

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第3部門第2区分
【発行日】令和6年10月25日(2024.10.25)

【国際公開番号】W02022/094433
【公表番号】特表2023-548073(P2023-548073A)
【公表日】令和5年11月15日(2023.11.15)
【年通号数】公開公報(特許)2023-215
【出願番号】特願2023-524899(P2023-524899)
【国際特許分類】

10

A 6 1 K 38/16(2006.01)
A 6 1 K 39/395(2006.01)
A 6 1 P 1/02(2006.01)
A 6 1 P 11/00(2006.01)
A 6 1 P 11/04(2006.01)
A 6 1 P 11/02(2006.01)
A 6 1 P 27/16(2006.01)
A 6 1 P 31/04(2006.01)
A 6 1 K 45/00(2006.01)
A 6 1 K 31/43(2006.01)
A 6 1 K 31/63(2006.01)
C 0 7 K 16/12(2006.01)
C 1 2 N 15/13(2006.01)

20

【F I】

A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 11/04
A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 27/16
A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/43
A 6 1 K 31/63
C 0 7 K 16/12 Z N A
C 1 2 N 15/13

30

【誤訳訂正書】
【提出日】令和6年10月17日(2024.10.17)
【誤訳訂正1】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項1】

40

それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムもし

50

くは多微生物性バイオフィルムに関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法における使用のための組合せ物であって、(i)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を含む、組合せ物。

【請求項2】

抗生物質が、(i)または(ii)の前に、それと同時的に、またはその後に、前記対象に投与されることを特徴とし、必要に応じて、前記抗生物質が、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含む、請求項1に記載の組合せ物。

10

【請求項3】

H a e m o p h i l u s細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法における使用のための組合せ物であって、前記組合せ物は、(i)抗DNA結合性およびベンディングタンパク質(DNA B I I)抗体またはその生物学的に活性な断片、ならびに(ii)抗I V型線毛(T 4 P)の大多数サブユニット(P i l A)抗体またはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、(i)前記抗DNA結合性およびベンディングタンパク質(DNA B I I)抗体または前記その生物学的に活性な断片、ならびに(ii)前記抗I V型線毛(T 4 P)の大多数サブユニット(P i l A)抗体または前記その生物学的に活性な断片を前記多微生物性バイオフィルムと接触させるステップを含む、組合せ物。

20

【請求項4】

抗生物質療法のために、必要に応じてそれを必要とする対象において、H a e m o p h i l u s細菌を含む多微生物性バイオフィルムに感作するための、または前記多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された(N R e l)状態に誘導するための方法における使用のための組合せ物であって、前記組合せ物は、(i)抗DNA B I I抗体またはその生物学的に活性な断片、および(ii)抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、前記バイオフィルムを、(i)前記抗DNA B I I抗体または前記その生物学的に活性な断片、および(ii)前記抗P i l A抗体もしくは前記その生物学的に活性な断片、または前記P i l Aポリペプチドもしくは前記その生物学的に活性な断片と接触させるステップを含む、組合せ物。

30

【請求項5】

前記DNA B I Iが、組込み宿主因子(I H F)またはヒストン様タンパク質(H U)タンパク質から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項6】

前記抗DNA B I I抗体またはその生物学的に活性な断片が、DNA B I I A 5ペプチド、DNA B I I m B 4ペプチド、チップペプチド、チップキマーペプチド、または前記A 5ペプチドおよび前記m B 4ペプチドを含む組換えチップキマーポリペプチドのうちの1つまたは複数を経験し、それに結合する、請求項1～5のいずれか一項に記載の組合せ物。

40

【請求項7】

前記P i l Aが、組換えの可溶性P i l A(r s P i l A)である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項8】

前記抗生物質が、(i)および(ii)と同時に、またはその後に、前記バイオフィルムと接触するか、または前記対象に投与されることを特徴とする、請求項2に記載の組合せ物。

【請求項9】

前記多微生物性バイオフィルムが、それにより、抗DNA B I I抗体もしくはその生物

50

学的に活性な断片、抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、P i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの1つ、または抗生物質単独の接触または投与と比較して、相乗的な様式で、防止される、阻害される、破壊される、分散される、または処置されるのうちの1つまたは複数であることを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項10】

前記バイオフィームから放出された前記細菌の前記新たに放出された（N R e l）状態が、以下：

以下の遺伝子：d e a D、a r t M、f i s、f o l A、f o l P、e m r A、e m r B、またはa c r Rのうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；

以下のタンパク質：A s n C、C y a A、G l p C、N r f A、T e h B、T r p B、T r p C、T r p D、T r u A、またはT r x Aのうちの1つまたは複数の変更されたレベル；

以下のタンパク質：A b g A、A r o E、A r o K、A r t P、A t p H、B i o B、B i o F、C c m A、C i t D、C i t T、C m K、C o a D、D c D、D j l A、D k s A、D n a E、D n a Q、D s b E、F a b G、F d h X、F t n B、F t s E、F t s I、F u m C、F u r、G l p A、G l p B、G m K、G p s A、G r e A、H f q、H i s I、H u g Z、I n f A、I n f B、I s p D、I s p F、L i c 2 A、L i c C、L i c D、L o l A、L p s A、m e n C、M e n C、N a p A、N r f B、N r f C、N T H I 0 0 5 3、N T H I 0 2 4 9、N T H I 0 2 9 1、N T H I 0 3 1 9、N T H I 0 3 4 9、N T H I 0 4 3 6、N T H I 0 4 8 7、N T H I 0 4 9 0、N T H I 0 5 5 5、N T H I 0 7 3 2、N T H I 0 7 7 9、N T H I 0 8 2 0、N T H I 1 0 2 5、N T H I 1 0 8 5、N T H I 1 1 9 9、N T H I 1 4 3 7、N T H I 1 4 3 9、N T H I 1 5 0 3、N T H I 1 5 9 0、N T H I 1 7 4 8、O p p F、P a n F、P d x H、P e p T、P h o B、P l s C、P o l A、P p C、P p i B、P r f B、P u r U、R a d A、R e l B、R i b A、R p l W、R p o E、R p o Z、R s e A、S e c F、S x y、T e s B、T h r B、T o l A、U n G、U r e G、U u a P、またはU v r Bのうちの1つまたは複数の低いレベル；

以下のタンパク質：C l p B、C y d D、D e a D、D l d、D m s B、E x b D、G r o E S、H f e A、H f e B、H g p B、H i s J、H i s J、H i t A、H k t E、H x u C、L c t P、L l d D、L p x C、M u r B、N d h A、N i f S 2、N T H I 0 0 4 3、N T H I 0 0 5 2、N T H I 0 1 7 5、N T H I 0 3 6 4、N T H I 1 2 0 8、N T H I 1 2 1 4、N T H I 1 3 6 9、N T H I 1 7 0 3、O m p P 2、O r f G、P a l、P d g X、R b f A、R e c N、R p l O、R p l U、R p m E、R p s E、R p s J、R p s L、R p s Q、R p s T、S o d A、T b p 1、T o l B、T o n B、T r p A、T r x A、またはZ n u Aのうちの1つまたは複数の高いレベル

のうちの1つまたは複数を含む、請求項4～9のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項11】

前記高い、低い、変更された発現またはレベルが、同じであるがプランクトン様に成長した細菌と比較される、請求項10に記載の組合せ物。

【請求項12】

（i）抗D N A B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、

（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの一方または両方、あるいは

（i i i）必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む、抗生物質

のうちの少なくとも2つ、

および必要に応じて、使用説明書

を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキット。

【請求項13】

10

20

30

40

50

以下：

- (i) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、
 - (i i) 抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうち的一方または両方、あるいは
 - (i i i) β -ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を必要に応じて含む、抗生物質
- のうちの少なくとも2つ、
 および担体、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項14】

請求項1～11のいずれか一項に記載の方法による、以下：防止、阻害、破壊、分散、処置または感作のうちの一つまたは複数に好適な多微生物性バイオフィルムを選択するための方法であって、

(a) 前記多微生物性バイオフィルム、またはそれらから単離および成長した多微生物性バイオフィルムを、(i) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(i i) 抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうち的一方または両方と接触させるステップ、ならびに

(b) 以下の遺伝子：dead、artM、fis、folA、folP、emrA、emrB、またはacrRのうちの一つまたは複数の発現、およびタンパク質：AsnC、CyaA、GlpC、NrfA、TehB、TrpB、TrpC、TrpD、TruA、TrxA；AbgA、AroE、AroK、ArtP、AtpH、BioB、BioF、CcmA、CitD、CitT、CmK、CoaD、DcdD、DjlA、DksA、DnaE、DnaQ、DsbE、FabG、FdhX、FtnB、FtsE、FtsI、FumC、Fur、GlpA、GlpB、GmK、GpsA、GreA、Hfq、HisI、HugZ、InfA、InfB、IspD、IspF、Lic2A、LicC、LicD、LolA、LpsA、menC、MenC、NapA、NrfB、NrfC、NTHI0053、NTHI0249、NTHI0291、NTHI0319、NTHI0349、NTHI0436、NTHI0487、NTHI0490、NTHI0555、NTHI0732、NTHI0779、NTHI0820、NTHI1025、NTHI1085、NTHI1199、NTHI1437、NTHI1439、NTHI1503、NTHI1590、NTHI1748、OppF、PanF、PdxH、PepT、PhoB、PlsC、PolA、PpC、PpiB、PrfB、PurU、RadA、RelB、RibA、RplW、RpoE、RpoZ、RseA、SecF、Sxy、TesB、ThrB、TolA、UnG、UreG、UuaP、UvrB；ClpB、Cydd、DeaD、DldD、DmsB、ExbD、GroES、HfeA、HfeB、HgpB、HisJ、HisJ、HitA、HktE、HxuC、LctP、LldD、LpxC、MurB、NdhA、NifS2、NTHI0043、NTHI0052、NTHI0175、NTHI0364、NTHI1208、NTHI1214、NTHI1369、NTHI1703、OmpP2、OrfG、Pal、Pd gX、RbfA、RecN、RplO、RplU、RpmE、RpsE、RpsJ、RpsL、RpsQ、RpsT、SodA、Tbp1、TolB、TonB、TrpA、TrxA、またはZnuAのうちの一つまたは複数のレベルについて、(a)の前記バイオフィルムから放出された細菌をアッセイするステップ

を含み、

以下：

以下の遺伝子：dead、artM、fis、folA、folP、emrA、emrB、またはacrRのうちの一つまたは複数の変更された遺伝子発現；

以下のタンパク質：AsnC、CyaA、GlpC、NrfA、TehB、TrpB、TrpC、TrpD、TruA、またはTrxAのうちの一つまたは複数の変更されたレベ

10

20

30

40

50

ル；

以下のタンパク質：A b g A、A r o E、A r o K、A r t P、A t p H、B i o B、B i o F、C c m A、C i t D、C i t T、C m K、C o a D、D c D、D j l A、D k s A、D n a E、D n a Q、D s b E、F a b G、F d h X、F t n B、F t s E、F t s I、F u m C、F u r、G l p A、G l p B、G m K、G p s A、G r e A、H f q、H i s I、H u g Z、I n f A、I n f B、I s p D、I s p F、L i c 2 A、L i c C、L i c D、L o l A、L p s A、m e n C、M e n C、N a p A、N r f B、N r f C、N T H I 0 0 5 3、N T H I 0 2 4 9、N T H I 0 2 9 1、N T H I 0 3 1 9、N T H I 0 3 4 9、N T H I 0 4 3 6、N T H I 0 4 8 7、N T H I 0 4 9 0、N T H I 0 5 5 5、N T H I 0 7 3 2、N T H I 0 7 7 9、N T H I 0 8 2 0、N T H I 1 0 2 5、N T H I 1 0 8 5、N T H I 1 1 9 9、N T H I 1 4 3 7、N T H I 1 4 3 9、N T H I 1 5 0 3、N T H I 1 5 9 0、N T H I 1 7 4 8、O p p F、P a n F、P d x H、P e p T、P h o B、P l s C、P o l A、P p C、P p i B、P r f B、P u r U、R a d A、R e l B、R i b A、R p l W、R p o E、R p o Z、R s e A、S e c F、S x y、T e s B、T h r B、T o l A、U n G、U r e G、U u a P、またはU v r Bのうちの1つまたは複数の低いレベル；

10

以下のタンパク質：C l p B、C y d D、D e a D、D l D、D m s B、E x b D、G r o E S、H f e A、H f e B、H g p B、H i s J、H i s J、H i t A、H k t E、H x u C、L c t P、L l d D、L p x C、M u r B、N d h A、N i f S 2、N T H I 0 0 4 3、N T H I 0 0 5 2、N T H I 0 1 7 5、N T H I 0 3 6 4、N T H I 1 2 0 8、N T H I 1 2 1 4、N T H I 1 3 6 9、N T H I 1 7 0 3、O m p P 2、O r f G、P a l、P d g X、R b f A、R e c N、R p l O、R p l U、R p m E、R p s E、R p s J、R p s L、R p s Q、R p s T、S o d A、T b p 1、T o l B、T o n B、T r p A、T r x A、またはZ n u Aのうちの1つまたは複数の高いレベル

20

のうちの1つまたは複数が、前記バイオフィルムが請求項1～11のいずれか一項に記載の方法に好適であることを示す、方法。

【請求項15】

前記選択された多微生物性バイオフィルムを、

(i) 抗DNA B I I抗体またはその生物学的に活性な断片、

(i i) 抗P i l A抗体もしくは生物学的に活性な断片またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、および

30

(i i i) 必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む、必要に応じた抗生物質

と接触させた、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムもしくは多微生物性バイオフィルムに関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法における使用のための組成物であって、抗DNA B I I抗体またはその生物学的に活性な断片を含み、前記組成物は、

40

(i) 抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(i i) P i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項17】

それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムもしくは多微生物性バイオフィルムに関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法における使用のための組成物であって、(i) 抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(i i) P i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を含み、前記組成物は、抗DNA

50

B I I 抗体またはその生物学的に活性な断片と組み合わせて投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 18】

H a e m o p h i l u s 細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの 1 つまたは複数のための方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、抗 D N A 結合性およびベンディングタンパク質 (D N A B I I) 抗体またはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、(i) 前記抗 D N A 結合性およびベンディングタンパク質 (D N A B I I) 抗体または前記その生物学的に活性な断片、ならびに (i i) 抗 I V 型線毛 (T 4 P) の大多数サブユニット (P i l A) 抗体またはその生物学的に活性な断片を前記多微生物性バイオフィルムと接触させるステップを含む、組成物。

10

【請求項 19】

H a e m o p h i l u s 細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの 1 つまたは複数のための方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、抗 I V 型線毛 (T 4 P) の大多数サブユニット (P i l A) 抗体またはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、(i) 抗 D N A 結合性およびベンディングタンパク質 (D N A B I I) 抗体またはその生物学的に活性な断片、ならびに (i i) 前記抗 I V 型線毛 (T 4 P) の大多数サブユニット (P i l A) 抗体または前記その生物学的に活性な断片を前記多微生物性バイオフィルムと接触させるステップを含む、組成物。

20

【請求項 20】

抗生物質療法のために、必要に応じてそれを必要とする対象において、H a e m o p h i l u s 細菌を含む多微生物性バイオフィルムに感作するための、または前記多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された (N R e l) 状態に誘導するための方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、(i) 抗 D N A B I I 抗体またはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、前記バイオフィルムを、(i) 前記抗 D N A B I I 抗体または前記その生物学的に活性な断片、および (i i) 抗 P i l A 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または P i l A ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片と接触させるステップを含む、組成物。

30

【請求項 21】

抗生物質療法のために、必要に応じてそれを必要とする対象において、H a e m o p h i l u s 細菌を含む多微生物性バイオフィルムに感作するための、または前記多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された (N R e l) 状態に誘導するための方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、(i i) 抗 P i l A 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または P i l A ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を含み、前記方法は、前記バイオフィルムを、(i) 抗 D N A B I I 抗体またはその生物学的に活性な断片、および (i i) 前記抗 P i l A 抗体もしくは前記その生物学的に活性な断片、または前記 P i l A ポリペプチドもしくは前記その生物学的に活性な断片と接触させるステップを含む、組成物。

40

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】 明細書

【訂正対象項目名】 全文

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

50

本出願は、2020年11月1日出願された米国仮出願第63／108,421号の米国特許法第119条(e)項の利益、および2021年6月30日出願された米国出願第17／364,578号の米国特許法第365条(c)項の利益を主張し、これらのそれぞれの内容は、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

疾病管理予防センターおよび国立衛生研究所は、バイオフィルムがすべての細菌感染症のうちの約80%の病態形成に寄与すると推定している(Dongari-Bagtzoglou, 2008)。多くの他のものの中でも、バイオフィルム関連疾患、例えば、中耳炎(OM)、
10 嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、慢性鼻副鼻腔炎、慢性創傷感染症、歯周炎、膀胱炎、ならびに医療インプラントおよび留置カテーテルの感染症は、典型的には、宿主の免疫エフェクターおよび抗生物質による死滅に対して非常に耐性であるバイオフィルム内の細菌の存在に起因して、慢性および／または再発性である(Costerton et al., 1999; Flemming and Wingender, 2010)。そのため、これらの疾患を処置するための有効な療法を見出す必要性が当技術分野に存在する。本開示は、この必要性を充足し、同様に関連する利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

開示の概要

上気道および下気道の多くの疾患は、分類不可能なHaemophilus influenzae (NTHI)によって引き起こされ、ここで、バイオフィルムは、それぞれの疾患経過に大いに寄与する(Autio et al., 2015; Cardines et al., 2012; Zhang et al., 2012)。NTHIが主たる病原体である1つのそのような疾患の例は、小児において最も一般的な細菌性疾患である(Hassan, 2013; Mittal et al., 2018)中耳炎(OM)である(Barkai et al., 2009; Cleary et al., 2018; Grevers et al., 2012; Vergison, 2008; Wiertsema et al., 2011)。
30 OMの病態形成、慢性化および再発におけるバイオフィルムの役割は、広く受け入れられている。それにもかかわらず、ほとんどのNTHI誘発性疾患のように、OMは、依然として一般には、広域スペクトル経口抗生物質で処置され、これは、バイオフィルム、またはさらにこの解剖学的ニッチ内でプランクトン様に成長する細菌を根絶するために中耳(または他の部位)において十分なレベルに達しない(Belfield et al., 2015)。それらの使用は、示される場合があるか、または必要であるが、広域スペクトル抗生物質は、付随する免疫学的小児および／または発達上の帰結を伴って、皮膚の発疹、下痢および腸内マイクロバイオームの生涯にわたる破壊の形態の付随的損害も引き起こし得る(Gilbert et al., 2018; Kuehn et al., 2015; Lamont et al., 2020)。また、よくありがちな無差別の小児および多くの場合に効果がない抗生物質の使用は、多抗生物質耐性細菌の発生の全世界的に急増している問題に大いに寄与している(Beekmann et al., 2005; Leibovitz et al., 2010; Song et al., 2012)。
40

【0004】

ワクチンの送達は、これらが予防を標的にするので(Andre et al., 2008)、感染性疾患を管理するための最も費用効率が高い方法であり、それ自体は、実行可能で真に理想的な目標のままである。しかしながら、バイオフィルムが関連する慢性感染症または
回帰感染症が存在するこれらの小児および成人のために、有効な治療的アプローチが非常に必要とされている。

【0005】

本明細書に開示される発見を適用することで、それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれが生成するバイオフィルムを含む多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害す
50

る、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法が本明細書に提供される。この方法は、(i)抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PIL A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii)抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPIL Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー(chimer)抗体のCDRは、下記に示される配列番号1~3、7~9、13および14に示される。抗テールキマー(chimer)のCDRは、配列番号4~6および10~12に示される。一態様では、抗体は、ポリクローナル抗体である。一態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。別の態様では、抗体は、モノクローナル抗体またはその生物学的に活性な断片である。さらなる態様では、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PIL A抗体は、PIL Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PIL A表面抗原または組換えの可溶性PIL A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp_003864351.1) が挙げられる。一部の態様では、多微生物性バイオフィームは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および/またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

20

【0006】

それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィーム感染に関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法も提供される。この方法は、(i)抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PIL A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii)抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPIL Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一態様では、抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー(chimer)抗体のCDRは、下記に示される配列番号1~3、7~9、13および14に示される。さらなる態様では、抗DNABIIチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PIL A抗体は、PIL Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PIL A表面抗原または組換えの可溶性PIL A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp_003864351.1) が挙げられる。一部の態様では、多微生物性バイオフィームは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aur

30

40

50

eus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の実施形態では、疾患は、嚢胞性線維症（CF）、肺CF、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性鼻副鼻腔炎（CRS）、歯周炎、インプラント周囲炎、中耳感染症、中耳炎（OM）、急性中耳炎（AOM）、滲出性中耳炎（OME）、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏（PTTO）、人工呼吸器関連肺炎（VAP）、市中感染性肺炎（CAP）、胸腔チューブ／カテーテル／留置デバイスバイオフィルム感染症、扁桃炎、咽頭炎（pharyngitis）、咽頭炎（laryngitis）、喉頭蓋炎、副鼻腔炎、肺炎、気管支炎、または他の気道感染症（RTI）から選択される。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

【0007】

また別の態様では、Haemophilus細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法が提供される。この方法は、バイオフィルムを、（i）抗DNA結合性およびベンディングタンパク質（DNABII）抗体またはその生物学的に活性な断片、ならびに（ii）抗IV型線毛（T4P）の大多数サブユニット（PilA）抗体またはその生物学的に活性な断片と接触させるステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一部の態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片である。ある特定の実施形態では、抗チップキマー（chimer）抗体のCDRは、下記に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。一部の実施形態では、この方法は、多微生物性バイオフィルムを抗生物質と接触させるステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。接触させるステップは、in vitroまたはin vivoであり得る。

20

30

【0008】

さらなる態様では、抗生物質療法のためにHaemophilus細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、もしくはそれを含む多微生物性バイオフィルムに感作する、または多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された（NRel）状態に誘導するための方法が提供される。この方法は、バイオフィルムを、（i）抗DNA結合性およびベンディングタンパク質（DNABII）抗体またはその生物学的に活性な断片、ならびに（ii）抗IV型線毛（T4P）の大多数サブユニット（PilA）抗体またはその生物学的に活性な断片と接触させるステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、またはそれらの生物学的に活性な断片であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー（chimer）抗体のCDRは、下記に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chi

40

50

mer) 抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗 DNA B I チップキマー (chimer) 抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗 P i l A 抗体は、P i l A ペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A 表面抗原または組換えの可溶性 P i l A (Genbank 受託番号: E F U 9 6 7 3 4 . 1) および I V 型ピリン (Genbank 受託番号: Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。一部の実施形態では、この方法は、多微生物性バイオフィルムを抗生物質と接触させるステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、H a e m o p h i l u s、例えば、N T H I、および B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a、または M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s のうちの 1 つまたは複数によって引き起こされる。接触させるステップは、i n v i t r o または i n v i v o であり得る。

10

20

30

40

50

【0009】

またさらなる態様では、抗生物質療法のためにそれを必要とする対象における H a e m o p h i l u s 細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、もしくはそれを含むポリクローナル微生物性バイオフィルムに感作する、またはそれを必要とする対象における多微生物性バイオフィルムの細菌を新たに放出された (N R e l) 状態に誘導するための方法が提供される。この方法は、(i) 抗 DNA B I I 抗体またはその生物学的に活性な断片、および (i i) P i l A ポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗 DNA B I I 抗体は、抗 DNA B I I 抗体、抗 DNA B I I チップ抗体、抗 DNA B I I チップキマー (chimer) 抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの 1 つまたは複数を含む。一態様では、抗 DNA B I I 抗体は、抗 DNA B I I チップキマー (chimer) 抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー (chimer) 抗体の C D R は、下記に示される配列番号 1 ~ 3、7 ~ 9、13 および 14 に示される。さらなる態様では、抗 DNA B I I チップキマー (chimer) 抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗 P i l A 抗体は、P i l A ペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A 表面抗原または組換えの可溶性 P i l A (Genbank 受託番号: E F U 9 6 7 3 4 . 1) および I V 型ピリン (Genbank 受託番号: Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、H a e m o p h i l u s、例えば、N T H I、および B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a、または M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s のうちの 1 つまたは複数によって引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0010】

例えば本明細書に開示される方法における使用のための、キットおよび組成物も提供される。一態様では、(i) 抗 DNA B I I 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、(i i) 抗 P i l A 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または P i l A ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの一方または両方、あるいは (i i i) 抗生物質のうちの少なくとも 2 つ、および必要に応じて、使用説明書を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるキットが提供される。抗体は、ポリクロー

ナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I I抗体、抗DNA B I Iチップ抗体、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー（chimer）抗体のCDRは、下記に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A（Genbank受託番号：E F U 9 6 7 3 4 . 1）およびI V型ピリン（Genbank受託番号：Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1）が挙げられる。一部の実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

【0011】

別の態様では、以下：（i）抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの一方または両方、あるいは（i i i）抗生物質のうちの少なくとも2つ、および担体、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組成物が提供される。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。ある特定の実施形態では、抗チップキマー（chimer）抗体のCDRは、下記に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A（Genbank受託番号：E F U 9 6 7 3 4 . 1）およびI V型ピリン（Genbank受託番号：Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0012】

一部の実施形態では、抗体、ポリペプチド、それらのそれぞれの生物学的に活性な断片、またはそれらの任意の組合せは、本明細書に開示される組成物中で対象に投与されてもよい。他の実施形態では、抗体、ポリペプチド、それらのそれぞれの生物学的に活性な断片、またはそれらの任意の組合せは、そのような抗体、ポリペプチド、生物学的に活性な断片をコードするポリヌクレオチド、またはそれらに相補的なポリヌクレオチドとして対象に投与されてもよい。一部の実施形態では、そのようなポリヌクレオチドは、例えば、発現を指示する調節配列をさらに含むことにより、対象における抗体、ポリペプチド、生物学的に活性な断片を発現するのに好適であり得る。さらなる実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含むベクター、例えば、遺伝子送達ビヒクルも、投与のために使用されてもよい。ベクターは、本明細書に開示されるウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであってもよい。またさらなる実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドおよび／またはベクターのうちの1つまたは複数を含む宿主細胞が提供される。したがって、対応する発現される抗体、ペプチド、またはそれらの生物学的に活性な断片に加えて、またはその代わりに、そのようなポリヌクレオチドおよび／またはベクターおよび／または宿主細胞のうちの1つまたは複数を含むキットならびに組成物が提供される。そのようなポリペプチド、抗体、生物学的に活性な断片、ポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞を産生するのに好適な方法ならびに組成物がさらに提供される。

【0013】

加えて、本明細書に開示される方法による、以下：防止、阻害、破壊、分散、処置または感作のうちの1つまたは複数に好適な *Haemophilus* 細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルムを選択するための方法が提供される。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、例えば、NTHI、および *Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、または *Moraxella catarrhalis* のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。スクリーニングする方法は、(a) 多微生物性バイオフィルム、またはそれらから単離および成長した多微生物性バイオフィルムを、抗DNAse抗体もしくはその生物学的に活性な断片、抗PilA抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはPilAポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちのいずれか1つと接触させるステップ、ならびに(b) 以下の遺伝子：*dead*、*artM*、*fis*、*folA*、*folP*、*emrA*、*emrB*、または *acrR* のうちの1つまたは複数の発現、およびタンパク質：*AsnC*、*CyaA*、*GlpC*、*NrfA*、*TehB*、*TrpB*、*TrpC*、*TrpD*、*TruA*、*TrxA*；*AbgA*、*AroE*、*AroK*、*ArtP*、*AtpH*、*BioB*、*BioF*、*CcmA*、*CitD*、*CitT*、*CmK*、*CoaD*、*DcdD*、*DjlA*、*DksA*、*DnaE*、*DnaQ*、*DsbE*、*FabG*、*FdhX*、*FtnB*、*FtsE*、*FtsI*、*FumC*、*Fur*、*GlpA*、*GlpB*、*GmK*、*GpsA*、*GreA*、*Hfq*、*HisI*、*HugZ*、*InfA*、*InfB*、*IspD*、*IspF*、*Lic2A*、*LicC*、*LicD*、*LolA*、*LpsA*、*menC*、*MenC*、*NapA*、*NrfB*、*NrfC*、NTHI0053、NTHI0249、NTHI0291、NTHI0319、NTHI0349、NTHI0436、NTHI0487、NTHI0490、NTHI0555、NTHI0732、NTHI0779、NTHI0820、NTHI1025、NTHI1085、NTHI1199、NTHI1437、NTHI1439、NTHI1503、NTHI1590、NTHI1748、*OppF*、*PanF*、*PdxH*、*PepT*、*PhoB*、*PlsC*、*PolA*、*PpC*、*PpiB*、*PrfB*、*PurU*、*RadA*、*RelB*、*RibA*、*RplW*、*RpoE*、*RpoZ*、*RseA*、*SecF*、*Sxy*、*TesB*、*ThrB*、*TolA*、*UnG*、*UreG*、*UuaP*、*UvrB*；*ClpB*、*CydD*、*Dead*、*DldD*、*DmsB*、*ExbD*、*GroES*、*HfeA*、*HfeB*、*HgpB*、*HisJ*、*HisJ*、*HitA*、*HktE*、*HxuC*、*LctP*、*LldD*、*LpxC*、*MurB*、*NdhA*、*NifS2*、NTHI0043、NTHI0052、NTHI0175、NTHI0364、NTHI1208、NTHI1214、NTHI1369、NTHI1703、*OmpP2*、*OrfG*、*Pal*、*PdgX*、*RbfA*、*RecN*、*RplO*、*RplU*、*RpmE*、*RpsE*、*RpsJ*、*RpsL*、*RpsQ*、*RpsT*、*SodA*、*Tbp1*、*TolB*、*TonB*、*TrpA*、*TrxA*、または *ZnuA* のうちの1つまたは複数のレベルについて、(a) のバイオフィルムから放出された細菌をアッセイするステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、以下：以下の遺伝子：*dead*、*artM*、*fis*、*folA*、*folP*、*emrA*、*emrB*、または *acrR* のうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；以下のタンパク質：*AsnC*、*CyaA*、*GlpC*、*NrfA*、*TehB*、*TrpB*、*TrpC*、*TrpD*、*TruA*、または *TrxA* のうちの1つまたは複数の変更されたレベル；以下のタンパク質：*AbgA*、*AroE*、*AroK*、*ArtP*、*AtpH*、*BioB*、*BioF*、*CcmA*、*CitD*、*CitT*、*CmK*、*CoaD*、*DcdD*、*DjlA*、*DksA*、*DnaE*、*DnaQ*、*DsbE*、*FabG*、*FdhX*、*FtnB*、*FtsE*、*FtsI*、*FumC*、*Fur*、*GlpA*、*GlpB*、*GmK*、*GpsA*、*GreA*、*Hfq*、*HisI*、*HugZ*、*InfA*、*InfB*、*IspD*、*IspF*、*Lic2A*、*LicC*、*LicD*、*LolA*、*LpsA*、*menC*、*MenC*、*NapA*、*NrfB*、*NrfC*、NTHI0053、NTHI0249、NTHI0291、NTHI0319、NTHI0349、NTHI

0436、NTHI0487、NTHI0490、NTHI0555、NTHI0732、NTHI0779、NTHI0820、NTHI1025、NTHI1085、NTHI1199、NTHI1437、NTHI1439、NTHI1503、NTHI1590、NTHI1748、OppF、PanF、PdxH、PepT、PhoB、PlsC、PolA、PpC、PpiB、PrfB、PurU、RadA、RelB、RibA、RplW、RpoE、RpoZ、RseA、SecF、Sxy、TesB、ThrB、TolA、UnG、UreG、UuaP、またはUvrBのうちの1つまたは複数の低いレベル；あるいは以下のタンパク質：ClpB、CydD、DeaD、DldD、DmsB、ExbD、GroES、HfeA、HfeB、HgpB、HisJ、HisJ、HitA、HktE、HxuC、LctP、LldD、LpxC、MurB、NdhA、NifS2、NTHI0043、NTHI0052、NTHI0175、NTHI0364、NTHI1208、NTHI1214、NTHI1369、NTHI1703、OmpP2、OrfG、Pal、PdgX、RbfA、RecN、RplO、RplU、RpmE、RpsE、RpsJ、RpsL、RpsQ、RpsT、SodA、Tbp1、TolB、TonB、TrpA、TrxA、またはZnuAのうちの1つまたは複数の高いレベルのうちの1つまたは複数が、バイオフィームが本明細書に開示される方法に好適であることを示す。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、抗チップキマー（chimer）抗体のCDRは、下記に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。別の態様では、抗PilA抗体は、PilAペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PilA表面抗原または組換えの可溶性PilA（Genbank受託番号：EFU96734.1）およびIV型ピリン（Genbank受託番号：Yp_003864351.1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。必要に応じて、高い、低い、変更された発現またはレベルは、同じであるがプランクトン様に成長した細菌と比較される。使用説明書およびアッセイに好適なプローブを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる、方法における使用のためのキットがさらに提供される。一部の実施形態では、プローブのうちの1つまたは複数は、標識されている。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1A～1Bは、抗rsPilAまたは抗IHFのいずれかによってバイオフィーム所在から放出されたNTHIの定量化を示す。16時間確立されたNTHIバイオフィームを、追加で、（図1A）6時間、ウサギ抗rsPilA IgGとともに、もしくは（図1B）15分間、ウサギ抗IHF IgGとともに、または3つの陰性対照（sBHI、ナイーブ血清から単離されたIgG、または抗OMP P5血清から単離されたIgG）のそれぞれとともにインキュベートし、それに続いて、バイオフィーム上の上清から回収されたNTHIの定量化を行った。抗rsPilAおよび抗IHFは、バイオフィーム所在から新たに放出された（NRel）状態へのNTHIの有意な放出を誘導した。個々のデータポイントを示し、バーは平均±SEMを表す。****、 $P < 0.0001$ 、ホルムーシダック補正を伴う一元配置分散分析。

【0015】

【図2-1】図2A～図2Eは、抗rsPilA NRelが、個々の細胞としてバイオフィームから放出された一方で、抗IHF NRelが凝集していたことを示す。図2Aは、2つの対照試料についての側方散乱および前方散乱のプロファイルを示す輪郭プロットを提供し、NTHIを、短時間超音波処理して、個々の細胞懸濁液を生成したか、また

はNTHIコロニーを、寒天プレートから収集して、細菌凝集体とし、フローサイトメトリによって評価した。(図2B)抗*rsPilA* NReIおよび(図2C)抗IHF NReIの代表的な輪郭プロットは、2つのNReI集団間の固有の散乱プロファイルを実証した。(図2D)前方散乱および(図2E)側方散乱による抗IHF NReI(右ヒストグラム)対抗*rsPilA* NReI(左ヒストグラム)の分布も明確に異なった。(図2D)および(図2E)に示される抗*rsPilA* NReIと比較した抗IHF NReIの累積分布の増加パーセントを、コルモゴロフスミルノフ検定(99%のCI)によって決定した。これらのデータは、バイオフィーム所在からのNTHIの抗*rsPilA*抗体または抗DNABII抗体媒介放出のいずれかへの曝露を介して生成されたNReI集団の追加の判別可能な特徴を表した。

10

【図2-2】同上。

【0016】

【図3】図3A~3Dは、プランクトン様に成長したNTHIと、重要なことには互いと比較して、明確に異なるプロテオミクス発現プロファイルで、抗*rsPilA*抗体または抗IHF抗体が生成したNReI集団とのインキュベーションによるバイオフィームからのNTHIの放出を示す。図3Aは、抗*rsPilA* NReI(中央の円中のドット)、抗IHF NReI(左の円中のドット)およびプランクトン様に成長したNTHI(右の円中のドット)におけるそれぞれのタンパク質の正規化されたスペクトルカウントから生成した主成分分析(PCA)プロットを提供する。それぞれの集団の三反復の試料を、95%の信頼楕円によって取り囲む。抗*rsPilA* NReIおよび抗IHF NReIのプロテオミクス発現プロファイルは、プランクトン様に成長したNTHIからおよび互いからの両方で明確に異なった。図3Bは、プランクトン様NTHIと比較した抗*rsPilA*(左部分)、抗IHF(右部分)または共通(中央部)に特異的な有意な($P < 0.05$)1.5倍の増加(破線の上)または2/3の減少(破線の下)を有するタンパク質の数のベン図を提供する。図3Cは、抗*rsPilA* NReI(それぞれの群の上側のバー)および抗IHF NReI(それぞれの群の下側のバー)が、プランクトン様に成長したNTHIと比較した場合に、異なるCOGカテゴリーによって表される有意な($P < 0.05$)1.5倍の増加または2/3の減少を有する明確に異なるタンパク質発現パターンを実証したことを示す。図3Dは、抗IHF NReI対抗*rsPilA* NReIのボルケーノプロットによって示される、互いと比較して有意な($P < 0.05$)1.5倍の増加または2/3の減少を有する抗IHF NReIおよび抗*rsPilA* NReIの集団のタンパク質発現プロファイルの相違の直接比較を提供する。負の有意な倍数減少は、抗*rsPilA* NReI(左上部におけるドット)においてより高い存在量のタンパク質を表す一方、正の倍数増加は、互いと比較して、抗IHF NReI(右上部におけるドット)においてより高いタンパク質存在量を表す。

20

30

【0017】

【図4】図4A~4Cは、抗生物質感受性を含む観察された明確に異なる抗IHF NReIおよび抗*rsPilA* NReIの表現型を支持する相対遺伝子発現の相違を示す。プランクトン様NTHIと比べたNReIによる遺伝子の発現を調べるためのqRT-PCRアッセイの結果。図4Aは、抗IHF NReI対抗*rsPilA* NReIにおいて有意に大きかった、成長の誘導期に関連する遺伝子である*dead*、*artM*、および*fis*の相対発現を提供する。図4Bは、TMPおよびSMXによって標的にされる酵素が、それぞれ、*fola*および*folP*によってコードされ、それによって、増加した発現が、耐性を付与することを示す。抗*rsPilA* NReIによる*fola*および*folP*の相対発現は、抗IHF NReIによるよりも有意に少なかった。図4Cは、TMP-SMXを輸送する排出ポンプのサブユニットをコードする*emrA*および*emrB*の相対発現が、抗*rsPilA* NReI対抗IHF NReIによって有意に少なかったことを示す。AMCを輸送する排出ポンプを表す*acrR*の発現は、抗IHF NReI対抗*rsPilA* NReIにおいて有意に上昇した。相対遺伝子発現のこれらのパターンは、それぞれ、TMP-SMXまたはAMCに対する抗*rsPilA* NReIまたは

40

50

抗 I H F N R e l の増強された感受性を支持する。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 、スチューデントの t 検定。

【0018】

【図5】図5A～5Eは、N R e l N T H I 集団が、それらのプランクトン様対応物よりも死滅に対して感受性がより高く、この感受性が、互いに明確に異なったことを示す。図5Aは、本明細書で試験された N T H I の4つの集団の図を提供する。N R e l は、N T H I バイオフィルムの抗 r s P i l A 血清（6時間、左下）からまたは抗 I H F 血清（15分、右下）から単離されたウサギポリクローナル I g G とのインキュベーションによって生成された。図5Bおよび図5Cは、抗 r s P i l A N R e l が、プランクトン様 N T H I よりもトリメトプリム／スルファメトキサゾールによる死滅に対して有意に感受性がより高かったが（それぞれ、1mlあたり0.94 μ gおよび4.7 μ gのTMP-SMX、図5B）、アモキシシリン／クラバン酸塩による死滅に対して感受性は同等でしかなかった（それぞれ、1mlあたり2.5 μ gおよび1.25 μ gのAMC、図5C）ことを示す。バイオフィルム内 N T H I は、予想通り、TMP-SMXまたはAMCのいずれかに対して、最小の感受性を提示した。対照的に、図5Dおよび5Eに示されるように、抗 I H F N R e l は、プランクトン様 N T H I と、TMP-SMXによる死滅に対して感受性は同等でしかなかったが（それぞれ、0.09および0.45 μ g/ml、図5D）、AMCによる死滅に対して有意に感受性がより高かった（それぞれ、0.30および0.15 μ g/ml、図5E）。TMP-SMXまたはAMCのいずれかによる死滅に対する N T H I N R e l の固有に高められた感受性は、それらがバイオフィルム所在から放出された機構に依存した。個々のデータポイントを示し、バーは平均 $\pm$ S E M を表す。*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 、ホルムーシダック補正を伴う一元配置分散分析。

10

20

【0019】

【図6】図6A～6Dは、それぞれ、TMP-SMXまたはAMCに対する抗 r s P i l A N R e l N T H I または抗 I H F N R e l N T H I の増強された感受性が、バイオフィルム所在からの N T H I 放出のタイミングと無関係であったことを提供する。出願人は、バイオフィルムを、抗 r s P i l A 血清または抗 I H F 血清のいずれかから単離されたウサギポリクローナル I g G に2時間曝露し、次いで、N R e l N T H I を収集し、相対抗生物質感受性についてアッセイした。（図6Aおよび図6B）は、抗 r s P i l A N R e l が、プランクトン様 N T H I よりもTMP-SMXによる死滅に対して有意に感受性がより高かったが（それぞれ、1mlあたり0.09 μ gおよび0.45 μ gのTMP-SMX）（図6A）、AMCによる死滅に対して感受性は同等でしかなかった（それぞれ、1mlあたり0.3 μ gおよび0.15 μ gのAMC、図6B）ことを示す。対照的に、（図6Cおよび図6D）に示されるように、抗 I H F N R e l は、プランクトン様 N T H I と、TMP-SMXによる死滅に対して感受性は同等でしかなかったが（それぞれ、0.94および4.7 μ g/ml、図6C）、AMCによる死滅に対して有意に感受性がより高かった（それぞれ、2.5および1.25 μ g/ml、図6D）。これらのデータは、15分の抗 I H F N R e l を6時間の抗 r s P i l A N R e l と比較した場合に示されるように、時間が一致した抗 r s P i l A N R e l または抗 I H F N R e l が、同じ明確に異なる抗生物質感受性の表現型を維持したことを示した（図5を参照されたい）。個々のデータポイントを示し、バーは平均 $\pm$ S E M を表す。****、 $P < 0.0001$ 、ホルムーシダック補正を伴う一元配置分散分析。

30

40

【0020】

【図7】図7は、抗 r s P i l A 抗体および抗 I H F（例えば、抗 D N A B I I）抗体の相乗効果を示す。ウェルを、1:1:1の比の N T H I + S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e + S t a p h y l o c o c c u s a u r e a s を用いてインキュベートし、37℃および5%のCO₂で16時間バイオフィルムを形成させた後、2時間処置して、培地単独による処置と比較した相対破壊を決定した（図にマークされた処置を参照されたい）。細菌を F M 1 - 4 3 F X で標識し、相対蛍光をウェルごとに算出した

50

。明確な相乗的な転帰は、抗 *r s P i l A* と抗チップキマー (*c h i m e r*) モノクローナル抗体による組合せ処置を介して達成され、ここで、最初の実証された。

【0021】

【図8-1】図8A~8Cは、抗 *I H F N T H I* によってバイオフィルムから新たに放出された *N T H I* の抗生物質感受性を示す。バイオフィルムを、37℃で16時間成長させ、次いで、抗 *I H F N T H I* (1:50希釈) または *s B H I* のみで6時間処置した。プランクトン様集団を収集し、抗生物質感受性についてアッセイした。使用した *A C* 濃度は $1 / 0.5 \mu g / ml$ であり、使用した *T S* 濃度は $7.5 / 37.5 \mu g / ml$ である。(図8A)は、 $1 / 10$ で希釈された抗 *I H F* または抗 *I H F* 処置なしからのデータをプロットする。(図8B)は、 $1 / 100$ で希釈された抗 *I H F* または抗 *I H F* 処置なしからのデータをプロットする。(図8C)は、死滅のパーセンテージを提供する。N=3。

10

【図8-2】同上。

【0022】

【図9-1】図9A~9Cは、複数種のバイオフィルムに対する相乗的活性を示す。(図9A)は、*N T H I + B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a* を示す。*N T H I* 単独のバイオフィルムは、明確に示されるカクテルの相乗性で予想されるように、機能し続けた。2種のバイオフィルムについて、両方の抗血清のみが有効であったが、カクテルは、2種のバイオフィルムからの両方の種の統計学的に有意な相乗的放出を誘導した。(図9B)は、*N T H I + S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s* バイオフィルムに対する活性を示す。(図9C)は、*N T H I + S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a* を示す。

20

【図9-2】同上。

【図9-3】同上。

【0023】

【図10-1】図10A~10Eは、二重種のバイオフィルムからの *M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s* (*M c a t*) による放出に対する抗 *r s P i l A* + 抗チップキマー (*c h i m e r*) の相乗活性を示す。(図10A) 非処置バイオフィルムからの無関係の細菌と比較した、 $2.5 \mu g$ の抗 *r s P i l A* 抗体、抗 *T i p* 抗体、または両方の抗体の組合せのいずれかへの曝露2時間後の *N T H I + M c a t* によって形成された2種のバイオフィルムまたは *N T H I* バイオフィルムのいずれかから放出された *N R e l*。(図10B) 非処置バイオフィルムからの無関係の細菌と比較した、 $2.5 \mu g$ の抗 *r s P i l A* 抗体、抗 *T i p* 抗体、または両方の抗体の組合せのいずれかへの曝露6時間後の *N T H I + M c a t* によって形成された2種のバイオフィルムまたは *N T H I* バイオフィルムのいずれかから放出された *N R e l*。(図10C) 非処置バイオフィルムからの無関係の細菌と比較した、 $2.5 \mu g$ の抗 *r s P i l A* 抗体、抗 *T i p* 抗体、または両方の抗体の組合せのいずれかへの曝露16時間後の *N T H I + M c a t* によって形成された2種のバイオフィルムまたは *N T H I* バイオフィルムのいずれかから放出された *N R e l*。(図10D) 非処置バイオフィルムからの無関係の細菌と比較した、 $10 \mu g$ の抗 *r s P i l A* 抗体、抗 *T i p* 抗体、または両方の抗体の組合せのいずれかへの曝露6時間後の *N T H I + M c a t* によって形成された2種のバイオフィルムまたは *N T H I* バイオフィルムのいずれかから放出された *N R e l*。(図10E) 非処置バイオフィルムからの無関係の細菌と比較した、 $10 \mu g$ の抗 *r s P i l A* 抗体、抗 *T i p* 抗体、または両方の抗体の組合せのいずれかへの曝露16時間後の *N T H I + M c a t* によって形成された2種のバイオフィルムまたは *N T H I* バイオフィルムのいずれかから放出された *N R e l*。

30

40

【図10-2】同上。

【図10-3】同上。

【発明を実施するための形態】

【0024】

詳細な説明

定義

50

本明細書で引用されるすべての技術的刊行物および特許公開は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本開示が、以前の開示によって、そのような開示に先行する権利がないという自白として、本明細書で解釈されない。本開示全体を通して、さまざまな技術的刊行物が、それらの第一著者および発行年または他の特定する引用によって参照される。第一著者および発行年によって特定される刊行物についての完全な引用は、特許請求の範囲に直前に見ることができる。

【0025】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似のまたは等価な任意の方法および材料を、本開示の実行または試験において使用することができるが、ここでは、好ましい方法、デバイス、および材料を記載する。

10

【0026】

本開示の実行は、他に指示されない限り、当技術分野の技能内にある、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組換えDNAについての従来技法を利用する。例えば、Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al.

20

(1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells:*

A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of*

30

Experimental Immunology; *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)); Sohail (ed.) (2004) *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application* (CRC Press)を参照されたい。

40

【0027】

範囲を含むすべての数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は近似値であり、これは、適切な場合、0.1または1.0の増分によって(+)または(-)に変動する。常に明確に述べられているとは限らないが、すべての数字表示に「約」という用語が先行することが理解されるべきである。常に明確に述べられているとは限らないが、本明細書に記載される試薬が単なる例示的なものであり、その等価物が当技術分野において公知であることも理解されるべきである。

【0028】

「約」という用語は、量または濃度などのような測定値に言及するときに本明細書で 사용되는場合、規定の量の20%、10%、5%、1%、0.5%、またはさらに0.1

50

%の変動を包含することを意味する。

【0029】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が他を明らかに指示しない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「抗体 (an antibody)」という用語は、複数の抗体を、それらの混合物を含めて、含む。

【0030】

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」または「含む (comprises)」という用語は、組成物および方法が、列挙された要素を含むが、他のものを排除しないことを意味することを意図する。「から本質的になる (consisting essentially of)」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、述べられた目的のための組合せに対して任意の本質的に重要な他の要素を排除することを意味するものとする。そのため、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法由来の微量の夾雑物および薬学的に許容される担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存剤などを排除しない。「からなる (consisting of)」は、他の成分の微量の要素および本開示の組成物を投与するための実質的な方法のステップまたは組成物を生成するためもしくは意図される結果を達成するためのプロセスのステップよりも多くのステップを排除することを意味するものとする。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本開示の範囲内である。

【0031】

「必要に応じた」または「必要に応じて」は、後に記載する状況が生じてもよく、または生じなくてもよいことを意味し、その結果、この記載には、この状況が生じる事例およびこれが生じない事例を含む。

【0032】

本明細書で使用される場合、「および／または」は、関連するリストされた項目の1つまたは複数のありとあらゆる可能な組合せ、ならびに選択的に（「or」）解釈される場合には、組合せの欠如を指し、それを包含する。

【0033】

「実質的に」または「本質的に」は、一部の所与の量の、ほぼ全体的にまたは完全に、例えば、95%またはそれよりも多くを意味する。一部の実施形態では、「実質的に」または「本質的に」は、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%を意味する。

【0034】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される比較用語、例えば、高い、低い、増加する、減少する、低減する、またはそれらの任意の文法的変形形態は、参照からのある特定の変動を指し得る。一部の実施形態では、そのような変動は、参照よりも約10%、もしくは約20%、もしくは約30%、もしくは約40%、もしくは約50%、もしくは約60%、もしくは約70%、もしくは約80%、もしくは約90%、もしくは約1倍、もしくは約2倍、もしくは約3倍、もしくは約4倍、もしくは約5倍、もしくは約6倍、もしくは約7倍、もしくは約8倍、もしくは約9倍、もしくは約10倍、もしくは約20倍、もしくは約30倍、もしくは約40倍、もしくは約50倍、もしくは約60倍、もしくは約70倍、もしくは約80倍、もしくは約90倍、もしくは約100倍、またはそれよりも高い増加を指し得る。一部の実施形態では、そのような変動は、参照の約1%、または約2%、または約3%、または約4%、または約5%、または約6%、または約7%、または約8%、または約9%、または約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%などの減少を指し得る。

【0035】

本明細書で使用される場合、「多微生物性バイオフィルム」という用語は、2種以上の

バイオフィルムを引き起こす細菌によって引き起こされるバイオフィルムを意図する。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、例えば、*NTHI*、および別の細菌、例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumonia*、または*Moraxella catarrhalis*のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。

【0036】

一部の実施形態では、「破壊する」という用語またはその文法的変形形態は、微生物性バイオフィルムの構成要素であるDNA／タンパク質マトリックスの妨害、例えば、細菌などの微生物の外側のバイオフィルムの構造上の根幹中の抗原を標的にし、このようにしてバイオフィルムを壊し、バイオフィルムの低減および／または排除をもたらすことを意図する。一部の実施形態では、そのような破壊プロセスは、細菌などの微生物によって提供されない。本明細書に示される一部の実施形態では、抗DNA B I I抗体は、バイオフィルムを破壊する。さらなる実施形態では、そのような破壊は、微生物種特異的ではない。

10

【0037】

ある特定の実施形態では、バイオフィルムを破壊することは、バイオフィルムを分散させること、バイオフィルムのDNA／タンパク質マトリックスから微生物を放出させること、ならびに必要に応じて、宿主の免疫エフェクターおよび／または抗生物質によって微生物の死滅を可能にすることを指す。

20

【0038】

「分散させる」という用語または文法的変形形態は、バイオフィルム中の微生物の表面上または内側の分子の妨害、例えば、微生物の表面上の抗原を標的にし、このようにしてバイオフィルムを壊し、バイオフィルムの低減および／または排除をもたらすことを指す。本明細書に示される一部の実施形態では、抗P i l A抗体は、バイオフィルムを分散させる。さらなる実施形態では、バイオフィルムは、分類不可能な*Haemophilus influenzae*を含み、および／またはそれによって生成される。

【0039】

バイオフィルムを「阻害すること、防止すること、または破壊すること」は、バイオフィルムの構造における予防的なまたは治療的な低減を意図する。

30

【0040】

「微生物DNA」は、バイオフィルムに組み込まれた細菌などの微生物由来の一本鎖または二本鎖DNAを意図する。本明細書で使用される場合、「eDNA」という用語は、病原性バイオフィルムに対する構成要素として見出される細胞外DNAを指す。

【0041】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらのアナログのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を行い得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変は、ポリヌクレオチドのアセンブリーの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、標識化構成要素とのコンジュゲーションによって、重合後にさらに改変され得る。この用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。他に規定または要求されない限り、ポリヌクレオチドで

40

50

ある本開示の任意の実施形態は、二本鎖形態、および二本鎖形態を構成することが公知または予測される2つの相補的一本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらのアナログのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を行い得る。

【0042】

ポリヌクレオチドは、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAである場合に、チミンの代わりにウラシル（U）の特定の配列から構成される。そのため、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表現である。このアルファベット表現は、中央演算処理装置を有するコンピューターのデータベースに入力され、バイオインフォマティクス適用、例えば、機能的ゲノミクスおよび相同性検索のために使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、RNAである。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、DNAである。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、DNAおよびRNAのハイブリッドである。

【0043】

「単離された」という用語は、核酸、例えば、DNAまたはRNAに関して本明細書で使用される場合、高分子の天然起源中に存在する、それぞれ、他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。「単離された核酸」という用語は、断片として天然に存在せず、天然状態で見出されない核酸断片を含むことを意味する。「単離された」という用語はまた、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチド、タンパク質および／または宿主細胞を指すために本明細書で使用され、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。他の実施形態では、「単離された」という用語は、細胞の構成物質、およびそうでなければ、通常天然で会合している細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、似ていない表現型または遺伝子型の組織または細胞から分離された細胞である。当業者に明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、その天然に存在する対応物からそれを区別するための「単離」を必要としない。

【0044】

一部の実施形態では、「操作された」または「組換え」という用語は、言及される種の天然に存在するタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、株、野生型株または親宿主株において通常見出されない少なくとも1つの改変を有することを指す。一部の実施形態では、「操作された」または「組換え」という用語は、ヒトの介入によって合成されていることを指す。

【0045】

本開示が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、その等価物または生物学的等価物が、本開示の範囲内と意図されることは、明白な記述なしで、かつ他に意図されない限り、推測されるべきである。本明細書で使用される場合、「その生物学的等価物」という用語は、参照タンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸を指す場合、「その等価物」と同義であることが意図され、最小限の相同性を有するが、所望の構造または機能性を依然として維持しているものを意図する。本明細書で具体的に列挙されない限り、本明細書で言及される任意のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、その等価物も含むことが企図される。一部の実施形態では、参照核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに対する等価物は、参照によってコードされる同じ配列をコードする。一部の実施形態では、参照核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに対する等価物は、必要に応じて高ストリンジェンシーの条件下で、参照、相補体参照、逆参照、および／または逆相補体参照とハイブリダイズする。

【0046】

加えてまたは代替的に、等価な核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、参照核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに対して、少なくとも70%、もしくは少なくとも75%、もしくは少なくとも80%の配列同一性、または代替的に、少なくとも85%の配列同一性、または代替的に、少なくとも90%の配列同一性、または代替的に、少なくとも92%の配列同一性、または代替的に、少なくとも95%の配列同一性、または代替的に、少なくとも97%の配列同一性、または代替的に、少なくとも98%の配列同一性を有するものであるか、あるいは代替的に、等価な核酸は、高ストリンジエンシーの条件下で、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体とハイブリダイズする。一態様では、等価物は、本明細書に記載される1つまたは複数のアッセイにより必要に応じて特定され得る機能的タンパク質をコードしなければならない。別の態様では、等価物は、参照核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに対して、少なくとも70%、もしくは少なくとも75%、もしくは少なくとも80%の配列同一性、または代替的に、少なくとも85%の配列同一性、または代替的に、少なくとも90%の配列同一性、または代替的に、少なくとも92%の配列同一性、または代替的に、少なくとも95%の配列同一性、または代替的に、少なくとも97%の配列同一性、または代替的に、少なくとも98%の配列同一性を有するか、あるいは代替的に、等価な核酸は、高ストリンジエンシーの条件下で、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体とハイブリダイズし、但し、1つまたは複数の天然に存在しないグリコシル化部位を有する本明細書で特定された1つまたは複数の突然変異したポリヌクレオチドが、開示される配列中の対応する突然変異したポリヌクレオチドから突然変異していない。

10

20

【0047】

一態様では、等価なポリヌクレオチドは、ストリンジントな条件下で、記載される方法における使用のための本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの相補物とハイブリダイズするものである。別の態様では、等価な抗体または抗原結合性ポリペプチドは、参照抗体または抗原結合性断片と比較して、少なくとも70%、もしくは代替的に、少なくとも75%、もしくは代替的に、少なくとも80%、もしくは代替的に、少なくとも85%、もしくは代替的に、少なくとも90%、もしくは代替的に、少なくとも95%の親和性、またはそれよりも高い親和性で抗原に結合するものを意図する。別の態様では、その等価物は、競合ELISAアッセイ下で、参照抗体または抗原結合性断片のその抗原への結合と競合する。別の態様では、等価物は、少なくとも約80%の相同性または同一性、および代替的に、少なくとも約85%、または代替的に、少なくとも約90%、または代替的に、少なくとも約95%、または代替的に、98%の相同性パーセントまたは同一性パーセントを意図し、参照タンパク質、ポリペプチドまたは核酸に対して実質的に等価な生物活性を示す。生物学的に等価なポリペプチドの例は、開示されるアミノ酸配列に対する保存的アミノ酸置換を特定するWO2011/123396号の表9に提供されている。

30

【0048】

別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、整列された場合に、塩基（またはアミノ酸）のパーセンテージが、2つの配列の比較において同じであることを意味する。このアライメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性は、当技術分野において公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているものを使用して決定することができる。好ましくは、デフォルトパラメーターが、アライメントのために使用される。あるアライメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用する、BLASTである。特に、プログラムは、以下のデフォルトパラメーターを使用する、BLASTNおよびBLASTPである：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；予想＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝

40

50

50 配列；ソート＝高スコア；データベース＝重複しない GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProt + SPUdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス：www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTで見ることができる。

【0049】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的のために整列され得るそれぞれの配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列中の位置が、同じ塩基またはアミノ酸によって占有される場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の度合いは、配列によって共有される一致する位置または相同位置の数の関数である。「非関連」または「非相同」配列は、本開示の配列のうちの1つと、40%未満の同一性、または代替的に、25%未満の同一性を共有する。

10

【0050】

「相同性」または「同一性」または「類似性」はまた、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指し得る。「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化されている複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン結合によって、または任意の他の配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、複数鎖の複合体を形成する3つもしくはそれよりも多くの鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセスのステップ、例えば、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断を構成していてもよい。

20

【0051】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化されている複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン結合によって、または任意の他の配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、複数鎖の複合体を形成する3つもしくはそれよりも多くの鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセスのステップ、例えば、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断を構成していてもよい。ハイブリダイゼーションが、2つの一本鎖ポリヌクレオチド間の逆平行配置で起こる場合、反応は、「アニーリング」と呼ばれ、これらのポリヌクレオチドは、「相補的」と記載される。ハイブリダイゼーションが、第1のポリヌクレオチドの鎖の1つと第2のポリヌクレオチドの鎖の1つとの間で起こり得る場合、二本鎖ポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドに対して「相補的」または「相同」であり得る。「相補性」または「相同性」（1つのポリヌクレオチドが別のものと相補的である度合い）は、一般に許容される塩基対形成のルールに従って、互いと水素結合を形成すると予想される逆の鎖中の塩基の割合に関して定量化可能である。

30

40

【0052】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行うことができる。一般に、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション反応は、10×SSC中約40℃で、または等価なイオン強度／温度の溶液で行われる。中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、典型的には、6×SSC中約50℃で行われ、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション反応は、一般に、1×SSC中約60℃で行われる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の他の例としては、約25℃～約37℃のインキュベーション温度；約6×SSC～約10×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC～約8×SSCの洗浄溶液が挙げられる。中ハイブリダイゼーション条件の例としては、約40℃～約5

50

0℃のインキュベーション温度；約9×SSC～約2×SSCの緩衝液濃度；約30%～約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC～約2×SSCの洗浄溶液が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては、約55℃～約68℃のインキュベーション温度；約1×SSC～約0.1×SSCの緩衝液濃度；約55%～約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSCの洗浄溶液または脱イオン水が挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベーション時間は、5分間～24時間であり、1、2回またはそれよりも多くの洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約1、2または15分間である。SSCは、0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用するSSCの等価物を用いることができることが理解される。ハイブリダイゼーション反応はまた、当業者に周知である「生理学的条件」下で行うことができる。生理学的条件の非限定的な例は、細胞中で通常見出される、温度、イオン強度、pHおよびMg²⁺の濃度である。

10

【0053】

「ポリヌクレオチドの増幅」という表現は、PCR、ライゲーション増幅（またはリガーゼ連鎖反応、LCR）および増幅方法などの方法を含む。これらの方法は、当技術分野において、公知であり、広く実行されている。例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号、ならびにInnis et al., 1990（PCRのため）、およびWu et al. (1989) Genomics 4:560-569（LCRのため）を参照されたい。一般に、PCR手順は、(i) DNA試料（またはライブラリー）内の特異的遺伝子へのプライマーの配列特異的ハイブリダイゼーション、(ii) DNAポリメラーゼを使用する、アニーリング、伸長および変性の複数ラウンドを含むその後の増幅、ならびに(iii) 正しいサイズのバンドについてのPCR産物のスクリーニングから構成される遺伝子増幅の方法を記載する。使用されるプライマーは、十分な長さのオリゴヌクレオチドおよび重合の開始を提供するのに適切な配列であり、すなわち、それぞれのプライマーは、増幅されるゲノム遺伝子座のそれぞれの鎖に相補的であるように特異的に設計される。

20

【0054】

PCRを実行するための試薬およびハードウェアは、市販されている。特定の遺伝子領域から配列を増幅するために有用なプライマーは、好ましくは、標的領域またはその隣接領域中の配列に相補的であり、それと特異的にハイブリダイズする。増幅によって生成された核酸配列は、直接配列決定されてもよい。あるいは、増幅された配列は、配列分析の前にクローニングされてもよい。酵素的に増幅されたゲノム分節の直接クローニングおよび配列分析のための方法は、当技術分野において公知である。

30

【0055】

「遺伝子」は、転写および翻訳された後に、特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含むポリヌクレオチドを指す。

【0056】

「発現」という用語は、遺伝子産物の産生を指す。本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、および／または転写されたmRNAが、その後、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含んでいてもよい。

40

【0057】

「コードする」という用語は、それがポリヌクレオチドに適用される場合、その天然状態で、または当業者に周知の方法によって操作された場合に、それが転写および／または翻訳されて、ポリペプチドおよび／またはその断片のためのmRNAを産生することができる場合、ポリペプチドを「コードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コード配列は、それらから推定することができる。

【0058】

50

「遺伝子産物」または代替的に「遺伝子発現産物」は、遺伝子が転写および翻訳された場合に作成される mRNA および／またはアミノ酸（例えば、ペプチドまたはポリペプチド）を指す。

【0059】

「転写制御下」は、当技術分野において十分に理解されている用語であり、ポリヌクレオチド配列、通常は DNA 配列の転写が、それが転写の開始に寄与するかまたは転写を促進するエレメントに作動可能に連結されていることに依存することを示す。「作動可能に連結された」は、ポリヌクレオチドが、細胞中でそれらが機能することが可能な様式で配置されていることを意図する。

【0060】

「調節配列」、「発現制御エレメント」または「プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、転写および／または複製される標的ポリヌクレオチドに作動可能に連結されており、標的ポリヌクレオチドの発現および／または複製を容易にするポリヌクレオチドを意図する。プロモーターは、発現制御エレメントまたは調節配列の例である。プロモーターは、5'、または調節された遺伝子の転写のための制御ポイントを提供する遺伝子または他のポリヌクレオチドの上流に位置し得る。ポリメラーゼ II および III は、プロモーターの例である。

【0061】

エンハンサーは、標的配列の発現を増加させる調節エレメントである。「プロモーター／エンハンサー」は、プロモーターおよびエンハンサーの両方の機能を提供することができ、配列を含有するポリヌクレオチドである。例えば、レトロウイルスの長い末端反復配列は、プロモーターおよびエンハンサーの両方の機能を含有する。エンハンサー／プロモーターは、「内因性」または「外因性」または「異種性」であり得る。「内因性」エンハンサー／プロモーターは、ゲノム中の所与の遺伝子と天然で連結されているものである。「外因性」または「異種性」エンハンサー／プロモーターは、その遺伝子の転写が連結されたエンハンサー／プロモーターによって指示されるように、遺伝子操作（すなわち、分子生物学的技法）の手段によって遺伝子に並置されているものである。

【0062】

「プローブ」は、ポリヌクレオチド操作の文脈で使用される場合、標的とハイブリダイズすることによって、目的の試料中に潜在的に存在する標的を検出する試薬として提供されるオリゴヌクレオチドを指す。通常、プローブは、検出可能な標識もしくはマーカー、または標識もしくはマーカーが、ハイブリダイゼーション反応の前または後のいずれかに付着することができる手段を含む。あるいは、「プローブ」は、目的の試料中に潜在的に存在する標的に結合することができるポリペプチド、抗体またはその断片などの生体化合物であり得る。

【0063】

「プライマー」は、短いポリヌクレオチド、一般に、標的とハイブリダイズすることによって、目的の試料中に潜在的に存在する標的または「鋳型」に結合し、その後、標的に相補的なポリヌクレオチドの重合を促進する、遊離 3'-OH 基を有する短いポリヌクレオチドである。「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）は、複製コピーが、「上流」および「下流」プライマーからなる「プライマーの対」または「プライマーのセット」、ならびに重合の触媒、例えば、DNA ポリメラーゼ、および典型的には、熱的に安定なポリメラーゼ酵素を使用して、標的ポリヌクレオチドを作る反応である。PCR のための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press) に教示されて

いる。ポリヌクレオチドの複製コピーを生成するすべてのプロセス、例えば、PCR または遺伝子クローニングは、本明細書でまとめて「複製」と称される。プライマーは、ハイブリダイゼーション反応、例えば、サザンブロット分析またはノーザンブロット分析におけるプローブとして使用することもできる。Sambrook and Russell (2001)、以下。

10

20

30

40

50

【0064】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、互換的に使用され、それらの最も広範な意味では、2つまたはそれよりも多くのサブユニットのアミノ酸、アミノ酸アナログまたはペプチド模倣薬の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結されていてもよい。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルなどによって連結されていてもよい。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に対する制限はない。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および／もしくは非天然アミノ酸、または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンならびにDおよびL光学異性体の両方、アミノ酸アナログ、ならびにペプチド模倣薬を含む。

10

【0065】

「C末端ポリペプチド」は、少なくとも10個、もしくは代替的に、少なくとも15個、もしくは代替的に、少なくとも20個、もしくは少なくとも25個のC末端アミノ酸、または代替的にポリペプチドの半分を意図する。別の態様では、90アミノ酸を含有するポリペプチドについて、C末端ポリペプチドは、アミノ酸46から90を含む。一態様では、この用語は、カルボキシル末端からC末端の20アミノ酸を意図する。

【0066】

本明細書で使用される場合、参照配列において特定された位置に「対応する」目的の配列におけるアミノ酸(a a)またはヌクレオチド(n t)残基の位置は、目的の配列と参照配列との間の配列アライメントにおける特定された位置に整列された残基の位置を指す。C l u s t a l O m e g a および B L A S T などのさまざまなプログラムが、そのような配列アライメントを行うために利用可能である。

20

【0067】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、その位置のアミノ酸残基の極性または電荷に対してわずかな影響があるか、または影響がないような、天然アミノ酸残基の、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸を含む標準残基による置換を指す。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の任意の他の非極性残基による置き換えから生じる。さらに、ポリペプチド中の任意の天然残基はまた、「アラニンスキャニング突然変異誘発」の方法に従って、アラニンで置換されてもよい。天然に存在するアミノ酸は、以下の通り、それらの側鎖に基づいて特徴付けられる：塩基性：アルギニン、リシン、ヒスチジン；酸性：グルタミン酸、アスパラギン酸；非荷電極性：グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、チロシン；および非極性：フェニルアラニン、トリプトファン、システイン、グリシン、アラニン、バリン、プロリン、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン。アミノ酸置換についての一般的なルールを、下記に示す。

30

40

50

【表 6】

アミノ酸置換		
元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
Leu	ノロイシン, Ile, Val, Met,	Leu
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu

10

20

【0068】

等価物および生物学的等価物という用語は、例えば、参照としての抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドに言及する場合、互換的に使用される。一部の実施形態では、等価な抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドは、参照タンパク質またはポリペプチドに対して、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有するものである。一部の実施形態では、等価な抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドは、本明細書に開示されるポリペプチドまたはタンパク質に対して、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、等価な抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドは、本明細書で述べられる等価なポリヌクレオチドによってコードされる抗体、抗体断片、ポリペプチドまたはタンパク質に対して、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、または少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する。加えて、または代替的に、ポリヌクレオチドの等価物は、参照または親ポリヌクレオチドと同じまたは類似の機能の抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドをコードする。

30

40

【0069】

一部の実施形態では、等価物は、本明細書に記載される1つまたは複数のアッセイにより必要に応じて特定され得る機能的タンパク質である。別の態様では、等価物は、参照タンパク質またはポリペプチドに対して、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少な

50

くとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有する。

【0070】

一部の実施形態では、等価なまたは生物学的に等価な抗体、抗体断片、タンパク質またはポリペプチドは、野生型と類似の機能を行うか、および／または野生型と比較して類似のレベルで機能を行う。

【0071】

本明細書で使用される場合、「EC₅₀」という用語は、規定された曝露時間後に、ベースラインと最大との間の中間の応答（例えば、抗体またはその断片とその標的との間の結合）を誘導する抗体またはその断片の濃度を指す。

【0072】

いくつかのパラメーターが、受容体（R、例えば、抗体またはその断片）とリガンド（L、例えば、抗体またはその断片の標的）分子の結合および非結合反応を記載するために本明細書で使用され、これは、 $R + L \rightleftharpoons RL$ として式化される。この反応は、それぞれ、 $M^{-1} \text{秒}^{-1}$ および 秒^{-1} の単位を有するオンレート定数 k_{on} およびオフレート定数 k_{off} によって特徴付けられる。平衡では、順方向の結合推移 $R + L \rightarrow RL$ は、逆方向の非結合推移 $RL \rightarrow R + L$ とバランスを取らなければならない。すなわち、 $k_{on} [R] [L] = k_{off} [RL]$ であり、ここで、 $[R]$ 、 $[L]$ および $[RL]$ は、非結合遊離受容体の濃度、非結合遊離リガンドの濃度、および受容体-リガンド複合体の濃度を表す。さらに、平衡解離定数「 K_D 」は、 $[R] \times [L] / [RL]$ である k_{off} / k_{on} として算出することができる一方、平衡結合定数「 K_A 」は、 $[RL] / ([R] \times [L])$ である k_{on} / k_{off} として算出することができる。

【0073】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「チップ」または「コンフォメーションチップドメイン」という用語は、構造が、プロリン残基によって典型的には媒介される急な回転を有する逆平行ベータリボンを含む一次アミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

【0074】

ポリペプチドの「チップキマー (chimer)」は、1つまたは複数のポリペプチドのうちの2つのチップを含むポリペプチドを意図する。チップキマー (chimer) は、同じポリペプチドの2つのチップ、または2つの異なるポリペプチド由来のチップを含んでいてもよい。DNABIIポリペプチドのチップキマー (chimer) は、例としてIHFアルファおよびIHFベータを使用して、2つのアームのタンパク質を形成するDNABIIポリペプチドを意図する（参照により組み込まれる米国特許第11,104,723号の図1を参照されたい）。その非限定的な例としては、本明細書でAチップ断片：NFE LRDKSSRPGRNPKTG DVV、配列番号 とも称されるIhfAのチップ断片、および本明細書でmB4チップ断片とも称されるIhfB改変B4：SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL（配列番号 ）もしくはFSLHHRQPRLGRNPKTGDSV、配列番号 、または2 IhfAチップ断片、または2 IhfB改変B4チップ断片が挙げられる。追加の例は、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2018/129078号に開示されている。ある特定の実施形態では、チップキメラペプチドは、

【化1】

RPGRNPX₁TGDVVPVSARRVV-X-

FSLHHRQPRLGRNPX₁TGDSV (配列番号)、

（ここで、「X」は、必要に応じて1～20アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる必要に応じたアミノ酸リンカー配列であり、「X₁」は、任意のアミノ酸であるか、または代替的に、「X₁」は、アミノ酸Q、R、K、

S、またはTから選択される)のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる、本明細書でI h f A 5 - m I h f B 4 N T H Iと指定されるペプチドを含む。さらなる態様では、「X₁」は、KまたはQである。さらなる実施形態では、チップキメラペプチドI h f A 5 - m I h f B 4 N T H Iは、
【化2】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV-X-FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV (配列番号) ,

(ここで、「X」は、必要に応じて1~20アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる必要に応じたアミノ酸リンカー配列である)のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。またさらなる実施形態では、チップキメラペプチドI h f A 5 - m I h f B 4 N T H Iは、

【化3】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVVGPSLFSLHHRQPRLGRNPKTGDSV (配列番号) ,

のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるかまたはまたさらにそれからなり、一部の実施形態では、これは、本明細書でチップキマー (chimer)とも称され、ここで、GPSLは、アミノ酸リンカー配列としての機能を果たす。

【0075】

DNA B I Iポリペプチドの「テール断片」は、バルク培地に曝露され、DNAまたは他のポリペプチドによって妨げられない両方のタンパク質の領域を意図する。

【0076】

免疫優性抗原は、抗体を認識し、高親和性で抗体に結合するタンパク質の領域を意図する。

【0077】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、全抗体、およびその任意の抗原結合性断片または一本鎖、それらのバリエーションまたは誘導体を含む。そのため、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含む。そのような例としては、限定されるものではないが、重鎖もしくは軽鎖の相補性決定領域(CDR)またはそのリガンド結合性部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク(FR)領域、あるいはその任意の部分、あるいは結合タンパク質の少なくとも一部分が挙げられ、これらのいずれかは、本開示の抗体に組み込まれ得る。「抗体」という用語は、消化断片、その規定される部分、誘導体およびバリエーションを包含することをさらに意図し、抗体模倣物を含むか、あるいは一本鎖抗体およびその断片を含む抗体またはそれらの規定される断片もしくは部分の構造および／もしくは機能を模倣する抗体の部分を含む。抗体の「抗原結合性部分」という用語内に包含される結合性断片の例としては、V_L、V_H、C_LおよびC_Hドメインからなる一価断片であるFab断片；ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(a b')₂断片；V_HおよびC_HドメインからなるFd断片；抗体の単一アームのV_LおよびV_HドメインからなるFv断片、V_HドメインからなるdAb断片(Ward et al. (1989) Nature 341:544-546)；ならびに単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらにまた、Fv断片の2つのドメインであるV_LおよびV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、単一のタンパク質鎖としてそれらが作成されるのを可能にする合成リンカーによって接続することができ、ここで、V_LおよびV_H領域は、対形成して、一価分子(一本鎖Fv(scFv)として公知)を形成する。Bird et al. (1988) Science 242:423-426お

よびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883。一本鎖抗体は、「抗体の断片」または抗体の「生物学的に活性な断片」という用語内

10

20

30

40

50

に包含されることも意図する。上記で述べた抗体断片のいずれかは、当業者に公知の従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷抗体である場合と同じ様式で、結合特異性および中和活性についてスクリーニングされる。

【0078】

「抗体」、「複数の抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの免疫グロブリン、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv、scFv、dsFv、Fd断片、dAb、VH、VL、VhH、およびV-NARドメインを含む、抗原への特異的結合を保持する抗体の断片；ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよびカップボディ；抗体断片から形成される多特異性の抗体断片および1つまたは複数の単離されたものも含む。そのような例としては、限定されるものではないが、重鎖もしくは軽鎖の相補性決定領域(CDR)またはそのリガンド結合性部分、重鎖または軽鎖可変領域(本明細書で可変ドメインとも称される)、重鎖または軽鎖定常領域(本明細書で定常ドメインとも称される)、フレームワーク(FR)領域、またはそれらの任意の部分、結合タンパク質の少なくとも一部分、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、ならびに抗体の抗原結合性部分および非抗体タンパク質を含む融合タンパク質が挙げられる。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体(Ab)の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合を媒介し得る。

【0079】

「抗」または「対する」という用語は、タンパク質の名称の前に使用される場合、例えば、抗DNABI I、抗IHF、抗HU、抗チップキマー(chimer)、抗PilA、抗OMP P5は、特定のタンパク質に結合し、および／またはそれに対する親和性を有するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはそれらの生物学的に活性な断片を指す。例えば、「抗IHF」は、IHFタンパク質に結合する抗体を指す。特異的抗体は、それに対して生じたタンパク質以外のタンパク質に対する親和性を有し得るか、またはそれに結合し得る。例えば、抗IHFは、IHFタンパク質に対して特異的に生じたが、配列相同性または構造相同性のいずれかにより関連する他のタンパク質にも結合し得る。

【0080】

相補性決定領域(CDR)は、それぞれ、B細胞およびT細胞によって生成された抗体またはT細胞受容体の可変領域の部分であり、ここで、これらの分子は、それらの特異的抗原(エピトープとも呼ばれる)に結合する。ある特定の実施形態では、「可変領域」および「可変ドメイン」という用語は互換的に使用され、ある抗体から別のものまでアミノ酸残基のその配列が大きく変化し、そして、特定の抗原に対して抗体の特異性を付与する結合部位のコンフォメーションを決定する、抗体の軽鎖または重鎖のポリペプチドを指す。さらなる実施形態では、可変領域は、約90アミノ酸長～約200アミノ酸長、例えば、限定されるものではないが、約100アミノ酸長、または代替的に、約110アミノ酸長、または代替的に、約120アミノ酸長、または代替的に、約130アミノ酸長、または代替的に、約140アミノ酸長、または代替的に、約150アミノ酸長、または代替的に、約160アミノ酸長、または代替的に、約170アミノ酸長、または代替的に、約180アミノ酸長、または代替的に、約190アミノ酸長である。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列の可変領域は、本明細書で使用される場合、アミノ酸配列の最初の約100アミノ酸、または代替的に、約110アミノ酸、または代替的に、約120アミノ酸、または代替的に、約130アミノ酸、または代替的に、約140アミノ酸、または代替的に、約150アミノ酸(適用可能な場合、シグナルペプチドを含むか、またはそれを排除する)が可変領域であることを指す。

【0081】

CDRのセットは、抗原を認識し、それに結合する抗体の一部である、抗原結合性部位とも呼ばれるパラトープを構成する。重鎖または軽鎖などの抗原受容体の可変領域のアミノ酸配列上に、必要に応じてアミノ末端からカルボキシル末端に非連続的に配置された

3つのCDR（CDR1、CDR2およびCDR3）が存在する。本明細書で使用される場合、CDR_nは、免疫グロブリン鎖におけるCDR_nまたは免疫グロブリン鎖に由来するCDR_nを指し、ここで、数字nは1～3から選択される。一実施形態では、CDRL_nは、軽鎖におけるCDR_nまたは軽鎖に由来するCDR_nを指し、ここで、数字nは1～3から選択される一方、CDRH_nは、重鎖におけるCDR_nまたは重鎖に由来するCDR_nを指し、ここで、数字nは1～3から選択される。ある特定の実施形態では、フレームワーク領域（FR）は、CDRではない可変領域の部分を指す。ある特定の実施形態では、FR_nは、重鎖もしくは軽鎖におけるFRまたは重鎖もしくは軽鎖に由来するFRを指し、ここで、数字nは1～4から選択される。ある特定の実施形態では、可変領域は、以下（必要に応じて、提供された順序に従い、さらに必要に応じて、アミノ末端からカルボキシル末端に）：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

【0082】

抗体の可変領域および／もしくはCDR、またはそれらの断片は、例えば、公に利用可能なまたは市販のツールを使用して、当業者によって決定され得る。そのようなツールの非限定的な例としては、IgBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/でアクセス可能)、Scaligner (www.scaligner.com/のdrugdesigntechから利用可能)、IMGTのルールおよび／もしくはツール（例えば、www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.htmlを参照されたく、www.imgt.org/でもアクセス可能）、Chothia Canonical Assignment (www.bioinf.org.uk/abs/chothia.htmlでアクセス可能）、Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI、opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/anarci/でアクセス可能）、Kabatの番号付け方法／スキーム（例えば、Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）またはParatomeウェブサーバー (www.ofranlab.org/paratome/でアクセス可能、Vered Kunik, et al, Nucleic Acids Research, Volume 40, Issue W1, 1 July 2012, Pages W521-W524を参照されたい）が挙げられる。

20

30

【0083】

抗体は、それらが、所望の生物活性を示す限り、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性（例えば、二特異性抗体）および抗体断片であり得る。抗体は、任意の好適な生物学的起源、例えば、マウス、ラット、ヒツジおよびイヌから単離することができる。本明細書で使用される場合、そして具体的に述べられない限り、「抗体」という用語は、その生物学的に活性な断片、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、バリエーション、誘導体化、キメラ、またはそれらの他の公知の改変を含む。

40

【0084】

「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、異なるB細胞系に由来する抗体の調製物を指す。それらは、特定の抗原に対して分泌された免疫グロブリン分子の混合物であり、異なるエピトープをそれぞれ認識する。

【0085】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は、それぞれのモノクローナル抗体が抗原上の単一の決定基に対するものであるため、非常に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などで検出可能に標識されてい

50

てもよい。抗体は、他の部分、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー）などにさらにコンジュゲートされていてもよい。抗体はまた、限定されるものではないが、ポリスチレンのプレートまたはビーズなどを含む、固体支持体に結合されていてもよい。

【0086】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知のハイブリドーマ技法または組換えDNA法を使用して生成されてもよい。ハイブリドーマは、抗体産生リンパ球、および非抗体産生がん細胞、通常、骨髄腫またはリンパ腫の融合から研究室で産生される細胞である。ハイブリドーマは、増殖し、特異的モノクローナル抗体の連続試料を産生する。抗体を生成または選択するための代替技法としては、リンパ球の目的の抗原への *in vitro* 曝露、および細胞、ファージまたは類似の系における抗体ディスプレイライブラリーのスクリーニングが挙げられる。

【0087】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図する。本明細書で開示されるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、*in vitro* でランダムにまたは部位特異的突然変異誘発によって、または *in vivo* で体細胞突然変異によって導入される突然変異）を含んでいてもよい。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、別の哺乳動物種、例えば、マウスの生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むことを意図しない。そのため、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的にあらゆる部分（例えば、CDR、フレームワーク、CL、CHドメイン（例えば、CH1、CH2、CH3）、ヒンジ、（VL、VH））が、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、少ない配列の変化または変形形態のみを伴う抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、げっ歯動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスターなど）および他の哺乳動物が指定された抗体は、そのような種、亜属、属、亜科、科に特異的な抗体を指定する。さらに、キメラ抗体は、上記の任意の組合せを含む。そのような変化または変形形態は、必要に応じて、非改変抗体と比べて、ヒトまたは他の種において免疫原性を保持または低減する。そのため、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは明確に異なる。ヒト抗体は、機能的に再配置されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核細胞もしくは真核細胞によって産生され得ることを指摘する。さらに、ヒト抗体が一本鎖抗体である場合、これは、天然ヒト抗体で見出されないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、Fvは、リンカーペプチド、例えば、2～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基を含むことができ、これは、重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を接続する。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源のものであると見なされる。

【0088】

本明細書で使用される場合、抗体が、ヒト免疫グロブリン配列を使用する系から、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる場合、ヒト抗体は、特定の生殖細胞系列配列に「由来」する。ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に「由来」するヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較することによってそれ自体特定することができる。選択されたヒト抗体は、典型的には、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列において少なくとも90%同一であり、他の種の生殖細胞系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖細胞系列配列）と比較した場合に、ヒト抗体をヒトであると特定するアミノ酸残基を含有する。ある特定の場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列において少なくとも95%、またはさらに、少なくと

も 96%、97%、98%もしくは99%同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖細胞系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とは10個以下のアミノ酸の相違を提示する。ある特定の場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とは5個以下、またはさらに、4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸の相違を提示し得る。

【0089】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」または「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するヒト／非ヒトキメラ抗体を指す。大部分では、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域またはその断片（例えば、1、2、3、4、5、または6つすべてのCDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種の可変領域またはその断片（例えば、1、2、3、4、5、または6つすべてのCDR）（ドナー抗体）由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体においてまたはドナー抗体において見出されない残基を含んでいてもよい。ヒト化抗体はまた、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリンのものの少なくとも一部分、フレームワーク領域、定常領域またはCDR中に、ヒト抗体由来の対応して位置するアミノ酸で置換された1つまたは複数のアミノ酸を含有する非ヒト抗体を含み得る。理論に拘束されることは望まないが、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化バージョンと比較して、ヒト宿主において低減された免疫応答を生じる。ヒト化抗体は、抗原結合または他の抗体機能に対して実質的に効果を有さない保存的アミノ酸置換を有していてもよい。保存的置換のグループ分けとしては、グリシン-アラニン、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、セリン-トレオニンおよびアスパラギン-グルタミンが挙げられる。具体的には、本明細書に開示されるヒト化抗体は、ある特定の範囲の以下の1つまたは複数：EC50、Kon、Koff、KAおよび／またはKDで、DNABIIポリペプチドまたはその断片（チップキメラペプチドまたはテールキメラペプチドなど）に特異的に結合し、対象を処置する際にある特定のサイトカインを阻害または放出する。さらなる実施形態では、DNABIIポリペプチドのチップ領域（チップキメラペプチドなど）に特異的に結合するヒト化抗体は、in vivoおよびin vitroの両方でバイオフィルムを破壊する。加えて、ヒト化のプロセスは、合理的設計プロセスであるが、例えば、結合親和性、抗原特異性、または可溶性もしくは凝集性などの物理特性において予想外の変化（正または負）を生じることがあり、それ故に、ヒト化抗体の特性は、出発の非ヒト抗体の特性から生得的に予測可能ではない。

【0090】

一実施形態では、抗体は、本明細書で使用される場合、組換え抗体であってもよい。「組換え抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製、発現、作出または単離されるすべての抗体、例えば、免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックもしくはトランス染色体である動物（例えば、マウス）、またはそれらから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、および免疫グロブリン（Ig）遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングに關与する他の任意の手段によって調製、発現、作出もしくは単離された抗体を含む。しかしながら、ある特定の実施形態では、そのような組換え抗体は、in vitro突然変異誘発（または、Ig配列に対してトランスジェニックの動物が使用される場合、in vivo体細胞突然変異誘発）に付すことができ、そのため、組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、in vivoでの抗体生殖細胞レパートリー内に天然に存在し得ない配列である。これらの抗体を作製する方法を、本明細書に記載する。

【0091】

一実施形態では、抗体は、本明細書で使用される場合、キメラ抗体であってもよい。本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、異なる種に属する抗体可変領域および定常領域の遺伝子から、典型的には遺伝子工学によって、軽鎖および重鎖遺伝子が構築されている抗体である。

【0092】

抗体は、本明細書で使用される場合、「抗体誘導体」であってもよい。一部の実施形態では、抗体誘導体は、アミノ酸のうちの1つまたは複数が、例えば、抗体を第2の分子に連結するために、アルキル化、ペグ化、アシル化、エステル形成またはアミド形成などによって化学的に改変されている、全長抗体または抗体の断片を含む。これとしては、限定されるものではないが、ペグ化抗体、システイン-ペグ化抗体、およびそれらのバリエーションが挙げられる。一部の実施形態では、「抗体誘導体」という用語は、上記に定義されるエピトープに結合し、本開示の天然モノクローナル抗体の改変または誘導体である分子を包含することを意図する。誘導体としては、限定されるものではないが、例えば、二特異性、多特異性、異種特異性、三特異性、四特異性、多特異性の抗体、ダイアボディ、キメラ、組換えおよびヒト化が挙げられる。

【0093】

抗体は、本明細書で使用される場合、「抗体バリエーション」であってもよく、これは、マウス以外の種において産生された抗体を含むことを意図する。これはまた、抗体または断片の線状ポリペプチド配列に対する翻訳後改変を含有する抗体も含む。これは、完全ヒト抗体をさらに包含する。

【0094】

「抗原」および「抗原性」という用語は、抗体によって認識される能力、またはそうでなければ、抗体-リガンド対のメンバーとして作用する能力を有する分子を指す。「特異的結合」または「結合」とは、抗原の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変領域との相互作用を指す。抗体-抗原結合は、*in vivo*または*in vitro*で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含む巨大分子が、抗原として作用する可能性を有することを理解するであろう。当業者は、抗体リガンドとして作用する可能性を有するタンパク質をコードする核酸が、必然的に抗原をコードすることをさらに理解するであろう。当業者は、抗原が、全長分子に限定されないが、部分的分子も含み得ることをさらに理解するであろう。「抗原性」という用語は、抗原の特性を有する分子に対する形容詞的言及である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち、免疫原、および免疫学的無反応またはアネルギーを誘導する物質、すなわち、アネルジェンを包含する。

【0095】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、結合対（例えば、抗体および抗原、または受容体およびリガンド）間の相互作用を指す。さまざまな事例では、特異的結合は、約 10^{-6} モル/リットル、約 10^{-7} モル/リットル、もしくは約 10^{-8} モル/リットル、またはそれ未満の親和性定数によって具体化され得る。

【0096】

免疫優性抗原は、抗体を認識し、高親和性で抗体に結合するタンパク質の領域を意図する。一部の実施形態では、免疫保護抗原は、タンパク質の機能を妨げる抗体を認識し、高親和性でそれと結合するタンパク質の領域を意図し、免疫保護抗原に対して生成した抗体は、タンパク質の機能、一部の 경우에는、バイオフィルムを消去する改善された能力による妨害に対する結果として標的の指標に対する増強された効果または最適な効果によって特徴付けられる。

【0097】

「変更された抗原」は、対応する野生型抗原のものとは異なる一次配列を有するものである。変更された抗原は、合成方法または組換え方法によって作製することができ、限定されるものではないが、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質

10

20

30

40

50

切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって、翻訳の間または翻訳後に異なって改変された抗原性ペプチドを含む。例えば、Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320を参照されたい。本明細書で開示される合成抗原または変更された抗原は、天然エピトープと同じCDRセットおよび／またはTCRに結合することが意図される。

【0098】

「免疫応答」は、リンパ球の外来性物質への抗原特異的応答を広範に指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘発する能力を有する分子を指す。すべての免疫原は抗原であるが、しかしながら、すべての抗原が免疫原性ではない。本明細書に開示される免疫応答は、体液性（抗体活性を介する）または細胞媒介性（T細胞活性化を介する）であり得る。応答は、*in vivo*または*in vitro*で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含む各種の巨大分子が、免疫原性である可能性を有することを理解するであろう。当業者は、免疫応答を誘発することができる分子をコードする核酸が、必然的に免疫原をコードすることをさらに理解するであろう。当業者は、免疫原が、全長分子に限定されないが、部分的分子を含んでもよいことをさらに理解するであろう。

【0099】

「受動免疫」という用語は、抗体の移入によるある対象から別の対象への免疫の移入を指す。受動免疫は、母体の抗体が胎児に移入される場合に、天然に起こり得る。受動免疫はまた、抗体組成物が非免疫対象に投与される場合、人工的に起こり得る。抗体のドナーおよびレシピエントは、ヒトまたは非ヒト対象であり得る。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、*in vitro*または*in vivo*で生成してもよく、実施形態に応じて、精製されてもよく、部分的に精製されてもよく、または未精製であってもよい。本明細書に記載される一部の実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片の投与により、それを必要とする対象に付与される。一部の実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片をコードする単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドの投与により付与される。

【0100】

「繁殖する」という用語は、細胞または細胞の集団が成長することを意味する。「成長する」という用語も、支持培地、栄養素、増殖因子、支持細胞、または所望の数の細胞もしくは細胞型を得るために必要な任意の化学化合物または生体化合物の存在下での細胞の増殖を指す。

【0101】

「培養する」という用語は、さまざまな種類の培地上またはその中の細胞または生物の*in vitro*繁殖を指す。培養において成長した細胞の子孫は、親細胞と完全に同一でなくてもよい（すなわち、形態学的に、遺伝子学的に、または表現型的に）ことが理解される。

【0102】

「細胞」または「宿主細胞」は、特定の対象の細胞だけでなく、そのような細胞の後代または潜在的な後代も指す。ある特定の改変が、突然変異または環境の影響のいずれかに起因してその後の世代において起こり得るので、そのような後代は、実際には、親細胞と同一でなくてもよいが、本明細書で使用される用語の範囲内に依然として含まれる。一部の実施形態では、細胞は、真核細胞である。他の実施形態では、細胞は、原核細胞である。

【0103】

細胞の集団は、表現型および／または遺伝子型において同一であるか（クローン）、または同一ではない2つ以上の細胞の収集物を意図する。集団は、本明細書に記載されるように、精製され得るか、非常に精製され得るか、実質的に同質であり得るか、または異種

10

20

30

40

50

であり得る。

【0104】

「遺伝子送達ビヒクル」は、挿入されるポリヌクレオチドを宿主細胞に運ぶことができる任意の分子として定義される。遺伝子送達ビヒクルの例は、リポソーム、ミセル、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生体適合性ポリマー、リポタンパク質、ポリペプチド、多糖、リポ多糖、人工ウイルスエンベロープ、金属粒子、ならびに細菌またはウイルス、例えば、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、ならびにさまざまな真核宿主および原核宿主における発現について記載されており、遺伝子治療および単純なタンパク質発現に使用され得る当技術分野において典型的に使用される他の組換えビヒクルである。

10

【0105】

本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して細胞または組織または対象に送達することができる。「遺伝子送達」、「遺伝子移入」、「形質導入」などは、本明細書で使用される場合、導入のために使用される方法にかかわらず、外因性ポリヌクレオチド（場合により「導入遺伝子」と称される）の宿主細胞への導入について言及する用語である。そのような方法としては、各種の周知の技法、例えば、ベクター媒介遺伝子移入（例えば、ウイルス感染／トランスフェクション、またはさまざまな他のタンパク質に基づくもしくは脂質に基づく遺伝子送達複合体による）および「ネイキッド」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技法（電気穿孔、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドの導入のために使用されるさまざまな他の技法など）が挙げられる。導入されるポリヌクレオチドは、宿主細胞において安定に、または一過性に維持され得る。安定な維持は、典型的には、導入されるポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合する複製起点を含有するか、あるいは宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外レプリコン（例えば、プラスミド）または核染色体もしくはミトコンドリア染色体に組み込むことのいずれかを必要とする。当技術分野において公知であり、本明細書に記載されるように、いくつかのベクターは、遺伝子の哺乳動物細胞への移入を媒介することができることが公知である。

20

【0106】

「プラスミド」は、染色体DNAとは無関係に複製することができる、染色体DNAから分離されている染色体外DNA分子である。多くの場合に、これは環状で二本鎖である。プラスミドは、微生物の集団内で水平方向の遺伝子移入のための機構を提供し、典型的には、所与の環境状態で選択的な利点を提供する。プラスミドは、競合的環境ニッチにおいて天然に存在する抗生物質に対する耐性を提供する遺伝子を運び得るか、または代替的に、産生されるタンパク質は、類似の条件下で毒素として作用し得る。

30

【0107】

遺伝子工学において使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と呼ばれる。多くのプラスミドは、そのような使用のために市販されている。複製される遺伝子は、特定の抗生物質に対して細胞を耐性にする遺伝子、およびいくつかの一般に使用される制限部位を含有し、この場所でDNA断片の容易な挿入を可能にする短い領域である多重クローニング部位（MCS、またはポリリンカー）を含有するプラスミドのコピーに挿入される。プラスミドの別の主要な使用は、大量のタンパク質を作製することである。この場合では、研究者らは、目的の遺伝子を保有するプラスミドを含有する細菌を成長させる。細菌が、その抗生物質耐性を付与するタンパク質を産生するのと全く同じように、それは、挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように誘導することもできる。これは、遺伝子、または次いでそれがコードするタンパク質を大量に産生する安価で容易な方法である。

40

【0108】

「酵母人工染色体」または「YAC」は、大きなDNA断片（100 kb よりも大きく、最大で3000 kb）をクローニングするために使用されるベクターを指す。これは、人工的に構築された染色体であり、酵母細胞における複製および保存に必要なテロメア配列、セントロメア配列および複製起点配列を含有する。最初に環状プラスミドを使用して

50

構築すると、それらは、制限酵素を使用することによって線状化され、次いで、DNAリガーゼを、付着末端の使用によって線状分子内に目的の配列または遺伝子を付加することができる。酵母発現ベクター、例えば、YAC、YIp（酵母組込みプラスミド）およびYEp（酵母エピソームプラスミド）は、酵母それ自身が真核細胞であるため、翻訳後改変を有する真核生物タンパク質産物を得ることができるので、極めて有用であるが、しかしながら、YACは、BACよりも不安定であり、キメラ効果を生じることが見出されている。

【0109】

「ウイルスベクター」は、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のいずれかで、宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む組換え的に産生されたウイルスまたはウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。感染性タバコモザイクウイルス（TMV）に基づくベクターは、タンパク質を製造するために使用することができ、タバコ葉においてグリフィスシンを発現することが報告されている（O'Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106(15):6099-6104）。アルファウイルスベクター、例えば、セムリキ森林熱ウイルスに基づくベクターおよびシンドビスウイルスに基づくベクターは、遺伝子治療および免疫療法における使用のためにも開発されている。Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439およびYing et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827を参照されたい。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物は、レトロウイルスゲノムまたはその部分および治療用遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。

【0110】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス媒介遺伝子移入」または「レトロウイルス形質導入」は、同じ意味を持ち、遺伝子または核酸配列が、細胞に侵入し、ウイルスのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むウイルスによって、宿主細胞に安定に移入されるプロセスを指す。ウイルスは、その正常な感染の機構を介して宿主細胞に侵入することができ、またはウイルスが異なる宿主細胞表面受容体もしくはリガンドに結合して、細胞に侵入するように改変することができる。本明細書で使用される場合、レトロウイルスベクターは、ウイルスまたはウイルス様侵入機構により外因性核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。

【0111】

レトロウイルスは、それらの遺伝子情報をRNAの形態で運ぶが、しかしながら、ウイルスが細胞に感染すると、RNAは、DNA形態に逆転写され、これが、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれるDNA形態は、プロウイルスと呼ばれる。

【0112】

遺伝子移入がDNAウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（Ad）またはアデノ随伴ウイルス（AAV）によって媒介される態様では、ベクター構築物は、ウイルスゲノムまたはその部分および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス（Ad）は、比較的良く特徴付けられているウイルスの同種の群であり、50を超える血清型を含む。例えば、PCT国際出願公開第WO95/27071号を参照されたい。Adは、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない。組換えAd由来ベクター、特に、組換えおよび野生型ウイルスの生成の可能性が低減されたものも、構築されている。PCT国際出願公開第WO95/00655号および同第WO95/11984号を参照されたい。野生型AAVは、宿主細胞のゲノムに組み込まれる高い感染力および特異性を有する。Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470およびLebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996を参照されたい。

【0113】

ポリヌクレオチドが作動可能に連結され得るプロモーターおよびクローニング部位の両

方を含有するベクターは、当技術分野において周知である。そのようなベクターは、*in vitro*または*in vivo*でRNAを転写することができ、Stratagene (La Jolla, Calif.) およびPromega Biotech (Madison, Wis.) などの供給源から市販されている。発現および／または*in vitro*転写を最適化するために、クローンの5'および／または3'非翻訳部分を除去、付加または変更して、余分の潜在的で不適切な代替の翻訳開始コドン、または転写もしくは翻訳のレベルのいずれかで発現を妨げ得るか、もしくはそれを低減し得る他の配列を除外することが必要であり得る。あるいは、コンセンサスリボソーム結合部位は、開始コドンのすぐ5'に挿入されて、発現を増強することができる。

【0114】

遺伝子送達ビヒクルとしては、DNA／リボソーム複合体、ミセルおよび標的ウイルスタンパク質-DNA複合体も挙げられる。標的化抗体またはその断片も含むリボソームは、本明細書に開示される方法において使用することができる。ポリヌクレオチドの細胞または細胞集団への送達に加えて、本明細書に記載されるタンパク質の細胞または細胞集団への直接的導入は、タンパク質トランスフェクションの非限定的な技法によって行うことができ、あるいは本明細書に開示されるタンパク質の発現を増強し、および／またはその活性を促進することができる培養条件は、他の非限定的な技法である。

【0115】

遺伝子移入がレンチウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物は、レンチウイルスゲノムまたはその部分および治療用遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。本明細書で使用される場合、「レンチウイルス媒介遺伝子移入」または「レンチウイルス形質導入」は、同じ意味を持ち、遺伝子または核酸配列が、細胞に侵入し、ウイルスのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むウイルスによって、宿主細胞に安定に移入されるプロセスを指す。ウイルスは、その正常な感染の機構を介して宿主細胞に侵入することができ、またはウイルスが異なる宿主細胞表面受容体もしくはリガンドに結合して、細胞に侵入するように改変することができる。レトロウイルスは、それらの遺伝子情報をRNAの形態で運ぶが、しかしながら、ウイルスが細胞に感染すると、RNAは、DNA形態に逆転写され、これが、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれるDNA形態は、プロウイルスと呼ばれる。本明細書で使用される場合、レンチウイルスベクターは、ウイルスまたはウイルス様侵入機構により外因性核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。「レンチウイルスベクター」は、他のレトロウイルスベクターと比較して、非分裂細胞を形質導入するある特定の利点を有する当技術分野において周知のある種類のレトロウイルスベクターである。Trono D. (2002) *Lentiviral vectors*, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelbergを参照されたい。

【0116】

本開示のレンチウイルスベクターは、オンコレトロウイルス (MLVを含有するレトロウイルスの亜群) およびレンチウイルス (HIVを含有するレトロウイルスの亜群) に基づくか、またはそれに由来する。例としては、ASLV、SNVおよびRSVが挙げられ、これらのすべてが、レンチウイルスベクター粒子産生系のためのパッケージングおよびベクター構成要素に分けられる。本開示によるレンチウイルスベクター粒子は、遺伝子学的にまたはそうでなければ (例えば、細胞系をパッケージングする特異的な選択によって) 変更された特定のレトロウイルスのバージョンに基づいていてもよい。

【0117】

本開示によるベクター粒子が特定のレトロウイルスに「基づく」ということは、ベクターが特定のレトロウイルスに由来することを意味する。ベクター粒子のゲノムは、骨格としてそのレトロウイルス由来の構成要素を含む。ベクター粒子は、逆転写および組込み系を含むRNAゲノムに適合性の必須のベクター構成要素を含有する。通常、これらとしては、特定のレトロウイルスに由来するgagおよびpolタンパク質が挙げられる。そのため、ベクター粒子の構造構成要素の大多数は、通常、レトロウイルスに由来するが、それらは、遺伝子学的にまたはそうでなければ所望の有用な特性を提供するように変更され

ていてもよい。しかしながら、ある特定の構造構成要素、特に、envタンパク質は、異なるウイルスが起源であってもよい。ベクターの宿主範囲および感染または形質導入される細胞型は、ベクター粒子産生系において異なるenv遺伝子を使用して、異なる特異性をベクター粒子に与えることによって変更することができる。

【0118】

「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」という用語は、本明細書で使用される場合、この名称に関連し、Parvoviridae科のdependoparvovirus属に属するウイルスのクラスのメンバーを指す。このウイルスの複数の血清型は、遺伝子送達に好適であることが公知であり、公知の血清型はすべて、さまざまな組織型由来の細胞に感染することができる。少なくとも11の連続して番号付けされたAAV血清型が、当技術分野において公知である。本明細書に開示される方法において有用な非限定的な例示的な血清型としては、11の血清型、例えば、AAV2、AAV8、AAV9、またはバリエーションもしくは合成血清型、例えば、AAV-DJおよびAAV- Φ HP.Bのいずれかが挙げられる。AAV粒子は、VP1、VP2およびVP3の3つの主要なウイルスタンパク質を含むか、代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一実施形態では、AAVは、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV- Φ HP.BまたはAAV-rh74のものを指す。これらのベクターは、市販されているか、または特許文献もしくは技術文献に記載されている。

10

【0119】

「検出可能な標識」、「標識」、「検出可能なマーカー」または「マーカー」は、互換的に使用され、限定されるものではないが、放射性同位元素、蛍光色素、化学発光化合物、色素、および酵素を含むタンパク質を含む。検出可能な標識は、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または組成物に付着することもできる。

20

【0120】

本明細書で使用される場合、「標識」または検出可能な標識という用語は、「標識された」組成物を生成するために、検出される組成物に直接的にまたは間接的にコンジュゲートされている直接的にまたは間接的に検出可能な化合物または組成物、例えば、N末端ヒスチジンタグ(N-His)、磁気的に活性な同位元素、例えば、 ^{115}Sn 、 ^{117}Sn および ^{119}Sn 、非放射性同位元素、例えば、 ^{13}C および ^{15}N 、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば、抗体を意図する。この用語は、挿入される配列の発現の際にシグナルを提供する、ポリヌクレオチドにコンジュゲートされる配列、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)なども含む。標識は、それ自身によって検出可能であってもよく(例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識)、または酵素標識の場合では、検出可能である基質化合物もしくは組成物の化学変化を触媒してもよい。標識は、小スケールの検出に好適であり得るか、またはハイスループットスクリーニングにより好適であり得る。そのため、好適な標識としては、限定されるものではないが、磁気的に活性な同位元素、非放射性同位元素、放射性同位元素、蛍光色素、化学発光化合物、色素、および酵素を含むタンパク質が挙げられる。標識は、単に検出されてもよく、またはそれは、定量化されてもよい。単に検出される応答は、一般に、その存在が単に確認される応答を含む一方、定量化される応答は、一般に、定量可能な(例えば、数字で報告可能な)値、例えば、強度、偏光および/または他の特性を有する応答を含む。発光または蛍光アッセイでは、検出可能な応答は、結合に実際に関与するアッセイ構成要素と会合した発光団もしくはフルオロフォアを使用して直接的に、または別の(例えば、レポーターまたはインジケーター)構成要素と会合した発光団またはフルオロフォアを使用して間接的に生成されてもよい。シグナルを生成する発光標識の例としては、限定されるものではないが、生物発光および化学発光が挙げられる。検出可能な発光応答は、一般に、発光シグナルの変化、または発光シグナルの発生を含む。アッセイ構成要素を発光標識するための好適な方法および発光団は、当技術分野において公知であり、例えば、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed)

30

40

50

に記載されている。発光プローブの例としては、限定されるものではないが、エクオリンおよびルシフェラーゼが挙げられる。

【0121】

本明細書で使用される場合、「イムノコンジュゲート」という用語は、第2の薬剤、例えば、細胞傷害剤、検出可能な薬剤、放射活性剤、標的化剤、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、半合成抗体、もしくは多特異性抗体と会合したか、またはそれに連結された、抗体あるいは抗体誘導体を含む。

【0122】

好適な蛍光標識の例としては、限定されるものではないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、Cascade Blue（商標）、およびテキサスレッドが挙げられる。他の好適な光学色素は、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed.)に記載されている。

【0123】

別の態様では、蛍光標識は、細胞表面マーカーなどの細胞もしくは組織中、またはその表面上に存在する細胞構成要素への共有結合的な付着を容易にするように官能化されている。好適な官能基としては、限定されるものではないが、イソチオシアネート基、アミノ基、ハロアセチル基、マレイミド、スクシンイミジルエステルおよびスルホニルハライドが挙げられ、これらのすべては、蛍光標識を第2の分子に付着させるために使用され得る。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、薬剤、マーカーまたは第2の標識化剤のいずれかへの付着の部位に依存する。

【0124】

本明細書で使用される場合、精製標識または精製マーカーは、標識がコンジュゲートされる分子または構成要素を精製するのに使用され得る標識、例えば、エピトープタグ（限定されるものではないが、Mycタグ、ヒトインフルエンザ赤血球凝集素（HA）タグ、FLAGタグを含む）、親和性タグ（限定されるものではないが、グルタチオン-Sトランスフェラーゼ（GST）、ポリヒスチジン（His）タグ、カルモジュリン結合タンパク質（CBP）、またはマルトース結合タンパク質（MBP）を含む）、または蛍光タグを指す。

【0125】

「許容される」、「有効な」、または「十分な」という用語は、本明細書に開示される任意の構成要素、範囲、剤形などの選択を記載するために使用される場合、前記構成要素、範囲、剤形などが開示された目的のために好適であることを意図する。

【0126】

本開示の文脈では、「リガンド」は、ポリペプチドである。一態様では、「リガンド」という用語は、本明細書で使用される場合、別の分子上の特定の部位に結合する任意の分子を指す。言い換えれば、リガンドは、免疫エフェクター細胞、またはタンパク質に対する抗体、またはタンパク質に対するDNAとの反応においてタンパク質の特異性を付与する。一態様では、これは、免疫エフェクター細胞上の相補的結合部位と直接的に組み合わせられるタンパク質内のリガンド部位である。

【0127】

本明細書で使用される場合、「処置すること」、「処置」などの用語は、有益なもしくは所望の薬理的効果および／もしくは生理的効果、ならびに／または臨床結果を含む所望の結果を得ることを意味するために本明細書で使用される。一部の実施形態では、効果および／または結果は、障害またはその徴候もしくは症状を完全にまたは部分的に防止することのうちの1つまたは複数の観点で予防的であり得、ならびに／あるいは検出可能または検出不能にかかわらず、障害および／もしくは障害に起因する有害効果に対する部分的なもしくは完全な治癒、および／または1つもしくは複数の症状の軽減もしくは改善、状態（疾患を含む）の程度の減少、状態（疾患を含む）の安定化された（すなわち、悪化し

10

20

30

40

50

ていない) 状態、状態 (疾患を含む) の進行の遅延もしくは減速、状態 (疾患を含む) の状況の改善または軽減、および寛解 (部分的または全体的かどうか) という観点で治療的であり得る。「処置」の例としては、限定されるものではないが、障害にかかりやすくあり得るが、それを有するとしてまだ診断されていない対象において障害が生じるのを防止すること、障害を阻害すること、すなわち、その発生を阻むこと、および／または障害の症状を緩和することもしくは改善することが挙げられる。一態様では、処置は、疾患または障害の症状の発生の差し止めである。一部の実施形態では、それらは、(1) 疾患にかかりやすいか、もしくは疾患の症状をまだ示していない対象において症状または疾患が起こるのを防止すること；(2) 疾患を阻害すること、またはその発生を阻むこと；あるいは(3) 疾患もしくは疾患の症状を改善することまたはその退縮を引き起こすことを指す。一態様では、処置は、予防または防止を除外する。

10

【0128】

一部の実施形態では、処置によって達成される別の有益なまたは所望の薬理学的効果および／または生理学的効果は、以下のうちの1つもしくは複数を含み得るか、またはそれから本質的になり得るか、またはまたさらにそれからなり得る：抗生物質のみを使用する処置と比較して抗生物質の用量を低減すること、抗生物質のみを使用する処置と比較してより短い抗生物質を使用する期間、抗生物質のみを使用する処置と比較してより低い抗生物質を使用する頻度、または抗生物質のみを使用する処置と比較して抗生物質の使用に起因する副作用がより少ない (より穏やかな副作用、副作用がない、または副作用に苦しむより低い頻度、副作用に苦しむより短い期間)。そのような副作用は、皮膚の発疹、下痢および腸内マイクロバイオームの生涯にわたる破壊のうちの1つまたは複数を含み得るか、またはそれから本質的になり得るか、またはまたさらにそれからなり得る。

20

【0129】

防止することは、障害または影響にかかりやすい系または対象において、*in vitro*または*in vivo*で、疾患または障害または影響を防止することを意図する。そのような例は、それを産生することが公知の微生物に感染している系におけるバイオフィルムの形成を防止することである。

【0130】

一部の実施形態では、「バイオフィルムを処置すること」またはその文法的変形形態は、バイオフィルムを壊すこと (分散および／または破壊を介してなど) を指す。加えて、または代替的に、「バイオフィルムを処置すること」は、バイオフィルムを形成する微生物の微生物負荷 (例えば、数および／または濃度として示される) の低減および／または除去も指し得る。一部の実施形態では、微生物負荷は、以下の形態：プランクトン様、バイオフィルムまたは新たに放出のいずれか1つまたは2つまたは3つすべての微生物に基づいて算出される。一部の実施形態では、微生物負荷は、バイオフィルム中の微生物にのみ基づいて算出される。

30

【0131】

一実施形態では、「疾患」または「障害」という用語は、本明細書で使用される場合、多微生物性バイオフィルム、そのような疾患と診断される状態、そのような疾患を有すると疑われる状態、もしくはそのような疾患を有する高リスクの状態によって引き起こされるか、および／またはそれらに関するものなどの疾患を指す。一部の実施形態では、疾患は、肺炎、副鼻腔炎、敗血症、心内膜炎、喉頭蓋炎、敗血症性関節炎、髄膜炎、分娩後および新生児感染症、分娩後および新生児敗血症、急性および慢性卵管炎、心膜炎 (pericarditis)、蜂巣炎、骨髄炎、心内膜炎、胆嚢炎、腹腔内感染症、尿路感染症、乳様突起炎、大動脈移植感染症、結膜炎 (conjunctivitis)、ブラジル紫斑熱、潜在性菌血症、ならびに基礎的肺疾患、例えば、慢性気管支炎、気管支拡張症 (bronchiectasis) および嚢

40

胞性線維症の悪化から選択される。加えて、または代替的に、疾患は、嚢胞性線維症 (CF)、肺CF、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、慢性鼻副鼻腔炎 (CRS)、歯周炎、インプラント周囲炎、中耳感染症、中耳炎 (OM)、急性中耳炎 (AOM)、滲出性中耳炎

50

(OME)、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏(PTTO)、人工呼吸器関連肺炎(VAP)、市中感染性肺炎(CAP)、胸腔チューブ/カテーテル/留置デバイスバイオフィルム感染症、扁桃炎、咽頭炎(pharyngitis)、咽頭炎(laryngitis)、喉頭蓋炎、副鼻腔

炎、肺炎、気管支炎、または他の気道感染症(RTI)から選択される。一部の実施形態では、疾患は、H. influenzae(分類可能なおよび分類不可能な株)が関与する任意の病態、例えば、OM、肺炎、副鼻腔炎、敗血症、心内膜炎、喉頭蓋炎、敗血症性関節炎、髄膜炎、分娩後および新生児感染症、分娩後および新生児敗血症、急性および慢性卵管炎、喉頭蓋、心膜炎、蜂巣炎、骨髄炎、心内膜炎、胆嚢炎、腹腔内感染症、尿路感染症、乳様突起炎、大動脈移植感染症、結膜炎、ブラジル紫斑熱、潜在性菌血症、慢性閉塞性肺疾患、ならびに基礎的肺疾患、例えば、慢性気管支炎、気管支拡張症および嚢胞性線維症の悪化である。一部の実施形態では、疾患は、NTHIなどの本明細書に開示される細菌性バイオフィルムによって直接的にまたは間接的に引き起こされる対象の任意の障害である。一部の実施形態では、バイオフィルムは、多微生物性バイオフィルムである。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。

10

20

【0132】

抗体、ワクチン、ペプチド、細胞もしくはベクター、またはそれを含有する他の薬剤および組成物の「投与」または「送達」は、1用量で、処置の過程全体にわたって連続的または間欠的にもたらされ得る。投与の最も有効な手段および投薬量を決定する方法は、当業者に公知であり、治療のために使用される組成物、治療の目的、処置される標的の感染症またはバイオフィルム、および処置される対象により変わる。単回投与または複数回投与は、処置する医師によって、または動物の場合では処置する獣医師によって、選択される用量レベルおよびパターンで行うことができる。好適な投薬製剤および薬剤を投与する方法は、当技術分野において公知である。投与経路も決定することができ、投与の最も有効な経路を決定する方法は、当業者に公知であり、処置のために使用される組成物、処置の目的、処置される対象の健康状態または疾患ステージ、および標的細胞または組織により変わる。投与経路の非限定的な例としては、経口投与、腹腔内、注入、経鼻投与、吸入、注射、および局所適用が挙げられる。

30

【0133】

投与という用語は、限定されないが、経口、非経口(例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内、脳室内(ICV)、くも膜下腔内、大槽内注射もしくは注入、皮下注射、またはインプラント)による投与、経鼻吸入スプレー、膣、直腸、舌下、尿道(例えば、尿道坐剤)または局所投与経路(例えば、ゲル、軟膏、クリーム、エアロゾルなど)による投与を含むものとし、単独または一緒に、それぞれの投与経路に適切な従来の非毒性の薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤、およびビヒクルを含有する好適な投薬単位製剤において製剤化することができる。本開示は、投与経路、製剤または投薬スケジュールによって限定されない。

40

【0134】

「投与」は、1用量で、処置の過程全体にわたって連続的または間欠的にもたらされ得る。投与の最も有効な手段および投薬量を決定する方法は、当業者に公知であり、治療のために使用される組成物、治療の目的、処置される標的細胞、および処置される対象により変わる。単回投与または複数回投与は、処置する医師によって選択される用量レベルおよびパターンで行うことができる。好適な投薬製剤および薬剤を投与する方法は、当技術分野において公知である。

【0135】

本開示の薬剤は、投与の任意の好適な経路によって治療のために投与することができる

50

。最適な経路が、レシピエントの状態および年齢、ならびに処置される疾患により変わることも認識されるであろう。

【0136】

本明細書で使用される場合、「接触させること」という用語は、2つまたはそれよりも多くの分子間の直接的なまたは間接的な結合または相互作用を意味する。直接的な相互作用の特定の例は、結合である。間接的な相互作用の特定の例は、1つの実体が中間の分子に対して作用し、次に、それが第2の参照実体に対して作用する場合である。接触させることは、本明細書で使用される場合、溶液中、固相中、*in vitro*、*ex vivo*、細胞中、および *in vivo* を含む。*in vivo* で接触させることは、投与することまたは投与と称され得る。

10

【0137】

「組成物」は、活性薬剤、および不活性な（例えば、検出可能な薬剤または標識）または活性な別の化合物または組成物、例えば、アジュバント、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、脂溶性溶媒、保存剤、アジュバントなどとの組合せを意味することを意図し、薬学的に許容される担体を含む。担体としては、医薬賦形剤および添加剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物（例えば、単糖、二糖、三糖、四オリゴ糖、およびオリゴ糖を含む糖；誘導体化糖、例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖など；ならびに多糖または糖ポリマー）も挙げられ、これは、単独でまたは1～99.9重量%または体積%の組合せを含んで、単独または組合せで存在し得る。例示的なタンパク質賦形剤としては、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒトアルブミン（rHA）、ゼラチン、カゼインなどが挙げられる。緩衝能においても機能し得る代表的なアミノ酸／抗体構成要素としては、アラニン、アルギニン、グリシン、アルギニン、ペタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが挙げられる。炭水化物賦形剤はまた、この技術の範囲内で意図され、その例としては、限定されるものではないが、単糖、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど；二糖、例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど；多糖、例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなど；およびアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）およびミオイノシトールが挙げられる。

20

30

【0138】

「医薬組成物」は、活性なポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体と、組成物を、*in vitro*、*in vivo* または *ex vivo* での診断的または治療的使用に好適にする不活性なまたは活性な担体、例えば、固体支持体との組合せを含むことを意図する。

【0139】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、標準的な医薬担体のいずれか、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、およびエマルジョン、例えば、油／水型または水／油型エマルジョン、ならびにさまざまな種類の湿潤剤を包含する。組成物は、安定剤および保存剤を含むこともできる。担体、安定剤およびアジュバントの例について、Martin (1975) Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton) を参照されたい。一部の実施形態では、「薬学的に許容される担体」は、本明細書に開示される組成物において使用され得る任意の希釈剤、賦形剤または担体を指す。薬学的に許容される担体としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボ

40

50

キシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が挙げられる。好適な医薬担体は、この分野の標準的な参考テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Companyに記載されている。それらは、意図される投与の

形態、すなわち、経口錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して、および従来の薬務と一致して、選択され得る。

【0140】

生物学的に適合性の担体または媒体という用語と互換的に使用され得る薬学的に許容される担体（または媒体）という用語は、治療的に投与される細胞および他の薬剤と適合性であるだけでなく、正当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または妥当な利益／リスク比に釣り合った他の複雑な要因なく、人間および動物の組織と接触する使用に好適でもある、試薬、細胞、化合物、材料、組成物および／または剤形を指す。本開示における使用に好適な薬学的に許容される担体としては、液体、半固体（例えば、ゲル）および固体の材料（例えば、細胞足場およびマトリックス、チューブシート、ならびに当技術分野において公知のおよび本明細書により詳細に記載される他のそのような材料）を含む。これらの半固体材料および固体材料は、身体内での分解に耐えるように設計されていてもよく（非生分解性）、またはそれらは、身体内で分解するように設計されていてもよい（生分解性、生体内分解性）。生分解性材料は、さらに、生体吸収型または生体吸収性であってもよく、すなわち、これは、体液に溶解および吸収されてもよく（水溶性インプラントが一例である）、または天然経路による他の材料への変換もしくは破壊および排泄のいずれかによって、分解され、最終的に身体から排泄されてもよい。

【0141】

本明細書で使用される場合、互換的に使用される「固相支持体」または「固体支持体」は、特定の種類の支持体に限定されない。むしろ、多数の支持体が、利用可能であり、当業者に公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、ワタ、プラスチックビーズ、アルミナゲルが挙げられる。本明細書で使用される場合、「固体支持体」としては、合成抗原提示マトリックス、細胞およびリポソームも挙げられる。好適な固相支持体は、所望の最終使用、およびさまざまなプロトコルに対する好適性に基づいて選択され得る。例えば、ペプチド合成のために、固相支持体は、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、Bachem Inc.、Peninsula Laboratoriesなどから得られるPAM樹脂）、POLYHIPE（登録商標）樹脂（Aminotech、Canadaから得られる）、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratoriesから得られる）、ポリエチレングリコールとグラフトしたポリスチレン樹脂（TentaGel（登録商標）、Rapp Polymere、Tubingen、Germany）またはポリジメチルアクリルアミド樹脂（Milligen/Biosearch、Calif. から得られる）を指し得る。

【0142】

固相支持体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩ならびにマグネタイトが挙げられる。担体の特質は、ある程度まで可溶性、または不溶性のいずれかであり得る。支持体材料は、カップリングした分子がポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体に結合することができる限り、實際上、任意の可能な構造的配置を有していてもよい。したがって、支持体配置は、ビーズにおけるように球状、または試験管の内側表面またはロッドの外部表面におけるように円柱状であってもよい。あるいは、表面は、平面、例えば、シート、試験紙など、または代替的に、ポリスチレンビーズであってもよい。当業者であれば、抗体または抗原の結合のための多くの他の好適な担体を知っているか、またはルーチン実験の使用によってこれを解明することが可能であろう。

【0143】

本開示に従って使用される組成物は、投与の容易さおよび投薬量の均一性のために投薬単位形態で包装され得る。「単位用量」または「投薬量」という用語は、対象における使用に好適な物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、その投与、すなわち、適切な経路およびレジメンに関連して所望の応答を生じるように算出された所定量の組成物を含む。処置の回数および単位用量の両方に従って投与される量は、所望される結果および／または保護に依存する。組成物の正確な量は、開業医の判断にも依存し、それぞれの個体に固有である。用量に影響を及ぼす因子としては、対象の身体的状態および臨床的状态、投与経路、意図される処置の目標（症状の軽減対治療）、ならびに特定の組成物の効力、安定性および毒性が挙げられる。製剤化の際に、液剤は、投薬製剤と適合性の様式で、治療的にまたは予防的に有効であるような量で投与される。製剤は、各種の剤形、例えば、本明細書に記載される注射用液剤の種類で容易に投与される。

10

【0144】

診断または処置の「対象」（本明細書で「個体」または「患者」と互換的に使用される）は、細胞または動物、例えば、哺乳動物もしくはヒトである。診断または処置に付される非ヒト動物は、感染に付されるものまたは動物モデル、例えば、サル、ネズミ科動物、例えば、ラット、マウス、チンチラ、イヌ科動物、例えば、イヌ、ウサギ科動物、例えば、ウサギ、家畜、狩猟動物およびペットである。「対象」、「宿主」、「個体」および「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用される場合、動物、典型的に哺乳動物を指す。哺乳動物の非限定的な例としては、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカクなど）、飼育動物（例えば、イヌおよびネコ）、家畜動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、および実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）が挙げられる。一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階であり得る（例えば、成体、小児患者、青年、十代、思春期前の対象、子供、幼児、胎児、または子宮内の哺乳動物）。哺乳動物は、雄または雌であり得る。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一態様では、対象は、発症前の対象である。別の態様では、対象は、疾患の最小限の臨床症状を有する。対象は、雄もしくは雌の成体、幼児または小児の対象であり得る。追加の態様では、対象は、成体である。一部の事例では、成体は、成体ヒト、例えば、18歳よりも上の成体ヒトである。

20

【0145】

本明細書で使用される場合、生体試料または試料は、対象、細胞系、または培養された細胞もしくは組織から得ることができる。例示的な試料としては、限定されるものではないが、細胞試料、組織試料、液体試料、例えば、血液および生体起源の他の液体試料（限定されるものではないが、眼液（水性および硝子体液）、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液（CSF）、痰、唾液、骨髄、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー液もしくは尿道球腺液、女性の膣液、汗、涙液、囊胞液、胸膜液および腹腔液、心膜液、腹水、リンパ、粥状液、乳糜、胆汁、間質液、月経、膿汁、皮脂、嘔吐物、膣分泌物／洗浄液、滑液、粘膜分泌物、糞便汁、脾液、洞腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胚盤胞腔（blastocyst cavity）液、または臍帯血が挙げられる。一実施形態では、生体試料は、バイオフィルムを有すると疑われている。別の実施形態では、生体試料はバイオフィルムを含む。一部の実施形態では、試料は、対象の気道、例えば、粘液由来である。

30

40

【0146】

「有効量」は、有益なまたは所望の効果を生じさせるために十分な量である。有効量は、1回または複数回の投与、適用または投薬量で投与することができる。そのような送達は、個々の投薬単位が使用される期間、治療剤の生物学的利用率、投与経路などを含むいくつかの変数に依存する。しかしながら、任意の特定の対象に対する本開示の治療剤の特定の用量レベルが、用いられる特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、全体的な健康、性別および食事、投与の回数、排泄率、薬物の組合せ、ならびに処置される特定の障害の重症度および投与の形態を含む各種の因子に依存する。処置投薬量は、一般に、安全性お

50

よび有効性を最適化するために用量設定され得る。典型的には、*in vitro*および／または*in vivo*試験からの投薬量－効果の関係は、最初に、患者投与のための適正な用量に対する有用なガイダンスを提供することができる。一般に、*in vitro*で有効であることが見出された濃度に釣り合う血清レベルを達成するのに有効である化合物の量を投与することが望ましい。これらのパラメーターの決定は、十分に当技術分野の技能内である。これらの考慮事項、ならびに有効な製剤および投与手順は、当技術分野において周知であり、標準的なテキストに記載されている。免疫原性組成物の文脈では、一部の実施形態では、有効量は、病原体に対する保護的応答をもたらすために十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすために十分な量である。一部の実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に対して受動免疫を付与するために必要な量である。免疫原性組成物に関して、一部の実施形態では、有効量は、上記に記載される因子に加えて、意図される使用、特定の抗原性化合物の免疫原性の度合い、および対象の免疫系の健康／応答性に依存する。当業者は、これらのおよび他の因子に応じて適切な量を決定することが可能であろう。

10

20

30

40

50

【0147】

組成物の「免疫原性用量」は、投与前に検出可能な免疫応答と比較して、または投与前の標準的な免疫応答と比較して、投与後に、検出可能な体液性（抗体）および／または細胞性（T細胞）免疫応答を発生させるものである。一部の実施形態では、免疫応答は、保護的および／または治療的であり得る方法から生じる。一部の実施形態では、抗体および／またはT細胞免疫応答は、本明細書に開示されるバイオフィルム感染症、特に、中耳および／または鼻咽頭もしくは下気道の感染症から個体を保護する。この使用では、正確な用量は、患者の健康状態および体重、投与の方式、製剤の特質などに依存するが、一般に、70キログラムの患者あたり約1.0 μg ～約5000 μg 、より一般に、70キログラムの体重あたり約10～約500 μg の範囲である。

【0148】

体液性免疫応答は、多くの周知の方法、例えば、一元放射免疫拡散アッセイ（SRID）、酵素イムノアッセイ（EIA）および赤血球凝集阻害アッセイ（HAI）によって測定されてもよい。特に、SRIDは、試験される免疫原を含有する寒天などのゲルの層を利用する。ウェルを、ゲル中で切断し、試験される血清を、ウェルに入れる。ゲルへの抗体の拡散は、沈殿物のリングの形成をもたらし、その面積は、試験される血清中の抗体の濃度に比例する。ELISA（酵素結合イムノアッセイ）としても公知のEIAは、試料中の総抗体を決定するために使用される。免疫原は、マイクロタイタープレートの表面に吸着される。試験血清を、プレート、それに続いてIgGなどの免疫グロブリンに連結された酵素に曝露する。プレートに付着した酵素活性は、任意の従来手段、例えば、分光測定法によって定量化し、試験試料中に存在する免疫原に対する抗体の濃度に比例する。HAIは、ニワトリ赤血球（など）を凝集させるウイルスタンパク質などの免疫原の能力を利用する。アッセイは、中和抗体、すなわち、赤血球凝集を阻害することが可能な抗体を検出する。試験血清の希釈物を、標準的な濃度の免疫原とともにインキュベートし、それに続いて赤血球を添加する。中和抗体の存在は、免疫原による赤血球の凝集を阻害するであろう。細胞免疫応答を測定するための試験としては、遅延型過敏症の決定、または免疫原を標的にするリンパ球の増殖性応答を測定することが挙げられる。

【0149】

*in vitro*適用の場合では、一部の実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズおよび特質に依存する。これは、*in vitro*標的の特質および感受性、ならびに使用における方法にも依存する。当業者は、これらのおよび他の考慮事項に基づいて有効量を決定することが可能であろう。有効量は、実施形態に応じて組成物の1回または複数回の投与を含んでいてもよい。

本開示を行うための方法

【0150】

一態様では、それを必要とする対象における、*Haemophilus*細菌によって引

き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法が提供される。この方法は、(i)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I I抗体、抗DNA B I Iチップ抗体、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップ抗体もしくは抗チップキマー(chimer)抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp__003864351.1) が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、ESKAPE細菌によっても引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一態様では、対象は、哺乳動物またはヒト患者である。

10

20

30

40

50

【0151】

別の態様では、それを必要とする対象におけるHaemophilus細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルム感染に関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法が提供される。この方法は、(i)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii)抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I I抗体、抗DNA B I Iチップ抗体、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップ抗体もしくは抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体、またはそのそれぞれの生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp__003864351.1) が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の態様では、多微生物性バイオフィ

ルムは、*Haemophilus*、例えば、*NTHI*、および*Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumonia*、または*Moraxella catarrhalis*のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、*ESKAPE*細菌によっても引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、疾患は、本明細書に開示されるように、例えば、嚢胞性線維症（CF）、肺CF、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性鼻副鼻腔炎（CRS）、歯周炎、インプラント周囲炎、中耳感染症、中耳炎（OM）、急性中耳炎（AOM）、滲出性中耳炎（OME）、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏（PTTO）、人工呼吸器関連肺炎（VAP）、市中感染性肺炎（CAP）、胸腔チューブ／カテーテル／留置デバイスバイオフィルム感染症、扁桃炎、咽頭炎（pharyngitis）、咽頭炎（laryngitis）、喉頭蓋炎、副鼻腔炎、肺炎、気管支炎、または他の気道感染症（RTI）から選択される。一態様では、対象は、哺乳動物またはヒト患者である。

10

【0152】

また別の態様では、抗生物質療法のためにそれを必要とする対象における*Haemophilus*細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、もしくはそれを含むポリクロール微生物性バイオフィルムに感作する、またはそれを必要とする対象における多微生物性バイオフィルムの細菌を新たに放出された（NRel）状態に誘導するための方法が提供される。この方法は、（i）抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PIL A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または（ii）抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPIL Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクロール抗体もしくはモノクロール抗体、それらの誘導體、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABII抗体、抗DNABIIチップ抗体、抗DNABIIチップキマー（*chimer*）抗体、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片のうちの1つまたは複数を含む。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（*chimer*）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクロール抗体またはモノクロール抗体であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（*chimer*）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNABIIチップキマー（*chimer*）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクロール抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PIL A抗体は、PIL Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PIL A表面抗原または組換えの可溶性PIL A（Genbank受託番号：EFU96734.1）およびIV型ピリン（Genbank受託番号：Yp_003864351.1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、例えば、*NTHI*、および*Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumonia*、または*Moraxella catarrhalis*のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、*ESKAPE*細菌によっても引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一態様では、対象は、哺乳動物またはヒト患者である。

20

30

40

【0153】

50

一態様では、*Haemophilus* 細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの1つまたは複数のための方法が提供される。この方法は、(i) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp_003864351.1) が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、例えば、NTHI、および*Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumonia*、または*Moraxella catarrhalis*のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、ESKAP E細菌によっても引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、バイオフィルムを抗生物質と接触させるステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、接触させるステップは、in vitroまたはin vivoである。

10

20

30

40

50

【0154】

別の態様では、抗生物質療法のために多微生物性バイオフィルムに感作する、または*Haemophilus* 細菌によって引き起こされたか、それによって将来引き起こされるか、もしくはそれを含む多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された(NRel) 状態に誘導するための方法が提供される。この方法は、(i) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii) 抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を対象に投与するステップを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A (Genbank受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank受託番号: Yp_003864351.1) が挙げられる。

n k 受託番号：Y p __ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、ESKAPE細菌によっても引き起こされる。一部の実施形態では、この方法は、バイオフィルムを抗生物質と接触させるステップをさらに含む。さらなる実施形態では、抗生物質は、 β -ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、接触させるステップは、in vitroまたはin vivoである。

10

【0155】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、抗生物質は、(i) 抗DNA BII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PIL A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii) 抗DNA BII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPIL Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片と同時的にまたはその後、バイオフィルムと接触するか、または対象に投与される。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA BII抗体は、抗DNA BIIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA BII抗体は、抗DNA BIIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA BII抗体は、抗DNA BIIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA BIIチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PIL A抗体は、PIL Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PIL A表面抗原または組換えの可溶性PIL A (Genbank 受託番号：EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank 受託番号：Y p __ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、この方法は、接触させるステップまたは投与するステップの前に、対象または多微生物性バイオフィルムの試料中の細菌を特定するステップをさらに含む。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、ESKAPE細菌によっても引き起こされる。またさらなる実施形態では、細菌は、2つ以上のHaemophilus細菌を含む、またはそれから本質的になる、またはまたさらにそれからなるとして特定された。一部の実施形態では、細菌は、Haemophilus細菌および別の非Haemophilus細菌を含む、またはそれから本質的になる、またはまたさらにそれからなるとして特定された。一部の態様では、細菌は、Haemophilus、例えば、NTHI、およびBurkholderia cenocepacia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumonia、またはMoraxella catarrhalisのうちの1つまたは複数である。

20

30

40

【0156】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、本明細書に開示される方法を適用することを介して、Haemophilus細菌によって引き起こされるか、それによって将来引き起こされるか、またはそれを含む多微生物性バイオフィルムは、(i) 抗DNA BII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PIL A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または(ii) 抗DNA BII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPIL Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、あるいは抗生物質単独のうちの1つを接触させるまたは投与するのと比較して、相乗的な様式で、防止される、阻害される、破壊される、分散される、または処置されるのうちの1つまたは複数

50

である。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、例えば、*NTHI*、および*Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumonia*、または*Moraxella catarrhalis*のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌、例えば、*ESKAPE*細菌によっても引き起こされる。

【0157】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、バイオフィルムから放出された細菌の新たに放出された（*NRel*）状態は、同じであるがプランクトン様に成長した細菌とは異なる。一部の実施形態では、*NRel*細菌は、以下のうちの1つまたは複数を含む：以下の遺伝子：*deaD*、*artM*、*fis*、*folA*、*folP*、*emrA*、*emrB*、または*acrR*のうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；以下のタンパク質：*AsnC*、*CyaA*、*GlpC*、*NrfA*、*TehB*、*TrpB*、*TrpC*、*TrpD*、*TruA*、または*TrxA*のうちの1つまたは複数の変更されたレベル；以下のタンパク質：*AbgA*、*AroE*、*AroK*、*ArtP*、*AtpH*、*BioB*、*BioF*、*CcmA*、*CitD*、*CitT*、*CmK*、*CoaD*、*DcdD*、*DjlA*、*DksA*、*DnaE*、*DnaQ*、*DsbE*、*FabG*、*FdhX*、*FtnB*、*FtsE*、*FtsI*、*FumC*、*Fur*、*GlpA*、*GlpB*、*GmK*、*GpsA*、*GreA*、*Hfq*、*HisI*、*HugZ*、*InfA*、*InfB*、*IspD*、*IspF*、*Lic2A*、*LicC*、*LicD*、*LolA*、*LpsA*、*menC*、*MenC*、*NapA*、*NrfB*、*NrfC*、*NTHI0053*、*NTHI0249*、*NTHI0291*、*NTHI0319*、*NTHI0349*、*NTHI0436*、*NTHI0487*、*NTHI0490*、*NTHI0555*、*NTHI0732*、*NTHI0779*、*NTHI0820*、*NTHI1025*、*NTHI1085*、*NTHI1199*、*NTHI1437*、*NTHI1439*、*NTHI1503*、*NTHI1590*、*NTHI1748*、*OppF*、*PanF*、*PdxH*、*PepT*、*PhoB*、*PlsC*、*PolA*、*PpC*、*PpiB*、*PrfB*、*PurU*、*RadA*、*RelB*、*RibA*、*RplW*、*RpoE*、*RpoZ*、*RseA*、*SecF*、*Sxy*、*TesB*、*ThrB*、*TolA*、*UnG*、*UreG*、*UuaP*、または*UvrB*のうちの1つまたは複数の低いレベル；以下のタンパク質：*ClpB*、*CydD*、*DeaD*、*DldD*、*DmsB*、*ExbD*、*GroES*、*HfeA*、*HfeB*、*HgpB*、*HisJ*、*HisJ*、*HitA*、*HktE*、*HxC*、*LctP*、*LldD*、*LpxC*、*MurB*、*NdhA*、*NifS2*、*NTHI0043*、*NTHI0052*、*NTHI0175*、*NTHI0364*、*NTHI1208*、*NTHI1214*、*NTHI1369*、*NTHI1703*、*OmpP2*、*OrfG*、*Pal*、*PdgX*、*RbfA*、*RecN*、*RplO*、*RplU*、*RpmE*、*RpsE*、*RpsJ*、*RpsL*、*RpsQ*、*RpsT*、*SodA*、*Tbp1*、*TolB*、*TonB*、*TrpA*、*TrxA*、または*ZnuA*のうちの1つまたは複数の高いレベル。さらなる実施形態では、高い（本明細書で増加したとも称される）、低い（本明細書で減少したとも称される）、変更された発現またはレベルは、同じであるがプランクトン様に成長した細菌と比較される。

【0158】

一態様では、本明細書に開示される方法による、以下：防止、阻害、破壊、分散、処置または感作のうちの1つまたは複数に好適な多微生物性バイオフィルムを選択するための方法が提供される。この方法は、（a）多微生物性バイオフィルム、またはそれらから単離および成長した多微生物性バイオフィルムを、本明細書に開示されるように、（i）抗*DNA B I I*抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗*P i l A*抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または（i i）抗*DNA B I I*抗体もしくはその生物学的に活性な断片および*P i l A*ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片の一方または両方と接触させるステップ、ならびに（b）本明細書に開示される遺伝子および／または本明細書に開示されるタンパク質のうちの1つもしくは複数の発現について、（a）のバイオフィルムから放出された細菌をアッセイするステップを含むか、または代替的にそれから

本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、遺伝子は、以下：
：dead、artM、fis、folA、folP、emrA、emrB、またはacrRのうちの1つまたは複数から選択される。加えて、または代替的に、タンパク質は、
以下：AsnC、CyaA、GlpC、NrfA、TehB、TrpB、TrpC、TrpD、TruA、TrxA；AbgA、AroE、AroK、ArtP、AtpH、BioB、BioF、CcmA、CitD、CitT、CmK、CoaD、DcdD、DjlA、DksA、DnaE、DnaQ、DsbE、FabG、FdhX、FtnB、FtsE、FtsI、FumC、Fur、GlpA、GlpB、GmK、GpsA、GreA、Hfq、HisI、HugZ、InfA、InfB、IspD、IspF、Lic2A、LicC、LicD、LolA、LpsA、menC、MenC、NapA、NrfB、NrfC、NTHI0053、NTHI0249、NTHI0291、NTHI0319、NTHI0349、NTHI0436、NTHI0487、NTHI0490、NTHI0555、NTHI0732、NTHI0779、NTHI0820、NTHI1025、NTHI1085、NTHI1199、NTHI1437、NTHI1439、NTHI1503、NTHI1590、NTHI1748、OppF、PanF、PdxH、PepT、PhoB、PlsC、PolA、PpC、PpiB、PrfB、PurU、RadA、RelB、RibA、RplW、RpoE、RpoZ、RseA、SecF、Sxy、TesB、ThrB、TolA、UnG、UreG、UuaP、UvrB；ClpB、Cydd、Dead、DldD、DmsB、ExbD、GroES、HfeA、HfeB、HgpB、HisJ、HisJ、HitA、HktE、HxuC、LctP、LldD、LpxC、MurB、NdhA、Nifs2、NTHI0043、NTHI0052、NTHI0175、NTHI0364、NTHI1208、NTHI1214、NTHI1369、NTHI1703、OmpP2、OrfG、Pal、PdgX、RbfA、RecN、RplO、RplU、RpmE、RpsE、RpsJ、RpsL、RpsQ、RpsT、SodA、Tbp1、TolB、TonB、TrpA、TrxA、またはZnuAのうちの1つまたは複数から選択される。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNABII抗体は、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNABIIチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PilA抗体は、PilAペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PilA表面抗原または組換えの可溶性PilA（Genbank受託番号：EFU96734.1）およびIV型ピリン（Genbank受託番号：Yp__003864351.1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。

10

20

30

40

50

【0159】

一部の実施形態では、方法は、選択されたバイオフィルムを、（i）抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PilA抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または（ii）抗DNABII抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPilAポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、および（iii）必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む必要に応じた抗生物質と接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、選択された多微生物性バイオフィルムは、対象中にある。さらなる実施形態では、方法は、（i）抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片、（ii）PilAポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片、および（iii）必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む必要に応じた抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る

。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A（Genbank受託番号：E F U 9 6 7 3 4 . 1）およびI V型ピリン（Genbank受託番号：Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。

10

【0160】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、以下のうちの1つまたは複数
が、バイオフィルムが本明細書に開示される方法に好適であること、およびそのようにして
選択されることを示す：

以下の遺伝子：d e a D、a r t M、f i s、f o l A、f o l P、e m r A、e m r B
、またはa c r Rのうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；

以下のタンパク質：A s n C、C y a A、G l p C、N r f A、T e h B、T r p B、T
r p C、T r p D、T r u A、またはT r x Aのうちの1つまたは複数の変更されたレベル；

20

以下のタンパク質：A b g A、A r o E、A r o K、A r t P、A t p H、B i o B、B
i o F、C c m A、C i t D、C i t T、C m K、C o a D、D c D、D j l A、D k s
A、D n a E、D n a Q、D s b E、F a b G、F d h X、F t n B、F t s E、F t s
I、F u m C、F u r、G l p A、G l p B、G m K、G p s A、G r e A、H f q、H
i s I、H u g Z、I n f A、I n f B、I s p D、I s p F、L i c 2 A、L i c C、
L i c D、L o l A、L p s A、m e n C、M e n C、N a p A、N r f B、N r f C、
N T H I 0 0 5 3、N T H I 0 2 4 9、N T H I 0 2 9 1、N T H I 0 3 1 9、N T H I
0 3 4 9、N T H I 0 4 3 6、N T H I 0 4 8 7、N T H I 0 4 9 0、N T H I 0 5 5 5
、N T H I 0 7 3 2、N T H I 0 7 7 9、N T H I 0 8 2 0、N T H I 1 0 2 5、N T H
I 1 0 8 5、N T H I 1 1 9 9、N T H I 1 4 3 7、N T H I 1 4 3 9、N T H I 1 5 0
3、N T H I 1 5 9 0、N T H I 1 7 4 8、O p p F、P a n F、P d x H、P e p T、
P h o B、P l s C、P o l A、P p C、P p i B、P r f B、P u r U、R a d A、R
e l B、R i b A、R p l W、R p o E、R p o Z、R s e A、S e c F、S x y、T e
s B、T h r B、T o l A、U n G、U r e G、U u a P、またはU v r Bのうちの1つ
または複数の低いレベル；あるいは

30

以下のタンパク質：C l p B、C y d D、D e a D、D l D、D m s B、E x b D、G r
o E S、H f e A、H f e B、H g p B、H i s J、H i s J、H i t A、H k t E、H
x u C、L c t P、L l d D、L p x C、M u r B、N d h A、N i f S 2、N T H I 0
0 4 3、N T H I 0 0 5 2、N T H I 0 1 7 5、N T H I 0 3 6 4、N T H I 1 2 0 8、
N T H I 1 2 1 4、N T H I 1 3 6 9、N T H I 1 7 0 3、O m p P 2、O r f G、P a
l、P d g X、R b f A、R e c N、R p l O、R p l U、R p m E、R p s E、R p s
J、R p s L、R p s Q、R p s T、S o d A、T b p 1、T o l B、T o n B、T r p
A、T r x A、またはZ n u Aのうちの1つまたは複数の高いレベル。

40

【0161】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、変更された発現は、増加した
発現および減少した発現の両方を指す。

【0162】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、高い発現は、参照よりも約1
0 %、もしくは約2 0 %、もしくは約3 0 %、もしくは約4 0 %、もしくは約5 0 %、も

50

しくは約60%、もしくは約70%、もしくは約80%、もしくは約90%、もしくは約1倍、もしくは約2倍、もしくは約3倍、もしくは約4倍、もしくは約5倍、もしくは約6倍、もしくは約7倍、もしくは約8倍、もしくは約9倍、もしくは約10倍、もしくは約20倍、もしくは約30倍、もしくは約40倍、もしくは約50倍、もしくは約60倍、もしくは約70倍、もしくは約80倍、もしくは約90倍、もしくは約100倍、またはそれよりも高く増加した発現を指す。

【0163】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、低い発現は、参照の約1%、または約2%、または約3%、または約4%、または約5%、または約6%、または約7%、または約8%、または約9%、または約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%減少した発現を指す。

10

【0164】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、参照は、同じであるがプランクトン様に成長した細菌の対応する発現である。

【0165】

一態様では、キット、例えば、本明細書に開示される方法における使用のためのキットが提供される。一部の実施形態では、キットは、以下のうちの1つまたは複数を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる：(i)抗DNABI抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗PILA抗体もしくはその生物学的に活性な断片、あるいは(ii)抗DNABI抗体もしくはその生物学的に活性な断片およびPILAポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、それらのそれぞれのエレメントをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、またはポリヌクレオチドおよび／もしくはベクターを含み、必要に応じて抗体もしくはその断片を発現する宿主細胞、あるいは(iii)必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質、ならびに必要に応じて、使用説明書。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導體、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNABI抗体は、抗DNABIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNABIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNABI抗体は、抗DNABIチップキマー(chimer)抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNABIチップキマー(chimer)抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗PILA抗体は、PILAペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、PILA表面抗原または組換えの可溶性PILA(Genbank受託番号：EFU96734.1)およびIV型ピリン(Genbank受託番号：Yp_003864351.1)が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。

20

30

40

【0166】

別の態様では、(i)抗DNABI抗体、その生物学的に活性な断片、それをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、またはポリヌクレオチドおよび／もしくはベクターを含み、必要に応じて抗体もしくはその断片を発現する宿主細胞、(ii)抗PILA抗体もしくはその生物学的に活性な断片、PILAポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片、それをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、またはポリヌクレオチドおよび／もしくはベクターを含み、必要に応じて抗体もしくはその断片を発現する宿主細胞、あるいは(iii)必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質のうちの1つまたは複数、ならびに担体、必要に応じて薬学的に許容される担体を含むか、または代替的にそれから本

50

質的になるか、またはまたさらにそれからなる組成物が提供される。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A（Genbank受託番号：E F U 9 6 7 3 4 . 1）およびI V型ピリン（Genbank受託番号：Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1）が挙げられる。

【0167】

例えば本明細書に開示される方法における使用のための、キットおよび組成物も提供される。一態様では、（i）抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうち的一方または両方、あるいは（i i i）抗生物質のうち少なくとも2つ、および必要に応じて、使用説明書を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるキットが提供される。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗チップキマー（chime）抗体を含む。一部の実施形態では、抗生物質は、β-ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chime）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗P i l A抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A表面抗原または組換えの可溶性P i l A（Genbank受託番号：E F U 9 6 7 3 4 . 1）およびI V型ピリン（Genbank受託番号：Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1）が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。

【0168】

別の態様では、以下：（i）抗DNA B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうち的一方または両方、あるいは（i i i）抗生物質のうち少なくとも2つ、および担体、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組成物が提供される。抗体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、それらの誘導体、バリエーション断片であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。一態様では、抗DNA B I I抗体は、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体またはその生物学的に活性な断片を含む。さらなる態様では、抗DNA B I Iチップキマー（chimer）抗体は、例えば本明細書に開示される、モノクローナル抗体、キメラ抗

体またはヒト化抗体である。別の態様では、抗 P i l A 抗体は、P i l A ペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、P i l A 表面抗原または組換えの可溶性 P i l A (G e n b a n k 受託番号 : E F U 9 6 7 3 4 . 1) および I V 型ピリン (G e n b a n k 受託番号 : Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。抗体は、検出可能に標識され得る。一部の実施形態では、抗生物質は、 β -ラクタム抗生物質および／またはスルホンアミド抗生物質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0169】

一部の実施形態では、抗体、ポリペプチド、それらのそれぞれの生物学的に活性な断片、またはそれらの任意の組合せは、本明細書に開示される組成物中で対象に投与されてもよい。他の実施形態では、抗体、ポリペプチド、それらのそれぞれの生物学的に活性な断片、またはそれらの任意の組合せは、そのような抗体、ポリペプチド、生物学的に活性な断片をコードするポリヌクレオチド、またはそれらに相補的なポリヌクレオチドとして対象に投与されてもよい。一部の実施形態では、そのようなポリヌクレオチドは、例えば、発現を指示する調節配列をさらに含むことにより、対象における抗体、ポリペプチド、生物学的に活性な断片を発現するのに好適であり得る。さらなる実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含むベクター、例えば、遺伝子送達ビヒクルも、投与のために使用されてもよい。ベクターは、本明細書に開示されるウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであってもよい。またさらなる実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドおよび／またはベクターのうちの1つまたは複数を含む宿主細胞が提供される。したがって、対応する発現される抗体、ペプチド、またはそれらの生物学的に活性な断片に加えて、またはその代わりに、そのようなポリヌクレオチドおよび／またはベクターおよび／または宿主細胞のうちの1つまたは複数を含むキットならびに組成物が提供される。そのようなポリペプチド、抗体、生物学的に活性な断片、ポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞を産生するのに好適な方法ならびに組成物がさらに提供される。

バイオフィルム

【0170】

「バイオフィルム」は、微生物が、分泌、放出および／または細菌溶解に起因して細胞外環境において利用可能になるDNAなどのポリマーと一緒に、有機または無機であり得る構造の表面に付着することがある、微生物の組織化された群集を意図する。バイオフィルムは、マクロバイオティクスおよび抗微生物剤に対して非常に耐性である。それらは、歯肉組織、歯および修復物上で生存し、歯周プラーク疾患としても公知の虫歯および歯周病を引き起こす。それらは、慢性中耳感染症も引き起こす。バイオフィルムは、歯科インプラント、ステント、カテーテルラインおよびコンタクトレンズの表面上でも形成され得る。それらは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科的インプラント上で成長する。疾病管理センターは、院内で起こる（病院内で獲得される）感染症の65%よりも多くが、バイオフィルムによって引き起こされると推定している。それらは、慢性膿感染症を引き起こし、免疫系が妨害されている人々において生命を脅かす全身性感染症に至る。バイオフィルムは、多くの疾患にも関与する。一実施形態では、バイオフィルムは、DNABIIポリペプチドまたはタンパク質を含む。さらなる実施形態では、バイオフィルムは、IHfおよび／またはHuを含む。またさらなる実施形態では、バイオフィルムは、IHfAおよび／またはIHfBを含む。

【0171】

細菌はまた、プランクトン様に、すなわち、単一細胞として浮遊して、および／またはバイオフィルムを形成しないが表面に付着して、存在していてもよい。一部の実施形態では、プランクトン様細菌は、人工的に、例えば、超音波処理を介して研究室で生成される。一部の実施形態では、出願人が、そのような新たに放出された(NRel)細菌が、超音波処理によって生成したプランクトン様細菌と比較して、異なって機能することを発見したので、本明細書で使用される場合、プランクトン様細菌は、本明細書に開示される組成物の処置に起因してバイオフィルムから放出されたそれらの細菌を含まない。NRel

細菌のより多くの特徴およびプランクトン様のものと比較したそれらの相違を、本明細書に、例えば、表2および3に開示する。

【0172】

バイオフィームは、限定されるものではないが、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Borrelia burgdorferi* (例えば、B31)、*Bordetella pertussis* (例えば、Tohama I)、*Burkholderia pseudomallei* (例えば、668)、*Burkholderia cenocepacia* (例えば、HI2424)、*Escherichia coli* (例えば、K12 MG1655)、*Enterococcus faecalis* (例えば、V583)、*Haemophilus influenzae* (例えば、Rd KW20)、*Helicobacter pylori* (例えば、26695)、*Klebsiella pneumoniae*、*Moraxella catarrhalis* (例えば、RH4)、*Mycobacterium smegmatis* (例えば、MC2)、*Mycobacterium tuberculosis* (例えば、CDC1551)、*Neisseria gonorrhoeae* (例えば、FA1090)、*Neisseria meningitidis* (例えば、MC58)、*Pseudomonas aeruginosa*、*Porphyromonas gingivalis* (例えば、W83)、*Prevotella intermedia* (例えば、17)、*Prevotella melaninogenica* (例えば、ATCC (登録商標) 25845)、*Staphylococcus aureus* (例えば、MW2)、*Staphylococcus epidermidis* (例えば、RP62A)、*Streptococcus agalactiae* (例えば、2603V/R)、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus gallolyticus* (例えば、UCN34)、*Streptococcus gordonii* (例えば、NCTC 7868 (Challis))、*Streptococcus mutans* (例えば、UA159)、*Streptococcus pneumoniae* (例えば、R6)、*Streptococcus pyogenes* (例えば、MGAS10270)、*Streptococcus sobrinus* (例えば、6715)、*Salmonella enterica* (例えば、typhi、CT18)、*Treponema denticola* (例えば、ATCC (登録商標) 35405)、*Treponema palladum* (例えば、Nichols)、*Vibrio cholera* (例えば、El Tor、N16961) によって引き起こされるものを含む多数の疾患にも関与する。バイオフィームに関連することおよび／またはそれを形成することが公知の追加の生物としては、限定されるものではないが、*Campylobacter* spp.、*Candida* spp.、*Legionella pneumophila*、および *Listeria monocytogenes* が挙げられる。例えば、嚢胞性線維症患者は、多くの場合に抗生物質耐性バイオフィームをもたらし *Pseudomonas* 感染症を有する。バイオフィームに関連する他の疾患としては、限定されるものではないが、嚢胞性線維症患者の肺感染症、中耳炎、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏 (otorrhea)、慢性化膿性中耳炎、自然弁感染性心内膜炎、骨髓炎、鼻副鼻腔炎 (rhinosinosis)、前立腺炎、尿路感染症、創傷、虫歯および歯周炎が挙げられる。食物経路病原体、例えば、限定されるものではないが、上記にリストされた生物 (例えば、*Listeria monocytogenes*、*Escherichia coli*、*Salmonella enterica*) の一部も、それらが汚染する食品上でバイオフィームを形成し得る。動物においてバイオフィームを引き起こす疾患 (例えば、*Escherichia coli*、*Salmonella*、および *Shigella* 種) も、下流の食品汚染および／またはヒト宿主における疾患を引き起こし得る。さらに、バイオフィームは、1つの同種の微生物集団のものである必要はなく、他の病原体およびさらに宿主細胞に組み込んでいてもよい。

【0173】

10

20

30

40

50

院内で起こるおよびその他の両方で疾患に関連するもの、ならびに食品汚染に加えて、バイオフィルムは、最も注目すべきは、水を処理すること、およびそれらと接触する表面に関して、工業汚染の原因である場合が多い。工業汚染物としてバイオフィルムを形成する生物を含む複雑な事態としては、限定されるものではないが、バイオフィルム形成の結果としての生物腐食、生物付着、および設備の損傷が挙げられる。工業的状況でのバイオフィルムに関連する非限定的な例示的生物としては、Ferrera et al. (2015) Biofouling 31(2):173-180に開示されているものおよび *Desulfovibrio* 種が挙げられる。バイオフィルムに関する追加の詳細は、例えば、Donlan (2002) Emerging Infectious Diseases 8(9):881-890に見られ得る。

【0174】

Haemophilus は、*Pasteurellaceae* 科に属するグラム陰性の多形性の *coccobacilli* 細菌の属である。これらの生物は、上気道、口、膈、および腸管の粘膜を阻害する。この属は、軟性下疳の原因病原体である *Haemophilus influenza* および *Haemophilus ducreyi* などの一部の重要な病原体種と一緒に共生生物を含む。すべての膜は、好気性または通性に嫌気性のいずれかである。

【0175】

「*Haemophilus influenzae*」という用語は、例えば、耳感染症、眼感染症、OM および副鼻腔炎などの多くの異なる感染症を引き起こし得る病原性細菌を指す。*H. influenza* の臨床分離株は、細菌上の型特異的多糖莢膜の存在もしくは非存在にそれぞれ応じて、血清型「a」から「f」、または分類不可能 (NTHI) のいずれかとして分類される。*Haemophilus influenzae* の多くの異なる株が分離されており、IhfA、ihfB および hupA 遺伝子またはタンパク質を有する。*Haemophilus influenzae* の異なる株の一部の非限定的な例としては、Rd KW20、86-028NP、R2866、PittGG、PittEE、R2846、および2019が挙げられる。プロトタイプ NTHI 分離株は、慢性OMを有する子供から回収された低継代分離株86-028NPである。86-028NPは、2001年10月16日に、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関、10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110に寄託され、寄託番号PTA-4764が割り当てられた。

【0176】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、本明細書で議論されるバイオフィルムは、多微生物性バイオフィルム、すなわち、2つ以上の細菌を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる多微生物性バイオフィルムである。一部の実施形態では、バイオフィルムは、*Haemophilus* 細菌を含む。さらなる実施形態では、多微生物性バイオフィルムは、2つ以上の *Haemophilus* 細菌を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。加えて、または代替的に、多微生物性バイオフィルムは、1つまたは2つ以上の *Haemophilus* 細菌、および *Haemophilus* ではない細菌（すなわち、非 *Haemophilus* 細菌）を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、*Haemophilus* 細菌は、*Haemophilus influenzae*（例えば、分類不可能な *Haemophilus influenzae* (NTHI)、Rd KW20、86-028NP、R2866、PittGG、PittEE、R2846、および2019のうちの1つまたは複数）を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、*Haemophilus*、および *Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、または *Moraxella catarrhalis* のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。

【0177】

一部の実施形態では、*Haemophilus* 細菌は、分類不可能な *Haemophilus influenzae* (NTHI) を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一実施形態では、*Haemophilus* 細菌は、分類不可能な *Haemophilus influenzae* (NTHI) の1つの株、例えば、86-028NP、および必要に応じて、NTHI以外の1つもしくは複数の細菌（すなわち、非NTHI細菌）を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。HI1716またはNTHI 2019などの他のNTHI株は、当業者によって特定され得る。例えば、Greiner et al. 2004を参照されたい。別の実施形態では、*Haemophilus* 細菌は、分類不可能な *Haemophilus influenzae* (NTHI) の2つ以上の株、および必要に応じて、NTHI以外の1つもしくは複数の細菌を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の態様では、多微生物性バイオフィルムは、NTHI、および *Burkholderia cenocepacia*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、または *Moraxella catarrhalis* のうちの1つまたは複数によって引き起こされる。

10

【0178】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、非 *Haemophilus* 細菌および／または非NTHI細菌は、以下のうちの1つまたは複数から選択される：*Moraxella catarrhalis*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Streptococcus pneumoniae*、*Burkholderia cenocepacia*、ESKAP EE病原体（*Enterococcus faecium*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa*、および *Enterobacter* spp. から選択される）、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Borrelia burgdorferi*（例えば、B31）、*Bordetella pertussis*（例えば、Tohama I）、*Burkholderia pseudomallei*（例えば、668）、*Burkholderia cenocepacia*（例えば、HI2424）、*Escherichia coli*（例えば、K12 MG1655）、*Enterococcus faecalis*（例えば、V583）、*Helicobacter pylori*（例えば、26695）、*Klebsiella pneumoniae*、*Moraxella catarrhalis*（例えば、RH4）、*Mycobacterium smegmatis*（例えば、MC2）、*Mycobacterium tuberculosis*（例えば、CDC1551）、*Neisseria gonorrhoeae*（例えば、FA1090）、*Neisseria meningitidis*（例えば、MC58）、*Pseudomonas aeruginosa*、*Porphyromonas gingivalis*（例えば、W83）、*Prevotella intermedia*（例えば、17）、*Prevotella melaninogenica*（例えば、ATCC（登録商標）25845）、*Staphylococcus aureus*（例えば、MW2）、*Staphylococcus epidermidis*（例えば、RP62A）、*Streptococcus agalactiae*（例えば、2603V/R）、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus gallolyticus*（例えば、UCN34）、*Streptococcus gordonii*（例えば、NCTC 7868 (Challis)）、*Streptococcus mutans*（例えば、UA159）、*Streptococcus pneumoniae*（例えば、R6）、*Streptococcus pyogenes*（例えば、MGAS10270）、*Streptococcus sobrinus*（例えば、6715）、*Salmonella enterica*（例えば、typhi、CT18）、*Treponema denti*

20

30

40

50

cola (例えば、ATCC (登録商標) 35405)、Treponema palladum (例えば、Nichols)、Vibrio cholera (例えば、El Tor、N16961)、Campylobacter spp.、Candida spp.、Legionella pneumophila、Vibrio vulnificus、Vibrio cholera、E. coli、Legionella pneumophila Salmonella、Shigella、Listeria、Aggregatibacter、Neisseria、Burkholderia cenocepacia (B. cenocepacia)、B. multivorans、B. mallei、B. cepaci、B. pseudomallei、または Listeria monocytogenes。

10

【0179】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、多微生物性バイオフィルムは、NTHI、Streptococcus pneumonia、Staphylococcus aureus、または Moraxella catarrhalis を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0180】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、多微生物性バイオフィルムは、再発性、または抗生物質単剤療法に対して抵抗性である。本明細書で使用される場合、抗生物質単剤療法、すなわち、バイオフィルムの処置において抗生物質のみを使用することを指す抗生物質単剤療法に対して抵抗性のバイオフィルムは、所望の効果をもたらさず、および／またはバイオフィルムの再発を防止しない。

20

【0181】

バイオフィルムは、バイオフィルム内在細菌が、宿主免疫エフェクターおよび抗生物質による死滅に対して非常に抵抗性であるという事実に起因して、細菌性疾患の慢性化および再発に大いに寄与する。そのため、バイオフィルム所在から周囲の環境への細菌の抗体媒介放出は、そうでなければ処置が困難なバイオフィルム関連疾患を解決する強力な戦略を支持する。以前の研究では、出願人は、分類不可能な Haemophilus influenzae (NTHI) の2つの固有の決定基 (例えば、NTHI のIV型線毛 (T4P) または細菌性DNABII DNA結合タンパク質、細菌性バイオフィルムに構造的完全性を提供する種に無関係な標的) に対する抗体が、別個の機構を介してバイオフィルム内在細菌を放出することを明らかにした。本明細書では、出願人は、得られた新たに放出された (またはNRel) NTHI の表現型が、放出の特異的機構に依存することを示した。出願人は、フローサイトメトリー、プロテオミクスプロファイル、および標的トランスクリプトミクスを使用して、2つのNRel集団が、プランクトン様に成長したNTHI からだけでなく、重要なことには、遺伝的同一性にもかかわらず、互いと有意に異なったことを示した。また、それぞれのNRel集団は、プランクトン様NTHI と比較して、スルホンアミド抗生物質またはβ-ラクタム抗生物質のいずれかによる死滅に対する明確に異なる有意に増加した敏感性、それらの個々のプロテオームと一致した観察を有し、さらに、標的遺伝子発現における相対的な相違によって支持された。T4P またはDNABII 結合タンパク質の特異的エピトープに対する抗体によってバイオフィルムから放出されたNTHI の明確に異なる表現型は、バイオフィルムの根絶および疾患の解決のための標的治療戦略を開発するための新たな機会を提供する。抗rsPIL Aが、予想外であるがMoraxella catarrhalis によって発現されないNTHI 抗原を特異的に標的にすること、抗rsPIL Aが、純粋なM. catarrhalis バイオフィルムに対して効果を有さない一方で、M. catarrhalis が、NTHI の固有の構造形態とバイオフィルムを構築するのを可能にし、それによって、M. catarrhalis が、NTHI バイオフィルムのローンの中央にこれらの「バレル」に見える構造を構築する場合に、NTHI が、次にそのIV型線毛を使用して、M. catarrhalis 「バレル」の上で単収縮して、それらを完全に覆うことも公知である。抗rsPIL AによるNTHI + M cat 多微生物性バイオフィルムの処置が、NTHI が

30

40

50

それ自身を分散させることを示した。

【0182】

一部の実施形態では、バイオフィルムは、グラム陰性またはグラム陽性のバイオフィルム産生細菌に由来する。状態の非限定的な例は、静脈性潰瘍および糖尿病性足潰瘍を含む慢性の非回復期創傷、耳感染症、静脈洞感染症、尿路感染症、胃腸管疾病、肺感染症、気道感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、カテーテル関連感染症、留置デバイス関連感染症、移植されたプロステシスに関連する感染症、骨髄炎、蜂巣炎、膿瘍、ならびに歯周病の群から選択される。

P i l Aおよびワクチン

【0183】

N T H Iによって引き起こされる気道の疾患に対するワクチンを開発するための出願人の長年にわたる努力において、出願人は、2つの固有のバイオフィルム関連決定基に焦点を合わせた。第1の標的は、付着、コロニー形成、バイオフィルム形成、単収縮性運動および形質転換受容性において複数の役割を有する重要な付着因子であるN T H I T 4 Pである (Bakaletz et al., 2005; Carruthers et al., 2012; Das et al., 2017; Jurcisek et al., 2007; Mokrzan et al., 2019; Mokrzan et al., 2016; Toone et al., 2020)。N T H I T 4 P (P i l A)の大多数サブユニットに対する抗体、およびP i l Aの特異的な組換え体および可溶性形態 (「r s P i l A」)に対する抗体は、in v i t r oで既存のN T H Iおよび多微生物性バイオフィルム、ならびにまたN T H I誘発性OMの臨床モデルにおいて中耳内に存在するバイオフィルムの分散を誘導し、ここで、バイオフィルムの分散は、迅速な疾患の解決をもたらす (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2009; Novotny et al., 2013b; Novotny et al., 2016; Novotny et al., 2015; Ysebaert et al., 2019)。この転帰についての機構は、T 4 PおよびL u x S両方の発現を必要とし、後者は、N T H Iにおけるクオラムセンシングを媒介する (Armbruster et al., 2009; Daines et al., 2005; Surette et al., 1999)。Armbrusterらは、クオラムセンシング分子である自己誘導物質2 (A I - 2)のl u x S誘導産生が、in v i t r oで増加したバイオフィルム形成、およびOMのチンチラモデルにおいてin v i v oで持続をもたらすことを示し (Armbruster et al., 2009)、さらに、N T H Iが、R b s Bを介してその環境からA I - 2を吸収することを明らかにした (Armbruster et al., 2011)。バイオフィルム成熟およびバイオフィルム分散の防止におけるl u x S媒介A I - 2シグナル伝達の役割は、l u x S発現を誘導可能であったN T H I構築物を使用したP a n gらによってさらに実証された (Pang et al., 2018)。

【0184】

研究は、抗r s P i l A抗体によって誘導されるバイオフィルム分散の間の、N T H I T 4 P発現およびA I - 2のl u x S誘導産生の両方を必要とする特異的なl u x Sクオラムシグナル伝達についての追加の役割を明らかにした (Novotny et al., 2015)。N T H Iは、インキュベーションの6時間以内に上清への最大の分散で、「トップダウン」プロセスにおいて放出される (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2015)。Armbrusterらはまた、A I - 2を発現しないM o r a x e l l a c a t a r r h a l i sが、これらの2つの種によって形成される多微生物性バイオフィルム内でN T H Iによって生じるA I - 2シグナルにおける「傍受」にもかかわらず、増加したM . c a t a r r h a l i sバイオフィルム形成をもたらすことを示した (Armbruster et al., 2010)。興味深いことに、出願人が、事前に形成した二重種のN T H IとM . c a t a r r h a l i sのバイオフィルムを、r s P i l Aに対する抗体 (N T H Iによってもっぱら発現される抗原を標的にする)とともにインキュベートした場合、N T H IおよびM . c a t a r r h a l i sは両方とも、バイオフィルムから分散された (Mokrzan et al., 2018)。M . c a t a r r h a l i s分散についての機構は、M . c a t a r r h a l i sが抗r s P i l Aへの曝露に応答してN T H Iによって産

10

20

30

40

50

生された A I - 2 において傍受されている別の例を明らかにした (Mokrzan et al., 2018)。

【0185】

P i l A は、I V 型線毛主要サブユニットタンパク質について短い。I V 型線毛は、典型的には、5 ~ 7 nm の直径、数マイクロメートルの長さであり、単一タンパク質の S u b p e r t u r n から構成される (Bardy et al., Microbiology, 149, 295-304, 2003; Wall and Kaiser, Mol. Microbiol., 32, 1-10, 1999)。I V 型ピリンサブユニットは、通常、145 ~ 160 アミノ酸の長さであり、グリコシル化またはリン酸化されていてもよい。I V a 型および I V b 型の 2 つのピリンサブユニットのクラスがあり、これらは、リーダーペプチドおよび成熟サブユニットの平均長さによって互いと区別され、この N メチル化アミノ酸は、成熟タンパク質の N 末端位置および平均長さの D 領域 (ジスルフィド領域のため) を占める。呼吸器病原体のほとんどは、クラス I V a ピリンを発現する一方、腸管病原性のものは、より典型的には、クラス I V b ピリンを発現する。I V a 型線毛は、高度に保存された疎水性 N 末端メチル化フェニルアラ (phenylala)

10

1 C の存在によって区別される。

【0186】

一部の実施形態では、P i l A の生物学的に活性な断片は、野生型 P i l A の少なくとも約 50 %、もしくは少なくとも約 60 %、もしくは少なくとも約 70 %、もしくは少なくとも約 80 %、もしくは少なくとも約 85 %、もしくは少なくとも約 90 %、もしくは少なくとも約 95 %、もしくは少なくとも約 96 %、もしくは少なくとも約 97 %、もしくは少なくとも約 98 %、もしくは少なくとも約 99 %、もしくは少なくとも約 100 %、もしくは少なくとも 1.5 倍、もしくは少なくとも 2 倍、もしくは少なくとも 3 倍、もしくは少なくとも 4 倍、もしくは少なくとも 5 倍、もしくは少なくとも 6 倍、もしくは少なくとも 7 倍、もしくは少なくとも 8 倍、もしくは少なくとも 9 倍、もしくは少なくとも 10 倍、もしくは少なくとも 20 倍、もしくは少なくとも 50 倍、もしくは少なくとも 100 倍、またはそれよりも高い生物活性を有する。一部の実施形態では、P i l A の生物学的に活性な断片は、P i l A の断片を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、生物活性は、P i l A に対して対象における抗体または他の免疫応答を誘導することを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。そのような生物活性は、例えば、生物学的に活性な断片で免疫された対象の試料中の抗体の濃度および / または P i l A 親和性を定量化することを介して、当業者によって測定され得る。加えて、または代替的に、本明細書の生物活性は、対象におけるバイオフィルムを防止すること、阻害すること、破壊すること、分散させること、または処置することのうちの 1 つもしくは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

20

30

【0187】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、P i l A は、本明細書に開示されるキメラタンパク質である。本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、P i l A またはその生物学的に活性な断片は、分類不可能な H . i n f l u e n z a e (N T H I) の I V 型線毛主要サブユニットタンパク質 (P i l A) の断片、および N T H I O M P P 5 タンパク質 (P 5 - フィンブリン、フィンブリンまたは O M P P 5 - 相同付着因子とも呼ばれる) の断片を含むキメラタンパク質を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。さらなる実施形態では、P i l A またはその生物学的に活性な断片は、L B 1 ペプチドの B 細胞エпитープを提示するように改変された P i l A を含むキメラタンパク質を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。P i l A またはその生物学的に活性な断片として、本明細書に開示される 1 つまたは複数のキメラタンパク質を含むワクチン組成物、および本明細書に開示されるキメラタンパク質を使用する免疫応答を誘発する方法も本明細書に提供される。そのようなキメラタンパク質は、米国特許第 U S 7 8 1 1 5 9 1

40

50

号に開示されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0188】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、本明細書に記載されるキメラタンパク質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0189】

L B 1 ペプチドは、N T H I に対する免疫原性応答を誘導し、それが退屈な精製技法を必要としないので有益である、40アミノ酸の合成キメラP5-フィンブリリン由来ペプチド

【化4】

(Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Pro Ser

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Glu, 配列番号

)

10

である。L B 1 ペプチドは、B細胞エピトープ (A r g S e r A s p T y r L y s P h e T y r G l u A s p A l a A s n G l y T h r A r g A s p H i s L y s L y s G l y、配列番号) であるN末端の19アミノ酸ペプチドを含む。B細胞エピトープは、O M P P 5 (P5-フィンブリリンまたはO M P P 5-相同付着因子とも呼ばれる) として表示されるN T H i の外膜タンパク質 (フィンブリリン) の予測される表面露出ループ3に由来した。L B 1 ペプチドは、短い5merのリンカーペプチドおよび16残基のT細胞プロミスキヤスエピトープをさらに含む。T細胞エピトープは、麻疹ウイルスの融合タンパク質に由来した。T細胞プロミスキヤスエピトープは、このエピトープに曝露された個体において、非常に強いT細胞応答を誘導する。

20

【0190】

一部の実施形態では、P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、B細胞応答を誘導する有効性が低減されていない安全で選択的な担体タンパク質に挿入されたL B 1 ペプチドの断片を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。好ましくは、L B 1 ペプチドの断片は、それ自身がN T H i 誘発性疾患に対する保護も付与する担体に挿入される。N T H i 誘発性疾患に対する保護を誘導し得る1つのそのような担体は、P i l Aタンパク質としても公知のN T H i I V型線毛 (単収縮性線毛) タンパク質

30

【化5】

Met Lys Leu Thr Thr Gln

Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala

Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala

Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys

Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr

Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln

Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser

Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys (配列番号 51).

40

の配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる) を含むタンパク質である。P i l Aタンパク質は、p i l A遺伝子 (

50

【化 6】

atg aaa cta aca aca cag caa acc ttg aaa aaa ggg ttt aca tta ata gag cta atg att gtg att
gca att att gct att tta gcc act atc gca att ccc tct tat caa aat tat act aaa aaa gca gcg gta tct gaa tta
ctg caa gcg tca gcg cct tat aag gct gat gtg gaa tta tgt gta tat agc aca aat gaa aca aca aac tgt acg
ggg gga aaa aat ggt att gca gca gat ata acc aca gca aaa ggc tat gta aaa tca gtg aca aca agc aac
ggg gca ata aca gta aaa ggg gat ggc aca ttg gca aat atg gaa tat att ttg caa gct aca ggt aat gct gca
aca ggt gta act tgg aca aca act tgc aaa gga acg gat gcc tct tta ttt cca gca aat ttt tgc gga agt gtc
aca caa, 配列番号)

10

の配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる)によってコードされる。

【0191】

一部の実施形態では、P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、免疫原性応答を誘導するペプチドを提示するために、L B 1ペプチドの断片を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。そのようなL B 1ペプチドの断片は、12～35アミノ酸長、または15～30アミノ酸長、または18～19アミノ酸長であり得、フィンブリントタンパク質のサブユニットである。一部の実施形態では、L B 1ペプチドの断片は、N末端アミノ酸配列R S D Y K F Y E D A N G T R D H K K G (配列番号)

20

【0192】

別の実施形態では、P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、24アミノ酸ペプチドを提示するように改変されたP i l Aタンパク質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。24アミノ酸ペプチドは、L V R S D Y K F Y E D A N G T R D H K K G R H T (配列番号)のアミノ酸配列に示されるように改変されたL B 1ペプチドのB細胞エピトープを含み得、ここで、ロイシンおよびバリンは、L B 1のB細胞エピトープのN末端に付加され、アルギニン、ヒスチジンおよびトレオニンは、L B 1のB細胞エピトープのC末端にある。B細胞エピトープに対するこれらの改変は、タンパク質フォールディングおよび／または抗原提示を支援することが企図される。タンパク質フォールディングおよび／または抗原提示を支援するであろうL B 1のB細胞エピトープに対する任意の改変が使用され得る。

30

【0193】

N T H i O M P P 5の表面露出ループ3のアミノ酸配列は、N T H i株間で変わり得る。P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、N T H i O M P P 5のループ3の任意のバリエーションアミノ酸配列のB細胞エピトープを提示するように改変されたP i l Aタンパク質の断片を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。特に、P i l Aまたはその生物学的に活性な断片は、以下のバリエーションN T H i O M P P 5アミノ酸配列：R S D Y K L Y N K N S S S N S T L K N L G E (配列番号)、R S D Y K L Y N K N S S T L K D L G E (配列番号)およびR S D Y K F Y D N K R I D (配列番号)のうちの1つを提示するように改変されたP i l Aタンパク質を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。バリエーションペプチドはまた、N末端に付加されたロイシンおよびバリン、ならびにC末端に付加されたアルギニン、ヒスチジンおよびトレオニン、またはタンパク質フォールディングおよび／もしくは抗原提示を支援する任意の他の改変により提示され得る。

40

【0194】

本発明のキメラタンパク質は、天然P i l Aアミノ酸が、L B 1ペプチドの一部で置換されている、改変されたP i l Aアミノ酸を含む。加えて、本発明のキメラタンパク質は、L B 1ペプチドの一部が、天然P i l Aアミノ酸内およびそれに加えて挿入されている、改変されたP i l Aアミノ酸配列を含む。本発明のキメラタンパク質は、2つのタ

50

ンパク質に対する抗体の形成を誘導する能力を有し、したがって、より有効で、より特異的なワクチン候補である。

【0195】

一実施形態では、キメラタンパク質は、NTHi P i l Aタンパク質（配列番号51）の成熟アミノ酸配列（残基13～149）を含み、ここで、LB1ペプチドの一部が、配列番号51の62位および72位のシステイン残基間に挿入され、

【化7】

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro
Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn
Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala

10

【化8】

Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys
Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly
Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly
Ser Val Thr Gln, 配列番号

20

のアミノ酸配列を有するキメラタンパク質などの天然アミノ酸を置換していてもよい。このキメラタンパク質は、配列番号の残基40～149を含み、配列番号51の残基62と残基72との間に挿入されたLB1のB細胞エпитープ（Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr、配列番号52）を有する。別の実施形態では、LB1ペプチドの部分は、配列番号51の131位および144位のシステイン残基間に挿入され、

【化9】

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys
Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn
Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala
Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala
Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp
Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Cys Gly Ser Val Thr Gln, 配列番号

30

のアミノ酸配列を有するタンパク質などの天然アミノ酸を置換していてもよい。このキメラタンパク質は、配列番号51の残基40～149を含み、配列番号51の残基131と残基144との間に挿入されたLB1のB細胞エпитープ（配列番号52）を有する。

40

【0196】

別の実施形態では、キメラタンパク質は、NTHi P i l Aタンパク質（配列番号51）の成熟アミノ酸配列（残基13～149）を含み、ここで、LB1ペプチドの部分は、P i l Aタンパク質のC末端に挿入されている。例えば、

50

【化 1 0】

Gly Ser His Met Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser
Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr
Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr
Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala
Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu
Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu
Asp Ala Asn Gly Thr Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr, 配列番号

10

のキメラタンパク質は、配列番号 5 1 の残基 4 0 ~ 1 4 9 を含み、L B 1 の B 細胞エピー
トープ（配列番号 5 2）は、配列番号 5 1 の残基 1 4 9 の後に挿入されている。

【0 1 9 7】

別の実施形態では、キメラタンパク質は、N T H i P i l A タンパク質（配列番号 5
1）の成熟アミノ酸配列（残基 1 3 ~ 1 4 9）を含み、ここで、L B 1 ペプチドの部分は
、P i l A タンパク質の N 末端に挿入されている。例えば、

【化 1 1】

Gly Ser His Met Leu Val Arg Ser Asp Tyr Lys Phe Tyr Glu Asp Ala Asn Gly Thr
Arg Asp His Lys Lys Gly Arg His Thr Gly Pro Ser Leu Lys Leu Thr Lys Lys Ala Ala Val
Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr
Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly
Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn
Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys
Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln,(配列番号),

20

のキメラタンパク質は、配列番号 2 の残基 4 0 ~ 1 4 9 を含み、L B 1 の B 細胞エピー
トープ（配列番号 5 2）は、配列番号 5 1 の残基 4 0 の前に挿入されている。

30

【0 1 9 8】

さらなる実施形態では、キメラタンパク質は、N T H i P i l A タンパク質の一部
分、および本明細書に記載される L B 1 ペプチドのうちの 1 つまたは複数を含む。本発明の
キメラタンパク質は、N T H i P i l A タンパク質の一部内に 2 回以上の同じ L B 1 ペ
プチドが存在するもの、および N T H i P i l A タンパク質の一部内に 2 つまたはそれ
よりも多くの異なる L B 1 ペプチドが存在するものを含む。

【0 1 9 9】

本開示は、N T H i P i l A タンパク質の一部、および免疫応答を誘発する任意の
抗原性タンパク質を含むキメラタンパク質をさらに提供する。

【0 2 0 0】

キメラタンパク質は、遺伝子 p i l A によってコードされる N T H i I V 型線毛の主
要サブユニットの全長または一部分を含んでもよい。N T H i 分離株 8 6 - 0 2 8 N
P の P i l A タンパク質（例えば、配列番号 5 1）は、その全体が参照により本明細書に
組み込まれる米国特許第 7, 5 0 1, 1 3 1 号に記載されている核酸配列によってコード
される。N T H i 臨床分離株 1 7 2 8 M E E、1 7 2 9 M E E、3 2 2 4 A、1 0 5 4 8
M E E、1 0 6 0 M E E、1 8 8 5 M E E、1 7 1 4 M E E、1 2 3 6 M E E、1 1 2 8
M E E および 2 1 4 N P 由来の P i l A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提
供される。これらの P i l A ポリペプチドのアミノ酸配列は、それぞれ、

40

50

【化 1 2】

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile
Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val
Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr
Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly
Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn
Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys
Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln (配列番号 54);

10

20

30

40

50

【化 1 3】

Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln, (配列番号 55);	10
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln (配列番号 56);	20
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln, (配列番号 57);	30
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Asn Glu Thr Thr Asn Cys Thr Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Arg Ser Val Thr Lys, (配列番号 58);	40
Met Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr	50

【化 1 4】

Asn Glu Ile Thr Asn Cys Met Gly Gly Lys Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly
 Tyr Val Ala Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn
 Met Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys
 Gly Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Ile Thr Gln (配列番号 59),
 Met Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile
 Ala Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val
 Ser Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Gly
 Lys Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr
 Val Ala Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met
 Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Thr Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly
 Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln, (配列番号 60), Met
 Lys Leu Thr Thr Leu Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala
 Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser
 Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Gly
 Lys Leu Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr
 Val Ala Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met
 Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly
 Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Lys, (配列番号 61); Met
 Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala
 Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ser Val Ser
 Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ser Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Gly Lys
 Pro Ser Thr Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr Val
 Ala Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Gly Ile Thr Val Lys Gly Asn Gly Thr Leu Ala Asn Met Glu
 Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Gly Asn Ala Thr Ala Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly Thr
 Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Arg Ser Val Thr Lys, (配列番号 62); および Met
 Lys Leu Thr Thr Gln Gln Thr Leu Lys Lys Gly Phe Thr Leu Ile Glu Leu Met Ile Val Ile Ala
 Ile Ile Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Ile Pro Ser Tyr Gln Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Ala Val Ser
 Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Pro Tyr Lys Ala Asp Val Glu Leu Cys Val Tyr Ser Thr Gly
 Lys Pro Ser Ser Cys Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ile Ala Ala Asp Ile Thr Thr Ala Lys Gly Tyr
 Val Lys Ser Val Thr Thr Ser Asn Gly Ala Ile Thr Val Lys Gly Asp Gly Thr Leu Ala Asn Met
 Glu Tyr Ile Leu Gln Ala Ser Gly Asn Ala Ala Thr Gly Val Thr Trp Thr Thr Thr Cys Lys Gly

【化 1 5】

Thr Asp Ala Ser Leu Phe Pro Ala Asn Phe Cys Gly Ser Val Thr Gln (配列番号 63)

に示される。代替コドン使用頻度の可能性は、具体的には、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにおいて企図される。一実施形態では、ポリペプチドは、それぞれ、米国特許第 7, 811, 591 号に開示される配列番号 33、35、37、39、41、43、45、47、49 および 51 (配列のそれぞれは其の全体が参照により本明細書に組み込まれる) に示されるヌクレオチド配列によってコードされる。

【0201】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、NTHi P i l Aタンパク質の一部を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号51にそれぞれ示されるNTHi 86-028NPアミノ酸配列を含む。本発明のポリペプチドは、配列番号54、55、56、57、58、59、60、61、62および63に示されるP i l Aポリペプチドも含む。追加の実施形態では、本発明のP i l Aポリペプチドは、他の分類不可能なH. i n f l u e n z a e株のもの、ならびにH. i n f l u e n z a e株a、b、c、eおよびf由来のものである。

【0202】

P i l Aのポリペプチドは、具体的には、本発明の全長ポリペプチドの1つもしくは複数の生物学的なまたは免疫原性の特性を保持するP i l Aポリペプチドのペプチド断片（すなわち、ペプチド）または断片を含む。一実施形態では、本発明によって提供されるP i l Aペプチド断片は、T f p Q 2、T f p Q 3、T f p Q 4およびO L P 3と指定され、それぞれ、配列番号51のアミノ酸35から68、配列番号51のアミノ酸69から102、配列番号51のアミノ酸103から137、および配列番号51のアミノ酸21から35を含む。本開示によって提供される別のP i l Aペプチド断片は、配列番号51のアミノ酸40から149を含む。

【0203】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、P i l Aポリペプチドの生物活性および／または免疫原性活性に影響を及ぼさない1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有するP i l Aポリペプチドの一部を含む。あるいは、P i l Aポリペプチドは、生物活性を変更してもよく、または変更しなくてもよい、保存的アミノ酸置換を有することが企図される。

【0204】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、本発明のNTHi P i l Aポリペプチドのバリエーションの一部（例えば、生物活性および／または免疫原性活性を保持する配列番号51、54、55、56、57、58、59、60、61、62および63のポリペプチドに対して、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、典型的には、少なくとも約95%、96%、97%、より典型的には、少なくとも約98%、または最も典型的には、少なくとも約99%のアミノ酸同一性を示すポリペプチド）を含む。加えて、配列中の改変は、適切な残基の置換、付加または削除によって容易に行われる。例えば、システイン残基は、カルボキシ末端に付加されて、担体タンパク質に好都合な連結のためのスルフヒドリル基を提供してもよく、または追加のグリシン残基などのスペーサーエレメントは、ペプチドのC末端で連結しているアミノ酸とペプチドの残部との間の配列に組み込まれていてもよい。

【0205】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、P i l Aは、組換えの可溶性P i l A (r s P i l A)である。組換えP i l Aタンパク質 (r P i l A)は、より容易に再生可能な産物としての機能を果たすように生成されてもよい。これを行うために、天然ピリンサブユニットの機能的性質を有するようにr P i l Aが同様に適切にフォールドされることが重要であるので、4つのC y s残基も有するピリンを研究したKeizer e t al. (J. Biol. Chem., 276:24186-14193, 2001)の公開されたプロトコールが利用される。簡潔には、切断型ピリンは、操作され、ここで、最初の28残基が、N末端から除去されて、凝集が防止され、この切断型ピリンは、構築物中のO m p Aリーダー配列の組み込みによってペリプラズムに輸送されるようにさらに操作される。この戦略を使用して、Keizerらは、i n v i t r oアッセイでその受容体 (a s i a l o G M 1)に結合することができ、ペプチドが異種チャレンジの15分前に送達された場合に、マウスにおける罹患率および死亡率を減少させる、組換えの可溶性単量体P . a e r u g i n o s aピリンタンパク質を生成した。この可溶性の単量体の切断型NTHi P i l Aは、本明細書に記載される研究において有用である。

【0206】

一部の実施形態では、キメラタンパク質は、標準的な技法を使用して、合成され、精製され、配列決定されてもよい。例えば、キメラタンパク質は、段階的なFmoc-tert-ブチル固相合成によって半手動でアセンブルされ、HPLCによって精製されてもよい。組換えの合成キメラタンパク質の組成およびアミノ酸配列は、アミノ酸分析および／または質量スペクトル分析によって確認されてもよい。

抗P i l A抗体

【0207】

一部の実施形態では、抗P i l A抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。一態様では、ポリクローナル抗体は、P i l Aポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片で免疫された対象から単離された血清中にある。一部の実施形態では、そのような血清は、精製および処理されて、例えば、消化されて、抗体のF a b断片を産生し得る。

【0208】

一態様では、抗体は、P i l Aペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合し、そのような例としては、表面抗原または組換えの可溶性P i l A (G e n b a n k 受託番号: E F U 9 6 7 3 4 . 1) およびI V型ピリン (G e n b a n k 受託番号: Y p _ 0 0 3 8 6 4 3 5 1 . 1) が挙げられる。一態様では、抗体は、ポリクローナル抗体である。別の態様では、抗体は、モノクローナル抗体またはその生物学的に活性な断片である。モノクローナル抗体、その誘導体、断片およびバリエーションを生成する方法は、当技術分野において公知である。

【0209】

一部の実施形態では、抗P i l A抗体の生物学的に活性な断片は、参照抗P i l A抗体の少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約85%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは少なくとも約97%、もしくは少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%、もしくは少なくとも1.5倍、もしくは少なくとも2倍、もしくは少なくとも3倍、もしくは少なくとも4倍、もしくは少なくとも5倍、もしくは少なくとも6倍、もしくは少なくとも7倍、もしくは少なくとも8倍、もしくは少なくとも9倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは少なくとも20倍、もしくは少なくとも50倍、もしくは少なくとも100倍、またはそれよりも高い生物活性を有する。一部の実施形態では、生物活性は、P i l Aを特異的に認識し、それに特異的に結合することを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。そのような生物活性は、例えば、参照抗体と比較して、抗体のP i l A親和性および／もしくは特異性、ならびに／またはP i l Aの競合的結合を定量化することを介して、当業者によって測定され得る。加えて、または代替的に、本明細書の生物活性は、対象におけるバイオフィルムを防止すること、阻害すること、破壊すること、分散させること、もしくは処置することのうちの1つもしくは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、生物活性は、H . i n f l u e n z a e細菌を死滅させる能力を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。他の好適な活性は、以下から選択されてもよい：菌力を低減すること、付着を阻害すること、単収縮性運動を阻害すること、細胞分裂を阻害すること、ならびに／またはH . i n f l u e n z a e細菌の上皮への侵入および／もしくはH . i n f l u e n z a e細菌のファゴサイトーシスの増強を阻害すること。一部の実施形態では、抗P i l A抗体またはその生物学的に活性な断片は、P i l Aポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片に特異的に結合し、それを特異的に認識する。i n v i t r oで完全に媒介される細菌アッセイ系 (M u s h e r e t a l . , I n f e c t . I m m u n . 3 9 : 2 9 7 - 3 0 4 , 1 9 8 3 ; A n d e r s o n e t a l . , J . C l i n . I n v e s t . 5 1 : 3 1 - 3 8 , 1 9 7 2) を使用して、抗キメラタンパク質抗体の生物活性を測定してもよい。

10

20

30

40

50

D N A B I I 【0210】

組込み宿主因子 (IHF) は、細菌性バイオフィルムマトリックスの重要な構造エレメントである。IHFおよびHU (ヒストン様タンパク質) は、細菌DNA結合タンパク質のDNABIIファミリーの遍在性の2つのメンバーを含む。IHFおよび／またはHUをコードする遺伝子は、真正細菌のあらゆるメンバーのゲノム中に存在する (Goodman et al., 2011)。それ故に、この標的は、NTHIに固有ではないが、代わりに、高い優先度のESKAPE病原体 (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* および *Enterobacter* spp.) のそれぞれを含む、これまでのすべての試験された病原体形成バイオフィルム中のその存在に起因して種独立性である (Devaraj et al., 2018; Devaraj et al., 2015; Novotny et al., 2013a)。細胞外DNA (eDNA) および関連するDNABIIタンパク質は、これらのバイオフィルムの基本的構造物および構造完全性に必須である (Flemming and Wengler, 2010; Goodman et al., 2011; Jurcisek and Bakaletz, 2007; Whitchurch et al., 2002)。バイオフィルムマトリックス内で、eDNAの交差した鎖は、IHFおよびHUによって安定化される (Swinger and Rice, 2004)。結果は、バイオフィルム構造物を支持および維持する格子様eDNA足場である。細菌性バイオフィルムのDNABIIタンパク質に対する抗体への曝露は、eDNAマトリックスを不安定にし、バイオフィルム構造の崩壊を引き起こす (Goodman et al., 2011)。この転帰のための機構は、バイオフィルムを取り囲む環境中のDNABII分子が、抗体複合体の形成に起因して隔離され、このようにして、eDNAマトリックス内のDNABIIタンパク質が放出される、平衡シフトの誘導である (Brockson et al., 2014; Novotny et al., 2016)。結果は、*in vitro*で抗DNABII抗体への曝露の3分以内に開始する、eDNA足場の突然の完全な崩壊およびバイオフィルム内在細菌の放出である (Brockson et al., 2014; Novotny et al., 2019)。DNABIIタンパク質に対するワクチン誘導抗体は、宿主免疫エフェクターによるクリアランスを許容するNTHI誘発性OMのチンチラモデルにおいて既存のバイオフィルムを破壊する (Goodman et al., 2011; Novotny et al., 2019; Novotny et al., 2016)。また、抗DNABII抗体による治療的処置は、既存の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* バイオフィルムのラットモデルにおける溶骨性インプラント周囲炎を解決し (Freire et al., 2017)、マウス肺からの *P. aeruginosa* の凝集バイオフィルムも根絶する (Novotny et al., 2016)。

【0211】

「核様体関連タンパク質」または「NAP」という用語は、本明細書で使用される場合、原核細胞の核様体中の核酸の動的な空間組織化に影響を及ぼすタンパク質のクラスを指す。これらのタンパク質は、DNAの屈曲、結合、および凝集をもたらすことにより、ゲノムを組織化する。ある特定のNAPは、DNA結合タンパク質であり、DNABIIタンパク質であるDPS (Genbank受託番号: CAA49169)、HNS (Genbank受託番号: CAA47740)、Hfq (Genbank受託番号: ACE63256)、CbpA (Genbank受託番号: BAA03950)、およびCbpB (Genbank受託番号: NP_418813) を含むバイオフィルムに関連し得る。NAPのうち、DNABIIタンパク質は、明確に異なり、一般に、アルファヘリックス二量体化ドメインとの強い配列同一性を有し、逆平行ベータリボンを含んでいてもよく、これは、多くの場合、DNAの副溝に結合し、その中に挿入されるチップを含む

【化16】

NPXT

10

20

30

40

50

(ここで、Xは、任意のアミノ酸配列であるか、またはアミノ酸Q、R、K、S、もしくはTから選択され得る)を有し、それをもつれさせる。機能的プロトマーは、同一または相同サブユニットの二量体である。

【0212】

DNA BIIファミリーは、細胞内細菌核様体を一部では形作る細菌タンパク質の核様体関連タンパク質(NAP)と称されるタンパク質のクラスのメンバーである(Browning et al. (2010) Curr. Opin. Microbiol. 13:773-780)。加えて、このファミリーは、遍在性で、實際上、すべての真正細菌によって発現される。これまでにすべての特徴付けられたファミリーメンバーは、サブユニットのホモ二量体またはヘテロ二量体いずれかとして機能する。ファミリーは、HU(ヒストン様タンパク質)およびIH
F(組込み宿主因子)の2つの種類に分けられ、B. cenocepaciaは両方を発現することができる(株J2315遺伝子:BCAL3530、hupA;BCAL15
85、hupB;BCAL1487、ihfA、およびBCAL2949、ihfB)。これらのファミリーメンバー間の主な差異は、HUが独立した様式で配列中のDNAに結合する一方で、IH
Fが属にわたって保存されたコンセンサス配列(WATCAANNNTTR(ここで、Wは、AまたはTであり、Rは、プリンである)、配列番号)に結合する点である(Swinger et al. (2004) Curr. Opin. Struct. Biol. 14:28-35)。すべてのDNA BIIタンパク質は、DNAに結合して、それを大きく屈曲させる、例えば、E. coli IH
Fは、實際上、UターンにDNAを屈曲させることができる(Rice et al. (1996) Cell 87:1295-1306)。加えて、すべてのファミ
リーメンバーは、屈曲前またはカーブしたDNA構造、例えば、DNA組換えの中央の十字型様構造であるホリデイジャンクションに対する優先傾向を有する。実際に、DNA B
IIタンパク質は、遺伝子発現、組換え、修復および複製を含むすべての細胞内DNA機能を促進する補助因子として機能する(Swinger et al. (2004) Curr. Opin. S
truct. Biol. 14:28-35)。

【0213】

「DNA BIIポリペプチドまたはタンパク質」は、DNA結合性ドメインから構成され、このようにして、微生物DNAに対して特異的なまたは一般的な親和性を有するDNA結合タンパク質またはポリペプチドを意図する。一態様では、それらは、副溝においてDNAに結合する。DNA BIIタンパク質の非限定的な例は、組込み宿主因子(IH
F)タンパク質、およびE. coli株U93由来のヒストン様タンパク質(HU)である。バイオフィームに関連し得る他のDNA結合タンパク質としては、DPS(Genbank受託番号:CAA49169)、H-NS(Genbank受託番号:CAA47740)、Hfq(Genbank受託番号:ACE63256)、CbpA(Genbank受託番号:BA A03950)、およびCbpB(Genbank受託番号:NP
418813)が挙げられる。

【0214】

「組込み宿主因子」または「IH
F」タンパク質は、それらのDNAを宿主細菌に組み入れるためにバクテリオファージによって使用される細菌タンパク質である。それらは、細胞外微生物DNAにも結合する。E. coliにおいてIH
Fタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、himA遺伝子(Genbank受託番号:POA6X7.1)およびhimD遺伝子(POA6Y1.1)である。これらの遺伝子に対するホモログは、他の生物体において見出される。ある特定の実施形態では、「IH
F」という用語は、2つのIH
Fサブユニット:組込み宿主因子サブユニットアルファ(IH
FAまたはIh
fA)および組込み宿主因子サブユニットベータ(IH
FBまたはIh
fB)の一方または両方を指す。

【0215】

「HU」または「E. coli株U93由来のヒストン様タンパク質」は、典型的には、E. coliに関連するヘテロ二量体タンパク質のクラスを指す。HUタンパク質は、DNAジャンクションに結合することが公知である。関連するタンパク質は、他の微生物

から単離されている。E. coli HUの完全なアミノ酸配列は、Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem 103(3)447-481によって報告された。HUタンパク質に対する抗体は、Abeamから市販されている。E. coliにおけるHUタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、それぞれ、配列番号29および30に対応するhupAおよびhupBである。これらの遺伝子についてのホモログは、他の生物において見出し、他の生物由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、WO2011/123396号の表10に見ることができる。

【0216】

「表面抗原」または「表面タンパク質」という用語は、細菌細胞などの細胞の表面上のタンパク質またはペプチドを指す。外膜タンパク質の例は、例えば、OMP P5 (Genbank 受託番号: YP_004139079.1)、OMP P2 (Genbank 受託番号: ZZX87199.1) および OMP P26 (Genbank 受託番号: YP_665091.1) である一方で、表面抗原の例は、rsPilAまたは組換えの可溶性PilA (Genbank 受託番号: EFU96734.1) およびIV型ピリン (Genbank 受託番号: Yp_003864351.1) である。

【0217】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、DNABIIは、組込み宿主因子 (IHf) またはヒストン様タンパク質 (HU) のタンパク質から選択される。本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、DNABIIは、野生型DNABIIもしくはその生物学的に活性な断片を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、DNABIIの生物学的に活性な断片は、本明細書に開示されるキマー (chimer) を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一部の実施形態では、DNABIIは、WO2014/201305号の配列番号1から348 (配列のそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)、またはそれらのそれぞれの断片もしくは等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。グラム (+) およびグラム (-) 細菌によって産生される他の好適なDNABIIまたはその生物学的に活性な断片は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,999,291号の表8、ならびにWO2014/201305号、WO2017/023863号、WO2017/066719号、WO2018/129092号、WO2018/129078号、PCT特許出願第PCT/US2020/041082および同第PCT/US2021/040576号に見ることができる。これらのタンパク質およびそれらの断片に結合する抗体は、抗DNABII抗体と称される。

【0218】

さまざまな実施形態のDNA結合タンパク質の関連部分の配列アライメントは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,999,291号の表9に公開されている。太字は、コンセンサスとの完全な一致を示し、薄い灰色の文字は、保存的アミノ酸変化を示し、薄いまたは濃い影付きの配列は、種にわたって高度に保存されている。アミノ末端および/またはカルボキシ末端の灰色の影付きの未定義の配列は、コンセンサス配列と共有されない未定義のアミノ酸である。この表は、Obeto et al. (1994) Biochimie 76:901-908において以前に公開された情報に基づく。断片「ARM」は、表の下部に示され、これらの断片またはそれらの等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるポリペプチド断片は、本明細書で述べられる生物活性を有する。

【0219】

そのような非限定的な例としては、下記の表にリストされたアミノ酸配列またはそれらの断片もしくは等価物を含む単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドおよびそのそれぞれの等価物が挙げられる。さらなる非限定的な例としては、アミノ酸AARKGINPKTKKSISIPARKVVRFF (配列番号) を含むか、もしくは代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそのアミノ酸の単離されたポリペプチドまたは

組換えポリペプチドが挙げられる。またさらなる態様では、本開示は、I（または代替的に、別の疎水性アミノ酸、例えば、VまたはF）および／またはKに改変された61位および／または64位のP. gingivalisのアミノ酸に対応するアミノ酸を有する、成熟または組換えH U抗原性ポリペプチドを提供する。これらのポリペプチドの生物学的等価物は、本開示にさらに挙げられるが、但し、配列は、単離された野生型配列全体を含まない。

各種の種由来の非限定的な例示的H Uタンパク質配列のリスト。

【表 7 - 1】

配列番号	種	参照番号	例示的配列
配列番号	<i>Tannerella forsythia</i>	WP_041 591297.1	MNKTEFINAVA EKAGLSKVDGKKAVEAM VKTIQGEMKKGEKVSILGFGSFSVVEKAS RKGVPNPQTKKVINIPARKVIKFKPGTDL
配列番号	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	WP_004 334454.1	MNKTEFIAAVA EKAGLTKADAQRAVNAF TEVVKETMEKGDRLPLVGFGTFSVSQRKA REGKNPRTGETIKIAARKVVHFKPGANLD LK
配列番号	<i>Porphyromonas macacae</i>	WP_025 003580.1	MNKSEFIAEVA AKAGMTKVD AQKSVNAF IEVIQEQMKKGEKVALLGFGTFSVTQKAA RTGINPKTKKA IKIPARKAVKFKAGSALDV
配列番号	<i>Bergeyella zoohelcum</i>	WP_002 662711.1	MNKTD FIAAVA EKANLTKADAQRAVNAF AEVVTEQMNAGEKIALIGFGTFSVSERAA RKGINPATKQPINIPAKMVAKFKPGT
配列番号	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	WP_008 154292.1	MNKTEFINAVA EKSGLSKVD AKKAVEAF VETVSSELKEGGKVALLGFGSFSVAEKAA RKGVPNPKTQPIEIPARKSVKFKAGAEL
配列番号	<i>Porphyromonas cangingivalis</i>	WP_025 837655.1	MNKTEFISAVA EKAGATKVDTKAIVDAA VAVIAEEMKKGEKVAILGFGTFSVVERAK REGFNPRRTKEKIKIPARKIVKFKPGSDLDI
配列番号	<i>Bacteroides faecichinchillae</i>	WP_025 073728.1	MNKSELISAMATEAQMSKADAKRALEAFI TSVTNAMKAGDKVSLVGFGTFAVSERAA RTGINPSTKASITIPAKKVAKFKPGAEL

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列番号	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	WP_013 611412.1	MNKAQLIDAIAEKAGLTKADSKKALEAFV ETVGEALKGGDKVALIGFGSFSVSERSARS GRNPQTGKTITIPAKKVVKFKAGAEL
配列番号	<i>Bacteroides pyogenes</i>	WP_027 325691.1	MNKSELVSAMAAEAQMSKADAKKALDA FISSVTKAMKAGDKVSLVGFGTFSVSERS ARTGINPSTKATITIPAKKVAKFKAGAEL
配列番号	<i>Saprospira grandis</i>	WP_015 691662.1	MNKGDLIDKIAEAAGLKKADAAAALNAT LETIADTLKAGQKITLVGFGTFDVENYRAA RKGINPSTQKEIQISDKVTVKFKAG
配列番号	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	WP_004 583766.1	MNKTDFAA VA EKANLTKADAQRAVNAF AEVVTEQM NAGEKIALIGFGTFSVSERAA RKGINPKTKKSI SIPARKVVRFPKGSTLELK

【0220】

好適なポリペプチド断片の非限定的な例としては、限定されるものではないが、
(a)

【化17】

FLEEIRLSLESGQDVKLSGF;

(b)

【化18】

RPGRNPKTG DVVPVSARRVV;

(c)

【化19】

RTGRNPQTGA EIQIAASKVP;

(d)

【化20】

TLSAKEIENMV KDILEFISQ;

(e)

【化21】

RGFGSFSLHHRQPRLGRNPK;

(f)

【化22】

FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV;

(g)

【化 2 3】

KKQAKAALEATLDAITASLKEG;

(h)

【化 2 4】

VNERAARTGRNPQTGAIEQIAA;

(i) アミノ酸配列 N P X T を含むポリペプチド、または

(j) (a) から (i) の等価物

が挙げられ、ここで、等価物は、それらに対して少なくとも約 80 % の相同性もしくはアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列、または高ストリンジェンシーの条件下でアミノ酸配列もしくはその相補体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸を含み、ここで、高ストリンジェンシーの条件は、約 55 °C ~ 約 68 °C のインキュベーション温度；約 1 × S S C ~ 約 0.1 × S S C の緩衝液濃度；約 55 % ~ 約 75 % のホルムアミド濃度；および約 1 × S S C、0.1 × S S C の洗浄溶液または脱イオン水を含む。

【0 2 2 1】

本明細書で使用される場合、「キマー (chimer)」または「キメラペプチド」という用語は、互いに直接的にもしくは間接的に（リンカーを介してなど）コンジュゲートされた DNA B I E ポリペプチドの 2 つまたはそれよりの多くの断片またはドメインを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組換えポリペプチドを指す。一実施形態では、ドメインは、コンフォメーションチップドメインおよび／またはコンフォメーションテールドメインである。加えて、または代替的に、2 つまたはそれよりも多くの断片またはドメインは、同じまたは異なる DNA B I E ポリペプチドに由来する。一実施形態では、キメラペプチドは、互いに直接的にもしくは間接的に（リンカーを介してなど）コンジュゲートされた I h f A のチップドメインおよび I h f B のチップドメインを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 11, 104, 723 号を参照されたい。別の実施形態では、キメラペプチドは、互いに直接的にもしくは間接的に（リンカーを介してなど）コンジュゲートされた I h f A のテールドメインおよび I h f B のテールドメインを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 11, 104, 723 号を参照されたい。ポリペプチドの「コンフォメーションチップドメイン」は、構造が、プロリン残基によって典型的には媒介される急な回転を有する逆平行ベータリボンを含む一次アミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。I H F ポリペプチドの「チップ」は、WO 2018 / 129078 号の図 1 に示されている。

【0 2 2 2】

ポリペプチドの「コンフォメーションチップドメイン」は、構造が、プロリン残基によって典型的には媒介される急な回転を有する逆平行ベータリボンを含む一次アミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

【0 2 2 3】

下記の表は、コンフォメーションチップドメインポリペプチドの例を示す。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

略称 (タンパク質名称)	細菌株	配列	配列番号 :
Ec_HimA (b1712)	<i>E. coli K12-MG1655</i>	FDLRDKNQRPGRNPKTGEDI	

10

【表 8 - 2】

Salm_HimA (Sty1771)	<i>Salmonella enteric serovar typhi CT18</i>	FDLRDKNQRPGRNPKTGEDI	
Vc_HimA (VC_0273)	<i>V. cholera</i> El Toz N16961	FDLRDKNERPGRNPKTGEDI	
Pa_HimA (NMB_1302)	<i>P. aeruginosa</i>	FDLRDKRQRPGRNPKTGEEI	
Hi_HimA (HI1221)	<i>H. influenzae KW20 Rd</i>	FELRDKSSRPGRNPKTGDVV	
Aa_IHF アルファ (YP_0032559 65)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	FELRDKASRPGRNPKTGESV	
Mc HimA (YP_0036263 07)	<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	FELKDKKPRPGRNPKTGESV	
Ng_IHF アルファ (NGO603)	<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (オクラホマ)	FQLRDKPQRPGRNPKTGEEV	
Nm HimA (NMB_0729)	<i>N. meningitides</i> MC5B	FQLRDKPQRPGRNPKTGEEV	
Bc IHFA (Bcen2424_14 81)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	FQLRDKPQRPGRNPKTGEAI	
Bp IHFA (BURPS668_ 1718)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	FQLRDKPQRPGRNPNTGEAI	

20

30

40

50

【表 8 - 3】

Bpert IhfA (BP2572)	<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1	FQVRDKPPRPGRNPKTGETI	
Pm HimA	<i>Prevotella</i> <i>melaninogenica</i> ATCC 25845	FEVKKRLERVMVNPSTGLR M	
Pi HimA (PIN_0345)	<i>Prevotella intermedia</i> 17	FEVKKRLERIMTNPATGLRM	
Tp Dbp II (TP_0251)	<i>Treponema palladium</i> Nichols	FESRVRKASVGKSINTGEVV	
Pm Hup	<i>Prevotella</i> <i>melaninogenica</i> ATCC 25845	FKVQAVKPRESVNVNTGER V	
Pi hypo (PIN_0343)	<i>Prevotella intermedia</i> 17	FKVQAVKPRESVNVNTGER V	
Sa_HU (MW1362)	<i>S. aureus</i> MW2	FEVRERAARKGRNPQTGKEI	
Ec hupA	<i>E. coli</i> K12-MG.1655	FKVNHRAERTGRNPQTGKEI	
Se_Hup (SERP1041)	<i>S. epidermidis</i> RP62A	FEVRERAARKGRNPQTGKEI	
Ss Hu (1310)	<i>S. sobrinus</i> 6715	FEVRERAARKGRNPQTGA EI	
Spyog_HU (Spy1239)	<i>S. pyogenes</i> MGAS10270	FEVRERAARKGRNPQTGA EI	
Sgall_HlpA (YP_003430069)	<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>)	FEVRERAARKGRNPQTGEEI	
GBS_Hup (SAG_0505)	<i>S. agalactiae</i> (グループB Strep)2603V/R	FEVRERAARKGRNPQTGA EI	

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

Spneu_HU (spr1020)	<i>S. pneumoniae</i> R6	FEVRERAERKGRNPQTGKE M	
Sg_HlpA (SGO_0701)	<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868	FEVRERAARKGRNPQTGKEI	
Sm_HU (Smu_589)	<i>S. mutans</i> UA159	FEVRERAARKGRNPQTGEEI	
Ef Hup (Efl 550)	<i>Enterococcus faecalis</i> VS83	FEVRERAARKGRNPQTGQEI	
Hi_HupA (HI0430)	<i>H. influenzae</i> KW20 Rd	FKVNERAARTGRNPQTGA EI	
Vc_HupA (VC_0273)	<i>V. cholera</i> El Toz N16961	FKVNHRSA RTGRNPQTGEEI	
Pa_HupB	<i>P. aeruginosa</i>	FAVKERAARTGRNPQTGKPI	
Aa HU	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	FKVNARKARTGRNPQTGA EI	
Vc_HupB (VC_1919)	<i>V. cholera</i> El Toz N16961	FSVRTRAARTGRNPKTGEEI	
Ec hupB	<i>E. coli</i> K12-MG.1655	FAVKERAARTGRNPQTGKEI	
Mc HupB (YP_0036267 75)	<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	FSVKERAARMGRNPKTGEAI	
Bpert HupB (BP3530)	<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1	FAVSARAARTGRNPRTGETI	

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

Mc HimD (YP_003627027)	<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	FCLHHRSARIARNPRTGESV	
Pm HupB (PREME0022_2103)	<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	FATTERPAHEGINPRSKEKI	
Pi Hup (PIN_A0704)	<i>Prevotella intermedia</i> 17	YSVTERPAHEGINPATKQKI	
Td HU (TDE_1709)	<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405	DFAVLHGRKNARNPKTGEA V	
Pg_Hup-1 (PG_0121)	<i>P. gingivalis</i> W83	FSVSERAARKGINPKTKKSI	
Hp_Hup (Hp0835)	<i>H. pylori</i> 26695	FETAEQKGKEGKVPGSDKT Y	
Pm HupA (PREME0022_0268)	<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	SFIVKHRAEKTARNISKNTTI	
Pi Hup-2 (PIN_A1504)	<i>Prevotella intermedia</i> 17	SFIVKHRAEKTARNISKNTTI	
Pg_Hup-2 (PG_1258)	<i>P. gingivalis</i> W83	FIVKERAEKTARNISKQTTI	
Mt HU (MT_3064)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	FEQRRRAARVARNPRTGETV	

10

20

30

40

50

【表 8 - 6】

Ms_Hup (MSMEG_2389)	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2	FEQRRRAARVARNPRTGETV	
Ec_HimD (b0912)	<i>E. coli</i> K12-MG1655	FSLHYRAPRTGRNPKTGDKV	
Salm_HimD (Sty0982)	<i>Salmonella enteric</i> serovar typhi CT18	FSLHYRAPRTGRNPKTGDKV	
Vc_HipB (VC_1914)	<i>V. cholera</i> El Toz N16961	FSLHYREPRVGRNPKTGDKV	
Pa_HimD (PA3161)	<i>P. aeruginosa</i>	FSLHYRAPRVGRNPKTGESV	
Hi_HimD (HI1313)	<i>H. influenzae</i> KW20 Rd	FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV	
Aa_IHFB (YP_003256209)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	FSLHCRQPRIGRNPKTGEQV	
Ng_IHFβ (NGO603)	<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (オクラホマ)	FDLNHRPARIGRNPKTGERV	
Nm_HimD	<i>N. meningitides</i> MC5B	FDLNHRPARIGRNPKTGERV	
Bc_IHFB (Bcen2424_1048)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	FGLNRRPARVGRNPKSGEKV	

10

20

30

40

50

【表 8 - 7】

Bp IHFB (BURPS668_2881)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	FGLNRRPARVGRNPKSGEKV	
Bpert IhfB (BP0951)	<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1	FSLSQRSRIGRNPKEGEV	
Bb_Hbb (BB_0232)	<i>B. burgdorferi</i> B31	FEVRKRKGRLNARNPQTGE YV	

10

【0224】

DNA BII ポリペプチドの「チップ断片」は、例として IHF アルファおよび IHF ベータを使用して、2つのアームのタンパク質を形成する DNA BII ポリペプチドを意図する。そのような非限定的な例としては、IhfA のチップ断片（本明細書で A チップ断片とも称される）：NFE LRDKSSRPGRNPKTG DVV、配列番号 、および IhfB のチップ断片（本明細書で B チップ断片とも称される）：SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL（配列番号 ）または FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV（配列番号 ）が挙げられる。

20

【0225】

DNA BII ポリペプチドの「テール断片」は、バルク培地に曝露され、DNA または他のポリペプチドによって妨げられない両方のタンパク質の領域を意図する。

【0226】

ある特定の実施形態では、チップキメラペプチド IhfA 5-mIhfB 4 NTHI は、

【化 2 5】

RPGRNPX₁TG DVVPVSARRVV-X-FSLHHRQPRLGRNPX₁TGDSV（配列番号 ）、

30

（ここで、「X」は、必要に応じて 1～20 アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる必要に応じたアミノ酸リンカー配列であり、「X₁」は、任意のアミノ酸であるか、または代替的に、「X₁」は、アミノ酸 Q、R、K、S、もしくは T から選択される）のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。さらなる態様では、「X₁」は、K または Q である。さらなる実施形態では、チップキメラペプチド IhfA 5-mIhfB 4 NTHI は、

【化 2 6】

RPGRNPKTG DVVPVSARRVV-X-FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV（配列番号 ）、

40

（ここで、「X」は、必要に応じて 1～20 アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる必要に応じたアミノ酸リンカー配列である）のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。またさらなる実施形態では、チップキメラペプチド IhfA 5-mIhfB 4 NTHI は、

50

【化 27】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVVGPSLFSLHHRQPRLGRNPKTGDSV

(配列番号、一部の実施形態では、これは、本明細書でチップキマー (chimer) と称される) のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるかまたはまたさらにそれからなる。

【0227】

ある特定の実施形態では、テールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I は、F L E E I R L S L E S G Q D V K L S G F - X - T L S A K E I E N M V K D I L E F I S Q (配列番号) (ここで、「X」は、必要に応じて1~20アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる必要に応じたアミノ酸リンカー配列である) のポリペプチド配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、リンカーは、本明細書に開示されるいずれか1つまたは複数のものから選択される。一実施形態では、テールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I は、F L E E I R L S L E S G Q D V K L S G F G P S L T L S A K E I E N M V K D I L E F I S Q (配列番号) を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0228】

下記に開示される A 1 ~ A 4 および A 6、ならびに B 1 ~ B 6 に開示されるものがポリペプチドとしてさらに提供され、これは、コンフォメーションチップドメイン、および D N A B I I ポリペプチドを産生する本明細書で特定された異なる生物由来のこれらのポリペプチドの等価物を含むしない。配列は、

M A T I T K L D I I E Y L S D K Y H L S (本明細書で A 1 と称される; (配列番号)) ;

K Y H L S K Q D T K N V V E N F L E E I (本明細書で A 2 と称される; (配列番号)) ;

F L E E I R L S L E S G Q D V K L S G F (本明細書で A 3 と称される; (配列番号)) ;

K L S G F G N F E L R D K S S R P G R N (本明細書で A 4 と称される; (配列番号)) ;

A R R V V T F K P G Q K L R A R V E K T K (本明細書で A 6 と称される; (配列番号)) ;

M T K S E L M E K L S A K Q P T L S A K (本明細書で B 1 と称される (配列番号)) ;

T L S A K E I E N M V K D I L E F I S Q (本明細書で B 2 と称される (配列番号)) ;

E F I S Q S L E N G D R V E V R G F G S (本明細書で B 3 と称される (配列番号)) ;

R G F G S F S L H H R Q P R L G R N P K (本明細書で B 4 と称される (配列番号)) ;

G R N P K T G D S V N L S A K S V P Y F (本明細書で B 5 と称される; (配列番号)) ; および

S V P Y F K A G K E L K A R V D V Q A (本明細書で B 6 と称される; (配列番号)) ;

を含む。

【0229】

D N A B I I ポリペプチドの非限定的な例としては、I H F または H U アルファまたはベータポリペプチド; I H F アルファポリペプチド; M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s H U ; E . c o l i H u p A、H u p B、h i m A、h i m D ; E . f a e c a l i s H U (V 5 8 3 など) が挙げられる。

【0230】

同じまたは異なる細菌種によって産生され得る3～5のコンフォメーションチップドメインを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組換えポリペプチドも提供され、そのアミノ酸配列は、同じ（例えば、A5アミノ酸配列すべて）であり得るか、または少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つ、もしくは5つすべてが異なるアミノ酸配列を有し（例えば、A5およびmB4、ならびにそれらのそれぞれの等価物、および

【化28】

NPX₁T

を含有する断片のさまざまな組合せ）、ここで、X₁は、任意のアミノ酸であるか、または一態様では、アミノ酸Q、R、K、S、またはTから選択されるアミノ酸である。組換えポリペプチド中のコンフォメーションチップドメインは、線状または分枝状のコンフォメーションであり得る。それらは、それらに連結された検出可能な標識および／または精製標識をさらに含むことができる。チップドメインの構造配向性は、「ヘッド」からテール；テールからヘッド（ここで、ポリペプチドは、3つまたはそれよりも多くのチップドメイン、ヘッドからテールの任意の組合せを含む、例えば、ヘッダーヘッダーヘッダー；テールヘッダーヘッダー；テールヘッダーテールであり得、ここで、野生型配列のアミン末端は、「ヘッド」であり、野生型配列のカルボキシ末端は、ポリペプチドの「テール」である。一態様では、ポリペプチドは、要するに、41～120アミノ酸の長さであり得る。

【0231】

等価なポリペプチドの非限定的な例としては、それらに対して、またはポリペプチド配列について、少なくとも60%、もしくは代替的に、少なくとも65%、もしくは代替的に、少なくとも70%、もしくは代替的に、少なくとも75%、もしくは代替的に、80%、もしくは代替的に、少なくとも85%、もしくは代替的に、少なくとも90%、もしくは代替的に、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、または高ストリンジェンシーの条件下でそのようなポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドもしくはその相補体によってコードされるポリペプチドが挙げられる。高ストリンジェンシーの条件は、本明細書に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。出願人は、太字および下線付きのアミノ酸が、重度に保存されており、したがって、一態様では、等価なポリペプチドの設計において改変または変更されないことを決定した。等価なポリペプチドの追加の例としては、例えば、

【化29】

DKSSRPGRNPX₁TGDVVAASARR（配列番号 ）

（ここで、「X₁」は、任意のアミノ酸であるか、または代替的に、「X₁」は、アミノ酸Q、R、K、S、もしくはTから選択される）が挙げられる。

【0232】

等価なポリペプチド、1種の生物学的に活性な断片はまた、アミン末端またはカルボキシ末端のいずれかに（またはその両方に）、最大で25個、または代替的に、20個、または代替的に、15個、または代替的に、最大で10個、または代替的に、最大で5個のランダムなアミノ酸の付加を有する上記で述べられたポリペプチドからなるか、またはそれを含むポリペプチドも含む。別の態様では、等価なポリペプチドは、対応する野生型配列の隣接アミノ酸および野生型隣接アミノ酸の等価物から選択される、アミン末端またはカルボキシ末端のいずれかに（またはその両方に）、最大で25個、または代替的に、20個、または代替的に、15個、または代替的に、最大で10個、または代替的に、最大で5個のアミノ酸の付加を有する上記で述べられたポリペプチドからなるか、またはそれを含むポリペプチドも含む。

抗DNABII抗体

【0233】

一部の実施形態では、抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片は、必要に応じて、DNABII A5ペプチド、DNABII mB4ペプチド、またはA5ペプチドおよびmB4ペプチドを含む組換えポリペプチド（すなわち、チップキマー（chimera））のうちの1つまたは複数から選択される、DNABIIまたはその生物学的に活性な断片を認識し、それに結合する。

【0234】

一部の実施形態では、DNABIIの生物学的に活性な断片は、参照抗DNABII抗体の少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約85%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは少なくとも約97%、もしくは少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%、もしくは少なくとも約100%、もしくは少なくとも1.5倍、もしくは少なくとも2倍、もしくは少なくとも3倍、もしくは少なくとも4倍、もしくは少なくとも5倍、もしくは少なくとも6倍、もしくは少なくとも7倍、もしくは少なくとも8倍、もしくは少なくとも9倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは少なくとも20倍、もしくは少なくとも50倍、もしくは少なくとも100倍、またはそれよりも高い生物活性を有する。一部の実施形態では、生物活性は、DNABIIまたはその生物学的に活性な断片を特異的に認識し、それに特異的に結合することを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。そのような生物活性は、例えば、参照抗体と比較して、抗体のDNABII親和性および／もしくは特異性、ならびに／またはDNABIIもしくは生物学的に活性な断片の競合的結合を定量化することを介して、当業者によって測定され得る。加えて、または代替的に、本明細書の生物活性は、対象におけるバイオフィルムを防止すること、阻害すること、破壊すること、分散させること、または処置することのうちの1つまたは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0235】

好適な抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片は、米国特許第11,104,723号、WO2014/201305号、WO2017/023863号、WO2017/066719号、WO2018/129092号、WO2018/129078号、およびPCT公開第WO2021/007260号に見ることができ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に含められる。

【0236】

抗IHf抗体の非限定的な例は、本明細書に記載されており、一態様では、本明細書で特定されたポリペプチドを特異的に認識し、それに特異的に結合する抗体、あるいはそこで特定されたArm断片（上記で特定）、あるいはそのようなポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または配列：TCTCAACGATTTA（配列番号）；WATCAANNNTTR（ここで、Wは、AまたはTであり、Nは、任意のヌクレオチドであり、Rは、AまたはGである；（配列番号））；

【化30】

MATITKLDIEYLSDKYHLS

（本明細書でhIFA1とも称される；（配列番号））；

【化31】

KYHLSKQDTKNVVENFLEEI

（本明細書でhIFA2とも称される；（配列番号））；

【化32】

FLEEIRLSLESGQDVKLSGF

（本明細書でhIFA3とも称される；（配列番号））；

【化 3 3】

KLSGFGNFELRDKSSRPGRN

(本明細書で h I F A 4 と称される；(配列番号))；

【化 3 4】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV

(本明細書で h I F A 5 と称される；(配列番号))；ARRVVVTFKPGQKL RARVEKTK (本明細書で h I F A 6 と称される；(配列番号))、またはそれらの等価物のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチドの等価物、あるいはそれらに対して、またはポリペプチド配列について、少なくとも60%、または代替的に、少なくとも65%、または代替的に、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも75%、または代替的に、80%、または代替的に、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドまたはペプチドであって、高ストリンジェンシーの条件下でそのようなポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはその相補体によってコードされるポリヌクレオチドまたはペプチドのうちの1つまたは複数である。高ストリンジェンシーの条件は、上記に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。出願人は、太字および下線付きのアミノ酸が、重度に保存されており、したがって、一態様では、等価なポリペプチドの設計において改変または変更されないことを決定した。等価なポリペプチドの追加の例としては、例えば、アミン末端またはカルボキシ末端のいずれかに(またはその両方に)、最大で25個、または代替的に、20個、または代替的に、15個、または代替的に、最大で10個、または代替的に、最大で5個のランダムなアミノ酸の付加を有する上記で述べられたポリペプチドからなるか、またはそれを含む、ポリペプチドが挙げられる。

10

20

【0237】

ある特定の態様では、本開示は、Phe Leu Glu Glu Ile Arg Leu Ser Leu Glu Ser Gly Gln Asp Val Lys Leu Ser Gly Phe (配列番号64)、

【化 3 5】

30

FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV (配列番号 65), VNERAARTGRNPQTGAIEQIAA

(配列番号 66)

Lys Lys Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Asp Ala Ile Thr Ala Ser Leu Lys Glu Gly (配列番号67)、アミノ酸配列NPXTを含むポリペプチド、もしくはそれらのそれぞれの等価物から選択されるアミノ酸配列から本質的になる単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドを特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片に関する。さらなる態様では、単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドは、合計で、少なくとも15個、または代替的に、少なくとも18個、または代替的に、少なくとも20個のアミノ酸を含む。さらなる態様では、NPXT配列は、ポリペプチドの末端アミノ酸ではない。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ポリクローナル抗体ではない。

40

【0238】

加えて、抗体は、DNABIIタンパク質の「チップ」領域に対して生成され得、これは、一態様では、逆平行ベータリボンおよび／または配列NPXT(ここで、「X」は、任意のアミノ酸を指す)を含有するか、またはそのターンを含有するように変更されている。一部の実施形態では、Xは、アミノ酸Q、R、K、S、またはTから選択される。そのような抗体は、前記配列の一方または両方の端に約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16個のアミノ酸の間で必要に応

50

じて隣接した、NPXT配列を含むDNABIIタンパク質の断片を使用して生成されてもよい。そのような非限定的な例は、下線および太字テキストのコンセンサスアミノ酸配列

【化36】

NPXT

により本明細書に開示されている。別の態様では、抗体は、コンセンサス配列NPXT（ここで、「X」は、任意のアミノ酸であるか、または代替的に、「X」は、アミノ酸Q、R、K、S、もしくはTから選択される）を提供するDNABIIタンパク質のチップ領域に対して生成されてもよい。当業者は、これらの配列のうちのいずれか1つで、X位の残基（下記の例では

10

【化37】

二重下線

でマークされる）が、任意のアミノ酸、例えば、Q、R、K、S、またはTで置換されていてもよいことを認識するであろう。例としては、以下が挙げられる。

配列番号68：Haemophilus influenzae IhfA、A5断片：

【化38】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV.

20

配列番号69：Haemophilus influenzae HU、A5断片：

【化39】

RTGRNPQTGAEIQIAASKVP.

配列番号65：Haemophilus influenzae IhfB、改変B4（mB4）断片：

【化40】

FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV.

30

配列番号70：Haemophilus influenzae IhfA、Aチップ断片：

【化41】

NFELRDKSSRPGRNPKTGDVV.

配列番号71：Haemophilus influenzae IhfB、Bチップ断片：

【化42】

SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL.

40

配列番号66 Haemophilus influenzae HU、断片：VNER

【化43】

VNERAARTGRNPQTGAEIQIAA.

【0239】

一部の実施形態では、

【化44】

NPXT

50

を含むポリペプチドは、少なくとも約20アミノ酸長であり、NPXTは、配列の中心にある。そのような配列の非限定的な例としては、配列番号68、69、および66が挙げられる。あるいは、NPXTモチーフ（例えば、上記で述べた通り）を有するポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸の置換または欠失のいずれかによってNPXTモチーフを除去するように改変することができ、モノクローナル抗体は、これらのポリペプチドに対して生じ得る。出願人は、NPXTモチーフを欠くDNABIIポリペプチドに対して生じた抗体が、画像化する、ならびにバイオフィルムの形成および／または破壊をモニターする診断方法において有用であると決定した。一態様では、NPXTモチーフを有するDNABIIに対して生じた抗体またはそれに結合する抗体、およびNPXTモチーフを欠くDNABIIに対して生じた抗体またはそれに結合する抗体（例えば、改変されたポリペプチドまたは天然に存在するポリペプチド）を含むキットが提供される。例えば、キットは、ポリペプチドA5、B4、またはmB4を認識し、それに結合する抗体（治療的）を含むことができ、キットにおいて、ポリペプチドA3またはB2を認識し、それに結合する抗体（診断的）と組み合わせることができる。キットは、診断、処置、およびバイオフィルム処置のモニタリングのために有用である。

10

20

30

40

【0240】

ある特定の態様では、本開示は、配列番号64～65、配列番号66、配列番号67から選択されるアミノ酸配列を含むか、もしくはそれから本質的になる単離されたポリペプチドもしくは組換えポリペプチド、アミノ酸配列NPXTを含むポリペプチド、またはこれらのそれぞれの等価物を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片に関する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ポリクローナル抗体ではない。開示されるハイブリドーマによって産生される非限定的な例示的抗体は、下記の表に開示される。Haemophilus influenzaeのIhfA断片A5（配列番号68）、IhfB断片B4（Arg Gly Phe Gly Ser Phe Ser Leu His His Arg Gln Pro Arg Leu Gly Arg Asn Pro Lys、配列番号72）、およびIhfB断片mB4（配列番号65）を特異的に認識し、それに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系は、下記の表にリストされた寄託番号で、ブダペスト条約の規定に準拠して2015年7月30日にアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）に寄託され、それぞれのハイブリドーマ細胞系を、下記の表にリストする。さらなる非限定的な例示的抗体としては、ハイブリドーマ細胞系IhfA3 NTHI 9B10.F2.H3、IhfB2 NTHI 7A4.E4.G4、およびIhfB2 NTHI 7A4.E4.G11（これらのハイブリドーマは、下記の表にリストされた寄託番号で、ブダペスト条約の規定に準拠して2016年8月1日にアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）に寄託された）によって産生されたHaemophilus influenzaeのIhfA断片A3（配列番号64）またはIhfB断片B2（Thr Leu Ser Ala Lys Glu Ile Glu Asn Met Val Lys Asp Ile Leu Glu Phe Ile Ser Gln 配列番号73）を特異的に認識し、それに特異的に結合するもの、ならびに配列番号66、配列番号67を含むポリペプチド、アミノ酸配列NPXTを含むポリペプチド、またはこれらのそれぞれの等価物を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体が挙げられる。

50

【表 9】

特異性	配列番号	ATCC 受託番号	ハイブリドーマ細胞系
IhfA frag. A5	配列番号 68	PTA-122334	IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6
IhfB frag. B4	配列番号 72	PTA-122336	IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2
IhfB frag. mB4	配列番号 65	PTA-122335	mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5
IhfA frag. A3	配列番号 64		IhfA3 NTHI 9B10.F2.H3
IhfB frag. B2	配列番号 73		IhfB2 NTHI 7A4.E4.G4
			IhfB2 NTHI 7A4.E4.G11

10

【0241】

一態様では、本開示は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、および (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5 によって産生された抗体からなる群から選択される抗体に対して少なくとも 85% 同一である単離された抗体を提供する。

20

【0242】

一態様では、本開示は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、または (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5 によって産生された抗体の CDR を含む単離された抗体を提供する。一態様では、本開示は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、または (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5 によって産生された抗体に対して少なくとも 85% 同一である CDR を有する単離された抗体を提供する。

30

【0243】

本明細書に提供される抗体の一部の態様では、HC 可変ドメイン配列は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、もしくは (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5 によって産生された抗体の HC 可変ドメイン配列を含み、ならびに／または LC 可変ドメイン配列は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、もしくは (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E6.F8.D12.D5 によって産生された抗体の LC 可変ドメイン配列を含む。

40

【0244】

本明細書に提供される抗体の一部の態様では、HC 可変ドメイン配列は、(i) ハイブリドーマ細胞系 IhfA5 NTHI 14G8.F5.G6 によって産生された抗体、(ii) ハイブリドーマ細胞系 IhfB4 NTHI 4E11.E5.G2 によって産生された抗体、および (iii) ハイブリドーマ細胞系 mIhfB4 NTHI 12E

50

6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体の H C 可変ドメイン配列に対して少なくとも 8 5 % 同一の H C 可変ドメイン配列を含み、ならびに／または L C 可変ドメイン配列は、(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体の L C 可変ドメイン配列に対して少なくとも 8 5 % 同一の L C 可変ドメイン配列を含む。

【 0 2 4 5 】

一態様では、本開示は、重鎖 (H C) 可変ドメイン配列および軽鎖 (L C) 可変ドメイン配列を含む単離された抗体であって、重鎖および軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、D N A B I I タンパク質のエピトープに結合する抗原結合性部位を形成する、単離された抗体を提供する。

【 0 2 4 6 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか 1 つの C D R H 1 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R H 1 配列を含む。

【 0 2 4 7 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか 1 つの C D R H 2 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R H 2 配列を含む。

【 0 2 4 8 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか 1 つの C D R H 3 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R H 3 配列を含む。

【 0 2 4 9 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか 1 つの重鎖可変領域配列を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【 0 2 5 0 】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8. F 5. G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1. E 5. G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6. F 8. D 1 2. D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか 1 つの C D R L 1 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R L

1 配列を含む。

【0251】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか1つの C D R L 2 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R L 2 配列を含む。

【0252】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか1つの C D R L 3 を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R L 3 配列を含む。

【0253】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか1つの軽鎖可変領域配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0254】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、F S L T S Y S (配列番号) を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、F S L T S Y S V (配列番号)、F S L T S Y S V H (配列番号)、G F S L T S Y S (配列番号)、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R H 1 配列を含む。

【0255】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、F N I K D Y Y (配列番号 1 1 0) を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、F N I K D Y Y M (配列番号)、F N I K D Y Y M H (配列番号)、G F N I K D Y Y (配列番号)、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R H 1 配列を含む。

【0256】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、I W A G G S T (配列番号) を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、V I W A G G S T (配列番号)、G V I W A G G S T (配列番号)、L G V I W A G G S T (配列番号)、W L G V I W A G G S T (配列番号)、I W A G G S T N (配列番号)、V I W A G G S T N (配列番号)、G V I W A G G S T N (配列番号)、L G V I W A G G S T N (配列番号)、W L G V I W A G G S T N (配列番号)、I W A G G S T N Y (配列番号)、V I W A G G S T N Y (配列番号)、G V I W A G G S T N Y (配列番号)、L G V I W A G G S T N Y (配列番号)、W L G V I W A G G S T N Y (配列番号)、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的にな

10

20

30

40

50

るか、またはまたさらにそれからなるCDRH2配列を含む。

【0257】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、IDPENDDT（配列番号）を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、WIDPENDDT（配列番号）、GWIDPENDDT（配列番号）、IGWIDPENDDT（配列番号）、WIGWIDPENDDT（配列番号）、IDPENDDTE（配列番号）、WIDPENDDTE（配列番号）、GWIDPENDDTE（配列番号）、IGWIDPENDDTE（配列番号）、WIGWIDPENDDTE（配列番号）、IDPENDDTEY（配列番号）、WIDPENDDTEY（配列番号）、GWIDPENDDTEY（配列番号）、IGWIDPENDDTEY（配列番号）、WIGWIDPENDDTEY（配列番号）、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRH2配列を含む。

10

【0258】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、REDS（配列番号）を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、AREDS（配列番号）、またはその生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRH3配列を含む。

20

【0259】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、TELGAY（配列番号）を含むアミノ酸配列またはその生物学的等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRH3配列を含む。

【0260】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、下記に述べるポリヌクレオチド配列：

【化45】

Gaggtgcagctgcaggagtctggacctggcctggtgacgccctcacagagcctgtccatgactgcactgtctctgggttttcattaac
cagctatagtgtagactgggttcgccagcctccaggaagagtctggagtggctgggagtaatatgggctggtggaagcacaattat
aattcggctctcatgtccagactgagcatcagcaaagacaactccaagagccaagtttcttaaaaatggacagtctgcaaactgatgac

30

【化46】

acagccatatactactgtgccagagaggactcctgggtgaaggaacctcagtcaccgtctcctca（配列番号）

またはその生物学的等価物によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0261】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、アミノ酸配列：

40

【化47】

EVQLQESGPGLVTPSQSLMTCTVSGFSLTSYSVHWVRQPPGKSLEWLGVWAGGST
NYSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMDSLQTDDTAIYYCAREDSWGQGTSVTVSS

（配列番号）

またはその生物学的等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0262】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、下記に述べるポリヌクレ

50

オチド配列：

【化 4 8】

Gaggtgcagctgcaggagtctggggcagagcttgtaggtcaggggcctcagtcagttgtcctgcacagcttctggcttcaacatta
aagactactatatgcactgggtgaagcagaggcctgaacagggcctggagtggattggatggattgatcctgaaaatgatgatactga
atatgtcccgaagttccagggcaaggccagtatgactgcagacacatcctccaacacagcctacctgcagctcagcagcctgacatct
gaggacactgccgtctattactgtacagagctcggagcttactggggccaggggactctggtc (配列番号)

またはその生物学的等価物によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的に
それから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

【0 2 6 3】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の重鎖可変領域は、アミノ酸配列：

【化 4 9】

EVQLQESGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPEND
DTEYVPKFQGKASMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCTELGAYWGQGTLY
(配列番号)

またはその生物学的等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはま
たさらにそれからなる。

20

【0 2 6 4】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、Q N V G T N (配列番号)
を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、Q N V G T N V (配列番号)、
Q N V G T N V A (配列番号)、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始
するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または
代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる C D R L 1 配列を含む
。

【0 2 6 5】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、Q S L L D S N G K T Y
(配列番号)を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、Q S L L D S
N G K T Y L (配列番号)、Q S L L D S N G K T Y L N (配列番号)、またはそれ
らのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的
になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさら
にそれからなる C D R L 1 配列を含む。

30

【0 2 6 6】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、S A S (配列番号)を
含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、Y S A S (配列番号)、I Y
S A S (配列番号)、L I Y S A S (配列番号)、A L I Y S A S (配列番号)、
S A S Y (配列番号)、Y S A S Y (配列番号)、I Y S A S Y (配列番号)、L
I Y S A S Y (配列番号)、A L I Y S A S Y (配列番号)、S A S Y R (配列番号)
(配列番号)、Y S A S Y R (配列番号)、I Y S A S Y R (配列番号)、L I Y S A S Y R
(配列番号)、A L I Y S A S Y R (配列番号)、S A S Y R Y (配列番号)、Y
S A S Y R Y (配列番号)、I Y S A S Y R Y (配列番号)、L I Y S A S Y R Y (配列番号)、
A L I Y S A S Y R Y (配列番号)、S A S Y R Y S (配列番号)、
Y S A S Y R Y S (配列番号)、I Y S A S Y R Y S (配列番号)、L I Y S A S Y
R Y S (配列番号)、A L I Y S A S Y R Y S (配列番号)、またはそれらのそれぞ
れの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミ
ノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれから
なる C D R L 2 配列を含む。

40

【0 2 6 7】

50

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、L V S（配列番号 ）を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、Y L V S（配列番号 ）、I Y L V S（配列番号 ）、L I Y L V S（配列番号 ）、R L I Y L V S（配列番号 ）、L V S K（配列番号 ）、Y L V S K（配列番号 ）、I Y L V S K（配列番号 ）、L I Y L V S K（配列番号 ）、R L I Y L V S K（配列番号 ）、L V S K L（配列番号 ）、Y L V S K L（配列番号 ）、I Y L V S K L（配列番号 ）、L I Y L V S K L（配列番号 ）、R L I Y L V S K L（配列番号 ）、L V S K L D（配列番号 ）、Y L V S K L D（配列番号 ）、I Y L V S K L D（配列番号 ）、L I Y L V S K L D（配列番号 ）、R L I Y L V S K L D（配列番号 ）、L V S K L D S（配列番号 ）、Y L V S K L D S（配列番号 ）、I Y L V S K L D S（配列番号 ）、L I Y L V S K L D S（配列番号 ）、R L I Y L V S K L D S（配列番号 ）、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるC D R L 2配列を含む。

10

【0268】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、Q Q Y N S Y P（配列番号 ）を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、Q Q Y N S Y P T（配列番号 ）またはその生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるC D R L 3配列を含む。

20

【0269】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、W Q S T H F P H（配列番号 ）を含むアミノ酸配列、例えば、限定されるものではないが、W Q S T H F P H T（配列番号 ）またはその生物学的等価物で開始するか、それで終了するか、またはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるC D R L 3配列を含む。

【0270】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、ポリヌクレオチド配列：
【化50】

gacattgtgatgaccagctctcaaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcgtcacctgcaaggccagtcagaatgtgg
gtactaatgtagcctgggtatcaacagaaaccagggcaatctcctaaagcactgatttactcggtacatcctaccggtacagtgaggatccctg
atcgcttcacaggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcaatgtgcagtcctgaagactggcagagtatttctgtcagc
aatataacagctatcccacgttcggagggggggaccaagttggaataaaa（配列番号 ）

30

またはその生物学的等価物によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0271】

一部の実施形態では、抗体またはその断片の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列：
【化51】

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS
GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPTFGGGTKLEIK（配列番号
）

40

またはその生物学的等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0272】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、ポリヌクレオチド配列：

50

【化 5 2】

Gatgtgtgatgaccagattccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctccatctcttgaagtcaagtcagagcctcttag
 atagtaatggaaagacataattgaattggtgtttcagaggccaggccagtcctcaaagcgcctaattctatctggtgtctaaactggactct
 ggagtccttgacaggttactggcagtgatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagttgaggctgaggattgggaattta

【化 5 3】

ttattgctggcaaagtacacatttctcacacgttcggaggggggaccaagttggaaatcaaa (配列番号)

またはその生物学的等価物によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的に
 それから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。 10

【0 2 7 3】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、アミノ酸配列：

【化 5 4】

DVVMVTQIPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDLSNGKTYLNLWFQRPQGSPKRLIYLVSKL

DSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCWQSTHFPHTFGGGTKLEIK (

配列番号)

またはその生物学的等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはま
 たさらにそれからなる。 20

【0 2 7 4】

開示される C D R 配列ならびに重鎖および軽鎖可変配列を含む例示的抗体を、それぞれ
 、下記の表に開示する。代替 C D R 予測は、重鎖および／または軽鎖配列に基づいて、例
 えば、C D R 特異性の K a b a t、C l o t h i a、A b M、または c o n t a c t の定
 義に基づいて行われてもよく、これらの C D R 予測方法の詳細は、当技術分野において公
 知であり（例えば、bioinf.org.uk/abs/#cdr_idを参照されたい
 ）、および／または市販されている。表に開示されるものは、O f r a n L a b (o f
 r a n s e r v i c e s . b i u . a c . i l / s i t e / s e r v i c e s / p a r a
 t o m e / i n d e x . h t m l で利用可能な P a r a t o m e) および G r e e n M
 o u n t a i n A n t i b o d i e s の C D R 予測プログラムによって提供される C D
 R 予測アルゴリズムを利用する結果である。 30

【表 1 0 - 1】

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Ihf A5	Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ser Val His または Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ser	Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr または Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr	Arg Glu Asp Ser または Ala Arg Glu Asp Ser	Gln Asn Val Gly Thr Asn または Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala	Ser Ala Ser または Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro または Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Thr

40

50

【表 1 0 - 2】

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Ihf mB4		Ile Asp		Gln Ser		
		Pro Glu		Leu Leu		
	Phe Asn	Asn Asp		Asp Ser	Leu Val	Trp Gln
	Ile Lys	Asp Thr		Asn Gly	Ser	Ser Thr
	Asp Tyr	または		Lys Thr	または Arg	His Phe
	Tyr Met	Trp Ile	Thr Glu	Tyr Leu	Leu Ile	Pro His
	Hisまたは	Gly Trp	Leu Gly	または	Tyr Leu	または
	Gly Phe	Ile Asp	Ala Tyr	Gln Ser	Val Ser	Trp Gln
	Asn Ile	Pro Glu		Leu Leu	Lys Leu	Ser Thr
	Lys Asp	Asn Asp		Asp Ser	Asp Ser	His Phe
	Tyr Tyr	Asp Thr		Asn Gly		Pro His
		Glu Tyr		Lys Thr		Thr
				Tyr Leu		
				Asn		

10

20

【表 1 1 - 1】

抗体	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
Ihf A5	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
	Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro	Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
	Ser Gln Ser Leu Ser Met Thr	Val Gly Asp Arg Val Ser Val
	Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser	Thr Cys Lys Ala Ser Gln
	Leu Thr Ser Tyr Ser Val His	Asn Val Gly Thr Asn Val
	Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly	Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
	Lys Ser Leu Glu Trp Leu Gly	Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu
	Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser	Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg
	Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu	Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
	Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser	Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
	Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
	Val Phe Leu Lys Met Asp Ser	Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp
	Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala	Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
	Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro

30

40

50

【表 1 1 - 2】

	Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
Ihf mB4	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Val Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Glu Leu Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10

20

30

40

50

【0 2 7 5】

一態様では、本開示は、I h f A 5、I h f m B 4、またはそれらのそれぞれの生物学的等価物からなる群から選択される抗体に対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である単離された抗体を提供する。

【0 2 7 6】

一態様では、本開示は、I h f A 5のCDRを含む単離された抗体を提供する。一態様では、本開示は、I h f A 5またはその生物学的等価物に対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である単離された抗体を提供する。

【0 2 7 7】

一態様では、本開示は、I h f m B 4のCDRを含む単離された抗体を提供する。一態様では、本開示は、I h f m B 4またはその生物学的等価物に対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である単離された抗体を提供する。

【0 2 7 8】

本明細書に提供される抗体の一部の態様では、HC可変ドメイン配列は、I h f A 5の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、I h f A 5の可変ドメイン配列を含む。

【0 2 7 9】

本明細書に提供される抗体の一部の態様では、HC可変ドメイン配列は、I h f m B

4 の可変ドメイン配列を含み、L C 可変ドメイン配列は、I h f m B 4 の可変ドメイン配列を含む。

【0280】

上記で述べたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、それを含有するベクターおよび宿主細胞、ならびに当技術分野において公知のおよび本明細書に記載される組換え細胞系を使用するポリペプチドの組換え産生のための方法が本明細書にさらに提供される。

【0281】

本技術の別の態様では、単離された抗体は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を含む：

(a) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される軽鎖配列のうちのいずれかの軽鎖可変ドメインのCDRに対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である1つまたは複数のCDRを含む；

(b) 重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される重鎖配列のうちのいずれかの重鎖可変ドメインのCDRに対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である1つまたは複数のCDRを含む；

(c) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される軽鎖配列のうちのいずれかの軽鎖可変ドメインに対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である；

(d) H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される軽鎖配列のうちのいずれかの重鎖可変ドメインに対して、少なくとも85%、または代替的に、少なくとも90%、または代替的に、少なくとも95%同一である；および

(e) 抗体が、開示される配列のうちのいずれかに結合するエピトープと重複するエピトープに結合する。

【0282】

一部の態様では、抗体は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか1つの重鎖定常領域配列に対して少なくとも80%同一である重鎖定常領域を含む。

【0283】

一部の態様では、抗体は、以下の抗体：(i) ハイブリドーマ細胞系 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生された抗体、(i i) ハイブリドーマ細胞系 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生された抗体、および (i i i) ハイブリドーマ細胞系 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生された抗体のうちのいずれか1つの軽鎖定常領域配列に対して少なくとも80%同一である軽鎖定常領域を含む。

【0284】

非限定的な例示的抗体としては、本明細書に開示されるもの、例えば、限定されるものではないが、

(a)

【化55】

FLEEIRLSLESGQDVKLSGF;

(b)

【化56】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV;

(c)

10

20

30

40

50

【化 5 7】

RTGRNPOTGAEIQIAASKVP;

(d)

【化 5 8】

TLSAKEIENMVKDILEFISQ;

(e)

【化 5 9】

RGFGSFSLHHRQPRLGRNPK;

10

(f)

【化 6 0】

FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV;

(g)

【化 6 1】

KKQAKAALEATLDAITASLKEG;

(h)

【化 6 2】

VNERAARTGRNPOTGAEIQIAA;

20

(i) アミノ酸配列 N P X T を含むポリペプチド、または

(j) (a) から (i) の等価物

を含む開示されるポリペプチド断片に対して生成されたものが挙げられ、ここで、等価物は、それらに対して少なくとも約 80 % の相同性もしくはアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列、または高ストリンジェンシーの条件下でアミノ酸配列もしくはその相補体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸を含み、ここで、高ストリンジェンシーの条件は、約 55 °C ~ 約 68 °C のインキュベーション温度；約 1 × S S C ~ 約 0.1 × S S C の緩衝液濃度；約 55 % ~ 約 75 % のホルムアミド濃度；および約 1 × S S C、0.1 × S S C の洗浄溶液または脱イオン水を含む。

30

【0285】

本開示は、抗体断片（例えば、F a b 断片または抗原結合性断片）を提供する。本開示は、F a b 断片または抗原結合性断片（例えば、F a b 断片）のアミノ酸配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる単離されたポリペプチドであって、断片またはポリペプチドが、D N A B I I タンパク質もしくはポリペプチドを含む D N A B I I ポリペプチドおよび／もしくはバイオフィルム構成要素に結合するか、ならびに／またはそれを特異的に認識する、単離されたポリペプチドも提供する。

40

【0286】

本開示は、重鎖（H C）可変ドメイン配列および軽鎖（L C）可変ドメイン配列を含む単離された抗体であって、重鎖および軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、D N A B I I タンパク質のエピトープに結合する抗原結合性部位を形成する、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態では、抗体またはその断片は、D N A B I I ペプチド（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のチップ領域、I H F A もしくは I H F B のチップ領域、および／またはチップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む D N A B I I ペプチドのチップ領域；ならびに／あるいは限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A もしくは I H F B のテール領域、および／

50

またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I を含む D N A B I I ペプチドのテール領域など)に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片は、テールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I に結合する。

【0287】

一態様では、配列番号 1 ~ 6、13、24 もしくは 26 のアミノ酸 (a a) 25 ~ a a 144 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および/あるいは配列番号 7 ~ 9、14 もしくは 25 の a a 21 ~ a a 132、配列番号 10 ~ 12 もしくは 27 の a a 21 ~ a a 126 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。

10

【0288】

さらなる態様では、配列番号 1 ~ 6、13、24 もしくは 26 の a a 25 ~ a a 473 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖 (H C); および/あるいは配列番号 7 ~ 9、14 もしくは 25 の a a 21 ~ a a 239、配列番号 10 ~ 12 もしくは 27 の a a 21 ~ a a 233 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖 (L C) を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が提供される。

20

【0289】

またさらなる態様では、配列番号 1 ~ 6、13、24 もしくは 26 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖 (H C); および/あるいは配列番号 7 ~ 12、14、25 もしくは 27 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖 (L C) を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が提供される。

【0290】

別の態様では、配列番号 1 ~ 6、13、24 もしくは 26 のアミノ酸 (a a) 25 ~ 144 の群から選択される配列、またはそれらの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および/あるいは配列番号 6 ~ 9、14 もしくは 25 の a a 21 ~ a a 132、配列番号 10 ~ 12 もしくは 27 の a a 21 ~ a a 126 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。

30

【0291】

また別の態様では、配列番号 1 ~ 6、13、24 もしくは 26 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか 1 つまたはいずれか 2 つまたは 3 つすべての C D R; および/あるいは配列番号 7 ~ 12、14、25 もしくは 27 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか 1 つまたはいずれか 2 つまたは 3 つすべての C D R を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。

40

【0292】

別の態様では、配列番号 13、24 もしくは 26 の a a 25 ~ a a 144 の群から選択される配列、またはそれらの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および配列番号 14 もしくは 25 の a a 21 ~ a a 132、配列番号 27 の a a 21 ~ a a 126 の群から選択される配列、またはそれらの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖 (L

50

C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号1～6、13、24もしくは26のaa25～aa144の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列；および／あるいは配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。

10

【0293】

配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片も提供される。別の態様では、配列番号2のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、または代替的にそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体またはその断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号3のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。

20

30

【0294】

またさらなる態様では、配列番号4のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。配列番号5のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはまたそれからなる抗体およびその抗原結合性断片も提供される。配列番号6のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7～9、14もしくは25のaa21～aa132、配列番号10～12

40

50

もしくは27のaa21～aa126のうちのいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片がまたさらに提供される。

【0295】

別の態様では、配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体またはその抗原結合性断片が本明細書に提供される。配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号8のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその抗原結合性断片がまたさらに提供される。別の態様では、配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号9のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその抗原結合性断片も提供される。

【0296】

さらなる態様では、配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号10のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその抗原結合性断片も提供される。配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号11のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメインを含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体およびその抗原結合性断片も提供される。配列番号1～6、13、24もしくは26のうちのいずれか1つのaa25～aa144のアミノ酸配列、またはそれらのそれぞれの等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号12のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含む軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体およびその抗原結合性断片も提供される。

【0297】

一態様では、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7のaa21～aa132のアミ

ノ酸配列またはその等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一実施形態では、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号8のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が提供される。別の実施形態では、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号9のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー（chimer）（すなわち、チップキマー（chimer）に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。

10

【0298】

別の態様では、配列番号2のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、それからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。別の態様では、配列番号2のaa25～aa144のアミノ酸配列もしくはその等価物を含む重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号8のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。さらなる別の態様では、配列番号2のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号9のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー（chimer）（すなわち、チップキマー（chimer）に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。

20

30

【0299】

別の態様では、配列番号3のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号7のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号3のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号8のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列

40

50

を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一実施形態では、配列番号3のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号9のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含む軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー（chimer）（すなわち、チップキマー（chimer））に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。

【0300】

配列番号4のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号10のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片も提供される。別の態様では、配列番号4のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号11のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号4のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号12のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗テールキマー（chimer）（すなわち、テールキマー（chimer））に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。

【0301】

一実施形態では、配列番号5のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号10のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。別の実施形態では、配列番号5のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号11のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号5のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号12のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗テールキマー（chimer）（すなわち、テールキマー（chimer））に

特異的に結合し、それを特異的に認識する)である。

【0302】

別の実施形態では、配列番号6のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号10のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一態様では、配列番号6のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号11のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一実施形態では、配列番号6のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号12のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはそれからなる抗体およびその抗原結合性断片が本明細書に提供される。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗テールキマー(chimer)(すなわち、テールキマー(chimer))に特異的に結合し、それを特異的に認識する)である。

【0303】

一態様では、配列番号24のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および/あるいは配列番号25のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、DNABIIペプチドのチップ領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHFBのチップ領域、および/またはチップキメラペプチドIhfA5-mIhfB4NTHIを含む)に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、チップキメラペプチドIhfA5-mIhfB4NTHIに結合する。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー(chimer)(すなわち、チップキマー(chimer))に特異的に結合し、それを特異的に認識する)である。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および/あるいは配列番号7のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列、および/あるいは配列番号8のaa21～aa132のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的な

るか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号9のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号7のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号8のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号9のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号7のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号8のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号9のa a 2 1～a a 1 3 2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

【0304】

別の態様では、配列番号26のa a 2 5～a a 1 4 4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および配列番号27のa a 2 1～a a 1 2 6のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、D N A B I I ペプチドのテール領域（限定されるものではないが、I H F もしくはH U のテール領域、I H F A もしくはI H F B のテール領域、および／またはテールキメラペプチドI h f A 3 - I h f B 2 N T H I を含む

50

から本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号6のaa25～aa144のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／あるいは配列番号12のaa21～aa126のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

【0305】

一態様では、配列番号24のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号25のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、DNABIIペプチドのチップ領域（限定されるものではないが、IHfもしくはHUのチップ領域、IHfAもしくはIHfBのチップ領域、および／またはチップキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H Iを含む）に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、チップキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H Iに結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー（chimer）（すなわち、チップキマー（chimer）に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号7のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号8のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号1のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号9のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号7のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号8のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号2のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号9のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号7のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号8のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号3のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号9のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。
【0306】

10

20

30

40

50

別の態様では、配列番号26のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および配列番号27のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、DNABIIPeptidのテール領域（限定されるものではないが、IHFMもしくはHUのテール領域、IHFAもしくはIHFBのテール領域、および／またはテールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む）に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、テールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iに結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗テールキマー（chimer）（すなわち、テールキマー（chimer）に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号10のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号11のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号4のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号12のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号5のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号10のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号5のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号11のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいは

またさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 5 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 1 2 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 6 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 1 0 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 6 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 1 1 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 6 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 1 2 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

10

20

【0307】

一態様では、配列番号 2 4 の a a 2 5 ~ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 2 5 の a a 2 1 ~ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、D N A B I I ペプチドのチップ領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のチップ領域、I H F A もしくは I H F B のチップ領域、および／またはチップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む）に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I に結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー（chimer）（すなわち、チップキマー（chimer））に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 1 の a a 2 5 ~ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 7 の a a 2 1 ~ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 1 の a a 2 5 ~ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 8 の a a 2 1 ~ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 1 の a a 2 5 ~ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 9 の a a 2 1 ~ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 2 の a a 2 5 ~

30

40

50

a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、
 またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 7 の a a 2 1 ～
 a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、
 またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、
 またはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番
 号 2 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから
 本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番
 号 8 の a a 2 1 ～ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから
 本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれか
 ら本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体また
 はその断片は、配列番号 2 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含
 むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、お
 よび／あるいは配列番号 9 の a a 2 1 ～ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含
 むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含
 むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態
 では、抗体またはその断片は、配列番号 3 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列または
 その等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重
 鎖（H C）、および／あるいは配列番号 7 の a a 2 1 ～ a a 2 3 9 のアミノ酸配列または
 その等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽
 鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる
 。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 3 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のア
 ミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさら
 にそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 8 の a a 2 1 ～ a a 2 3 9 のア
 ミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさら
 にそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまた
 さらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 3 の a a
 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的にな
 るか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列番号 9 の a a
 2 1 ～ a a 2 3 9 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的にな
 るか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれから本質的に
 なるか、あるいはまたさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

【0308】

別の態様では、配列番号 26 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物
 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）
 、および配列番号 27 の a a 2 1 ～ a a 2 3 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか
 、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか
 、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断
 片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、D N A B I I ペプチド
 のテール領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A
 もしくは I H F B のテール領域、および／またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h
 f B 2 N T H I を含む）に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、テールキ
 メラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I に結合する。一部の実施形態では、抗体ま
 たは抗原結合性断片は、抗テールキマー（c h i m e r）（すなわち、テールキマー（c
 h i m e r））に特異的に結合し、それを特異的に認識する）である。またさらなる実施形
 態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列
 番号 4 の a a 2 5 ～ a a 4 7 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれか
 ら本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（H C）、および／あるいは配列
 番号 10 の a a 2 1 ～ a a 2 3 3 のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれ
 から本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（L C）を含むか、あるいはそれ
 から本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体また

はその断片は、配列番号4のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号11のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号4のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号12のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号5のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号10のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号5のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号11のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号5のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号12のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号6のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号10のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号6のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号11のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。また別の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号6のaa25～aa473のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる重鎖（HC）、および／あるいは配列番号12のaa21～aa233のアミノ酸配列またはその等価物を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる軽鎖（LC）を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

【0309】

一態様では、配列番号1～3もしくは24の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか1つまたはいずれか2つまたは3つすべてのCDR；および／あるいは配列番号7～9もしくは25の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか1つまたはいずれか2つまたは3つすべてのCDRを含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、DNABIIPептиドのチップ領域（限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHF Aもしくはは

I H F B のチップ領域、および／またはチップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む) に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I に結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗チップキマー (chimer) (すなわち、チップキマー (chimer) に特異的に結合し、それを特異的に認識する) である。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、配列番号 1 ~ 3 もしくは 2 4 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物の 3 つすべての C D R ; および／あるいは配列番号 7 ~ 9 もしくは 2 5 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物の 3 つすべての C D R を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。

10

【0310】

別の実施形態では、配列番号 4 ~ 6 もしくは 2 6 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか 1 つまたはいずれか 2 つまたは 3 つすべての C D R ; および／あるいは配列番号 1 0 ~ 1 2 もしくは 2 7 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物のいずれか 1 つまたはいずれか 2 つまたは 3 つすべての C D R を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。さらなる実施形態では、抗体またはその断片は、D N A B I I ペプチドのテール領域 (限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A もしくは I H F B のテール領域、および／またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I を含む) に結合する。一実施形態では、抗体またはその断片は、テールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I に結合する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、抗テールキマー (chimer) (すなわち、テールキマー (chimer) に特異的に結合し、それを特異的に認識する) である。またさらなる実施形態では、断片は、抗原結合性断片である。一実施形態では、配列番号 4 ~ 6 もしくは 2 6 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物の 3 つすべての C D R ; および／あるいは配列番号 1 0 ~ 1 2 もしくは 2 7 の群から選択される配列、またはそれらのそれぞれの等価物の 3 つすべての C D R を含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる抗体またはその断片が提供される。

20

【0311】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその断片は、1 つまたは複数のシグナルペプチドをさらに含む。一実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 1 ~ 6、1 3、2 4 もしくは 2 6 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸 (a a) 1 ~ a a 2 4 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。別の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 7 ~ 1 2、1 4、2 5 および 2 7 のうちのいずれか 1 つの a a 1 ~ a a 2 0 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。さらなる実施形態では、シグナルペプチドは、軽鎖可変領域のアミノ末端に位置する。加えて、または代替的に、同じシグナルペプチドまたは異なるシグナルペプチドが、重鎖可変領域のアミノ末端に位置する。

30

【0312】

本明細書に提供される抗体またはその断片は、単特異性または二特異性であってもよい。一実施形態では、抗体またはその断片は、三特異性、または四特異性、または五特異性である。加えて、または代替的に、抗体は、I g A (I g A 1 または I g A 2 など)、I g D、I g E、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 など)、または I g M 抗体の群から選択される。一実施形態では、抗体は、I g A 定常領域 (I g A 1 定常領域または I g A 2 定常領域など)、I g D 定常領域、I g E 定常領域、I g G 定常領域 (I g G 1 定常領域、I g G 2 定常領域、I g G 3 定常領域、または I g G 4 定常領域など)、または I g M 定常領域の群から選択される定常領域をさらに含む。

40

【0313】

ある特定の実施形態では、アミノ酸配列に対する等価物は、アミノ酸配列に対して少なくとも約 8 0 % (約 8 0 % ~ 1 0 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少な

50

くとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%を含む) のアミノ酸同一性を有するポリペプチドを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。加えて、または代替的に、アミノ酸配列に対する等価物は、高ストリンジエンシーの条件下でアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。さらなる実施形態では、アミノ酸配列に対する等価物は、アミノ酸配列に対して少なくとも約 80% (約 80%~100%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%を含む) の同一性のポリペプチドを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列 (抗体またはその断片、あるいは限定されるものではないが、配列番号 13、24 もしくは 26 の aa25~aa144、配列番号 14 もしくは 25 の aa21~aa132、配列番号 27 の aa21~aa126、配列番号 13、24 もしくは 26 の aa25~aa473、配列番号 14 もしくは 25 の aa21~aa239、配列番号 27 の aa21~aa233 を含む本明細書に開示される配列番号 1~14 および 24~26 のうちのいずれか 1 つもしくは複数、またはそれらの断片など) に対する等価物は、アミノ酸配列のうちの 1 つもしくは複数もしくはすべての CDR を含むポリペプチドを含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。加えて、または代替的に、ポリペプチドは、アミノ酸配列に対して少なくとも約 80% (約 80%~100%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%を含む) のアミノ酸同一性である。

【0314】

ある特定の実施形態では、アミノ酸配列に対する等価物、例えば、抗体、その断片、その相補性決定領域 (CDR)、または CDR 含有ポリペプチドは、CDR におけるアミノ酸配列に対するアミノ酸の相違を欠く。しかしながら、アミノ酸配列に対する等価物、例えば、抗体、その断片、その CDR、または CDR 含有ポリペプチドは、非 CDR 領域におけるアミノ酸配列と比較して、1 つまたは複数 (例えば、限定されるものではないが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 または 25) のアミノ酸の相違を含んでいてもよく、但し、CDR の三次元配置および／または CDR は、保持されている。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列に対して等価なポリペプチド、例えば、抗体、その断片、その CDR、または CDR 含有ポリペプチドは、アミノ酸配列に対して少なくとも約 80% (約 80%~100%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%を含む) のアミノ酸同一性であるが、但し、CDR の三次元配置および／または CDR は、保持されている。

【0315】

そのような非 CDR 領域の非限定的な例としては、フレームワーク領域 (FR)、定常領域、Fc 領域、pFc' 領域、定常重鎖 (CH) ドメイン (CH1、CH2、CH3 または CH4 など)、定常軽鎖 (CL) ドメイン、またはヒンジ領域が挙げられる。一実施形態では、そのようなアミノ酸の相違は、保存的アミノ酸置換であってもよく、および／または抗体、その断片、その CDR、もしくは CDR 含有ポリペプチドの三次元配置を変化させない。別の実施形態では、等価物は、CDR の境界において、例えば、CDR のアミノ末端、カルボキシル末端またはその両方の 1 個または 2 個のアミノ酸の保存的アミノ酸置換を含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0316】

一態様では、本明細書に開示される抗体またはその断片のCDRのうちの1つまたは複数（いずれか1つ、または2つ、または3つ、または4つ、または5つ、または6つのCDRなど）が提供される。一実施形態では、本明細書に開示される抗体またはその断片のCDRのうちの1つもしくは複数（いずれか1つ、または2つ、または3つ、または4つ、または5つ、または6つのCDRなど）を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRのセットが提供される。一実施形態では、本明細書に開示される可変領域のCDRL1、CDRL2およびCDRL3を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRのセットが提供される。さらなる実施形態では、本明細書に開示される可変領域のCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRのセットが提供される。またさらなる実施形態では、本明細書に開示される別の可変領域のCDRH1、CDRH2、CDRH3を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなるCDRのセットが提供される。ある特定の実施形態では、CDRセットは、パラトープを構成する。加えて、または代替的に、CDRセットは、DNABIIペプチド（限定されるものではないが、IHfもしくはHUのチップ領域、IHfAもしくはIHfBのチップ領域、チップーキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H I、IHfもしくはHUのテール領域、IHfAもしくはIHfBのテール領域、および／またはテールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む、チップ領域および／またはテール領域など）に特異的に結合する。さらなる実施形態では、本明細書に開示されるいずれか1つまたは複数のCDRを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる、抗体、その断片、またはそれらのそれぞれの等価物が提供される。またさらなる実施形態では、本明細書に開示されるCDRセットを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる、抗体、その断片、またはそれらのそれぞれの等価物が提供される。

【0317】

ある特定の実施形態では、抗チップキメラ抗体のCDRは、以下の表に示される配列番号1～3、7～9、13および14に示される。抗テールキマー（chimer）のCDRは、配列番号4～6および10～12に示される。ある特定の実施形態では、配列番号1～6、13、24または26のうちのいずれか1つのCDRH1は、それぞれ、配列番号1～6、13、24または26のアミノ酸（aa）50～aa57を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号1～6、13、24または26のうちのいずれか1つのCDRH2は、それぞれ、配列番号1～6、13、24または26のアミノ酸（aa）75～aa82を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号1～6、13、24または26のうちのいずれか1つのCDRH3は、それぞれ、配列番号1～6、13、24または26のアミノ酸（aa）121～aa133を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号7～9、14または25のうちのいずれか1つのCDRL1は、それぞれ、配列番号7～9、14または25のアミノ酸（aa）47～aa57を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号7～9、14または25のうちのいずれか1つのCDRL2は、それぞれ、配列番号7～9、14または25のアミノ酸（aa）75～aa77を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号7～9、14または25のうちのいずれか1つのCDRL3は、それぞれ、配列番号7～9、14または25のアミノ酸（aa）114～aa122を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号10～12または27のうちのいずれか1つのCDRL1は、それぞれ、配列番号10～12

または２７のアミノ酸（aa）４７～aa５２を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号１０～１２または２７のうちのいずれか１つのCDRL２は、それぞれ、配列番号１０～１２または２７のアミノ酸（aa）７０～aa７２を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号１０～１２または２７のうちのいずれか１つのCDRL３は、それぞれ、配列番号１０～１２または２７のアミノ酸（aa）１０９～aa１１６を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【表１２－１】

配列 番号	CD R1	CD R2	CDR3	可変領域
4	GFT FSR YG	ISS GG SY T	ERHG GDG YWY FDV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSW VRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYTDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCERHGGDGYWYFD VWGQGTMTVSS
5	GFT FSR YG	ISS GG SY T	ERHG GDG YWY FDV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSW VRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTYTDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCERHGGDGYWYFD VWGQGTMTVSS
6	GFT FSR YG	ISS GG SY T	ERHG GDG YWY FDV	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSRYGMSW RQAPGKGLEWVATISSGGSYTYTDSVKGRFTISRDN AKNLYLQMNSLKTEDTAVYYCERHGGDGYWYFDV WGQGTMTVSS

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

配列 番号	CD R1	CD R2	CDR3	可変領域
10	QDI SNY	YT S	QQG NPLR T	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DIS NYLNWYQQ KPGKAVKLLIYYT S R L HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYFC QQGNPLRT FGGGTKVEIK
11	QDI SNY	YT S	QQG NPLR T	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DIS NYLNWYQQ KPGKAVKLLIYYT S R L HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC QQGNPLRT FGGGTKVEIK
12	QDI SNY	YT S	QQG NPLR T	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ DIS NYLNWYQQ KPGQAVRLLIYYT S R L HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFAVYFC QQGNPLRT FGGGTKVEIK
1	GFT FRT YA	IG SD RR HT	VGPY DGY YGEF DY	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRTY AMSW VRQAPGKGLEWVAT IGSDRRHT YYPDSVKGRFTISR D NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VGPYDGY YGE FD YWGQGTILVTVSS
2	GFT FRT YA	IG SD RR HT	VGPY DGY YGEF DY	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRTY AMSW VRQAPGKGLEWVAT IGSDRRHT YYPDSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VGPYDGY YGE FD YWGQGTILVTVSS
3	GFT FRT YA	IG SD RR HT	VGPY DGY YGEF DY	EVKLVSQGAIEVKKPGASVKV SCKASGFTFRTY AMSW VRQAPGQRLEWVAT IGSDRRHT YYPDKFQGRVTITR D NAKNTLYMELSSLRSEDTAVYYC VGPYDGY YGE FDY WGQGTILVTVSS

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

配列 番号	CD R1	CD R2	CDR3	可変領域
7	QSL LDS DG KTF	LV S	WQG THFP YT	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTFL NWLQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYC WQGT HFPTFGQG TKLEIK
8	QSL LDS DG KTF	LV S	WQG THFP YT	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTFL NWLQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYC WQGT HFPTFGQG TKLEIK
9	QSL LDS DG KTF	LV S	WQG THFP YT	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSDGKTFL LNWLQQKPGQPPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYC WQGT HFPTFGQG TKLEIK

【0 3 1 8】

ある特定の実施形態では、以下の 2 つの表において特定される C D R が下記に提供される。

【表 1 3 - 1】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
1	V	C	AASGF	GFTF	GFTR	AASGF	GFTF	GFTR	GFTF	GFTF
	H	D	TFRTY	RTY	TY	TFRTY	RTY	TY	RTYA	RTY
	1	R	AMS	A		AMS	A			
		1								

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
		C	TIGSD	IGSD	GSDRR	TIGSD	IGSD	GSDRR	IGSDR	GSDR
		D	RRHTY	RRH	H	RRHTY	RRH	H	RHT	RH
		R		T			T			
		2								
		C	決定	決定	決定	決定	決定	決定	VGPY	VGPY
		D	されず	されず	されず	されず	されず	されず	DGY	DGY
		R							GEFD	GEFD
		3							Y	Y
2	V	C	AASGF	GFTF	GFTFR	AASGF	GFTF	GFTFR	GFTF	GFTF
	H	D	TFRTY	RTY	TY	TFRTY	RTY	TY	RTYA	RTY
	2	R	AMS	A		AMS	A			
	1									
		C	TIGSD	IGSD	GSDRR	TIGSD	IGSD	GSDRR	IGSDR	GSDR
		D	RRHTY	RRH	H	RRHTY	RRH	H	RHT	RH
		R		T			T			
		2								
		C	決定	決定	決定	決定	決定	決定	VGPY	VGPY
		D	されず	されず	されず	されず	されず	されず	DGY	DGY
		R							GEFD	GEFD
		3							Y	Y

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

S	E	Q	1	2	3	4	5	6	7	8
3	V	C	KASGF	GFTF	GFTFR	KASGF	GFTF	GFTFR	GFTF	GFTF
		H	TFRTY	RTY	TY	TFRTY	RTY	TY	RTYA	RTY
		R	AMS	A		AMS	A			
		1								
		C	TIGSD	IGSD	GSDRR	TIGSD	IGSD	GSDRR	IGSDR	GSDR
		D	RRHTY	RRH	H	RRHTY	RRH	H	RHTY	RH
		R		T			T			
		2								
		C	決定	決定	決定	決定	決定	決定	VGPY	VGPY
		D	されず	されず	されず	されず	されず	されず	DGY	DGY
		R							GEFD	GEFD
		3							Y	Y
7	V	C	RSSQS	QSL	RSSQS	RSSQS	QSL	RSSQS	QSL	QSL
		D	LLDSD	LDS	LLDSD	LLDSD	LDS	LLDSD	DSDG	DSDG
		R	GKTFL	DGK	GKTFL	GKTFL	DGK	GKTFL	KTF	KTF
		1	N	TF	N	N	TF	N		
		C	YLVSK	LVS	LVSKL	YLVSK	LVS	LVSKL	LVS	LVS
		D	LDS		DS	LDS		DS		
		R								
		2								
		C	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQGT
		D	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPY	HFPY
		R		YT			YT		T	T
		3								

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
8	V	C	RSSQS	QSL	RSSQS	RSSQS	QSL	RSSQS	QSL	QSL
	L	D	LLDSD	LDS	LLDSD	LLDSD	LDS	LLDSD	DSDG	DSDG
	2	R	GKTFL	DGK	GKTFL	GKTFL	DGK	GKTFL	KTF	KTF
	1	N	TF	TF	N	N	TF	N		
		C	YLVSK	LVS	LVS	YLVSK	LVS	LVS	LVS	LVS
		D	RDS		DS	RDS		DS		
		R								
		2								
		C	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQGT
		D	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPY	HFPY
		R		YT			YT		T	T
		3								
9	V	C	KSSQS	QSL	KSSQS	KSSQS	QSL	KSSQS	QSL	QSL
	L	D	LLDSD	LDS	LLDSD	LLDSD	LDS	LLDSD	DSDG	DSDG
	3	R	GKTFL	DGK	GKTFL	GKTFL	DGK	GKTFL	KTF	KTF
	1	N	TF	TF	N	N	TF	N		
		C	YLVSK	LVS	LVS	YLVSK	LVS	LVS	LVS	LVS
		D	LDS		DS	LDS		DS		
		R								
		2								

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
		C	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQG	WQGT	WQGT	WQGT
		D	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPYT	THFP	HFPYT	HFPY	HFPY
		R		YT			YT		T	T
		3								

10

SEQ: 配列番号

【表 1 4 - 1】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
4	V	C	AASGF	GFT	GFTF	AASGF	GFT	GFTF	GFTFSR	GFTFSR
	H	D	TFSRY	FSR	SRY	TFSRY	FSR	SRY	YG	Y
	1	R	GMS	YG		GMS	YG			
		1								
		C	TISSGG	ISSG	SSGG	TISSGG	ISSG	SSGG	ISSGGS	SSGGS
		D	SYTY	GSY	SY	SYTY	GSY	SY	YT	Y
		R		T			T			
		2								
		C	決定	決定	決定	決定	決定	決定	ERHGG	ERHGG
		D	されず	されず	されず	されず	されず	されず	DGYWY	DGYWY
		R							FDV	FDV
		3								
5	V	C	AASGF	GFT	GFTF	AASGF	GFT	GFTF	GFTFSR	GFTFSR
	H	D	TFSRY	FSR	SRY	TFSRY	FSR	SRY	YG	Y
	2	R	GMS	YG		GMS	YG			
		1								

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
		C	TISSGG	ISSG	SSGG	TISSGG	ISSG	SSGG	ISSGGS	SSGGS
		D	SYTY	GSY	SY	SYTY	GSY	SY	YT	Y
		R		T			T			
		2								
		C	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	ERHGG	ERHGG
		D							DGYWY	DGYWY
		R							FDV	FDV
		3								
6	V	C	TASGF	GFT	GFTF	TASGF	GFT	GFTF	GFTFSR	GFTFSR
	H	D	TFSRY	FSR	SRY	TFSRY	FSR	SRY	YG	Y
	3	R	GMS	YG		GMS	YG			
		1								
		C	TISSGG	ISSG	SSGG	TISSGG	ISSG	SSGG	ISSGGS	SSGGS
		D	SYTY	GSY	SY	SYTY	GSY	SY	YT	Y
		R		T			T			
		2								
		C	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	決定 されず	ERHGG	ERHGG
		D							DGYWY	DGYWY
		R							FDV	FDV
		3								

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
1 0	V L 1	C	RASQD	QDI	RASQ	RASQD	QDI	RASQ	QDISNY	QDISNY
		D	ISNYL	SNY	DISN	ISNYL	SNY	DISN		
		R 1	N		YLN	N		YLN		
		C	YYTSR	YTS	YTSR	YYTSR	YTS	YTSR	YTS	YTS
		D	LHS		LHS	LHS		LHS		
		R 2								
		C	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQGNP
		D	LRT	NPL	PLRT	LRT	NPL	PLRT	LRT	LRT
		R 3		RT			RT			
1 1	V L 2	C	RASQD	QDI	RASQ	RASQD	QDI	RASQ	QDISNY	QDISNY
		D	ISNYL	SNY	DISN	ISNYL	SNY	DISN		
		R 1	N		YLN	N		YLN		
		C	YYTSR	YTS	YTSR	YYTSR	YTS	YTSR	YTS	YTS
		D	LHS		LHS	LHS		LHS		
		R 2								
		C	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQGNP
		D	LRT	NPL	PLRT	LRT	NPL	PLRT	LRT	LRT
		R 3		RT			RT			

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

S			1	2	3	4	5	6	7	8
E										
Q										
1	V	C	RASQD	QDI	RASQ	RASQD	QDI	RASQ	QDISNY	QDISNY
2	L	D	ISNYL	SNY	DISN	ISNYL	SNY	DISN		
3	R	N			YLN	N		YLN		
		1								
		C	YYTSR	YTS	YTSR	YYTSR	YTS	YTSR	YTS	YTS
		D	LHS		LHS	LHS		LHS		
		R								
		2								
		C	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQG	QQGN	QQGNP	QQGNP
		D	LRT	NPL	PLRT	LRT	NPL	PLRT	LRT	LRT
		R		RT			RT			
		3								

10

20

SEQ:配列番号

【0319】

ある特定の実施形態では、対応する可変領域配列において、そのアミノ末端もしくはカルボキシル末端、またはその両方に、追加の1アミノ酸、または代替的に、2アミノ酸、または代替的に、3アミノ酸、または代替的に、4アミノ酸、または代替的に、5アミノ酸、または代替的に、6アミノ酸、または代替的に、7アミノ酸、または代替的に、8アミノ酸をさらに含む本明細書で特定されたCDRである代替CDRが提供される。加えて、または代替的に、対応する可変領域配列において、そのアミノ末端もしくはカルボキシル末端、またはその両方で切断された、1アミノ酸、または代替的に、2アミノ酸、または代替的に、3アミノ酸、または代替的に、4アミノ酸、または代替的に、5アミノ酸、または代替的に、6アミノ酸、または代替的に、7アミノ酸、または代替的に、8アミノ酸を有する本明細書で特定されたCDRである代替CDRが提供される。例えば、配列番号1のCDR1は、配列番号1のアミノ酸50～アミノ酸57であってもよい。しかしながら、配列番号1のCDR1はまた、配列番号1のアミノ酸42、または43、または44、または45、または46、または47、または48、または49、または50、または51、または52、または53、または54、または55、または56、または57、または58から開始することができる。さらに、配列番号1のCDR1は、配列番号1のアミノ酸49、または50、または51、または52、または53、または54、または55、または56、または57、または58、または59、または60、または61、または62、または63、または64、または65で終わることができ、但し、CDR1は、その開始後に終わる。加えて、または代替的に、CDRは、約1、または代替的に、約2、または代替的に、約3、または代替的に、約4、または代替的に、約5、または代替的に、約6、または代替的に、約7、または代替的に、約8、または代替的に、約9、または代替的に、約10、または代替的に、約11、または代替的に、約12、または代替

30

40

50

【 0 3 2 0 】

10

20

30

40

50

、それぞれ、配列番号 7～9 のそれぞれのアミノ酸 44～アミノ酸 59 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号 7～9 のうちのいずれか 1 つの CDR2 は、それぞれ、配列番号 7～9 のそれぞれのアミノ酸 74～アミノ酸 81 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号 7～9 のうちのいずれか 1 つの CDR3 は、それぞれ、配列番号 7～9 のそれぞれのアミノ酸 114 および 122 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号 10～12 のうちのいずれか 1 つの CDR1 は、それぞれ、配列番号 10～12 のそれぞれのアミノ酸 44～アミノ酸 54 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号 10～12 のうちのいずれか 1 つの CDR2 は、それぞれ、配列番号 10～12 のそれぞれのアミノ酸 79～アミノ酸 76 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、配列番号 10～12 のうちのいずれか 1 つの CDR3 は、それぞれ、配列番号 10～12 のそれぞれのアミノ酸 109 および 116 を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

【0323】

一態様では、本明細書に開示される抗体もしくはその断片の可変領域のうちの 1 つもしくは複数、および／または可変領域の等価物のうちの 1 つもしくは複数のうちの 1 つまたは複数が提供される。さらなる実施形態では、本明細書に開示される可変領域のうちのいずれか 1 つもしくはいずれか 2 つもしくはそれよりも多く、および／または可変領域の等価物のうちの 1 つもしくは複数を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる抗体、その断片、またはそれらのそれぞれの等価物が提供される。加えて、または代替的に、可変領域のうちの 1 つまたは複数、DNA BII ペプチド（限定されるものではないが、IHF もしくは HU のチップ領域、IHFA もしくは IHFB のチップ領域、チップーキメラペプチド IhfA5-mIhfB4_{NTHI}、IHF もしくは HU のテール領域、IHFA もしくは IHFB のテール領域、および／またはテールキメラペプチド IhfA3-IhfB2_{NTHI} を含む、チップ領域および／またはテール領域など）に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、可変領域は、以下：配列番号 1～6、13、24 および 26 のアミノ酸 (aa) 25～aa144；配列番号 7～9、14 および 25 の aa21～aa132；配列番号 10～12 または 27 の aa21～aa126；配列番号 1～6、13、24 および 26 のアミノ酸 24～アミノ酸 144；配列番号 7～12、14、25 および 27 のアミノ酸 20～アミノ酸 132；配列番号 7～12、14、25 および 27 のアミノ酸 20～アミノ酸 126 から選択される。

【0324】

さらなる実施形態では、可変領域またはその等価物は、配列番号で本明細書に提供される対応する配列において、そのアミノ末端もしくはカルボキシル末端、またはその両方に、追加の 1 アミノ酸、または代替的に、2 アミノ酸、または代替的に、3 アミノ酸、または代替的に、4 アミノ酸、または代替的に、5 アミノ酸、または代替的に、6 アミノ酸、または代替的に、7 アミノ酸、または代替的に、8 アミノ酸をさらに含む本明細書に開示される可変領域である。加えて、または代替的に、可変領域またはその等価物は、配列番号で本明細書に提供される対応する配列において、そのアミノ末端もしくはカルボキシル末端、またはその両方で切断された、1 アミノ酸、または代替的に、2 アミノ酸、または代替的に、3 アミノ酸、または代替的に、4 アミノ酸、または代替的に、5 アミノ酸、または代替的に、6 アミノ酸、または代替的に、7 アミノ酸、または代替的に、8 アミノ酸を有する本明細書に開示される可変領域である。例えば、配列番号 1 は、配列番号 1 のアミノ酸 50～アミノ酸 57 であってもよい。しかしながら、配列番号 1 のアミノ酸 24～アミノ酸 144 からなる可変領域に関する可変領域またはその等価物はまた、配列番号 1 のアミノ酸 16、または 17、または 18、または 19、または 20、または 21、または 22、または 23、または 24、または 25、または 26、または 27、または 28、または 29、または 30、または 31、または 32 から開始することができる。さらに、

配列番号 1 のアミノ酸 24～アミノ酸 144 からなる可変領域に関する可変領域またはその等価物は、配列番号 1 のアミノ酸 136、または 137、または 138、または 139、または 140、または 141、または 142、または 143、または 144、または 145、または 146、または 147、または 148、または 149、または 150、または 151、または 152 で終わることができ、但し、可変領域は、その開始後に終わる。加えて、または代替的に、可変領域は、約 90 アミノ酸長～約 200 アミノ酸長、例えば、約 100 アミノ酸長、または代替的に、約 110 アミノ酸長、または代替的に、約 120 アミノ酸長、または代替的に、約 130 アミノ酸長、または代替的に、約 140 アミノ酸長、または代替的に、約 150 アミノ酸長、または代替的に、約 160 アミノ酸長、または代替的に、約 170 アミノ酸長、または代替的に、約 180 アミノ酸長、または代替的に、約 190 アミノ酸長、または代替的に、約 200 アミノ酸長である。

10

【0325】

加えて、または代替的に、抗体またはその断片に対する等価物は、可変ドメイン以外の領域（本明細書で非 V H 領域と称される）における抗体またはその断片と比較して、1 つまたは複数（例えば、限定されるものではないが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 または 25）のアミノ酸の相違を含む。そのような非 V H 領域としては、限定されるものではないが、定常領域、F c 領域、p F c ' 領域、定常重鎖（C H）ドメイン（C H 1、C H 2、C H 3 または C H 4 など）、定常軽鎖（C L）ドメイン、またはヒンジ領域が挙げられる。本明細書に開示される抗体、その断片、またはそれらのそれぞれの等価物は、非 V H 領域においてさらに改変され（重鎖の軽鎖とのアセンブリーを増加させるため、検出可能なマーカーもしくは精製マーカーまたは薬物に直接的にまたは間接的にコンジュゲートするため、相補体の活性化を増加させるまたは減少させるため、抗体依存性細胞傷害性（A D C C）を増強するまたは低減するため、あるいは免疫細胞の活性化および動員を増加させるまたは減少させるためなど）、さらなる等価物を提供し得ることが当業者によって理解されるであろう。

20

【0326】

ある特定の実施形態では、等価物は、アミノ末端もしくはカルボキシル末端、またはその両方のいずれかに、最大で 50 個、または代替的に、最大で 30 個、または代替的に、最大で 25 個、または代替的に、最大で 20 個、または代替的に、最大で 15 個、または代替的に、最大で 10 個、または代替的に、最大で 5 個のランダムなアミノ酸をさらに含む。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列に対する等価物は、アミノ末端もしくはカルボキシル末端またはその両方で切断されたアミノ酸配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20 または 25 個のアミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。そのような付加または切断は、C D R の三次元配置、および／または抗体、その断片、その C D R、もしくは C D R 含有ポリペプチドの三次元配置を変化させることはできない。

30

【0327】

ある特定の実施形態では、抗体またはその断片は、V H のアミノ末端および／または V L のアミノ末端にシグナルペプチドを含む。一実施形態では、V H シグナルペプチドは、V L シグナルペプチドと異なる。別の実施形態では、V H シグナルペプチドは、V L シグナルペプチドと比較して、同じである。さらなる実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1～24 のアミノ酸配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。またさらなる実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 7 のアミノ酸 1～20 のアミノ酸配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。ある特定の実施形態では、抗体またはその断片に対する等価物は、抗体のシグナルペプチドとは異なるシグナルペプチドを含み、但し、等価物のシグナルペプチドは、V H および／または V L を、抗体のシグナルペプチドと同じ細胞の場所に方向付ける。

40

【0328】

50

ある特定の実施形態では、抗体またはその断片に対する等価物は、抗体または断片の機能活性の少なくとも50%（少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%など）を保持するか、またはそのうちの1つもしくは複数改善する。そのような機能活性としては、限定されるものではないが、DNABIIペプチド（限定されるものではないが、IHfもしくはHUのチップ領域、IHfAもしくはIHfBのチップ領域、チップキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H I、IHfもしくはHUのテール領域、IHfAもしくはIHfBのテール領域、および／またはテールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む、チップ領域および／またはテール領域など）に対する結合特異性、結合アビディティーおよび／または親和性、in vivoもしくはin vitroでのバイオフィルムの形成を防止すること、またはin vivoもしくはin vitroでバイオフィルムを破壊することが挙げられる。そのような機能活性を定量化する方法は、実施例に示される。

10

【0329】

さらなる態様では、エピトープへの結合について本明細書に開示される抗体またはその断片と競合する抗体またはその断片が提供される。抗体またはその断片は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／またはヒト化抗体であってもよい。

【0330】

一態様では、抗体は、二特異性抗体、または三特異性、四特異性もしくは五特異性抗体である。さらなる態様では、抗体は、IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM抗体である。別の態様では、抗体は、IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM定常領域から選択される定常領域をさらに含む。具体的な態様では、定常領域は、IgG1定常領域である。別の態様では、エピトープへの結合について本明細書に開示される抗体と競合する抗体が本明細書に提供される。これらは、従来の技法、例えば競合的ELISAを使用して特定することができる。

20

【0331】

本明細書に開示される抗体は、ポリクローナル、モノクローナルまたはヒト化であり得る。一態様では、抗体は、DNABIIポリペプチドの「チップ」領域、例えば、HUまたはIHf（Ih f AおよびIh f Bなど）に結合する。さらなる態様では、抗体は、DNABIIポリペプチドの「テール」領域、例えば、HUまたはIHf（Ih f AおよびIh f Bなど）に結合する。上記で述べたように、本開示は、抗原結合性断片を提供する。抗原結合性断片は、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFvまたはFvのうちのいずれか1つであり、これは、当業者に公知の従来の技法を使用して調製することができる。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、可溶性Fabである。別の態様では、本開示は、本明細書に開示される抗体のFab断片であって、抗体が、DNABIIペプチドのチップ領域（限定されるものではないが、IHfもしくはHUのチップ領域、IHfAもしくはIHfBのチップ領域、および／またはチップキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H Iを含む）に特異的に結合する、Fab断片を提供する。本開示の一態様では、DNABIIは、IHfペプチドまたはHUペプチドである。具体的な態様では、DNABIIは、IHfペプチドである。

30

40

【0332】

上記で述べたように、本開示は、抗体および抗原結合性断片に対する等価物を提供する。等価物は、ポリペプチドに対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、または高ストリンジェンシーの条件下でポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含み得る。

【0333】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、500 ng/mL未満、または代替的に、250 ng/mL未満、または代替的に、200 ng/mL未満、または代替的に、150 ng/mL未満、または代替的に、

50

100 ng/mL未満、または代替的に、90 ng/mL未満、または代替的に、80 ng/mL未満、または代替的に、70 ng/mL未満、または代替的に、65 ng/mL未満、または代替的に、60 ng/mL未満、または代替的に、55 ng/mL未満、または代替的に、50 ng/mL未満、または代替的に、45 ng/mL未満、または代替的に、40 ng/mL未満、または代替的に、35 ng/mL未満、または代替的に、30 ng/mL未満の半数最大有効濃度（EC₅₀）で、DNABIIタンパク質（限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHFBのチップ領域、チップーキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H I、IHFもしくはHUのテール領域、IHFAもしくはIHFBのテール領域、および／またはテールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む）に結合する。さらなる実施形態では、そのようなEC₅₀は、実施例において示されるELISA方法を使用して決定される。

10

【0334】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} M未満の平衡定数K_Dで、DNABIIタンパク質（限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHFBのチップ領域、チップーキメラペプチドIh f A 5 - m I h f B 4 N T H I、IHFもしくはHUのテール領域、IHFAもしくはIHFBのテール領域、および／またはテールキメラペプチドIh f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む）に結合する。一実施形態では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、1000 nM未満、または代替的に、900 nM未満、または代替的に、800 nM未満、または代替的に、700 nM未満、または代替的に、600 nM未満、または代替的に、500 nM未満、または代替的に、400 nM未満、または代替的に、300 nM未満、または代替的に、200 nM未満、または代替的に、100 nM未満、または代替的に、90 nM未満、または代替的に、80 nM未満、または代替的に、70 nM未満、または代替的に、60 nM未満、または代替的に、50 nM未満、または代替的に、40 nM未満、または代替的に、30 nM未満、または代替的に、20 nM未満、または代替的に、15 nM未満、または代替的に、10 nM未満、または代替的に、9 nM未満、または代替的に、8 nM未満、または代替的に、7 nM未満、または代替的に、6 nM未満、または代替的に、5 nM未満、または代替的に、4 nM未満、または代替的に、3 nM未満、または代替的に、2 nM未満、または代替的に、1 nM未満のK_Dで、DNABIIタンパク質に結合する。一実施形態では、そのようなK_Dは、実施例に示される表面プラズモン共鳴（SPR）方法を使用して決定される。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗原結合性部位は、DNABIIタンパク質に特異的に結合する。

20

30

【0335】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、 1.0×10^{-2} 秒⁻¹未満、または代替的に、 9.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 8.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 7.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 6.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 5.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 4.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 3.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 2.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 1.0×10^{-3} 秒⁻¹未満、または代替的に、 9.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 8.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 7.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 6.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 5.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 4.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 3.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 2.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 1.0×10^{-4} 秒⁻¹未満、または代替的に、 9.0×10^{-5} 秒⁻¹未満、または代替的に、 8.0×10^{-5} 秒⁻¹未満、または代替的に、 7.0×10^{-5} 秒⁻¹未満、または代替的に、 6.0×10^{-5} 秒⁻¹未満、または代替的に、 5.0×10^{-5} 秒⁻¹未満、または代替的に、 4.0×10^{-5} 秒⁻¹未満

40

50

、または代替的に、 $3.0 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $2.0 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 未満の K_{off} で、DNA BII タンパク質（限定されるものではないが、IH FもしくはH Uのチップ領域、IH F AもしくはIH F Bのチップ領域、チップーキメラペプチド $I h f A 5 - m I h f B 4_{NTHI}$ 、IH FもしくはH Uのテール領域、IH F AもしくはIH F Bのテール領域、および／またはテールキメラペプチド $I h f A 3 - I h f B 2_{NTHI}$ を含む）に結合する。一実施形態では、そのような K_{off} は、実施例に示される表面プラズモン共鳴（SPR）方法を使用して決定される。

【0336】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、 $9.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $8.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $7.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $6.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $5.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $4.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $3.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $2.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $9.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $8.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $7.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $6.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $5.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $4.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $3.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $2.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $9.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $8.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $7.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $6.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $4.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $3.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $9.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $8.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $7.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $6.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $3.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満、または代替的に、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 未満の K_{on} で、DNA BII タンパク質（限定されるものではないが、IH FもしくはH Uのチップ領域、IH F AもしくはIH F Bのチップ領域、チップーキメラペプチド $I h f A 5 - m I h f B 4_{NTHI}$ 、IH FもしくはH Uのテール領域、IH F AもしくはIH F Bのテール領域、および／またはテールキメラペプチド $I h f A 3 - I h f B 2_{NTHI}$ を含む）に結合する。一実施形態では、そのような K_{on} は、実施例に示される表面プラズモン共鳴（SPR）方法を使用して決定される。

【0337】

本発明の一部の態様では、 $I h f A 5 - m I h f B 4_{NTHI}$ チップキメラペプチドについての結合定数 K_A ($1/M$) は、約 $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ である。別の態様では、 K_A は、約 $3 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 、または代替的に、約 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 、代替的に約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 、代替的に約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 、代替的に約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 、代替的に約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^10$ である。

【0338】

別の態様では、 $I h f A 5 - m I h f B 4_{NTHI}$ チップキメラペプチドについての解離定数 K_D (M) は、約 $5 \times 10^{-9} \sim 3 \times 10^{-6}$ 、または代替的に、約 $1 \times 10^{-9} \sim$

1 E - 0 6、または代替的に、約 1 E - 0 8 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 7 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 6 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 9 ~ 約 1 E - 0 8、または代替的に、約 1 E - 0 8 ~ 約 1 E - 0 7、または代替的に、約 1 E - 9 ~ 約 1 E - 0 8、または代替的に、約 1 E - 1 0 ~ 約 1 E - 0 9、または代替的に、約 1 E - 1 1 ~ 約 1 E - 1 0 である。

【0339】

一態様では、I h f A 3 - I h f B 2 N T H I テールキメラペプチドについての K_A (1 / M) は、約 7 E + 0 6 ~ 約 2 E + 0 9、または代替的に、約 1 E + 0 5 ~ 約 1 E + 0 8、または代替的に、約 1 E + 0 6 ~ 約 1 E + 0 8、または代替的に、約 1 E + 0 7 ~ 約 1 E + 0 8、または代替的に、約 1 E + 0 4 ~ 約 1 E + 0 9、代替的に、約 1 E + 0 5 ~ 約 1 E + 0 9、代替的に、約 1 E + 0 6 ~ 約 1 E + 0 9、代替的に、約 1 E + 0 7 ~ 約 1 E + 0 9、代替的に、約 1 E + 0 8 ~ 約 1 E + 0 9、代替的に、約 1 E + 0 4 ~ 約 1 E + 0 9、または代替的に、約 1 E + 0 3 ~ 約 1 E + 1 0、または代替的に、約 1 E + 0 3 ~ 約 1 E + 1 1、または代替的に、約 1 E + 0 3 ~ 約 1 E + 1 2、または代替的に、約 1 E + 0 9 ~ 約 1 E + 1 0、または代替的に、約 1 E + 1 0 ~ 約 1 E + 1 1、または代替的に、約 1 E + 1 1 ~ 約 1 E + 1 2 である。

【0340】

別の態様では、I h f A 3 - I h f B 2 N T H I テールキメラペプチドについての K_D (M) は、約 6 E - 1 0 ~ 約 2 E - 0 7、または代替的に、約 1 E - 0 9 ~ 約 1 E - 0 6、または代替的に、約 1 E - 0 8 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 7 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 6 ~ 約 1 E - 0 5、または代替的に、約 1 E - 0 9 ~ 約 1 E - 0 8、または代替的に、約 1 E - 0 8 ~ 約 1 E - 0 7、または代替的に、約 1 E - 9 ~ 約 1 E - 0 8、または代替的に、約 1 E - 1 0 ~ 約 1 E - 0 9、または代替的に、約 1 E - 1 1 ~ 約 1 E - 1 0、または代替的に、約 1 E - 1 1 ~ 約 1 E - 1 2 である。

【0341】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、D N A B I I タンパク質のチップ領域 (限定されるものではないが、I H F もしくは H U のチップ領域、I H F A もしくは I H F B のチップ領域、および / またはチップ - キメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む) に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたは C D R は、少なくとも約 1 0 %、または代替的に、少なくとも約 1 5 %、または代替的に、少なくとも約 2 0 %、または代替的に、少なくとも約 2 5 %、または代替的に、少なくとも約 3 0 %、または代替的に、少なくとも約 3 5 %、または代替的に、少なくとも約 4 0 %、または代替的に、少なくとも約 4 5 %、または代替的に、少なくとも約 5 0 %、または代替的に、少なくとも約 5 5 %、または代替的に、少なくとも約 6 0 %、または代替的に、少なくとも約 6 5 %、または代替的に、少なくとも約 7 0 %、または代替的に、少なくとも約 7 5 %、または代替的に、少なくとも約 8 0 %、または代替的に、少なくとも約 8 5 %、または代替的に、少なくとも約 9 0 %、または代替的に、少なくとも約 9 5 %、i n v i t r o でバイオフィルムのバイオマスを低減する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、D N A B I I タンパク質のテール領域 (限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A もしくは I H F B のテール領域、および / またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I を含む) に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたは C D R は、約 1 % 未満、または代替的に、約 2 % 未満、または代替的に、約 3 % 未満、または代替的に、約 4 % 未満、または代替的に、約 5 % 未満、または代替的に、約 6 % 未満、または代替的に、約 7 % 未満、または代替的に、約 8 % 未満、または代替的に、約 9 % 未満、または代替的に、約 1 0 % 未満、または代替的に、約 1 2 % 未満、または代替的に、約 1 5 % 未満、または代替的に、約 2 0 % 未満、または代替的に、約 2 5 % 未満、または代替的に、約 3 0 % 未満、または代替的に、約 3 5 % 未満、または代替的に、約 4 0 % 未満、または代替的に、約 4 5 % 未満、または代替的に、約 5 0 % 未満、i n v i t r o でバイオフィルムのバイオマスを低減する。一実施形態では、そのようなバイオマ

スの変化は、実施例 3 または 4 に示される方法を使用して決定される。

【0342】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNA B I I タンパク質のチップ領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のチップ領域、I H F A もしくは I H F B のチップ領域、および／またはチップーキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む）に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたは C D R は、少なくとも約 10 %、または代替的に、少なくとも約 15 %、または代替的に、少なくとも約 20 %、または代替的に、少なくとも約 25 %、または代替的に、少なくとも約 30 %、または代替的に、少なくとも約 35 %、または代替的に、少なくとも約 40 %、または代替的に、少なくとも約 45 %、または代替的に、少なくとも約 50 %、または代替的に、少なくとも約 55 %、または代替的に、少なくとも約 60 %、または代替的に、少なくとも約 65 %、または代替的に、少なくとも約 70 %、または代替的に、少なくとも約 75 %、または代替的に、少なくとも約 80 %、または代替的に、少なくとも約 85 %、または代替的に、少なくとも約 90 %、または代替的に、少なくとも約 91 %、または代替的に、少なくとも約 92 %、または代替的に、少なくとも約 93 %、または代替的に、少なくとも約 94 %、または代替的に、少なくとも約 95 %、または代替的に、少なくとも約 96 %、または代替的に、少なくとも約 97 %、または代替的に、少なくとも約 98 %、または代替的に、少なくとも約 99 %、対象において細菌負荷を低減する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNA B I I タンパク質のテール領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A もしくは I H F B のテール領域、および／またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I を含む）に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたは C D R は、約 1 % 未満、または代替的に、約 2 % 未満、または代替的に、約 3 % 未満、または代替的に、約 4 % 未満、または代替的に、約 5 % 未満、または代替的に、約 6 % 未満、または代替的に、約 7 % 未満、または代替的に、約 8 % 未満、または代替的に、約 9 % 未満、または代替的に、約 10 % 未満、または代替的に、約 12 % 未満、または代替的に、約 15 % 未満、または代替的に、約 20 % 未満、または代替的に、約 25 % 未満、または代替的に、約 30 % 未満、または代替的に、約 35 % 未満、または代替的に、約 40 % 未満、または代替的に、約 45 % 未満、または代替的に、約 50 % 未満、対象において細菌負荷を低減する。一実施形態では、そのような細菌負荷の変化は、実施例に示される方法を使用して決定される。

【0343】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNA B I I タンパク質のチップ領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のチップ領域、I H F A もしくは I H F B のチップ領域、および／またはチップーキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I を含む）に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたは C D R は、少なくとも約 10 %、または代替的に、少なくとも約 15 %、または代替的に、少なくとも約 20 %、または代替的に、少なくとも約 25 %、または代替的に、少なくとも約 30 %、または代替的に、少なくとも約 35 %、または代替的に、少なくとも約 40 %、または代替的に、少なくとも約 45 %、または代替的に、少なくとも約 50 %、または代替的に、少なくとも約 55 %、または代替的に、少なくとも約 60 %、または代替的に、少なくとも約 65 %、または代替的に、少なくとも約 70 %、または代替的に、少なくとも約 75 %、または代替的に、少なくとも約 80 %、または代替的に、少なくとも約 85 %、または代替的に、少なくとも約 90 %、または代替的に、少なくとも約 91 %、または代替的に、少なくとも約 92 %、または代替的に、少なくとも約 93 %、または代替的に、少なくとも約 94 %、または代替的に、少なくとも約 95 %、または代替的に、少なくとも約 96 %、または代替的に、少なくとも約 97 %、または代替的に、少なくとも約 98 %、または代替的に、少なくとも約 99 %、中耳炎（O M）を有する対象における中耳閉塞を低減する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNA B I I タンパク質のテール領域（限定されるものではないが、I H F もしくは H U のテール領域、I H F A もしくは I H F B のテール領域、および／またはテールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I を

含む)に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、約1%未満、または代替的に、約2%未満、または代替的に、約3%未満、または代替的に、約4%未満、または代替的に、約5%未満、または代替的に、約6%未満、または代替的に、約7%未満、または代替的に、約8%未満、または代替的に、約9%未満、または代替的に、約10%未満、または代替的に、約12%未満、または代替的に、約15%未満、または代替的に、約20%未満、または代替的に、約25%未満、または代替的に、約30%未満、または代替的に、約35%未満、または代替的に、約40%未満、または代替的に、約45%未満、または代替的に、約50%未満、中耳炎(OM)を有する対象における中耳閉塞を低減する。一実施形態では、中耳閉塞のそのような変化は、実験OMモデルにおいて実施例に示される方法を使用して決定される。

10

【0344】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNABIIタンパク質のチップ領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHF Bのチップ領域、および/またはチップ-キメラペプチドIh f A 5-mIh f B 4 N T H Iを含む)に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、少なくとも約10%、または代替的に、少なくとも約15%、または代替的に、少なくとも約20%、または代替的に、少なくとも約25%、または代替的に、少なくとも約30%、または代替的に、少なくとも約35%、または代替的に、少なくとも約40%、または代替的に、少なくとも約45%、または代替的に、少なくとも約50%、または代替的に、少なくとも約55%、または代替的に、少なくとも約60%、または代替的に、少なくとも約65%、または代替的に、少なくとも約70%、または代替的に、少なくとも約75%、または代替的に、少なくとも約80%、または代替的に、少なくとも約85%、または代替的に、少なくとも約90%、または代替的に、少なくとも約91%、または代替的に、少なくとも約92%、または代替的に、少なくとも約93%、または代替的に、少なくとも約94%、または代替的に、少なくとも約95%、または代替的に、少なくとも約96%、または代替的に、少なくとも約97%、または代替的に、少なくとも約98%、または代替的に、少なくとも約99%、粘膜バイオフィルムを有する(OMを有するなど)対象における相対粘膜バイオフィルムスコアおよび/またはバイオマススコアを低減する。一実施形態では、DNABIIタンパク質のチップ領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHF Bのチップ領域、および/またはチップ-キメラペプチドIh f A 5-mIh f B 4 N T H Iを含む)に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、少なくとも約0.5、または代替的に、少なくとも約1、または代替的に、少なくとも約1.5、または代替的に、少なくとも約2、または代替的に、少なくとも約2.5、または代替的に、少なくとも約3、または代替的に、少なくとも約3.5、または代替的に、少なくとも約4、粘膜バイオフィルムを有する(OMを有するなど)対象における相対粘膜バイオフィルムスコアおよび/またはバイオマススコアを低減する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNABIIタンパク質のテール領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのテール領域、IHFAもしくはIHF Bのテール領域、および/またはテールキメラペプチドIh f A 3-Ih f B 2 N T H Iを含む)に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたはCDRは、約1%未満、または代替的に、約2%未満、または代替的に、約3%未満、または代替的に、約4%未満、または代替的に、約5%未満、または代替的に、約6%未満、または代替的に、約7%未満、または代替的に、約8%未満、または代替的に、約9%未満、または代替的に、約10%未満、または代替的に、約12%未満、または代替的に、約15%未満、または代替的に、約20%未満、または代替的に、約25%未満、または代替的に、約30%未満、または代替的に、約35%未満、または代替的に、約40%未満、または代替的に、約45%未満、または代替的に、約50%未満、粘膜バイオフィルムを有する(OMを有するなど)対象における相対粘膜バイオフィルムスコアおよび/またはバイオマススコアを低減する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、DNABIIタンパク質のテール領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのテール領域、IH

20

30

40

50

F AもしくはI H F Bのテール領域、および／またはテールキメラペプチドI h f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む)に結合する抗体、その断片、ポリペプチドまたはC D Rは、約0.1未満、または代替的に、約0.2未満、または代替的に、約0.3未満、または代替的に、約0.4未満、または代替的に、約0.5未満、または代替的に、約0.6未満、または代替的に、約0.7未満、または代替的に、約0.8未満、または代替的に、約0.9未満、または代替的に、約1未満、または代替的に、約1.5未満、または代替的に、約2未満、または代替的に、約2.5未満、粘膜バイオフィルムを有する(OMを有するなど)対象における相対粘膜バイオフィルムスコアおよび／またはバイオマススコアを低減する。一実施形態では、そのようなスコアは、実施例に示される方法を使用して決定される。

10

【0345】

ある特定の実施形態では、D N A B I Iタンパク質は、H UまたはI H Fである。さらなる実施形態では、D N A B I Iタンパク質は、I h f A、I h f B、またはその両方である。またさらなる実施形態では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはC D Rは、D N A B I Iタンパク質のチップ領域またはテール領域(限定されるものではないが、I H FもしくはH Uのチップ領域、I H F AもしくはI H F Bのチップ領域、チップーキメラペプチドI h f A 5 - m I h f B 4 N T H I、I H FもしくはH Uのテール領域、I H F AもしくはI H F Bのテール領域、および／またはテールキメラペプチドI h f A 3 - I h f B 2 N T H Iを含む)に結合する。一実施形態では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはC D Rは、I h f A 5 - m I h f B 4 N T H Iチップキメラペプチドに結合する。別の実施形態では、抗体、その断片、ポリペプチドまたはC D Rは、I h f A 3 - I h f B 2 N T H Iテールキメラペプチドに結合する。

20

【0346】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、可溶性F a bである。

【0347】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、H CおよびL C可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、H CおよびL C可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。

【0348】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、全長抗体である。

30

【0349】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、キメラまたはヒト化である。

【0350】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、F cドメインを含む。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、非ヒト動物、例えば、ラット、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコまたはウサギ抗体である。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、ヒトもしくはヒト化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。

【0351】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。L CおよびH C配列に融合され得るフレームワーク領域の例は、当技術分野において公知であり、そのような例は、配列番号15~23、またはそれらのそれぞれの等価物に提供される。

40

【0352】

他の態様では、本明細書に提供される抗体のC D Rにおける1つまたは複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換されている。置換は、アミノ酸の同じファミリー内の置換であるという意味で「保存的」であってもよい。天然に存在するアミノ酸は、以下の4つのファミリーに分けられてもよく、保存的置換は、これらのファミリー内で行われる。

1) 塩基性側鎖を有するアミノ酸：リシン、アルギニン、ヒスチジン。

2) 酸性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸。

3) 非荷電極性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン

50

、チロシン。

4) 非極性側鎖を有するアミノ酸：グリシン、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、システイン。

【0353】

別の態様では、1つまたは複数のアミノ酸残基が、抗体の1つまたは複数のCDRに付加されるか、またはそれから欠失される。そのような付加または欠失は、CDRのN末端もしくはC末端で、またはCDR内の位置で起こる。

【0354】

アミノ酸の付加、欠失または置換により抗体のCDRのアミノ酸配列を変化させることによって、標的抗原に対する増加した結合親和性などのさまざまな効果が得られ得る。

【0355】

そのような変化したCDR配列を含む本開示の抗体が、依然として、開示される抗体と類似の特異性および感受性プロファイルで、DNABIタンパク質に結合することが理解されるべきである。これは、ELISAまたはSPRなどの結合アッセイの方法によって試験することができる。

【0356】

さらなる態様では、抗体は、適切なアッセイおよびスクリーニングを使用して決定される、免疫優性および免疫保護性の両方であることによって特徴付けられる。

【0357】

別の態様では、抗体は、従来の技法によって改変することができ、これは、一態様では、抗体の半減期を増加させ得、例えば、ペグ化、PEGミメティック、ポリシアル化、HES化またはグリコシル化であり得る。

【0358】

抗体および抗原結合性断片は、検出可能なマーカーまたは精製マーカーをさらに含むことができる。

抗体およびその誘導体

【0359】

本開示は、本明細書に開示される方法における使用のための単離されたポリペプチドに結合する抗体、および／またはそれを特異的に認識し、それに特異的に結合する抗体も提供する。抗体は、本明細書に記載されるさまざまな抗体のいずれかであり得、そのような非限定的な例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ベニア化抗体、ダイアボディ、ヒト化抗体、抗体誘導体、組換えヒト化抗体、またはそれらのそれぞれの等価物（誘導体など）もしくは断片が挙げられる。一態様では、断片は、抗体のCDRを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。一態様では、抗体は、検出可能に標識されるか、またはそれにコンジュゲートされる検出可能な標識をさらに含む。

【0360】

本明細書に開示されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も提供される。上記の実施形態のうちの1つまたは複数を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組成物が、本明細書にさらに提供される。抗体および断片のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、ならびに抗体ポリペプチドおよびその断片を組換え的に産生するか、またはそれを化学合成する方法がさらに提供される。抗体ポリペプチドは、真核細胞もしくは原核細胞において、または当技術分野において公知のおよび本明細書に記載される他の方法によって産生することができる。

【0361】

CDR配列の例としては、限定されないが、以下：抗体またはその断片の重鎖可変領域が、下記のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなることを含むか、本質的にそれからなるか、あるいはまたさらにそれからなることが挙げられる。

【0362】

10

20

30

40

50

抗体は、当技術分野において公知のおよび文献に十分に記載されている従来の技法を使用して生成することができる。ポリクローナル抗体の産生のためのいくつかの方法論がある。例えば、ポリクローナル抗体は、典型的には、限定されるものではないが、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラット、およびウサギなどの好適な哺乳動物の免疫によって産生される。抗原を、哺乳動物に注射し、Bリンパ球を誘導して、抗原に特異的な免疫グロブリンを産生する。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製されてもよい。

【0363】

この方法論の変形形態としては、最適な産生および動物の人道的な処置のために、アジュバント、投与の経路および部位、部位あたりの注射体積、ならびに動物あたりの部位の数の変更が挙げられる。例えば、アジュバントは、典型的には、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために使用される。ほとんどのアジュバントは、流入領域リンパ節への抗原の徐放を可能にする、注射部位抗原デポを提供する。他のアジュバントは、大きな表面積および免疫賦活性分子にわたるタンパク質抗原分子の濃縮を促進する界面活性物質を含む。ポリクローナル抗体生成のためのアジュバントの非限定的な例としては、フロイントアジュバント、Rib i アジュバントシステム、およびT i t e r m a xが挙げられる。ポリクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法を使用して生成ことができ、その一部は、米国特許第7, 279, 559号；同第7, 119, 179号；同第7, 060, 800号；同第6, 709, 659号；同第6, 656, 746号；同第6, 322, 788号；同第5, 686, 073号；および同第5, 670, 153号に記載されている。

【0364】

本開示の抗体誘導体は、本明細書に開示される抗体をコードするポリヌクレオチドを好適な宿主に送達して、例えば、そのような抗体をそれらの乳汁中で産生する、トランスジェニック動物または哺乳動物、例えば、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどを提供することによって調製することもできる。これらの方法は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5, 827, 690号；同第5, 849, 992号；同第4, 873, 316号；同第5, 849, 992号；同第5, 994, 616号；同第5, 565, 362号；および同第5, 304, 489号に記載されている。

【0365】

「抗体誘導体」という用語は、抗体または断片の線状ポリペプチド配列への翻訳後改変を含む。例えば、米国特許第6, 602, 684 B1号は、増強されたF e媒介性細胞毒性を有する、全抗体分子、抗体断片、または免疫グロブリンのF c領域と等価の領域を含む融合タンパク質を含む、改変されたグリコール形態の抗体の生成のための方法、およびそのようにして生成された糖タンパク質を記載している。

【0366】

本明細書に開示される抗体は、共有結合性付着が、抗体が抗イディオタイプ応答を生成するのを防止しないような、抗体への任意の種類の分子の共有結合性付着によって改変された誘導体も含む。抗体誘導体としては、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。加えて、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有していてもよい。

【0367】

抗体誘導体は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを送達して、植物部分またはそれから培養された細胞においてそのような抗体、規定の部分またはバリエーションを産生するトランスジェニック植物および培養植物細胞（例えば、限定されるものではないが、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサ）を提供することによって調製することもできる。例えば、Cramer et al. (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118およびそこで引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを使用して、大

量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉の産生を記載している。トランスジェニックトウモロコシを使用して、他の組換え系において産生されたもの、または天然起源から精製されたものと等価な生物活性を有する哺乳動物タンパク質を商業的生産レベルで発現させた。例えば、Hood et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147、およびそこで引用された参考文献を参照されたい。抗体誘導体はまた、タバコ種子およびジャガイモ塊茎を含む、一本鎖抗体 (s c F v) などの抗体断片を含むトランスジェニック植物種子から大量に産生されている。例えば、Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109、およびそこで引用された参考文献を参照されたい。そのため、抗体を、公知の方法に従って、トランスジェニック植物を使用して産生することもできる。

10

【0368】

抗体誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を改変する、または結合、親和性、オンレート、オフレート、アビディティ、特異性、半減期もしくは任意の他の好適な特徴を低減、増強もしくは改変することによって、産生させることもできる。一般に、非ヒトまたはヒト C D R 配列の部分または全体は維持されるが、非ヒト配列の可変領域および定常領域は、ヒト、または他のアミノ酸、または他のアイソタイプ由来の可変領域もしくは定常領域で置き換えられる。

【0369】

一般に、C D R 残基は、抗原結合への影響に直接的におよび最も実質的に関与する。抗体のヒト化または操作は、任意の公知の方法、例えば、限定されるものではないが、米国特許第 5, 723, 323 号；同第 5, 976, 862 号；同第 5, 824, 514 号；同第 5, 817, 483 号；同第 5, 814, 476 号；同第 5, 763, 192 号；同第 5, 723, 323 号；同第 5, 766, 886 号；同第 5, 714, 352 号；同第 6, 204, 023 号；同第 6, 180, 370 号；同第 5, 693, 762 号；同第 5, 530, 101 号；同第 5, 585, 089 号；同第 5, 225, 539 号；および同第 4, 816, 567 号に記載されているものを使用して行うことができる。

20

【0370】

本開示のキメラ抗体、ヒト化抗体または霊長類化抗体は、標準的な分子生物学技法を使用して調製された参照モノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする D N A は、標準的な分子生物学技法を使用して、目的のハイブリドーマから得、非参照 (例えば、ヒト) 免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作出するために、マウス可変領域を、当技術分野において公知の方法 (米国特許第 4, 816, 567 号) を使用して、ヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を作出するために、マウス C D R 領域を、当技術分野において公知の方法 (米国特許第 5, 225, 539 号ならびに米国特許第 5, 530, 101 号；同第 5, 585, 089 号；同第 5, 693, 762 号；および同第 6, 180, 370 号) を使用して、ヒトフレームワークに挿入することができる。同様に、霊長類化抗体を作出するために、マウス C D R 領域を、当技術分野において公知の方法 (W O 93 / 02108 号および W O 99 / 55369 号) を使用して、霊長類フレームワークに挿入することができる。

30

40

【0371】

部分的な～完全なヒト抗体を作製するための技法は、当技術分野において公知であり、任意のそのような技法を使用することもできる。一実施形態によれば、完全なヒト抗体配列は、ヒト重鎖および軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製される。異なるクラスの抗体を産生することができる、そのようなトランスジェニックマウスの複数の株が作製されている。望ましい抗体を産生しているトランスジェニックマウス由来の B 細胞を融合させて、所望の抗体の持続的産生のためのハイブリドーマ細胞系を作製することができる (例えば、Russel et al. (2000) Infection and Immunity April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) European J. of Immun. 30:534-540; Green (1999) J. of Immun. Metho

50

ds 231:11-23; Yang et al. (1999A) J. of Leukocyte Biology 66:401-410; Yang (1999B) Cancer Research 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) Advanced Drug Reviews 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188(3):483-495; Jakobovits (1998) Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) Genomics 42:413-421; Sherman-Gold (1997) Genetic Engineering News 17(14); Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156; Jakobovits (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) Current Opinion in Biotechnology 6:561-566; Mendez et al. (1995) Genomics 26:294-307; Jakobovits (1994) Current Biology 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) Immunity 1(4):247-260; Jakobovits (1993) Nature 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(6):2551-2555; および米国特許第 6, 075, 181 を参照されたい。
【0372】

10

本明細書に開示される抗体を改変して、キメラ抗体を作出することもできる。キメラ抗体は、抗体の重鎖および軽鎖のさまざまなドメインが、2つ以上の種由来のDNAによってコードされるものである。例えば、米国特許第 4, 816, 567 号を参照されたい。
【0373】

20

あるいは、本明細書に開示される抗体を改変して、ベニア化抗体を作出することもできる。ベニア化抗体は、第1の種の抗体が、第2の種において免疫原性ではなく、それによって、抗体の免疫原性が低減するように、ある種の抗体の外側アミノ酸残基が、第2の種のもので思慮深く置き換えられたか、または「ベニア化された」ものである。タンパク質の抗原性は、その表面の特質に主に依存するので、抗体の免疫原性は、別の哺乳動物種において通常見出される残基とは異なる露出した残基を置き換えることによって、低減され得る。外側残基のこの思慮深い置き換えは、内側ドメインまたはドメイン間接触に対してわずかな効果を有するか、または有さないはずである。そのため、リガンド結合特性は、可変領域フレームワーク残基に限定される変更の帰結として、影響を受けないはずである。抗体の外表面または外皮のみが変更され、支持する残基は破壊されないままであるので、このプロセスは、「ベニア化」と称される。

30

【0374】
「ベニア化」のための手順は、Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological interest, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Healthによってコンパイルされたヒト抗体可変ドメインについての利用可能配列データ、このデータベースのアップデート、ならびに他のアクセス可能な米国および外国のデータベース（核酸およびタンパク質の両方）を活用する。ベニア化抗体を生成するために使用される方法の非限定的な例としては、EP 5 195 96 号；米国特許第 6, 797, 492 号が挙げられ、Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28(4-5):489-498に記載されている。

【0375】
「抗体誘導体」という用語は、2つの抗原結合性部位を有する小さな抗体断片である「ダイアボディ」も含み、ここで、断片は、同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン（VL）に接続された重鎖可変ドメイン（VH）を含む（例えば、EP 404, 097 号；WO 93/11161 号；および Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448を参照されたい）。同じ鎖における2つのドメインの間の対

40

形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成することを強制し、2つの抗原結合性部位を作出する（親抗体の超可変領域に挿入された1つまたは複数のアミノ酸を有し、抗原に対する親抗体の結合親和性よりも少なくとも約2倍強い標的抗原に対する結合親和性を有する抗体バリエーション

50

開示する、Chenらに対する米国特許第6,632,926号も参照されたい)。

【0376】

「抗体誘導体」という用語は、scFv、dAb、ナノボディ、ミニボディ、ユニボディ、およびアフィボディなどの操作された抗体分子、断片および単ドメインをさらに含む(およびHudson (2005) Nature Biotech 23(9):1126-36;米国特許出願公開第2006/0211088号;PCT国際出願公開第WO2007/059782号;米国特許第5,831,012号)。

【0377】

「抗体誘導体」という用語は、「線状抗体」をさらに含む。線状抗体を作製するための手順は、当技術分野において公知であり、Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062に記載されている。簡潔には、これらの抗体は、一对の抗原結合性領域を

形成する一对のタンデムEdセグメント($V_H-C_H1-V_H-C_H1$)を含む。線状抗体は、二特異性または単特異性であり得る。

【0378】

本明細書に開示される抗体は、限定されるものではないが、プロテインA精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む公知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)を、精製のために使用することもできる。

【0379】

本開示の抗体は、天然で精製された産物、化学合成手順の産物、ならびに例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主から、または代替的に、上記に記載される原核生物宿主から組換え技法によって産生された産物を含む。いくつかの抗体産生系が、Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:671-685に記載されている。

【0380】

試験される抗体が、タンパク質またはポリペプチドと結合する場合、試験される抗体および本開示によって提供される抗体は、等価物である。試験される抗体によって、本明細書に開示される抗体が、この抗体が正常に反応するタンパク質またはポリペプチドに結合することを防止するかどうかを決定することによって、過度の実験なしで、抗体が、本明細書に開示される抗体と同じ特異性を有するかどうかを決定することも可能である。本明細書に開示されるモノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように、試験される抗体が、本明細書に開示される抗体と競合する場合、2つの抗体は、同じまたは密接に関連するエピトープに結合する可能性がある。あるいは、本明細書に開示される抗体を、それが正常な反応性であるタンパク質とともにプレインキュベートし、試験される抗体が、抗原に結合するその能力において阻害されるかを決定することができる。試験される抗体が阻害される場合、ほぼ確実に、これは、本明細書に開示される抗体と同じまたは密接に関連するエピトープ特異性を有する。

【0381】

「抗体」という用語はまた、すべての免疫グロブリンアイソタイプおよびサブクラスの抗体を含むことを意図する。特定のアイソタイプのモノクローナル抗体は、最初の融合物から選択することによって直接的に調製することができ、またはsib選択技法を使用することによって異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製して、Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653またはSpira et al. (1984) J. Immunol. Methods 74:307に記載されている手順を使用してクラススイッチバリエーションを単離することができる。あるいは、組換えDNA技法が使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0382】

本明細書に記載されるモノクローナル抗体の特異性を有する他のモノクローナル抗体の単離は、抗イディオタイプ抗体を産生することによって、当業者により達成することもできる。Herlyn et al. (1986) Science 232:100。抗イディオタイプ抗体は、目的のモノクローナル抗体に存在する固有の決定基を認識する抗体である。

【0383】

本明細書に開示される一部の態様では、抗体を検出可能にまたは治療的に標識することが有用である。好適な標識は、上記に記載されている。抗体をこれらの薬剤にコンジュゲートするための方法は、当技術分野において公知である。説明だけの目的のために、抗体は、検出可能な部分、例えば、放射活性原子、発色団、フルオロフォアなどで標識することができる。そのような標識された抗体は、*in vivo*で、または単離された試験試料においてのいずれかで、診断技法のために使用することができる。

【0384】

低分子量ハプテンへの抗体のカップリングは、アッセイにおける抗体の感受性を増加させることができる。次いで、ハプテンは、第2の反応によって特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特異的抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインなどのハプテンを使用することが一般的である。Harlow and Lane (1988)、上記を参照されたい。

【0385】

本開示の抗体の可変領域は、VHおよび／またはVL CDR1、CDR2および／またはCDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させて、抗体の1つまたは複数の結合特性（例えば、親和性）を改善することによって改変することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介性突然変異誘発によって導入されてもよく、目的の抗体結合または他の機能特性に対する効果は、適切な*in vitro*または*in vivo*アッセイにおいて評価することができる。ある特定の実施形態では、保存的改変が導入され、典型的には、CDR領域内の1、2、3、4または5残基以下が変更される。突然変異は、アミノ酸の置換、付加または欠失であってもよい。

【0386】

フレームワーク改変を、例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「戻し突然変異する」ことによって、抗体に対して行って、免疫原性を減少させることができる。

【0387】

加えて、本明細書に開示される抗体は、Fc領域内に改変を含むように操作して、抗体の1つまたは複数の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および／または抗原依存性細胞性細胞傷害性を変更してもよい。そのような改変としては、限定されるものではないが、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にするため、または抗体の安定性を増加もしくは減少させるためのヒンジ領域におけるシステイン残基の数の変更（米国特許第5,677,425号）、ならびに抗体の生物学的半減期を減少させるためのFcヒンジ領域におけるアミノ酸突然変異（米国特許第6,165,745号）が挙げられる。

【0388】

加えて、本明細書に開示される抗体は、化学的に改変されていてもよい。抗体のグリコシル化は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つまたは複数の部位を改変して、抗原に対する抗体の親和性を増加させることによって変更することができる（米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号）。あるいは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性を増加させるために、低減された量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体、または増加した二分型GlcNaC構造を有する抗体を、変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって得ることができる（Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180）。

【0389】

本明細書に開示される抗体は、1つまたは複数のポリエチレングリコール（PEG）基が抗体または抗体断片に付着するようになる条件下、抗体またはその断片をPEGまたはPEGの反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体と反応させることによって、ペグ化して、生物学的半減期を増加させることができる。抗体のペグ化は、反応性PEG分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応によって行われてもよい。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C1～C10）アルコキシもしくはアリーロキシポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコールマレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のいずれかを包含することを意図する。ペグ化される抗体は、アグリコシル化抗体であり得る。タンパク質をペグ化するための方法は、当技術分野において公知であり、本明細書に開示される抗体に適用することができる（EP0154316号およびEP0401384号）。

10

【0390】

加えて、抗体は、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質に抗体の抗原結合性領域をコンジュゲートまたは融合することによって化学的に改変して、得られる分子の半減期を増加させてもよい。そのようなアプローチは、例えば、EP0322094号およびEP0486525号に記載されている。

【0391】

本開示の抗体またはその断片は、診断剤にコンジュゲートされ、診断的に使用して、例えば、疾患の発生または進行をモニターしてもよく、所与の処置レジメンの有効性を決定してもよい。診断剤の例としては、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、さまざまな陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当技術分野において公知の技法を使用して、抗体もしくはその断片に直接的に、またはリンカーを通じて間接的にのいずれかで、カップリングまたはコンジュゲートされていてもよい。好適な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペクターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる。好適な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる。発光材料の例としては、ルミノールが挙げられる。生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる。好適な放射性材料の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム-111、ルテチウム-171、ビスマス-212、ビスマス-213、アスタチン-211、銅-62、銅-64、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、リン-32、リン-33、スカンジウム-47、銀-111、ガリウム-67、プラセオジウム-142、サマリウム-153、テルビウム-161、ジスプロシウム-166、ホルミウム-166、レニウム-186、レニウム-188、レニウム-189、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225、鉄-59、セレン-75、ヒ素-77、ストロンチウム-89、モリブデン-99、ロジウム-1105、パラジウム-109、プラセオジウム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリジウム-194、金-198、金-199、および鉛-211が挙げられる。モノクローナル抗体は、抗体に共有結合的に連結された二官能性キレート化剤の使用により、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートされていてもよい。キレート化剤は、amitties (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78)；アミノ酸残基のスルフヒドリル (sulfhydryl) 基 (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120:217-262)、および炭水化物基 (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83:2632-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570) を通して付着されていてもよい。

20

30

40

【0392】

50

さらに、本開示の抗体またはその断片は、治療剤にコンジュゲートされていてもよい。好適な治療剤としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、代謝拮抗薬（メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン（decarbazine）、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン（gemcitabine）、クラドリピンなど）、アルキル化剤（メクロレタミン、チオテパ（thioepa）、クロラムブシル（chlorambucil）、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの他の白金誘導体など）、抗生物質（ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ダウノルピシン（以前は、ダウノマイシン）、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）など）、ジフテリア毒素および関連分子（ジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子など）、リシン毒素（リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素など）、コレラ毒素、志賀様毒素（SLT-I、SLT-II、SLT-III）、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ボウマンバークプロテアーゼ阻害剤、Pseudomonas外毒素、アロリン、サボリン、モデシン、ゲラニン、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリエトシン（restrietocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）毒素および混合毒素が挙げられる。

10

20

30

40

【0393】

追加の好適なコンジュゲートされた分子としては、リボヌクレアーゼ（RNase）、DNase I、アンチセンス核酸、siRNA分子などの阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成性分子、および外部ガイド配列が挙げられる。アプタマーは、ステムループまたはG-カルテットなどの定義された二次構造および三次構造にフォールドされた15～50塩基の長さの範囲の小型核酸であり、ATP（米国特許第5,631,146号）およびテオフィリン（theophiline）（米国特許第5,580,737号）などの小分子、ならびに逆転写酵素（米国特許第5,786,462号）およびトロピン（米国特許第5,543,293号）などの大分子に結合することができる。リボザイムは、分子内または分子間のいずれかで、化学反応を触媒することができる核酸分子である。リボザイムは、典型的には、標的基質の認識および結合と、その後の切断により、核酸基質を切断する。三重鎖形成性機能的核酸分子は、三重鎖を形成することによって、二本鎖または一本鎖核酸と相互作用することができ、ここで、3つのDNA鎖は、ワトソン-クリック塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成の両方に依存する複合体を形成する。三重鎖分子は、高い親和性および特異性で、標的領域に結合することができる。

【0394】

機能的核酸分子は、標的分子によって保有される比活性のエフェクター、阻害剤、モジュレーターおよび刺激因子として作用してもよく、または機能的核酸分子は、任意の他の分子から独立したdenovo活性を保有していてもよい。

【0395】

治療剤は、多数の利用可能な方法のいずれかを使用して、直接的にまたは間接的に抗体

50

に連結することができる。例えば、薬剤は、還元された抗体構成要素のヒンジ領域で、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)などの架橋剤を使用したジスルフィド結合形成を介して、または抗体のFc領域における炭水化物部分を介して、付着することができる(Yu et al. 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995))。

10

【0396】

治療剤を抗体にコンジュゲートするための技法は、周知である(Amon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.); Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," (1982) Immunol. Rev. 62:119-58)。

20

【0397】

本明細書に開示される抗体またはその抗原結合性領域は、別の機能的分子、例えば、別の抗体または受容体のためのリガンドに連結されて、少なくとも2つまたはそれよりも多くの異なる結合部位または標的分子に結合する二特異性分子または多特異性分子を生成することができる。別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物などの1つまたは複数の他の結合分子への抗体の連結は、例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、または非共有結合的会合によって行うことができる。多特異性分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性をさらに含むことができる。

30

【0398】

二特異性分子および多特異性分子は、当技術分野において公知の方法を使用して調製することができる。例えば、二特異的分子のそれぞれの結合単位を別々に生成し、次いで、互いにコンジュゲートすることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合、各種のカップリング剤または架橋剤を、共有結合的コンジュゲーションのために使用することができる。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシニミジルS-アセチル-L-チオアセテート(SATA)、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸(2-nitroterephthalic acid))(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)、およびスルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン(cyclohexane)-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。結合分子が抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によってコンジュゲートすることができる。

40

50

【0399】

本開示の抗体またはその断片は、抗体が結合される細胞に対して毒性がある部分に連結されて、「枯渴」抗体を形成してもよい。これらの抗体は、NK細胞を枯渴させることが望ましい適用において特に有用である。

【0400】

本明細書に開示される抗体はまた、固体支持体に付着されていてもよく、これは、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用である。そのような固体支持体としては、限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

【0401】

抗体は、多くの異なる担体に結合させることもできる。そのため、本開示は、抗体、および活性なまたは不活性な別の物質を含有する組成物も提供する。周知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびにマグネタイトが挙げられる。担体の特質は、本明細書に開示される目的のために、可溶性または不溶性のいずれかであり得る。当業者であれば、モノクローナル抗体の結合のための他の好適な担体が公知であるか、またはルーチンの実験を使用して、それを解明することが可能であろう。

【0402】

ある特定の態様では、本開示は、DNABIIタンパク質もしくはその断片のチップもしくはテールドメイン、テール断片またはチップ断片を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片に関する。DNABIIタンパク質またはその断片は、IHFポリペプチドまたはHUポリペプチドであり得る。

抗体による機能分析

【0403】

本明細書に開示される抗体を使用して、本明細書に開示されるポリペプチドを精製し、生物学的に等価なポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを特定することができる。それらを使用して、本明細書に開示されるポリペプチドの機能を改変する薬剤を特定することもできる。これらの抗体としては、当業者に良く知られており、上記に記載されている、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、およびこれらの調製物に由来するさまざまな試薬が挙げられる。

【0404】

特定された遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を中和する抗体はまた、*in vivo*および*in vitro*で使用して、そのような中和抗体を*in vivo*および*in vitro*の試験系に添加することによって機能を実証することができる。それらは、本明細書に開示されるポリペプチドの活性をモジュレートするための医薬品としても有用である。

【0405】

さまざまな抗体調製物は、ELISAアッセイまたはウエスタンブロットなどの分析方法において使用して、*in vitro*または*in vivo*で、試験細胞によって特定された遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を実証することもできる。代謝の間にプロテアーゼ分解によって生成されたそのようなタンパク質の断片は、適切なポリクローナル抗血清と実験試料に由来する試料を使用することによって特定することもできる。

【0406】

本明細書に開示される抗体は、単独で、あるいはペプチドもしくはタンパク質に基づくワクチンまたは樹状細胞に基づくワクチンと組み合わせて、ワクチン接種のため、またはワクチン接種をブーストするために使用されてもよい。

【0407】

抗体の一般構造は、当技術分野において公知であり、ここでは簡潔に要約するのみである。免疫グロブリンモノマーは、ジスルフィド結合によって接続された2つの重鎖および

10

20

30

40

50

2つの軽鎖を含む。それぞれの重鎖は、ジスルフィド結合を介して直接的に結合される軽鎖の1つと対形成する。それぞれの重鎖は、定常領域（抗体のアイソタイプに応じて変わる）および可変領域を含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2およびCDRH3と指定され、フレームワーク領域内で支持される、3つの超可変領域（または相補性決定領域）を含む。それぞれの軽鎖は、定常領域および可変領域を含み、可変領域は、重鎖の可変領域と類似の様式で、フレームワーク領域によって支持される3つの超可変領域（CDRL1、CDRL2およびCDRL3と指定される）を含む。

【0408】

重鎖および軽鎖のそれぞれの対の超可変領域は、互いに協力して、標的抗原に結合することができる抗原結合性部位を提供する。重鎖および軽鎖の対の結合特異性は、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3の配列によって定義される。そのため、特定の結合特異性を生じるCDR配列（すなわち、重鎖および軽鎖についてCDR1、CDR2およびCDR3の配列）のセットが決定されると、CDR配列のセットは、原理上、同じ抗原結合特異性を有する異なる抗体を提供するために、任意の抗体の定常領域内で連結された任意の他の抗体フレームワーク領域内の適切な位置に挿入され得る。

【0409】

Fab断片の生成のための抗体は、当技術分野において公知のおよび文献に十分に記載されている従来の技法を使用して生成することができる。ポリクローナル抗体の産生のためのいくつかの方法論がある。例えば、ポリクローナル抗体は、典型的には、限定されるものではないが、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ハムスター、ウマ、イヌ、マウス、ラット、およびウサギなどの好適な哺乳動物の免疫によって産生される。抗原を、哺乳動物に注射し、Bリンパ球を誘導して、抗原に特異的な免疫グロブリンを産生する。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製されてもよい。IHF α および／またはIHF β サブユニットに対して特異的な抗体は、IHF α およびIHF β の異なるエピトープに対応するポリペプチドの注射によって生成することができる。例えば、抗体は、それぞれ、IHFの断片A3およびA5、HUの断片A5、IHFの断片B2、B4、およびmB4などのそれぞれのサブユニットの20アミノ酸を使用して生成することができる。

【0410】

この方法論の変形形態としては、最適な産生および動物の人道的な処置のために、アジュバント、投与の経路および部位、部位あたりの注射体積、ならびに動物あたりの部位の数の変更が挙げられる。例えば、アジュバントは、典型的には、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために使用される。ほとんどのアジュバントは、流入領域リンパ節への抗原の徐放を可能にする、注射部位抗原デポを提供する。他のアジュバントは、大きな表面積および免疫賦活性分子にわたるタンパク質抗原分子の濃縮を促進する界面活性物質を含む。ポリクローナル抗体生成のためのアジュバントの非限定的な例としては、フロイントアジュバント、Ribiaアジュバントシステム、MPL由来アジュバント、E.coliの易熱性エンテロトキシンに由来するもの（例えば、dmLT＝二重突然変異不安定毒素）、およびTitertaxが挙げられる。ポリクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法を使用して生成することができ、その一部は、米国特許第7,279,559号；同第7,119,179号；同第7,060,800号；同第6,709,659号；同第6,656,746号；同第6,322,788号；同第5,686,073号；および同第5,670,153号に記載されている。

【0411】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知のおよび文献に十分に記載されている従来のハイブリドーマ技法を使用して生成することができる。例えば、ハイブリドーマは、好適な不死化細胞系（例えば、骨髓腫細胞系、例えば、限定されるものではないが、Sp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L5、P3X63Ag8,653、Sp2SA3、Sp2MAI、Sp2SS1、Sp2SA5、U397、MIA144、ACTIV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH313、HL-60、MLA14

4、NAMA IWA、NEURO 2A、CHO、Per C. 6、YB2/O)など、またはヘテロミエローム、その融合産物、またはそれらが由来する任意の細胞もしくは融合細胞、または当技術分野において公知の任意の他の好適な細胞系(以下のウェブアドレス、例えば、atcc.org, lifetech.com、最終アクセス2007年11月26日のものを参照されたい)を、内因性核酸または異種核酸のいずれかとして、組換えまたは内因性の、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、げっ歯動物、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ヒツジ、霊長類、真核生物、ゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAもしくはRNA、葉緑体DNAもしくはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本鎖、二本鎖もしくは三本鎖、ハイブリダイズされたものなど、あるいはそれらの任意の組み合わせとして、抗体産生細胞、例えば、限定されないが、単離されたまたはクローニングされた脾臓、末梢血、リンパ、扁桃腺、または他の免疫細胞もしくはB細胞を含有する細胞、あるいは重鎖または軽鎖の定常配列または可変配列またはフレームワーク配列またはCDR配列を発現する任意の他の細胞と融合することによって産生される。抗体産生細胞は、目的の抗原で免疫されたヒトもしくは他の好適な動物の、末梢血から、または特定の実施形態では、脾臓もしくはリンパ節から得ることもできる。本開示の抗体、その規定の断片またはバリエーションをコードする異種核酸または内因性核酸を発現させるために、任意の他の好適な宿主細胞を使用することもできる。融合された細胞(ハイブリドーム)または組換え細胞は、選択的培養条件または他の好適な公知の方法を使用して単離し、限界希釈もしくは細胞選別、または他の公知の方法によってクローニングすることができる。本明細書に開示される一部の実施形態は、IHF断片に対してモノクローナル抗体を産生する特異的なハイブリドームに関し、非限定的な例としては、Ih f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 (ATCC番号PTA-122334)、Ih f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 (ATCC番号PTA-122336)、mIh f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 (ATCC番号PTA-122335)が挙げられる。

10

20

【0412】

限定されるものではないが、当技術分野において公知の方法を使用して、ペプチドまたはタンパク質ライブラリー(例えば、限定されるものではないが、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、cDNAなど、ディスプレイライブラリー;例えば、MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Bioinvent (Lund, Sweden), Affitech (Oslo, Norway)などのさまざまな商業的ベンダーから利用可能なもの)から組換え抗体を選択する方法を含む、必要な特異性の抗体を産生または単離する他の好適な方法を使用することができる。当技術分野の公知の方法は、特許文献に記載されており、その一部としては、米国特許第4,704,692号;同第5,723,323号;同第5,763,192号;同第5,814,476号;同第5,817,483号;同第5,824,514号;同第5,976,862号が挙げられる。代替方法は、当技術分野において公知であるように、および/または本明細書に記載されるように、ヒト抗体のレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、SCIDマウス、Nguyen et al. (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al. (1998) Mamma 93:154-161)の免疫に依拠する。そのような技法としては、限定されるものではないが、リボソームディスプレイ(例えば、Wanes et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95:14130-14135);単一細胞抗体産生技術(例えば、選択されたリンパ球抗体方法(「SLAM」)(米国特許第5,627,052号、Wen et al. (1987) J. Immunol 17:887-892; Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848);ゲル微小液滴およびフローサイトメトリー(Powell et al. (1990) Biotechnol. 8:333-337; One Cell Systems (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) J. Imm. Meth. 182:155

30

40

50

-163; および Kenny et al. (1995) Bio. Technol. 13:787-790); B細胞選択 (Steenbakkers et al. (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134) が挙げられる。追加の方法は、当技術分野において公知の技法を使用するヒト血清からのヒト抗体の単離に依拠し、米国特許第7, 939, 344号を参照されたい。

【0413】

抗体はまた、リンパ球集団において *in vivo* 産生を誘導することによって、または組換え免疫グロブリンライブラリーもしくは非常に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、産生されてもよい (Orlandi et al. (1989) PNAS 86:3833-3837; Winter et al. (1991) Nature 349:293-299)。

【0414】

あるいは、一本鎖抗体の産生のための技法が使用されてもよい。一本鎖抗体 (*scFv*) は、リンカーペプチド (典型的には、およそ5~25アミノ酸の長さ) で接続された重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。*scFv* では、重鎖および軽鎖の可変領域は、同じ抗体または異なる抗体に由来していてもよい。*scFv* は、組換え技法を使用して、例えば、*E. coli* などの宿主生物において *scFv* をコードするベクターの発現によって、合成されてもよい。*scFv* をコードするDNAは、鋳型として上記で言及した抗体の重鎖または重鎖の可変領域をコードするDNAおよびその軽鎖または軽鎖の可変領域をコードするDNAから選択されるDNAの全体のまたは所望アミノ酸配列をコードする部分DNAを使用する増幅を行うことによって、その両末端を定義するプライマー対を使用するPCR、ならびにそれぞれ、リンカーの両末端が重鎖および軽鎖にライゲーションされるように、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両末端を定義するプライマー対を組み合わせる増幅を行うことによって、得ることができる。*scFv* をコードするDNAを含有する発現ベクター、および発現ベクターによって形質転換される宿主は、当技術分野において公知の従来方法に従って得ることができる。

【0415】

抗原結合性断片、例えば、 $F(ab')_2$ 断片は、抗体分子、および $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって産生され得るFab断片のペプシン消化によって産生することができる。Fab断片、特に、マウスモノクローナル抗体から産生されるマウスFab断片は、システインの存在下でチオールプロテアーゼのフィシンによる抗体の消化によって産生することもできる。Fab断片、特に、ウサギポリクローナル抗体から産生されるウサギFab断片はまた、システイン-HClの存在下でプロテアーゼのパパインによる抗体の消化によって産生されてもよい。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速で容易な特定を可能にしてもよい (Huse et al. (1989) Science 256:1275-1281)。断片の生成の際に、断片は、従来技法を使用して単離および配列決定することができ、アミノ酸配列が決定される。

【0416】

本開示の抗体誘導体は、本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを好適な宿主に送達して、例えば、そのような抗体をそれらの乳汁中で産生する、トランスジェニック動物または哺乳動物、例えば、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどを提供することによって調製することもできる。これらの方法は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5, 827, 690号; 同第5, 849, 992号; 同第4, 873, 316号; 同第5, 849, 992号; 同第5, 994, 616号; 同第5, 565, 362号; および同第5, 304, 489号に記載されている。

【0417】

本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片およびポリペプチドが由来する親抗体は、共有結合性付着が、抗体が抗イディオタイプ応答を生成するのを防止しないような、抗体への任意の種類の分子の共有結合性付着によって改変された誘導体も含む。抗体誘導体としては、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化

10

20

30

40

50

、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。本明細書で企図される改変された抗体の非限定的な例は、アグリコシル化全抗体分子、抗体断片、または免疫グロブリンのFc領域と等価な領域を含む融合タンパク質である。そのようなアグリコシル化形態は、例えば、N連結グリカンを含むタンパク質を改変する能力を欠く宿主細胞において、または目的の抗体上のN連結コンセンサス部位を突然変異させることによって生成することができる。加えて、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有していてもよい。

【0418】

親抗体の抗体誘導体は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを送達して、植物部分またはそれから培養された細胞においてそのような抗体、規定の部分またはバリエーションを産生するトランスジェニック植物および培養植物細胞（例えば、限定されるものではないが、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサ）を提供することによって調製することもできる。例えば、Cramer et al. (1999) Curr. Top. Microbiol Immunol 240: 95-8およびそこで引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを使用して、大量の

組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉の産生を記載している。トランスジェニックトウモロコシを使用して、他の組換え系において産生されたもの、または天然起源から精製されたものと等価な生物活性を有する哺乳動物タンパク質を商業的生産レベルで発現させた。例えば、Hood et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147、およびそこで引用された参考文献を参照されたい。抗体誘導体はまた、タバコ種

子およびジャガイモ塊茎を含む、一本鎖抗体（scFv）などの抗体断片を含むトランスジェニック植物種子から大量に産生されている。例えば、Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109、およびそこで引用された参考文献を参照されたい。その

ため、抗体を、公知の方法に従って、トランスジェニック植物を使用して産生することもできる。

【0419】

親抗体の抗体誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を改変する、または結合、親和性、オンレート、オフレート、アビディティ、特異性、半減期もしくは任意の他の好適な特徴を低減、増強もしくは改変することによって、産生させることもできる。一般に、非ヒトまたはヒトCDR配列の部分または全体は維持されるが、非ヒト配列の可変領域および定常領域は、ヒト、または他のアミノ酸で置き換えられる。

【0420】

抗体のヒト化または操作は、任意の公知の方法、例えば、限定されるものではないが、米国特許第5,723,323号；同第5,976,862号；同第5,824,514号；同第5,817,483号；同第5,814,476号；同第5,763,192号；同第5,723,323号；同第5,766,886号；同第5,714,352号；同第6,204,023号；同第6,180,370号；同第5,693,762号；同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,225,539号；および同第4,816,567号に記載されているものを使用することができる。

【0421】

Fab断片もしくは抗原結合性断片、または本明細書に記載される検出可能な標識または精製標識をさらに含む本明細書に開示されるポリペプチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる単離されたポリペプチドがさらに提供される。

【0422】

本開示の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドのキメラ抗体、ヒト化抗体または霊長類化抗体は、標準的な分子生物学技法を使用して調製された参照モノクローナル抗

体の配列に基づいて調製することができる。そのような抗体は、本開示の抗体断片（例えば、F a b断片または抗原結合性断片）を生成するために使用されてもよい。

【0423】

重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、標準的な分子生物学技法を使用して、目的のハイブリドーマから得、非参照（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作出するために、マウス可変領域を、当技術分野において公知の方法（米国特許第4,816,567号）を使用して、ヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を作出するために、マウスCDR領域を、当技術分野において公知の方法（米国特許第5,225,539号ならびに米国特許第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号；および同第6,180,370号）を使用して、ヒトフレームワークに挿入することができる。同様に、霊長類化抗体を作出するために、マウスCDR領域を、当技術分野において公知の方法（PCT国際特許出願公開第WO93/02108号および同第WO99/55369号）を使用して、霊長類フレームワークに挿入することができる。

10

【0424】

部分的な～完全なヒト抗体を作製するための技法は、当技術分野において公知であり、任意のそのような技法を使用することもできる。一実施形態によれば、完全なヒト抗体配列は、ヒト重鎖および軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製される。異なるクラスの抗体を産生することができる、そのようなトランスジェニックマウスの複数の株が作製されている。望ましい抗体を産生しているトランスジェニックマウス由来のB細胞を融合させて、所望の抗体の持続的産生のためのハイブリドーマ細胞系を作製することができる（例えば、Russel et al. (2000) *Infection and Immunity* April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) *European J. of Immun.* 30:534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231:11-23; Yang et al. (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66:401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) *Advanced Drug Reviews* 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3):483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) *Genomics* 42:413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Jakobovits (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV*, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566; Mendez et al. (1995) *Genomics* 26:294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) *Immunity* 1(4):247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6):2551-2555; および米国特許第6,075,181を参照されたい。

20

30

【0425】

本明細書に開示される抗体を改変して、キメラ抗体を作出することもできる。キメラ抗体は、抗体の重鎖および軽鎖のさまざまなドメインが、2つ以上の種由来のDNAによってコードされるものである。例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。

40

【0426】

あるいは、本明細書に開示される抗体を改変して、ベニア化抗体を作出することもできる。ベニア化抗体は、第1の種の抗体が、第2の種において免疫原性ではなく、それによって、抗体の免疫原性が低減するように、ある種の抗体の外側アミノ酸残基が、第2の種のもので思慮深く置き換えられたか、または「ベニア化された」ものである。タンパク質の抗原性は、その表面の特質に主に依存するので、抗体の免疫原性は、別の哺乳動物種抗体において通常見出される残基とは異なる露出した残基を置き換えることによって、低減

50

され得る。外側残基のこの思慮深い置き換えは、内側ドメインまたはドメイン間接触に対してわずかな効果を有するか、または有さないはずである。そのため、リガンド結合特性は、可変領域フレームワーク残基に限定される変更の帰結として、影響を受けないはずである。抗体の外表面または外皮のみが変更され、支持する残基は破壊されないままであるので、このプロセスは、「ベニア化」と称される。

【0427】

「ベニア化」のための手順は、Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Healthによってコンパイルされたヒト抗体可変ドメインについての利用可能配列デー

10

タ、このデータベースのアップデート、ならびに他のアクセス可能な米国および外国のデータベース（核酸およびタンパク質の両方）を活用する。ベニア化抗体を生成するために使用される方法の非限定的な例としては、EP 5 195 96号；米国特許第6,797,492号が挙げられ、Padlan et al. (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5):489-498に記載されている。

【0428】

本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片およびポリペプチドは、限定されるものではないが、プロテインA精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む公知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）を、精製のために使用することもできる。

20

【0429】

本開示の抗体断片、抗原結合性断片の調製のための抗体は、天然で精製された産物、化学合成手順の産物、ならびに例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主から、または代替的に、上記に記載される原核生物宿主から組換え技法によって産生された産物を含む。いくつかの抗体産生系が、Birch & Radner (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:671-685に記載されている。

【0430】

30

試験される抗体断片が、タンパク質またはポリペプチドと結合する場合、試験される抗体断片および本開示によって提供される抗体断片は、等価物である。試験される抗体によって、本明細書に開示される抗体断片が、この抗体断片が正常に反応するタンパク質またはポリペプチドに結合することを防止するかどうかを決定することによって、過度の実験なしで、抗体断片が、本明細書に開示される抗体断片と同じ特異性を有するかどうかを決定することも可能である。本明細書に開示される抗体断片による結合の減少によって示されるように、試験される抗体断片が、本明細書に開示される抗体断片と競合する場合、2つの抗体断片は、同じまたは密接に関連するエピトープに結合する可能性がある。あるいは、本明細書に開示される抗体断片を、それが正常な反応性であるタンパク質とともにブレインキュベートし、試験される抗体断片が、抗原に結合するその能力において阻害されるかを決定することができる。試験される抗体断片が阻害される場合、ほぼ確実に、これは、本明細書に開示される抗体断片と同じまたは密接に関連するエピトープ特異性を有する。

40

【0431】

「抗体」および「抗体断片」という用語はまた、すべての免疫グロブリンアイソタイプおよびサブクラスの抗体を含むことを意図する。特定のアイソタイプのモノクローナル抗体は、最初の融合物から選択することによって直接的に調製することができ、またはs i b選択技法を使用することによって異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製して、Steplewski et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8653またはSpira et al. (1984) *J. Immunol. M*

50

ethods 74:307に記載されている手順を使用してクラススイッチバリエーションを単離することができる。あるいは、組換えDNA技法が使用されてもよい。

【0432】

本明細書に記載されるモノクローナル抗体の特異性を有する抗体断片、抗原結合性断片およびポリペプチドを生成するための他のモノクローナル抗体の単離は、抗イディオタイプ抗体を産生することによって、当業者により達成することもできる。Herlyn et al. (1986) Science 232:100。抗イディオタイプ抗体は、目的のモノクローナル抗体に存在する固有の決定基を認識する抗体である。

【0433】

本明細書に開示される一部の態様では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを検出可能にまたは治療的に標識することが有用である。好適な標識は、本明細書に記載されている。抗体およびポリペプチドをこれらの薬剤にコンジュゲートするための方法は、当技術分野において公知である。説明だけの目的のために、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、検出可能な部分、例えば、放射活性原子、発色団、フルオロフォアなどで標識することができる。そのような標識された抗体は、*in vivo*で、または単離された試験試料においてのいずれかで、診断技法のために使用することができる。

【0434】

低分子量ハプテンへの抗体、断片およびポリペプチドのカップリングは、アッセイにおける抗体断片またはポリペプチドの感受性を増加させることができる。次いで、ハプテンは、第2の反応によって特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特異的抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインなどのハプテンを使用することが一般的である。Harlow

and Lane (1988)、上記を参照されたい。

【0435】

本開示の親抗体の可変領域は、VHおよび／またはVL CDR1、CDR2および／またはCDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させて、抗体の1つまたは複数の結合特性（例えば、親和性）を改善することによって改変することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介性突然変異誘発によって導入されてもよく、目的の抗体結合または他の機能特性に対する効果は、適切な*in vitro*または*in vivo*アッセイにおいて評価することができる。ある特定の実施形態では、保存的改変が導入され、典型的には、CDR領域内の1、2、3、4または5残基以下が変更される。突然変異は、アミノ酸の置換、付加または欠失であってもよい。

【0436】

フレームワーク改変を、例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「戻し突然変異する」ことによって、親抗体に対して行って、免疫原性を減少させることができる。

【0437】

加えて、本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、Fc領域内に改変を含むように操作して、抗体の1つまたは複数の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および／または抗原依存性細胞性細胞傷害性を変更してもよい。そのような改変としては、限定されるものではないが、軽鎖および重鎖のアセンブリを容易にするため、または抗体の安定性を増加もしくは減少させるためのヒンジ領域におけるシステイン残基の数の変更（米国特許第5,677,425号）、ならびに抗体の死生物学的半減期を減少させるためのFcヒンジ領域におけるアミノ酸突然変異（米国特許第6,165,745号）が挙げられる。

【0438】

加えて、本明細書に開示される抗体断片は、化学的に改変されていてもよい。抗体のグリコシル化は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つまたは複数の部位を改変して、抗原に対する抗体の親和性を増加させることによって変更することができる（米国特許第

5, 714, 350号および同第6, 350, 861号)。あるいは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性を増加させるために、低減された量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体、または増加した二分型GlcNaC構造を有する抗体を、変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって得ることができる (Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180)。

【0439】

本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、1つまたは複数のポリエチレングリコール (PEG) 基が抗体または抗体断片に付着するようになる条件下、抗体またはその断片をPEGまたはPEGの反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体と反応させることによって、ペグ化して、生物学的半減期を増加させることができる。ペグ化は、反応性PEG分子 (または類似の反応性水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応によって行われてもよい。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ (C1~C10) アルコキシもしくはアリールオキシポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコールマレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のいずれかを包含することを意図する。ペグ化される抗体は、アグリコシル化抗体であり得る。タンパク質をペグ化するための方法は、当技術分野において公知であり、本明細書に開示される抗体に適用することができる (EP0154316号およびEP0401384号)。

【0440】

加えて、抗体結合性断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質に抗原結合性領域をコンジュゲートまたは融合することによって化学的に改変して、得られる分子の半減期を増加させてもよい。そのようなアプローチは、例えば、EP0322094号およびEP0486525号に記載されている。

【0441】

本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、診断剤にコンジュゲートされ、診断的に使用して、例えば、疾患の発生または進行をモニターしてもよく、所与の処置レジメンの有効性を決定してもよい。診断剤の例としては、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、さまざまな陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当技術分野において公知の技法を使用して、抗体もしくはその断片に直接的に、またはリンカーを通じて間接的にのいずれかで、カップリングまたはコンジュゲートされていてもよい。好適な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。好適な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる。発光材料の例としては、ルミノールが挙げられる。生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる。好適な放射性材料の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム-111、ルテチウム-171、ビスマス-212、ビスマス-213、アスタチン-211、銅-62、銅-64、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、リン-32、リン-33、スカンジウム-47、銀-111、ガリウム-67、プラセオジウム-142、サマリウム-153、テルビウム-161、ジスプロシウム-166、ホルミウム-166、レニウム-186、レニウム-188、レニウム-189、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225、鉄-59、セレン-75、ヒ素-77、ストロンチウム-89、モリブデン-99、ロジウム-1105、パラジウム-109、プラセオジウム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリジウム-194、金-198、金-199、および鉛-211が挙げられる。モノクローナル抗体は、抗体に共有結合的に連結された二官能性キレート化剤の使用によ

り、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートされていてもよい。キレート化剤は、amitties (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78) ; アミノ酸残基のスルヒドリル基 (Koyama 1994 Chem. Abstr. 120:217262t) 、および炭水化物基 (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83:2632-2636 ; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570) を通して付着されていてもよい。

【0442】

さらに、本開示の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、治療剤にコンジュゲートされていてもよい。好適な治療剤としては、例えば、抗生物質もしくは抗微生物薬、または宿主防御ペプチド (例えば、特異的標的抗菌ペプチド (STAMP)) が挙げられる。

10

【0443】

追加の好適なコンジュゲートされた分子としては、リボヌクレアーゼ (RNase) 、DNase、アンチセンス核酸、siRNA分子などの阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成性分子、および外部ガイド配列が挙げられる。アプタマーは、ステムループまたはG-カルテットなどの定義された二次構造および三次構造にフォールドされた15~50塩基の長さの範囲の小型核酸であり、ATP (米国特許第5,631,146号) およびテオフィリン (米国特許第5,580,737号) などの小分子、ならびに逆転写酵素 (米国特許第5,786,462号) およびトロンビン (米国特許第5,543,293号) などの大分子に結合することができる。リボザイムは、分子内または分子間のいずれかで、化学反応を触媒することができる核酸分子である。リボザイムは、典型的には、標的基質の認識および結合と、その後の切断により、核酸基質を切断する。三重鎖形成性機能的核酸分子は、三重鎖を形成することによって、二本鎖または一本鎖核酸と相互作用することができ、ここで、3つのDNA鎖は、ワトソン-クリック塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成の両方に依存する複合体を形成する。三重鎖分子は、高い親和性および特異性で、標的領域に結合することができる。好適なコンジュゲートされた分子は、DNAに結合する任意のタンパク質をさらに含んでもよく、但し、バイオフィルム構造物を作出も安定化もせず、そのようなタンパク質の少なくともサブセットが、本明細書に開示される薬剤についての結合の動態を容易にし得ることが構想される。

20

30

【0444】

機能的核酸分子は、標的分子によって保有される比活性のエフェクター、阻害剤、モジュレーターおよび刺激因子として作用してもよく、または機能的核酸分子は、任意の他の分子から独立したde novo活性を保有していてもよい。

【0445】

治療剤は、多数の利用可能な方法のいずれかを使用して、直接的にまたは間接的に断片またはポリペプチドに連結することができる。例えば、薬剤は、還元された抗体構成要素のヒンジ領域で、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) などの架橋剤を使用したジスルフィド結合形成を介して、または抗体のFc領域における炭水化物部分を介して、付着することができる (Yu et al. (1994) Int. J. Cancer 56:244 ; Upeslasis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995) ; Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter

40

et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)) 。

【0446】

治療剤を抗体および抗体断片にコンジュゲートするための技法は、周知である (Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In

50

Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-58)。

10

【0447】

断片またはポリペプチドは、別の機能的分子、例えば、別の抗体または受容体のためのリガンドに連結されて、少なくとも2つまたはそれよりも多くの異なる結合部位または標的分子に結合する二特異性分子または多特異性分子を生成することができる。別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物などの1つまたは複数の他の結合分子への抗体の連結は、例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、または非共有結合的会合によって行うことができる。多特異性分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性をさらに含むことができる。

20

【0448】

二特異性分子および多特異性分子は、当技術分野において公知の方法を使用して調製することができる。例えば、二特異的分子のそれぞれの結合単位を別々に生成し、次いで、互いにコンジュゲートすることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合、各種のカップリング剤または架橋剤を、共有結合的コンジュゲーションのために使用することができる。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジルS-アセチル-L-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(OPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。結合分子が抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によってコンジュゲートすることができる。

30

【0449】

本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドはまた、固体支持体に付着されていてもよく、これは、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用である。そのような固体支持体としては、限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

40

【0450】

抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、多くの異なる担体に結合させることもできる。そのため、本開示は、断片またはポリペプチド、および活性なまたは不活性な別の物質を含有する組成物も提供する。周知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびにマグネタイトが挙げられる。担体の特質は、本明細書に開示される目的のために、可溶性または不溶性のいずれかであり得る。当業者であれば、モノクローナル抗体の結合のための他の好適な担体が公知であるか、またはルーチンの実験を使用して、それを解明することが可能であろう。

【0451】

50

上記の実施形態のうちの1つまたは複数を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる組成物が、本明細書にさらに提供される。抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、ならびに断片およびポリペプチドを組換え的に産生するか、またはそれを化学合成する方法がさらに提供される。抗体ポリペプチドおよび断片は、真核細胞もしくは原核細胞において、または当技術分野において公知のおよび本明細書に簡潔に記載される他の方法によって産生することができる。

【0452】

本明細書に開示される断片および断片を含む単離されたポリペプチドは、それらが、高レベルのエピトープ結合特異性およびバイオフィルムに対する高い結合親和性を有するように、選択されてもよい。一般に、抗体または抗体断片または抗体断片を含む単離されたポリペプチドのより高い結合親和性では、よりストリンジントな洗浄条件を、イムノアッセイにおいて行って、標的を除去することなく、非特異的に結合した材料を除去することができる。したがって、開示される方法において有用な本技術の断片および抗体断片を含む単離されたポリペプチドは、通常、少なくとも 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、または 10^{-12} Mの結合親和性を有する。ある特定の態様では、断片および抗体断片を含む単離されたポリペプチドは、少なくとも12時間、少なくとも5時間、少なくとも1時間、または少なくとも30分以内に標準的な条件下で平衡に達する十分な動態学的なオンレートをも有する。別の態様では、抗体または抗原結合性断片の親和性は、1000ピコモル (pM) 未満もしくは約1000 pM、約900 pM 未満、約800 pM 未満、約700 pM 未満、約600 pM 未満、約500 pM 未満、約400 pM 未満、約300 pM 未満、約200 pM 未満、約100 pM 未満、約50 pM 未満、約40 pM 未満、約30 pM 未満、約20 pM 未満、または約10 pM、または約9 pM、または約8 pM、または代替的に、約4 pM 未満、または代替的に、約2 pM 未満である。

【0453】

上記の実施形態のいずれかでは、ペプチドリinkerを、本明細書に開示される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドのN末端またはC末端に付加することができる。「リンカー」または「ペプチドリinker」は、ポリペプチド配列のN末端またはC末端のいずれかに連結されたペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは、約1～約20アミノ酸残基長、または代替的に、2～約10、約3～約5アミノ酸残基長である。ペプチドリinkerの例は、Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu (配列番号43) である。他の例としては、Gly-Gly-Gly (配列番号44)；Gly-Pro-Ser-Leu (配列番号45)；Gly-Pro-Ser (配列番号46)；Pro-Ser-Leu-Lys (配列番号47)；Gly-Pro-Ser-Leu-Lys (配列番号48)、およびSer-Leu-Lys-Leu (配列番号49) が挙げられる。

抗生物質

【0454】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、 β -ラクタム抗生物質は、アモキシシリンとクラブラン酸 (AMC) を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、 β -ラクタム抗生物質は、ベンザチン、ベンジルペニシリン (ペニシリンG)、ベンザチンペニシリンG、ベンザチンペニシリンV、フェノキシメチルペニシリン (ペニシリンV)、プロカインペニシリン、フェネチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、テモシリン、アモキシシリン、アンピシリン、メシリナム、ピペラシリン、カルペニシリン、チカルシリン、カルボキシペニシリン、ウレイドペニシリン、アズロシリン、メズロシリン；セファゾリン、セファレキシン、セファロスポリンC、セファロチン、セファピリン、セファクロル、セファマンドール、セフロキシム、セフォテタン、セフォキシチン、セフィキシム、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトジジム、セフトリアキソン、セフジニル、セフェピム、セフ

ピロム、セフタロリン；ピアペネム、ドリペネム、エルタペネム、ファロペネム、イミペネム、メロペネム、パニペネム、ラズペネム、テビペネム、チエナマイシン；アズトレオナム、チゲモナム、ノカルディシンA、またはタブトキシニンβ-ラクタムのうちの1つまたは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0455】

本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、スルホンアミド抗生物質は、トリメトプリムとスルファメトキサゾール（TMP-SMX）を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。本明細書に開示される任意の態様の一部の実施形態では、スルホンアミド抗生物質は、以下：スルファフラゾール；スルファセタミド、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファフラゾール（スルフィソキサゾール）、スルフィソミジン（スルフィソジミジン）、スルファメトキサゾール、スルファモキサゾール、スルファニトラン、スルファジメトキシシン、スルファメトキシピリダジン、スルファメトキシジアジン、スルファドキシシン、スルファメトピラジン、またはテレフチル（Terephthyl）のうちの1つまたは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0456】

一部の実施形態では、抗生物質は、以下：アンピシリン、アモキシシリン-クラブラン酸塩、およびセフジニルのうちの1つまたは複数を含むか、またはそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

投与プロトコール

【0457】

本明細書に開示される方法に適用可能な投与経路としては、鼻腔内、筋肉内、尿道、気管内、皮下、皮内、経皮、局所的適用、静脈内、直腸、経鼻、経口、吸入、ならびに他の腸内および非経口投与経路が挙げられる。投与経路は、薬剤および／または所望の効果に応じて、所望により、組み合わせられてもよく、または調整されてもよい。活性薬剤は、単一用量または複数回用量で投与することができる。送達に適したこれらの方法および経路の実施形態としては、全身経路または局所経路が挙げられる。一般に、本明細書に開示される方法に適した投与の経路としては、限定されるものではないが、直接注射、腸、非経口、または吸入経路が挙げられる。

【0458】

吸入投与以外の非経口投与経路としては、限定されるものではないが、局所、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、嚢内、脊髄内、胸骨内、および静脈内の経路、すなわち、消化管を通る以外の任意の投与経路が挙げられる。非経口投与は、阻害性薬剤の全身送達または局所送達をもたらすように実施することができる。全身送達が所望される場合、投与は、典型的には、医薬調節物の浸潤性のまたは全身吸収性の、局所のまたは粘膜の投与を含む。

【0459】

本明細書に開示される薬剤は、腸内投与によって対象に送達することもできる。腸内投与経路としては、限定されるものではないが、経口および直腸（例えば、坐剤を使用する）送達も挙げられる。

【0460】

皮膚または粘膜を通じた活性物の投与の方法としては、限定されるものではないが、好適な医薬調製物の局所適用、経皮的伝達、経皮伝達、注射および上皮投与が挙げられる。経皮伝達のためには、吸収促進剤またはイオントフォレーシスは、好適な方法である。イオントフォレーシス伝達は、それらの製品を、壊れていない皮膚を通じた電気パルスを紹介して連続的に、数日またはそれよりも長い期間送達する市販の「パッチ」を使用して達成することができる。

【0461】

本明細書に開示される方法のさまざまな実施形態では、干渉性薬剤は、連続して毎日、少なくとも1日1回（QD）、およびさまざま実施形態では、1日2回（BID）、1日3回（TID）またはさらに1日4回、吸入、注射または経口で投与される。典型的には

10

20

30

40

50

、治療有効一日用量は、少なくとも約 1 mg、または少なくとも約 10 mg、または少なくとも約 100 mg、または約 200～約 500 mg、および時には、化合物に応じて、最大で約 1 g～約 2.5 g 程度であろう。

【0462】

投薬は、カプセル剤、錠剤、経口懸濁剤、筋内注射用懸濁剤、静脈内注入用懸濁剤、局所適用用ゲルもしくはクリーム、または関節内注射用懸濁剤を使用して、本明細書に開示される方法に従って達成することができる。

【0463】

本明細書に記載される組成物の投薬量、毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団の 50% に致死的な用量）および ED₅₀（集団の 50% において治療的に有効な用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これは、比 LD₅₀ / ED₅₀ として表すことができる。ある特定の実施形態では、組成物は、高い治療指数を示す。毒性副作用を示す化合物が使用されてもよいが、非感染細胞への潜在的損傷を最小化し、それによって、副作用を低減するために、そのような化合物を、罹患組織の部位を標的にする送達システムを設計することに注意すべきである。

【0464】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のためのある範囲の投薬量の製剤化において使用することができる。そのような化合物の投薬量は、ある特定の実施形態では、わずかな毒性でまたは毒性なしで、ED₅₀ を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変わり得る。方法において使用される任意の化合物について、治療有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、細胞培養において決定された IC₅₀（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて処方することができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定されてもよい。

【0465】

一部の実施形態では、治療効果または予防効果を達成するために十分な組成物の有効量は、1 投与あたり体重 1 キログラムあたり約 0.000001 mg～1 投与あたり体重 1 キログラムあたり約 10,000 mg の範囲である。好適には、投薬量範囲は、1 投与あたり体重 1 キログラムあたり約 0.0001 mg～1 投与あたり体重 1 キログラムあたり約 100 mg である。投与は、初期用量、それに続いて 1 回または複数の「ブースター」用量として提供することができる。ブースター用量は、初期用量の 1 日、2 日、3 日、1 週間、2 週間、3 週間、1 か月、2 か月、3 か月、6 か月、または 12 か月後に提供することができる。一部の実施形態では、ブースター用量は、前の投与に対する対象の応答の評価後に投与される。

【0466】

当業者は、限定されるものではないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全体的な健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含む、ある特定の因子が、対象を有効に処置するために必要な投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。また、治療有効量の明細書に記載される治療用組成物による対象の処置は、単回処置または一連の処置を含むことができる。

【0467】

in vitro で実施される場合、方法は、本明細書に開示されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体もしくはその断片、宿主細胞、小分子および組成物と同じ、類似のもしくは逆の能力を有する薬剤をスクリーニングするため、またはそれを確認するために有用である。あるいは、それらは、どの薬剤が微生物感染を処置するために最も適しているかを特定するために使用することができる。例えば、DNABII ポリペプチドおよび微生物 DNA および試験される薬剤を含有する 2 つの試料を有することによって、例えば

、新しい薬剤または組合せ治療についてスクリーニングすることができる。第2の試料は、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNA、ならびに活性であることが公知の薬剤、例えば、陽性対照としての機能を果たす抗I H F抗体または小分子を含有する。さらなる態様では、いくつかの試料が提供され、薬剤は、臨床環境において対象を処置するのに有効である可能性がある最適用量を決定するために、希釈を増加させて系に添加される。当業者に明らかであるように、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを含有する陰性対照を提供することができる。さらなる態様では、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAは、例えば、互いに密接に接触した場合にシグナルを放出する発光分子を用いて、検出可能に標識される。試料は、DNA B I I ポリペプチドと微生物DNAとの間の相互作用を阻害する、競合する、または滴定する薬剤のための有効な期間、類似の条件下で含有され、次いで、試料は、発光分子からのシグナルの放出についてアッセイされる。試料がシグナルを放出する場合、薬剤は、結合を阻害するために有効ではない。

10

【0468】

別の態様では、*in vitro*方法は、感染を引き起こす微生物（細菌など）分離株がヒト／動物から単離され、次いで、培養されて、それが*in vitro*でバイオフィルムとして成長することを可能にし得る小型化チャンバースライドシステムにおいて実施され、例えば、下記の実験を参照されたい。薬剤（抗I H F抗体など）または潜在的な薬剤は、潜在的な薬剤または抗I H F（または他の抗体、小分子、薬剤など）などの薬剤の希釈を増加させて、または増加させずに、培養物に単独で、または培養物に別の薬剤を組み合わせて添加して、感染が存在した対象に送達された場合にその患者を処置するのに有効である可能性がある最適用量が見出される。当業者に明らかであるように、陽性対照および陰性対照を同時に行うことができる。

20

【0469】

さらなる態様では、方法は、フローセルにおいて薬剤（抗I H F抗体など）および／または潜在的な薬剤（単独で、または別の薬剤と組み合わせて）を用いるハイスループットプラットフォームにおいて実施される。薬剤（抗I H F抗体など）または潜在的な薬剤は、潜在的な薬剤または抗I H F（または他の抗体、小分子、薬剤など）などの薬剤の希釈を増加させて、または増加させずに、培養物に単独で、または培養物に別の薬剤を組み合わせて添加して、感染が存在した対象に送達された場合にその患者を処置するのに有効である可能性がある最適用量が見出される。バイオフィルム分離株は、超音波処理されて、微生物DNAに結合したI H FなどのDNA B I I ポリペプチドからバイオフィルム細菌が分離される。DNA B I I ポリペプチド-DNA複合体は、プラットフォームにおいて抗I H F抗体によって単離される。次いで、微生物DNAは、例えば、塩洗浄により放出され、添加されたバイオフィルム細菌を特定するために使用される。次いで、遊離したDNAは、例えば、PCR配列決定することによって特定される。DNAが遊離しない場合、薬剤は、微生物DNAが成功裏に機能するか、またはそれに結合した。DNAが試料中に見られる場合、薬剤は、DNA B I I ポリペプチド-微生物DNA結合に干渉しなかった。当業者に明らかであるように、陽性対照および／または陰性対照を同時に行うことができる。

30

【0470】

別の態様では、本明細書に開示される薬剤または抗体のうちの1つまたは複数は、*in vivo*でバイオフィルムを検出する方法において使用される。さらなる実施形態では、薬剤または抗体は、例えば、発光分子または蛍光分子で検出可能に標識される。本明細書に開示される方法のさらなる適用としては、例えば、バイオフィルムへの結合の際に検出可能なシグナルを提供する検出可能に標識された一次薬剤もしくは一次抗体、またはそれがバイオフィルムに結合した場合に一次薬剤または一次抗体に結合する検出可能に標識された二次抗体を使用して、バイオフィルムを画像化するためのそのような薬剤または抗体の使用の方法が挙げられる。

40

【0471】

上記の方法はまた、所与の細菌種が、別のものよりもある薬剤によるそのバイオフィル

50

ムの反転に対してよりよく応答する可能性があるので、診断試験として使用することができ、この迅速なハイスループットアッセイシステムは、当業者が、可能性のある薬剤のパネルをアッセイして、群の最も効果的なものを特定することを可能にし得る。

【0472】

これらの方法の利点は、ほとんどの病院内の臨床微生物検査室が、液体培養において（またはプランクトン様に）成長している細菌を使用するこれらいくつかのアッセイ（すなわち、MIC、MBC値の決定）を行うための既に設備が整っていることである。当業者に明らかであるように、細菌は、一般に、それらが疾患を引き起こしている場合、プランクトン様に成長しない。代わりに、それらは、安定なバイオフィームとして成長しており、これらのバイオフィームは、抗生物質、抗体または他の治療薬による処置に対して有意に耐性がより高い。この耐性は、ほとんどのMIC/MBC値が*in vivo*での有効性を正確に予測することができない理由である。そのため、どの「用量」の薬剤が（上記に記載されるように）*in vitro*で細菌バイオフィームを反転させ得るかを決定することによって、出願人の前臨床アッセイは、個別化医療の適用としてでさえも、臨床有効性のより信頼性のある予測因子になるであろう。

【0473】

臨床環境に加えて、方法は、工業環境において、感染を引き起こす微生物を特定するため、および／または有効な薬剤を確認するために使用することができる。

【0474】

上記の方法のさらなる態様では、基礎となる感染の成長を阻害することが公知の抗生物質または抗微生物薬を、連続してまたは同時的に添加して、感染が阻害され得るかを決定する。薬剤を微生物DNAまたはDNABEIポリペプチドに添加した後、複合体を添加して、バイオフィーム阻害についてアッセイすることも可能である。

【0475】

非ヒト動物、例えば、チンチラにおいて*in vivo*で実施される場合、方法は、単独で、またはバイオフィームを壊す他の薬剤と組み合わせて使用され得る薬剤を特定するための前臨床スクリーニングを提供する。

【0476】

別の態様では、有効量のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、抗体またはその抗原結合性断片を対象に投与し、それによって、微生物性バイオフィームを阻害する、防止する、溶解する、または壊すことによる、対象におけるバイオフィームを阻害する、溶解する、防止する、または壊す方法が本明細書に提供される。

【0477】

代替的に、または加えて、バイオフィームを阻害する、溶解する、防止する、または壊す方法は、*in vitro*および／または*ex vivo*で実施されてもよく、対象から採取されたかまたは*in vitro*で生成したバイオフィームの試料を提供するステップ、および有効量のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、抗体またはその抗原結合性断片を投与し、それによって微生物性バイオフィームを阻害し、防止し、または壊すステップを含む。同様に、本明細書に開示される組成物は、限定されるものではないが、病院の装置、産業機器、および生きている組織を構成しない他の材料などのバイオフィームによってコロニー形成される表面上の微生物性バイオフィームを阻害する、防止する、または壊すための方法の実施形態において使用されてもよい。

【0478】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、抗体またはその抗原結合性断片のうちの1つまたは複数、単独でまたは組み合わせて投与するステップを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれを含む。開示される方法のさらなる実施形態では、薬剤は、同時に投与されてもよい。代替の実施形態では、抗体は、連続して投与される。

【0479】

それを必要とする対象において免疫応答を誘導する、またはそれに対する受動免疫を付

10

20

30

40

50

与するための方法であって、有効量の本明細書に開示されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、抗体またはその抗原結合性断片のうちの1つまたは複数を対象に投与するステップを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる、方法も本明細書に提供される。

【0480】

一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ポリクローナル抗体ではない。

【0481】

さらなる態様では、方法は、有効量の抗微生物薬、抗原ペプチドまたはアジュバントのうちの1つまたは複数を対象に投与するステップをさらに含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0482】

抗微生物剤の非限定的な例は、表面抗原、例えば、OMP P5、rSPiLA、OMP 26、OMP P2、またはIV型ピリントリタンパク質などのワクチン構成要素に対する抗体である (Jurcisek and Bakaletz (2007) J. Bacteriology 189(10): 3868-3875; Murphy et al. (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal 28:S121-S126; Novotny et al. (2015) Mol Microbiol. 96(2):276-92を参照されたい)。

【0483】

本明細書に開示される薬剤および組成物は、他の抗微生物剤および／または表面抗原とともに、同時にまたは連続して投与することができる。特定の一態様では、投与は、例えば、直接注射によって、または吸入によって、感染の部位に局所的である。投与の他の非限定的な例としては、経皮、尿道、舌下、直腸、経膈、眼内、皮下、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、吸入による、または経口を含む1つまたは複数の方法によるものが挙げられる。

【0484】

これらの微生物感染は、上気道、中気道および下気道に存在し得る（耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、それだけでなく、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の悪化、慢性咳、嚢胞性線維症（CF）の合併症および／またはCFの主原因、ならびに市中感染性肺炎（CAP））。そのため、本明細書に開示されるin vivo方法を実施することによって、これらの疾患およびこれらの感染からの合併症を、防止または処置することもできる。

【0485】

感染症はまた、口腔（虫歯、歯周炎）において起こり、Streptococcus mutans、Porphyromonas gingivalis、Aggregatibacter actinomycetemcomitansによって引き起こされる可能性がある。感染症はまた、皮膚に局在し（膿瘍、「ブドウ球菌」感染症、膿疱疹、熱傷の二次感染症、ライム病）、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Pseudomonas aeruginosaおよびBorrelia burgdorferiによって引き起こされる可能性がある。尿路感染症（UTI）を処置することもでき、これは、典型的には、Escherichia coliによって引き起こされる。胃腸管感染症（GI）（下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍）は、典型的には、Salmonella enterica serovar、Vibrio choleraeおよびHelicobacter pyloriによって引き起こされる。生殖器感染症は、Neisseria gonorrhoeaeを含み、典型的には、これによって引き起こされる。感染症は、Enterococcus faecalisによって引き起こされる膀胱の感染症または留置デバイスの感染症であり得る。典型的には、各種の細菌によって引き起こされる、移植されたプロステシスデバイス、例えば、人工腎部もしくは膝置換物、または歯科インプラント、または医療デバイス、例えば、ポンプ、カテーテル、ステントもしくはモニタリングシステムに関連する感染症は、本明細書に開示される方法によって処置することができる。これらのデバイスは、本明細書に記載される薬剤でコーティングすることができ、またはそれにコンジュゲートすることができる。そのため、本明細書に開示されるin vivo方法を

10

20

30

40

50

実施することによって、これらの疾患およびこれらの感染からの合併症を、防止または処置することもできる。

【0486】

*Streptococcus agalactiae*によって引き起こされる感染症は、本明細書に開示される方法によって処置することもでき、それは、新生児における細菌性敗血症の主原因である。髄膜炎を引き起こし得る *Neisseria meningitidis* によって引き起こされる感染症も、処置することができる。

【0487】

一部の実施形態では、抗体の生物学的に活性な断片は、アミノ末端またはカルボキシル末端（またはその両方）のいずれかに最大で25個、または代替的に、20個、または代替的に、15個、または代替的に、最大で10個、または代替的に、最大で5個のランダムなアミノ酸の付加を有する、抗体の重鎖および軽鎖、その抗原結合性断片、CDR、ならびにそれらのそれぞれの等価物を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる単離されたポリペプチドを含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。生物学的に活性な断片は、検出可能なマーカ—または精製マーカ—をさらに含むことができる。

【0488】

一部の実施形態では、ペプチドおよび／または抗体の生物学的に活性な断片は、本明細書に開示されるポリペプチド、または断片、またはそれらのそれぞれの等価物のうちの1つ、2つもしくはそれよりも多く、または3つもしくはそれよりも多く、4つもしくはそれよりも多く、5つしくはそれよりも多く、6つしくはそれよりも多く、7つしくはそれよりも多く、8つしくはそれよりも多く、9つしくはそれよりも多く、10もしくはそれよりも多く、11もしくはそれよりも多く、12もしくはそれよりも多く、13もしくはそれよりも多く、14もしくはそれよりも多く、またはすべてを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドを含むか、あるいはそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれからなる。

【0489】

上記の実施形態のいずれかでは、ペプチドリンカ—を、ポリペプチドのN末端またはC末端に付加することができる。「リンカ—」または「ペプチドリンカ—」は、ポリペプチド配列のN末端またはC末端のいずれかに連結されたペプチド配列を指す。一態様では、リンカ—は、約1～約20アミノ酸残基長、または代替的に、2～約10、約3～約5アミノ酸残基長である。ペプチドリンカ—の例は、Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu（配列番号）である。他の例としては、Gly-Gly-Gly；Gly-Pro-Ser-Leu（配列番号）；Gly-Pro-Ser；Pro-Ser-Leu-Lys（配列番号）；Gly-Pro-Ser-Leu-Lys（配列番号）、およびSer-Leu-Lys-Leu（配列番号）が挙げられる。

【0490】

本明細書に開示される単離されたポリペプチドは、原核宿主細胞および真核宿主細胞から組換え的に産生されたポリペプチドおよびタンパク質、ならびにそのムテイン、アナログおよび断片を含むことが意図され、そのような細胞の例は上記に記載されている。一部の実施形態では、この用語は、本明細書に記載される抗体および抗イディオタイプ抗体も含む。そのようなポリペプチドは、当技術分野において公知のおよび本明細書に簡潔に記載される方法を使用して、単離または産生することができる。

【0491】

野生型ポリペプチドまたはタンパク質の機能的等価物またはバリエ—、例えば、アミノ酸の保存的アミノ酸置換を有するものも、本開示の範囲内であることが理解される。

【0492】

さらなる態様では、ポリペプチドを、検出可能な標識または薬剤にコンジュゲートまたは連結して、ポリペプチドの半減期を増加させ、例えば、ペグ化、PEG模倣物、ポリシ

10

20

30

40

50

アル化、HES化、またはグリコシル化である。好適な標識は、当技術分野において公知であり、本明細書に記載される。

【0493】

またさらなる態様では、検出可能な標識を有するまたは有しないポリペプチドは、宿主原核細胞、または真核宿主細胞、例えば、樹状細胞に含有され得るか、またはその表面上で発現され得る。

【0494】

タンパク質およびポリペプチドは、精製、化学合成、および組換え方法を含む当業者に公知のいくつかのプロセスによって得られる。ポリペプチドは、抗体による免疫沈降、ならびに標準的な技法、例えば、ゲル濾過、イオン交換、逆相、およびアフィニティークロマトグラフィーなどの方法によって宿主細胞系などの調製物から単離することができる。そのような方法論について、例えば、Deutscher et al. (1999) Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology (Vol. 182, Academic Press)を参照さ

れたい。したがって、本開示は、これらのポリペプチドを得るためのプロセス、ならびにこれらのプロセスによって得られ得るおよび得られる産物も提供する。

【0495】

ポリペプチドは、市販の自動ペプチド合成機、例えば、Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc.、モデル430Aまたは431A、Foster City, Calif.、USAによって製造されたものを使用する化学合成によって得ることもできる。合成されたポリペプチドは、沈殿させ、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってさらに精製することができる。したがって、本開示は、タンパク質および試薬、例えば、アミノ酸および酵素の配列を提供すること、およびアミノ酸を適正な方向および線状配列と一緒に連結することによって、本明細書に開示されるタンパク質を化学合成するためのプロセスも提供する。

【0496】

あるいは、タンパク質およびポリペプチドは、本明細書に記載される宿主細胞およびベクター系を使用して、例えば、Sambrook et al. (1989)、上記に記載されている周知の組換え方法によって得ることができる。

【0497】

診断方法における使用のための検出可能な薬剤にコンジュゲートされた本明細書に記載されるポリペプチドも本出願によって提供される。一部の実施形態では、DNABIIポリペプチドのテール領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのテール領域、IHFAもしくはIHF Bのテール領域、および/またはテールキメラペプチドIhfA3-IhfB2_{NTHI}を含む)に対して特異的である抗体は、バイオフィルムの検出のための診断アッセイにおいて特に有用であり、単独で、または本明細書に記載される1つもしくは複数の抗体と組み合わせて使用することができる。一態様では、テール領域に対して特異的な抗体は、DNABIIポリペプチドのチップ領域(限定されるものではないが、IHFもしくはHUのチップ領域、IHFAもしくはIHF Bのチップ領域、および/またはチップキメラペプチドIhfA5-mIhfB4_{NTHI}を含む)に対して特異的な抗体のためのコンパニオン診断として使用される。

【0498】

改変を本明細書に開示されるペプチドに対して行って、変更された特性をそれらに提供することができることは、当業者に周知である。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および/もしくは非天然アミノ酸、または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンならびにDまたはL光学異性体の両方、ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣薬を含む。3個またはそれよりも多くのアミノ酸のペプチドは、ペプチド鎖が短い場合には、一般に、オリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長い場合、ペプチドは、一般に、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

【0499】

本明細書に開示されるペプチドは、非天然アミノ酸を含むように改変することができる。そのため、ペプチドは、ペプチドに特別な特性を伝えるために、D-アミノ酸、L-アミノ酸の組合せ、およびさまざまな「デザイナー」アミノ酸（例えば、ベーターメチルアミノ酸、C-アルファメチルアミノ酸、およびN-アルファメチルアミノ酸など）を含んでいてもよい。加えて、特定のカップリングステップで特定のアミノ酸を割り当てることによって、アルファヘリックス、ベータターン、ベータシート、ガンマターンを有するペプチド、および環状ペプチドを生成することができる。一般に、アルファヘリックス二次構造またはランダム二次構造が、特に役立ち得ると考えられる。

【0500】

本明細書に開示されるポリペプチドは、さまざまな固相担体、例えば、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、もしくは医療用インプラント、または液相担体、例えば、ビーズ、滅菌溶液もしくは水溶液、薬学的に許容される担体、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、懸濁液、およびエマルジョンと組み合わせることもできる。非水性溶媒の例としては、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコール、および植物油が挙げられる。抗体を調製するために、または *in vivo* で免疫応答を誘導するために使用される場合、担体は、特異的免疫応答を非特異的に増大させるのに有用であるアジュバントを含むこともできる。当業者は、アジュバントが必要であるかどうかを容易に決定することができ、1つを選択することができる。しかしながら、説明だけの目的のために、好適なアジュバントとしては、限定されるものではないが、フロイント完全アジュバントおよび不完全アジュバント、無機塩、ならびにポリヌクレオチドが挙げられる。他の好適なアジュバントとしては、モノホスホリルリピドA (MPL)、E. coli の易熱性エンテロトキシンの突然変異誘導体、コレラ毒素の突然変異誘導体、CPGオリゴヌクレオチド、およびスクアレンに由来するアジュバントが挙げられる。

【0501】

本開示は、本明細書に開示されるポリペプチド、アナログ、ムテイン、もしくは断片のいずれかを、単独で、または互いにもしくは他の薬剤、例えば、抗生物質および許容される担体もしくは固相支持体と組み合わせて、含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる医薬組成物も提供する。これらの組成物は、本明細書に記載されるさまざまな診断方法および治療方法に有用である。

ポリヌクレオチド

【0502】

上記で特定された抗体、その断片、CDR、単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチド、およびそれらのそれぞれの相補鎖のうちの1つまたは複数をコードする単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドも提供される。単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを含むベクターが、さらに提供され、その例は、当技術分野において公知であり、本明細書に簡潔に記載する。2つ以上の単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドが単一単位として発現される一態様では、単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドは、多シストロン性ベクター内に含有され得る。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、mRNA、または干渉RNA、例えば、siRNA、miRNA、もしくはdsRNAであり得る。そのようなポリヌクレオチドおよびベクターは、対象に投与すること、および抗体、ポリペプチドまたは生物学的に活性な断片を発現させることを介して、抗体、ポリペプチド、またはそれらのそれぞれの生物学的に活性な断片を必要とする対象に送達するために使用することができる。

【0503】

別の態様では、本開示は、DNAの微生物性バイオフィーム中のポリペプチドまたはタンパク質への結合を妨げるポリヌクレオチド、またはホリディジャンクションに類似する4方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークに類似する3方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、またはベントポリヌクレオチドである干渉性薬剤を提供し、これは、DNABIIポリヌクレオチド(HUまたはI

H F) が微生物 DNA に結合するのを処置または阻害することができ、同様に、バイオフィルム形成ならびに関連する感染症および障害を処置、防止または阻害することができる。当業者は、本明細書に提供される情報および当業者の知識を使用して、そのようなポリヌクレオチドを作製することができる。Goodman and Kay (1999) J. Biological Chem. 274(52):37004-37011 および Kamashev and Rouviere-Yaniv (2000) EMBO J. 19(23):6527-6535 を参照されたい。

【0504】

本開示は、RNA 転写のプロモーター、ならびに DNA もしくは RNA の複製および／または一過性もしくは安定な発現のための他の調節配列に作動可能に連結された単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドをさらに提供する。本明細書で使 10
用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、プロモーターが、DNA 分子からの RNA の転写を方向付けるような様式で配置されることを意味する。そのようなプロモーターの例は、SP6、T4、および T7 である。ある特定の実施形態では、細胞特異的プロモーターは、挿入されるポリヌクレオチドの細胞特異的発現のために使用される。プロモーターまたはプロモーター／エンハンサーを、終止コドン、および選択マーカー配列、ならびに挿入された DNA 小片をそのプロモーターに作動可能に連結させることができるクローニング部位とともに含有するベクターは、当技術分野において公知であり、市販されている。一般的な方法論およびクローニング戦略について、Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) およびそこで引用 20
された参考

文献、ならびにマップ、機能的特性、商業的供給業者、およびさまざまな好適なベクターの GenEMBL 受託番号に対する参照を含有する Vectors: Essential Data Series (Gacsa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)) を参照されたい。

【0505】

一実施形態では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドに由来するポリヌクレオチドは、本明細書に記載される診断的なおよび治療的な有用性を有するポリペプチドまたはタンパク質、ならびに存在していてもよく、または存在していなくてもよいタンパク質の転写物を特定するためのプローブをコードする。これらの核酸断片は、例えば、より大きなポリヌクレオチドの制限酵素消化によって調製され、次いで、検出可能なマーカーによっ 30
て標識することができる。あるいは、ランダムな断片を、分子のニック翻訳を使用して生成することができる。そのような断片の調製および標識化のための方法論について、Sambrook et al. (1989)、上記を参照されたい。

【0506】

これらの核酸分子を含有する発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを産生するための宿主ベクター系を得るために有用である。これらの発現ベクターが、エピソームとして、または染色体 DNA の不可欠な部分としてのいずれかで、宿主生物において複製可能でなければならないことが意味される。好適な発現ベクターの非限定的な例としては、プラスミド、酵母ベクター、ウイルスベクター、およびリポソームが挙げられる。アデノウイルスベクターは、in vitro および in vivo の両方で、それらの高レ 40
ベルの発現および細胞の効率的な形質転換を理由として、遺伝子を in vivo で組織に導入するために特に有用である。核酸が、好適な宿主細胞、例えば、原核細胞または真核細胞に挿入されると、宿主細胞は、複製し、タンパク質を、組換え的に産生することができる。好適な宿主細胞は、ベクターに依存し、公知の方法を使用して構築された哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を含み得る。Sambrook et al. (1989)、上記を参照されたい。外因性核酸の細胞への挿入のためのウイルスベクターの使用に加えて、核酸を、当技術分野において公知の方法、例えば、細菌細胞のための形質転換；哺乳動物細胞のためのリン酸カルシウム沈殿を使用するトランスフェクション；または DEAE-デキストラン；電気穿孔；またはマイクロインジェクションによって、宿主細胞に挿入することができる。方法論について、Sambrook 50

et al. (1989)、上記を参照されたい。そのため、本開示は、タンパク質またはポリペプチドまたは抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、動物細胞（ラットまたはマウス）、ヒト細胞、または原核細胞、例えば、細菌細胞も提供する。

【0507】

ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への改変は、ポリヌクレオチドのアセンブリー前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、標識化構成要素とのコンジュゲーションによって、重合後にさらに改変され得る。この用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。他に規定または要求されない限り、ポリヌクレオチドである本明細書に開示される任意の実施形態は、二本鎖形態、および二本鎖形態を構成することが公知のまたは予測される2つの相補的一本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。

【0508】

ベクターが、本明細書に開示される方法において、*in vivo*または*ex vivo*の遺伝子治療として使用される場合、薬学的に許容されるベクター、例えば、複製インコンピテントレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターは、例示的なものであり（しかし限定的ではない）、特に役立ち得る。本明細書に開示される核酸を含有する薬学的に許容されるベクターは、挿入されるポリヌクレオチドの一過性または安定な発現のためにさらに改変することができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容されるベクター」という用語は、限定されるものではないが、核酸を分裂している細胞に選択的に標的にし、導入する能力を有するベクターまたは送達ビヒクルを含む。そのようなベクターの例は、ウイルスタンパク質を産生することができないこと、感染した宿主細胞においてベクターの伝播が不可能であることによって定義される「複製インコンピテント」ベクターである。複製インコンピテントレトロウイルスベクターの例は、LNL6 (Miller et al. (1989) BioTechniques 7:980-990) である。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介遺伝子移入のために複製インコンピテントレトロウイルスを使用する方法論は確立されている (Bordignon (1989) PNAS USA 86:8912-8952; Culver (1991) PNAS USA 88:3155; および Rill (1991) Blood 79(10):2694-2700)。

【0509】

本開示は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含有および／または発現する遺伝子改変細胞も提供する。遺伝子改変細胞は、プロモーターおよび遺伝子活性化因子などの上流の調節配列の挿入によって産生することができる（米国特許第5,733,761号を参照されたい）。一実施形態では、改変細胞は、真核細胞または原核細胞である。

【0510】

ポリヌクレオチドは、細胞における核酸の検出および／または遺伝子の発現のための検出可能なマーカー、例えば、酵素標識または放射性同位元素にコンジュゲートすることができる。検出可能なシグナルを与えることができる蛍光、放射活性、酵素、または他のリガンド、例えば、アビジン／ビオチンを含む、多種多様な適切な検出マーカーが当技術分野において公知である。一態様では、放射活性のまたは他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識または酵素タグ、例えば、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼもしくはペルオキシダーゼを用いることが望ましい可能性がある。酵素タグの場合では、熱量測定指標基質を用いて、人間の眼に見える手段を提供することができ、または分光光度法で、相補的核酸含有試料との特異的ハイブリダイゼーションを特定することができる。そのため、本開示は、標的の一本鎖ポリヌクレオチドを、相補的一本鎖ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件（必要に応じて、中ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）下で、または必要に応じて、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示されるポリヌクレオチドの一部である標識された一本鎖ポリヌクレオチド（プローブ）と接触させることによって、一本鎖ポリヌクレオチドまたはその相補体を検出するための方法をさらに提供する。ハイブリダイズされたポリ

ヌクレオチド対を、ハイブリダイズされていない一本鎖ポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズされたポリヌクレオチド対は、当業者に公知の方法、および例えば、Sambrook et al. (1989)、上記に示される方法を使用して検出される。

【0511】

本開示において具体化されるポリヌクレオチドは、化学合成、組換えクローニング方法、PCR、またはそれらの任意の組合せを使用して得ることができる。ポリヌクレオチド化学合成の方法は、当技術分野において公知であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。当業者は、本明細書に提供される配列データを使用して、DNA合成機を用いることによって、または商業的サービスから注文することによって、所望のポリヌクレオチドを得ることができる。

【0512】

本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、PCRを使用して単離または複製することができる。PCR技術は、米国特許第4,683,195号；同第4,800,159号；同第4,754,065号；および同第4,683,202号の主題であり、PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al. eds., Birkhauser Press, Boston (1994))またはMacPherson et al. (1991)および(1995)、上記、ならびにそこで引用された参考文献に記載されている。あるいは、当業者は、本明細書に提供される配列および市販のDNA合成機を使用して、DNAを複製することができる。したがって、本開示は、ポリヌクレオチドの線状配列、ヌクレオチド、適切なプライマー分子、化学物質、例えば、酵素、およびそれらの複製のための説明書を提供すること、ならびにポリヌクレオチドを得るためにヌクレオチドを適正な方向に化学的に複製するか、または連結することによる、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを得るためのプロセスも提供する。別々の実施形態では、これらのポリヌクレオチドは、さらに単離されている。またさらに、当業者は、ポリヌクレオチドを好適な複製ベクターに挿入することができ、ベクターを複製および増幅のために好適な宿主細胞（原核細胞または真核細胞）に挿入することができる。そのように増幅されたDNAは、当業者に公知の方法によって細胞から単離することができる。この方法によってポリヌクレオチドを得るためのプロセス、ならびにそのように得られたポリヌクレオチドが、本明細書にさらに提供される。

【0513】

RNAは、最初に、DNAポリヌクレオチドを好適な宿主細胞に挿入することによって得ることができる。DNAは、任意の適切な方法によって、例えば、適切な遺伝子送達ビヒクル（例えば、リボソーム、プラスミド、またはベクター）の使用によって、または電気穿孔によって、送達することができる。細胞が複製され、DNAがRNAに転写されると、次いで、RNAは、当業者に公知の方法、例えば、Sambrook et al. (1989)、上記に示される方法を使用して単離することができる。例えば、mRNAは、Sambrook et al. (1989)、上記に示される手順に従ってさまざまな溶菌酵素もしくは化学溶液を使用して単離することができ、または製造業者によって提供された添付の説明書に従って核酸結合樹脂によって抽出することができる。

【0514】

本明細書に開示されるポリヌクレオチドに対する配列相補性または相同性を示すポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとして、または本明細書で特定された特異的ポリヌクレオチドの等価物として有用である。転写物の全コード配列が公知であるので、この配列または相同配列の任意の部分は、本明細書に開示される方法において使用することができる。

【0515】

「完全一致」プローブが、特異的ハイブリダイゼーションのために必要ではないことは公知である。少数の塩基の置換、欠失、または挿入によって達成されるプローブ配列のマイナーな変化は、ハイブリダイゼーションの特異性に影響を及ぼさない。一般に、20%程度の塩基対のミスマッチ（最適に整列させた場合）が許容され得る。一部の実施形態では、前述のmRNAを検出するために有用なプローブは、相同領域に対して少なくとも約

10

20

30

40

50

80%同一である。一部の実施形態では、プローブは、相同領域のアライメント後、対応する遺伝子配列に対して85%同一であり、一部の実施形態では、これは、90%の同一性を示す。

【0516】

これらのプローブは、放射アッセイ（例えば、サザンブロットおよびノーザンブロット分析）において使用して、さまざまな細胞またはこれらの細胞を含有する組織を検出、予知、診断、またはモニターすることができる。プローブは、本明細書に開示されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現の検出のためのハイスループットスクリーニングアッセイにおける使用のために、固相支持体、またはチップなどのアレイに付着させることもできる。したがって、本開示は、ハイスループットスクリーニングにおける使用のための固相支持体に付着した、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、またはその等価物、またはその相補体、またはその断片を含むか、またはそれに対応するプローブも提供する。

10

【0517】

断片の総サイズ、ならびに相補的ストレッチのサイズは、特定の核酸セグメントの意図される使用または適用に依存する。より小さな断片は、一般に、ハイブリダイゼーション実施形態における使用が見出され、ここで、相補領域の長さは、例えば、少なくとも5～10～約100ヌクレオチド、またはさらには検出しようとする相補配列に応じて全長まで変わり得る。

【0518】

5ヌクレオチド超～10ヌクレオチドの長さのストレッチにわたる相補配列を有するヌクレオチドプローブは、一般に、ハイブリッドの安定性および選択性を増加させ、それによって、得られた特定のハイブリッド分子の特異性を改善するために十分に適している。ある特定の実施形態では、10ヌクレオチドもしくはそれよりも長い、または50ヌクレオチドの長さよりも長い、または望ましい場合はさらにより長い遺伝子相補ストレッチを有するポリヌクレオチドを設計することができる。そのような断片は、例えば、化学的手段により断片を直接合成することによって、核酸再生技術、例えば、米国特許第4,603,102号に記載される2つのプライミングオリゴヌクレオチドを用いるPCR技術の適用によって、または組換え産生のための組換えベクターに選択された配列を導入することによって、容易に調製され得る。一態様では、プローブは、約50～75ヌクレオチドもしくはそれよりも長い、あるいは50～100ヌクレオチドの長さである。

20

30

【0519】

本開示のポリヌクレオチドは、本明細書に記載される細胞において発現される遺伝子または遺伝子転写物の検出のためのプライマーとしての機能を果たすことができる。この文脈では、増幅は、妥当な忠実度で標的配列を複製することができるプライマー依存性ポリメラーゼを用いる任意の方法を意味する。増幅は、T7 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素などの天然または組換えDNAポリメラーゼによって行われてもよい。説明だけの目的で、プライマーは、プローブに関して同定された長さと同じ長さである。

【0520】

ポリヌクレオチドを増幅するための一方法は、PCRであり、PCR増幅のためのキットが市販されている。増幅後、得られたDNA断片を、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって、例えば、アガロースゲル電気泳動とそれに続く臭化エチジウム染色および紫外線照射による可視化によって、検出することができる。

40

【0521】

細胞に有効量の遺伝子送達ベクターまたはビヒクルを投与するための方法が開発されており、当業者に公知であり、本明細書に記載される。細胞における遺伝子発現を検出するための方法は、当技術分野において公知であり、DNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション、PCR、RNAse保護アッセイ、およびノーザンブロット分析などの技法が挙げられる。そのような方法は、細胞における遺伝子の発現を検出および定量するために有用である。あるいは、コードされるポリペ

50

プチドの発現を、さまざまな方法によって検出することができる。特に、標的ポリペプチドに特異的な反応性のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製することは有用である。そのような抗体は、免疫組織学、E L I S A、およびウエスタンブロットなどの技法を使用して、ポリペプチドを発現する細胞を可視化するために有用である。これらの技法を使用して、発現されたポリヌクレオチドの発現レベルを決定することができる。

産生方法

【0522】

抗体、断片、C D R、またはポリペプチドを産生する方法であって、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはC D Rをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、ポリヌクレオチドの発現のための条件下で培養するステップ、ならびに必要に応じて、細胞および／または培養物から抗体、断片、C D R、および／またはポリペプチドを単離するステップを含むか、または代替的にそれからなるか、またはまたさらにそれからなる方法も提供される。加えて、ポリヌクレオチドの発現のための条件下の、抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、またはC D Rをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞も提供される。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞または原核細胞である。さらなる実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。

組成物

【0523】

組成物がさらに提供される。組成物は、担体、ならびに本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞、本明細書に開示される小分子、または抗体および／もしくは抗原結合断片のうちの1つまたは複数を含む。担体は、固体支持体または薬学的に許容される担体のうちの1つまたは複数であり得る。組成物は、アジュバント、またはワクチンとしての投与に好適な他の構成要素をさらに含むことができる。一態様では、組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、担体および／またはアジュバントとともに製剤化される。加えて、本開示の組成物の実施形態は、1つまたは複数の薬学的に許容される物質とともに製剤化された、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、小分子、本明細書に開示される単離された宿主細胞、または本開示の抗体のうちの1つまたは複数を含む。

【0524】

経口調製物について、本明細書に記載される単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチド、本明細書に記載される単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチド、本明細書に記載されるベクター、本明細書に記載される単離された宿主細胞、本明細書に記載される小分子または抗体もしくはその断片のうちのいずれか1つまたは複数は、単独で、あるいは化合物を、錠剤、散剤、顆粒剤もしくはカプセル剤を作製するための適切な添加物と組み合わせて、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプンもしくはジャガイモデンプンなどの従来の添加物；結晶性セルロース、セルロース誘導体、アカシア、トウモロコシデンプンもしくはゼラチンなどの結合剤；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンもしくはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどの崩壊剤；タルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；および所望により、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、保存剤および香味剤と組み合わせて含むか、またはこれから本質的になる本明細書に開示される医薬製剤において使用することができる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント材料を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トロージ剤などは、以下の成分または類似の特性の化合物のいずれかを含有することができる：微結晶性セルロース、トラガカントガムもしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、P r i m o g e lもしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはS t e r o t e sなどの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香味料

などの香味剤。

【0525】

経口投与に好適な医薬製剤および単位用量形態は、慢性状態、感染症の処置、および患者が薬物を自己投与する治療において特に有用である。一態様では、製剤は、小児投与に特異的である。

【0526】

本開示は、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞、または本明細書に開示される抗体のうちの1つまたは複数が、所望により、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤および保存剤または他の抗微生物剤などの従来の添加物とともに、植物油もしくは他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコールなどの水性または非水性溶媒に溶解、懸濁または乳化することによって、本開示による注射用調製物に製剤化され得る、医薬製剤を提供する。そのような非限定的な例は、表面抗原、例えば、OMP P5、OMP 26、OMP P2またはIV型ピリントパク質 (Jurcisek and Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875およびMurphy, T F, Bakaletz, L O and Smeesters, P R (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126を参照されたい) などの他のワクチン構成要素、および抗微生物剤などの抗微生物剤である。静脈内投与のためには、好適な担体としては、生理的静菌水、Cremophor EL (商標) (BASF、Parsippany、N. J.) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。すべての場合で、非経口投与のための組成物は、滅菌されていなければならない、容易な注射可能性が存在する程度に流動性でなければならない。

【0527】

本開示によって提供されるエアロゾル製剤は、吸入を介して投与することができ、噴霧剤または非噴霧剤ベースであり得る。例えば、本明細書に開示される医薬製剤の実施形態は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容される噴霧剤中に製剤化された本明細書に開示される化合物を含む。吸入による投与のためには、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧された容器もしくはディスペンサー、または噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達することができる。非噴霧剤の非限定的な例は、機械力 (すなわち、その指でピストンを押し下げる、または容器の圧縮、例えば、容器の壁に適用される圧縮力、もしくは例えば弾性囊によって、壁それ自身によって発揮される弾性力による) によって閉鎖容器から噴出されるポンプスプレーである。

【0528】

本明細書に開示される坐剤は、本明細書に開示される化合物を、乳化基剤または水溶性基剤などの各種の基剤のいずれかと混合することによって、調製することができる。本明細書に開示される化合物のこの医薬製剤の実施形態は、坐剤により直腸投与することができる。坐剤は、体温で融解するが、室温で凝固するビヒクル、例えば、カカオバター、カルボワックスおよびポリエチレングリコールを含むことができる。

【0529】

経口または直腸投与のための単位剤形、例えば、シロップ剤、エリキシル剤および懸濁剤が提供され得、ここで、それぞれの投薬量単位、例えば、ディースプーン、テーブルスプーン、錠剤または坐剤は、本明細書に開示される1つまたは複数の化合物を含有する所定の量の組成物を含有する。同様に、注射または静脈内投与のための単位剤形は、滅菌水、生理食塩水または別の薬学的に許容される担体中の溶液として、組成物中に本明細書に開示される化合物を含んでいてもよい。

【0530】

本明細書に開示される医薬製剤の実施形態は、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベク

10

20

30

40

50

ター、本開示における使用のための小分子、本明細書に開示される単離された宿主細胞、または本明細書に開示される抗体もしくはその断片のうちの1つまたは複数が、注射用組成物に製剤化されるものを含む。本明細書に開示される注射用医薬製剤は、液体の液剤もしくは懸濁剤として；または注射前の液体ビヒクルへの溶解もしくは懸濁に好適な固体形態として調製される。調製物は、本明細書に開示される医薬製剤の他の実施形態に従って、乳化されていてもよく、またはリポソームビヒクルに封入された活性成分であってもよい。

【0531】

ある実施形態では、本明細書に開示される単離されたポリペプチド、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド、本明細書に開示されるベクター、本明細書に開示される単離された宿主細胞、または本明細書に開示される抗体のうちの1つまたは複数は、持続送達システムによる送達のために製剤化される。「持続送達システム」という用語は、本明細書で「制御送達システム」と互換的に使用され、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた、持続的（例えば、制御された）送達デバイス（例えば、ポンプ）を包含し、多種多様なものが当技術分野において公知である。

10

【0532】

機械的または電気機械的注入ポンプも、本開示による使用に好適であり得る。そのようなデバイスの例としては、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号；同第5,820,589号；同第5,643,207号；同第6,198,966号などに記載されているものが挙げられる。一般に、本明細書に開示される化合物の送達は、各種の詰め替え可能なポンプシステムのいずれかを使用して、達成することができる。ポンプは、経時的に一貫した制御放出を提供する。一部の実施形態では、本明細書に開示される化合物は、薬物不透過性リザーバーにおける液体製剤中にあり、持続的様式で個体に送達される。

20

【0533】

一実施形態では、薬物送達システムは、少なくとも部分的に植込み型デバイスである。植込み型デバイスは、当技術分野において周知の方法およびデバイスを使用して、任意の好適な植込み部位に植え込むことができる。植込み部位は、薬物送達デバイスが導入され、設置される、対象の身体内の部位である。植込み部位は、必ずしも限定されるものではないが、真皮下、皮下、筋肉内、または対象の身体内の他の好適な部位が挙げられる。皮下植込み部位は、一部の実施形態では、薬物送達デバイスの植込みおよび除去における便宜のために、使用される。

30

【0534】

本開示における使用に好適な薬物放出デバイスは、各種の操作の方式のいずれか、例えば、いくつかの供給業者、例えばBioDegmerおよびSigma-Aldrichから市販されているポリ（グリコリド-コーラクチド）（PGLA）などのポリマーに基づいていてもよい。例えば、薬物放出デバイスは、拡散システム、対流システムまたは侵食可能システム（例えば、侵食に基づくシステム）に基づくことができる。例えば、薬物放出デバイスは、電気化学ポンプ、浸透圧ポンプ、電気浸透圧ポンプ、蒸気圧ポンプまたは浸透圧バーストマトリックスであり得、例えば、ここで、薬物は、ポリマー（例えば、PGLA）に組み込まれ、ポリマーは、薬物含浸ポリマー材料（例えば、生分解性の薬物含浸ポリマー材料）の分解に付随して薬物製剤の放出を提供する。他の実施形態では、薬物放出デバイスは、電気拡散システム、電解ポンプ、発泡ポンプ、圧電ポンプ、加水分解システムなどに基づく。

40

【0535】

機械的または電気機械的注入ポンプに基づく薬物放出デバイスも、本開示による使用に好適であり得る。そのようなデバイスの例としては、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号などに記載されているものが挙げられる。一般に、対象

50

処置方法は、各種の詰め替え可能なポンプシステム、交換不可能なポンプシステムのいずれかを使用して達成することができる。ポンプおよび他の対流システムは、それらの一般により一貫性のある経時的な制御放出に起因して利用されてもよい。浸透圧ポンプは、一部の実施形態では、より一貫性のある制御放出および比較的小さいサイズというそれらの複合的利点に起因して使用される（例えば、PCT国際出願公開第WO97/27840ならびに米国特許第5,985,305号および同第5,728,396号を参照されたい）。本開示における使用に好適な例示的な浸透圧駆動デバイスは、必ずしも限定されるものではないが、米国特許第3,760,984号；同第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,923,426号；同第3,987,790号；同第3,995,631号；同第3,916,899号；同第4,016,880号；同第4,036,228号；同第4,111,202号；同第4,111,203号；同第4,203,440号；同第4,203,442号；同第4,210,139号；同第4,327,725号；同第4,627,850号；同第4,865,845号；同第5,057,318号；同第5,059,423号；同第5,112,614号；同第5,137,727号；同第5,234,692号；同第5,234,693号；同第5,728,396号などに記載されているものが挙げられる。本開示に適應され得るさらなる例示的なデバイスは、Synchromed注入ポンプ（Medtronic）である。

10

【0536】

一部の実施形態では、薬物送達デバイスは、植込み型デバイスである。薬物送達デバイスは、当技術分野において周知の方法およびデバイスを使用して、任意の好適な植込み部位に植え込むことができる。本明細書で述べられるように、植込み部位は、薬物送達デバイスが導入され、設置される、対象の身体内の部位である。植込み部位は、必ずしも限定されるものではないが、真皮下、皮下、筋肉内、または対象の身体内の他の好適な部位が挙げられる。

20

【0537】

本明細書に開示される化合物のための好適な賦形剤ビヒクルは、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。加えて、所望により、ビヒクルは、湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有していてもよい。そのような剤形を調製する方法は、公知であるか、または本開示の考慮の際に、当業者に明らかになるであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 17th edition, 1985を参照されたい。投与される組成物または製剤は、いずれにしても、処置されている

30

対象における所望の状態を達成するために適切な化合物の含量を含有する。

【0538】

本開示の組成物は、持続放出マトリックスまたは制御放出マトリックスを含むものを含む。加えて、本開示の実施形態は、持続放出製剤を使用する他の処置と併せて使用することができる。本明細書で使用される場合、持続放出マトリックスは、酵素的にもしくは酸に基づく加水分解によって、または溶解によって分解可能である材料、通常は、ポリマーから作製されたマトリックスである。身体に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液による作用を受ける。持続放出マトリックスは、望ましくは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチドc o -グリコリド（乳酸およびグリコール酸のコポリマー）、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、カルボン酸（carboxylic acid）、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン（phenylalanine）、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリ

40

ビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンおよびシリコーンなどの生体適合性材料から選択される。実例となる生分解性マトリックスとしては、ポリラクチドマトリックス、ポリグリコリドマトリックス、およびポリラクチドc o -グリコリド（乳酸およびグリコール

50

酸のコポリマー)マトリックスが挙げられる。

【0539】

別の実施形態では、ポリペプチド、抗体またはその断片(および組合せ組成物)は、制御放出システムにおいて送達される。例えば、本明細書に開示される化合物は、静脈内注入、植込み型浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与の方式を使用して投与されてもよい。一実施形態では、ポンプが使用されてもよい(Sefton (1987) C RC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574)。別の実施形態では、ポリマー材料が使用される。また別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的、すなわち、肝臓の近位に配置され、このようにして、全身用量のごく一部しか必要としない。また別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的に近位に配置され、このようにして、全身性のごく一部しか必要としない。他の制御放出システムは、L anger (1990) Science 249:1527-1533による概説において議論されている。

10

【0540】

別の実施形態では、本開示の組成物(および別々のまたは一緒にの組合せ組成物)は、組成物を送達するための、吸収性材料、例えば、縫合糸、包帯およびガーゼへの本明細書に記載される阻害性薬剤の含浸によって形成されたもの、または固相材料、例えば、手術用ステープル、ジッパーおよびカテーテルの表面にコーティングされたものを含む。この種類の他の送達システムは、本開示を考慮して、当業者に容易に明らかであろう。

【0541】

本開示は、微生物感染症の処置のための、干渉性薬剤のうちの1つまたは複数の宿主(例えば、ヒト)への投与のための方法および組成物を提供する。さまざまな実施形態では、本明細書に開示されるこれらの方法は、in vivoおよびex vivo方法、ならびに全身および局部投与経路を含む、薬物送達に好適なほとんどの任意の利用可能な方法および経路に及ぶ。

20

製剤および共製剤

【0542】

本明細書に提供される開示は、本明細書で上記に開示されたものなどの薬学的に許容される賦形剤と一緒に、本明細書に開示される薬剤の特定の製剤および共製剤を企図する。

【0543】

具体的な態様では、本開示は、単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドを特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む製剤または共製剤を提供する。本明細書に開示される抗体は、それらが、高レベルのエピトープ結合特異性およびバイオフィルムに対する高い結合親和性を有するように、選択されてもよい。一般に、抗体のより高い結合親和性では、よりストリンジェントな洗浄条件を、イムノアッセイにおいて行って、標的を除去することなく、非特異的に結合した材料を除去することができる。したがって、開示される方法において有用な本技術の抗体は、通常、少なくとも 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、または 10^{-12} Mの結合親和性を有する。ある特定の態様では、抗体は、少なくとも12時間、少なくとも5時間、少なくとも1時間、または少なくとも30分以内に標準的な条件下で平衡に達する十分な動態学的なオンレート(結合速度)を有する。別の態様では、抗体または抗原結合性断片の親和性は、1000ピコモル(pM)未満もしくは約1000 pM、900 pM、800 pM、700 pM、600 pM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、約100 pM、50 pM、40 pM、30 pM、20 pM、10 pM、9 pM、8 pM、7 pM、6 pM、5 pM、または4 pMである。

30

【0544】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約0.1 mg/mL~約200 mg/mL、または代替的に、約1~約150 mg/mL、または代替的に、約2 mg/mL~約100 mg/mL、または代替的に、約3 mg/mL~約80 mg/mL、または代替的に、約4 mg/mL~約50 mg/mL、または代替的に、約5 mg/mL~

40

50

約 20 mg/mL の濃度で製剤中に存在する。一部の実施形態では、抗体は、少なくとも約 1 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 2 mg/mL、少なくとも約 3 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 4 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 5 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 6 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 7 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 8 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 9 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 10 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 15 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 20 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 30 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 40 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 50 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 60 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 70 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 80 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 90 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 100 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 120 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 150 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 200 mg/mL の濃度で存在する。一部の実施形態では、複数の抗体のうちの少なくとも 1 つは、少なくとも約 1 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 2 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 3 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 4 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 5 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 6 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 7 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 8 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 9 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 10 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 15 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 20 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 30 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 40 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 50 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 60 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 70 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 80 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 90 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 100 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 120 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 150 mg/mL、または代替的に、少なくとも約 200 mg/mL の濃度で存在する。

10

20

【0545】

複数の異なる抗体が抗体共製剤に含まれる一部の実施形態では、異なる抗体は、実質的に等しい濃度で存在していてもよい。そのような実施形態の別の態様では、異なる抗体の 1 つまたは複数の抗体は、他の抗体よりも実質的に高い濃度で、例えば、約 1.5 : 1、または代替的に、約 1.5 : 1 : 1、または代替的に、約 1.5 : 1 : 1 : 1、または代替的に、約 2 : 1、または代替的に、約 2 : 1 : 1、または代替的に、約 2 : 1 : 1 : 1、または代替的に、少なくとも約 2.5 : 1、または代替的に、少なくとも約 2.5 : 1 : 1、または代替的に、少なくとも約 2.5 : 1 : 1 : 1 の比で存在していてもよい。

30

【0546】

一部の実施形態では、共製剤は、A5、その断片もしくは等価物（例えば、重複、または mB4 などの別のものと組み合わせる）のうちの 2 つもしくはそれよりも多く、または mB4 ポリペプチド、その断片もしくは等価物のうちの 2 つもしくはそれよりも多く、または A5 と組み合わせる mB4、そのそれぞれの断片もしくは等価物から本質的になる、単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドを特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれを含む。一部の実施形態では、製剤中の 1 つまたは複数の抗体は、ポリクローナル抗体ではない。一部の実施形態では、この製剤は、治療法として使用される。

40

【0547】

一部の実施形態では、共製剤は、A1 ~ A4 もしくは A6 もしくは B1 ~ B6、またはそれらの断片もしくは等価物のうちの 2 つまたはそれよりも多くから本質的になる単離されたポリペプチドまたは組換えポリペプチドを特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体を含むか、あるいは代替的にそれから本質的になるか、あるいはまたさらにそれを含む。一部の実施形態では、製剤中の 1 つまたは複数の抗体は、ポリクローナル

50

抗体ではない。一部の実施形態では、この製剤は、診断法として使用される。

【0548】

抗体の製剤および共製剤を安定に製剤化する方法は、当技術分野に開示される技法に従って行うことができ、例えば、米国特許公開第US2011/0059079号を参照されたい。

【0549】

本発明のキメラタンパク質に対して機能する抗体の投与を介した受動免疫療法によって宿主に短期の保護を付与することも可能である。そのため、本発明の抗体は、受動免疫療法において使用され得る。ヒト免疫グロブリンは、異種免疫グロブリンが、その外来免疫原性構成要素に対する免疫応答を起こさせ得るので、ヒト医薬において好ましい。そのような受動免疫は、特定のリスクに対する免疫されていない個々の対象の即時保護のための緊急事態において使用され得る。

スクリーニングアッセイ

【0550】

本開示は、本明細書に記載されるポリクローナル抗体と等価なモノクローナル抗体などの等価な薬剤、および活性薬剤の活性をモジュレートするさまざまな薬剤、および本明細書に開示される医薬組成物、または本明細書に開示されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもしくはペプチド産物の機能についてスクリーニングするための方法を提供する。本開示の目的のために、「薬剤」は、限定されるものではないが、単純なもしくは複雑な有機もしくは無機分子（本明細書で、核酸などの小分子と称される）、ペプチド、タンパク質（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド（アンチセンス）、またはリボザイムなどの生体化合物または化学化合物を含むことを意図する。広範囲の化合物、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどのポリマー、ならびにさまざまなコア構造に基づく合成有機化合物を合成することができ、これらも、「薬剤」という用語に含まれる。加えて、さまざまな天然の起源が、スクリーニングのための化合物、例えば、植物または動物抽出物などを提供することができる。常に明確に記述されていないが、薬剤が、単独で、または本発明のスクリーニングによって特定された薬剤と同じもしくは異なる生物活性を有する別の薬剤と組み合わせて使用されることが理解されるべきである。

【0551】

小分子化合物などの薬剤の潜在的な阻害効果または結合効果（すなわち、相互作用または会合）を、コンピューターモデリング技法の使用によって、その実際の合成および試験前に分析してもよい。所与の化合物の理論的構造が、バイオフィームおよび／またはDNA B I Iタンパク質におけるそれと微生物DNAとの間の不十分な相互作用ならびに会合を示唆する場合、薬剤の合成および試験を回避することができる。しかしながら、コンピューターモデリングが強い相互作用を示す場合、薬剤を合成し、*in vitro*または*in vivo*実験などのさまざまな方法を使用して、結合する能力または相互作用を阻害するその能力について試験することができる。単独でまたは別の薬剤と併せたバイオフィームを阻害または滴定する薬剤の能力を試験する方法が本明細書に開示される。この様式では、効力がない薬剤および化合物の合成を回避することができる。

【0552】

当業者は、DNA B I Iまたは微生物DNAと、より詳細には、特異的結合部位と会合するそれらの能力について、化学実体もしくは生物実体または断片をスクリーニングするいくつかの方法のいずれかを使用してもよい。次いで、選択された断片または化学実体を、各種の方向で配置してもよく、またはDNAもしくはDNA B I Iポリペプチドの個々の結合部位内でドッキングさせてもよい。ドッキングは、QUANTA、SYBYLなどのソフトウェア、それに続いてエネルギー最小化および標準的な分子機械力場による分子動力学、例えば、CHARMMおよびAMBERを使用して達成されてもよい。

【0553】

市販のコンピュータープログラムも、*in silico*設計のために利用可能である。例としては、限定されないが、GRID (Oxford University、Ox

10

20

30

40

50

ford、UK)、MCSS (Molecular Simulations, Burlington, Mass.)、AUTODOCK (Scripps Research Institute, La Jolla, Calif.)、DOCK (University of California, San Francisco, Calif.)、GLIDE (Schrodinger Inc.)、FlexX (Tripos Inc.) および GOLD (Cambridge Crystallographic Data Centre) が挙げられる。

【0554】

薬剤または化合物が、上記の方法によって設計または選択されたら、薬剤または化合物が互いに結合し得る効率を試験し、コンピューター評価によって最適化することができる。例えば、有効な DNABII 断片は、その結合状態と遊離状態（すなわち、結合の小さい変形エネルギー）との間のエネルギーの比較的小さな相違を実証し得る。

10

【0555】

設計または選択された化合物は、その結合状態において、それが必要に応じて標的タンパク質との静電反発相互作用を欠き得るように、コンピューターでさらに最適化され得る。そのような非相補的（例えば、静電）相互作用としては、反発性の電荷－電荷相互作用、双極子－双極子相互作用、および電荷－双極子相互作用が挙げられる。具体的には、薬剤または化合物がいずれかの薬剤に結合した場合のバイオフィルム中の薬剤および DNABII ならびに／または微生物 DNA の間のすべての静電相互作用の合計は、必要に応じて結合のエンタルピーに中立的にまたは好ましく寄与する。

20

【0556】

コンピューターソフトウェアも、化合物の変形エネルギーおよび静電相互作用を評価するために当技術分野で使用可能である。例としては、限定されないが、Gaussian 92 [Gaussian, Inc., Pittsburgh, Pa.] ; AMBER [University of California at San Francisco] ; QUANTA/CHARMM [Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass.] ; および Insight II/Discover [Biosym Technologies Inc., San Diego, Calif.] が挙げられる。

【0557】

結合薬剤が、上記に記載されるように最適に選択または設計されたら、次いで、その結合特性を改善または改変するために、置換を、その原子または側鎖基の一部に行ってもよい。一般に、最初の置換は保存的である、すなわち、置き換え基は、元の基とおおよそ同じサイズ、形状、疎水性、および電荷を有する。当然ながら、コンフォメーションを変更することが当技術分野において公知の構成要素が回避されるべきであることが理解されるべきである。次いで、そのような置換された化学化合物を、上記で詳細に記載される同じコンピューター方法によってバイオフィルム中の DNABII タンパク質および／または微生物 DNA へのフィットの効率について分析してもよい。

30

【0558】

ある特定の実施形態は、本明細書に開示されるタンパク質またはポリヌクレオチドと相互作用することができる小分子をスクリーニングするための方法に関する。本開示の目的のために、「小分子」は、一実施形態では、目的のタンパク質に結合することができ、それによって、タンパク質の機能を変更する低分子量 (MW) を有する分子である。一部の実施形態では、小分子の MW は、1,000 以下である。タンパク質機能を変更することができる小分子をスクリーニングするための方法は、当技術分野において公知である。例えば、細胞における小分子－タンパク質相互作用を検出するための小型化アレイアッセイが、You et al. (1997) Chem. Biol. 4:961-968 によって議論されている。

40

【0559】

スクリーニング方法を *in vitro* で実施するために、処置される微生物に感染した好適な細胞培養物または組織が、最初に提供される。細胞を、密度依存的な制約なしで

50

、指數的増殖に達する条件（温度、成長または培養培地、および気体（CO₂））下で、適切な期間、培養する。対照として、感染していない追加の別々の細胞培養物を維持することも望ましい。

【0560】

当業者に明らかであるように、好適な細胞を、マイクロタイタープレートにおいて培養することができ、いくつかの薬剤を、遺伝子型変化、表現型変化または微生物力価の低減に注目することによって同時にアッセイすることができる。

【0561】

薬剤が、上記に記載される小分子などのDNAまたはRNA以外の組成物である場合、薬剤は、細胞培養物に直接的に添加することができ、または添加のために、培養培地に添加することができる。当業者に明らかであるように、経験的に決定することができる「有効」量が添加されなければならない。

【0562】

薬剤が、抗体または抗原結合性断片である場合、薬剤は、競合的ELISAを行うための条件下で、標的抗原および本明細書に記載されるポリクローナル抗体と接触させることができ、またはそれとともにインキュベートすることができる。そのような方法は、当業者に公知である。

【0563】

アッセイは、対象において行うこともできる。対象が、ラット、チンチラ、マウスまたはサルなどの動物である場合、方法は、ヒト患者における薬剤の臨床試験の前に使用することができる便利な動物モデル系を提供する。この系では、疾患または微生物感染症の症状が、同じ感染を有する未処置動物とそれぞれ比較して、低減または排除される場合、候補薬剤は、見込みがある薬物である。比較のための基礎を提供する、健康な処置されない細胞または動物の別々の陰性対照群を有することも有用であり得る。

【0564】

薬剤および組成物は、医薬組成物における活性成分などの、医薬の製造において、ならびに従来の手順に従った投与によるヒトおよび他の動物の処置のために使用することができる。

併用療法

【0565】

本開示の組成物および関連する方法は、他の療法の投与と組み合わせて使用されてもよい。これらとしては、限定されるものではないが、DNase酵素、抗生物質、抗微生物薬、抗感染症薬、抗真菌薬、抗寄生生物薬、抗ウイルス薬、または他の抗体の投与が挙げられる。

【0566】

一部の実施形態では、方法および組成物は、抗DNABII抗体と相乗的に作用するデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）酵素を含む。DNaseは、DNA骨格におけるホスホジエステル連結の切断を触媒する任意の酵素である。十字型構造だけでなく、DNAの各種の二次構造も標的にすることが公知のDNase酵素の3つの非限定的な例としては、DNase I、T4 EndoVII、T7 Endo I、RuvABC、およびRusAが挙げられる。ある特定の実施形態では、バイオフィルムを不安定化するために必要な抗DNABII抗体の有効量は、DNaseと組み合わせた場合に低減される。in vitroで投与される場合、DNaseは、アッセイに直接的に、または酵素を安定化することが公知の好適な緩衝液中で添加することができる。DNaseの有効な単位用量およびアッセイ条件は、変わり得、当技術分野において公知の手順に従って最適化することができる。

【0567】

他の実施形態では、方法および組成物は、抗生物質および／または抗微生物薬と組み合わせることができる。抗微生物薬は、細菌、真菌または原生動物などの微生物を死滅させるか、またはその成長を阻害する物質である。バイオフィルムは、一般に、抗生物質の作

10

20

30

40

50

用に対して耐性であるが、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、バイオフィルムが関与する感染症を、感染症を処置するための従来の治療方法に対して感受性にすることができる。他の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物と組み合わせた抗生物質または抗微生物薬の使用は、抗微生物薬および／またはバイオフィルム低減剤の有効量の低減を可能にする。本開示の方法と組み合わせて有用な抗微生物薬および抗生物質の一部の非限定的な例としては、アモキシシリン、アモキシシリン-クラブラン酸塩、セフジニル、アジスロマイシンおよびスルファメトキサゾール-トリメトプリムが挙げられる。バイオフィルム低減剤と組み合わせた抗微生物薬および／または抗生物質の治療有効用量は、従来の方法によって容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィルム低減剤と組み合わせた抗微生物剤の用量は、他の細菌感染症、例えば、感染の病因がバイオフィルムを含まない細菌感染症において有効であることが示された平均有効用量である。他の実施形態では、用量は、平均有効用量の0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0または5倍である。抗生物質または抗微生物薬は、抗DNA B I I抗体の添加の前に、それと同時的にまたはその後に添加することができる。

10

【0568】

他の実施形態では、方法および組成物は、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることができる。本明細書に記載される方法および組成物と組み合わせて有用な抗体の一例は、無関係の外膜タンパク質（すなわち、OMP P5）に対する抗体である。この抗体単独による処置は、*in vitro*でバイオフィルムを減量しない。この抗体およびバイオフィルム低減剤による組み合わせ療法は、同じ濃度で単独で使用された試薬のいずれかによって達成されるものよりも高い効果をもたらす。バイオフィルム低減剤またはバイオフィルムを低減する方法と組み合わせた場合に相乗効果を生じ得る他の抗体としては、抗rsP i l A、抗OMP 26、抗OMP P2および抗全OMP調製物が挙げられる。

20

【0569】

本明細書に記載される組成物および方法を使用して、バイオフィルムが関与する細菌感染症を、バイオフィルムなしの細菌感染症の処置において有効であるが、そうでなければバイオフィルムが関与する細菌感染症の処置において効果がない一般的な治療モダリティに対して感受性にすることができる。他の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、バイオフィルムが関与する細菌感染症の処置において有効な治療モダリティと組み合わせて使用することができるが、そのような追加の療法およびバイオフィルム低減剤または方法の組合せは、相乗効果を生じ、その結果、バイオフィルム低減剤または追加の治療剤のいずれかの有効用量が低減され得る。他の事例では、そのような追加の療法およびバイオフィルム低減剤または方法の組合せは、処置が増強されるような相乗効果を生じる。処置の増強は、感染症を処置するのに必要なより短い時間によって証拠付けられ得る。

30

【0570】

追加の治療的処置は、バイオフィルムを低減するために使用される方法もしくは組成物の前に、それと同時的に、またはその後に追加することができ、同じ製剤／組成物内に、または別々の製剤／組成物として含有され得る。

40

キット

【0571】

本明細書に記載される*in vitro*および*in vivo*方法を行うために必要な薬剤および説明書を含有するキットも特許請求の範囲に記載される。したがって、本開示は、本明細書に定義されるように、抗体、抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞、ならびに本明細書に開示される方法を行う、例えば、試料を収集する、および／またはスクリーニングを行う、および／または結果を分析する、および／または抗体、抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主

50

細胞の有効量の投与のための説明書を含み得る、これらの方法を行うためのキットを提供する。これらは、単独でまたは他の好適な抗微生物剤と組み合わせて使用することができる。

【0572】

例えば、キットは、上記で特定された薬剤、例えば、抗体、抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞のうちのいずれか1つもしくは複数、および使用説明書を含み得るか、または代替的に本質的にそれからなり得るか、またはまたさらにそれからなり得る。キットは、アジュバント、抗原ペプチド、または抗微生物薬のうちの1つまたは複数をさらに含むことができる。担体の例としては、液体担体、薬学的に許容される担体、固相担体、薬学的に許容される担体、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、または医療用インプラントが挙げられる。

10

【0573】

本明細書に記載される *in vitro* および *in vivo* 方法を行うために必要な薬剤および説明書を含むキットも特許請求の範囲に記載される。したがって、本開示は、本明細書に定義されるように、本明細書に開示される薬剤、ならびに本明細書に開示される方法を行う、例えば、試料を収集する、および／またはスクリーニングを行う、および／または結果を分析する、および／または薬剤の有効量の投与のための説明書を含み得る、これらの方法を行うためのキットを提供する。これらは、単独でまたは他の好適な抗微生物剤と組み合わせて使用することができる。

20

【0574】

例えば、キットは、いずれか1つまたは複数の上記で特定された薬剤、例えば、単離されたポリペプチドもしくは組換えポリペプチド、またはそれらのそれぞれの断片もしくは等価物；上記で述べたポリペプチドのうちのいずれか1つをコードする単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチド；抗体またはその断片：および使用説明書を含み得るか、あるいは代替的にそれから本質的になり得るか、あるいはまたさらにそれからなり得る。キットは、アジュバント、抗原ペプチド、または抗微生物薬のうちの1つまたは複数をさらに含むことができる。担体の例としては、液体担体、薬学的に許容される担体、固相担体、薬学的に許容される担体、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科用インプラント、または医療用インプラントが挙げられる。

30

【実施例】

【0575】

以下の実施例は、説明することを意図し、本明細書に開示される実施形態を限定するものではない。

実験方法

実験番号 1 — 抗体媒介分散対抗体媒介破壊によるバイオフィルムから新たに放出された (NRel) 分類不可能な *Haemophilus influenzae* は表現型的に明確に異なる

【0576】

ここで使用した2つの標的抗血清の機構および動態が非常に異なるという事実にもかかわらず、NTHI バイオフィルムの抗 *rsPIA* 抗体または抗 *DNA BII* 抗体への曝露の転帰は、周囲環境に耐性のバイオフィルム所在からの NTHI の放出である。いくつかの研究室からの先駆的研究は、バイオフィルムから放出された細菌が、それらのバイオフィルム内対応物またはプランクトン様対応物とは明確に異なる表現型を実証する (Chua et al., 2014; Marks et al., 2013; Sauer et al., 2004) ことを明らかにしている。注目すべきは、これらの放出された細菌の共通の特徴が、さらにプランクトン様に成長した細菌によって示されるものよりも高い抗生物質死滅に対する感受性である (Brockson et al., 2014; Chambers et al., 2017; Goodwine et al., 2019; Mokrzan et al., 2018)。興味深いことに、グルタミン酸塩または

40

50

一酸化窒素のいずれかへの曝露によるバイオフィルムから放出された *P. aeruginosa* は、互いと比較してトブラマイシンおよび／またはコリスチンに対する可変の感受性を示したが、両方の集団は、それらのプランクトン様対応物よりも抗生物質死滅に対して感受性がより高かった (Chambers et al., 2017; Petrova and Sauer, 2016)。出願人は、抗 *rsPilA* 抗体による二重種バイオフィルムから放出された *NTHI* および *M. catarrhalis* が、それらの寒天成長対応物よりも、それぞれ、トリメトプリムとスルファメトキサゾールまたはクラリスロマイシンのいずれかによる死滅に対して有意に感受性がより高いことを示した (Mokrzan et al., 2018)。また、抗生物質と組み合わせて抗 *DNA BII* 抗体に曝露された *NTHI* バイオフィルムは、*in vitro* で、OM を処置するために使用される 3 つすべてのファーストライン抗生物質 (例えば、アンピシリン、アモキシシリン-クラブラン酸塩、セフジニル) による新たに放出された *NTHI* の死滅を有意に増大する (Brockson et al., 2014)。さらに、出願人の *in vivo* 研究は、アミノグリコシド抗生物質のトブラマイシンと組み合わせた抗 *DNA BII* 抗体による処置が、抗体または抗生物質単独による処置と比較して、マウス肺からの *P. aeruginosa* の根絶に対する追加の利益を付与することを実証する (Novotny et al., 2016)。

10

20

30

40

50

【0577】

本明細書では、出願人は、モデル生物として *NTHI* を使用して、本明細書の以下で「*NRel*」と称される新たに放出された細菌の表現型をさらに特徴付けた。*NTHI* が、抗 *DNA BII* 抗体と比較して、抗 *rsPilA* によってバイオフィルムから放出される固有の方法を考慮すると、出願人は、すべての発現したタンパク質の存在量 (定量的質量分析によって決定される通り)、標的トランスクリプトミクス、フローサイトメトリーおよびスルホンアミド抗生物質または β -ラクタム抗生物質による死滅に対する敏感性の比較分析を使用して、抗 *rsPilA* 誘導 *NRel NTHI* (Novotny et al., 2015) が、これらの 2 つの集団の遺伝的同一性にもかかわらず、抗 *DNA BII* 誘導 *NRel NTHI* (Brockson et al., 2014) と表現型的に異なったかどうかを調べた。

【0578】

抗 *rsPilA* 抗体または抗 *IHF* 抗体との *NTHI* バイオフィルムのインキュベーションは、バイオフィルム所在から *NTHI* を放出した。

【0579】

これまでに、出願人は、*NRel* 状態へのバイオフィルム内在細菌の抗 *rsPilA* 抗体または抗 *DNA BII* 抗体媒介放出の 2 つの機構と転帰との間の広範な相違を示しており、ここでは、表 2 に示される 2 つの新たな識別を追加した (Devaraj et al., 2015; Goodman et al., 2011; Novotny et al., 2013a; Novotny et al., 2016)。この理解においてさらにここで拡張するために、出願人は、最初に、抗 *rsPilA* 血清または抗 *IHF* 血清のいずれかから単離されたウサギポリクローナル *IgG* とのインキュベーション後にバイオフィルム所在から放出された *NTHI* の数を定量化した。無菌培養培地から、またはナイーブ血清もしくは確立された *NTHI* バイオフィルムを分散させない *NTHI* 付着因子外膜タンパク質 *P5* (*OMP P5*) (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2015) に対する抗血清から回収された同等の濃度のポリクローナル *IgG* は、陰性対照としての役割を果たした。出願人の以前の研究は、16 時間確立され、抗 *rsPilA* とともにインキュベートされた *NTHI* バイオフィルムが、6 時間後に最大に分散されるが (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2015)、同様に熟成したバイオフィルムの完全な崩壊は、抗 *IHF* により 15 分後に達成される (Novotny et al., 2019) ことを明らかにしている。そのため、このアッセイについて、抗 *rsPilA* または抗 *IHF* によって誘導された *NRel* を、それぞれ、6 時間または 15 分のいずれかで計数のために収集した (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2019; Novotny et al., 2015)。

【0580】

表 2. 抗 *rsPilA* または抗 *IHF* によって媒介される *NRel* 状態へのバイオフィルム所在から

の NTHI 放出の機構間の相違
【表 2】

	抗 rsPilA	抗 IHF
抗原の場所	NTHI 表面(Bakaletz et al., 2005)	バイオフィーム構造上の根幹(Goodman et al., 2011)
NTHI の寄与	能動-天然/プログラム化(Novotny et al., 2015)	受動-人工的に誘導
放出スピード	遅い(Novotny et al., 2015)	速い(Brockson et al., 2014)
放出方式	トップダウン(Novotny et al., 2015)	一斉(Novotny et al., 2019)
NTHI 特異的抗原か?	はい	いいえ、種に依存しない(Goodman et al., 2011)
誘導期における NRel か?	いいえ(本研究)	はい(本研究)
凝集体として放出	いいえ(本研究)	はい(本研究)
バイオフィームからの放出を定義するために使用される用語	分散	破壊

10

20

30

40

50

【0581】

ナイブ血清または抗OMP P5血清のいずれからのポリクローナルIgGとともにインキュベートされたバイオフィーム上の上清から回収されたNTHIの濃度は、無菌SBHIとともにインキュベートされた場合の濃度と類似していた(図1aおよび1b)。このことは、これらの3つの処置のいずれもが、6時間または15分間のインキュベーション期間内のバイオフィームの成長およびリモデリングの天然の一部分として、細菌がバイオフィームに出入りする通常の平衡を有意に変更するとは予想されなかったもので、予期された。逆に、抗rsPilA IgGとの6時間のインキュベーションは、放出されたNTHIの濃度の有意な>2倍の増加を誘導した(図1a、 $P<0.0001$)。同様に、抗IHF IgGとの15分間のインキュベーションは、放出されたNTHIの濃度の有意な>3倍の増加を誘導した($P<0.0001$)(図1b)。図1aに同様に表すものと比較した3つの対照集団のより低い濃度は、より短い15分のインキュベーション期間を反映する。出願人は、本明細書で、バイオフィーム所在から新たに放出されたこれらのNTHIの集団を「抗rsPilA NRel」または「抗IHF NRel」と称して、2つの固有におよび特異的に標的とされた抗体の作用に起因するそれらの生成を反映し、ここで、バイオフィーム内NTHIの放出の機構および動態は異なる(表2)。

【0582】

抗rsPilA NRel集団および抗IHF NRel集団のFACS解析

【0583】

それらが回収されたNRel集団の巨視的観察において仮定され、それに基づくように、抗rsPILANRelおよび抗IHFNRelについての散乱プロファイルも明確に異なる。出願人は、フローサイトメトリーを行い、それぞれのNRel集団についての前方散乱および側方散乱のプロファイルを調べて、サイズおよび複雑性の潜在的相違を明らかにした。評価前に短く超音波処理されたNTHIの懸濁液についての散乱プロファイルは、類似のサイズの細胞（すなわち、単一細胞）の集団を明らかにしたが、より大きく、より複雑な集団（すなわち、凝集体）は、より大きい側方散乱および前方散乱によって示される細菌凝集体を有する試料において追加で観察された（図2a）。抗rsPILANRelは、単一の均一な集団が明らかになったので、個々の細胞として放出されていると思われる（図2b）。逆に、抗IHFNRelについての散乱プロファイルは、細菌凝集体および／またはバイオフィルムレムナントを示すより大きい集団を含んでいた（図2c）。また、抗IHFNRel集団は、それぞれの集団の明確に異なる特徴のさらなる証拠である、抗rsPILANRelと比較して10%大きいサイズ（図2d）および47%より複雑（図2e）であった。また、これらのデータは、分散を介して媒介されたプログラム化放出が実際に個々の細胞としての放出を好むが、破壊を介してNTHIを放出するバイオフィルムの急速な物理的崩壊は、凝集体としての放出を好むので、それぞれの抗血清がバイオフィルム所在からのNTHIの放出をどのように媒介するのかについての記載される相違に十分にフィットする（表2）。

10

【0584】

抗rsPILANRelおよび抗IHFNRelのプロテオミクス発現プロファイルは、それらのプランクトン様に成長した対応物の両方と、および重要なことには互いと明確に異なった。

20

【0585】

抗生物質による死滅に対するNRelNTHIの相対感受性における出願人の最終的な目的を考慮して、次に、出願人は、抗rsPILANRel集団および抗IHFNRel集団が、プランクトン様に成長したNTHI（抗生物質感受性またはMIC値を決定するために臨床的に使用した集団）とだけでなく、互いと、どのように表現型的に比較されるかについて疑問を持った。この核心となる疑問に対処し始めるために、出願人は、質量分光分析によって、抗rsPILANRel、抗IHFNRelおよびプランクトン様NTHI（ブロス中で対数中期まで静的に成長した）のプロテオミクス発現プロファイルを調べた。抗rsPILANRelおよび抗IHFNRelについての総プロテオミクス発現プロファイルは、主成分分析（PCA）プロットにおいてそれぞれの集団の別個の場所によって示されるように、プランクトン様NTHIとは異なった（図3a）。また、出願人は、NRel集団のプロテオミクスプロファイルが、プランクトン様細胞と異なるであろうと予期したが（Brockson et al., 2014; Mokrzan et al., 2018）、2つのNRel集団は、遺伝的同一性にもかかわらず、95%の信頼楕円によって強調されるように、互いとも非常に異なった。

30

【0586】

抗rsPILANRelまたは抗IHFNRelとプランクトン様に成長したNTHIとの間のタンパク質発現の全体的なグローバルの変化に起因して、出願人は、次に、それぞれが最初にプランクトン様NTHIと比較した後に、2つのNRel集団間で存在量の相違を有するタンパク質を調べた。それぞれ、抗rsPILANRel集団および抗IHFNRel集団におけるプランクトン様NTHI（ $P < 0.05$ ）と比較した存在量の有意な > 1.5 倍の増加または $< 2/3$ の減少を伴う合計で63および103の差次的に発現したタンパク質（DEP）が存在した（図3bおよび表1）。また、プランクトン様NTHIと比較して存在量の固有の有意差で、抗rsPILANRelは、40のタンパク質を発現し、抗IHFNRelは、80のタンパク質を発現し、これは、2つのNRel集団間の相違のさらなる証拠を提供した（図3b）。

40

【0587】

表1. NRel対プランクトン様に成長したNTHIまたは抗IHFN対抗rsPILANの比較の存在量

50

の有

意な ($P < 0.05$) 1.5 倍の増加または 2/3 の減少を有するタンパク質の概要

【表 1 - 1】

COG カテゴリ ー*	タンパク 質†	機能†	受託番号 ‡	Fc‡
抗 rsPilA NRel/プランクトン様				
エネルギー生産 および変換	®TrxA	チオレドキシン様タンパク質	AAX88118.1	5.1
	LctP	推測上の L-乳酸パーミターゼ	AAX88216.1	3.4
	NdhA	NADH デヒドロゲナーゼ	AAX87796.1	1.9
	LldD	L-乳酸デヒドロゲナーゼ	AAX88789.1	1.8
	FumC	フマル酸ヒドラターゼクラス II	AAX88535.1	-1.6
	GpsA	グリセロール-3-リン酸デヒドロ ゲナーゼ	AAX87756.1	-1.7
	®DsbE	チオール:ジスルフィド交換タン パク質	AAX88104.1	-2.3
	NrfC	Fe-S-クラスター含有ヒドロゲナ ーゼ構成要素 1	AAX88077.1	-2.3
	PpC	ホスホエノールピルビン酸カル ボキシラーゼ	AAX88226.1	-2.5
	NapA	ペリプラズム硝酸レダクターゼ	AAX87401.1	-3.8
アミノ酸輸送お よび代謝	GlpC	嫌気性グリセロール-3-リン酸デ ヒドロゲナーゼサブユニット C	AAX87714.1	-4.0
	GlpA	嫌気性グリセロール-3-リン酸デ ヒドロゲナーゼサブユニット A	AAX87716.1	-4.1
	TrpC	トリプトファン生合成タンパク 質 TrpCF	AAX88545.1	12.5
	®HisJ	ほぼ確実なアミノ酸 ABC トラ ンスポーター結合タンパク質シ	AAX88089.1	2.3

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	SodA	[Mn]スーパーオキシドジスムターゼ	AAX88097.1	1.7
	FtnB	フェリチン様タンパク質 2	AAX88550.1	-1.7
	NrfA	チトクロム c552	AAX88079.1	-8.1
	NrfB	チトクロム C 型タンパク質	AAX88078.1	-9.9
翻訳後改変、タンパク質代謝回転、シャペロン	TrxA	チオレドキシン様タンパク質	AAX88118.1	5.1
	PdgX	ペルオキシレドキシン/グルタレドキシン	AAX87624.1	2.0
	ClpB	ATP 依存性シャペロン	AAX87905.1	1.7
	OrfG	形質転換に関与する遺伝子座中の保存されている仮説上の 21.9kD のタンパク質	AAX87485.1	1.6
	RadA	DNA 修復タンパク質 RadA ホモログ	AAX88271.1	-1.8
	DsbE	チオール:ジスルフィド交換タンパク質	AAX88104.1	-2.3
	CcmA	ヘム排出タンパク質 A	AAX88098.1	-2.7
細胞表層バイオジェネシス	LpxC	UDP-3-O-[3-ヒドロキシミリストール]N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ	AAX88145.1	2.3
	LpsA	リポオリゴ糖グリコシルトランスフェラーゼ	AAX87813.1	-1.5
	FtsI	ペプチドグリカンシンテターゼ	AAX88133.1	-3.3
	TolA	細胞表層完全性内膜タンパク質	AAX87438.1	-4.0
補酵素代謝	NTHI0175	保存されている仮説上のタンパク質 SAM 依存性メチルトラン	AAX87158.1	3.6

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

		スフェラーゼ		
	PdxH	ピリドキサミン 5'-リン酸オキシダーゼ	AAX87909.1	-1.6
	MenC	O-スクシニル安息香酸シンターゼ	AAX88008.1	-2.7
DNA 複製、組換えおよび修復	RecN	DNA 修復タンパク質	AAX87073.1	1.7
	UvrB	UvrABC 系タンパク質 B	AAX88673.1	-1.6
翻訳、リボソーム構造およびバ イオジェネシス	RbfA	リボソーム結合因子 A	AAX88605.1	1.5
	PrfB	ペプチド鎖放出因子 2	AAX88210.1	-1.8
転写	AsnC	調節タンパク質 AsnC	AAX87611.1	1.6
	Sxy	DNA 形質転換タンパク質 TfoX	AAX87644.1	-1.8
ヌクレオチド輸送および代謝	CyaA	アデニル酸シクラーゼ	AAX87755.1	2.3
シグナル伝達	HisJ	ほぼ確実なアミノ酸 ABC トランスポーター結合タンパク質シ スチンインポート	AAX88089.1	2.3
細胞内輸送	ExbD	輸送タンパク質	AAX87311.1	2.1
一般的な機能予 測のみ	NTHI1703	保存されている仮説上のオキシ ドレダクターゼ	AAX88493.1	1.9
	Hfq	宿主因子 I タンパク質 Hfq	AAX87465.1	-1.7
	NTHI0732	予測される HAD スーパーファ ミリーのヒドロラーゼ	AAX87648.1	-1.9
	NTHI0053	保存されている仮説上のタンパ ク質	AAX87048.1	-1.9

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	NTHI0249	保存されている仮説上のタンパク質	AAX87219.1	-1.9
機能未知	NTHI1214	保存されている推定上のガンマ-カルボキシムコノラクトンデカルボキシラーゼサブユニット	AAX88067.1	1.7
	NTHI1503	仮説上のタンパク質	AAX88314.1	-1.6
	NTHI0349	保存されている仮説上のタンパク質	AAX87303.1	-4.8
抗 IHF NRel/プランクトン様				
翻訳、リボソーム構造およびバ イオジェネシス	RpsQ	30S リボソームタンパク質 S17	AAX87834.1	2.8
	NTHI0364	保存されている仮説上のタンパク質リボソーム関連阻害剤 A	AAX87316.1	2.0
	RpmE	50S リボソームタンパク質 L31	AAX87806.1	1.9
	RpsT	30S リボソームタンパク質 S20	AAX88005.1	1.8
	RpsJ	30S リボソームタンパク質 S10	AAX87824.1	1.7
	RplO	50S リボソームタンパク質 L15	AAX87845.1	1.6
	RplU	50S リボソームタンパク質 L21	AAX87919.1	1.6
	RpsE	30S リボソームタンパク質 S5	AAX87843.1	1.6
	RpsL	30S リボソームタンパク質 S12	AAX87659.1	1.6
	InfB	翻訳開始因子 IF-2	AAX88610.1	-1.6
	RplW	50S リボソームタンパク質 L23	AAX87827.1	-2.0
	InfA	翻訳開始因子 IF-1	AAX87597.1	-4.9
	TruA	tRNA プソイドウリジンシンターゼ A	AAX88218.1	-5.7

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

	PhoB	リン酸レギュロン転写調節タンパク質	AAX88556.1	-5.8
無機イオン輸送 および代謝	HktE	カタラーゼ	AAX87967.1	2.0
	HgpB	ヘモグロビン-ハプトグロビン結合タンパク質 B	AAX87692.1	2.0
	HfeB	推定上の ABC 型キレート鉄輸送系、ATPase 構成要素	AAX87416.1	2.0
	HfeA	推定上のペリプラズムキレート鉄結合タンパク質	AAX87417.1	1.9
	ZnuA	高親和性亜鉛取り込み系タンパク質	AAX87184.1	1.6
	TehB	テルル酸耐性タンパク質	AAX88653.1	1.5
	CitT	クエン酸/コハク酸交換輸送体	AAX87023.1	-1.7
	Fur	鉄取り込み調節タンパク質	AAX87247.1	-1.7
	NTHI1439	保存されている仮説上のリン酸輸送調節因子	AAX88259.1	-1.8
	NrfB	チトクロム C 型タンパク質	AAX88078.1	-2.4
	NrfA	チトクロム c552	AAX88079.1	-2.7
翻訳後改変、タンパク質代謝回転、シャペロン	*CydD	仮説上の ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	AAX87693.1	2.4
	PdgX	ペルオキシレドキシシ/グルタレドキシシ	AAX87624.1	1.8
	GroES	10kDa のシャペロニン	AAX87591.1	1.8
	TrxA	チオレドキシシ	AAX87086.1	1.7
	ClpB	ATP 依存性シャペロン	AAX87905.1	1.6

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

	DjlA	DnaJ 様タンパク質	AAX87329.1	-1.8
	PpiB	ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼ B	AAX87081.1	-1.9
	UreG	ウレアーゼ付属タンパク質 UreG	AAX87585.1	-2.0
	DsbE	チオール:ジスルフィド交換タンパク質	AAX88104.1	-7.8
エネルギー生産 および変換	LctP	推測上の L-乳酸パーミターゼ	AAX88216.1	2.8
	CydD	仮説上の ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	AAX87693.1	2.4
	Dld	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	AAX88704.1	2.1
	PpC	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	AAX88226.1	-1.9
	GlpA	嫌気性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼサブユニット A	AAX87716.1	-2.0
	FdhX	ギ酸デヒドロゲナーゼ主要サブユニット	AAX87009.1	-2.1
	AtpH	ATP シンターゼデルタ鎖	AAX87536.1	-2.2
	CitD	クエン酸リアーゼアシル担体タンパク質	AAX87027.1	-3.3
	DsbE	チオール:ジスルフィド交換タンパク質	AAX88104.1	-7.8
細胞表層バイオ ジェネシス	TonB	ペリプラズムタンパク質 TonB、内膜および外膜連結	AAX87310.1	2.0
	Pal	外膜タンパク質 P6 前駆体	AAX87436.1	1.6
	OmpP2	外膜タンパク質 P2 前駆体	AAX87199.1	1.5

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

	LicC	ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ	AAX88398.1	-1.8
	LolA	外膜リボタンパク質担体タンパク質前駆体	AAX88274.1	-2.0
	FtsI	ペプチドグリカンシンテターゼ	AAX88133.1	-3.0
	Lic2A	UDP-Gal-リポオリゴ糖ガラクトシルトランスフェラーゼ	AAX87599.1	-3.0
	LicD	ホスホリルコリントランスフェラーゼ	AAX88397.1	-5.7
	NTHI1085	PDZ ドメインを有する予測される膜結合亜鉛メタロプロテアーゼ	AAX87956.1	-6.0
アミノ酸輸送および代謝	HisJ	ほぼ確実なアミノ酸 ABC トランスポーター結合タンパク質シスチンインポート	AAX88089.1	1.7
	NTHI1208	保存されている仮説上のタンパク質のトランスグルタミナーゼ様酵素、推定上システインプロテアーゼ	AAX88062.1	1.5
	OppF	オリゴペプチド輸送 ATP 結合タンパク質	AAX88123.1	-1.8
	GlpB	嫌気性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼサブユニット B	AAX87715.1	-2.0
	AroK	シキミ酸キナーゼ	AAX87264.1	-2.2
	ArtP	アルギニン輸送 ATP 結合タンパク質	AAX88179.1	-3.5
	AroE	シキミ酸 5-デヒドロゲナーゼ	AAX87686.1	-8.7
補酵素代謝	BioB	ビオチンシンターゼ	AAX88047.1	-1.6

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

	RibA	GTP シクロヒドロラーゼ II	AAX87269.1	-2.0
	PdxH	ピリドキサミン 5'-リン酸オキシダーゼ	AAX87909.1	-2.6
	CoaD	ホスホバンテテインアデニリルトランスフェラーゼ	AAX87681.1	-3.7
	menC	O-スクシニル安息香酸シンターゼ	AAX88008.1	-4.3
	BioF	8-アミノ-7-オキシノナン酸シンターゼ	AAX88384.1	-5.3
DNA 複製、組換えおよび修復	RecN	DNA 修復タンパク質	AAX87073.1	1.9
	PolA	DNA ポリメラーゼ I	AAX87902.1	-1.7
	DnaE	DNA ポリメラーゼ III アルファサブユニット	AAX87791.1	-2.0
	RelB	DNA 損傷誘導タンパク質 J、翻訳の負の調節因子	AAX87739.1	-5.3
	DnaQ	DNA ポリメラーゼ III、イブシロン鎖	AAX87197.1	-5.8
転写	UreG	ウレアーゼ付属タンパク質 UreG	AAX87585.1	-2.0
	RpoZ	DNA 指向性 RNA ポリメラーゼ オメガ鎖	AAX88793.1	-2.1
	GreA	転写伸長因子 GreA	AAX88453.1	-2.2
	RpoE	RNA ポリメラーゼシグマ E 因子	AAX87635.1	-3.3
脂質代謝	PlsC	1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ	AAX87785.1	-1.8
	TesB	アシル-CoA チオエステラーゼ II	AAX87079.1	-4.5

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

	IspD	2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸シチジリルトランスフェラーゼ	AAX87703.1	-5.0
	IspF	2-C-メチル-D-エリスリトール 2,4-シクロニリン酸シンターゼ	AAX87702.1	-8.7
シグナル伝達	HisJ	ほぼ確実なアミノ酸 ABC トランスポーター結合タンパク質シスチンインポート	AAX88089.1	1.7
	NTHI1437	保存されている仮説上のタンパク質、SH3 ドメイン	AAX88257.1	-2.3
	DksA	DnaK 抑制因子タンパク質	AAX87065.1	-3.3
	RseA	シグマ-E 因子陰性調節タンパク質ホモログ	AAX87634.1	-6.5
細胞内輸送および分泌	ExbD	輸送タンパク質	AAX87311.1	2.3
	TolB	Tol-Pal 系タンパク質 TolB	AAX87437.1	1.7
細胞分裂および染色体分配	FtsE	細胞分裂 ATP 結合タンパク質	AAX87817.1	-3.6
一般的な機能予測のみ	NTHI0052	保存されている仮説上の FtsH 相互作用内在性膜タンパク質	AAX87047.1	5.2
	NTHI0043	保存されている仮説上の膜タンパク質	AAX87038.1	1.6
	NTHI1199	予測される ATPase	AAX88055.1	-1.7
	UuaP	ABC トランスポーターATP 結合タンパク質	AAX88594.1	-1.8
	Hfq	宿主因子 I タンパク質 Hfq	AAX87465.1	-1.8
	AbgA	アミノベンゾイル-グルタミン酸利用タンパク質 A	AAX87654.1	-1.9

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

	NTHI1590	推定上の NAD(P)H オキシドレ ダクターゼ	AAX88393.1	-2.0
	NTHI0779	ほぼ確実な ABC トランスポー ター、ATP 結合タンパク質	AAX87689.1	-2.5
	NTHI0053	保存されている仮説上のタンパ ク質	AAX87048.1	-7.0
機能未知	NTHI0490	RcsB 依存性ストレス応答の保存 されている仮説上のタンパク質 の推定上負の調節因子	AAX87425.1	-1.6
	NTHI0820	保存されている仮説上のタンパ ク質のオートトランスポーター 翻訳およびアセンブリー因子 TamB	AAX87724.1	-1.7
	NTHI0487	N 末端 xre 型 HTH ドメインを有 する保存されている仮説上の転 写調節因子	AAX87422.1	-2.1
	NTHI0555	保存されている仮説上のタンパ ク質	AAX87483.1	-3.4
	NTHI1025	保存されている仮説上のタンパ ク質の細胞分裂タンパク質 ZapA	AAX87903.1	-3.5
	NTHI0436	保存されている仮説上のタンパ ク質のイソプレニルシステイン カルボキシルメチルトランスフ ェラーゼ	AAX87377.1	-5.1
	NTHI1748	保存されている仮説上のタンパ ク質のカルコンイソメラーゼ様	AAX88534.1	-5.2
	NTHI0319	保存されている仮説上のタンパ ク質の膜タンパク質 YkgB	AAX87278.1	-10.2

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

抗 IHF NRel/抗 rsPilA NRel				
翻訳、リボソーム構造およびバイオジェネシス	DeaD	低温ショック DEAD ボックスタンパク質 A ホモログ	AAX87292.1	2.2
	RpsT	30S リボソームタンパク質 S20	AAX88005.1	1.9
	NTHI1369	推定上の翻訳因子、SUA5	AAX88196.1	1.9
	RpsQ	30S リボソームタンパク質 S17	AAX87834.1	1.8
	RplU	50S リボソームタンパク質 L21	AAX87919.1	1.6
	RpsE	30S リボソームタンパク質 S5	AAX87843.1	1.5
	RpsL	30S リボソームタンパク質 S12	AAX87659.1	1.5
	InfA	翻訳開始因子 IF-1	AAX87597.1	-5.5
	PhoB	リン酸レギュロン転写調節タンパク質	AAX88556.1	-5.5
細胞表層バイオジェネシス	MurB	UDP-N-アセチレノールピルボイルグルコサミンレダクターゼ	AAX87327.1	1.9
	Pal	外膜タンパク質 P6 前駆体	AAX87436.1	1.6
	NTHI0291	推定上の小コンダクタンス機械感受性チャネル:カリウム流出タンパク質 KefA	AAX87252.1	-1.5
	LicD	ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ	AAX88397.1	-4.8
転写	DeaD	低温ショック DEAD ボックスタンパク質 A ホモログ	AAX87292.1	2.2
	GreA	転写伸長因子 GreA	AAX88453.1	-2.2
	AsnC	調節タンパク質 AsnC	AAX87611.1	-1.6
DNA 複製、組	DeaD	低温ショック DEAD ボックスタ	AAX87292.1	2.2

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

換えおよび修復		ンパク質 A ホモログ		
	RelB	DNA 損傷誘導タンパク質 J、翻訳の負の調節因子	AAX87739.1	-4.9
	UnG	ウラシル DNA グリコシラーゼ	AAX87021.1	-4.9
無機イオン輸送 および代謝	NrfA	チトクロム c552	AAX88079.1	3.0
	TehB	テルル酸耐性タンパク質	AAX88653.1	-1.5
	HugZ	推定上のヘム鉄利用タンパク質	AAX87900.1	-1.9
エネルギー生産 および変換	*CydD	仮説上の ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	AAX87693.1	3.6
	GlpC	嫌気性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼサブユニット C	AAX87714.1	2.8
	DmsB	嫌気性ジメチルスルホキシドレダクターゼ B 鎖	AAX88060.1	1.5
翻訳後改変、タンパク質代謝回転、シャペロン	*CydD	仮説上の ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	AAX87693.1	3.6
	DjlA	DnaJ 様タンパク質	AAX87329.1	-2.0
脂質代謝	PlsC	1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ	AAX87785.1	-1.9
	IspF	2-C-メチル-D-エリスリトール 2,4-シクロニリン酸シンターゼ	AAX87702.1	-8.6
補酵素代謝	PanF	ナトリウム/パントテン酸シンボーター	AAX88013.1	-1.5
	RibA	GTP シクロヒドロラーゼ II	AAX87269.1	-2.1
	CoaD	ホスホパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ	AAX87681.1	-3.2

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

ヌクレオチド輸送および代謝	GmK	グアニル酸キナーゼ	AAX88794.1	-1.5
	CmK	シチジル酸キナーゼ	AAX88701.1	-2.0
	PurU	ホルミルテトラヒドロ葉酸デホルミラーゼ	AAX88279.1	-2.0
	DcD	デオキシシチジン三リン酸デアミナーゼ	AAX87193.1	-2.3
	CyaA	アデニル酸シクラーゼ	AAX87755.1	-4.7
	OppF	オリゴペプチド輸送 ATP 結合タンパク質	AAX88123.1	-1.5
	TrpB	トリプトファンシンターゼベータ鎖	AAX88492.1	-1.8
	HisI	ヒスチジン生合成二官能性タンパク質 HisIE	AAX87529.1	-3.0
	TrpC	トリプトファン生合成タンパク質 TrpCF	AAX88545.1	-3.6
	TrpD	アントラニル酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ	AAX88546.1	-5.2
	AroE	シキミ酸 5-デヒドロゲナーゼ	AAX87686.1	-8.3
細胞内輸送および分泌	SecF	タンパク質排出膜タンパク質 SecF	AAX87299.1	-2.0
二次代謝産物生合成、輸送および異化	FabG	推定上のオキシドレダクターゼ	AAX87052.1	-1.5
細胞分裂および染色体分配	FtsE	細胞分裂 ATP 結合タンパク質	AAX87817.1	-3.7
一般的な機能予	NTHI0052	保存されている仮説上の FtsH	AAX87047.1	4.8

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

測のみ		相互作用内在性膜タンパク質		
	NTHI0043	保存されている仮説上の膜タンパク質	AAX87038.1	2.0
	NTHI1199	予測される ATPase	AAX88055.1	-1.6
	NTHI0779	ほぼ確実な ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	AAX87689.1	-2.4
機能未知	NTHI0487	N 末端 xre 型 HTH ドメインを有する保存されている仮説上の転写調節因子	AAX87422.1	-2.0
	NTHI0319	保存されている仮説上のタンパク質の膜タンパク質 YkgB	AAX87278.1	-6.0

10

20

【0588】

*タンパク質のオルソログスな群のクラスター

【0589】

^δNCBI GenBank タンパク質受託番号(Clark, K. 2016 D67)

【0590】

[†]NCBI GenBank タンパク質受託番号からのアノテーション(Clark, K. 2016 D67)またはAziz, A. 2019 p1622からのアノテーション

【0591】

‡Fc = 有意 (P < 0.05) な倍数変化、(−) 倍数減少

【0592】

Φ 2 つ以上の COG カテゴリー内

【0593】

出願人は、次に、DEPをタンパク質のオルソログスな群のクラスター (COG) (Aziz et al., 2019; Tatusov et al., 2000) によってアノテートして、明確に異なる抗体媒介分散対破壊を介したバイオフィーム所在からの放出の結果として、2つのNRel DEPの相対機能を評価した。抗rsPILANRelについて、63のDEPのアノテーションは、最も頻繁に表されるCOGカテゴリー (36.5%) が、エネルギー生産および変換 (19.0%) またはアミノ酸輸送および代謝 (17.5%) のいずれかに関与したことを明らかにした (図3c、抗rsPILANRelのバーおよび表1)。エネルギー生産および変換カテゴリーに特異的に、解糖、三カルボン酸サイクル、窒素代謝、およびグリセロールの嫌氣的代謝に関与する酵素は、プランクトン様NTHIと比較して、存在量が < 2/3 に減少した。一方で、乳酸の取り込みおよび利用に関与するタンパク質は、プランクトン様NTHIと比較して、存在量が > 1.5 倍増加した (表1)。同じカテゴリーでは、> 1.5 倍の増加で抗rsPILANRelに特異的なDEPは、トリプトファン生合成およびシステイン代謝酵素を含んでいた。タンパク質機能カテゴリーにおける集団的な相違は、抗rsPILANRelが、主に、能動的な適応エネルギー利用およびアミノ酸代謝状態にあったことを示した。

30

40

【0594】

50

対照的に、抗IHF NReL集団内では、「翻訳、リボソーム構造およびバイオジェネシス」は、プランクトン様NTHIと比較して、103のDEPの中で最も頻繁に表されたCOGカテゴリー（13.6%）であった（図3c、抗IHFのバーおよび表1）。抗IHF NReL DEPに特異的に、8つは、 >1.5 倍の増加を有する30Sおよび50Sリボソームタンパク質であったが、リボソーム構造タンパク質も増加し、2つの翻訳開始因子は、 $<2/3$ に減少した（表1）。さらに、細胞表層バイオジェネシス、補酵素代謝、および脂質代謝のCOGカテゴリーのタンパク質のそれぞれの発現は、プランクトン様NTHI、例えば、リポオリゴ糖（LOS）の改変およびホスホリルコリン部分による装飾の原因となるタンパク質であるLic2A、LicCおよびLicD（Poole et al., 2013; Swords et al., 2003）、ならびにリボタンパク質を内膜から外膜に往復させるリボタンパク質担体タンパク質LolA（Kaplan et al., 2018）と比較して、 $<2/3$ に減少した。また、プランクトン様NTHIと比較して、発現が有意に $<2/3$ に減少した脂質代謝カテゴリー内で4つの抗IHF NReLが存在した（図3c）。加えて、脂肪酸生合成における補助因子である、ビオチンの生合成のために必要な補酵素代謝タンパク質も、発現を有意に $<2/3$ に減少させた（Parsons and Rock, 2013）。対照的に、外膜の完全性の維持およびペプチドグリカンへの付着に関与する外膜リボタンパク質OMP P6、ならびに主要外膜タンパク質OMP P2は、プランクトン様NTHIと比較して、発現を有意に増加させた（表1）（Murphy et al., 2006; Sikkema and Murphy, 1992）。まとめると、これらのデータは、抗IHF NReLが、タンパク質の翻訳のために豊富なりボソームを含有したが、しかしながら、翻訳は、低減された翻訳開始因子タンパク質に起因して制限されたことを示唆した。さらに、抗IHF NReLは、LOS改変酵素および脂質代謝遺伝子の減少した発現が、外膜完全性維持タンパク質の発現の増加と併せて、プランクトン様に成長したNTHIと比較して、抗IHF NReLの膜組成の相違を示唆したことを実証した。

10

20

30

40

50

【0595】

抗IHF NReLのプロテオミクスプロファイルにおいて観察されたリボソームタンパク質の増加した存在量は、成長の誘導期における細菌の特徴でもある（Rolfe et al., 2012）。抗IHF NReLが、誘導期の細菌と他の類似性を示したかどうかを決定するために、出願人は、qRT-PCRを使用して、誘導期における細菌によって規範的に発現される3つの遺伝子の発現を調べた（Martinez-Antonio and Collado-Vides, 2003）。deaD、artMおよびfisの発現は、抗IHF NReL対プランクトン様NTHIにおいて有意に（ >2 倍）上方調節された（図4a）。興味深いことに、これらの遺伝子の3つすべてについて、プランクトン様NTHIに対する転写物の存在量の倍数増加は、抗IHF NReL対抗rsPila NReLについて、有意に大きかった（ $P<0.05$ ）。そのため、抗IHF NReLは、誘導期を模倣した状態においてバイオフィーム所在から放出されると思われ、抗IHF表現型と抗rsPila表現型との間の別の有意な相違を表し（表2）、再び、バイオフィーム構造の物理的崩壊が迅速な放出において生じたが、NTHIが、抗rsPila NReLよりも代謝的により不活発であったことを示唆した。

【0596】

2つのNReLのプロテオミクス発現プロファイルが互いに異なったので（図3a）、出願人は、次に、ボルケーノプロットによって表されるように、2つのNReL集団間のDEPの直接比較を実施した（図3d）。 >1.5 倍の増加または $<2/3$ の減少を有する51のDEPを、抗IHF NReL対抗rsPila NReLの中で特定した（図3dおよび表1）。これらのうち、15のタンパク質（29.4%）が、抗rsPila NReLと比較して、抗IHF NReLによる発現の >1.5 倍の増加を実証し、これらのタンパク質は、前に記載した5つの30Sおよび50Sリボソームタンパク質を含んでいた。また、OMP P6は、抗rsPila NReLと比較して、抗IHF NReLにおいてより豊富であった。抗rsPila NReLと比較して、抗IHF NReLにおいて $<2/3$ の減少を有する（例えば、抗rsPila NReLにおいてより

多い存在量) DE Pは、豊富に発現されたトリプトファン生合成タンパク質の特徴であった。これらの区別は、プランクトン様 NTHI と比較して、抗 I H F N R e l 集団において発現が減少したとして既に特定されている脂質代謝タンパク質の相対的相違に加えてであった。とりわけ、2つの N R e l プロテオミクス発現プロファイルのこの直接比較は、抗 r s P i l A N R e l と比較して、抗 I H F N R e l DE P 内のペプチドグリカン合成タンパク質である M u r B (Nikolaidis et al., 2014) の有意な増加も明らかにし、これは、抗 I H F N R e l の変更された細胞表層組成をさらに示唆した(表 1)。

【0597】

抗 r s P i l A N R e l または抗 I H F N R e l は、プランクトン様 NTHI よりも特定の抗生物質による死滅に対して有意に感受性がより高かった。

10

【0598】

実証された2つの N R e l 集団間の明確に異なるタンパク質の相対発現において観察された有意な相違により、出願人は、次に、これらの相違が表現型の特徴をどのように変更したかを調べた。バイオフィームから新たに放出された細菌は、典型的には、それらのプランクトン様対応物よりも抗生物質による死滅に対して感受性がより高いので(Brockson et al., 2014; Chambers et al., 2017; Goodwine et al., 2019; Mokrzan et al., 2018)、出願人は、NTHI 誘発 OM および呼吸器感染症のために一般に処方される抗生物質を表す TMP-SMX または AMC に対する N R e l NTHI の感受性を評価した(Harrison et al., 2009; K et al., 2017; Pelton, 2020; Sethi and Murphy, 2008; Tristram et al., 2007; Wald and DeMuri, 2018; Wasserman

20

and Gerber, 2017)。出願人は、TMP-SMX または AMC による死滅に対する抗 r s P i l A N R e l および抗 I H F N R e l の感受性を、両方のバイオフィーム内在 NTHI (規範的に高い耐性)、ならびに成長の対数中期まで成長したプランクトン様 NTHI のものと比較した(臨床微生物学研究室で MIC 値を決定するために一般に使用される集団の規範的な感受性および代表)(図 5 a)。15 分間の抗 I H F I g G または 6 時間の抗 r s P i l A I g G への曝露によって放出された NTHI の数の相違について制御するために(図 1 を参照されたい)、出願人は、抗 I H F N R e l 集団または抗 r s P i l A N R e l 集団のいずれかのものと一致するようにそれぞれの実験におけるプランクトン様 NTHI の密度を調整した。出願人が、それぞれの細菌密度でプランクトン様 NTHI の約 25% を再現性よく死滅させるために必要な AMC または TMP-SMX の濃度を特定した後、次いで、出願人は、これらの濃度を使用して、対応する N R e l またはバイオフィーム内在 NTHI の相対死滅を評価した。

30

【0599】

予想通り、抗 r s P i l A N R e l は、TMP-SMX または AMC のいずれかによる死滅に対して、バイオフィーム内在 NTHI よりも有意に感受性がより高かった($P \leq 0.0001$)(図 5 b および 5 c)。しかしながら、とりわけ、TMP-SMX による死滅に対する抗 r s P i l A N R e l の感受性は、2 時間のみの抗生物質曝露後、プランクトン様 NTHI についての感受性と比較して、有意に高かった($P \leq 0.0001$)(図 5 b)。対照的に、抗 r s P i l A N R e l は、 β -ラクタム抗生物質の AMC による死滅に対して、それらのプランクトン様対応物と感受性は同等でしかなかった(図 5 c)。次いで、出願人は、抗 I H F N R e l を同様に評価し、再び予想通り、それらが、TMP-SMX または AMC のいずれかによる死滅に対して、バイオフィーム内在 NTHI よりも有意に感受性がより高かったことも見出した($P \leq 0.0001$)(図 5 d および 5 e)。しかしながら、興味深いことに、そして抗 r s P i l A N R e l とはまったく対照的に、抗 I H F N R e l 集団は、それらのプランクトン様対応物と TMP-SMX 媒介死滅に対して感受性が同等でしかなかったが(図 5 d)、AMC に対して有意に感受性がより高かった($P \leq 0.0001$)(図 5 e)。

40

【0600】

50

抗生物質死滅に対する細菌の感受性は、薬物の取り込み、排出、および分解を含む複数のプロセス、ならびに抗生物質の作用の直接機構の結果である (Kapoor et al., 2017)。抗 I H F N R e l または抗 r s P i l A N R e l の選択的に増強された抗生物質感受性についての可能性のある機構を特定するために、出願人は、q R T - P C R を使用して、T M P - S M X または A M C に対する感受性または耐性において役割を果たす可能性があるいくつかの遺伝子の相対発現を調べた。T M P および S M X のタンパク質標的であるジヒドロ葉酸レダクターゼおよびジヒドロプロテイン酸シンターゼは、それぞれ、f o l A および f o l P によってコードされ、F o l A および F o l P の過剰産生は、T M P - S M X に対する耐性に関連する (Huovinen, 2001)。したがって、出願人は、抗 r s P i l A N R e l N T H I が、選択された時点で、抗 I H F N R e l よりも f o l A および / または f o l P の低い相対発現を実証する可能性があると推測した。出願人の結果は、f o l A および f o l P 発現としてのこの仮説が、抗 r s P i l A N R e l 対抗 I H F N R e l において両方とも有意に低減されたことを確認した (図 4 b、 $P < 0.001$)。

10

20

30

40

50

【0601】

排出ポンプは、細菌が細胞内抗生物質の濃度を減少するのを可能にする。E m r E 排出系は、N e i s s e r i a g o n o r r h o e a e において β -ラクタム抗生物質を輸送し (Du et al., 2018)、E . c o l i では、T M P - S M X 曝露は、E m r A B 排出ポンプの発現を刺激し (Barrero et al., 2014)、これは、E m r A B 排出ポンプが、T M P - S M X に対する N R e l の感受性に影響を及ぼすことを示唆した。出願人は、抗 r s P i l A N R e l による e m r A および e m r B の相対発現が、T M P - S M X に対するより高い抗 r s P i l A N R e l の感受性と一致して、抗 I H F N R e l によるものよりも有意に低かったことを見出した (図 4 c、 $P < 0.001$)。対照的に、A r c A B 排出ポンプは、 β -ラクタム抗生物質を輸送することができ、転写リプレッサー a c r R の制御下にある (Anes et al., 2015)。a c r R 突然変異を介した増強された A c r A B 発現は、H a e m o p h i l u s (a a c . a s m . o r g / c o n t e n t / 5 1 / 7 / 2 5 6 4 . l o n g) におけるアモキシシリン耐性に関連していた一方で、出願人は、a c r R の増強された発現が、反対の効果である A M C に対する N T H I の増強された感受性を有する可能性があることを主張した。出願人が予期したように、相対 a c r R 発現は、抗 I H F N R e l について観察された A M C に対する増大した感受性と一致して、抗 I H F N R e l 対抗 r s P i l A N R e l によって有意に高かった (図 4 c、 $P < 0.0001$)。

【0602】

総合すれば、抗生物質の感受性および転写物の存在量のデータは、抗 r s P i l A N R e l および抗 I H F N R e l が、それらがバイオフィーム所在から放出された機構に起因してそれらの相対抗生物質感受性において有意に異なったことを示唆した。しかしながら、出願人は、最大破壊 (分) 対分散 (時間) に必要な時間の相違も観察された表現型において役割を果たす可能性があることに関心を持った。それにより、出願人は、両方の抗体についての最大放出の時間のおよそ中間の時点である 2 時間の抗 r s P i l A I g G または抗 I H F I g G のいずれかとのインキュベーション後に回収された時間が一致した N R e l 集団に対する相対抗生物質感受性の分析を繰り返した。図 5 に示される結果と類似して、抗 r s P i l A N R e l は、プランクトン様 N T H I と、T M P - S M X による死滅に対して有意により敏感であり ($P \leq 0.0001$) (図 6 a)、A M C による死滅に対して同等に敏感であった (図 6 b)。また、時間が一致した抗 I H F N R e l は、プランクトン様 N T H I と比較して、A M C による死滅に対して有意により敏感であり ($P \leq 0.0001$) (図 6 c)、T M P - S M X による死滅に対して同等に敏感であった (図 6 d)。これらの結果は、示された明確に異なる抗生物質の感受性表現型が、放出、分散対破壊の 2 つの異なる機構から生じたという仮説についてのさらなる支持を提供した。

【0603】

まとめると、これらのデータは、抗 *r s P i l A* *N R e l* と抗 *I H F* *N R e l* との間の追加の表現型の差異を追加し、ここで、これらの2つの遺伝学的に同一の集団が、独特のプロテオミクス発現プロファイルおよび標的トランスプロテオミクス発現プロファイルを示しただけでなく、それらが、凝集体対個々の細胞のいずれかとしての放出で、成長の明確に異なる段階でバイオフィーム所在から放出されたことを明らかにし、プランクトン様 *N T H I* と比較した場合に、その両方が *N T H I* 誘発性疾患の処置のために推奨されるファーストライン抗生物質であるスルホンアミド抗生物質またはβ-ラクタム抗生物質のいずれかによる死滅に対して有意に増加したが異なる感受性を実証した。

【0604】

議論

10

【0605】

歴史的に、ワクチンのための開発経路および抗生物質のための開発経路は、並行して進んでおり、一方は防止に焦点を当て、他方は処置に焦点を当てていた (Tagliabue and Rappuoli, 2018)。この戦略は、実際に多くの疾患に対して成功していたが、いずれの経路もまだ全体的な成功を達成していない、複数の慢性感染症および再発性感染症の問題が依然として存在する。これに関して進展の障害が広く認識されており、少なくともこれは、典型的には、本質的に遅いワクチン開発プロセスではない (Koff and Schenk elberg, 2019)。同様に、抗生物質開発経路に対するおびただしい課題が存在し、世界的な多抗生物質耐性細菌の上昇の心配な急速な増加によって必要とされた莫大な努力にもかかわらず、臨床的に承認された真に新しいクラスの薬物は30年超も導入されていない (2017a; Ribeiro da Cunha et al., 2019)。これらの進展の障害は、慢性疾患の当然の所与の複雑さおよび処置の困難さの特質であり、これは、両方の発見経路を複雑にした。そのような持続的感染および回帰感染は、バイオフィームを形成する原因病原体に原因があり、ここで、常在細菌は、固有のトランスクリプトーム、ならびに抗生物質およびそれらのプランクトン様対応物を容易に死滅させる宿主免疫エフェクターに対してそれらを耐性にする非常に不応性の表現型を有する (Ahearn et al., 2017; Hall and Mah, 2017; Pang et al., 2012; Sharma et al., 2019; Silva and Sillankorva, 2019; Stewart, 2002)。 *N R e l* 表現型の認識および理解の前進は、ここに、死滅に対して現在著しくより脆弱な状態に不応性のバイオフィーム所在から細菌を放出する治療用抗体の使用を考慮するためにこれらの開発経路の態様を統合する機会を我々に提供する。

20

30

【0606】

以前の研究では、出願人は、細菌 *D N A B I I* タンパク質に対する抗血清および抗生物質の両方に同時に曝露された確立された *N T H I* バイオフィームが、それらのプランクトン様対応物と比較して、*M I C* の $\leq 1 / 4$ の濃度で、*O M* を処置するために一般に使用される3つの抗生物質 (例えば、アンピシリン、*A M C* およびセフジニル) による死滅に対して有意に感受性がより高かったことを示した (Brockson et al., 2014)。出願人は、*N R e l* *N T H I* および *N R e l* *M . c a t a r r h a l i s* の両方が、寒天上での成長からのものよりも、抗 *r s P i l A* とのインキュベーションによって二重種バイオフィームから放出された場合に、それぞれ、*T M P - S M X* またはクラリスロマイシンに対してより敏感であることも示した (Mokrzan et al., 2018)。出願人の以前の観察を考慮して、ここで、出願人は、これが、得られた *N R e l* 集団の根絶を最も媒介する関係がある臨床アプローチにおいて注目に値する影響を有し得るので、別個の機構によってバイオフィーム所在から *N T H I* を放出する、特異的に標的にされる抗 *r s P i l A* 血清および抗 *I H F* 血清によって誘導された2つの *N R e l* 集団の相対表現型を理解することを始めることを目標にした。

40

【0607】

この研究では、出願人は、抗 *r s P i l A* *N R e l* および抗 *I H F* *N R e l* を特徴付け、それらの相対プロテオミクス発現プロファイル、標的遺伝子の相対発現、および抗生物質による死滅に対する感受性が、プランクトン様に成長した *N T H I* と明確に異なっ

50

ただけでなく、重要なことには、互いとも明確に異なったことを示した。抗 I H F 媒介破壊対抗 r s P i l A 媒介分散による放出の動態は明確に異なるが、出願人の結果は、N R e l 表現型の観察された相違が、バイオフィルム所在からの放出を媒介する特異的抗体に依存したことを強く示唆した。プロテオミクス発現プロファイルは、総放出 N R e l 集団の時間でのスナップショットを提供した。抗 r s P i l A N R e l 集団のプロテオミクスプロファイルは、エネルギー代謝および変換の適応状態、ならびにバイオフィルムから能動的に分散するように誘導されているそれらに回答したアミノ酸の輸送および代謝によって定義された。この適応代謝状態は、それらが、6 時間のインキュベーション期間にわたって A I - 2 および I V 型単収縮線毛の両方の発現に起因してバイオフィルムから能動的に分散するので、細胞のより段階的な放出に起因して、抗 I H F N R e l N T H I よりもいくらかより均一である可能性がある。それにもかかわらず、この抗 r s P i l A N R e l 集団の適応代謝状態は、バイオフィルムからの放出に回答する他の属（例えば、S . p n e u m o n i a e、K . p n e u m o n i a e、および P . a e r u g i n o s a）について記載されたものと非常に類似しており、それによって非定型的であるとは思われなかった（Guilhen et al., 2016; Pettigrew et al., 2014; Rumbaugh and Sauer, 2020）。

10

【0608】

抗 I H F N R e l 集団の分析において、出願人は、それが、L O S 改変、細胞膜維持および脂質代謝タンパク質の同時的な減少を伴うリボソームタンパク質の増加した産生によって定義されたことを見出した。リボソームタンパク質の富化は、抗 I H F N R e l 集団が、周囲環境への一斉の迅速な受動的放出に回答する変更された膜組成を伴うタンパク質合成を平衡に保ったことを示唆した。そのため、抗 I H F N R e l は、依然として非常に似ているバイオフィルム内在 N T H I 細菌と予想され得る。実際に、標的トランスクリプトミクスは、抗 I H F N R e l が、誘導期に類似する成長の段階にあったことを示した。それにもかかわらず、抗 I H F N R e l 表現型はまた、バイオフィルム内在 N T H I と比較してスルホンアミド抗生物質および β -ラクタム抗生物質の両方によるそれらの有意により高い死滅によって明らかにされたように、バイオフィルム内在 N T H I のものとは明確に異なった。

20

【0609】

出願人の以前の研究（Brockson et al., 2014; Mokrzan et al., 2018）からの予想通り、N R e l N T H I は、N T H i 誘発性疾患を処置するために処方される 2 つのファーストライン抗生物質に非常に感受性であった。しかしながら、ここで、出願人は、これらの N R e l 集団が、それらが分散（例えば、抗 r s P i l A を介して）または破壊（例えば、抗 I H F を介して）のいずれかによってバイオフィルム所在から放出されたかどうかに応じて、異なるクラスの抗生物質による死滅に対する固有の増強された感受性を提示したことを最初に示した。これらの相違は、N T H I 生存率もこれらの抗生物質のいずれかによる死滅に対する感受性も、いずれかの抗体とのインキュベーションによって影響されないの、N R e l N T H I に対する抗 r s P i l A または抗 I H F のいずれかの直接効果によって説明することができなかった（Brockson et al., 2014; Mokrzan et al., 2018）。まとめると、2 つの得られた N R e l 集団は、相対プロテオミクス発現プロファイル、標的トランスクリプトミクスプロファイル、バイオフィルム所在からの放出の特徴（両方の成長期、および単一細胞対凝集体として）、および抗生物質感受性において有意な相違を示した。

30

40

【0610】

スルホンアミドクラスの抗生物質が、アミノ酸合成に関与する葉酸合成経路を標的にするので、抗 r s P i l A N R e l 適応アミノ酸輸送および代謝状態は、この集団の固有に増加した T M P - S M X に対する感受性の機構への洞察を提供した（Fernandez-Villa et al., 2019）。また、抗 I H F N R e l と比較して、それぞれ、T M P および S M X のためのタンパク質標的をコードする f o l A および f o l P のより低い相対発現は、T M P - S M X を細胞の外に輸送する E m r A B 排出ポンプのサブユニットをコー

50

ドする *emrA* および *emrB* のより低い発現と一緒に、抗 *rsPilA* *NReL* 対抗 *IHF* *NReL* の *TMP-SMX* に対するより高い感受性も支持した。同様に、抗 *IHF* *NReL* 脂質代謝および細胞膜組成タンパク質において述べた相違は、観察された *AMC* に対する増加した感受性を支持し、ここで、改変された膜の内容物は、それらがペニシリン結合タンパク質に結合して、ペプチドグリカンの架橋を防止するペリプラズムへの β -ラクタム抗生物質のより多くの通過を可能にする変更された膜透過性を有していた (Delcour, 2009)。抗 *IHF* *NReL* 集団における β -ラクタム抗生物質に対する固有の感受性の機構への追加の洞察は、ペプチドグリカン合成タンパク質 *MurB* の増加した存在量によって提供され、これは、抗 *IHF* *NReL* が、 β -ラクタム抗生物質の活性に対するそれらのより高い感受性を支持するペプチドグリカンを能動的に合成したことを示唆した (Delcour, 2009; Zapun et al., 2008)。 *AcraAB* 排出ポンプの発現を抑制

10

する *acrR* の上方調節は、抗 *IHF* *NReL* 内の増加した *AMC* 濃度および増強された死滅をもたらす可能性がある。抗 *IHF* *NReL* 集団における *fis* の上方調節は、非機能的 *fit* 遺伝子を有する *P. aeruginosa* および *E. coli* 突然変異体の両方が、 β -ラクタム抗生物質に対する増強された耐性を示したので、*AMC* に対する増加した感受性についてのまた別の可能性のある機構を提示する (Grkovic et al., 2001; Long et al., 2020; Martin and Rosner, 1997)。上記で議論した可能性のある機構に加えて、多くの他の因子、例えば、周囲の環境にバイオフィルムマトリックスから放出された細菌に対するアクセス性は、代謝活性の全体的な変化ならびに／または膜内容物および透過性の変更と組み合わせられて、すべてが、示された特定のクラスの抗生物質に対する観察された感受性、およびおそらくまだ試験されていない追加のクラスの抗生物質に寄与した可能性がある。出願人が、抗 *rsPilA* *NReL* *NTHI* および抗 *IHF* *NReL* *NTHI* の表現型をさらに定義し続けているので、この根拠は、現在調査中である。

20

【0611】

総合すれば、出願人のデータは、*NReL* 表現型が「一般的」ではないが、むしろ非常に明確に異なり、バイオフィルム所在からの *NTHI* の放出の抗体媒介機構に依存していることを示唆した。出願人が、*NReL* *NTHI* が、免疫エフェクター単独 (Novotny et al., 2019; Novotny et al., 2015)、または必要な場合に共送達される抗生物質 (現在低減された用量であるが) と組み合わせて (Novotny et al., 2016) のいずれかによって *in vivo* で迅速に根絶されることを既に示したことを考慮して、表現型の差異が存在するが、*NReL* *NTHI* および他の *NReL* 細菌種 (Brockson et al., 2014; Chambers et al., 2017; Goodwine et al., 2019; Mokrzan et al., 2018; Petrova and Sauer, 2016) が、それらが非常に有効に排除され得る非常に脆弱な状態にあると思われることは明らかである。*NReL* *NTHI* 集団間の可能性のある多様な差異を特徴付けるためのさらなる調査は、バイオフィルムが形成される環境条件、突然変異の状態、および *NTHI* の多様な株によって形成されるバイオフィルムの特徴、ならびに他の細菌の属の検討を含む。さらにまた、ここに記載される2つの *NReL* 集団が適応状態を表すので、*NReL* 表現型は、経時的に動的である可能性がある。実際に、放出動態およびバイオフィルムを分散または破壊する手段の寄与を精査することは、明確に異なる抗生物質感受性表現型の開始および期間をさらに特徴付ける検討の焦点である。

30

40

【0612】

world 'running out of antibiotics' (2017b)では、新しい抗微生物薬を特定し、抗生物質の適正使用支援を制定し、不適切な抗生物質の使用の危険性に関して市民を教育することを迫っている (Piltcher et al., 2018)。この状況は、新規の創造性に富んだ方法で、多くの人にこの問題に取り組むことを呼び起こした。*Nature commentary*, Rappuoli, Bloom and Black (Rappuoli et al., 2017)では、出願人は、出願人の「多剤耐性細菌性疾患および持続性疾患に対する最後の希望」として

50

、ワクチン誘発抗体の力と抗生物質のより適切な使用を組み合わせることを提案した。それらの焦点は、保因、したがって、抗生物質耐性細菌の伝達を低減する抗生物質であったが (Rappuoli et al., 2017)、出願人は、これらの非常に耐性の群集からバイオフィーム内在 NTHI を放出し、そのようにして、それらが、宿主の免疫エフェクターおよび必要な場合に、従来の抗生物質によって死滅され得るような特異的に誘導された抗体の使用を構想し、後者は、ここで、NRel NTHI の非常に感受性の表現型に起因して、著しく低減された用量、およびより短い経過で使用される。より頻度が低い抗生物質処置レジメンの追加の潜在的な利益は、オフターゲット副作用の低減、および経口抗生物質使用の他の望ましくない続発症であり、これには、抗生物質耐性の発達 (Patini et al., 2020; Tagliabue and Rappuoli, 2018) および／または腸内マイクロバイオームの破壊 (Bailey et al., 2020; Gillies et al., 2015; Kuehn et al., 2015; MacPherson et al., 2018; Pallav et al., 2014) を含む。

10

【0613】

本明細書では、出願人は、この重要なヒト病原体の固有のバイオフィーム関連標的に対する NRel 誘導抗体の使用を介して、NTHI によって引き起こされるバイオフィーム関連疾患を処置するためのこの戦略の原理の証明を提供した。また、種に無関係の抗 DNA BII アプローチの使用は、多様なヒト病原体によって引き起こされる多くの他の疾患の処置のためのこの組合せ戦略の潜在的な使用を拡大し、ここで、バイオフィームは、同様に、病態形成、慢性化、再発、および処置に対する抵抗に大きく寄与する。in vitro および in vivo の両方で DNA BII タンパク質に対する NRel 誘導モノクローナル抗体の最近のヒト化および実証された有効性は、ヒトの臨床試験への移行を促進することが予想される (D'Andrea and Lau, 2020; Novotny et al., 2020)。

20

実験番号 2 - 材料および方法

【0614】

NRel NTHI の収集および定量化

【0615】

分類不可能な *Haemophilus influenzae* 株 86-028 NP は、慢性 OM に起因する鼓膜切開チューブ挿入を受けている小児の鼻咽頭から回収された臨床分離株であり (Harrison et al., 2005; Sirakova et al., 1994)、低継代数で凍結して維持した。NTHI バイオフィームを、(Jurcisek et al., 2011) に記載されるようにして、1 ml あたりそれぞれ 2 μ g の β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (β -NAD) およびヘムで補充された脳心臓注入ブロス (sBHI) 中、8 ウェルチャンパーのあるカバーガラススライドにおいて、16 時間確立した。16 時間後、バイオフィームを、200 μ l のカルシウムまたはマグネシウムなしの平衡化 (37°C) ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) で洗浄した。

30

【0616】

NRel を収集および計数するために、16 時間の NTHI バイオフィームを穏やかに洗浄し、次いで、バイオフィームの表面積 1 cm² あたり 13.6 μ g の抗 r s P i l A 抗血清に由来するウサギポリクローナル IgG (NTHI 株 86-028 NP によって発現された r s P i l A に対して生成) (Novotny et al., 2009) とともに 6 時間 (「抗 r s P i l A NRel」)、またはバイオフィームの表面積 1 cm² あたり 6.2 μ g の抗天然 IHF 抗血清に由来するウサギポリクローナル IgG (NTHI 株 86-028 NP によって発現された天然 IHF に対して生成) (Novotny et al., 2019) とともに 15 分間 (「抗 IHF NRel」)、インキュベートし、抗体を、事前に温めて平衡化した (37°C、5%の CO₂) sBHI に希釈した。これらの IgG の量は、以前の研究 (Brockson et al., 2014; Mokrzan et al., 2018) において出願人が使用したそれぞれ個々のウサギ高度免疫血清の 1:50 希釈内に存在する IgG 濃度と一致した。使用したインキュベーション時間は、バイオフィーム所在から NTHI の最大放出が達成される時間と一致した (Mokrzan et al., 2018; Novotny et al., 2019)。陰性対照としての機能を果たす抗 NTHI OMP P5 に由来するウサギポ

40

50

リクローナルIgGまたは天然ウサギ血清から単離されたものを、NRel誘導抗血清と同等の濃度で使用した（例えば、抗rsPIL Aと比較される場合11μg、または抗IH Fと比較される場合5μgのいずれか）。ウサギポリクローナルIgGを、製造業者の説明書（GE Healthcare Life Sciences）によって、rProtein A Protein G GraviTrapカラムにより、全血清または抗血清の継代によって生成した。6時間（抗rsPIL A NRel）または15分間（抗IH F NRel）のいずれかのインキュベーション後、バイオフィルム上の190μlの上清を、それぞれのウェルから穏やかに収集し、水浴超音波処理器中で2分間超音波処理して、任意の凝集したNTHIを壊し、次いで、連続希釈し、チョコレート寒天上に蒔いて、NTHIのCFUを定量化した。

10

【0617】

LC-MS/MSのための試料調製

【0618】

抗rsPIL A NRelおよび抗IH F NTHIを、記載されるようにして収集した。プランクトン様NTHIを、成長の対数中期まで、sBHI中で静的にインキュベートした。試料を、13,200×gで4分間遠心分離し、1mlのDPBSに再懸濁させ、再度遠心分離した。ペレットを、急速凍結し、-80℃で保管した。すべてのさらなる処理は、次に記載されるようにして、MS Bioworks, LLC (Ann Arbor, MI) によって行った。

20

【0619】

細胞ペレットを、緩衝液（2%のドデシル硫酸ナトリウム、150mMのNaCl、50mMのTris pH8）に懸濁させ、音波プローブ（Q Sonica, Newtown, CT）を用いて溶解し、100℃で10分間加熱した。抽出物のタンパク質濃度を、Qubit蛍光光度法によって決定し、10μgのそれぞれの試料を、MES緩衝系中、10%のBis Tris NuPage mini-gel（Invitrogen）を使用して、SDS-PAGEによって処理した。遊走ウィンドウ（1cmのゲルレーン）を切除し、以下のプロトコールによりProGestロボット（Digilab, Hopkinton, MA）を使用して、トリプシンで、ゲル中で消化した：1）25mMの重炭酸アンモニウムとそれに続くアセトニトリルによる洗浄；2）60℃での10mMのジチオスレイトールによる還元とそれに続く室温での50mMのヨードアセトアミドによるアルキル化；3）トリプシン（Promega, Madison, WI）による37℃で4時間の消化；4）ギ酸によるクエンチ。上清を、さらなる処理なしで直接分析した。

30

【0620】

質量分析

【0621】

それぞれプールされた画分の半分を、ThermoFisher Fusion Lumos質量分析計と接続されたWaters M-クラスHPLCシステムによるナノLC-MS/MSによって分析した。ペプチドを、捕捉カラムにロードし、350nL/分で、75μmの分析カラム上で溶出させ、両方のカラムは、Luna C18樹脂（Phenomenex, Torrance, CA）で充填されていた。質量分析計を、データ依存モードで動作させ、MSおよびMS-MSを、Orbitrapにおいて、それぞれ、60,000FWHM（半値全幅）の分解能および15,000FWHMの分解能で行った。装置を、MSおよびMS/MSのために3秒サイクルで実行した。2時間の装置時間を、それぞれの試料の分析のために用いた。

40

【0622】

質量分析データ処理

【0623】

データを、以下のパラメーターを用いてMascot（Matrix Science）のローカルコピーを使用して検索した：酵素、トリプシン/P；データベース、www

50

. n c b i . n l m . n i h . g o v / n u c c o r e / C P 0 0 0 0 5 7 . 2 (フ ォ ワードおよびリバースと共通の夾雑物を連結) ; 固定化改変、カルバミドメチル (C) ; 可変の改変: アセチル (N 末端) 、脱アミド (N , Q) 、酸化 (M) 、ピロ- g l u (N 末端 Q) ; 質量値、モノ同位体; ペプチド質量トレランス、1 0 p p m ; 断片質量トレランス、0 . 0 2 D a ; 最大見逃し切断、2。M a s c o t D A T ファイルを、バリデーション、フィルタリング、および試料ごとの非重複リストを作出するために S c a f f o l d (P r o t e o m e S o f t w a r e) にパースした。データを、タンパク質あたり少なくとも2つの固有のペプチドを必要とする1%のタンパク質およびペプチドの偽発見率 (F D R) を使用してフィルタリングした。出願人は、下流の分析のために正規化されたスペクトルカウントを使用した。複製における変形形態および再現性を評価するために、出願人は、プランクトン様群、抗 r s P i l A N R e l 群および抗 I H F N R e l 群の3つの試料において質量分析によって特定されたそれぞれのタンパク質についての正規化されたスペクトルカウントを用いて、それぞれの集団を取り囲む95%の信頼楕円を用いてPCAプロットを作成した (R 中の F a c t o M i n e R および g g p l o t 2 パッケージを使用する) (L e e t a l . , 2 0 0 8 ; W i c k h a m e t a l . , 2 0 1 6) 。

10

【0624】

差次的発現分析

【0625】

3つの試料群 (プランクトン様、抗 r s P i l A N R e l および抗 I H F N R e l) の3つの生物学的複製からの正規化されたスペクトルカウントを、ペアワイズ比較のために使用して、両側t検定を使用して、それぞれのタンパク質の差次的発現を決定した。P値、ベンジャミニーホッホバーグ調整P値、および倍数変化を提供する (補充データセット1) 。 > 1 . 5 倍の増加または < 2 / 3 の減少、および関連する P < 0 . 0 5 を有するタンパク質を、発現において有意差があると見なした。N T H I 株 8 6 - 0 2 8 N P タンパク質を、タンパク質のオルソログスな群のクラスター (A z i z e t a l . , 2 0 1 9 ; T a t u s o v e t a l . , 2 0 0 0) によってアノテートした。

20

【0626】

バイオフィーム内在 N T H I 、プランクトン様 N T H I または N R e l N T H I の抗生物質感受性

出願人は、N R e l がある特定の抗生物質に対してプランクトン様 N T H I よりも感受性がより高いと仮説を立てたので、出願人は、プランクトン様の死滅についてのベースラインを25%に設定し、その結果、出願人は、所与の抗生物質による N R e l 死滅におけるダイナミックレンジを実証することが可能であった。N R e l N T H I の過剰の操作または希釈を回避するため、ならびにプランクトン様および N R e l の同等の数の直接比較を可能にするために、出願人は、プランクトン様細胞の密度を、以下の通り、それぞれの実験において、N R e l 集団として同じ1mlあたりの C F U に調整した: N T H I を、成長の対数中期まで静的にインキュベートし、次いで、6時間で収集された抗 r s P i l A N R e l との比較のために 3×10^8 C F U / m l 、または15分で収集された抗 I H F N R e l との比較のために 2×10^8 C F U / m l のいずれかに希釈した (図1を参照されたい) 。次いで、出願人は、それぞれの密度でおよそ25%のプランクトン様 N T H I を死滅させた、アモキシシリン (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) およびクラブラン酸塩 (米国薬局方、R o c k v i l l e , M D) 、またはトリメトプリム (S i g m a - A l d r i c h) およびスルファメトキサゾール (S a n t a C r u z B i o t e c h , D a l l a s , T X) の濃度を決定した。同じ抗生物質濃度を、抗 I H F N R e l または抗 r s P i l A N R e l 、密度が一致した (同じ C F U / m l) プランクトン様 N T H I 、およびそれぞれ関連する実験についての付着バイオフィームのために使用した。同様に、2時間で収集された抗 I H F N R e l または抗 r s P i l A N R e l について、出願人は、最初に N R e l を定量化し、それぞれ、抗 r s P i l A I g G または抗 I H F I g G へのバイオフィームの曝露によって放出された約 2.0×10^8 または 4.0×10^8 C F U / m l を見出した。次いで、出願人は

30

40

50

、同じ密度で25%のプランクトン様NTHIを死滅させた、アモキシシリンとクラブラン酸（「オーグメンチン」、AMC）またはトリメトプリムとスルファメトキサゾール（TMP-SMX）の濃度による抗IHFNRelまたは抗rsPILANRelの死滅を評価した。

【0627】

抗rsPILANRelまたは抗IHFNRelを、上記に記載されるようにして収集し、超音波処理した。水浴超音波処理器中で2分間超音波処理して、任意のNTHI凝集体を壊した後、NRelまたはプランクトン様NTHIを、示される抗体とともに37℃で2時間インキュベートし、次いで、連続希釈し、チョコレート寒天上に蒔いて、可変NTHIを定量化した。バイオフィーム内在NTHIを評価するために、バイオフィームを、上記に記載されるようにして、37℃で16時間確立し、DPBSで2回洗浄し、示された抗生物質で補充されたSBHI中、37℃でインキュベートした。2時間後、バイオフィーム内在NTHIを、強力なピペティングによって収集し、2分間超音波処理し、上記に記載されるようにして計数した。すべての実験は、それぞれの処置群および対照群について2回または3回の技術的反復で、別々の日に少なくとも3回行った。

10

【0628】

フローサイトメトリー

【0629】

上記に記載されたように、NTHIバイオフィームを、8ウェルチャンバーのあるカバーガラススライドにおいて確立した。16時間後、培地を、それぞれのウェルから吸引し、バイオフィームを、5μgのウサギポリクローナルIHFIgGとともに15分間、または11μgのポリクローナルウサギ抗rsPILAIgGとともに6時間、37℃、5%のCO₂でインキュベートした。それぞれの個々の時点で、それぞれのバイオフィームの上の190μlの上清を収集し、ハンクス平衡塩溶液中の1μMのFM1-43FX（Invitrogen）に移し、室温で15分間、静的にインキュベートした。緩衝液にチョコレート寒天培地から集めたNTHIは、「塊になった」細菌対照としての役割を果たした。穏やかなピペティングとそれに続く5分間の超音波処理によって緩衝液に懸濁されたNTHIは、「塊になっていない」細菌対照としての役割を果たした。蛍光染色されたNTHIの前方散乱および側方散乱のプロファイルを、BDLSRIIFローサイトメーターおよびFlowJoソフトウェアを用いて調べ、10,000事象を、それぞれの試料について収集した。

20

30

【0630】

RNA単離およびqRT-PCRアッセイ

【0631】

RNA単離のために、出願人は、T-25組織培養フラスコに、 2×10^5 CFU/mlの6mlのNTHIを播種した。37℃、5%のCO₂での16時間のインキュベーション後、フラスコを、穏やかに反転させ、培地を注ぎ出した。フラスコを逆さまにして、6mlの事前に温めたDPBSを添加し、次いで、フラスコをゆっくりと反転させて、バイオフィームを穏やかに洗浄した。DPBS洗浄液を除去するために、フラスコを再び反転させ、DPBSを注ぎ出した。SBHIに希釈された抗体を、依然として逆さまにしたフラスコに添加して、チャンバースライドアッセイにおいて使用されたのと同じ濃度の抗体/cm²を送達した（1mlあたり51.5μgの抗IHFIgG、または1mlあたり113μgの抗rsPILAIgG）。フラスコを、インキュベーターに戻し、培地がバイオフィームを再び覆うように、穏やかに逆さまにした。抗IHFIについて3分後、または抗rsPILAについて3時間後、フラスコを逆さまにし、培地を注ぎ出して、NRelNTHIを収集し、16.1×gで1分間遠心分離した。上清を吸引し、細菌ペレットに、1mlのTRIzol（商標）試薬（ThermoFisher、Waltham、MA）を直ぐに添加した。試料を-80℃で保管した。

40

【0632】

RNAをQiagenRNeasyキット（Qiagen、Germantown、

50

MD)を用いて精製した。残ったDNAを、20UのSUPERase In RNase阻害剤(Ambion)の存在下、37℃で45分間、製造業者の説明書により、DNase I(NEB)による処置によって除去した。相対遺伝子発現を、製造業者により、Superscript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCRキット(ThermoFisher)を用いる定量的逆転写PCR(qRT-PCR)によって評価した。遺伝子発現を16Sに対して正規化し、相対発現を、比較($\Delta\Delta C_T$)方法によって算出し、遺伝子発現の倍数変化を、 $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ として表した。結果は、三反復でそれぞれアッセイされた3つの生体試料の平均を表す。遺伝子発現の2倍の変化を生物学的に有意と見なした。使用したプライマーを表3にリストする。

10

【0633】

表3. 本研究で使用したプライマー

【表3-1】

プライマー	配列	配列番号
<i>acrR</i> -フォワード	CGGCGATAAATTTAGCCTCTGA	
<i>acrR</i> -リバーズ	TGAATCGCACGCCAAGAG	
<i>artM</i> -フォワード	GTCTTATCCAATGCGTGGTTCT	
<i>artM</i> -リバーズ	GGATGCTAATGCCGTTCTTTA	

20

【表3-2】

<i>deaD</i> -フォワード	TGTGGTGAACACTACGACATTCC	
<i>deaD</i> -リバーズ	GATCCTGATCGGCTGTGAATAA	
<i>emrA</i> -フォワード	CCGCAAATACAGAATGCGATAAA	
<i>emrA</i> -リバーズ	ATTACGACGCGCCACATAG	
<i>emrB</i> -フォワード	CGGTAACCTTCGAGCCATCA	
<i>emrB</i> -リバーズ	GCCAGACAGCGTTATTGTAGTA	
<i>fis</i> -フォワード	TAATCCTGCCGATGCCTTAAC	
<i>fis</i> -リバーズ	CGGGTTTGATTACCACGAGTAT	
<i>folA</i> -フォワード	TTGGTCGTCCACTACCTAAAC	
<i>folA</i> -リバーズ	GACCGCACTTTCAAAGCTATC	
<i>folP</i> -フォワード	TGCTGGATTCTGTGCGATTCTT	
<i>folP</i> -リバーズ	GCTCTTGCAAAGCACGAATATC	
16S-フォワード	AAAGGAGACTGCCAGTGATAAA	
16S-リバーズ	CCCTCTGTATACGCCATTGTAG	

30

40

50

【0634】

統計分析

【0635】

データは、1試料あたり2回または3回の技術的反復で別々の日に行われた少なくとも3回の生物学的反復の平均±SEMとして表される。統計分析を、GraphPad (Prism) ソフトウェアバージョン8.2を用いて行った。多重比較を、ホルムーシダック補正を伴う一元配置分散分析によって行った。すべての他の比較は、スチューデントのt検定を用いて行った。質量分析および世代主成分分析によって特定されたタンパク質の正規化されたスペクトルカウントにおける倍数変化の比較を、R (Bioconductor) において行った。フローサイトメトリーデータを、コルモゴロフスミルノフ検定によって分析して、前方散乱および前方散乱のプロファイルについて、抗rsPILANReL対抗IHFNReLの累積分布を比較した。

10

【0636】

データ利用可能性

【0637】

この研究の間に作成および分析されたすべてのデータは、表1に見ることができる。

実験番号3 - 抗rsPIL A抗体および抗DNABIIチップキマー (chimer) 抗体の相乗効果

【0638】

NTHI+Streptococcus pneumoniae+Staphylococcus aureasを、1:1:1の比で、37℃および5%のCO₂で16時間成長させ、バイオフィルムを形成させた後、2時間処置した。4つの処置群は、例えば、陰性対照として培地のみ、3μgの抗rsPIL A抗体、1.25μgの抗MsTipMab (すなわち、DNABIIチップキマー (chimer) に対するマウスモノクローナル抗体)、および3μgの抗rsPIL A抗体と1.25μgの抗MsTipMabを含む。細菌をFM1-43 FXで標識し、相対蛍光をウェルごとに算出した。図7に示されるように、30.5%のバイオフィルムの低減が、組合せ処置において観察されたが、単剤処置は、4.6%および0.7%の低減を示し、明確な相乗的な転帰が、抗rsPIL Aと抗チップキマー (chimer) モノクローナル抗体による組合せ処置を介して達成されたことを示唆する。

20

実験番号4 - 2つの固有の機構を活用して細菌をバイオフィルムからNReL状態に放出して、格好の拡大された治療域を達成する

【0639】

出願人は、バイオフィルム所在からの細菌の放出による正確な機構が、新たに放出された (NReL) 集団の表現型に著明な影響を有していたと決定した。例えば、実験番号1を参照されたい。明確に異なる決定基を標的にするこれらの2つの方法を組み合わせることによって、出願人は、処置および／または防止のいくつかの重要なボトルネックを克服することができる。

30

【0640】

各種の機構を介してバイオフィルムから放出された細菌が、バイオフィルム内に内在するもの、またはプランクトン様に成長した (実験室において一般に行われる通り) 場合のものとは異なることを示したが、出願人は、遺伝的同一性にもかかわらず、NReL細菌の集団が、それらがバイオフィルムから放出された正確な様式に起因して固有であると決定した。これらのNReL細菌集団の表現型は、バイオフィルムが病態形成および疾患経過に大いに寄与する慢性および再発性の細菌性疾患の処置および／または防止の両方に対する複数のボトルネックを克服する固有の方法で活用することができる。

40

【0641】

この予期せぬ発生を考慮して、出願人は、抗DNABIIおよび抗PIL Aを組み合わせる相乗的な保護／治療転帰をさらに観察し、そのような相乗効果を繰り返すように、DNABIIタンパク質およびPIL Aの両方で免疫した。方法および他に関するより詳細

50

について、Novotny et al 2015およびNovotny et al 2017 Clinical Vaccine Immunology 24:e00563-16を参照されたい。出願人はまた、P i l Aに対する抗体または

I H Fに対する抗体が、バイオフィルムから細菌を放出させ、バイオフィルム中のものとは異なる抗生物質の作用に対して非常に感受性になった状態にしたことも実証した（Bro ckson, ME et al. 2014 ; Mokrzan, EM et al. 2018を参照されたい）。これらの結果の前に、出願人は、これらの2つの免疫原によって誘導された抗体が、異なるプロテオーム、トランスクリプトーム、および抗生物質に対する感受性を有する、2つの遺伝子学的に同一であるが表現型的に明確に異なる細菌の集団をもたらすことを予想していなかった。他の免疫エフェクターに対する感受性は、調査中である。

10

【0642】

慢性および再発性の細菌性疾患は、かなりの世界的な健康負荷を示す。それらは、生来、処置することが非常に困難であり、従来の抗生物質に対して非常に耐性である。出願人は、処置および／または相乗的な臨床転帰の持続的な絶好の機会を発展させる様式で、免疫誘導抗体および／または明確に異なる記載されたN R e l状態を誘導する抗体の治療的送達を組み合わせることが可能であると構想した。

【0643】

文献では、任意のいくつかの方法を介してバイオフィルム所在から放出された細菌が、それらが、バイオフィルム群衆の部分であった場合および／またはそれらが、典型的には実験室で行われるように、プランクトン様に成長された場合の両方とは異なることを実証した。出願人は、この観察に興味をそそられ、N T H IのI V型単収縮線毛に特異的に対するアプローチ、または種に依存せず、2つのD N A B I Iタンパク質のいずれか内の保護エピトープに特異的に対するアプローチのいずれかを疑問に思い、バイオフィルム所在から放出されたN T H Iおよびの他の細菌は両方とも、実際に、これらの新たに放出された（N R e l）細菌を抗生物質による死滅に対して非常に感受性になった。これは、細菌が、疾患状態で真にプランクトン様であることは決してなく、それらは、悪名高くも処置することが困難な保護バイオフィルム内に存在することを好むので、臨床的に関連する疑問である。出願人は、出願人が抗 r s P i l A抗血清または抗D N A B I I抗血清のいずれかによりバイオフィルムから細菌を非常に脆弱な状態（従来の抗生物質および／または免疫エフェクターのいずれかに対して）に放出する場合、おそらく、これを臨床的に活用できると仮説を立てた。出願人は、実際に、N R e l N T H IおよびN R e l M . c a t a r r h a l i sの両方に対する抗生物質によるこの増強された死滅を実証することができたが、しかしながら、出願人が予期できなかったのは、少なくともN T H Iについて、抗 r s P i l A血清または抗D N A B I I血清のいずれかによってバイオフィルム所在からの放出後に生じたN R e lの集団が、遺伝子学的に同一であるにもかかわらず、表現型が明確に異なったことであった。この差異は、プロテオミクス、トランスクリプトミクス、および所与の抗生物質による明確に異なる統計的に有意な増加した死滅によって証拠付けられた。理論によって拘束されることを望まないが、出願人は、混合細菌バイオフィルム感染の状態、出願人が、抗 r s P i l Aの力を十分に利用して、L u x SおよびI V型線毛の両方のプログラムされた発現に起因して確立されたバイオフィルムからのN T H Iの持続的であるがゆっくりとしたトップダウン放出を誘導するだけでなく、能動免疫および／または保護エピトープに特異的に対する抗D N A B I I抗体の治療的送達のいずれかも介するが、能動免疫の結果としての任意の新たなN T H Iバイオフィルムの形成を防止し、プログラムされていない機構を介した複数の細菌種によって形成されたバイオフィルムを迅速に破壊するというこの理解を活用することができると仮説を立てた。これらの抗血清の両方が、明確に異なるN R e l表現型を誘導することを考慮して、これは、必要により、抗生物質処置のため、およびいずれかが単独で誘導することが可能である可能性があることを超えて持続および増幅される宿主媒介クリアランスのための絶好の機会を提供する。この仮説は、N R e l状態の誘導が、N R e l集団の遺伝的同一性にもかかわらず、放出の正確な機構と明確に異なり、それに寄与した、非常に予想外の結果におい

20

30

40

50

て予測される。バイオフィルムが、長期間所定の場所にあり、複数の細菌から構成される疾患では、出願人は、抗DNA B I I抗体が、種に依存しない様式でこれらの既存のバイオフィルムを減量し、特定の抗生物質の死滅作用およびおそらく免疫エフェクターに感受性の複数のN R e l集団を生成する一方で、抗r s P i l A抗血清が、防止的および治療的の両方で、抗生物質、および必要により免疫エフェクターに対するその自身の固有の感受性を有するN R e l集団を誘導することによって哺乳動物の気道全体にわたって疾患において役割を果たすN T H Iを特異的に標的にするように作用するという仮説を立てた。有効な抗バイオフィルム戦略を誘導することができる方法が多くなれば、予期される力がより大きくなり、より多くの肯定的な臨床転帰が予測される。理想的には、治療的適用のためには、出願人は、出願人が特定および特徴付けたr s P i l AおよびDNA B I Iタンパク質両方の特異的保護エピトープに対するヒト化モノクローナル抗体も使用する。能動免疫適用のためには、出願人は、出願人が設計し、それらの相対有効性について広範囲に前臨床で試験したワクチン候補で同様に免疫した。

10

【0644】

出願人は、複数の高い優先度の病原体による多様な単一種および混合種のバイオフィルムの両方を構築するために開発されたハイスループット96ウェルバイオフィルムプレートアッセイを使用し、これらのバイオフィルムを、抗r s P i l A単独、抗DNA B I I単独、または両方の組合せのいずれかで処置して、既存のバイオフィルムを破壊／分散させるそれらの相対的な能力を決定する。試験される細菌は以下を含む：N T H I、M . c a t a r r h a l i s、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a、B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a、E S K A P E病原体およびその他。

20

【0645】

さらに、出願人は、N R e l細菌を生成／回収するためにハイスループットアッセイを使用して、上記の単一種および混合種のバイオフィルムの両方を試験するプランクトン様対応物（臨床微生物学研究室でMIC値および患者のための処置レジメンを決定するために使用される通り）と比較した場合に、相対抗生物質感受性について試験する。

【0646】

加えて、出願人は、バイオフィルム疾患の3つの動物モデル（OMのチンチラモデル、インプラント周囲炎のラットモデルまたは肺疾患のマウスモデル）のいずれかを使用して、上記で仮説を立てた組み合わせられた能動免疫＋治療アプローチを試験する。

30

実験番号5 — 2種バイオフィルムの破壊／分散相乗アッセイ

【0647】

細菌を寒天上で18～20時間成長させ、次いで、補充されたB H Iブロス（s B H I）に希釈して、両方の微生物と一緒に培養されて生存することを可能にするように事前に決定された特定の標的濃度を達成し、我々が、N T H Iが処置されたときに同じ年齢の単一種バイオフィルム中にあった場合に達成可能な濃度と類似の濃度でN T H Iを回収することを可能にした。100 μ lの2つの細菌懸濁液のそれぞれを、8ウェルのカバーされたチャンバーガラススライドの適切なウェルに添加した。しかしながら、N T H Iのみが播種されたウェルについて、100 μ lのs B H Iを、すべてのウェルが200 μ lに培養培地の最終体積を含有するように、添加した。それぞれの細菌のペアリングについての標的濃度を下記にリストする（N T H I：第2の細菌種の比がそれぞれのペアリングに固有であったことに留意されたい）。

40

【0648】

表4.

【表 4 - 1】

	cfu / ウェル		cfu / ウェル
NTHI	2.00E+04	<i>B. cenocepacia</i>	5.00E+03
NTHI	2.00E+04	<i>S. aureus</i>	2.50E+03

【表 4 - 2】

NTHI	1.00E+08	<i>S. pneumoniae</i>	5.00E+04
NTHI	2.00E+04	<i>M. catarrhalis</i>	6.00E+04

10

【0649】

チャンバーのあるカバーガラススライドを、次いで、37℃、5%のCO₂で24時間インキュベートした。ウェルを、200μlの事前に温めたsBHIで1回穏やかに洗浄して、バイオフィーム内ではない任意の細菌を除去し、次いで、200μlの無菌sBHI（陰性対照）、抗*r s P i l A*モノクローナル抗体、抗チップキマー（*c h i m e r*）モノクローナル抗体（A5-mB4チップキマー（*c h i m e r*）抗体）、または抗*r s P i l A*+抗チップキマー（*c h i m e r*）モノクローナル抗体のカクテル（「コンボ」、すべてsBHIに希釈）のいずれかをウェルに添加した。チャンバーのあるカバーガラススライドを、次いで、37℃、5%のCO₂で2時間インキュベートした。

20

【0650】

インキュベーション後、150μlの培地を、それぞれのウェルから除去し、無菌エッペンドルフ管に入れた。次いで、200μlの無菌DPBSを、任意の残ったバイオフィームを妨げないようにそれぞれのウェルに注意深く添加し、この150μlを収集し、エッペンドルフ管に添加し、それぞれのウェルについて繰り返した。これらのプールされた液体は、適用されたモノクローナル抗体または抗体カクテルの作用によってバイオフィーム所在から新たに放出された（NRel）細菌、または陰性対照（sBHI）で「処置された」バイオフィームの場合における細菌を含有し、細菌は、それらがバイオフィームから剥がれたかまたはバイオフィームと全く会合せず、「バイオフィームリモデリング」の通常の部分として培養液中で単に成長していたので、培養液中に単に存在することを表す。

30

【0651】

出願人が、DNABIIタンパク質を標的にする抗血清の作用を介して産生されたNRelが、小さな凝集体中のバイオフィーム所在からの細菌の放出を誘導した（一方で、抗*r s P i l A*の作用によって産生されたものは単一細胞である）ことをすでに決定していたので、すべての管を、2分間穏やかに超音波処理をした後、連続希釈し、最も正確なカウントを保証するために、適切な寒天上に細菌を蒔いた。

40

【0652】

この研究では、出願人は、NTHI、およびバイオフィームが病態形成に寄与する多くのヒト疾患においてNTHIとともに一般に見出される別のヒト気道病原体によって形成されるバイオフィームを調べた。NTHI+*Burkholderia cenocepacia*は、特に、嚢胞性線維症（CF）を有する個体において非常に問題があり；NTHI+*Staphylococcus aureus*は、気道全体にわたって問題があるコンボであり、NTHI+*Streptococcus pneumoniae*は、気道全体にわたって問題がある。図9におけるそれぞれのプロットは、多くの細菌（NRel）が、陰性対照である培地単独（sBHI）によって、抗*r s P i l A*によって、抗*T i p M a b*によって、または抗血清カクテルによって新たに放出されることを示す。白色の

50

バーは、それがバイオフィルムを単独で構築した場合に、NTHIに起こることを表す（図7を参照されたく、ここで、sBHIが、バイオフィルムから細菌を放出しないが、抗*r s P i l A*抗体および抗*T i p M a b*の両方が放出し、カクテルが、相乗的であり、このようにして最も高い放出を誘導することを示す）－白色のバー。それらは灰色で影が付けられたバー、および黒色のバーは、NTHIが別の細菌種とバイオフィルムを形成し、sBHI、2つの抗血清のうちの1つ、または両方の抗血清のカクテルで処置された場合を示す。図9を参照されたい。図10は、NTHIおよびM. *c a t*. バイオフィルムの処置の結果を示す。

実験番号6 – 中耳炎

【0653】

中耳感染症（または中耳炎、OM）は、世界的に非常に蔓延している疾患であり、最も重度の形態（慢性化膿性OMまたはCSOMと呼ばれる）に、世界で毎年5000万～3億3000万人の小児が苦しんでいる。OMの社会経済的負荷も大きく、費用は、米国単独で毎年50～60億ドルと推定される。OMの普及している細菌性病原体の3つすべてが、*i n v i t r o*および*i n v i v o*の両方でバイオフィルムを形成することが公知であり、最近、臨床医らは、OMの慢性性および再発性が、少なくとも部分的に、中耳腔内の細菌性バイオフィルムの形成に起因することを認識するようになっている。

【0654】

実際に、微生物培養物と組み合わせた、鼓膜切開チューブおよび持続性耳漏を伴う小児患者由来の耳漏固体をeDNAおよびIHFについて標識した結果は、バイオフィルムが、慢性耳漏において役割を果たすことを示す。具体的には、分析された15の小児耳漏試料のうち、9（60％）は、eDNA（ウサギ抗IHFを使用して標識され、Alexa Fluor 594にコンジュゲートされたヤギ抗ウサギIgGで検出される）の格子と関連するIHFの標識化について陽性の固体を含有し、75％は、陽性の細菌培養物を生じた。細菌培養結果は、H. *i n f l u e n z a e*、Staphylococcus *a u r e u s* (MRSA)、S. *p n e u m o n i a*、M. *c a t a r r h a l i s*、およびP. *a e r u g i n o s a*の存在を実証した。これらのデータは、DNABIIタンパク質が、他の耳疾患の中で、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏における治療標的としての機能を果たし得ることを示唆する。

【0655】

OMの1つのチンチラモデルでは、若年チンチラに、最初に、ウイルス性「風邪」を与え、それに続いて1週間後、生菌の接種物により鼻腔内にチャレンジした。「私の子供は風邪をひき、1週間後に耳感染症になった」ヒトの状態と同様に、チンチラも、チャレンジのおよそ1週間後に、細菌性OMを発生した一方で、ウイルス性上気道感染症を経験した。細菌の増加が中耳に達すると（耳管の上昇を介して、または中耳洞への直接的なチャレンジ後のいずれか）、それらは、頑強なバイオフィルムを形成する。そのため、出願人は、本明細書で報告されるように、チンチラモデルを企図し、これを実際にすでに使用して、既存のバイオフィルムの迅速な消失をもたらすIHF免疫化の保護有効性を実証した。このモデルはまた、抗DNABII抗体の受動送達を介した、またはIHFもしくは他のDNABIIファミリーメンバーに結合することが公知の小分子もしくは他の薬剤の送達を介した、治療アプローチのために有用である。

【0656】

本明細書に開示される組合せおよび／または方法の有効性を決定するために、NTHI細菌を、チンチラの中耳洞に注射し、バイオフィルムを形成させた。特に、中耳疾患の証拠がない成体チンチラ（Chinchilla *l a n i g e r a*）を購入し（Rauscher's Chinchilla Ranch, LLC）、7日間休息させた後、無菌のパイロジェンフリー生理食塩水に希釈された水疱あたり1000コロニー形成単位（CFU）の分類不可能なHaemophilus *i n f l u e n z a e* 番号86-028NPによる経水疱チャレンジを行った（ゼロ（0）日目）。次いで、4日目および5日目、または4日目、5日目および6日目のいずれかに、本明細書に開示される組成物を、

10

20

30

40

50

それぞれの中耳洞に注入する（水疱あたり100 μ l）。4日目および5日目に投与されたチンチラについて、コホートあたり3頭のチンチラを、6日目または12日目（2用量の実験）のいずれかに犠牲にする。4日目、5日目および6日目に投与されたチンチラについて、コホートあたり3頭のチンチラを、13日目（3用量の実験）に犠牲にする。犠牲にした後、チンチラを、画像化し、中耳粘膜を収集し、付着バイオフィルムを評価し、中耳液を収集し、細菌の定量化を行い、中耳液を、サイトカイン多重アッセイを使用して評価する。

【0657】

中耳液を収集し、アリコート連続希釈し、チョコレート寒天上に蒔き、相対プランクトン様細菌負荷を定量化する。残った液体を、1000 $\times$ gで5分間遠心分離し、上清を分離し、細胞ペレットおよび液体画分の両方を、急速凍結した後、 -80°C で保管する。中耳粘膜および付着細菌バイオマス、デジタル的に画像化し、事前に秤量した微量遠心分離管に収集し、1.0 mlの無菌の0.9%塩化ナトリウム中でホモジナイズする。ホモジネートも、前のように、連続希釈して、蒔き、組織／バイオマスの1 mgあたりの中耳洞内で付着した細菌の集団を定量化する。残った試料を、急速凍結した後、 -80°C で保管する。培養プレート、加湿雰囲気中、 37°C で24時間インキュベートした後、Protocol 2装置（Synbiosis）を介して細菌コロニーを計数する。

【0658】

デジタルカメラシステム（MedRx、Largo、FL）に接続された0度の3インチプローブを使用するビデオ耳鏡検査を利用して、OMの徴候（例えば、鼓膜炎および／または中耳洞における液体の存在）をモニターする。ティンパノメトリーを、MADSEN Otoflexティンパノメーターを用いて行い、データを、OTOSuiteソフトウェア（Otometrics、Schaumburg、IL）を用いて分析する。OMの全体的な徴候は、確立された0～4+のスケールに対して盲検的に格付けし、 ≥ 2 のスコアを有する中耳は、中耳液が鼓膜の後で見える場合に、OMについて陽性となす。鼓膜が、外耳道内の閉塞に起因して（すなわち、耳垢蓄積に起因して）見ることができない場合、その耳は、毎日のカウントから除外する。確立されたプロトコールにより、それぞれの中耳は独立しているとなし、それぞれのコホートについて、OMを有する中耳のパーセンテージを算出する。

【0659】

中耳洞内の残存バイオフィルムをランク付けするために、中耳の画像をスクランブルし、7人の個人によって盲検的にレビューする。確立された解説を使用して、0～4のスコアをそれぞれの画像に割り当てる：0：見えるバイオフィルムはない、1：バイオフィルムは中耳洞の $\leq 25\%$ を満たす、2：バイオフィルムは中耳洞の $> 25\% \sim \leq 50\%$ を満たす、3：バイオフィルムは中耳洞の $> 50\% \sim \leq 75\%$ を満たす、4：バイオフィルムは中耳洞の $> 75\% \sim \leq 100\%$ を満たす。

【0660】

このランク付け／スコア付けスケールは、下記の表に詳細に記載され、それぞれの動物の中耳内に残っているバイオマスの相対量を示す。

【0661】

表5

10

20

30

40

50

【表 5】

スコア	基準
0	バイオマスの証拠なし
1+	バイオマスは中耳洞の $\leq 25\%$ を満たす。骨中隔の下方水疱との接合部が見える。
2+	バイオマスは中耳洞の $>25\% \sim \leq 50\%$ を満たす。骨中隔が下方水疱と出会う場所は見ることができない。
3+	バイオマスは中耳洞の $>50\% \sim \leq 75\%$ を満たす。バイオマスは、骨中隔の長さの $>50\%$ を覆っている。
4+	バイオマスは中耳洞の $>75\% \sim \leq 100\%$ を満たす。骨中隔は見え、バイオマスによって覆い隠されている。

10

20

【0662】

清澄化された中耳液中の炎症誘発性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインのパネル（IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12p70、IL-17A、TNF、IFN γ 、IL-4、IL-10、およびIL-13）の相対量を、製造業者の説明書に従って、BD Cytometric Beadアレイ（BD Biosciences）を使用して決定し、試料を、BD Accuri C6サイトメーターにおいて評価する。データを、FloJo V_10ソフトウェアを用いて分析する。

実験番号7 - 口腔疾患の処置

【0663】

いくつかの口腔細菌（例えば、Aggregatibacter actinomycetemcomitans、Porphyromonas gingivalis）が、歯槽骨および歯肉を破壊する歯周炎およびインプラント周囲炎などの炎症性疾患の病態形成に関わっている。これらの細菌の病態形成の調査は、有効な動物モデルの欠如によって妨げられている。特定の細菌の病原性を調査することの課題の1つは、外因性細菌が、動物の口腔に導入された場合のバイオフィルムを確立する困難さである。歯周炎の動物モデルは開発されているが、培養可能な細菌が、接種された動物の口腔から回収されることは稀である。特定の細菌の病原性を評価することができる有効な動物モデルを開発することは、それらの病原性機構を解明するのに大いに役立つ。

30

【0664】

機械加工したチタン歯科インプラント（1.2×4.5mm）の表面を、A103によるグリットブラスティング（100 μ m）、およびHClエッチング（pH7.8、80℃で20分間）によって改変することができる。機械加工およびナノテクスチャー加工したインプラントを、Aggregatibacter actinomycetemcomitans（Aa）のD7S臨床株を接種したTSB培地中、37℃で1～3日間インキュベートする。インプラント上の細菌バイオフィルムを、LIVE/DEAD（登録商標）BacLight（商標）で染色した後、SEMによって、および共焦点レーザー走査性顕微鏡法によって分析する。Aaバイオフィルムが確立されたインプラントおよび確立されていないインプラントを、雌ラットの上顎の小白歯領域と切歯領域との間で歯槽骨に経粘膜的に配置する。in vivoで配置されたインプラント上のAaバイオフィルムの存在を検出するために、細菌試料を、2日後に唾液およびインプラントの口腔表面か

40

50

ら収集する。A aは、培養によって、およびPCR分析によって検出することができる。さまざまな時点、例えば、植え込みの6週間後に、インプラント周囲の骨および粘膜組織のマイクロCTおよび組織学的分析を行うことができる。

【0665】

さらに、口腔は、バイオフィルム群集内に共存する数々の細菌種を含有する。これらの群集は、共生細菌、例えば、一部の口腔の*streptococci*、および他の細菌種、例えば、歯周炎の病原体である*Porphyromonas gingivalis*の両方を含有する。以前から存在するバイオフィルム内の*P. gingivalis*の侵入し、持続し、拡大する能力は、バイオフィルム内に存在する共生細菌と相互作用するその能力に依存する。*P. gingivalis*の1つの十分に特徴付けられている結合パートナーは、*Streptococcus gordonii*である。どのように*P. gingivalis*が*S. gordonii*と相互作用するかを理解すること、およびその相互作用を妨げることで、口腔内の天然バイオフィルム群集からこの重要な歯周炎の病原体の排除または除去を可能にし得る。共焦点顕微鏡法を利用して、バイオフィルム構造を分析し、差次的プレーティングおよび免疫蛍光顕微鏡法を使用して、バイオフィルム内に存在する細菌種の組成を決定することができる。

【0666】

本明細書に開示される方法および組成物は、これらのバイオフィルムの低減および／または排除のための治療戦略および防止戦略の両方を開発することを企図する。感染した対照と比較した発赤、炎症および出血の減少は、バイオフィルムの低減および／または排除を示すであろう。加えて、感染した対照と比較した、インプラントスクリューについての炎症性または炎症誘発性組織構造の低減または非存在およびトルク除去力の維持は、バイオフィルムの低減および／または排除を示すであろう。

実験番号8 - 嚢胞性線維症

【0667】

この実験は、嚢胞性線維症を処置する干渉性薬剤の前臨床試験のためのブタモデルを提供する。Stoltz et al. (2010) Science Translational Medicine 2(29):29-31を参照されたい。嚢胞性線維症は、CF膜貫通コンダクタンス調節因子(CFTRと呼ばれる)のアニオンチャネルをコードする遺伝子の突然変異に起因する常染色体劣性疾患である。このモデルでは、「CFTR」と呼ばれる遺伝子に欠損を持つように特異的に交配され、CFブタと呼ばれているブタは、複数の細菌種による下気道の感染症を含むCF肺疾患の顕著な特色を自発的に発生する。本明細書に開示される方法および組成物は、これらのバイオフィルムの低減および／もしくは排除、ならびに／または疾患および関連する病状の徴候の改善のための治療戦略および防止戦略の両方を開発することを企図する。

実験番号9 - P i l Aワクチン

【0668】

本明細書に記載される方法を使用して、ヒトおよび動物におけるP i l Aに対する免疫応答を誘発し得る。免疫原性組成物を、限定されるものではないが、アルミニウム塩およびリポソームなどのアジュバントの存在下で、ヒトおよび動物対象に投与し得る。当業者は、任意のいくつかの薬学的に許容されるアジュバントも使用することができることを理解するであろう。免疫原性組成物は、筋肉内、真皮下、鼻腔内、または任意の他の好適な経路により、ヒトまたは動物対象に投与され得る。免疫原性組成物は、選択された投与の方式と一致した方式で調製され得る。免疫原性組成物は、ポリペプチド、核酸またはそれらの組合せの形態をとってもよく、全長抗原または部分抗原を含んでいてもよい。加えて、または代替的に、免疫原性組成物は、特定の抗原によるパルス状のAPC、または特定の抗原をコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドで移入されたAPCの形態をとってもよい。投与は、免疫原性組成物の単一用量を含んでいてもよく、または初回投与とそれに続く1回もしくは複数回のブースター用量を含んでいてもよい。ブースター用量は、初期用量の1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、6

か月、もしくは12か月後、またはその後の任意の他の時点に提供されてもよい。ブースター用量は、対象の抗体力価の評価後に投与されてもよい。

実験番号10 - 受動免疫

【0669】

本明細書に記載される方法を使用して、本明細書に開示されるP i l Aおよび／またはD N A B I Iに対して非免疫対象に受動免疫を付与し得る。所与の抗原に対する受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識するか、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片の移入により付与され得る。抗体のドナーおよびレシピエントは、ヒトまたは非ヒト対象であり得る。加えて、または代替的に、抗体組成物は、特定の抗原を特異的に認識し、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを含み得る。

10

【0670】

受動免疫は、免疫原性組成物の投与が、レシピエント対象に対してリスクがあり、レシピエント対象が、免疫的に無防備であるか、またはレシピエント対象が、即時の免疫を必要とする場合に付与され得る。免疫原性組成物は、選択された投与の方式と一致した方式で調製され得る。組成物は、全抗体、抗原結合性断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、i n v i v oで生成された抗体、i n v i t r oで生成された抗体、精製されたもしくは部分的に精製された抗体、または全血清を含み得る。投与は、抗体組成物の単一用量を含んでいてもよく、または初回投与とそれに続く1回もしくは複数回のブースター用量を含んでいてもよい。ブースター用量は、初期用量の1日、2日、3日、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、6か月、もしくは12か月後、またはその後の任意の他の時点に提供されてもよい。ブースター用量は、対象の抗体力価の評価後に投与されてもよい。

20

均等物

【0671】

本発明を、上記の実施形態と併せて記載したが、前述の記載および例は、説明を意図し、本発明の範囲を限定しないことが理解されるべきである。本発明が付与する本発明の範囲内の他の態様、利点および改変は、当業者に明らかであろう。

【0672】

本開示が、具体的な実施形態、ならびに当業者によって用いられ得る本明細書に開示されるその実施形態の必要に応じた特色、改変、改善および変形形態によって具体的に開示されているが、そのような改変、改善および変形形態は、本開示の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。本明細書に提供される材料、方法、および例は、特定の実施形態の代表であり、例示であり、そして本開示の範囲に対する限定として意図されるものではない。

30

【0673】

本開示の範囲は、本明細書に広くおよび一般的に記載されている。一般的な開示内のより狭い種および下位属のグループ分けのそれぞれはまた、本開示の一部を形成する。これは、排除される材料が本明細書に具体的に列挙されているかどうかにかかわらず、任意の主題をその属から除去するという但し書きまたは否定的限定により、一般的記載を含む。

40

【0674】

加えて、本発明の特色または態様がマーカッシュ群の観点で記載される場合、当業者は、本発明が、それによって、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの下位群の観点でも記載されることを認識するであろう。

【0675】

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それぞれが個々に参照によって組み込まれたのと同程度まで、それらの全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。

配列表

【0676】

50

配列番号 1 (H10210 (1F8. F1 ヒト化 HC1 (抗チップキマー (chimer) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

【化 6 3】

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTY
AMSWVRQAPGKGLEWVATIGSDRRHTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCVGPDGYGGEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

10

【0677】

配列番号 2 (H10211 (1F8. F1 ヒト化 HC2、抗チップキマー (chimer) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

【化 6 4】

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTY
AMSWVRQAPGKGLEWVATIGSDRRHTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCVGPDGYGGEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

30

【0678】

配列番号 3 (H10212 (1F8. F1 ヒト化 HC3、抗チップキマー (chimer) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

40

【化 6 5】

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEV~~KL~~VQSGAEVKKPGASVKV~~SCKAS~~SGFTFRTY
AMSWVRQAPGQRLEWVATIGSDRRHTYYPDKFQGRVTITRDNAKNTLYMELSS
LRSEDTAVYYCVGPYDGYGEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

10

【0 6 7 9】

配列番号 4 (H 1 0 2 1 3 (1 1 E 7 . C 7))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

【化 6 6】

20

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEV~~QL~~VESGGGLVKPGGSLRLSCAASSGFTFSRY
GMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYTDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL
RAEDTAVYYCCERHGGDGYWYFDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

30

【0 6 8 0】

配列番号 5 (H 1 0 2 1 4 (1 1 E 7 . C 7 ヒト化 H C 2))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

【化 6 7】

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEV~~QL~~VESGGGLVKPGGSLRLSCAASSGFTFSRY
GMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTYTDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL

40

【化 6 8】

RAEDTAVYYCERHGGDGYWYFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG**

10

【0 6 8 1】

配列番号 6 (H 1 0 2 1 5 (1 1 E 7 . C 7 ヒト化 H C 3、抗チップキマー (c h i m e r) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

【化 6 9】

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSRY
GMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYTDSVKGRFTISRDNAKNILYLQMNSL
KTEDTAVYYCERHGGDGYWYFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG**

20

30

【0 6 8 2】

配列番号 7 (L 1 0 2 1 0 (1 F 8 . F 1 ヒト化 L C 1、抗チップキマー (c h i m e r) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

【化 7 0】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKT
FLNWLQQRPGQSPRRLIYLISKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCWQGTHFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

40

【0 6 8 3】

配列番号 8 (L 1 0 2 1 1 (1 F 8 . F 1 ヒト化 L C 2、抗チップキマー (c h i m e r) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

50

【化 7 1】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKT
FLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCWOGTHFPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

【0684】

10

配列番号 9 (L10212 (1F8. F1 ヒト化 LC3、抗チップキマー (chimer) 抗体))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

【化 7 2】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSDGK
TFLNWLQKPGQPPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAV
YYCWOGTHFPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC*

20

【0685】

配列番号 10 (L10213 (11E7. C7 ヒト化 LC1))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

【化 7 3】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNW
YQQKPGKAVKLLIYYTSRHLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQQ
GNPLRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC*

30

【0686】

配列番号 11 (L10214 (11E7. C7 ヒト化 LC2))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な CDR を示す。

【化 7 4】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNW
YQQKPGKAVKLLIYYTSRHLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQ
GNPLRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

40

【化 7 5】

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC*

50

【 0 6 8 7 】

配列番号 1 2 (L 1 0 2 1 5 (1 1 E 7 . C 7 ヒト化 L C 3))

太字フォントは、例示的な可変領域を示す一方、太字のイタリック体の下線付きフォントは、例示的な C D R を示す。

【 化 7 6 】

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNW
YQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISPLEPDAFYFCQOG
NPLRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC*

10

【 0 6 8 8 】

配列番号 1 3 (重鎖 コンセンサス配列、抗チップキマー (c h i m e r) 抗体)

【 化 7 7 】

MDPKGSLSWR ILLFLSLAFE LSYGEVqLVe SGgglvXPGg SlrlSCaASG 50
FTFXXYXMSW VRQAPGkgLE WVaTIXSXXX XTYXXDsvkG RfTIIsRDNaK 100
NtLYlqmnSL raEDTAVYYC XXXXXXXXXYXX FDXWGQGTxV TVSSASTKGP 150
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 200
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVdK KVEPKSCDKT 250
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 300
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
LNGKEYKCKV 350
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY 400
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 450
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG** 475

20

30

ここで、X および小文字は、対応する位置において、任意のアミノ酸で、または代替的に、配列番号 1 ~ 6 から選択されるアミノ酸で置換することができる。一実施形態では、X は、アミノ酸残基の非存在も示し得る。

【 0 6 8 9 】

配列番号 1 4 (軽鎖 コンセンサス配列、抗チップキマー (c h i m e r) 抗体)

【 化 7 8 】

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DXvMTQSPXs LsvslGXrat isCrXSQXXX 50

40

50

【化 7 9】

XXXXXXXXLNW XQqkPGqaXX XLIYXXSXIX SGvPdRfSGS GSGTDXTLdI 100
SslXXEDXav YyCXQGXXXXX XTFGXGTKXE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL 150
KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL 200
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSfNRGEC* 240

ここで、Xおよび小文字は、対応する位置において、任意のアミノ酸で、または代替的に、配列番号7～12から選択されるアミノ酸で置換することができる。一実施形態では、Xは、アミノ酸残基の非存在も示し得る。

10

【0690】

配列番号15 ヒトIgD定常領域、Uniprot:P01880

【化80】

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQPQRTEPEIQ
RRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTA
QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVY
LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
SQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASS
DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL
RVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPMK

20

【0691】

配列番号16 ヒトIgG1定常領域、Uniprot:P01857

【化81】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【0692】

配列番号17 ヒトIgG2定常領域、Uniprot:P01859

【化82】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

50

【0693】

配列番号18 ヒトIgG3定常領域、Uniprot:P01860

【化83】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRC
PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNIFSCSVMEALHNRTQKSLSLSPGK

10

【0694】

配列番号19 ヒトIgM定常領域、Uniprot:P01871

【化84】

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
LRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTDDQVQAEAKESG
PTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVDPQDTAIRVFAIPPS
FASIFLTKSTKLTCVLDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEAS
ICEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
TITCLVTGFSPADVVFQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

20

【0695】

配列番号20 ヒトIgG4定常領域、Uniprot:P01861

【化85】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

40

【0696】

配列番号21 ヒトIgA1定常領域、Uniprot:P01876

【化86】

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVARNFPPSQD
ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTSPSTPP
TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTFTWTPSSGKSAVQGP
PERDLGCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVH

50

【化 8 7】

LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQG
TTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
MAEVDGTCY

【0 6 9 7】

配列番号 2 2 ヒト Ig A 2 定常領域、Uniprot: P01877

【化 8 8】

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPPSQD
ASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSL
HRPALEDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVS
SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELK TPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGT TTTFAVTSILRVA
AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

10

【0 6 9 8】

配列番号 2 3 ヒト Ig カッパ 定常領域、Uniprot: P01834

【化 8 9】

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【0 6 9 9】

配列番号 2 4 (チップ重鎖コンセンサス配列)

【化 9 0】

MDPKGSLSWR ILLFLSLAFE LSYGEV kLVe SGgglvqPGg SlrlSCaASG 50
FTFRTYAMSW VRQAPG kgLE WVA TIIGSDRR HTYYPDsvkG RfTIsRDNaK 100
NTLYlqmnSL RaEDTAVYYC VGPYDGY YGE FDYWGQGT LV TVSSASTKGP 150
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 200
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT 250
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 300
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
350
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY 400
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 450
SCSV MHEALH NHYTQKSLSL SPG** 475

30

40

ここで、小文字は、対応する位置において、配列番号 1 ~ 3 から選択されるアミノ酸で置換することができる。

【0 7 0 0】

50

配列番号 25 (チップ軽鎖コンセンサス配列)

【化91】

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DVVMTQSPIS LpVtLGqpAs IsCrSSQSLL 50
 DSDGKTFLNW LQqrPGQsPr RLIYLVSKID SGVPDRFSGS GSGTDFTLki 100
 SrveAEDVgV YYCWQGTHFP YTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL 150
 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL 200
 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC** 240

10

ここで、小文字は、対応する位置において、配列番号7～9から選択されるアミノ酸で置換することができる。

【0701】

配列番号 26 (テール重鎖コンセンサス配列)

【化92】

MDPKGSLSWR ILLFLSLAFE LSYGEVQLVE SGGGLVkpGg SLRLSCaASG 50
 FTFSRYGMSW VRQAPGKGLE WVaTISSGGS YTYYTDSVKG RFTISRDNak 100
 NsLYLQMNSL raEDTAVYYC ERHGGDGYWY FDVWGQGTMV TVSSASTKGP 150
 SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAY 200
 LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT 250
 HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 300
 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV 350
 SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY 400
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 450
 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG** 475

20

30

ここで、小文字は、対応する位置において、配列番号4～6から選択されるアミノ酸で置換することができる。

【0702】

配列番号 27 (テール軽鎖コンセンサス配列)

【化93】

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIqMTQSPss LSaSvGdRvT itCRASQDIS 50
 NYLNWYQQKP GkAVkLLIYY TSRLHSGvPs RFSGSGSGTID YTLTISSLqP 100

40

50

【化 9 4】

EDFAIYICQQ GNPLRTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS 150
VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 200
SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC* 234

ここで、小文字は、対応する位置において、配列番号 10～12 から選択されるアミノ酸で置換することができる。

【0703】

10

配列番号 28 (IHF が結合するコンセンサス配列)

【化 9 5】

WATCAANNNTTR

ここで、W は、A または T であり、R は、プリンである。

【0704】

配列番号 29 (E. coli hupA、Genbank 受託番号：AP__003818、最終アクセス 2011 年 3 月 21 日)

【化 9 6】

20

MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGDAVQLVGFGTFK
VNHRAERTGRNPQTGKEIKIAAANVPAFVSGKALKDAVK

【0705】

配列番号 30 (E. coli hupB、Genbank 受託番号：AP__001090.1、最終アクセス 2011 年 3 月 21 日)

【化 9 7】

MNKSQIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFG
TFAVKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPSFRAGKALKDAVN

30

【0706】

配列番号 31 (IhfA、A チップ断片)

【化 9 8】

NFELRDKSSRPGRNPKTGDVV

【0707】

配列番号 32 (IhfB、B チップ断片)

【化 9 9】

40

SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL

【0708】

配列番号 33 (ペプチドリンカー)

【化 100】

Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu

【0709】

配列番号 34 (ペプチドリンカー)

50

【化 1 0 1】

Gly-Pro-Ser-Leu

【 0 7 1 0】

配列番号 3 5 (ペプチドリンカー)

【化 1 0 2】

Pro-Ser-Leu-Lys

【 0 7 1 1】

配列番号 3 6 (ペプチドリンカー)

【化 1 0 3】

Gly-Pro-Ser-Leu-Lys

【 0 7 1 2】

配列番号 3 7 (ペプチドリンカー)

【化 1 0 4】

Ser-Leu-Lys-Leu

【 0 7 1 3】

配列番号 3 8 (チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I)

【化 1 0 5】

RPGRNPX₁TGDVVPVSARRVV-X-FSLHHRQPRLGRNPX₁TGDSV

ここで、「X」は、必要に応じて、1～20アミノ酸を含むか、またはそれから本質的になるか、またはさらにそれからなる、必要に応じたアミノ酸リンカー配列であり、「X₁」は、任意のアミノ酸であるか、または代替的に、「X₁」は、アミノ酸 Q、R、K、S、もしくは T から選択される。

【 0 7 1 4】

配列番号 3 9 (チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I)

【化 1 0 6】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV-X-FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV

ここで、「X」は、必要に応じて、1～20アミノ酸を含む、必要に応じたアミノ酸リンカー配列である。

【 0 7 1 5】

配列番号 4 0 (チップキメラペプチド I h f A 5 - m I h f B 4 N T H I、一部の実施形態では、本明細書でチップキマー (chimer) と称される)

【化 1 0 7】

RPGRNPKTGDVVPVSARRVVGPSLFSLHHRQPRLGRNPKTGDSV

【 0 7 1 6】

配列番号 4 1 (テールキメラペプチド I h f A 3 - I h f B 2 N T H I)

【化 1 0 8】

FLEEIRLSLESGQDVKLSGF-X-TLSAKEIENMVKDILEFISQ

10

20

30

40

50

【0717】

配列番号42：非限定的な例示的リンカー：G G S G G S

【0718】

配列番号43：非限定的な例示的リンカー：G P S L K L

【0719】

配列番号44：非限定的な例示的リンカー：G G G

【0720】

配列番号45：非限定的な例示的リンカー：G P S L

【0721】

配列番号46：非限定的な例示的リンカー：G P S

10

【0722】

配列番号47：非限定的な例示的リンカー：P S L K

【0723】

配列番号48：非限定的な例示的リンカー：G P S L K

【0724】

配列番号49：非限定的な例示的リンカー：S L K L

【0725】

配列番号50（テールキメラペプチドI h f A 3 - I h f B 2 N T H I）

F L E E I R L S L E S G Q D V K L S G F G P S L T L S A K E I E N M V K D I L E
F I S Q

20

参考文献

30

40

50

【化 1 0 9】

2017a. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization.

apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258965/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf;jsessionid=4C4B74B963CED463A94DD2DE9CB5EACA?sequence=1

2017b. The world is running out of antibiotics, WHO report confirms. Geneva, World Health Organization. www.who.int/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms

10

Ahearn, C.P., Gallo, M.C., Murphy, T.F., 2017. Insights on persistent airway infection by non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathog Dis* 75. doi: 10.1093/femspd/ftx042

Andre, F.E., Booy, R., Bock, H.L., Clemens, J., Datta, S.K., John, T.J., Lee, B.W., Lolekha, S., Peltola, H., Ruff, T.A., Santosham, M., Schmitt, H.J., 2008. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bull World Health Organ* 86, 140-146. doi: 10.2471/blt.07.040089

20

Anes, J., McCusker, M.P., Fanning, S., Martins, M., 2015. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 6, 587. doi: 10.3389/fmicb.2015.00587

Armbruster, C.E., Hong, W., Pang, B., Dew, K.E., Juneau, R.A., Byrd, M.S., Love, C.F., Kock, N.D., Swords, W.E., 2009. LuxS promotes biofilm maturation and persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* *in vivo* via modulation of lipooligosaccharides on the bacterial surface. *Infect Immun* 77, 4081-4091. doi: 10.1128/IAI.00320-09

30

Armbruster, C.E., Hong, W., Pang, B., Weimer, K.E., Juneau, R.A., Turner, J., Swords, W.E., 2010. Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. *mBio* 1, e00102-00110. doi: 10.1128/mBio.00102-10

Armbruster, C.E., Pang, B., Murrah, K., Juneau, R.A., Perez, A.C., Weimer, K.E., Swords, W.E., 2011. RbsB (NTHI_0632) mediates quorum signal uptake in nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP. *Mol Microbiol* 82, 836-850. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07831.x

40

【化 1 1 0】

- Autio, T.J., Tapiainen, T., Koskenkorva, T., Narkio, M., Lappalainen, M., Nikkari, S., Hemmila, H., Koskela, K.A., Koskela, M., Koivunen, P., Alho, O.P., 2015. The role of microbes in the pathogenesis of acute rhinosinusitis in young adults. *Laryngoscope* 125, E1-7. doi: 10.1002/lary.24862
- Aziz, A., Sarovich, D.S., Nosworthy, E., Beissbarth, J., Chang, A.B., Smith-Vaughan, H., Price, E.P., Harris, T.M., 2019. Molecular signatures of non-typeable *Haemophilus influenzae* lung adaptation in pediatric chronic lung disease. *Front Microbiol* 10, 1622. doi: 10.3389/fmicb.2019.01622 10
- Bailey, M.T., Lauber, C.L., Novotny, L.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2020. Immunization with a biofilm-disrupting nontypeable *Haemophilus influenzae* vaccine antigen did not alter the gut microbiome in chinchillas, unlike oral delivery of a broad-spectrum antibiotic commonly used for otitis media. *mSphere* 5, e00296-00220. doi: 10.1128/mSphere.00296-20
- Bakaletz, L.O., Baker, B.D., Jursisek, J.A., Harrison, A., Novotny, L.A., Bookwalter, J.E., Mungur, R., Munson, R.S., Jr., 2005. Demonstration of type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 73, 1635-1643. doi: 10.1128/IAI.73.3.1635-1643.2005 20
- Barkai, G., Leibovitz, E., Givon-Lavi, N., Dagan, R., 2009. Potential contribution by nontypeable *Haemophilus influenzae* in protracted and recurrent acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 28, 466-471. doi: 10.1097/inf.0b013e3181950c74
- Barrero, M.A., Pietralonga, P.A., Schwarz, D.G., Silva, A., Jr., Paula, S.O., Moreira, M.A., 2014. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl ss-naphthylamide (PAssN) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Res Vet Sci* 97, 176-181. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.05.013 30
- Beekmann, S.E., Heilmann, K.P., Richter, S.S., Garcia-de-Lomas, J., Doern, G.V., Group, G.S., 2005. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and group A beta-haemolytic streptococci in 2002-2003. Results of the multinational GRASP Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 25, 148-156. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.016 40

【化 1 1 1】

- Belfield, K., Bayston, R., Birchall, J.P., Daniel, M., 2015. Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 79, 296-300. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.01.003
- Brockson, M.E., Novotny, L.A., Mokrzan, E.M., Malhotra, S., Jurcisek, J.A., Akbar, R., Devaraj, A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2014. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol* 93, 1246-1258. doi: 10.1111/mmi.12735
- Cardines, R., Giufre, M., Pompilio, A., Fiscarelli, E., Ricciotti, G., Di Bonaventura, G., Cerquetti, M., 2012. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int J Med Microbiol* 302, 45-52. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.08.003
- Carruthers, M.D., Tracy, E.N., Dickson, A.C., Ganser, K.B., Munson, R.S., Jr., Bakaletz, L.O., 2012. Biological roles of nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus proteins encoded by the pil and com operons. *J Bacteriol* 194, 1927-1933. doi: 10.1128/JB.06540-11
- Chambers, J.R., Cherny, K.E., Sauer, K., 2017. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e00846-00817. doi: 10.1128/AAC.00846-17
- Chua, S.L., Liu, Y., Yam, J.K., Chen, Y., Vejborg, R.M., Tan, B.G., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L., 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat Commun* 5, 4462. doi: 10.1038/ncomms5462
- Cleary, D., Devine, V., Morris, D., Osman, K., Gladstone, R., Bentley, S., Faust, S., Clarke, S., 2018. Pneumococcal vaccine impacts on the population genomics of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Microb Genom* 4, e000209. doi: 10.1099/mgen.0.000209
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
- D'Andrea, M.M., Lau, G.W., 2020. DNABII targeting antibodies as vaccines against biofilm diseases. *EBioMedicine* 58, 102921. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102921

10

20

30

40

50

【化 1 1 2】

- Daines, D.A., Bothwell, M., Furrer, J., Unrath, W., Nelson, K., Jarisch, J., Melrose, N., Greiner, L., Apicella, M., Smith, A.L., 2005. *Haemophilus influenzae* luxS mutants form a biofilm and have increased virulence. *Microb Pathog* 39, 87-96. doi: 10.1016/j.micpath.2005.06.003
- Das, J., Mokrzan, E., Lakhani, V., Rosas, L., Jurcisek, J.A., Ray, W.C., Bakaletz, L.O., 2017. Extracellular DNA and type IV pilus expression regulate the structure and kinetics of biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *mBio* 8, e01466-01417. doi: 10.1128/mBio.01466-17 10
- Delcour, A.H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794, 808-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Devaraj, A., Buzzo, J., Rocco, C.J., Bakaletz, L.O., Goodman, S.D., 2018. The DNABII family of proteins is comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm structure. *MicrobiologyOpen* 7, e00563. doi: 10.1002/mbo3.563 20
- Devaraj, A., Justice, S.S., Bakaletz, L.O., Goodman, S.D., 2015. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol* 96, 1119-1135. doi: 10.1111/mmi.12994
- Dongari-Bagtzoglou, A., 2008. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6, 201-208. doi: 10.1586/14787210.6.2.201
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., Luisi, B.F., 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 16, 523-539. doi: 10.1038/s41579-018-0048-6 30
- Fernandez-Villa, D., Aguilar, M.R., Rojo, L., 2019. Folic acid antagonists: Antimicrobial and immunomodulating mechanisms and applications. *Int J Mol Sci* 20, 4996. doi: 10.3390/ijms20204996
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415
- Freire, M.O., Devaraj, A., Young, A., Navarro, J.B., Downey, J.S., Chen, C., Bakaletz, L.O., Zadeh, H.H., Goodman, S.D., 2017. A bacterial-biofilm-induced oral osteolytic infection can 40

【化 1 1 3】

be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. *Mol Oral Microbiol* 32, 74-88. doi: 10.1111/omi.12155

Gilbert, J.A., Blaser, M.J., Caporaso, J.G., Jansson, J.K., Lynch, S.V., Knight, R., 2018.

Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 24, 392-400. doi:

10.1038/nm.4517

Gillies, M., Ranakusuma, A., Hoffmann, T., Thorning, S., McGuire, T., Glasziou, P., Del Mar, C., 2015. Common harms from amoxicillin: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials for any indication. *CMAJ* 187, E21-E31. doi:

10.1503/cmaj.140848

Goodman, S.D., Obergfell, K.P., Jurcisek, J.A., Novotny, L.A., Downey, J.S., Ayala, E.A., Tjokro, N., Li, B., Justice, S.S., Bakaletz, L.O., 2011. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol* 4, 625-637. doi: 10.1038/mi.2011.27

Immunol 4, 625-637. doi: 10.1038/mi.2011.27

Goodwine, J., Gil, J., Doiron, A., Valdes, J., Solis, M., Higa, A., Davis, S., Sauer, K., 2019.

Pyruvate-depleting conditions induce biofilm dispersion and enhance the efficacy of antibiotics in killing biofilms *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* 9, 3763. doi: 10.1038/s41598-019-40378-z

40378-z

Grevers, G., Wiedemann, S., Bohn, J.C., Blasius, R.W., Harder, T., Kroeniger, W., Vetter, V., Pircon, J.Y., Marano, C., 2012. Identification and characterization of the bacterial

etiology of clinically problematic acute otitis media after tympanocentesis or spontaneous otorrhea in German children. *BMC Infect Dis* 12, 312. doi: 10.1186/1471-2334-12-312

Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A., 2001. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 12, 225-237. doi: 10.1006/scdb.2000.0248

Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., Balestrino, D., 2016. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* 17, 237. doi: 10.1186/s12864-016-2557-

x

10

20

30

40

50

【化 1 1 4】

- Hall, C.W., Mah, T.F., 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 41, 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010
- Harrison, A., Dyer, D.W., Gillasp, A., Ray, W.C., Mungur, R., Carson, M.B., Zhong, H., Gipson, J., Gipson, M., Johnson, L.S., Lewis, L., Bakaletz, L.O., Munson, R.S., Jr., 2005. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*; comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. J Bacteriol 187, 4627-4636. doi: 10.1128/JB.187.13.4627-4636.2005 10
- Harrison, C.J., Woods, C., Stout, G., Martin, B., Selvarangan, R., 2009. Susceptibilities of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, including serotype 19A, and *Moraxella catarrhalis* paediatric isolates from 2005 to 2007 to commonly used antibiotics. J Antimicrob Chemother 63, 511-519. doi: 10.1093/jac/dkn538
- Hassan, F., 2013. Molecular mechanisms of *Moraxella catarrhalis*-induced otitis media. Curr Allergy Asthma Rep 13, 512-517. doi: 10.1007/s11882-013-0374-8 20
- Huovinen, P., 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis 32, 1608-1614. doi: 10.1086/320532
- Jurcisek, J.A., Bakaletz, L.O., 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* *in vivo* contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. J Bacteriol 189, 3868-3875. doi: 10.1128/JB.01935-06
- Jurcisek, J.A., Bookwalter, J.E., Baker, B.D., Fernandez, S., Novotny, L.A., Munson, R.S., Jr., Bakaletz, L.O., 2007. The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. Mol Microbiol 65, 1288-1299. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05864.x 30
- Jurcisek, J.A., Dickson, A.C., Bruggeman, M.E., Bakaletz, L.O., 2011. *In vitro* biofilm formation in an 8-well chamber slide. J Vis Exp 20, 2481. doi: 10.3791/2481
- K, L.C.H., Akyol, S., Parkan, O.M., Dinc, G., Sav, H., Aydemir, G., 2017. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. Infez Med 25, 27-32. 40

【化 1 1 5】

Kaplan, E., Greene, N.P., Crow, A., Koronakis, V., 2018. Insights into bacterial lipoprotein trafficking from a structure of LolA bound to the LolC periplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E7389-E7397. doi: 10.1073/pnas.1806822115

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 33, 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15

Koff, W.C., Schenkelberg, T., 2019. The future of vaccine development. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.101

Kuehn, J., Ismael, Z., Long, P.F., Barker, C.I., Sharland, M., 2015. Reported rates of diarrhea following oral penicillin therapy in pediatric clinical trials. *J Pediatr Pharmacol Ther* 20, 90-104. doi: 10.5863/1551-6776-20.2.90

Lamont, R.F., Moller Luef, B., Stener Jorgensen, J., 2020. Childhood inflammatory and metabolic disease following exposure to antibiotics in pregnancy, antenatally, intrapartum and neonatally. *F1000Res* 9, F1000 Faculty Rev-1144. doi: 10.12688/f1000research.19954.1

Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: A package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1-18. doi: 10.18637/jss.v025.i01

Leibovitz, E., Broides, A., Greenberg, D., Newman, N., 2010. Current management of pediatric acute otitis media. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 151-161. doi: 10.1586/eri.09.112

Long, Y., Fu, W., Wang, S., Deng, X., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., Wu, W., 2020. Fis Contributes to resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin by regulating pyocin synthesis. *J Bacteriol* 202. doi: 10.1128/JB.00064-20

MacPherson, C.W., Mathieu, O., Tremblay, J., Champagne, J., Nantel, A., Girard, S.A., Tompkins, T.A., 2018. Gut bacterial microbiota and its resistome rapidly recover to basal state levels after short-term amoxicillin-clavulanic acid treatment in healthy adults. *Sci Rep* 8, 11192. doi: 10.1038/s41598-018-29229-5

Marks, L.R., Davidson, B.A., Knight, P.R., Hakansson, A.P., 2013. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *mBio* 4, e00438-00413. doi: 10.1128/mBio.00438-13

10

20

30

40

50

【化 1 1 6】

Martin, R.G., Rosner, J.L., 1997. Fis, an accessory factor for transcriptional activation of the mar (multiple antibiotic resistance) promoter of *Escherichia coli* in the presence of the activator MarA, SoxS, or Rob. *J Bacteriol* 179, 7410-7419. doi: 10.1128/jb.179.23.7410-7419.1997

Martinez-Antonio, A., Collado-Vides, J., 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 482-489. doi: 10.1016/j.mib.2003.09.002

10

Mittal, R., Parrish, J.M., Soni, M., Mittal, J., Mathee, K., 2018. Microbial otitis media: recent advancements in treatment, current challenges and opportunities. *J Med Microbiol* 67, 1417-1425. doi: 10.1099/jmm.0.000810

Mokrzan, E.M., Johnson, T.J., Bakaletz, L.O., 2019. Expression of the nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus is stimulated by coculture with host respiratory tract epithelial cells. *Infect Immun* 87, e00704-00719. doi: 10.1128/IAI.00704-19

Mokrzan, E.M., Novotny, L.A., Brockman, K.L., Bakaletz, L.O., 2018. Antibodies against the majority subunit (PilA) of the type IV pilus of nontypeable *Haemophilus influenzae* disperse *Moraxella catarrhalis* from a dual-species biofilm. *mBio* 9, e02423-02418. doi: 10.1128/mBio.02423-18

20

Mokrzan, E.M., Ward, M.O., Bakaletz, L.O., 2016. Type IV pilus expression is upregulated in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms formed at the temperature of the human nasopharynx. *J Bacteriol* 198, 2619-2630. doi: 10.1128/JB.01022-15

Murphy, T.F., Kirkham, C., Lesse, A.J., 2006. Construction of a mutant and characterization of the role of the vaccine antigen P6 in outer membrane integrity of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 74, 5169-5176. doi: 10.1128/IAI.00692-06

30

Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., Dessen, A., 2014. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Sci* 23, 243-259. doi: 10.1002/pro.2414

Novotny, L.A., Adams, L.D., Kang, D.R., Wiet, G.J., Cai, X., Sethi, S., Murphy, T.F., Bakaletz, L.O., 2009. Epitope mapping immunodominant regions of the PilA protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) to facilitate the design of two novel chimeric vaccine candidates. *Vaccine* 28, 279-289. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.017

40

【化 1 1 7】

Novotny, L.A., Amer, A.O., Brockson, M.E., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2013a.

Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacterial nucleic acid binding protein. PLoS One 8, e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629

Novotny, L.A., Clements, J.D., Bakaletz, L.O., 2013b. Kinetic analysis and evaluation of the mechanisms involved in the resolution of experimental nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced otitis media after transcutaneous immunization. Vaccine 31, 3417-3426. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.033

10

Novotny, L.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2019. Redirecting the immune response towards immunoprotective domains of a DNABII protein resolves experimental otitis media. NPJ Vaccines 4, 43. doi: 10.1038/s41541-019-0137-1

Novotny, L.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2020. Targeting a bacterial DNABII protein with a chimeric peptide immunogen or humanised monoclonal antibody to prevent or treat recalcitrant biofilm-mediated infections. EBioMedicine. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102867

20

Novotny, L.A., Jurgisek, J.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2016. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms *in vitro* and induce bacterial clearance *in vivo*. EBioMedicine 10, 33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022

Novotny, L.A., Jurgisek, J.A., Ward, M.O., Jr., Jordan, Z.B., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2015. Antibodies against the majority subunit of type IV Pili disperse nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. Mol Microbiol 96, 276-292. doi: 10.1111/mmi.12934

30

Pallav, K., Dowd, S.E., Villafuerte, J., Yang, X., Kabbani, T., Hansen, J., Dennis, M., Leffler, D.A., Newburg, D.S., Kelly, C.P., 2014. Effects of polysaccharopeptide from *Trametes versicolor* and amoxicillin on the gut microbiome of healthy volunteers: a randomized clinical trial. Gut Microbes 5, 458-467. doi: 10.4161/gmic.29558

Pang, B., Armbruster, C.E., Foster, G., Learman, B.S., Gandhi, U., Swords, W.E., 2018. Autoinducer 2 (AI-2) production by nontypeable *Haemophilus influenzae* 86-028NP promotes expression of a predicted glycosyltransferase that is a determinant of biofilm

40

【化 1 1 8】

maturation, prevention of dispersal, and persistence *in vivo*. Infect Immun 86. doi: 10.1128/IAI.00506-18

Pang, B., Hong, W., Kock, N.D., Swords, W.E., 2012. Dps promotes survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in biofilm communities *in vitro* and resistance to clearance *in vivo*. Front Cell Infect Microbiol 2, 58. doi: 10.3389/fcimb.2012.00058

Parsons, J.B., Rock, C.O., 2013. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. Prog Lipid Res 52, 249-276. doi: 10.1016/j.plipres.2013.02.002

10

Patini, R., Mangino, G., Martellacci, L., Quaranta, G., Masucci, L., Gallenzi, P., 2020. The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: A systematic review. Antibiotics (Basel) 9, 22. doi: 10.3390/antibiotics9010022

Pelton, S., 2020. Acute otitis media in children: Treatment, in: Post, T. (Ed.), UpToDate, Waltham, MA.

Petrova, O.E., Sauer, K., 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. Curr Opin Microbiol 30, 67-78. doi: 10.1016/j.mib.2016.01.004

20

Pettigrew, M.M., Marks, L.R., Kong, Y., Gent, J.F., Roche-Hakansson, H., Hakansson, A.P., 2014. Dynamic changes in the *Streptococcus pneumoniae* transcriptome during transition from biofilm formation to invasive disease upon influenza A virus infection. Infect Immun 82, 4607-4619. doi: 10.1128/IAI.02225-14

Piltcher, O.B., Kosugi, E.M., Sakano, E., Mion, O., Testa, J.R.G., Romano, F.R., Santos, M.C.J., Di Francesco, R.C., Mitre, E.I., Bezerra, T.F.P., Roithmann, R., Padua, F.G., Valera, F.C.P., Lubianca Neto, J.F., Sa, L.C.B., Pignatari, S.S.N., Avelino, M.A.G., Caixeta, J.A.S., Anselmo-Lima, W.T., Tamashiro, E., 2018. How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. Braz J Otorhinolaryngol 84, 265-279. doi: 10.1016/j.bjorl.2018.02.001

30

Poole, J., Foster, E., Chaloner, K., Hunt, J., Jennings, M.P., Bair, T., Knudtson, K., Christensen, E., Munson, R.S., Jr., Winokur, P.L., Apicella, M.A., 2013. Analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* phase-variable genes during experimental human nasopharyngeal colonization. J Infect Dis 208, 720-727. doi: 10.1093/infdis/jit240

40

【化 1 1 9】

- Rappuoli, R., Bloom, D.E., Black, S., 2017. Deploy vaccines to fight superbugs. *Nature* 552, 165-167. doi: 10.1038/d41586-017-08323-0
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L.P., Calado, C.R.C., 2019. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics (Basel)* 8, 45. doi: 10.3390/antibiotics8020045
- Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., Hinton, J.C., 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J Bacteriol* 194, 686-701. doi: 10.1128/JB.06112-11 10
- Rumbaugh, K.P., Sauer, K., 2020. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A., Davies, D.G., Gilbert, P., 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186, 7312-7326. doi: 10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004 20
- Sethi, S., Murphy, T.F., 2008. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359, 2355-2365. doi: 10.1056/NEJMra0800353
- Sharma, D., Misba, L., Khan, A.U., 2019. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control* 8, 76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3
- Sikkema, D.J., Murphy, T.F., 1992. Molecular analysis of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 60, 5204-5211. doi: 10.1128/IAI.60.12.5204-5211.1992 30
- Silva, M.D., Sillankorva, S., 2019. Otitis media pathogens - A life entrapped in biofilm communities. *Crit Rev Microbiol* 45, 595-612. doi: 10.1080/1040841X.2019.1660616
- Sirakova, T., Kolattukudy, P.E., Murwin, D., Billy, J., Leake, E., Lim, D., DeMaria, T., Bakaletz, L., 1994. Role of fimbriae expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in pathogenesis of and protection against otitis media and relatedness of the fimbrin subunit to outer membrane protein A. *Infect Immun* 62, 2002-2020. doi: 40

【化 1 2 0】

- Song, J.H., Dagan, R., Klugman, K.P., Fritzell, B., 2012. The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. *Vaccine* 30, 2728-2737. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.091
- Stewart, P.S., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292, 107-113. doi: 10.1078/1438-4221-00196
- Surette, M.G., Miller, M.B., Bassler, B.L., 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1639-1644. doi: 10.1073/pnas.96.4.1639 10
- Swinger, K.K., Rice, P.A., 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 14, 28-35. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003
- Swords, W.E., Jones, P.A., Apicella, M.A., 2003. The lipo-oligosaccharides of *Haemophilus influenzae*: an interesting array of characters. *J Endotoxin Res* 9, 131-144. doi: 10.1179/096805103125001531 20
- Tagliabue, A., Rappuoli, R., 2018. Changing priorities in vaccinology: Antibiotic resistance moving to the top. *Front Immunol* 9, 1068. doi: 10.3389/fimmu.2018.01068
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V., 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28, 33-36. doi: 10.1093/nar/28.1.33
- Toone, S.L., Ratkiewicz, M., Novotny, L.A., Phong, B.L., Bakaletz, L.O., 2020. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Type IV pilus mediates augmented adherence to rhinovirus-infected human airway epithelial cells. *Infect Immun*. doi: 10.1128/IAI.00248-20 30
- Tristram, S., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C., 2007. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev* 20, 368-389. doi: 10.1128/CMR.00040-06
- Vergison, A., 2008. Microbiology of otitis media: a moving target. *Vaccine* 26 Suppl 7, G5-10. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.006
- Wald, E.R., DeMuri, G.P., 2018. Antibiotic recommendations for acute otitis media and acute bacterial sinusitis: Conundrum no more. *Pediatr Infect Dis J* 37, 1255-1257. doi: 10.1097/INF.0000000000002009 40

【化 1 2 1】

Wasserman, R.C., Gerber, J.S., 2017. Acute otitis media in the 21st century: What now? *Pediatrics* 140. doi: 10.1542/peds.2017-1966

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T.L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.

Wiertsema, S.P., Kirkham, L.A., Corscadden, K.J., Mowe, E.N., Bowman, J.M., Jacoby, P., Francis, R., Vijayasekaran, S., Coates, H.L., Riley, T.V., Richmond, P., 2011. Predominance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children with otitis media following introduction of a 3+0 pneumococcal conjugate vaccine schedule. *Vaccine* 29, 5163-5170. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.035

Ysebaert, C., Denoel, P., Weynants, V., Bakaletz, L.O., Novotny, L.A., Godfroid, F., Hermant, P., 2019. A protein E-PilA fusion protein shows vaccine potential against nontypeable *Haemophilus influenzae* in mice and chinchillas. *Infect Immun* 87, e00345-00319. doi: 10.1128/IAI.00345-19

Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T., 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32, 361-385. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x

Zhang, L., Xie, J., Patel, M., Bakhtyar, A., Ehrlich, G.D., Ahmed, A., Earl, J., Marrs, C.F., Clemans, D., Murphy, T.F., Gilsdorf, J.R., 2012. Nontypeable *Haemophilus influenzae* genetic islands associated with chronic pulmonary infection. *PLoS One* 7, e44730. doi: 10.1371/journal.pone.0044730

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67–D72. doi.org/10.1093/nar/gkv1276

Aziz, A., Sarovich, D. S., Nosworthy, E., Beissbarth, J., Chang, A. B., Smith-Vaughan, H., Price, E. P., & Harris, T. M. (2019). Molecular Signatures of Non-typeable *Haemophilus influenzae* Lung Adaptation in Pediatric Chronic Lung Disease. *Frontiers in microbiology*, 10, 1622. doi.org/10.3389/fmicb.2019.01622

10

20

30

40

50

【化 1 2 2】

Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*, 28(1), 33–36. doi.org/10.1093/nar/28.1.33

Greiner LL, Watanabe H, Phillips NJ, Shao J, Morgan A, Zaleski A, Gibson BW, Apicella MA. Nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing N-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):4249-60. doi: 10.1128/IAI.72.7.4249-4260.2004. PMID: 15213170; PMCID: PMC427468.

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

それを必要とする対象における *Haemophilus* 細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの 1 つまたは複数のための方法であって、(i) 抗 DNABII 抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗 PiliA 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または (ii) 抗 DNABII 抗体もしくはその生物学的に活性な断片および PiliA ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を前記対象に投与するステップを含む、方法。

(項目 2)

Haemophilus 細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムに関連する疾患を防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの 1 つまたは複数のための方法であって、(i) 抗 DNABII 抗体もしくはその生物学的に活性な断片および抗 PiliA 抗体もしくはその生物学的に活性な断片、または (ii) 抗 DNABII 抗体もしくはその生物学的に活性な断片および PiliA ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片を前記対象に投与するステップを含む、方法。

(項目 3)

前記疾患が、嚢胞性線維症 (CF)、肺 CF、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、慢性鼻副鼻腔炎 (CRS)、歯周炎、インプラント周囲炎、中耳感染症、中耳炎 (OM)、急性中耳炎 (AOM)、滲出性中耳炎 (OME)、鼓膜切開チューブ挿入後の耳漏 (PTTO)、人工呼吸器関連肺炎 (VAP)、市中感染性肺炎 (CAP)、胸腔チューブ／カテーテル／留置デバイスバイオフィルム感染症、扁桃炎、咽頭炎 (pharyngitis)、咽頭炎 (laryngitis)、喉頭蓋炎、副鼻腔炎、肺炎、気管支炎、または他の気道感染症 (RTI) から選択される、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

必要に応じて β -ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

Haemophilus 細菌によって引き起こされるか、それを含むか、またはそれによって将来引き起こされる多微生物性バイオフィルムを防止する、阻害する、破壊する、分散させる、または処置するのうちの 1 つまたは複数のための方法であって、(i) 抗 DNA 結合性およびベンディングタンパク質 (DNABII) 抗体またはその生物学的に活性な断片、ならびに (ii) 抗 IV 型線毛 (T4P) の大多数サブユニット (PiliA) 抗体またはその生物学的に活性な断片を前記多微生物性バイオフィルムと接触させるステップを含む、方法。

(項目 6)

前記多微生物性バイオフィルムを、必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質と接触させるステップをさらに含む、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記接触させるステップが、*in vitro*または*in vivo*である、項目5または6に記載の方法。

(項目8)

抗生物質療法のために*Haemophilus*細菌を含む多微生物性バイオフィルムに感作する、または多微生物性バイオフィルムを形成する細菌を新たに放出された(NRel)状態に誘導するための方法であって、前記バイオフィルムを、(i)抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片、および(ii)抗PilA抗体またはその生物学的に活性な断片と接触させるステップを含む、方法。

10

(項目9)

前記バイオフィルムを、必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質と接触させるステップをさらに含む、項目8に記載の方法。

(項目10)

抗生物質療法のためにそれを必要とする対象における*Haemophilus*細菌を含むポリクロール微生物性バイオフィルムに感作する、またはそれを必要とする対象における多微生物性バイオフィルムの細菌を新たに放出された(NRel)状態に誘導するための方法であって、(i)抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片、および(ii)抗PilAポリペプチドまたはその生物学的に活性な断片を前記対象に投与するステップを含む、方法。

20

(項目11)

必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記DNABIIが、組込み宿主因子(IHF)またはヒストン様タンパク質(HU)タンパク質から選択される、項目1~11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片が、DNABII A5ペプチド、DNABII mB4ペプチド、チップペプチド、チップキマーペプチド、またはA5ペプチドおよびmB4ペプチドを含む組換えチップキマーポリペプチドのうちの1つまたは複数を経験し、それに結合する、項目1~12のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目14)

前記PilAが、組換えの可溶性PilA(rsPilA)である、項目1~13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記β-ラクタム抗生物質が、アモキシシリンとクラバン酸(AMC)を含む、項目4、6~7、9および11~14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記β-ラクタム抗生物質が、ベンザチン、ベンジルペニシリン(ペニシリンG)、ベンザチンペニシリンG、ベンザチンペニシリンV、フェノキシメチルペニシリン(ペニシリンV)、プロカインペニシリン、フェネチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、テモシリン、アモキシシリン、アンピシリン、メシリナム、ピペラシリン、カルペニシリン、チカルシリン、カルボキシペニシリン、ウレイドペニシリン、アズロシリン、メズロシリン；セファゾリン、セファレキシン、セファロスポリンC、セファロチン、セファピリン、セファクロル、セファマンドール、セフロキシム、セフォテタン、セフォキシチン、セフィキシム、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトジジム、セフトリアキソン、セフジニル、セフェピム、セフピロム、セフトロリン；ピアペネム、ドリペネム、エルタペネム、ファロペネム

40

50

、イミペネム、メロペネム、パニペネム、ラズペネム、テビペネム、チエナマイシン；アズトレオナム、チゲモナム、ノカルディシンA、またはタブトキシニンβ-ラクタムのうちの1つまたは複数を含む、項目4、6～7、9および11～14のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

前記スルホンアミド抗生物質が、トリメトプリムとスルファメトキサゾール(TMP-SMX)を含む、項目4、6～7、9および11～16のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記スルホンアミド抗生物質が、以下：スルファフラゾール；スルファセタミド、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファフラゾール(スルフィソキサゾール)、スルフィソミジン(スルフィソジミジン)、スルファメトキサゾール、スルファモキサゾール、スルファニトラン、スルファジメトキシシン、スルファメトキシピリダジン、スルファメトキシジアジン、スルファドキシシン、スルファメトピラジン、またはテレフチル(Terephthyl)のうちの1つまたは複数を含む、項目4、6～7、9および11～16のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記抗生物質が、(i)および(ii)と同時的に、またはその後に、前記バイオフィルムと接触するか、または前記対象に投与される、項目4、6～7、9および11～18のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記Haemophilus細菌が、Haemophilus influenzaまたは分類不可能なHaemophilus influenzae(NTHI)を含む、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記多微生物性バイオフィルムが、Haemophilus細菌、およびMoraxella catarrhalis、Staphylococcus aureus、Pseudomonas aeruginosa、Streptococcus pneumoniae、Burkholderia cenocepacia、ESKAPE病原体(Enterococcus faecium、Klebsiella pneumoniae、Acinetobacter baumannii、Pseudomonas aeruginosa、およびEnterobacter spp.から選択される)、Aggregatibacter actinomycetemcomitansのうちの少なくとも1つを含む、項目1～20のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記多微生物性バイオフィルムが、NTHI、Streptococcus pneumoniaeおよびStaphylococcus aureusを含む、項目1～21のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記多微生物性バイオフィルムが、再発性、または抗生物質単剤療法に対して抵抗性である、項目1～22のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

接触させるステップまたは投与するステップの前に、前記対象または前記多微生物性バイオフィルムの試料中の細菌を特定するステップをさらに含む、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記多微生物性バイオフィルムが、(i)もしくは(ii)のうちの1つ、または抗生物質単独の接触または投与と比較して、相乗的な様式で、防止される、阻害される、破壊される、分散される、または処置されるのうちの1つまたは複数である、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記バイオフィルムから放出された前記細菌の前記新たに放出された（N R e l）状態が、以下：

以下の遺伝子：d e a D、a r t M、f i s、f o l A、f o l P、e m r A、e m r B、またはa c r Rのうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；

以下のタンパク質：A s n C、C y a A、G l p C、N r f A、T e h B、T r p B、T r p C、T r p D、T r u A、またはT r x Aのうちの1つまたは複数の変更されたレベル；

以下のタンパク質：A b g A、A r o E、A r o K、A r t P、A t p H、B i o B、B i o F、C c m A、C i t D、C i t T、C m K、C o a D、D c D、D j l A、D k s A、D n a E、D n a Q、D s b E、F a b G、F d h X、F t n B、F t s E、F t s I、F u m C、F u r、G l p A、G l p B、G m K、G p s A、G r e A、H f q、H i s I、H u g Z、I n f A、I n f B、I s p D、I s p F、L i c 2 A、L i c C、L i c D、L o l A、L p s A、m e n C、M e n C、N a p A、N r f B、N r f C、N T H I 0 0 5 3、N T H I 0 2 4 9、N T H I 0 2 9 1、N T H I 0 3 1 9、N T H I 0 3 4 9、N T H I 0 4 3 6、N T H I 0 4 8 7、N T H I 0 4 9 0、N T H I 0 5 5 5、N T H I 0 7 3 2、N T H I 0 7 7 9、N T H I 0 8 2 0、N T H I 1 0 2 5、N T H I 1 0 8 5、N T H I 1 1 9 9、N T H I 1 4 3 7、N T H I 1 4 3 9、N T H I 1 5 0 3、N T H I 1 5 9 0、N T H I 1 7 4 8、O p p F、P a n F、P d x H、P e p T、P h o B、P l s C、P o l A、P p C、P p i B、P r f B、P u r U、R a d A、R e l B、R i b A、R p l W、R p o E、R p o Z、R s e A、S e c F、S x y、T e s B、T h r B、T o l A、U n G、U r e G、U u a P、またはU v r Bのうちの1つまたは複数の低いレベル；

以下のタンパク質：C l p B、C y d D、D e a D、D l d D、D m s B、E x b D、G r o E S、H f e A、H f e B、H g p B、H i s J、H i s J、H i t A、H k t E、H x u C、L c t P、L l d D、L p x C、M u r B、N d h A、N i f S 2、N T H I 0 0 4 3、N T H I 0 0 5 2、N T H I 0 1 7 5、N T H I 0 3 6 4、N T H I 1 2 0 8、N T H I 1 2 1 4、N T H I 1 3 6 9、N T H I 1 7 0 3、O m p P 2、O r f G、P a l、P d g X、R b f A、R e c N、R p l O、R p l U、R p m E、R p s E、R p s J、R p s L、R p s Q、R p s T、S o d A、T b p 1、T o l B、T o n B、T r p A、T r x A、またはZ n u Aのうちの1つまたは複数の高いレベル

のうちの1つまたは複数を含む、項目8～25のいずれか一項に記載の方法。

（項目27）

前記高い、低い、変更された発現またはレベルが、同じであるがプランクトン様に成長した細菌と比較される、項目26に記載の方法。

（項目28）

（i）抗D N A B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、

（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの一方または両方、あるいは

（i i i）必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む抗生物質

のうちの少なくとも2つ、

および必要に応じて、使用説明書

を含む、項目1～27のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキット。

（項目29）

以下：

（i）抗D N A B I I抗体もしくはその生物学的に活性な断片、

（i i）抗P i l A抗体もしくはその生物学的に活性な断片、またはP i l Aポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片のうちの一方または両方、あるいは

（i i i）β-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を必要に応じて含む抗生物質

10

20

30

40

50

のうちの少なくとも2つ、

および担体、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含む、組成物。

(項目30)

前記DNA B I Iが、組込み宿主因子(I H F)またはヒストン様タンパク質(H U)タンパク質から選択される、請求29に記載の組成物。

(項目31)

前記抗DNA B I I抗体またはその生物学的に活性な断片が、DNA B I I A 5ペプチド、DNA B I I m B 4ペプチド、またはA 5ペプチドおよびm B 4ペプチドを含む組換えポリペプチドのうちの1つまたは複数を認識し、それに結合する、項目29または30に記載の組成物。

10

(項目32)

前記P i l Aが、組換えの可溶性P i l A (r s P i l A)である、項目29～31のいずれか一項に記載の組成物。

(項目33)

前記β-ラクタム抗生物質が、アモキシシリンとクラブラン酸(A M C)を含む、項目29～32のいずれか一項に記載の組成物。

(項目34)

前記β-ラクタム抗生物質が、ベンザチン、ベンジルペニシリン(ペニシリンG)、ベンザチンペニシリンG、ベンザチンペニシリンV、フェノキシメチルペニシリン(ペニシリンV)、プロカインペニシリン、フェネチシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、テモシリン、アモキシシリン、アンピシリン、メシリナム、ピペラシリン、カルベニシリン、チカルシリン、カルボキシペニシリン、ウレイドペニシリン、アズロシリン、メズロシリン；セファゾリン、セファレキシン、セファロスポリンC、セファロチン、セファピリン、セファクロル、セファマンドール、セフロキシム、セフォテタン、セフォキシチン、セフィキシム、セフォタキシム、セフボドキシム、セフトラジウム、セフトリアキソン、セフジニル、セフェピム、セフピロム、セフトロリン；ピアペネム、ドリペネム、エルタペネム、ファロペネム、イミペネム、メロペネム、パニペネム、ラズペネム、テビペネム、チエナマイシン；アズトレオナム、チゲモナム、ノカルディシンA、またはタフトキシニンβ-ラクタムのうちの1つまたは複数を含む、項目29～32のいずれか一項に記載の組成物。

20

30

(項目35)

前記スルホンアミド抗生物質が、トリメトプリムとスルファメトキサゾール(T M P - S M X)を含む、項目29～34のいずれか一項に記載の組成物。

(項目36)

前記スルホンアミド抗生物質が、以下：スルファフラゾール；スルファセタミド、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファフラゾール(スルフィソキサゾール)、スルフィソミジン(スルファイソジミジン)、スルファメトキサゾール、スルファモキサゾール、スルファニトラン、スルファジメトキシシン、スルファメトキシピリダジン、スルファメトキシジアジン、スルファドキシシン、スルファメトピラジン、またはテレフチルのうちの1つまたは複数を含む、項目29～34のいずれか一項に記載の組成物。

40

(項目37)

項目1～27のいずれか一項に記載の方法による、以下：防止、阻害、破壊、分散、処置または感作のうちの1つまたは複수에好適な多微生物性バイオフィルムを選択するための方法であって、

(a) 前記多微生物性バイオフィルム、またはそれらから単離および成長した多微生物性バイオフィルムを、(i)または(ii)の一方または両方と接触させるステップ、ならびに

(b) 以下の遺伝子：d e a D、a r t M、f i s、f o l A、f o l P、e m r A、e m r B、またはa c r Rのうちの1つまたは複数の発現、およびタンパク質：A s n C、

50

CyaA, GlpC, NrfA, TehB, TrpB, TrpC, TrpD, TruA, TrxA; AbgA, AroE, AroK, ArtP, AtpH, BioB, BioF, CcmA, CitD, CitT, CmkK, CoaD, DcdD, DjlA, DksA, DnaE, DnaQ, DsbE, FabG, FdhX, FtnB, FtsE, FtsI, FumC, Fur, GlpA, GlpB, Gmk, GpsA, GreA, Hfq, HisI, HugZ, InfA, InfB, IspD, IspF, Lic2A, LicC, LicD, LolA, LpsA, menC, MenC, NapA, NrfB, NrfC, NTHI0053, NTHI0249, NTHI0291, NTHI0319, NTHI0349, NTHI0436, NTHI0487, NTHI0490, NTHI0555, NTHI0732, NTHI0779, NTHI0820, NTHI1025, NTHI1085, NTHI1199, NTHI1437, NTHI1439, NTHI1503, NTHI1590, NTHI1748, OppF, PanF, PdxH, PepT, PhoB, PlsC, PolA, PpC, PpiB, PrfB, PurU, RadA, RelB, RibA, RplW, RpoE, RpoZ, RseA, SecF, Sxy, TesB, ThrB, TolA, Ung, UreG, UuaP, UvrB; ClpB, CydD, DeaD, DldD, DmsB, ExbD, GroES, HfeA, HfeB, HgpB, HisJ, HisJ, HitA, HktE, HxC, LctP, LldD, LpxC, MurB, NdhA, NifS2, NTHI0043, NTHI0052, NTHI0175, NTHI0364, NTHI1208, NTHI1214, NTHI1369, NTHI1703, OmpP2, OrfG, Pal, PdgX, RbfA, RecN, RplO, RplU, RpmE, RpsE, RpsJ, RpsL, RpsQ, RpsT, Soda, Tbp1, TolB, TonB, TrpA, TrxA, またはZnuAのうちの1つまたは複数のレベルについて、(a)の前記バイオフィームから放出された細菌をアッセイするステップ

10

20

30

40

50

を含み、

以下：

以下の遺伝子：deaD, artM, fis, folA, folP, emrA, emrB, またはacrRのうちの1つまたは複数の変更された遺伝子発現；

以下のタンパク質：AsnC, CyaA, GlpC, NrfA, TehB, TrpB, TrpC, TrpD, TruA, またはTrxAのうちの1つまたは複数の変更されたレベル；

以下のタンパク質：AbgA, AroE, AroK, ArtP, AtpH, BioB, BioF, CcmA, CitD, CitT, CmkK, CoaD, DcdD, DjlA, DksA, DnaE, DnaQ, DsbE, FabG, FdhX, FtnB, FtsE, FtsI, FumC, Fur, GlpA, GlpB, Gmk, GpsA, GreA, Hfq, HisI, HugZ, InfA, InfB, IspD, IspF, Lic2A, LicC, LicD, LolA, LpsA, menC, MenC, NapA, NrfB, NrfC, NTHI0053, NTHI0249, NTHI0291, NTHI0319, NTHI0349, NTHI0436, NTHI0487, NTHI0490, NTHI0555, NTHI0732, NTHI0779, NTHI0820, NTHI1025, NTHI1085, NTHI1199, NTHI1437, NTHI1439, NTHI1503, NTHI1590, NTHI1748, OppF, PanF, PdxH, PepT, PhoB, PlsC, PolA, PpC, PpiB, PrfB, PurU, RadA, RelB, RibA, RplW, RpoE, RpoZ, RseA, SecF, Sxy, TesB, ThrB, TolA, Ung, UreG, UuaP, またはUvrBのうちの1つまたは複数の低いレベル；

以下のタンパク質：ClpB, CydD, DeaD, DldD, DmsB, ExbD, GroES, HfeA, HfeB, HgpB, HisJ, HisJ, HitA, HktE, HxC, LctP, LldD, LpxC, MurB, NdhA, NifS2, NTHI0043, NTHI0052, NTHI0175, NTHI0364, NTHI1208,

NTHI1214、NTHI1369、NTHI1703、OmpP2、OrfG、Pal、Pd gX、RbfA、RecN、RplO、RplU、RpmE、RpsE、RpsJ、RpsL、RpsQ、RpsT、SodA、Tbp1、TolB、TonB、TrpA、TrxA、またはZnuAのうちの1つまたは複数の高いレベル
のうちの1つまたは複数が、前記バイオフィルムが項目1～27のいずれか一項に記載の方法に好適であることを示す、方法。

(項目38)

前記高い、低い、変更された発現またはレベルが、同じであるがプランクトン様に成長した細菌と比較される、項目37に記載の方法。

(項目39)

選択されたバイオフィルムを、

(i) 抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片、

(ii) 抗PilA抗体または生物学的に活性な断片、および

(iii) 必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む必要に応じた抗生物質

と接触させるステップをさらに含む、項目37または38に記載の方法。

(項目40)

選択された多微生物性バイオフィルムが、対象中にあり、前記方法が、

(i) 抗DNABII抗体またはその生物学的に活性な断片、

(ii) PilAポリペプチドまたは生物学的に活性な断片、および

(iii) 必要に応じてβ-ラクタム抗生物質またはスルホンアミド抗生物質を含む必要に応じた抗生物質

を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目37または38に記載の方法。

10

20

30

40

50