110のいずれのメンバーからなることができる。他の適した宿主系は、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、T7ディスプレイ、リボソームディスプレイなどを含む。リボソームディスプレイの概説については、本明細書において参照により援用されるLowe D and Jermutus L, 2004, Curr. Pharm. Biotech, 517-27、さらに国際公開第92/01047号パンフレットを参照されたい。

10

【0139】

類似したシャッフリング技術またはコンビナトリアル技術はまた、Stemmer (本明細書において参照により援用されるNature, 1994, 370:389-391) によっても開示され、Stemmerは、 λ -ラクターゼ遺伝子に関しての技術を記載しているが、このアプローチが抗体の生成に使用されてもよいことを述べている。

20

【0140】

さらなる代案は、可変ドメイン全体において突然変異を生成するために、1つ以上の選択されたV Hおよび/またはV L遺伝子のランダム突然変異誘発を使用して、本開示のCDR由来の配列を有する新規なV HまたはV L領域を生成することである。そのような技術は、エラーブローンPCRを使用したGram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580) によって記載される。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのアミノ酸置換が、HCDRおよび/またはLCDRのセット内でなされる。

【0141】

使用されてもよい他の方法は、V HまたはV L遺伝子のCDR領域に対して突然変異誘発を誘導することである。そのような技術は、Barbas et al, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) およびSchier et al (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567) によって開示される。

30

【0142】

本開示の方法および技術は、別段の指示がない限り、当技術分野においてよく知られており、本明細書の全体にわたって引用され、考察される様々な全般的なおよびより詳細な参考文献において記載される従来する方法に従って全般的に実行される。例えば、すべて本明細書において参照により援用されるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) を参照されたい。

40

【0143】

当業者は、当技術分野におけるルーチン的な手法を用いて、本開示の抗原結合タンパク質、MrkAポリペプチド、およびその免疫原性断片を提供するために上記に記載されるそのような技術を使用することができるであろう。

50

【0144】

II. MrkA 結合分子

本開示は、MrkA、例えばクレブシエラMrkAに特異的に結合するMrkA結合分子、例えば抗体、抗原結合タンパク質、およびその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、MrkA結合分子、例えば抗体、抗原結合タンパク質、およびその抗原結合断片が、肺炎桿菌MrkAに特異的に結合する。MrkA結合分子は、「MrkA結合分子」、「MrkA結合タンパク質」、または「MrkA結合剤」と本明細書において同義的に指される。

【0145】

MrkAについての完全長アミノ酸配列および完全長ヌクレオチド配列は、当技術分野において知られている（例えば、肺炎桿菌MrkAについてのUniProt Acc. No. B6S767または大腸菌MrkAについてのUniProt Acc. No. B0ZDW4を参照されたい。共にそれらの全体が参照により本明細書に援用される）。本明細書において使用されるように、用語「肺炎桿菌MrkA」は、図2Dにおいて示されるアミノ酸配列を指す（配列番号17）。肺炎桿菌分離株は、共通して、2つの線毛アドヘシン、1型および3型フィンブリアを発現する。1型フィンブリアは、肺炎桿菌コロニー形成およびバイオフィーム形成の促進に関係するが、3型フィンブリアは、生物および非生物表面上のバイオフィーム形成を媒介し、成熟したバイオフィームの成長に必要とされる。3型フィンブリアの様々な構成成分は、mrkABCDFOペロンによってコードされ、これは、主なピリンサブユニットMrkA、シャペロンMrkB、外膜アッシャーMrkC、アドヘシンMrkDおよびMrkFを産生する。Yang et al. PLoS One. 2013 Nov 14; 8(11): e79038を参照されたい。肺炎桿菌3型フィンブリアは、集まってヘリックス状のフィラメントになるMrkAピリンから主として構成される。3型フィンブリアは、MrkAタンパク質から構成される線毛の軸と結合するMrkDアドヘシンを使用して、標的組織への結合を媒介する。Langstraat et al., Infect Immun. 2001 Sep; 69(9): 5805-5812を参照されたい。クレブシエラの宿主細胞粘着およびバイオフィーム形成は、そのようなMrkAピリンによって媒介される。その全体が参照により本明細書に援用されるChan et al., Langmuir 28: 7428-7435(2012)を参照されたい。

【0146】

いくつかの実施形態では、本開示は、MrkAに特異的に結合する抗体またはポリペプチドである単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が、MrkAに特異的に結合する抗体の抗原結合断片である。

【0147】

ある実施形態では、MrkA結合分子が抗体またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、本開示は、MrkAに特異的に結合するマウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、リサーフェシング、またはヒト抗原結合タンパク質であるその単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、MrkA結合分子がヒト化抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、MrkA結合分子がヒト抗体またはその抗原結合断片である。

【0148】

本開示は、MrkAに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む）が、a) 少なくとも2つの肺炎桿菌（K. pneumoniae）血清型に結合するか、b) 肺炎桿菌のオプソニン作用による死滅（OPK）を誘導するか、またはc) 少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合し、かつ肺炎桿菌のOPKを誘導する。

【0149】

いくつかの実施形態では、本開示は、O1:K2、O1:K79、O2:K28、O2

10

20

30

40

50

a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも3つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも4つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも5つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも6つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも7つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも8つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも9つの肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも10の肺炎桿菌血清型に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、表5に列挙される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の肺炎桿菌の血清型に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）を提供する。

【0150】

いくつかの実施形態では、本開示は、肺炎桿菌血清型 O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 : K 2 8、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 に結合する単離抗原結合タンパク質を提供する。

【0151】

本開示は、例えば肺炎桿菌を含むクレブシエラの O P K を誘導する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、O 3 : K 1 1、O 3 : K 2 5、O 4 : K 1 5、O 5 : K 6 1、O 7 : K 6 7、および O 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも1つの肺炎桿菌血清型において O P K を誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、O 1 : K 2、O 1 : K 7 9、O 2 a : K 2 8、O 5 : K 5 7、O 3 : K 5 8、

○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも2つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも3つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも4つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも5つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも6つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも7つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも8つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも9つの肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 からなる群から選択される少なくとも10の肺炎桿菌血清型においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 1 5 2 】

いくつかの実施形態では、本開示は、肺炎桿菌血清型○ 1 : K 2、○ 1 : K 7 9、○ 2 a : K 2 8、○ 5 : K 5 7、○ 3 : K 5 8、○ 3 : K 1 1、○ 3 : K 2 5、○ 4 : K 1 5、○ 5 : K 6 1、○ 7 : K 6 7、および○ 1 2 : K 8 0 においてOPKを誘導する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供する。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態では、本開示は、MrkAに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、a) 少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合すること、b) インビトロにおいて少なくとも1つまたは2つの肺炎桿菌血清型のOPKを誘導すること、c) マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて細菌の負担を低下させること、およびd) マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて延命効果を与えることからなる群から選択される、少なくとも1つの特性を有する。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態では、本開示は、MrkAに特異的に結合する単離抗原結合タンバ

ク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、a）少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合すること、b）インビトロにおいて少なくとも1つまたは2つの肺炎桿菌血清型の O P K を誘導すること、c）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて細菌の負担を低下させること、および d）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて延命効果を与えることからなる群から選択される、少なくとも2つの特性を有する。

【0155】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、a）少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合すること、b）インビトロにおいて少なくとも1つまたは2つの肺炎桿菌血清型の O P K を誘導すること、c）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて細菌の負担を低下させること、および d）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて延命効果を与えることからなる群から選択される、少なくとも3つの特性を有する。

【0156】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、a）少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合し、b）インビトロにおいて少なくとも1つまたは2つの肺炎桿菌血清型の O P K を誘導し、c）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて細菌の負担を低下させ、および d）マウスクレブシエラ感染症モデルにおいて延命効果を与える。

【0157】

本明細書において開示される M r k A 結合タンパク質は、M r k A 抗体 K p 3 および K p 1 6 ならびにその抗原結合断片を含む。本明細書において開示される M r k A 結合タンパク質はまた、M r k A 抗体クローン1、クローン4、クローン5、およびクローン6ならびにその抗原結合断片も含む。本開示の M r k A 結合タンパク質はまた、K p 3 または K p 1 6 と同じ M r k A エピトープに特異的に結合する M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）も含む。本開示の M r k A 結合タンパク質はまた、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6と同じ M r k A エピトープに特異的に結合する M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）も含む。いくつかの実施形態では、本開示は、オリゴマー M r k A に結合する単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）を提供する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が単量体 M r k A に結合しない。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が単量体 M r k A に結合する（例えば、クローン1、クローン1の6つの C D R もしくは V H および V L を含有する抗体もしくはその抗原結合断片、またはクローン1と同じエピトープに結合するか、もしくは M r k A へのクローン1の結合を競合的に阻害する抗体もしくはその抗原結合断片）。

【0158】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）が配列番号17のアミノ酸1～40および171～202内のエピトープに結合する。

【0159】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）が、配列番号17において示される M r k A 配列に結合するが、配列番号17のアミノ酸1～40を欠く M r k A （すなわち配列番号26）に結合しない。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が、配列番号17において示される M r k A 配列に結合するが、配列番号17のアミノ酸171～202を欠く M r k A （すなわち配列番号27）に結合しない。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断

片)が、配列番号17において示されるMrkA配列に結合するが、配列番号17のアミノ酸1~40および171~202を欠くMrkA(すなわち配列番号28)に結合しない。

【0160】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片)がMrkA(配列番号17)に特異的に結合するが、配列番号26または配列番号27のいずれにも結合しない。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片)がMrkA(配列番号17)に特異的に結合するが、配列番号26~28のいずれにも結合しない。

【0161】

MrkA結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片)はまた、MrkAへのKp3またはKp16の結合を競合的に阻害するMrkA結合タンパク質も含む。MrkA結合タンパク質(例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片)はまた、MrkAへのクローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害するMrkA結合タンパク質も含む。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいてMrkAへのKp3またはKp16の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいてMrkAへのクローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌へのKp3またはKp16の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌へのクローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌株29011へのKp3またはKp16の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌株29011へのクローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌株961842へのKp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて肺炎桿菌株985048へのKp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6の結合を競合的に阻害する。

【0162】

いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも20%、MrkAへの $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも25%、MrkAへの $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも30%、MrkAへの $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。

【0163】

いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも20%、肺炎桿菌への $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも25%、肺炎桿菌への $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗MrkA抗体またはその抗原結合断片が競合ELISAアッセイにおいて少なくとも30%、肺炎桿菌への $1\mu\text{g}$ Kp3の結合を減少させる。

【0164】

いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片が競合 E L I S A アッセイにおいて少なくとも 20 %、肺炎桿菌株 29011 への $1\mu\text{g}$ K p 3 の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片が競合 E L I S A アッセイにおいて少なくとも 25 %、肺炎桿菌株 29011 への $1\mu\text{g}$ K p 3 の結合を減少させる。いくつかの実施形態では、 10^2 倍過剰の抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片が競合 E L I S A アッセイにおいて少なくとも 30 %、肺炎桿菌株 29011 への $1\mu\text{g}$ K p 3 の結合を減少させる。

【0165】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）がクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

10

【0166】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）が少なくとも 25 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 30 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 40 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 50 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 55 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 60 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 25 % ~ 約 65 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 50 % ~ 約 60 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

20

30

【0167】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で少なくとも 25 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で少なくとも 25 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で少なくとも 25 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

【0168】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で少なくとも 50 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で少なくとも 60 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

40

【0169】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で約 25 % ~ 約 65 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タ

50

ンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で約 5 0 % ~ 約 6 0 % だけクレブシエラバイオフィルム形成を阻害するかまたは低下させる。

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）がクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。

【 0 1 7 1 】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 2 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 3 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が少なくとも 4 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 2 0 % ~ 約 5 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 4 0 % ~ 約 5 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、

10

20

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で少なくとも 2 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で少なくとも 3 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で少なくとも 4 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で約 2 0 % ~ 約 5 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、クレブシエラ上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。いくつかの実施形態では、M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）が約 1 0 μ g / m l の濃度で約 4 0 % ~ 約 5 0 % だけクレブシエラ細胞粘着（例えば、上皮細胞粘着）を阻害するかまたは低下させる。

30

【 0 1 7 3 】

M r k A 結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片）はまた、K p 3、K p 1 6、クローン 1、クローン 4、クローン 5、またはクローン 6 の重鎖および軽鎖相補性決定領域（C D R）配列を含む M r k A 結合タンパク質も含む。K p 3、K p 1 6、クローン 1、クローン 4、クローン 5、およびクローン 6 の C D R 配列は、下記の表 1 および 2 に示される。

40

【 0 1 7 4 】

【表 1】

表 1.可変重鎖 CDR アミノ酸配列

抗体	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Kp3	SNSNTYYWG (配列番号 1)	TIHSSGRTYYNPSLKS (配列番号 2)	DLSGASLAPRRPFNYYY YNMDV (配列番号 3)
Kp16	TYYMH (配列番号 4)	MINPSSGSTIYAQPFRG (配列番号 5)	GNYGSSFGY (配列番号 6)
St1_C1 "クローン 1"	SYAVH (配列番号 29)	GINGGNGNTRISQRFQD (配列番号 30)	ADDCSGVGCHPWFD (配列番号 31)
St2_C4 "クローン 4"	NANWWS (配列番号 32)	EIYHSGTTYYNPSLKS (配列番号 33)	DRDITSRGTFDV (配列番号 34)
St3_C5 "クローン 5"	AYYMH (配列番号 35)	WINPSSGGTNSAQKFQG (配列番号 36)	GTIGAAGNY (配列番号 37)
St4_C6 "クローン 6"	SYAVH (配列番号 38)	GVNGGNGNTRFSQKFQD (配列番号 39)	ADDCSGVGCHPWFD (配列番号 40)

10

【 0 1 7 5 】

【表 2】

表 2.可変軽鎖 CDR アミノ酸配列

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Kp3	RSSQSLVYSDGNTYLN (配列番号 7)	KVSNRDS (配列番号 8)	MQGTHWPPIT (配列番号 9)
Kp16	SGSSSNIGSNTVN (配列番号 10)	NNNQRP (配列番号 11)	AAWDDSLNGVV (配列番号 12)
St1_C1 "クローン 1"	SGDKLGDKYVS (配列番号 41)	KDTKRPS (配列番号 42)	QAWDRSIMI (配列番号 43)
St2_C4 "クローン 4"	RASEGIYHWLA (配列番号 44)	KASSLAS (配列番号 45)	QQYSNYPLT (配列番号 46)
St3_C5 "クローン 5"	SGSRPNIGGNTVN (配列番号 47)	SNSQRPS (配列番号 48)	AAWDDSLTGVP (配列番号 49)
St4_C6 "クローン 6"	SGDKLGDKYTS (配列番号 50)	QDTKRPS (配列番号 51)	QAWDSDSGTAT (配列番号 52)

20

30

【 0 1 7 6 】

本明細書において記載される抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）は、本明細書において記載される個々の可変軽鎖または可変重鎖の 1 つを含むことができる。本明細書において記載される抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）はまた、可変軽鎖および可変重鎖の両方を含むこともできる。抗 M r k A K p 3、K p 1 6、クローン 1、クローン 4、クローン 5、およびクローン 6 抗体の可変軽鎖配列および可変重鎖配列は、下記の表 3 および 4 に提供される。

40

【 0 1 7 7 】

【表 3】

表 3:可変重鎖アミノ酸配列

抗体	VH アミノ酸配列(配列番号)
Kp3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSMNSNSNTYYWGWRQPPGKGLEWIGTIH SSGRYYNPSLKSRTISVDMSKNQFSLNLTSAADTAVYYCARDLSGASLAPRR PFNYYYYNMDVWGRGTLTVSS (配列番号 13)
Kp16	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYALTTYMHVVRQAPGQGLQWMGMIN PSSGSTIYAQPFRGRVTLTRDTSSGTVFMDLSSLTSEDTAIYYCARGNYGSSFGYW GKGTMVTVSS (配列番号 14)
St1_C1 "クローン 1"	QVQLVQSGAEVRKPGASVTVFCRTSGYIFTSYAVHWVRQAPGQGLEWMGGINGG NGNTRISQRFQDRLMITRDRSANTASMELRSLTSEDTAIYYCARADDCSGVGCHP WFDWPWGRGTLTVSS (配列番号 53)
St2_C4 "クローン 4"	QLQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGDSIDNANWWSVVRQTPGKGLEWIGEIIYHS GTTYNPSLKSRTISIDNSKNQFSLALTSVTAADTAVYYCARDRDRITSRGTFDQW GRGTMVTVSS (配列番号 54)
St3_C5 "クローン 5"	QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCASGYTFTAYMHVVRQAPGHGLEWMGWINP SSGGTNSAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRSLTSDDTAVYYCARGTIGAAGNY WGQGTLLTVSS (配列番号 55)
St4_C6 "クローン 6"	QVQLVQSGAEVRKPGASVTLSCRTSGYTFTSYAVHWVRQAPGQGLEWMGGVNG GNGNTRFSQKFQDRLMIVRDRSANTASMELRSLTSEDTAIYYCARADDCSGVGC HPWFDWPWGQGTLLTVSS (配列番号 56)

10

20

【 0 1 7 8 】

【表 4】

表 4:可変軽鎖アミノ酸配列

抗体	VL アミノ酸配列(配列番号)
Kp3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKV SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPPITFGQGTRLEI K (配列番号 15)
Kp16	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNQNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFEGGGTKVTVL (配列番号 16)
St1_C1 "クローン 1"	QSVLTQPPSVSVSPGHTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKSGQSPVLVMYKDKTKRPS GIPERFSGSNSGNTATLAISGTQAVDEADYFCQAWDRSIMIFGGGGTKVTVL (配列 番号 57)
St2_C4 "クローン 4"	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASG APSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDDEADYYCAAWDDSLNGVVFEGGGTKLEIK (配列番号 58)
St3_C5 "クローン 5"	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPS GVPDRFSGSKYGTASLAISGLQSDDEADYYCAAWDDSLTGPVFEGGGTKLTIL (配列番号 59)
St4_C6 "クローン 6"	SVILTQPPSVSVSPGQTANITCSGDKLGDKYTSWYLLQKPGQSPVLLIFQDKRPSDIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCAAWDDSDSGTATFGGGTKLTIVL (配列番号 60)

30

40

【 0 1 7 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、MrkAに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗MrkA抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13～14または53～56と少なくとも95、96、97、98、または99%同一な重鎖可変領域（VH）および配列番号15～16または57～60と少な

50

くとも 95、96、97、98、または 99 % 同一な軽鎖可変領域 (V_L) を含む。いくつかの実施形態では、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質が、配列番号 13 ~ 14 または 53 ~ 56 の配列を含む重鎖可変領域および配列番号 15 ~ 16 または 57 ~ 60 の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、配列番号 13 ~ 16 または 53 ~ 60 に対して一定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドが、保存的アミノ酸置換によってのみ配列番号 13 ~ 16 または 53 ~ 60 と異なる。

【0180】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質 (抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む) を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 15 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 14 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 16 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 53 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 57 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 54 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 58 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 55 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 59 と少なくとも 95 % 同一な V_L、または配列番号 56 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 60 と少なくとも 95 % 同一な V_L を含み、抗原結合タンパク質が少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型に結合する。

【0181】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質 (抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む) を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 15 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 14 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 16 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 53 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 57 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 54 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 58 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 55 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 59 と少なくとも 95 % 同一な V_L、または配列番号 56 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 60 と少なくとも 95 % 同一な V_L を含み、抗原結合タンパク質が少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型の O P K をインビトロにおいて誘導する。

【0182】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質 (抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む) を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 15 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 14 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 16 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 53 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 57 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 54 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 58 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 55 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 59 と少なくとも 95 % 同一な V_L、または配列番号 56 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 60 と少なくとも 95 % 同一な V_L を含み、抗原結合タンパク質が対象における細菌の負担を低下させる。

【0183】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質 (抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む) を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 15 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 14 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 16 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 53 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 57 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 54 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 58 と少なくとも 95 % 同一な V_L、配列番号 55 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 59 と少なくとも 95 % 同一な V_L、または配列番号 56 と少なくとも 95 % 同一な V_H および配列番号 60 と少なくとも 95 % 同一な V_L を含み、抗原結合タンバ

ク質が対象において延命効果を与える。

【0184】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも96%同一なV L、配列番号14と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも96%同一なV L、配列番号53と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも96%同一なV L、配列番号54と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも96%同一なV L、配列番号55と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも96%同一なV L、または配列番号56と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも96%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合する。

10

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも96%同一なV L、配列番号14と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも96%同一なV L、配列番号53と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも96%同一なV L、配列番号54と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも96%同一なV L、配列番号55と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも96%同一なV L、または配列番号56と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも96%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が少なくとも2つの肺炎桿菌血清型のO P Kをインピトロにおいて誘導する。

20

【0186】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも96%同一なV L、配列番号14と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも96%同一なV L、配列番号53と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも96%同一なV L、配列番号54と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも96%同一なV L、配列番号55と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも96%同一なV L、または配列番号56と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも96%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が対象における細菌の負担を低下させる。

30

【0187】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも96%同一なV L、配列番号14と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも96%同一なV L、配列番号53と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも96%同一なV L、配列番号54と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも96%同一なV L、配列番号55と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも96%同一なV L、または配列番号56と少なくとも96%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも96%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が対象において延命効果を与える。

40

【0188】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも97%同一なV L、配列番号14と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号16と少なく

50

とも97%同一なV L、配列番号53と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも97%同一なV L、配列番号54と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも97%同一なV L、配列番号55と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも97%同一なV L、または配列番号56と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも97%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合する。

【0189】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも97%同一なV L、配列番号14と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも97%同一なV L、配列番号53と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも97%同一なV L、配列番号54と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも97%同一なV L、配列番号55と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも97%同一なV L、または配列番号56と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも97%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が少なくとも2つの肺炎桿菌血清型のO P Kをインビトロにおいて誘導する。

10

【0190】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも97%同一なV L、配列番号14と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも97%同一なV L、配列番号53と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも97%同一なV L、配列番号54と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも97%同一なV L、配列番号55と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも97%同一なV L、または配列番号56と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも97%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が対象における細菌の負担を低下させる。

20

【0191】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも97%同一なV L、配列番号14と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも97%同一なV L、配列番号53と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも97%同一なV L、配列番号54と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも97%同一なV L、配列番号55と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも97%同一なV L、または配列番号56と少なくとも97%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも97%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が対象において延命効果を与える。

30

【0192】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k Aに特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗M r k A抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号13と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号15と少なくとも98%同一なV L、配列番号14と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号16と少なくとも98%同一なV L、配列番号53と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号57と少なくとも98%同一なV L、配列番号54と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号58と少なくとも98%同一なV L、配列番号55と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号59と少なくとも98%同一なV L、または配列番号56と少なくとも98%同一なV Hおよび配列番号60と少なくとも98%同一なV Lを含み、抗原結合タンパク質が少なくとも2つの肺炎桿菌血清型に結合する。

40

50

【0193】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 1 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 7 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 8 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 9 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、または配列番号 5 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 6 0 と少なくとも 9 8 % 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型の O P K をインビトロにおいて誘導する。

10

【0194】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 1 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 7 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 8 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 9 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、または配列番号 5 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 6 0 と少なくとも 9 8 % 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が対象における細菌の負担を低下させる。

20

【0195】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 1 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 1 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 3 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 7 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 4 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 8 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、配列番号 5 5 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 5 9 と少なくとも 9 8 % 同一な V L、または配列番号 5 6 と少なくとも 9 8 % 同一な V H および配列番号 6 0 と少なくとも 9 8 % 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が対象において延命効果を与える。

30

【0196】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 1 5 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 1 4 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 1 6 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 5 3 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 5 7 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 5 4 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 5 8 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 5 5 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 5 9 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、または配列番号 5 6 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 6 0 と少なくとも 9 9 % 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型に結合する。

40

【0197】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 1 5 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 1 4 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 1 6 と少なくとも 9 9 % 同一な V L、配列番号 5 3 と少なくとも 9 9 % 同一な V H および配列番号 5 7

50

と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 54 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 58 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 55 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 59 と少なくとも 99% 同一な V L、または配列番号 56 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 60 と少なくとも 99% 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が少なくとも 2 つの肺炎桿菌血清型の O P K をインビトロにおいて誘導する。

【0198】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 15 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 14 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 16 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 53 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 57 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 54 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 58 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 55 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 59 と少なくとも 99% 同一な V L、または配列番号 56 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 60 と少なくとも 99% 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が対象における細菌の負担を低下させる。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、本開示は、M r k A に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質（抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む）を提供し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号 13 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 15 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 14 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 16 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 53 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 57 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 54 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 58 と少なくとも 99% 同一な V L、配列番号 55 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 59 と少なくとも 99% 同一な V L、または配列番号 56 と少なくとも 99% 同一な V H および配列番号 60 と少なくとも 99% 同一な V L を含み、抗原結合タンパク質が対象において延命効果を与える。

20

【0200】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495 によって記載されるものなどのハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法の使用では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を上記に記載した通り免疫し、免疫抗原に特異的に結合し得る抗体のリンパ球による産生を誘発する。リンパ球はまた、インビトロで免疫することもできる。免疫後、リンパ球を単離し、例えばポリエチレングリコールを使用して好適な骨髓腫細胞株と融合することによりハイブリドーマ細胞を形成し、次にそこから未融合のリンパ球および骨髓腫細胞を選択によって除くことができる。次に、免疫沈降、免疫プロット法によるか、またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA））によって決定するとき選択の抗原を特異的に対象とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、標準方法を用いたインビトロ培養か（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986）、あるいは動物においてインビボで増殖させることができる。次に、モノクローナル抗体を培養培地または腹水から精製することができる。

30

40

【0201】

あるいは、モノクローナル抗体はまた、米国特許第 4,816,567 号明細書に記載される通り組換え DNA 法を用いて作製することもできる。成熟 B 細胞またはハイブリドーマ細胞から、その抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使用した RT-PCR によるなどして、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、従来の手順を用いてその配列を決定する。次に、重鎖および軽鎖をコードする単離ポリヌクレオチドを好適な発現ベクターにクローニン

50

グシ、本来免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞にその発現ベクターをトランスフェクトすると、宿主細胞によってモノクローナル抗体が生成される。また、記載される通り、所望の種のC D Rを発現するファージディスプレイライブラリから、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはその断片を単離することもできる（M c C a f f e r t y e t a l . , 1990, N a t u r e , 348:552-554; C l a c k s o n e t a l . , 1991, N a t u r e , 352:624-628; およびM a r k s e t a l . , 1991, J . M o l . B i o l . , 222:581-597）。

【0202】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、組換えD N A技術を用いた何らかの種々の方法でさらに修飾することができ、それにより代替的な抗体を作成し得る。一部の実施形態では、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインが、1)例えばヒト抗体のそれらの領域に置換されてキメラ抗体が作成されるか、または2)非免疫グロブリンポリペプチドに置換されて融合抗体が作成され得る。一部の実施形態では、定常領域がトランケートされるか、または除去されて、モノクローナル抗体の所望の抗体断片が作成される。可変領域の部位特異的または高密度突然変異誘発を用いてモノクローナル抗体の特異性、親和性等を最適化することができる。

【0203】

いくつかの実施形態では、M r k Aに対するモノクローナル抗体がヒト化抗体である。ある実施形態では、そのような抗体が、ヒト対象に投与された場合に抗原性およびH A M A（ヒト抗マウス抗体）応答を低下させるために治療上使用される。ヒト化抗体は、当技術分野において知られている様々な技術を使用して産生することができる。ある代替の実施形態では、M r k Aに対する抗体がヒト抗体である。

【0204】

ヒト抗体は、当技術分野において公知の様々な技法を用いて直接調製することができる。インビトロで免疫されるか、または標的抗原に対する抗体を産生する免疫された個体から単離された固定化ヒトBリンパ球を作成することができる（例えば、C o l e e t a l . , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , p . 77 (1985); B o e m e r e t a l . , 1991, J . I m m u n o l . , 147(1):86-95; および米国特許第5,750,373号明細書を参照されたい）。また、例えば、V a u g h a n e t a l . , 1996, N a t . B i o t e c h . , 14:309-314、S h e e t s e t a l . , 1998, P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . , 95:6157-6162、H o o g e n b o o m a n d W i n t e r , 1991, J . M o l . B i o l . , 227:381、およびM a r k s e t a l . , 1991, J . M o l . B i o l . , 222:581に記載される通り、ヒト抗体はファージライブラリから選択することもでき、ここで、そのファージライブラリはヒト抗体を発現する）。抗体ファージライブラリを作成および使用する技術は、米国特許第5,969,108号明細書、同第6,172,197号明細書、同第5,885,793号明細書、同第6,521,404号明細書；同第6,544,731号明細書；同第6,555,313号明細書；同第6,582,915号明細書；同第6,593,081号明細書；同第6,300,064号明細書；同第6,653,068号明細書；同第6,706,484号明細書；および同第7,264,963号明細書；およびR o t h e e t a l . , 2007, J . M o l . B i o . , d o i : 10.1016/j.jmb.2007.12.018（これらの各々は、全体として参照により援用される）にも記載されている。親和性成熟戦略およびチェインシャッフリング戦略（M a r k s e t a l . , 1992, B i o / T e c h n o l o g y 10:779-783、全体として参照により援用される）が当技術分野において公知であり、高親和性ヒト抗体の作成に用いることができる。

【0205】

ヒト化抗体はまた、免疫時に内因性免疫グロブリンを産生することなくヒト抗体の完全レパートリーを産生する能力を有するヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスでも作製することができる。この手法は、米国特許第5,545,807号明細書；同第5,545,806号明細書；同第5,569,825号明細書；同第5,625,126号明細書；同第5,633,425号明細書；および同第5,661,016号明細書に記載されている。

【0206】

本開示によれば、Mrk Aに特異的な一本鎖抗体の作製技法を適合させることができる（米国特許第4,946,778号明細書を参照されたい）。加えて、Mrk Aに対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片またはその断片の迅速かつ有効な同定を可能にするFab発現ライブラリの構築方法を適合させることができる（Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)）。抗体断片は、限定はされないが：（a）抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')₂断片、（b）F(ab')₂断片のジスルフィド架橋の還元によって生成されるFab断片、（c）抗体分子をパインおよび還元剤で処理することによって生成されるFab断片、および（d）Fv断片を含め、当技術分野における技法によって作製することができる。

10

【0207】

その血清半減期を増加させるために抗体を修飾することは、とりわけ抗体断片の場合にさらに望ましいものとなり得る。これは、例えば、抗体断片の適切な領域の突然変異によって抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことによるか、または後に抗体断片にいずれかの末端もしくは中央で（例えば、DNAまたはペプチド合成によって）融合するペプチドタグにそのエピトープを組み込むことによって達成し得る。

20

【0208】

本開示の抗原結合タンパク質は、抗体定常領域またはその一部をさらに含むことができる。例えば、VLドメインは、そのC-末端部で、ヒトCまたはC鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに付けることができる。同様に、VHドメインをベースとする抗原結合タンパク質は、そのC-末端部で、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgE、およびIgMならびにアイソタイプサブクラス、特にIgG1およびIgG4のいずれかに由来する免疫グロブリン重鎖のすべてまたは一部（例えばCH1ドメイン）に結合することができる。例えば、免疫グロブリン重鎖は、抗体アイソタイプサブクラス、IgG1に由来することができる。これらの特性を有し、可変領域を安定化する任意の合成または他の定常領域変異体も本開示の実施形態で使用する事が企図される。抗体定常領域は、YTE突然変異を有するFc領域とすることができ、Fc領域は、下記のアミノ酸置換を含む：M252Y/S254T/T256E。この残基の付番は、Kabatsの付番に基づく。Fc領域中のYTE突然変異は、抗原結合タンパク質の血清中での持続性を増加させる（Dall'Acqua, W. F. et al. (2006) The Journal of Biological Chemistry, 281, 23514-23524を参照されたい）。

30

【0209】

本明細書におけるいくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合断片が、エフェクター機能を改善するために、例えば、抗原依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）および/または補体依存性細胞障害作用（CDC）を増強するために修飾される。これは、1つ以上のアミノ酸置換をなすことによってまたはFc領域中にシステインを導入することによって実現することができる。抗体のエフェクター機能を増強するかもしれないしは衰えさせ、かつ/または抗体の薬物動態学的特性（例えば、半減期）を改変することができるFc領域の変異体（例えば、アミノ酸置換および/または追加および/または欠失）は、例えば米国特許第6,737,056B1号明細書、米国特許出願公開第2004/0132101A1号明細書、米国特許第6,194,551号明細書、ならびに米国特許第5,624,821号明細書および米国特許第5,648,260

40

50

号明細書において開示される。置換のある特定のセット、3重突然変異 L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S (「T M」) は、ヒト C 1 q、C D 6 4、C D 3 2 A、および C D 1 6 に対するヒト I g G 1 分子の結合活性における大幅な減少を引き起こす。例えば、O g a n e s y a n e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r D B i o l C r y s t a l l o g r . 6 4 : 7 0 0 - 7 0 4 (2 0 0 8) を参照されたい。他の場合、定常領域修飾が血清半減期を増加させることができる。F c 領域を含むタンパク質の血清半減期は、F c R n に対する F c 領域の結合親和性を増加させることによって増加させることができる。

【0210】

抗原結合タンパク質が抗体またはその抗原結合断片である場合、それは、(a) I g A 定常ドメイン、(b) I g D 定常ドメイン、(c) I g E 定常ドメイン、(d) I g G 1 定常ドメイン、(e) I g G 2 定常ドメイン、(f) I g G 3 定常ドメイン、(g) I g G 4 定常ドメイン、および(h) I g M 定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が、I g G 1 重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質が、I g G 1 / I g G 3 キメラ重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片である。

10

【0211】

本開示の抗原結合タンパク質は、(a) I g カッパ定常ドメイン、および(b) I g ラムダ定常ドメインからなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに含むことができる。

20

【0212】

本開示の抗原結合タンパク質は、ヒト I g G 1 定常ドメインおよびヒトラムダ定常ドメインをさらに含むことができる。

【0213】

本開示の抗原結合タンパク質は、252、254、および256位に突然変異を含有する I g G F c ドメインを含むことができ、位置付番は、K a b a t の E U インデックスに従う。例えば、I g G 1 F c ドメインは、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、および T 2 5 6 E の突然変異を含有することができ、位置付番は、K a b a t の E U インデックスに従う。

30

【0214】

本開示はまた、本開示の抗原結合タンパク質の単離 V H ドメインおよび / または本開示の抗原結合タンパク質の単離 V L ドメインにも関する。

【0215】

本開示の抗原結合タンパク質(抗 M r k A 抗体またはその抗原結合断片を含む)は、検出可能なまたは機能的な標識により標識することができる。検出可能な標識は、131I または 99Tc などの放射能標識を含み、これらは、抗体画像処理について当技術分野において知られている従来の化学を使用して本開示の抗体に付けられてもよい。標識はまた、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素標識を含む。標識は、特定の関連する検出可能な成分、例えば標識アビジンへの結合を介して検出されてもよいビオチンなどの化学成分をさらに含む。本開示の抗原結合タンパク質(抗体またはその抗原結合断片を含む)に付けられてもよい他の検出可能なまたは機能的な標識の非限定的な例は、同位体標識、磁気標識、レドックス活性成分、光学色素、ビオチン化基、ビオチンシグナル伝達ペプチド、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、および黄色蛍光タンパク質(YFP)などの蛍光成分、ならびにヒスチジンペプチド(his)、ヘマグルチニン(HA)、金結合ペプチド、Flagなどの二次レポーターによって認識されるポリペプチドエピトープ、放射性同位体、放射性核種、毒素、治療剤および化学療法剤を含む。

40

【0216】

III. 医薬組成物およびワクチン

50

本開示はまた、本明細書において記載される1つ以上のMrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくは抗原結合断片を含む）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、医薬組成物が薬学的に許容可能なビヒクルまたは薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む。ある実施形態では、これらの医薬組成物がヒト患者においてクレブシエラ感染症に関連する状態を治療するか、予防するか、または回復させる際に使用を見出す。ある実施形態では、これらの医薬組成物がクレブシエラの増殖を阻害する際に使用を見出す。

【0217】

ある実施形態では、製剤は、本明細書において記載される抗体もしくは抗MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを薬学的に許容可能なビヒクル（例えば、担体、賦形剤）と組み合わせることにより、保存および使用のために調製される（例えば、参照により本明細書に援用されるRemington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000を参照されたい）。いくつかの実施形態では、製剤が保存剤を含む。

10

【0218】

本開示の医薬組成物は、局所的なおよび全身性の治療のために任意の数の方法で投与することができる。

20

【0219】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載される1つ以上のMrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくは抗原結合断片を含む）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、肺炎、尿路感染症、敗血症、新生児敗血症、下痢、軟部組織感染症、臓器移植後の感染症、外科手術による感染症、創傷感染症、肺感染症、化膿性肝膿瘍（PLA）、眼内炎、髄膜炎、壊死性髄膜炎、強直性脊椎炎、または脊椎関節症を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される1つ以上のMrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくは抗原結合断片を含む）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、院内感染症、日和見感染症、臓器移植後の感染症、ならびにクレブシエラ感染症に関連する他の状態（例えば、肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. ブランチコラ、および/またはK. グラニュロマトリスによる感染症）において有用である。いくつかの実施形態では、本明細書において記載される1つ以上のMrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくは抗原結合断片を含む）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、例えば人工呼吸器、カテーテル、または静脈内カテーテルを含む、クレブシエラに汚染されたデバイスに暴露される対象において有用である。

30

【0220】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象におけるクレブシエラの増殖を阻害するのに有効な量のMrkA結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）を含む。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. ブランチコラ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌である。

40

【0221】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象においてクレブシエラに対する免疫応答、例えば抗体の産生を誘起するのに有効な量のMrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチド

50

を含む。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K．オキシトカ、K．ブランチコラ、および／またはK．グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K．オキシトカ、および／またはK．グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌である。

【0222】

いくつかの実施形態では、クレブシエラ感染症に関連する状態を治療し、予防し、かつ／または回復させる方法は、クレブシエラに感染した対象を、インビボにおいて、Mrk A結合タンパク質（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、Mrk A結合タンパク質、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、感染症を予防するために、対象が細菌に暴露されたのと同時にまたはその直後に投与される。いくつかの実施形態では、Mrk A結合タンパク質を含む医薬組成物が感染後に治療薬として投与される。

10

【0223】

ある実施形態では、クレブシエラ感染症を治療し、予防し、かつ／または回復させる方法は、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む。ある実施形態では、対象がヒトである。いくつかの実施形態では、Mrk A結合タンパク質（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、対象がクレブシエラに感染する前に投与される。いくつかの実施形態では、Mrk A結合タンパク質（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、対象がクレブシエラに感染した後に投与される。

20

【0224】

ある実施形態では、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が人工呼吸器で対象に投与される。ある実施形態では、対象がカテーテル（例えば、尿道カテーテルまたは静脈内カテーテル）を有する。ある実施形態では、対象が抗生物質を受けている。

30

【0225】

ある実施形態では、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物は、院内クレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体またはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、Mrk Aポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が日和見クレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が臓器移植後のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。

40

【0226】

ある実施形態では、Mrk A結合剤（例えば、抗Mrk A抗体もしくはその抗原結合断片）、Mrk Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrk Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物は、セファロsporin

50

抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物がアミノグリコシド抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物がキノロン抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物がカルバペネム抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、セファロスポリン、アミノグリコシド、キノロン、およびカルバペネム抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が広域スペクトルのベータ-ラクタマーゼ（E S B L）を産生するクレブシエラによる感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物がセファロスポリン、アミノグリコシド、およびキノロン抵抗性のクレブシエラ感染症の治療または予防のためのものである。ある実施形態では、M r k A 結合剤（例えば、抗 M r k A 抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物が、カルバペネマーゼを産生するクレブシエラによる感染症の治療または予防のためのものである。

10

20

30

40

50

【0227】

クレブシエラ感染症に関連する状態の治療、予防、および/または回復のために、本明細書において記載される医薬組成物、抗体、抗 M r k A 結合剤、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドの適切な投薬量は、状態のタイプ、状態の重症度および経過、状態の応答性、医薬組成物、抗体、抗 M r k A 結合剤、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが治療目的に投与されるかまたは防止目的に投与されるか、以前の療法、患者の病歴など、治療している医者によるあらゆることに依存する。本明細書において記載される医薬組成物、抗体、抗 M r k A 結合剤、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドは、1回または数日～数か月まで続く一連の治療中またはある治療法が実行されるか、もしくは状態の縮小が実現されるまで投与することができる。最適な投薬スケジュールは、患者の体内の薬剤蓄積についての測定値から計算することができ、個々の抗体または作用物質の相対的な効力に依存して変動するであろう。投与している医者は、最適な投薬量、投薬の手法、および反復率を容易に決定することができる。

【0228】

本明細書において提供されるように、M r k A、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドは、例えば、防御 M r k A 抗原に対する抗体を誘起することにより、クレブシエラによる感染症から防御するために対象に投与することができる。さらなる態様では、M r k A、その免疫原性断片、

または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物が、クレブシエラ感染症を診断するための抗体を産生するためにまたはそのようなクレブシエラ感染症の予防処置および / もしくは治療のためのワクチンならびに免疫原性組成物の免疫原に対する抗体の高い力価を維持するためのブースターワクチンを産生するために利用することができる。

【 0 2 2 9 】

いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が肺炎桿菌 M r k A またはその免疫原性断片である。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が肺炎桿菌 M r k A である。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が単量体である。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片がオリゴマーである。

10

【 0 2 3 0 】

いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 7 5 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 8 0 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 8 5 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 0 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 5 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 6 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 7 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 8 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 において示される配列に少なくとも 9 9 % 同一な配列を含む。

20

【 0 2 3 1 】

いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 4 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 5 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 1 0 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 1 5 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 ~ 1 7 5 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。

30

40

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 7 1 ~ 2 0 2 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 5 0 ~ 2 0 2 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 7 のアミノ酸 1 0 0 ~ 2 0 2 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、

50

90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、Mark Aまたはその免疫原性断片が、配列番号17のアミノ酸50~202または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。

【 0 2 3 3 】

いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号17のアミノ酸1～40および171～202または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。

【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 75 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 80 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 85 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 90 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 95 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 96 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 97 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 98 % 同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 19 において示される配列に少なくとも 99 % 同一な配列を含む。

【 0 2 3 5 】

いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号 1 9 のアミノ酸 1 ~ 4 2 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 9 のアミノ酸 1 ~ 5 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 9 のアミノ酸 1 ~ 1 0 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 9 のアミノ酸 1 ~ 1 5 0 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k A またはその免疫原性断片が、配列番号 1 9 のアミノ酸 1 ~ 1 7 5 または少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % それに同一な配列を含む。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号19のアミノ酸173~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号19のアミノ酸150~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号19のアミノ酸100~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。いくつかの実施形態では、M r k Aまたはその免疫原性断片が、配列番号19のアミノ酸50~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%

、 98%、もしくは99%それに同一な配列を含む。

【0237】

ワクチンは、溶液または懸濁液のいずれかとして注射液として調製することができる。吸入用など、油ベース中のワクチンもよく知られている。使用前に溶解または懸濁される固体の形態も製剤することができる。活性成分と適合性でありかつ医薬品の使用に許容可能である医薬品の担体、希釈剤、および賦形剤が一般に追加される。そのような担体の例は、水、生理食塩水、デキストロース、またはグリセロールを含むが、これらに限定されない。担体の組み合わせも使用されてよい。ワクチン組成物は、ワクチンの有効性を改善する役割を果たすことができる、pHを安定化するかまたはアジュバント、湿潤剤、もしくは乳化剤として機能するための物質を含むことができる。いくつかの実施形態では、ワクチンが1つ以上のアジュバントを含む。

10

【0238】

ワクチン投与は、従来のルート、例えば静脈内、皮下、腹腔内、または粘膜のルートに一般によるものである。投与は、非経口注射、例えば皮下または筋肉内注射によるものとすることができる。

【0239】

ワクチンは、単一用量スケジュールまたは任意選択で複数回の用量スケジュールで与えられてもよい。クレブシエラに対する免疫を付与するのに十分なワクチンの量は、当業者によく知られている方法によって決定される。この量は、年齢、性別、および全般的な理学的状態ならびに必要なとされる免疫のレベルの考慮を含めて、ワクチンレシピエントの特性に基づいて決定されるであろう。

20

【0240】

I V . 使用の方法

本明細書において記載されるM r k A結合剤（例えば、抗M r k A抗体およびその抗原結合断片を含む）、M r k Aポリペプチド、その免疫原性断片、ならびにM r k Aポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドは、肺炎、尿路感染症、敗血症、新生児敗血症、下痢、軟部組織感染症、臓器移植後の感染症、外科手術による感染症、創傷感染症、肺感染症、化膿性肝膿瘍（P L A）、眼内炎、髄膜炎、壊死性髄膜炎、強直性脊椎炎、および脊椎関節症を含むが、これらに限定されない様々な適用に有用である。いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるM r k A結合剤（抗体およびその抗原結合断片を含む）、M r k Aポリペプチド、その免疫原性断片、ならびにM r k Aポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、院内感染症、日和見感染症、臓器移植後の感染症、ならびにクレブシエラ感染症に関連する他の状態（例えば、肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および/またはK . グラニュロマティスによる感染症）において有用である。いくつかの実施形態では、M r k A結合剤、M r k Aポリペプチド、その免疫原性断片、およびM r k Aポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、例えば人工呼吸器、カテーテル、または静脈内カテーテルを含む、クレブシエラに汚染されたデバイスに暴露される対象において有用である。

30

【0241】

いくつかの実施形態では、本開示は、クレブシエラ感染症に関連する状態を治療し、予防し、かつ/または回復させる方法であって、有効量のM r k A結合剤（例えば、抗M r k A抗体もしくはその抗原結合断片）、M r k Aポリペプチド、その免疫原性断片、またはM r k Aポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを対象に投与するステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、その量は、対象におけるクレブシエラの増殖を阻害するのに有効である。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K . オキシトカ、K . ブランチコラ、および/またはK . グラニュロマティスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K . オキシトカ、および/またはK . グラニュロマティスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌である。いくつかの実施形態では、対象がクレブシエラに暴露された。いくつ

40

50

かの実施形態では、クレブシエラが対象において検出された。いくつかの実施形態では、対象が、例えば症状に基づいてクレブシエラに感染していることが疑われる。

【0242】

いくつかの実施形態では、本開示は、クレブシエラ感染症に関連する状態を治療し、予防し、かつ/または回復させる方法であって、ある量のMrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを対象に投与するステップを含み、その量が、対象においてクレブシエラに対する免疫応答をもたらす（例えば、抗体の産生）のに有効である。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌である。いくつかの実施形態では、対象がクレブシエラに暴露された。いくつかの実施形態では、クレブシエラが対象において検出された。いくつかの実施形態では、対象が、例えば症状に基づいてクレブシエラに感染していることが疑われる。

【0243】

いくつかの実施形態では、本開示は、クレブシエラの増殖を阻害する方法であって、MrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを対象に投与するステップを含む方法をさらに提供する。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、K. プランチコラ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌、K. オキシトカ、および/またはK. グラニュロマトリスである。いくつかの実施形態では、クレブシエラが肺炎桿菌である。いくつかの実施形態では、対象がクレブシエラに暴露された。いくつかの実施形態では、クレブシエラが対象において検出された。いくつかの実施形態では、対象が、例えば症状に基づいてクレブシエラに感染していることが疑われる。

【0244】

いくつかの実施形態では、クレブシエラ感染症に関連する状態を治療し、予防し、かつ/または回復させる方法は、クレブシエラに感染した対象を、インビボにおいて、MrkA結合剤（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドと接触させるステップを含む。ある実施形態では、細胞を、MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドと接触させるステップが対象において行われる。例えば、MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、およびMrkAポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを、細菌の負担を低下させるためにマウスクレブシエラ感染症モデルに投与することができる。いくつかの実施形態では、MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、感染症を予防するために対象への細菌の導入前に投与される。いくつかの実施形態では、MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、感染症を予防するために対象が細菌に暴露されたのと同時にまたはその直後に投与される。いくつかの実施形態では、MrkA結合剤、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが感染後に治療薬として対象に投与される。

【0245】

ある実施形態では、クレブシエラ感染症を治療し、予防し、かつ/または回復させる方法は、有効量のMrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくは

はその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを対象に投与するステップを含む。ある実施形態では、対象がヒトである。いくつかの実施形態では、有効量のMrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが対象または患者がクレブシエラに感染する前に投与される。いくつかの実施形態では、有効量のMrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドが、対象または患者がクレブシエラに感染した後に投与される。

【0246】

10

ある実施形態では、対象が人工呼吸器をしている。ある実施形態では、対象がカテーテル（例えば、尿道カテーテルまたは静脈内カテーテル）を有する。ある実施形態では、対象が抗生物質を受けている。

【0247】

ある実施形態では、クレブシエラ感染症が院内感染症である。ある実施形態では、クレブシエラ感染症が日和見感染症である。ある実施形態では、クレブシエラ感染症が臓器移植の結果として生じる。

【0248】

ある実施形態では、クレブシエラがセファロスポリン抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラがアミノグリコシド抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラがキノロン抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラがカルバペネム抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラがセファロスポリン、アミノグリコシド、キノロン、およびカルバペネム抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラが広域スペクトルのベータ-ラクタマーゼ（ESBL）を産生する。ある実施形態では、クレブシエラがセファロスポリン、アミノグリコシド、およびキノロン抵抗性である。ある実施形態では、クレブシエラがカルバペネマーゼを産生する。

20

【0249】

ある実施形態では、クレブシエラ感染症を治療し、予防し、かつ/または回復させる方法は、有効量のMrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドおよび抗生物質を対象に投与するステップを含む。MrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドおよび抗生物質は、同時にまたは逐次的に投与することができる。MrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドおよび抗生物質は、同じ医薬組成物において投与することができる。MrkA結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体もしくはその抗原結合断片）、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、またはMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドおよび抗生物質は、別々の医薬組成物において同時にまたは逐次的に投与することができる。抗生物質は、例えばカルバペネムまたはコリスチンとすることができる。

30

40

【0250】

本開示はまた、MrkA、例えばMrkAオリゴマーを検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、MrkAまたはMrkAオリゴマーを検出する方法は、試料を、本明細書において提供されるMrkA抗体またはその抗原結合断片と接触させるステップおよび試料への抗体またはその抗原結合断片の結合についてアッセイするステップを含む。結合を評価する方法は、当技術分野においてよく知られている。

【0251】

V. キット

50

本開示の任意の態様または実施形態による単離抗原結合タンパク質（例えば、抗 M r k A 抗体分子もしくはその抗原結合断片）、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドを含むキットも本開示の一態様として提供される。キットにおいて、抗原結合タンパク質もしくは抗 M r k A 抗体、M r k A ポリペプチド、その免疫原性断片、または M r k A ポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドは、試料中でのその反応性を例えば下記にさらに記載されるように決定することができるように標識することができる。キットの構成要素は、一般に無菌であり、密封バイアルまたは他の容器中にある。キットは、抗体分子が有用な診断分析または他の方法において用いることができる。キットは、方法、例えば本開示に従う方法における構成要素の使用のための説明書を含むことができる。そのような方法の実行を支援するかまたは可能にする付随的な材料が本開示のキットに含まれてもよい。

10

20

30

40

50

【0252】

試料中の抗体またはその抗原結合断片の反応性は、任意の適切な手段によって決定することができる。ラジオイムノアッセイ（R I A）は、可能性として考えられる1つの手段である。放射性標識抗原を非標識抗原（試験サンプル）と混合し、抗体に結合させる。結合した抗原を結合していない抗原から物理的に分離し、抗体に結合した放射性抗原の量を決定する。試験サンプル中に抗原が多くあるほど、抗体に結合する放射性抗原は少ないであろう。競合的結合アッセイはまた、レポーター分子に連結された抗原または類似体を使用して、非放射性抗原と共に使用することもできる。レポーター分子は、スペクトルで特定される吸収特性または放射特性を有する蛍光色素、蛍光体、またはレーザー色素とすることができる。適した蛍光色素は、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、および T e x a s R e d を含む。適した発色性色素は、ジアミノベンジジンを含む。

【0253】

他のレポーターは、有色、磁気、または常磁性のラテックスビーズなどの高分子コロイド粒子または微粒子物質および検出可能なシグナルを直接または間接的に、視覚的に観察するか、電子的に検出するか、または他に記録することができるようにする生物学的または化学的活性剤を含む。これらの分子は、例えば、色を生じるかもしくは変化させるか、または電氣的な特性における変化を引き起こす反応を触媒する酵素とすることができる。それらは、分子が反応性であり、あるエネルギー状態間の電子遷移が特徴的なスペクトルの吸収または放射をもたらす。それらは、バイオセンサーと共に使用される化学物質を含むことができる。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を用いることができる。

【0254】

個々の抗体 - レポーターコンジュゲートによって生成されるシグナルは、試料（標準および試験）中の適切な抗体結合の定量化可能な絶対的または相対的データを得るために使用することができる。

【0255】

本開示はまた、競合アッセイにおいて抗原レベルを測定するための、上記に記載される抗原結合タンパク質の使用も提供し、競合アッセイにおいて本開示によって提供される抗原結合タンパク質を用いることにより、試料中の M r k A のレベルを測定する方法を含む。いくつかの実施形態では、結合していない抗原からの結合している抗原の物理的な分離が必要とされない。いくつかの実施形態では、物理的なまたは光学的な変化が結合に際して起こるように、レポーター分子が抗原結合タンパク質に連結される。レポーター分子は、検出可能であり、好ましくは測定可能なシグナルを直接または間接的に生成することができる。いくつかの実施形態では、レポーター分子の連結が直接的もしくは間接的であるかまたは共有結合性であり、例えば、ペプチド結合または非共有結合性の相互作用を介したものである。ペプチド結合を介した連結は、抗体およびレポーター分子をコード遺伝子融合物の組換え発現の結果としてのものとすることができる。

【0256】

本開示はまた、本開示による抗原結合タンパク質を用いることにより、MrkAのレベルを直接測定する方法も提供する。いくつかの実施形態では、これらの方法が、バイオセンサー系を利用する。

【0257】

VI. ポリヌクレオチドおよび宿主細胞

さらなる態様では、本開示は、本開示による抗原結合タンパク質、VHドメインおよび/もしくはVLドメイン、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片をコードする核酸配列を含む単離核酸を提供する。いくつかの態様では、本開示は、本明細書において記載される抗原結合タンパク質、VHドメインおよび/もしくはVLドメイン、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片を作製または調製する方法であって、前記抗原結合タンパク質、VHドメインおよび/もしくはVLドメイン、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片の産生をもたらす条件下で前記核酸を発現させるステップ、ならびに抗原結合タンパク質、VHドメインおよび/もしくはVLドメイン、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片を任意選択で回収するステップを含む方法を提供する。

【0258】

本開示によって提供される核酸がDNAおよび/またはRNAを含む。一態様では、核酸がcDNAである。一態様では、本開示は、上記に記載されるCDRもしくはCDRのセットまたはVHドメインもしくはVLドメインまたは抗体抗原結合部位または抗体分子、例えばscFvもしくはIgG1をコードする核酸を提供する。

【0259】

本開示の一態様は、本明細書において記載されるVH CDRまたはVL CDR配列をコードする核酸、一般に単離核酸、任意選択でcDNAを提供する。いくつかの実施形態では、VH CDRが配列番号1~6または29~40から選択される。いくつかの実施形態では、VL CDRが配列番号7~12または41~52から選択される。Kp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6のCDRのセットをコードする核酸、Kp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6のHCDRのセットをコードする核酸、およびKp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6のLCDRのセットをコードする核酸も、表1および2に記載される個々のCDR、HCDR、LCDR、およびCDR、HCDR、LCDRのセットをコードする核酸のように提供される。いくつかの実施形態では、本開示の核酸が、表3および4に記載されるKp3、Kp16、クローン1、クローン4、クローン5、またはクローン6のVHおよび/またはVLドメインをコードする。

【0260】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも75%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも80%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも85%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも90%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも95%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも96%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも97%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも98%同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17において示される配列に少なくとも99%同一な配列をコードする。

【0261】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号17のアミノ酸1~40または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もし

10

20

30

40

50

0

20

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号 19 のアミノ酸 1 ~ 42 または少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号 19 のアミノ酸 1 ~ 50 または少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号 19 のアミノ酸 1 ~ 100 または

少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸1~150または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸1~175または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。

【0266】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸173~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸150~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸100~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドが、配列番号19のアミノ酸50~204または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%それに同一な配列をコードする。

10

【0267】

本開示は、本明細書において開示される核酸分子またはその相補体 (c o m p l e m e n t) の断片である、ハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマー、またはシーケンシングプライマーとしての使用に十分な単離ポリヌクレオチドまたはcDNA分子を提供する。核酸分子は、例えば、制御配列に作動可能に連結することができる。

20

【0268】

本開示はまた、上記に記載される少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態の構築物も提供する。

【0269】

本開示はまた、1つ以上の核酸、プラスミド、ベクターを含むかまたは上記に記載される組換え宿主細胞も提供する。提供される任意のCDRまたはCDRのセットまたはVHドメインもしくはVLドメインまたは抗体抗原結合部位、抗体分子、例えばscFvまたはIgG1 (例えば、表1~4を参照されたい)、MrkAポリペプチドまたはその免疫原性断片をコードする核酸は、それ自体、コード産物の産生の方法のように、本開示の一態様を形成し、この方法は、産物 (例えば、本明細書において開示される抗原結合タンパク質) をコードする核酸からの発現を含む。発現は、適切な条件下で、本明細書において記載される核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することによって好都合に実現することができる。発現による産生後、CDR、CDRのセット、VHもしくはVLドメイン、抗原結合タンパク質、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片は、任意の適した技術を使用して単離および/または精製することができる。

30

【0270】

いくつかの実例では、宿主細胞が、NS0マウス骨髓腫細胞、PER.C6 (登録商標) ヒト細胞、またはチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などの哺乳類宿主細胞である。

40

【0271】

抗原結合タンパク質、VHおよび/またはVLドメイン、MrkAポリペプチド、その免疫原性断片、ならびにコード核酸分子およびベクターは、例えば、それらの自然環境から、実質的に純粋なもしくは均質の形態で単離および/もしくは精製することができるか、または核酸の場合、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外のものともとの核酸もしくは遺伝子がないかもしくは実質的にないものとすることができる。本開示による核酸は、DNAまたはRNAを含み、全体的にまたは部分的に合成することが

50

できる。本明細書において説明されるヌクレオチド配列への言及は、特定の配列を有するDNA分子を包含し、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、UがTと置換される、特定の配列を有するRNA分子を包含する。

【0272】

様々な異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現のための系が、よく知られている。適した宿主細胞は、細菌、哺乳類細胞、植物細胞、酵母およびバキュロウイルス系、ならびにトランスジェニック植物および動物を含む。異種ポリペプチドの発現のための当技術分野において利用可能な哺乳類細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NS0マウスメラノーマ細胞、YB2/Oラット骨髓腫細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト胎児由来網膜細胞、およびその他多くの細胞を含む。一般的な細菌宿主は、大腸菌である。

10

【0273】

大腸菌などの原核細胞における抗体および抗体断片の発現は、当技術分野において十分に確立されている。概説については、例えばPlueckthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991)を参照されたい。培養中の真核細胞における発現も抗原結合タンパク質の産生のための選択肢として当業者に利用可能である。例えば、Chadd HE and Chamow SM (2001) 110 Current Opinion in Biotechnology 12:188-194、Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:117、Larrick J W and Thomas DW (2001) Current opinion in Biotechnology 12:411-418。

20

【0274】

プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカ遺伝子、および必要に応じて他の配列を含む適切な調節配列を含有する適したベクターを選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じてプラスミド、ウイルス、例えば「ファージまたはファージミドであってもよい。より詳細については、例えばMolecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、シークエンシング、細胞中へのDNAの導入および遺伝子発現、ならびにタンパク質の分析における、核酸の操作のための多くの知られている技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1988, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 4th edition 1999において詳細に記載される。Sambrook et al. および Ausubel et al. (両方)の開示は、参照により本明細書に援用される。

30

40

【0275】

したがって、本開示のさらなる態様は、本明細書において開示される核酸を含有する宿主細胞を提供する。例えば、本開示は、本開示の抗原結合タンパク質または抗体CDR、CDRのセット、抗原結合タンパク質のVHおよび/もしくはVLドメイン、本開示のMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞が、本開示の発現抗原結合タンパク質または抗体CDR、CDRのセット、抗原結合タンパク質のVHおよび/もしくはVLドメイン、本開示のMrkAポリペプチドもしくはその免疫原性断片を含む。

50

【0276】

そのような宿主細胞は、インピトロにおけるものとして行うことができ、培養中のものとして行うことができる。そのような宿主細胞は、単離宿主細胞として行うことができる。そのような宿主細胞は、インピボにおけるものとして行うことができる。

【0277】

本明細書において提供されるさらなる態様は、宿主細胞中にそのような核酸を導入するステップを含む方法である。導入は、任意の利用可能な技術を用いることができる。真核細胞について、適した技術は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介性のトランスフェクション、およびレトロウイルスもしくは他のウイルス、例えばワクシニアウイルスまたは昆虫細胞についてバキュロウイルスを使用する形質導入を含んでいてもよい。宿主細胞、特に真核細胞中への核酸の導入は、ウイルスまたはプラスミドベースの系を使用することができる。プラスミド系は、エピソームで維持されてもよく、または宿主細胞中にもしくは人工染色体中に組み込まれてもよい。組み込みは、単一の遺伝子座または複数の遺伝子座での1つ以上のコピーのランダムまたは標的統合によるものとして行うことができる。細菌細胞について、適した技術は、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを使用するトランスフェクションを含んでいてもよい。

【0278】

導入後、核酸からの発現を引き起こすまたは可能にする、例えば、遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養することができる。

【0279】

一実施形態では、本開示の核酸が、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）中に統合される。統合は、標準的な技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列の組み入れによって促進することができる。

【0280】

本開示はまた、上記に記載される抗原結合タンパク質またはポリペプチドを発現するために発現系において構築物（例えば、上記に記載されるプラスミド、ベクターなど）を使用するステップを含む方法を提供する。

【0281】

別の態様では、本開示は、本開示の抗原結合タンパク質（例えば、抗MrkA抗体またはその抗原結合断片）を産生するハイブリドーマを提供する。

【0282】

本開示のさらなる態様は、本開示の抗体結合タンパク質、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片の産生の方法であって、コード核酸からの発現を引き起こすステップを含む方法を提供する。そのような方法は、前記抗原結合タンパク質、MrkAポリペプチド、またはその免疫原性断片の産生に適した条件下で宿主細胞を培養するステップを含むことができる。

【0283】

いくつかの実施形態では、産生の方法が、宿主細胞またはハイブリドーマから産生される抗原結合タンパク質（抗体もしくはその抗原結合断片を含む）、MrkAポリペプチド、または免疫原性断片を単離および/または精製するステップをさらに含む。

【実施例】

【0284】

クレブシエラ感染症に対して防御し、有効である作用物質を同定する必要性を考慮して、グラム陰性菌肺炎桿菌についての交差防御標的を同定するために新規な機能ベーススクリーニングアッセイを使用した。この新規なアッセイは、オプソニン作用による死滅（OPK）を誘導することができる抗体を同定し、最初は、いかなる特定の標的抗原にも注目しなかった。

【0285】

材料および方法

10

20

30

40

50

肺炎桿菌株についての情報

肺炎桿菌分離株は、すべて *America Type Culture Collection* (ATCC、Manassas、VA) または *Eurofin collection* から得た。莢膜およびO抗原欠損肺炎桿菌 43816 株 (43816 cps B WaaL または 43816 DM) は、Cps B ORF および WaaL ORF を含有するプラスミドによる対立遺伝子置換を通して構築し、ゲンタマイシンの存在下において選択した。ゲンタマイシン抵抗性のコロニーを選択し、増やした。Cps B および WaaL 遺伝子の欠失は、PCR 分析によって確認した。ルシフェラーゼを発現する肺炎桿菌株 (Lux 株) を構築するために、様々な肺炎桿菌臨床分離株を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含有するプラスミドで形質転換し、ゲンタマイシン抵抗性のコロニーを選択した。特に指定のない限り、肺炎桿菌培養物は、すべて 37 で 2 × YT 培地中で維持し、適切な場合、抗生物質を補足した。

【0286】

ファージパニングおよびスクリーニング

健康なドナーから構築された scFv ファージディスプレイライブラリを、Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14:309-14 (1996) において記載されるように選択のために使用した。選択のために、43816 cps B WaaL 由来の 9×10^9 肺炎桿菌細胞をラウンド1のパニング抗原として使用し、野生型株 1901 (ATCC BAA-1901) および 1899 (ATCC BAA-1899) の均等なミックスでさらに2ラウンドのパニングを続けた。それぞれのラウンドについて、細菌細胞は、対数期の中間部で回収し、ブロックし (2 × YT + 3% 粉ミルク)、その後、 1×10^{12} ブロックファージ粒子を追加した。次いで、細胞は、PBS 中での再懸濁を繰り返すことによって7回洗浄した。結合したファージ粒子を、0.1N HCl により溶出し、1M Tris-HCl、pH 8.0 により中和し、ファージ粒子増幅およびパニングの続くラウンドのためにTG1を感染させるために使用した。第3ラウンドファージパニングアウトプットに感染したTG1細胞は、ファージミドを調製するために使用した。scFv断片を、精製ファージミドプールから調製し、産物に近いフォーマットでの発現およびスクリーニングのためにscFv-Fc発現ベクター中にサブクロニングした。1900、3556、およびMGH78578分離株に交差反応性のクローンを、OPKアッセイにおいてさらに特徴付けた。

【0287】

肺炎桿菌特異的ハイブリドーマの単離

Balb/cマウスを、4週間、毎週、腹腔内 (I.P.) ルートを介して43816 cps B WaaL により免疫化し、その後、野生型肺炎桿菌臨床分離株 (Kp1901 および 1899) の混合物により最終的な追加免疫を続けた。免疫の終了時に、リンパ節リンパ球および脾細胞を回収し、P3X骨髓腫と融合し、1 × HAT 培養培地において選択にかけた。次いで、結果として生じるハイブリドーマ由来の上清を全細菌ELISAによって43816 cps B WaaL への結合についてスクリーニングした。ポジティブなバインダーを、肺炎桿菌に対する防御ハイブリドーマの可能性のあるハイブリドーマを選択するためにハイスループットOPKアッセイにかけた。

【0288】

抗肺炎桿菌全細菌ELISA

複数の株に対する抗肺炎桿菌抗体の結合を、参照により本明細書に援用される Digandomenico, et al., *J Exp Med*, 209:1273-87 (2012) において記載されるようにELISAによって評価した。手短かに言えば、単一コロニーの肺炎桿菌を、培養物が対数期に達するまで、2 × YT 培地に接種した。細菌を4で一晩、384ウェルプレート (Nunc MaxiSorp) 上にコーティングした。1セットのプレートを、ネガティブコントロールとして *Acinetobacter pittii* 19004 (ATCC 19004) の同様に調製した培養物でコーティングした。4% BSA を補足した PBS (PBS-B) でブロックした後、コーティング

プレートに抗肺炎桿菌抗体と共に1時間インキュベートした。次いで、HRPコンジュゲート二次抗体を追加する前にプレートをPBS-T (PBS + 0.1% Tween 20)により1時間洗浄し、その後、洗浄およびTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質の追加を続けた。発色現象を0.1N HCLの追加によって停止させ、450nmでの吸光度をマイクロプレート読み取り装置 (Molecular Devices) によって測定した。データをPrismソフトウェアによりプロットした。

【0289】

ハイスループットなオプソニン作用による死滅 (OPK) アッセイ

OPKアッセイは、DiGiandomenico, et al., J Exp Med, 209:1273-87 (2012) において記載されるものに変更を加えた手順に基づいて実行した。手短かに言えば、ルシフェラーゼを有する肺炎桿菌株 (Lux) の対数期培養物を約 2×10^6 細胞/mlまで希釈した。4つの構成要素を、OPKアッセイのために384ウェルプレート中で一緒に混合した: 細菌、希釈仔ウサギ血清 (Cedarlane, 1:10)、分化HL-60細胞、および抗体。混合物は、振盪させながら (250rpm) 2時間37℃でインキュベートした。次いで、相対発光単位 (RLU) をEnvision Multilabelプレート読み取り装置 (Perkin Elmer) を使用して測定した。死滅のパーセンテージは、抗肺炎桿菌mAbおよびネガティブコントロールmAbによるアッセイから得られたRLUを比較することによって決定した。

【0290】

共焦点顕微鏡

肺炎桿菌43816を、37℃で2xYT培養培地中で一晩成長させた。蛍光標識は、MkA特異的モノクローナル抗体Kp3と、その後、Alexa 488標識抗ヒトIgG二次抗体 (Invitrogen) と細菌をインキュベートすることによって実現した。次いで、細菌は、4%中性バッファーホルマリンにより固定し、カバーガラス上にマウントした。共焦点顕微鏡は、Leica DMI6000 B倒立顕微鏡 (Leica Microsystems) からなるLeica TCS SP5共焦点システムにより実行した。画像は、LAS AFバージョン2.2.1 Leica Application Suiteソフトウェア (Leica Microsystems) を使用して分析した。

【0291】

肺炎桿菌溶解物からの免疫沈降

肺炎桿菌一晩培養物を遠心分離によって収集し、細胞ペレットは、プロテアーゼ阻害剤カクテルおよびDNase I (200U/μlで2μl/ml) を補足した3mlのB-PER (Thermo Scientific) バッファー中で再懸濁した。40分間室温でインキュベートした後、上清は、4℃で20分間テーブルトップEppendorf遠心分離機 (14,000rpm/分) で最高速度での遠心分離によって収集した。透明の溶解物を、40μlのプロテインA/Gビーズ (Pierce, #20422) と混合し、2時間4℃でインキュベートした。溶解物を、4℃で15分間最高速度で (14,000rpm/分) 再び遠心分離によって収集した。透明の溶解物を、15μlのプロテインA/Gビーズ (B-PERによりあらかじめ洗浄)、6μgの免疫沈降抗体を含有する新たなEppendorfチューブに移し、4℃で3時間ローター上でインキュベートした。次いで、ビーズは、4℃で1分、10,000rpmで回転させ、その後、氷冷B-PERバッファーにより3回洗浄することによって収集した。次いで、免疫沈殿した試料を、SDS-PAGEバッファー中に再懸濁し、SDS-PAGEゲル (4~12% 勾配ゲルNovex) 上に直接ロードした。試料の半分は、青色染色 (Invitrogen) および続く質量分析試料調製のために一方のゲル上にロードし、他方の半分は、ウエスタンブロット分析のために別のゲルにロードした。

【0292】

免疫沈降産物のLC-MS同定

関心のあるバンドを切り取り、脱染色し、洗浄し、その後、ジチオスレイトール (DTT) によるゲル内還元および暗中でヨードアセトアミドによるアルキル化を続けた。タンパク質は、37 °C でトリプシンによりゲル内消化し、その後、消化されたペプチドの抽出を続けた。トリプシン消化試料は、参照により本明細書に援用される Aboulaich et al., Biotechnol. Prog. 30: 1114 - 1124 (2014) において提供されるプロトコルに類似する方法を使用して、オンラインナノ LC-MS によって分析した。ペプチドの LC 分離は、400 nL / 分の流速で作動する内径 180 μm × 長さ 20 mm の C18 Symmetry trap column および 100 μm × 100 mm C18 (Waters) 逆相カラムを備えた nano-ACQUITY UPLC (登録商標) (Waters) システムで実行した (バッファー - A : 0.1 % ギ酸; バッファー - B : アセトニトリル中 0.1 % ギ酸) (Heidbrink Thompson et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry 28: 855 - 60 (2014) を参照されたい)。それぞれの試料は、1 % バッファー B を使用してトラップカラムに注入した。ペプチドを 60 分間溶出した。LC 分離後、溶出したペプチドは、MS / MS について衝突誘起解離 (CID) を使用し、データ依存モードで LTQ-Orbitrap (top six MS / MS 法) 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、オンラインで分析した。それぞれのタンパク質の特徴は、Sequest ノードおよび Mascot ノード (Aboulaich et al., Biotechnol. Prog. 30: 1114 - 1124 (2014)) を備えた Proteome Discoverer v. 1.3 ソフトウェアにより、肺炎桿菌タンパク質配列データベース (UniProt) に対して質量スペクトルデータを検索することによって決定した。データベースはまた、ヒト IgG₁ タンパク質配列も含有した。1 タンパク質当たり最低 2 つの中程度または高度な信頼度の (Proteome Discoverer ソフトウェアの Peptide Validator ノードにおいて決定される) ペプチドがそれぞれのタンパク質を明確に同定するために必要とされた。

【0293】

組換え MrkA タンパク質発現

MrkA-his タグオープンリーディングフレーム (ORF) を合成し、発現ベクター pACYC-duet-1 (EMD Millipore) 中にクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) 細胞に形質転換した。クロラムフェニコール抵抗性のコロニーを選択し、150 μg / ml のクロラムフェニコールを含有する LB 培地中で増やした。OD (600 nm) が 0.4 に達したら、4 時間 37 °C で MrkA-his の発現を誘導するために、1 mM IPTG を培養物に追加した。細菌を B-PER により溶解し、MrkA-his の存在は、本明細書において記載される抗 his または MrkA 特異的 mAb を使用してウエスタンブロットによって調べた。

【0294】

MrkA タンパク質のインビトロにおける転写および翻訳

インビトロにおける発現のための MrkA の DNA 鋳型を PCR によって増幅した。鋳型は、MrkA ORF の 5' に T7 プロモーター、c-Myc タグ、および 3' に T7 ターミネーターを含む。250 ng の DNA 鋳型を、25 μl の反応混合物中で Disulfide Bond Enhancer (NEB E6820S) ありまたはなしの PURExpress インビトロタンパク質系 (NEB E6800) に追加し、反応ミックスを 2 時間 37 °C でインキュベートした。合成されたタンパク質は、本明細書において記載されるように抗 c-Myc および MrkA 特異的 mAb を使用してウエスタンブロットによって分析した。

【0295】

細菌感染モデル

C56 / BL6 マウスは、Jackson Laboratories から得て、特別な病原体なしの設備で維持した。動物実験は、すべて IACUC プロトコルおよびガイ

ダンスに従って行った。肺炎桿菌株は、一晚、寒天プレート上で成長させ、適切な濃度で食塩水中で希釈した。接種材料の力価は、攻撃前および後に、寒天プレート上に段階希釈した細菌を平板培養することによって決定した。抗体およびコントロールは、細菌感染の24時間前に投与した。臓器負担モデルについて、C57/b16マウスに、肺炎を誘導するために50 μ l 食塩水中1e7 CFU細菌を鼻腔内に接種した。肺細菌負担は、感染の24時間後にCFUを決定するために寒天プレート上に肺ホモジネートを平板培養することによって測定した。急性肺炎型では、C57/b16マウスに、それぞれ5e3 CFUもしくは1e8 CFUの肺炎桿菌43816株(O1:K2)または肺炎桿菌985048株を鼻腔内に接種した。Kp3およびヒトIgG1コントロール抗体は、細菌攻撃の1日前に与えた。マウスの生存は、8日目まで毎日モニターした。3つの実験について合わせた生存データをPrismでプロットした。

10

【0296】

統計分析

統計分析は、すべてGraphPad Prismバージョン6で実行した。細菌負担を比較するために、Kp3治療動物は、対応のないt検定によってヒトアイソタイプコントロール抗体治療動物と比較した。生存結果は、カプランマイヤー曲線としてプロットし、Log-rank(Mental-Cox)検定で分析した。

【0297】

実施例1：生きている肺炎桿菌に対するファージバニング

健康なドナーから得たヒトscFvライブラリ(Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-14(1996))は、肺炎桿菌特異的抗体を選択するために使用した。このプロセスは、特異的な抗原を使用するのではなく、機能的に関係のある標的を選択するために設計した。肺炎桿菌の莢膜多糖およびO抗原の非常に可変性の構造のために、莢膜およびO抗原欠失突然変異株43816DM(43816 cpsB WaaL)は、選択プロセスを、より保存されている表面抗原の方に向けるために生成した。親和性選択バニングの第1ラウンドを43816DMに対して実行し、その後、さらに2ラウンドのバニングを野生型分離株(1901および1899)の混合物に対して実行した。100倍超濃度が高くなったことが、3ラウンドのバニングにわたるアウトプット力価から観察された。

20

【0298】

この研究において使用したファージライブラリは、単鎖断片可変(scFv)ライブラリであった。scFvフォーマットは、特異的な結合に基づく予備的なスクリーニングに適切であるが、OPKがFc断片によって媒介されるエフェクター機能に依存するため、OPKなどの機能的スクリーニングフォーマットには適していない。したがって、第3ラウンドのバニングのアウトプットをscFv-Fcフォーマットにバッチ変換した。このプラットフォームは、細菌および哺乳類宿主の両方におけるscFv-Fc発現を可能にし、ハイスループットおよび機能的スクリーニングの両方の必要に適している。scFv-Fcクローンを細菌中で発現させ、結果として生じる上清を、3つの生きている肺炎桿菌野生型株への結合について試験した。合計3520のscFv-Fcクローンをスクリーニングし、400を超えるクローンが3つの肺炎桿菌分離株すべてに対して特異的な結合を示した。非特異的バインダーは、ELISAスクリーニング中にコントロールとして無関係の細菌を使用することによって除外した。シークエンシングにより2つの重要なファージ由来クローン、Kp3およびKp16が明らかになった。これらを哺乳類細胞においてscFv-Fcフォーマットで発現させ、OPK活性について試験した。IgG1に再フォーマットした後、それらは、全細菌ELISAにおいてKp29011に対する強い結合を保持し(図1A)、強力なOPK活性を示し(図1B)、様々な莢膜およびO抗原血清型を有する大部分の分離株に対する結合を示した(図1E)。Kp3およびKp16はまた、様々な血清型の肺炎桿菌のパネルに対してOPK活性を示した(図1F)。スペクトルの広い700の最近の肺炎桿菌臨床分離株によりさらに試験すると、Kp3は、62%を超える株に結合し、それらの大部分は多薬剤抵抗性の分離株であった。Kp3に

30

40

50

よって認識される代表的な肺炎桿菌臨床分離株のリストを表5に示す。

【0299】

【表5】

表5:多薬剤抵抗性の肺炎桿菌臨床分離株へのKp3の結合

地域	国	IHMA 番号	身体 場所	施設名
ヨーロッパ	イタリア	845670	呼吸器:気管内吸引液	小児科 ICU
ヨーロッパ	イタリア	845728	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ヨーロッパ	ポルトガル	845904	呼吸器:痰	内科 ICU
ヨーロッパ	ポルトガル	845927	INT:創傷	緊急救命室
ラテン アメリカ	アルゼンチン	847379	INT:皮膚潰瘍	内科 ICU
中東	イスラエル	849156	体液:腹膜	内科一般
中東	イスラエル	849584	INT:膿瘍	小児科 ICU
中東	イスラエル	849626	INT:創傷	内科一般
ヨーロッパ	ルーマニア	850438	INT:創傷	外科一般
ラテン アメリカ	チリ	866937	INT:創傷	他
中東	イスラエル	869311	呼吸器:気管支ブラッシング	内科 ICU
ヨーロッパ	ロシア	874876	呼吸器:痰	小児科 ICU
ヨーロッパ	イタリア	875928	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ラテン アメリカ	ブラジル	900678	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ヨーロッパ	ポルトガル	938176	呼吸器:痰	内科一般
ヨーロッパ	イタリア	946900	呼吸器:気管支ブラッシング	外科一般
ラテン アメリカ	コロンビア	960417	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科一般
北 アメリカ	アメリカ	961842	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科 ICU
北 アメリカ	アメリカ	977784	呼吸器:気管内吸引液	他
北 アメリカ	アメリカ	979288	呼吸器:痰	外科一般

10

20

30

【0300】

【表 6】

地域	国	IHMA 番号	身体 場所	施設名
北 アメリカ	アメリカ	979290	呼吸器:痰	内科 ICU
ラテン アメリカ	ベネズエラ	984342	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ヨーロッパ	ポーランド	985048	INT:創傷	外科一般
ラテン アメリカ	ブラジル	991499	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ラテン アメリカ	ブラジル	991947	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	外科一般
中東	イスラエル	994038	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
中東	イスラエル	994039	呼吸器:気管内吸引液	内科一般
アジア	中国	996004	呼吸器:痰	情報なし
アジア	中国	1032915	呼吸器:痰	内科一般
アフリカ	ケニア	1046198	呼吸器:他	内科 ICU
ヨーロッパ	ロシア	1049214	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	外科一般
ヨーロッパ	ロシア	1049391	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	外科 ICU
ヨーロッパ	ロシア	1049474	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	外科一般
北 アメリカ	アメリカ	1072280	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	外科 ICU
ラテン アメリカ	ベネズエラ	1073570	呼吸器:気管内吸引液	情報なし
ヨーロッパ	スペイン	1073956	呼吸器:気管支ブラッシング	内科 ICU
ヨーロッパ	スペイン	1073967	CVS:血液	内科一般
南太平洋	フィリピン	1079540	CVS:血液	小児科 ICU
南太平洋	フィリピン	1079544	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
アジア	タイ	1082632	INT:創傷	外科一般
アジア	韓国	1085601	呼吸器:痰	内科一般
アフリカ	南アフリカ	1088166	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ヨーロッパ	ベルギー	1089847	INT:創傷	内科 ICU
アフリカ	南アフリカ	1093894	体液:腹膜	全般的な不特定の ICU
ラテン アメリカ	アルゼンチン	1093960	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科 ICU
ラテン アメリカ	アルゼンチン	1093955	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科 ICU
ラテン アメリカ	アルゼンチン	1093975	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科 ICU
ラテン アメリカ	アルゼンチン	1093976	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科 ICU

10

20

30

40

【表 7】

地域	国	IHMA 番号	身体 場所	施設名
北 アメリカ	アメリカ	1094435	INT:創傷	内科一般
北 アメリカ	アメリカ	1103982	INT:創傷	内科 ICU
中東	クウェート	1104304	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ギリシア	1104866	体液:腹膜	内科一般
北 アメリカ	アメリカ	1105534	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科一般
アフリカ	ケニア	1106510	CVS:血液	外科 ICU
ラテン アメリカ	コロンビア	1109216	体液:腹膜	外科一般
ヨーロッパ	チェコ共和 国	1120042	呼吸器:痰	内科 ICU
ヨーロッパ	ベルギー	1130776	呼吸器:気管内吸引液	外科 ICU
ラテン アメリカ	チリ	1131115	CVS:血液	内科一般
ラテン アメリカ	チリ	1131124	CVS:血液	内科 ICU
ヨーロッパ	イタリア	1137983	GI:膿瘍	外科一般
ヨーロッパ	イタリア	1137984	呼吸器:気管支ブラッシング	内科 ICU
ラテン アメリカ	チリ	1145451	呼吸器:気管内吸引液	内科一般
ラテン アメリカ	チリ	1145452	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
北 アメリカ	アメリカ	1147892	呼吸器:気管内吸引液	内科一般
北 アメリカ	アメリカ	1147894	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ラテン アメリカ	チリ	847204	INT:創傷	外科一般
ラテン アメリカ	アルゼンチン	847694	未知	内科 ICU
ラテン アメリカ	アルゼンチン	847747	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
中東	イスラエル	849585	INT:創傷	内科一般
中東	イスラエル	849624	INT:創傷	内科一般
南太平洋	フィリピン	850793	SSI:膿瘍腔	他
北 アメリカ	アメリカ	863890	INT:床ずれ	情報なし
ヨーロッパ	イタリア	867822	体液:腹膜	外科一般
ヨーロッパ	ベルギー	869028	呼吸器:他	外科 ICU

10

20

30

40

【表 8】

地域	国	IHMA 番号	身体 場所	施設名
ヨーロッパ	ルーマニア	869918	呼吸器:痰	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ルーマニア	869921	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
北 アメリカ	アメリカ	873461	INT:創傷	外科 ICU
ヨーロッパ	ロシア	874316	呼吸器:痰	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ロシア	874329	呼吸器:他	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	イタリア	875926	呼吸器:痰	内科一般
ヨーロッパ	イタリア	875931	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科一般
ラテン アメリカ	コロンビア	884610	呼吸器:気管内吸引液	内科 ICU
ラテン アメリカ	コロンビア	884619	呼吸器:痰	外科一般
北 アメリカ	アメリカ	890567	体液:腹膜	他
アジア	タイ	894608	呼吸器:痰	内科 ICU
アジア	中国	896832	呼吸器:痰	内科一般
ラテン アメリカ	ブラジル	900681	INT:創傷	外科一般
ヨーロッパ	イタリア	918904	呼吸器:気管支肺胞洗浄液	内科一般
ヨーロッパ	イタリア	919877	呼吸器:痰	外科 ICU
ヨーロッパ	ギリシア	921044	呼吸器:痰	内科一般
ヨーロッパ	トルコ	926871	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	トルコ	926901	呼吸器:痰	内科一般
ヨーロッパ	ギリシア	927898	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ギリシア	927915	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ギリシア	927952	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU
ヨーロッパ	ギリシア	927963	呼吸器:気管内吸引液	全般的な不特定の ICU

【 0 3 0 3 】

実施例 2 : 肺炎桿菌に対するハイブリドーマ生成

43816DM (43816 cpsB WaaL) 株は、莢膜または LPS O 抗原と異なる抗原に対する抗体を誘起する目的で、マウスを免疫化するために使用した。突然変異株による初期の免疫後、最終的な追加免疫を、脾臓およびリンパ節をハイブリドーマ生成のために収集する前に野生型株 (1901 および 1899) の組み合わせにより実行した。結合による全細胞細菌スクリーニングは、交差反応性の抗体を同定するために、上記のファージパニングアプローチと同様に、ハイブリドーマ生成において初めに適用した

。試験したおよそ9000のハイブリドーマのうち、4つのハイブリドーマ(21G10、22B12、88D10、および89E10)が、試験した肺炎桿菌株に対して血清型非依存性の結合を示した(図1AおよびE)。

【0304】

実施例3：血清型非依存性のオプソニン作用による死滅(OPK)活性の実証

OPK活性を有する抗体は、インビボにおける防御機能と相関することが報告された。例えば、参照により本明細書に援用されるDi Giandomenico, et al., J Exp Med, 209:1273-87(2012)を参照されたい。表現型のスクリーニングを容易にするハイスループットOPKアッセイは適していた。およそ1000のハイブリドーマを抗生物質なしの培地中に維持し、OPK活性について試験した。次いで、OPKポジティブハイブリドーマをクローニングし、抗体精製のために増やした。これらの中で2つのハイブリドーマから得られた抗体(88D10、89E10)がOPK活性の増強を示し(図1B)、全細菌ELISAアッセイによって肺炎桿菌株に対する強い結合を示した(図1A)。

10

【0305】

OPKポジティブなファージおよびハイブリドーマ由来の抗体はまた、ELISAによって様々な莢膜およびO抗原血清型を有する肺炎桿菌株の選択パネルへの結合についても試験した(図1E)。ファージおよびハイブリドーマ由来の抗体は、同様の結合パターンを示し、すべて複数の莢膜およびO抗原血清型に結合した。

20

【0306】

ファージ由来のKp3抗体が、エクスビボにおいて成長させたクレブシエラに結合する能力も試験した。これらの実験では、クレブシエラ株は、37℃、250rpmで一晩、2xYTブロス中で培養した。次いで、培養物は、1:200に希釈し、対数期まで成長させた。5e8 CFU細菌は、腹腔内(エクスビボIP)または鼻内(エクスビボIN)ルートを通じてマウスに注射した。2時間後、マウスを犠牲死させ、細菌を肺ホモジネート、腹膜の洗浄液、または血液から単離した。これらの条件下で単離した細菌は、Kp3を使用して、FACS結合アッセイにかけた。下記の表6に示されるように、Kp3はまた、エクスビボにおいて成長させた複数のクレブシエラ血清型にも結合する(「+または++または+++」は、結合のレベルを示し、「-」は、結合しないことを示す)。

30

【0307】

【表 9】

表 6:Kp3 はエクスビボにおいて成長させたクレブシエラに結合する

クレブシエラ株	増殖条件	KP3
9178 (O3:K58)	2xYT プロス	++
	エクスビボ IP	++
	エクスビボ IN	+
29011 (O1:K2)	2xYT プロス	+++
	エクスビボ IP	+
9148 (O2:K28)	2xYT プロス	++
	エクスビボ IP	+
	エクスビボ IN	+
5046 (O2:K3)	インビトロ	-
	エクスビボ IN	-
9177 (O5:K57)	インビトロ	++
	エクスビボ IP	+
	エクスビボ IN	+
3048554 (KPC)	2xYT プロス	++
	エクスビボ IP	++

10

20

30

【0308】

実施例 4 : M r k A 抗原の同定

2つのファージ (K p 3 および K p 1 6) ならびに 4つのハイブリドーマクローン (8 8 D 1 0、8 9 E 1 0、2 1 G 1 0、および 2 2 B 1 2) の同様の結合パターン (図 1 E を参照されたい) が、それらが同じ抗原を認識する可能性についての調査を促した。これらの競合 E L I S A 実験では、1 μ g / m l のビオチン標識抗体 (図 1 C の K p 3 または図 1 D の 8 8 D 1 0) を増加性の量の K p 3 または K p 1 6 と混合し (図 1 に示されるように)、肺炎桿菌に対するその結合について試験した。抗マウス I g G - H R P を検出剤として使用した。E L I S A シグナルの低下を阻害のパーセンテージとして表現した。競合 E L I S A は、それらがすべて、試験した肺炎桿菌分離株への結合について互いに競合したことを示し、同じ抗原上の重複するエピトープにそれらが結合することを示した (図 1 C および 1 D)。

40

50

【0309】

結合分析前の全細胞プロテアーゼ処理により、mAb Kp3および88D10の反応性がなくなった。これは、これらの抗体の標的がタンパク質であろうことを示す。線毛に類似している突き出ている繊維状の細胞表面構造が視覚化されたように、Kp3染色を使用する共焦点顕微鏡によって抗原標的が肺炎桿菌の表面上に位置することも確認された（図2A）。

【0310】

次いで、免疫沈降を、mAb結合抗原標的を単離するために使用した。これらの実験において、細胞溶解物を非反応性（1899）および反応性（43816DM）の株から調製し、Kp3、88D10、およびアイソタイプ抗体コントロールによる免疫沈降にかけた。免疫沈降産物を分けて二等分し、還元条件下で2つの4～12% SDS-PAGEゲル上で分離した。一方のゲルは、青色染色によって分析した。他方の同一のゲルは、PVDF膜に転写し、検出抗体としてビオチン化88D10、1およびKp3の混合物を使用してウェスタン分析にかけた。

10

【0311】

コントロール抗体と比較して、Kp3および88D10は4つの主なタンパク質バンドを捕捉し、バンド1はネガティブコントロール分離株1899由来のものであった（図2B）。それらの中でバンド番号3は、ウェスタンブロット分析においてKp3に対して反応性である（図2C）。4つのバンドすべてを切り取り、LC-MS分析にかけた。完全MrkA配列の50%以上を包含するペプチドが回収されたため、最も目立つタンパク質バンド（図2Bバンド#3）がMrkAとして同定された。質量分析法によって同定したMrkAペプチドに図2Dにおいて太字で下線を引く。他方の目立つバンド（図2Bバンド#2）は、MrkA線毛サブユニットのフォールディングおよび細胞膜周辺腔を通る輸送を容易にするシャペロンタンパク質であるMrkBとして同定された（Chan et al., Langmuir 28:7428-35 (2012); Burmölle et al., Microbiology 154:187-95 (2008)）。最も目立たなかったバンド（図2Bバンド#4）およびネガティブコントロール分離株から単離されたバンド（図2Bバンド#1）は、いかなる特異的細胞表面局在化タンパク質も同定しなかった。

20

【0312】

30

実施例5：抗原としてのMrkAの確認

MrkAは、LC-MSによって図2BバンドNo. 3から同定された単一のタンパク質種であったが、MrkAについて予測されるMW（約20kDa）およびSDS-PAGEによる見かけ上のMW（60～200kDa）に明らかな差異があった（図2BおよびC）。B群連鎖球菌のアルファタンパク質CおよびMrkAを含む、梯子状に現れる細菌表面タンパク質が以前に報告された。Chan et al., Langmuir 28:7428-35 (2012) and Langstraet et al., Infect. Immun. 69:5805-12 (2001)を参照されたい。抗原の特徴をさらに確認するために、組換えMrkAを、肺炎桿菌MGH78578の公開MrkA配列に基づいて大腸菌において発現させた。詳細に述べると、UniProtデータベース由来の株MGH78578のMrkA ORFを発現ベクター中にクローニングし、BL21細胞において発現させた。次いで、溶解物をB-PERを使用して調製し、抗hisタグまたはKp3を使用してウェスタンブロット分析にかけた。内因性MrkAと同様に、組換えMrkAは、60kDa～200kDa超の見かけ上のサイズの範囲にわたるバンドを含む梯子状のパターンを示した（図3A）。興味深いことに、抗his抗体は、単量体およびオリゴマーMrkAの両方を認識したが、Kp3は、オリゴマー形態のみを認識した。MrkA mAb標的の特徴も、共焦点実験において示される線毛構造と一致する（図2A）。組換えMrkAはまた、異なる実験条件下でインビトロ転写および翻訳系でc-Mycタグと共に発現させ、産物をウェスタンブロット分析にかけた。抗Myc検出によって示されるように、インビトロ発現系は、MrkA単量体タンパク質を主に産生

40

50

した(図3B)。Kp3は、細菌細胞溶解物中に存在する、より高分子量のバンドを認識したが(図3B、試料1)、それはMrkA単量体を検出することができなかった。これは、Kp3が、III型線毛における高次のMrkA構造に結合することおよびMrkAの構築には、この研究において使用されるインビトロ発現系において欠けている他の細胞構成要素または条件の寄与が必要とされ得ることを示唆する。

【0313】

実施例6：抗MrkA抗体はインビボにおいて肺炎桿菌からマウスを防御する

本明細書において開示される抗MrkA抗体による優れた血清型非依存性のOPK活性およびバイオフィルム予防を考慮して、2つの主なO血清型株による肺炎桿菌感染症のマウスモデルにおいてKp3を評価した。様々な臨床肺炎桿菌分離株の毒性は、免疫応答性マウスにおいて劇的に変動する。評価した大部分の分離株は、わずかな例外を除いて、急性肺炎モデルにおいて高接種用量(1e9CFU/マウス)でさえ有毒とならなかった。そのため、臓器負担モデルを、複数の分離株に対する抗MrkA抗体の効能を実証するために採用した。これらの実験では、マウスは、1e7CFUの細菌による鼻内感染の24時間前にIP投与による抗体の単回投与を受けた。次いで、マウスを犠牲死させ、感染した肺における菌の数を評価した。15mg/kg(mpk)のKp3は、Kp29011(O1:K2)およびKp9178(O3:K58)に感染したマウスにおける肺負担を有意に低下させた(図4Aおよび4B)。Kp43816に対するヒトIgG1ウサギポリクローナル抗体をコントロールとして使用した。抗体用量漸増法は、15mpkが最善の防御をもたらしたことを示し、用量をより多くしてもさらなる有益性がもたらされることはなかった。

【0314】

Kp3はまた、Kp43816、有毒なO1:K2株(図4C)、または最近単離された臨床多薬剤抵抗性株であるKp985048(図4D)を使用して、致命的な肺炎モデルでも試験した。このモデルでは、5e3CFU(Kp43816)または1e8CFU(Kp985048)の細菌を抗体投与の24時間後に鼻腔内に与えた。マウスを感染の8日後までモニターした。MAb Kp3は、これらのモデルにおいて有意な防御効果を示した(図4Cおよび4D)。

【0315】

これらのデータは、抗MrkA抗体のOPK活性が細菌負担を低下させ、かつ肺炎桿菌の複数の血清型に感染したマウスの生存を強化するそれらの能力に寄与し得ることを示す。

【0316】

実施例7：MrkAエピトープの同定

MrkA欠失を生成するために、40アミノ酸N末端欠失(「MrkA-N-dlt」)、32アミノ酸C末端欠失(「MrkA-C-dlt」)、ならびにNおよびC末端欠失の組み合わせ(「MrkA-N/C-dlt」)を有するMrkA遺伝子配列をC末端にHisタグが追加されたpCABNTAB6(GE Healthcare)細菌発現ベクター中にクローニングした。単一のコロニーを選択し、100ユニットのカルベニシリンを補足したLB中に接種した。細菌を250rpm、37℃で培養した。OD600が0.4~0.6に達したら、IPTGを1mMの最終濃度まで追加し、細菌をさらに3時間培養した。次いで、細菌細胞を収集し、B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent(Thermo Scientific)を使用して溶解にかけた。透明な細胞溶解物を、ELISAプレートにコーティングするために直接使用し、Kp3の結合を、標準的なELISAの手順を使用して測定した。ヒトIgG1および関係がない抗MrkA抗体をコントロールとして使用した。図6に示されるように、Kp3は、完全長MrkAのみ検出し、MrkA-N-dlt;すなわち、配列番号17のアミノ酸41~202(すなわち配列番号26)、MrkA-C-dlt;すなわち、配列番号17のアミノ酸1~170(すなわち配列番号27)、またはMrkA-N/C-dlt;すなわち、配列番号17のアミノ酸41~170(すなわち配列

番号28)のいずれにも結合しなかった。対照的に、コントロール抗MrkA抗体は、完全長MrkAおよびN末端欠失を有するMrkAを検出した(データ示さず)。これらの結果は、Kp3が立体エピトープを認識することを示す。

【0317】

実施例8:単量体およびポリマーMrkAは細菌攻撃モデルにおける臓器負担を低下させる

予防の治療における抗MrkA mAbの血清型非依存性防御活性を考慮して、精製MrkAがワクチン抗原として防御を付与する能力について試験した。組換えMrkAタンパク質は、単量体およびポリマー形態の両方で存在する(図3A)。防御免疫を誘導する際の単量体およびオリゴマーMrkAタンパク質の役割を評価するために、単量体およびポリマー種の両方をカラム分画によって精製した。手短かに言えば、MrkAを大規模で発現させ、MrkAの成熟形態(配列番号17)を、N端6xHisタグとインフレーションでpET28(Novagen)中にクローニングした。タンパク質を宿主BL21-DE3大腸菌株によって発現させた。形質転換細胞を0.6のOD600に達するまで250RPMで振盪させながら37℃でTerrific Broth(Corning)+カナマイシン(50μg/ml)中で成長させた。IPTG(1M)(Invitrogen)を培養物に追加して最終濃度を1mMにし、培養物をさらに4時間インキュベートした。細胞を遠心分離(10分間12,000Xg)によって回収し、細胞ペレットを精製まで-80℃で保存した。MrkA精製のために、細胞ペレットを氷上で解凍し、B-PERを使用して溶解し、不溶性の封入体画分を遠心分離によって収集し、可溶化バッファ(10mM Tris、pH8、100mMリン酸ナトリウム、8M尿素、1mM DTT)中に再懸濁した。可溶化された封入体を10℃で15分間27,000xgで遠心分離によって清澄化し、次いで、可溶化バッファにより平衡化した5ml HisTrap HPカラム(GE Healthcare)にロードした。フロースルーおよび溶出した画分の両方を収集し、記載されるプロトコールに従ってリフォールディングにかけた。リフォールディングした混合物を、HisTrapカラムにロードし、500mM NaClを有する25mMリン酸ナトリウム、pH7.4中500mMイミダゾールまでの直線勾配で溶出した。単量体MrkAは、勾配(およそ150mMイミダゾール)で初めに収集され、オリゴマー種は、勾配(およそ250mMイミダゾール)で後に収集された。それぞれのプールをVivaspin 5 K MWCODデバイス(Vivascience)により濃縮し、100mM NaClを有する10mM Tris、pH7.5中に透析した。

【0318】

透析によってリフォールディングするために、試料を3容量のDilution Buffer[10mM Tris、100mMリン酸ナトリウム、1mM EDTA、5mMシステアミン、0.5mMシスタミン、pH8]により希釈した。それらを4℃で一晩混合した。それらを4℃でリフォールディングバッファ(EDTAなしのDilution Buffer)中に透析し(2回交換)、次いで1xPBS、pH7.2中に透析した。透析した試料を、HisTrapを使用して精製した(500mM NaClを有する25mMリン酸ナトリウム、pH7.4中500mMイミダゾールまで直線勾配で溶出)。

【0319】

第1のローディングステップ中にカラム中に保持されたMrkAは、ほとんどオリゴマーMrkAを含有した。それを、上記に記載されるようにカラム上でリフォールディングし、溶出し、濃縮した。封入体からの精製により、高純度の単量体およびオリゴマーMrkAがもたらされ(図7)、これを続く免疫実験において使用した。

【0320】

精製し、濃縮した単量体およびオリゴマーMrkAをマウスにワクチン接種するために使用した。6~8週齢C57/bl6マウスに、フロインドアジュバントを有する15マイクログラムの単量体またはポリマーMrkAの皮下注射を通して3回ワクチン接種した

。3回目の感染後、Mrk Aに対する強い血清力価が検出された。次いで、マウスは、第3の免疫後に 1.4×10^7 CFU Kp 29011 (O1:K2)を鼻腔内に抗原投与した(4週目)。感染の24時間後、肺および肝臓を1 mLのPBS中でホモジナイズし、ホモジネートのCFU/mLを計算するためにLB寒天プレート上で平板培養した。

【0321】

図8に示される結果は、アジュバントコントロール群(PBS-CFA/IFA)と比較して、単量体およびオリゴマーMrk Aのワクチン接種の両方が細菌攻撃後に臓器負担を低下させたことを実証し、Mrk Aがワクチン抗原として防御を付与し得ることを示唆する。単量体Mrk Aは、肺において細菌を有意に低下させ、オリゴマーMrk Aは、肺および肝臓の両方において細菌を有意に低下させた(図8A~B)。したがって、これらの結果は、単量体および/またはオリゴマーMrk Aによるワクチン接種がクレブシエラ臓器負担を低下させることを実証する。

【0322】

実施例9：抗Mrk A抗体はバイオフィーム形成および細胞吸着を阻害する

抗Mrk A抗体がバイオフィーム形成を阻害するかどうかを決定するために、バイオフィームアッセイを、変更を加えたWilksch et al., (PLoS Pathogens 7(8):e1002204(2011))に従って実行した。肺炎桿菌43816を増殖させて対数期の培養物にし、0.1に等しいOD₆₅₀となるように最少培地(RPMI-1%BSA)中に希釈した。三通り、細菌を、Kp3またはhIgG1(アイソタイプコントロール)抗体の一連の希釈液を有する平底96ウェルマイクロタイタープレート(Falcon; BD Biosciences)中でインキュベートした。37℃、120rpmでの2時間のインキュベーション後、浮遊性の細菌を洗い流し、ウェルを蒸留水により洗浄した。ウェル表面に結合したバイオフィームは、150μLの0.1%(wt/vol)クリスタルバイオレット溶液により室温で15分間染色した。クリスタルバイオレット溶液をデカントし、非結合色素を徹底的に除去するためにウェルを続いて洗浄した。結合した色素は、200μL 95%エタノールにより可溶化し、595nmで吸光度を測定することによって定量化した。増殖培地のみを含有するウェルは、阻害のパーセンテージを計算するためにネガティブコントロールとして使用した。細菌が宿主組織または非生物表面にコロニーを形成し、微小コロニー、群集、またはバイオフィームを形成する能力は、細菌感染症の病原および持続に重要な役割を果たす。Gupta et al.,

“Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review.” Arch Microbiol. 2015 Sep 16。肺炎桿菌におけるIII型線毛は、真核細胞および非生物表面への粘着を媒介する、繊維状の付属器である。主な線毛サブユニットであるMrk Aは、バイオフィーム形成を容易にすることが以前に示されたが、アドヘシン(MrkD)は示されなかった(Langstraet et al., Infect Immun 2001; 69:5805-12)。抗Mrk A抗体が細菌表面のMrk Aに結合し、続いてバイオフィーム形成をブロックするかどうかを決定するために、抗Mrk A mAb Kp3またはヒトIgG1コントロール抗体の存在下における非生物プレートへの細菌吸着を測定した。Kp3は、用量依存的な方法でクレブシエラ43816株によるバイオフィーム形成を有意にブロックした(図9)。したがって、図9に示される結果は、抗Mrk A Kp3抗体がクレブシエラバイオフィーム形成を阻害することを実証する。

【0323】

III型線毛の他の重要な特徴は、感染の定着に至る宿主組織のクレブシエラコロニー形成を容易にすることである。抗Mrk A mAb Kp3が肺上皮細胞とのクレブシエラの結合を予防したかどうかを試験するために、細胞吸着アッセイも実行した。手短かに言えば、これらの実験では、Kp3またはhIgG1(アイソタイプコントロール)抗体を、不透明な96ウェルプレート(Nunc Nunc lon Delta)において増

殖させたコンフルエントな A 5 4 9 細胞に追加した。対数期発光性肺炎桿菌 4 3 8 1 6 を 5 0 の感染多重度 (M O I) で追加した。9 0 分間の 3 7 °C でのインキュベーション後、細胞を洗浄し、その後、0 . 0 5 m l の 2 × Y T + 0 . 5 % グルコースを追加した。細菌 R L U は、3 7 °C での 1 5 分のインキュベーション後に E n v i s i o n M u l t i l a b e l プレート読み取り装置 (P e r k i n E l m e r) を使用して定量化した。図 1 0 に示されるように、K p 3 は、A 5 4 9 ヒト肺の上皮細胞への肺炎桿菌の吸着を有意に低下させ、それにより、抗 M r k A K p 3 抗体が上皮細胞へのクレブシエラの結合を阻害することを実証する。

【 0 3 2 4 】

考察

標的不可知論的 (t a r g e t a g n o s t i c) 戦略は、肺炎桿菌感染症の治療のための交差防御抗体を同定するために適用した。肺炎桿菌を標的にする交差反応性の抗体を同定する著しい努力がなされてきたが、そのような治療薬の開発には、大きな障壁がある。C P S および L P S を含む、十分に検証された抗体標的は、血清型特異的であり、そのため、広範な株を対象とするために複数の抗体を必要とする。この課題は、より保存された表面抗原に注目するために C P S および L P S O 抗原欠失変異体を構築することによって改善された。全細菌結合アッセイおよびよりハイスループットな O P K アッセイを利用することにより、クレブシエラに対する著しいインビトロおよびインビボ効能を示す、ハイブリドーマおよびファージディスプレイプラットフォームの両方からの抗 M r k A 抗体が同定された。

【 0 3 2 5 】

M r k A は、I I I 型線毛複合体の主なタンパク質であり、宿主細胞吸着およびバイオフィルム形成 (M u r p h y e t a l . , F u t u r e M i c r o b i o l 2 0 1 2 ; 7 : 9 9 1 - 1 0 0 2 を参照されたい)、感染を確立するために病原菌が使用する戦略 (B u r m o l l e e t a l . , M i c r o b i o l o g y 2 0 0 8 ; 1 5 4 : 1 8 7 - 9 5) に関係してきた。1 つの概念実証実験では、精製 I I I 型線毛により免疫化されたマウスは、続く肺炎桿菌攻撃に対して比較的低い抗原投与量にすぎないにもかかわらず抵抗性を示した (L a v e n d e r e t a l . , I n t e r n a t i o n a l j o u r n a l o f m e d i c a l m i c r o b i o l o g y 2 0 0 5 ; 2 9 5 : 1 5 3 - 9) 。体液性免疫は、防御メカニズムとして関係したが、防御を誘起した抗原成分は、解明されなかった。本明細書において開示される抗 M r k A モノクローナル抗体は、複数のメカニズムを通して免疫防御に寄与する。第 1 に、抗 M r k A m A b は、肺細胞株への細菌吸着およびバイオフィルム形成を低下させ、これは、続いて、宿主組織に対する細菌コロニー形成を低下させ、細菌除去を容易にし得る。第 2 に、抗 M r k A m A b は、血清型に非依存性の O P K 活性の強い向上を示した。O P K 活性は、細菌負担を低下させ、肺炎桿菌の複数の血清型に感染したマウスにおける生存を強化するのを支援し得る。興味深いことに、I I I 型線毛アドヘンシタンパク質 M r k D に対する抗体は、抗 M r k A m A b と同様に、複数の肺炎桿菌株に対して交差反応性を示したが、O P K を誘導せず、インビボにおいて防御を付与しなかった (データ示さず) 。これにより、O P K 活性が、これらの抗体についてのインビボにおける防御に必要となり得ることがさらに確認された。

【 0 3 2 6 】

抗体治療標的としての M r k A の有望な特徴は、様々な分離株間での高度な配列保存および細胞外標的としての全体的な接近容易性である。2 つの最も重要な病原性分離株である肺炎桿菌および K . オキシトカ由来の M r k A は、9 5 % の相同性を有し、腸内細菌科の代表的なメンバー間の相同性は、他のものと非常に異なるエンテロバクター・クロアカを除いて、9 0 % を超える (図 5) 。さらなる研究が、他のメンバー由来の M r k A 配列を広範囲に調査するために必要である。しかしながら、これは、M r k A ベースの抗肺炎桿菌および全グラム陰性 (p a n G r a m n e g a t i v e) 戦略を開発する有望な機会を提供する。

10

20

30

40

50

【0327】

2つの異なるプラットフォームから単離された抗MrkA抗体が、同様のエピトープを標的にすることにおいてよく類似していることは注目に値する。これは、ハイブリドーマおよびファージ作戦から結果として生じる抗体が様々なエピトープを標的にしたことを示す最近の報告と全く対照的である(Rossant et al., mAbs 2014; 6:1425-38)。エピトープは、事実上、立体エピトープと思われる。それは、本明細書において開示される同定された機能的抗体がオリゴマーMrkA上に主に存在するエピトープを認識するという発見と一致している。精製単量体および多量体MrkA抗原によるワクチン接種研究は、両方の形態の抗原が防御免疫を誘導し得ることを示唆した。これらの観察は、MrkAベースの治療薬およびワクチンの開発にとって重要な意味合いを有し得る。

10

【0328】

要約すると、これらの研究は、抗体の機能的スクリーニングが肺炎桿菌に対する治療薬の開発および新たな標的発見における強力なツールとなることをさらに実証する。MrkAおよび抗MrkA抗体を巡るこの研究から生成された多くの情報は、肺炎桿菌病原の分野にとって有用であるはずであり、肺炎桿菌および他の重度の細菌感染に対処する際に集積されるべきである。

【0329】

実施例10：組換えMrkAタンパク質に対するファージライブラリのパニング

さらなる抗MrkA抗体は、精製組換えMrkAタンパク質に対してナイーブヒト単鎖可変断片(scFv)抗体ファージライブラリをパニングすることによって同定した。

20

【0330】

組換えMrkAタンパク質を調製するために、材料および方法のセクションにおいて記載されるものに変更を加えて、hisタグ付加組換えMrkAを発現させ、精製した。大腸菌宿主株BL21(DE3)において発現されたMrkAは、主として封入体中にとどまった。8モルの尿素を含有するバッファーを、MrkAを可溶化するために使用し、hisタグ付加MrkAは、変性MrkAをアフィニティーカラムに直接ロードし、最初にリフォールディングせずに変性条件下で精製した以外は、前に記載されるようにHisTrap HPカラム(GE Healthcare)を使用して精製した(参照により本明細書に援用されるWang, Q. et al., 2016. Target Agnostic Identification of Functional Monoclonal Antibodies Against Klebsiella pneumoniae Multimeric MrkA Fimbrial Subunit. Journal of Infectious Diseases, 213(11):1800-1808を参照されたい)。単量体およびオリゴマーMrkAは、さらなる分離を伴うことなく一緒に溶出した。溶出したMrkA画分を収集し、PBSバッファーに対して透析して、ビオチン標識およびパニングの準備を整えた。ビオチン標識のために、Pierceの標識キットを使用し、メーカーのプロトコールに従った。

30

【0331】

パニング選択は、Lillo, A.M. et al. ("Development of phage-based single chain Fv antibody reagents for detection of Yersinia pestis," PLoS One 6:e27756 (2011))において記載されるものに変更を加えて、Kingfisher自動化システムを使用して、溶液のフォーマットで実行した。この研究において使用されるナイーブscFvファージディスプレイライブラリは、Vaughan T.J. et al. ("Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library," Nat Biotechnol 14:309-314 (1996))において前に記載された。パニング抗原MrkAをビオチン化し、0.3 µgを最初の2ラ

40

50

ウンドの各パニングに使用した。第3ラウンドを必要とした選択について、ビオチン化MrkAは、 $0.1\mu\text{g}$ まで低下させた。ファージアウトプットが第1ラウンドと比較して100倍超まで改善したら、パニング選択を停止し、ハイスループットスクリーニングを開始した。

【0332】

スクリーニングの第1ラウンドは、MrkAに対する特異的な結合に基づいた。大腸菌株Top10(Invitrogen)においてpSplice.V5ベクターを通して発現させたscFv.Fcは、特異的なバインダーをスクリーニングするために均一性時間分解蛍光法(HTRF)に基づいたアッセイにおいて使用した(Xiao X, et al., "A Novel Dual Expression Platform for High Throughput Functional Screening of Phage Libraries in Product like Format," PLoS One 10:e0140691 (2015); Newton P. et al., "Development of a homogeneous high-throughput screening assay for biological inhibitors of human rhinovirus infection." J Biomol Screen 18:237-246 (2013))。結果として生じるMrkA特異的バインダーを1つにまとめ、配列決定した。ユニークなクローンは、前に記載されるように、哺乳類細胞トランスフェクション、scFv.Fc発現、およびOPK分析のためのプラスミドを調製するために使用した(Xiao X, et al., "A Novel Dual Expression Platform for High Throughput Functional Screening of Phage Libraries in Product like Format," PLoS One 10:e0140691 (2015)を参照されたい)。

10

20

30

【0333】

パニングの目的のために、単量体MrkAは、オリゴマーMrkAから分離しなかった。選択の第2または第3のラウンド後、パニングアウトプットは、第1ラウンドと比較して、100倍超改善した。パニングアウトプットは、pSplice.V5においてscFv.Fcに変換し、上記に記載され、かつ図11に概説されるようにハイスループットスクリーニングにかけ、均一性時間分解蛍光法(HTRF)プロセスは、図12においてさらに説明する。4000を超えるコロニーから始めて、様々なエピトープに結合する様々なMrkA特異的、OPKポジティブな4つの抗体を同定した。これらの4つの抗体をヒトIgG1フォーマットに変換し、下記に記載されるようにさらなる特徴付けをした。それらを抗MrkAクローン1、4、5、および6と名付ける。

40

【0334】

実施例11：抗MrkAクローン1、4、5、および6の特徴付け

ポジティブなOPK活性を示すそれらのscFv.Fcクローンは、それらの見かけ上の親和性および関連する結合エピトープを評価するためにバイオレイヤー干渉法(BLI)アッセイに基づいてピニングした。

40

【0335】

親和性測定のために、2つの異なるフォーマットを使用した。第1に、単量体およびオリゴマーMrkAの混合物に対するIgGを使用した。第2に、単量体MrkAに対するFabを使用した。ForteBio Octet QK384機器は、抗MrkA mAbの反応速度について研究するために使用した。アッセイは、すべて30のForteBio 10x kinetic buffer中200 μl /ウェルで行った。 $0.3\mu\text{g/ml}$ のビオチン化MrkAを400秒間、ストレプトアビジンバイオセンサー(SA)の表面上にロードし、 $1.0\sim 1.5\text{nm}$ のレベルに達した後、300秒間のバイオセンサー洗浄ステップを続けた。溶液中の個々のmAb($0.274\sim 200\text{nM}$)に対するバイオセンサー上のMrkAの結合を600秒間分析した。相互作用の解離を600秒間調べた。リガンドをロードしたが分析物なしでインキュベートしたセンサーについて

50

記録したシフトを差し引くことにより、いかなる規則的なベースラインドリフトも修正した。Octet Data Analysisソフトウェアバージョン8.0は、1:1相互作用モデルに利用可能な結合方程式を用いてカーブフィッティングに使用した。網羅的分析は、非線形最小二乗フィッティングを使用して行った。データについての適合度は、生成された残差プロット、 R^2 、および χ^2 値によって評価した。

【0336】

4つのクローン1、4、5、および6は、293 free style cell (Invitrogen)においてヒトIgG1として発現させ、精製した。それらは頑健な(robust)結合活性を維持したが、ELISAフォーマットは結合に有意に影響を与えた。それらの見かけ上の親和性は、IgGフォーマットにおいてBLIアプローチによって測定されるように、3~10 nMである(図13および表7)。ウエスタンブロットデータは、クローン1のみが単量体MrkAを検出することができたのに対して、他のいずれも検出することができなかったことを示した(図14)。

【0337】

【表10】

表7:単量体および多量体 MrkA の混合物に対する
IgG フォーマットにおける K_D の測定

IgG	K_D	K_{on} ($\times 10^4$ 1/Ms)	K_{off} ($\times 10^{-4}$ 1/s)	R^2
クローン1	3.25 nM	5.3	1.7×10^{-4}	0.989
クローン4	3.61 nM	4.06	1.46×10^{-4}	0.985
クローン5	3.54 nM	2.6	9.2×10^{-5}	0.996
クローン6	8.80 nM	2.2	2.0×10^{-4}	0.996
KP3	0.15 nM	7.6	1.2×10^{-5}	0.993

【0338】

MrkAは、とりわけ突然変異に対して不耐性であり、MrkA由来の断片のサブクローンおよび発現は、多くの場合、発現をもたらさなかった。したがって、突然変異分析は、エピトープ分析に適した方法ではない。その代わりに、mAbのエピトープの相対的な位置を研究するためのBLIベースのアプローチを使用した。エピトープマッピングは、ForteBio Octet QK384で行った。ビオチン化MrkAをストレプトアビジンバイオセンサー上に捕捉し、600秒間200 nMの飽和濃度で試験mAbによりコーティングした。他のmAbのエピトープは、等濃度の試験mAbと一緒に100 nMのそれぞれの他のmAbにおいて試験mAbコーティングバイオセンサーをアッセイすることにより、試験mAbに関連して調べた。グラフはすべて重ね合わせ、ベースラインでそろえた。

【0339】

マッピング実験では、IgGクローン1は、他のすべてとは異なるエピトープに結合するように思われるのに対して、IgGクローン4、5、6、およびKP3は、様々なマッピング構成によって明らかにされるように、程度は限られているが重複するエピトープに結合した(図15)。ペプチドスクリーニング実験では、抗体のいずれも、MrkAの全長を包含する重複ペプチドアレイを認識しなかった。

【 0 3 4 0 】

単量体 MrkA を 4 つのクローンの Fab フォーマットに対して BLI アッセイにおいて使用した場合、クローン 1 および 5 のみが異なるレベルで結合活性を保持したのに対して、クローン 4 および KP3 は結合を全体的に失ったことを発見したことは驚くべきことであった（表 8）。

【 0 3 4 1 】

【表 1 1】

表 8: 単量体 MrkA に対する Fab フォーマットにおける K_D 測定。ND、検出できない; N/A、該当しない。

Fab	K_D	$K_{on} (x 10^6 1/Ms)$	$K_{off} (x 10^{-3} 1/s)$	R^2
クローン 1	2.76 nM	0.15	0.34	0.998
クローン 4	ND	ND	N/A	--
クローン 5	1520 nM	0.05	78.2	0.997
KP3	ND	ND	N/A	--

10

【 0 3 4 2 】

これらのデータは、クローン 4、5、および 6 ならびに KP3 がオリゴマー MrkA 上の重複エピトープに結合するのに対して、クローン 1 は、MrkA の非重複エピトープおよび単量体 MrkA に結合することを実証する。

20

【 0 3 4 3 】

実施例 12：OPK 活性はインビボにおける防御にとって重要である

インビボにおける防御における OPK 活性の役割を理解するために、KP3 IgG を生成した。それは、そのエフェクター機能をなくす TM 突然変異を含有した (Oganesyan V. et al, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 64:700-704 (2008))。OPK 活性は、有意に低下し (図 16、上のパネル)、OPK 活性における低下は、インビボ予防処置防御攻撃モデルにおける低下と一致した。しかしながら、OPK 活性もインビボにおける防御も完全にはなくならなかった (図 16、下のパネル)。これらのデータは、OPK が抗 MrkA 抗体 KP3 の防御メカニズムにとって重要であることを示す。

30

【 0 3 4 4 】

実施例 13：フローサイトメトリーによって例証される生きている細菌への抗体結合

クローンが肺炎桿菌「KP」に結合するかどうかを決定するために、フローサイトメトリー分析を、様々な血清型の生きている細菌に対して実行した。これらのアッセイでは、細菌を一晩、 $2 \times Y T$ プロス中で培養し、次いで、 2×10^7 CFU/mL のおよその濃度まで FACS バッファー (0.5% のウシ血清アルブミンを有する PBS) 中に希釈した。細菌 (1×10^6) は、穏やかに振盪させながら 4℃ で 1 時間、抗 MrkA 抗体またはネガティブコントロール抗体と共にインキュベートした。プレートを FACS バッファーにより洗浄し、遠心分離し (3500 rpm、5 分)、その後、Alexa Fluor 647 ヤギ抗ヒト IgG 二次抗体 (Life Technologies) と共にインキュベーションを続けた。プレートは、穏やかに振盪させながら 4℃ で 1 時間、暗中でインキュベートし、FACS バッファーにより 2 度洗浄した。試料は、BD LSR II (BD Biosciences) で測定し、FlowJo を使用して分析した。

40

【 0 3 4 5 】

4 つのクローン 1、4、5、および 6 は、すべて試験した 3 つの分離株を認識した。たとえ、それぞれの抗体による様々な分離株への結合パターンに明らかな差異があったとしても、抗体の中で有意差はなかった (図 17)。さらに、選択した分離株を鼻内ルートに

50

よって接種し、気管支肺胞洗浄液を感染の3時間後に収集した。これらのインビボ継代細菌に結合する抗MrkA抗体を次いで分析した。結果により、抗MrkA mAbは、インビトロにおける培養により増殖させた細菌と同様に、インビボにおいて増殖させた細菌に結合することが確認された。要するに、抗MrkA抗体は、広範囲に収集されたKP分離株に明確に結合した。

【0346】

実施例14：OPKアッセイによる抗体特徴付け

OPK活性を特徴付けるために、クローン1、4、5、および6を含むそれぞれのピンンググループ由来の代表的なクローンをIgG1に変換し、発現させ、精製し、前に記載されるようにOPKアッセイにおいて分析した。手短かに言えば、発光性KP株(Lux)の対数期培養物を約 2×10^6 細胞/mlまで希釈した。細菌、補体を提供する希釈仔ウサギ血清(Cedarlane、1:10)、ジメチルホルムアミド(DMF)、分化HL-60細胞または新たに単離された多形核白血球(PMN)細胞、および抗MrkA IgGを96ウェルプレート中で混合し、振盪させながら(250rpm)2時間37でインキュベートした。次いで、相対発光単位(RLU)をEnvision Multilabelプレート読み取り装置(Perkin Elmer)を使用して測定した。死滅のパーセンテージは、抗KP mAbおよびネガティブコントロールmAbから得られたRLUと抗体なしのアッセイから得られたRLUを比較することによって決定した。

10

【0347】

クローン1、4、5、および6は、スクリーニングプロセス中にscFv-Fcフォーマットにおいてそれらの異なるエピトープおよびそれらのポジティブOPK活性のためにさらなる分析のために選択した。OPK分析は、それらのIgG1対応物を用いて実行し、それらはすべて様々な血清型のKPに対するKP3のOPK活性と同等の強力なOPK活性を示した(図18)。したがって、抗MrkA抗体は、複数のKP血清型に対して強力なOPK活性を有する。

20

【0348】

実施例15：インビボ攻撃モデルにおける抗体防御効果

抗MrkA抗体のインビボ防御活性を評価するために、急性肺炎モデルを使用した。C57BL/6マウスに、 $1 - 2 \times 10^8$ CFUの多薬剤抵抗性の分離株を鼻腔内に接種した。KP3、ヒトIgG1コントロール抗体R347、ならびにクローン1、4、5、および6抗体を、予防処置のために細菌攻撃の24時間前にまたは療法のために細菌攻撃の1時間後に腹腔内(IP)ルートを通じて与えた。マウスの生存は、最低5日間、8日目まで毎日モニターした。代表的な実験の生存データをPrismでプロットした。

30

【0349】

それらの同等の細菌結合およびOPK活性を反映して、クローン1、4、5、および6抗体は、すべて予防処置モデルにおいて同様に強力なインビボ防御活性を示した(図19)。1mg/kg用量で、クローン1、4、5、および6抗体のすべてが、完全に近い防御を付与した。治療モデルでは、適度の防御が、5mg/kgの用量で見られた(図20)。いずれのモデルでもそれらの活性において異なるエピトープを標的にする抗体間に有意な差異があるようには思われなかった。

40

【0350】

驚いたことに、用量応答は、必ずしもインビボ防御モデルにおいてすべての抗MrkA抗体について該当するとは限らず、細菌に対する抗MrkA抗体結合強度およびそれらのインビボ防御効果間に直接的な相関性はなかった。それにもかかわらず、抗MrkA抗体は、インビボにおいて防御活性を示した。

【0351】

実施例16：単一抗体は抗体の組み合わせと同程度に防御する

抗菌分野における抗体の組み合わせは、いくつかの非常に有望な結果を実現した。したがって、抗MrkA抗体の組み合わせについて調査した。KP3をクローン1または5の

50

いずれかと組み合わせた場合に有意な相加または相乗効果は観察されなかった（図 2 1）。3 つまでの m A b を有するより複雑な組み合わせも、いかなるさらなる有益性も示さなかった。そのため、単一抗 M r k A 抗体は、抗 M r k A 抗体の組み合わせと同程度に防御する。

【 0 3 5 2 】

具体的な実施形態の前出の説明は、本開示の一般的性質を十分に完全に明らかにするものであり、従って第三者が、当技術分野の範囲内の知識を適用することにより、本開示の一般的概念から逸脱することなく、過度の実験を行うことなしにかかる具体的な実施形態を容易に改良しおよび / またはそれを様々な適用に適合させることができる。従って、かかる適合形態および改良形態は、本明細書に提供される教示および指針に基づけば、開示される実施形態の均等物の意味および範囲内にあることが意図される。本明細書における用語法または表現法は、限定ではなく、説明を目的とするものであり、従って本明細書の用語法または表現法は当業者によって教示および指針を踏まえて解釈されるべきであることが理解されなければならない。

【 0 3 5 3 】

本開示の広さおよび範囲は、上記の例示的な実施形態のいずれによっても限定されないが、下記の請求項およびそれらの均等物に従ってのみ定義されるべきである。

【 0 3 5 4 】

本出願において引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、および / または他の文献は、それぞれの個々の刊行物、特許、特許出願、および / または他の文献が事実上、参照により組み込まれるように個々に示されるのと同じように、事実上、それらの全体が参照により組み込まれる。

【 図 1 - 1 】

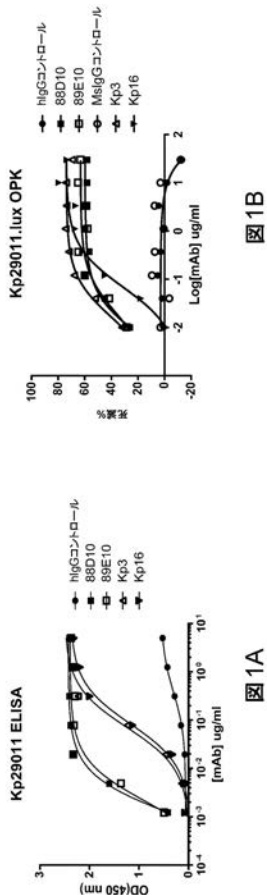


図 1B

図 1A

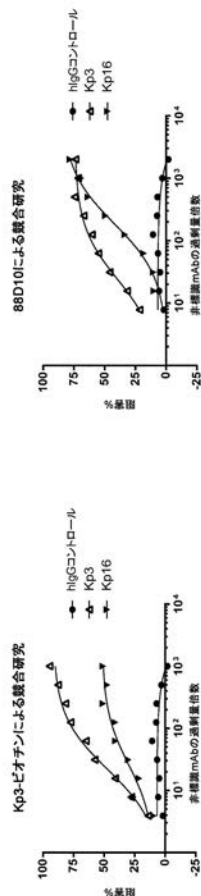


図 1C

図 1D

【 図 1 - 2 】

株	血清型				ハイブリドーマ			ファージクローン		
	Kp 43816	O1:K2	O1:K20	KP9140	21G10	22B12	88D10	89E10	KP3	KP16
Kp 43816	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KP11356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp5046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KP9148	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9177	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9145	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP9187	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP11357	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

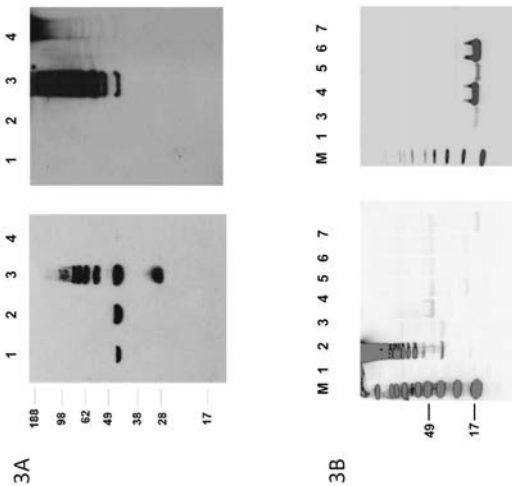
1E

【図 1 - 3】

株(血清型)	Kp3およびKp16のOPK活性
29011 (O1:K2)	中
9148 (O2a:K28)	高
9178 (O3:K58)	高
9135 (O4:K15)	高
9591(K1)	なし
3048570/43816 (K2)	低

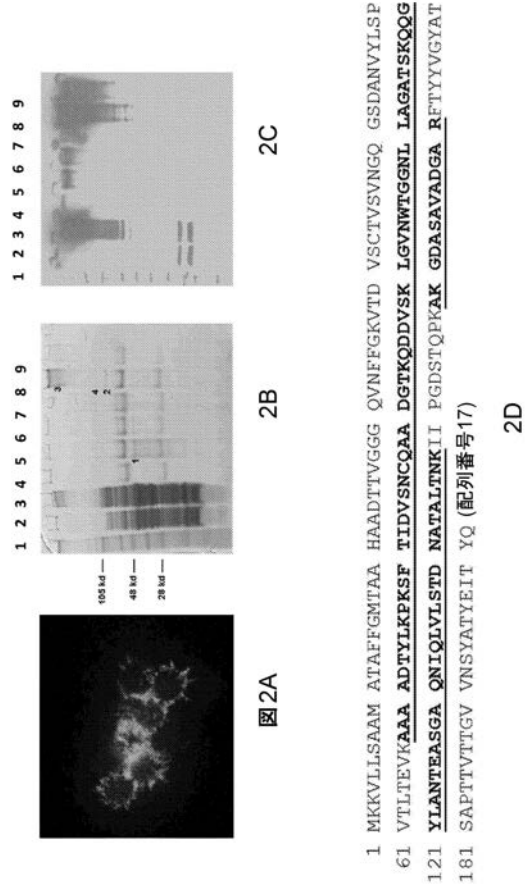
高:100%の最大の死滅
中:80%の最大の死滅
低:最大の死滅が30%の死滅

【図 3 A - 3 B】

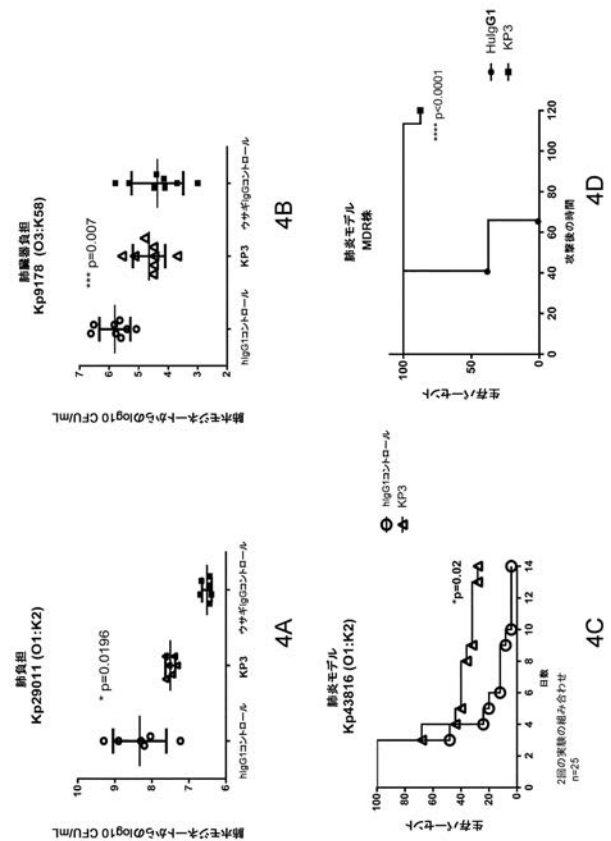


【図 2 A - 2 D】

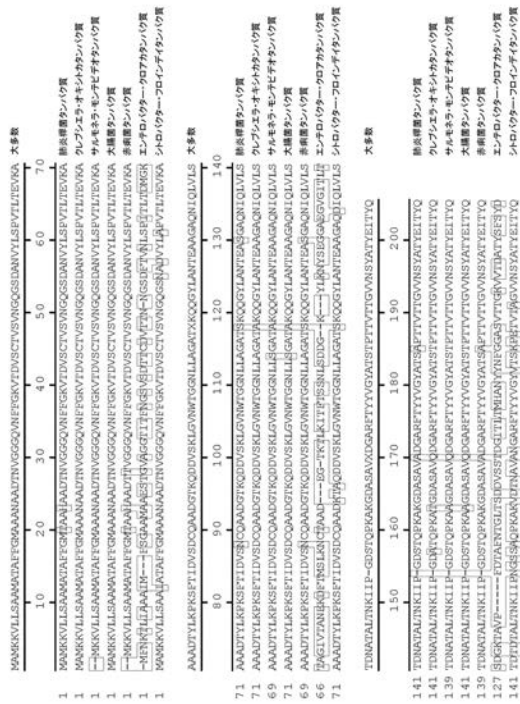
1F



【図 4 A - 4 D】



【 図 5 】

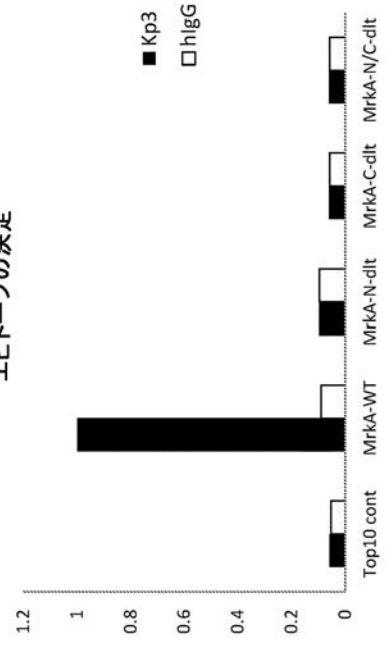


【 図 6 】

5

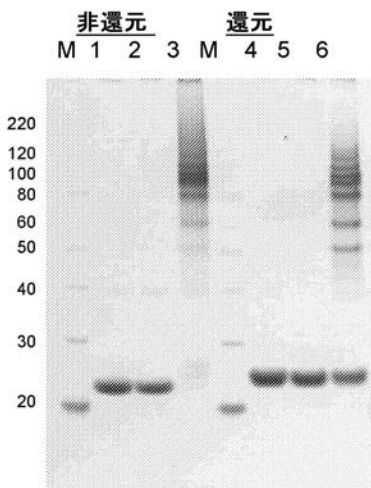
6

エピソードの決定



【 図 7 】

7



M-分子量マーカー(kd)

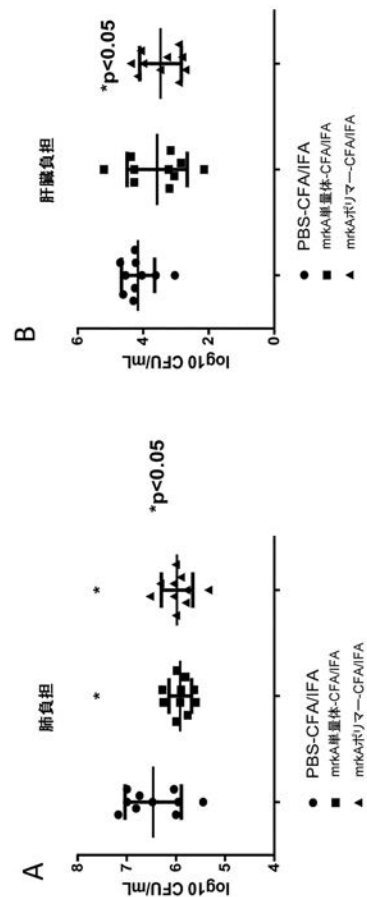
1および4、プール1由来の単量体MrkA

2および5、プール2由来の単量体MrkA

3および6、オリゴマーMrkA

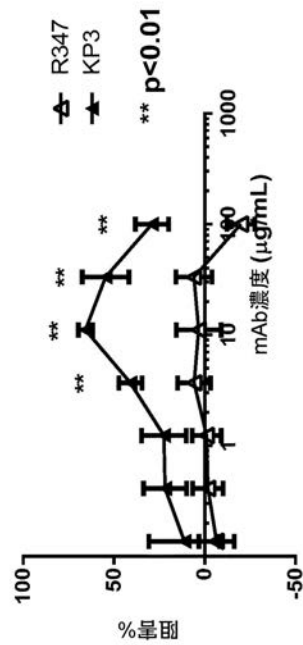
【 図 8 A - 8 B 】

8



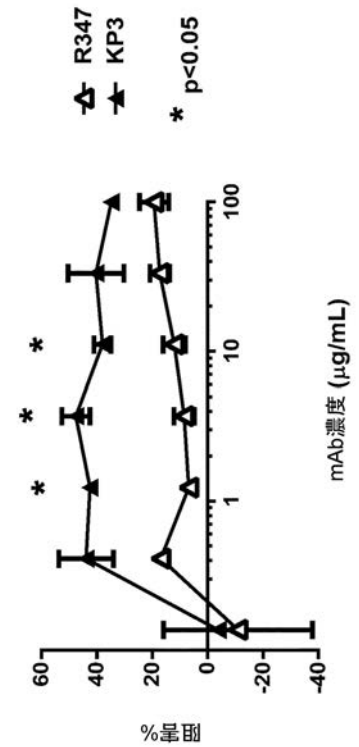
【図 9】

9



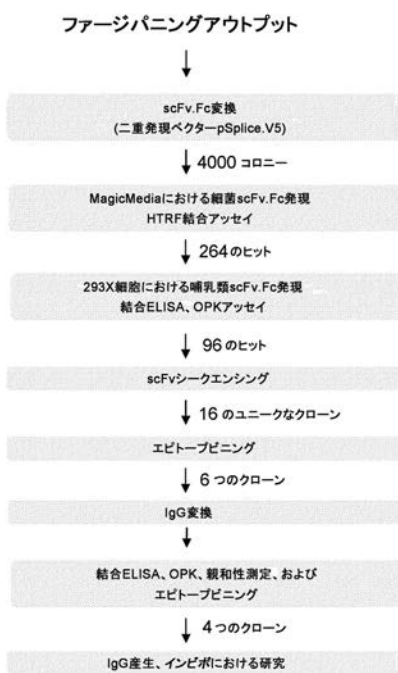
【図 10】

10



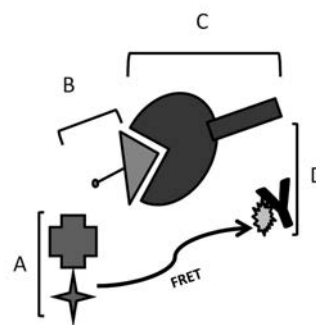
【図 11】

11



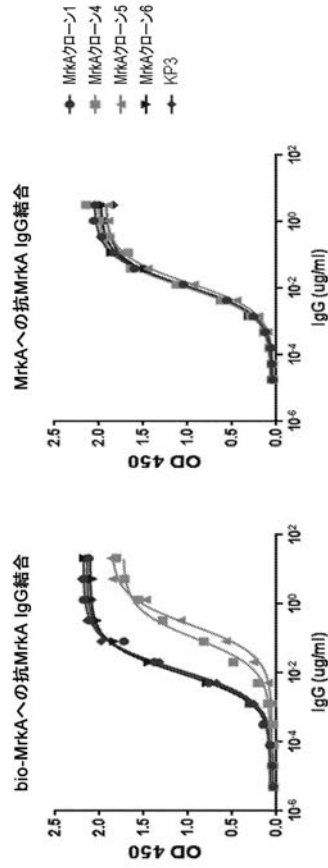
【図 12】

12



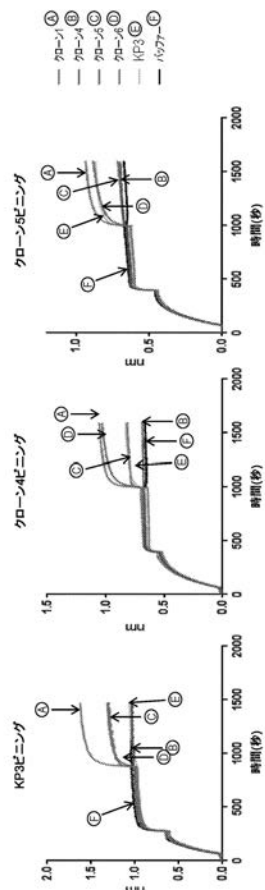
13

【図 13】



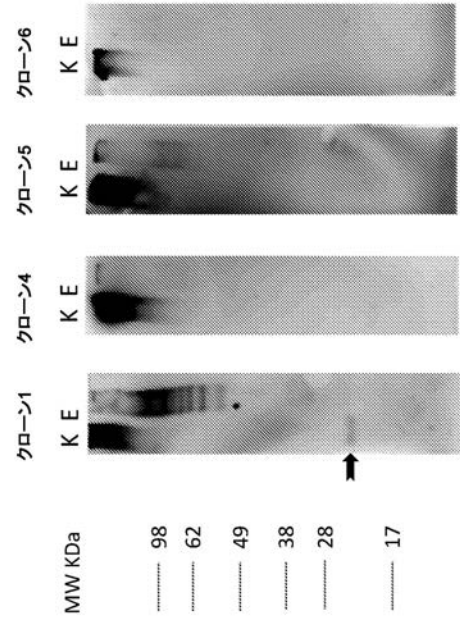
15

【図 15】



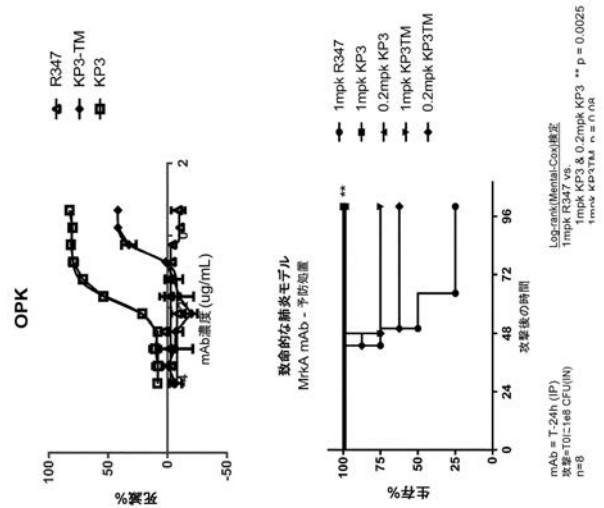
14

【図 14】



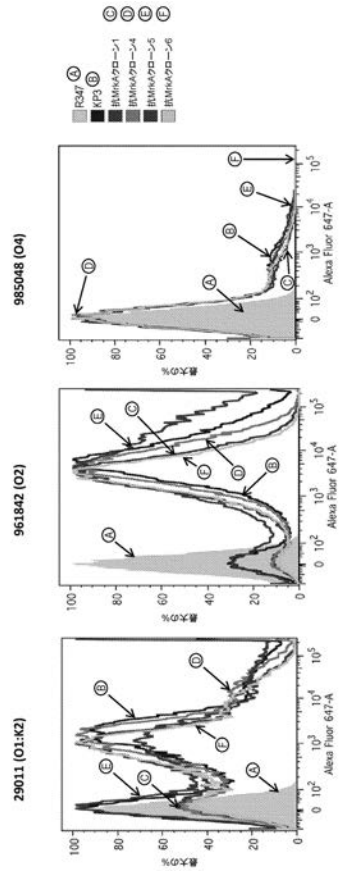
16

【図 16】



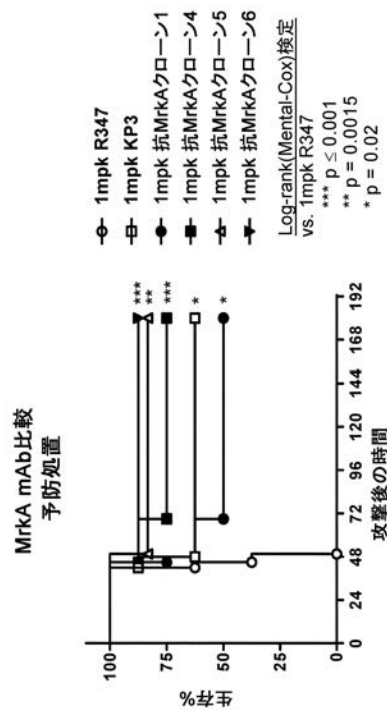
【図 17】

17



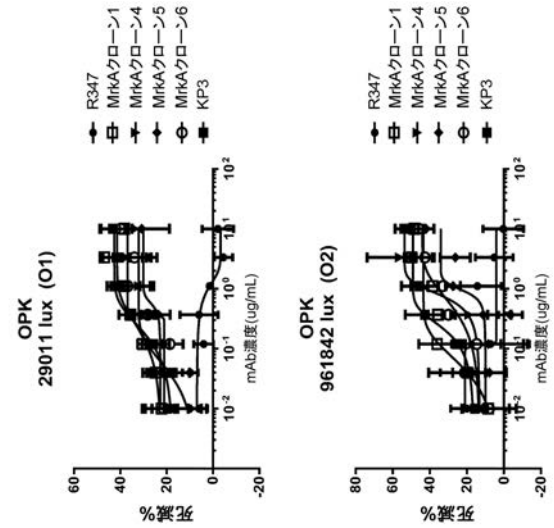
【図 19】

19



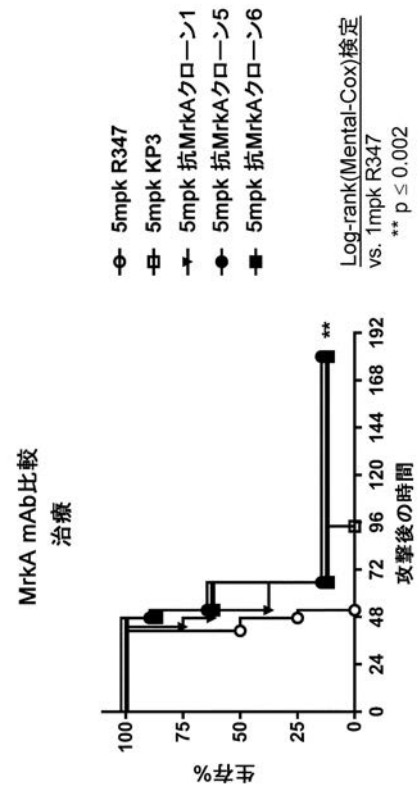
【図 18】

18



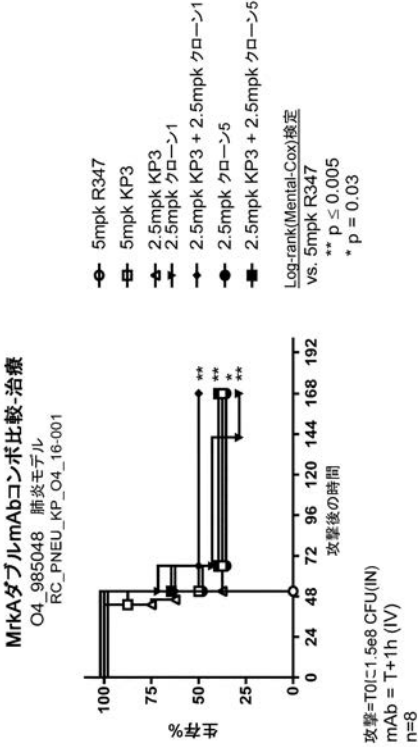
【図 20】

20



【 図 2 1 】

21



【 配 列 表 】

2018527924000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2016/048221 29.11.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/048221

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

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

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 13-17, 26, 27, and 53-60 were searched.

PCT/US2016/048221 29.11.2016**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2016/048221

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5, 18, 19, 29, 31-59, 64-70, 73-75, 77, 78, 82-94, 97-101
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

PCT/US2016/048221 29.11.2016**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.
PCT/US2016/048221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00; A61K 39/108; A61K 39/395; C07K 14/26; C07K 16/12; C07K 16/18 (2016.01) CPC - A61K 39/00; A61K 39/0266; A61K 45/06; A61K 2039/505; C07K 14/26; C07K 16/1228 (2016.08) 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) IPC - A61K 38/00; A61K 39/108; A61K 39/395; C07K 14/26; C07K 16/12; C07K 16/18 CPC - A61K 39/00; A61K 39/0266; A61K 45/06; A61K 2039/505; C07K 14/26; C07K 16/1228; C07K 2317/21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/190.1; 424/259.1; 530/300; 530/324; 530/350 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar Search terms used: klebsiella mrka "complex antigen" (oligomer OR multimer) opsonophagocytic killing "OPK assay" luminescent		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2014/0212448 A1 (VALNEVA AUSTRIA GMBH) 31 July 2014 (31.07.2014) entire document	6 ----- 1-4, 7
X — Y	US 2012/0156723 A1 (WREN et al) 21 June 2012 (21.06.2012) entire document	60-63, 79-81, 95, 96 ----- 9, 14, 20, 21, 23, 26, 27
X — Y	US 2002/0062010 A1 (ARATHOON et al) 23 May 2002 (23.05.2002) entire document	72 ----- 23, 26
Y	US 7,041,465 B1 (HULTGREN et al) 09 May 2006 (09.05.2006) entire document	1-4, 7, 30
Y	US 2015/0023966 A1 (MEDIMMUNE, LLC et al) 22 January 2015 (22.01.2015) entire document	4
Y	US 2009/0117095 A1 (MESSMER et al) 07 May 2009 (07.05.2009) entire document	9
Y	US 2008/0085241 (STASSAR et al) 10 April 2008 (10.04.2008) entire document	14
Y	US 2013/0039927 A1 (DEWHURST et al) 14 February 2013 (14.02.2013) entire document	20, 21, 27
Y	US 2014/0044733 A1 (SIERKS et al) 13 February 2014 (13.02.2014) entire document	30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 October 2016		Date of mailing of the international search report 29 NOV 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7174

PCT/US2016/048221 29.11.2016**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2016/048221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURMOLLE et al. "Type 3 Fimbriae, Encoded by the Conjugative Plasmid pOLA52, Enhance Biofilm Formation and Transfer Frequencies in Enterobacteriaceae Strains," Microbiology, 01 January 2008 (01.01.2008), Vol. 154, Pgs. 187-95. entire document	1-4, 6-17, 20-28, 30, 60-63, 71, 72, 76, 79-81, 95, 96
A	MURPHY et al. "Klebsiella pneumoniae and Type 3 Fimbriae: Nosocomial Infection, Regulation and Biofilm Formation," Future Microbiology, 07 August 2012 (07.08.2012), Vol. 7, Pgs. 991-1002. entire document	1-4, 6-17, 20-28, 30, 60-63, 71, 72, 76, 79-81, 95, 96
A	US 2012/0141493 A1 (THROSBY et al) 07 June 2012 (07.06.2012) entire document	1-4, 6-17, 20-28, 30, 60-63, 71, 72, 76, 79-81, 95, 96
A	WILKSCH et al. "MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls Klebsiella pneumoniae Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression," PLoS Pathogens, 25 August 2011 (25.08.2011), Vol. 7, e1002204, Pgs. 1-22. entire document	1-4, 6-17, 20-28, 30, 60-63, 71, 72, 76, 79-81, 95, 96
P,X	WANG et al. "Target-Agnostic Identification of Functional Monoclonal Antibodies Against Klebsiella pneumoniae Multimeric MrkA Fimbrial Subunit," Journal of Infectious Diseases, 14 January 2016 (14.01.2016), Vol. 213, Pgs. 1800-1808 and Supplemental Information. entire document	1-4, 6-17, 20-28, 30, 60-63, 71, 72, 76, 79-81, 95, 96

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	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	C 1 2 N	5/20		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/02		
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/12		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	31/407	(2006.01)	A 6 1 K	31/407		
A 6 1 K	38/12	(2006.01)	A 6 1 K	38/12		
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39		
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/00	1 0 0	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	47/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	R	
			A 6 1 K	39/395	D	
			A 6 1 K	39/395	V	
			A 6 1 K	49/00		
			A 6 1 K	47/00		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 ラジャン , サラヴァナン

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

(72) 発明者 チャン , チェウ - シュン

- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ヘイドブリンク トンプソン, ジェニー
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 リン, フン - ユ
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ストーヴァー, チャールズ ケンダル
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ペンニニ, メグハン
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ダルアクア, ウィリアム
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 チョウダリー, パーサ エス.
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 シャオ, シャオドン
- アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA90X AA91X AA92X AA92Y AA93X AB01 AB05 AC14 BA02 BA08
CA25 CA44

4C076 CC06 CC32 CC50 FF39 FF51 FF63

4C084 AA02 AA12 AA13 AA19 BA01 BA08 BA17 BA24 MA17 MA23
MA55 MA56 MA65 MA66 MA70 NA05 NA14 ZA331 ZA591 ZA661
ZA751 ZA811 ZA961 ZB351 ZC751

4C085 AA03 AA05 AA14 AA16 AA38 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36
BB37 BB41 BB42 BB43 EE01 EE03 EE06 GG01 GG02 GG03
GG04 GG06 HH03 HH11 HH13 HH20 KA26 KA27 KA28 KA29

4C086 AA01 AA02 CC08 EA18 MA01 MA02 MA03 MA04 NA05 NA14
ZA33 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA96 ZB35 ZC75

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA29 EA31 FA72 FA74