

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7661008号  
(P7661008)

(45)発行日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(24)登録日 令和7年4月4日(2025.4.4)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12	Z N A
請求項の数 18 (全123頁)				
(21)出願番号	特願2019-556568(P2019-556568)	(73)特許権者	515289842	
(86)(22)出願日	平成30年1月3日(2018.1.3)		リサーチ インスティテュート アット	
(65)公表番号	特表2020-506221(P2020-506221 A)		ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル	
(43)公表日	令和2年2月27日(2020.2.27)		アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 ,	
(86)国際出願番号	PCT/US2018/012255		コロンバス, チルドレンズ ドライブ	
(87)国際公開番号	WO2018/129092		7 0 0 , ルーム ダブリュー 1 7 2	
(87)国際公開日	平成30年7月12日(2018.7.12)	(74)代理人	100078282	
審査請求日	令和2年12月28日(2020.12.28)		弁理士 山本 秀策	
審判番号	不服2023-324(P2023-324/J1)	(74)代理人	100113413	
審判請求日	令和5年1月10日(2023.1.10)		弁理士 森下 夏樹	
(31)優先権主張番号	62/442,307	(74)代理人	100181674	
(32)優先日	平成29年1月4日(2017.1.4)		弁理士 飯田 貴敏	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641	
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バイオフィルム関連障害の処置のための抗体断片

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象においてDNA B I Iタンパク質を産生する微生物による感染と関連する炎症応答を処置もしくは予防するための、またはバイオフィルムに感染している、もしくはバイオフィルムの存在と関連する状態を患っている対象を処置するための組成物であって、該組成物は、抗体F a b断片を含み、該抗体は、DNA B I Iタンパク質と特異的に結合し、さらに、該抗体F a b断片は、該対象において抗炎症性サイトカインの産生を誘導し、該抗体F a b断片は、ATCC受託番号PTA - 1 2 2 3 3 5の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の断片である、組成物。

【請求項 2】

前記F a b断片が、配列番号53の重鎖可変領域および配列番号57の軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記F a b断片が、検出可能な標識をさらに含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗炎症性サイトカインが、IL - 4、IL - 1 3またはIL - 1 0のうち1つまたは複数を含む、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記対象が、哺乳動物、ヒトまたは小児患者から選択される、請求項1から4のいずれ

か一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物が、抗生物質および／またはワクチンアジュバントと組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記炎症の状態が、静脈性潰瘍および糖尿病性足部潰瘍、耳感染症、副鼻腔感染症、尿路感染症、肺感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、カテーテル関連感染症、植え込まれたプロテーゼに関連する感染症、または歯周病を含む慢性非治癒創傷の群から選択される状態に付随する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

対象において D N A B I I ポリペプチドを産生する微生物の感染と関連する該対象における状態を処置または予防する方法における使用のための組み合わせ物であって、該組み合わせ物は、ポリペプチドならびに抗生物質および／またはワクチンアジュバントを含み、該ポリペプチドは、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 2 3 3 5 の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の F a b 断片である、組み合わせ物。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、前記抗生物質の効力を増加させる、請求項 8 に記載の組み合わせ物。

【請求項 10】

対象において D N A B I I ポリペプチドを産生する微生物の感染と関連する該対象における状態を処置または予防する方法における使用のための組成物であって、該組成物は、ポリペプチドを含み、該組成物は、抗生物質および／またはワクチンアジュバントと組み合わせて投与されることを特徴とし、該ポリペプチドは、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 2 3 3 5 の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の F a b 断片である、組成物。

【請求項 11】

対象において D N A B I I ポリペプチドを産生する微生物の感染と関連する該対象における状態を処置または予防する方法における使用のための組成物であって、該組成物は、抗生物質および／またはワクチンアジュバントを含み、該組成物は、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 2 3 3 5 の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の F a b 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 12】

前記 F a b 断片が、前記抗生物質の効力を増加させる、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

対象において D N A B I I タンパク質を産生する微生物による感染と関連する炎症応答を処置もしくは予防するための、またはバイオフィルムに感染している、もしくはバイオフィルムの存在と関連する状態を患っている対象を処置するための組成物であって、該組成物は、抗体 F a b 断片を含み、該抗体は、D N A B I I タンパク質と特異的に結合し、さらに、該抗体 F a b 断片は、該対象において抗炎症性サイトカインの産生を誘導し、該抗体 F a b 断片は、配列番号 53 の重鎖可変領域および配列番号 57 の軽鎖可変領域を含む、組成物。

【請求項 14】

前記 F a b 断片が、検出可能な標識をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記抗炎症性サイトカインが、I L - 4、I L - 13 または I L - 10 のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 13 または請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記対象が、哺乳動物、ヒトまたは小児患者から選択される、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記組成物が、抗生物質および／またはワクチンアジュバントと組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 13 から 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記炎症の状態が、静脈性潰瘍および糖尿病性足部潰瘍、耳感染症、副鼻腔感染症、尿路感染症、肺感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、カテーテル関連感染症、植え込まれたプロテゼに関連する感染症、または歯周病を含む慢性非治癒創傷の群から選択される状態に付随する、請求項 13 から 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2017 年 2 月 2 日に出願された同 62 / 453 , 921、および 2017 年 1 月 4 日に出願された同 62 / 442 , 307 に対する利益を主張し、上記の米国仮出願の各内容は、その全容が参考として本明細書に援用される。

【0002】

政府権利についての陳述

本発明は、米国国立衛生研究所により与えられる認可番号 DC011818 のもとで政府支援を受けて行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

分野

本開示は、一般には、新規抗体断片およびこれらの断片を含有する組成物を使用して、細菌バイオフィルムを減らし、かつ／またはなくし、そしてバイオフィルムに関連する疾患または障害を処置するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

公知の真正細菌全てにおいてタンパク質の DNA B I I ファミリーからの少なくとも 1 つのタンパク質が見いだされ、細菌細胞の外側に天然に見いだされる。このファミリーにより、強力な自然免疫応答が引き出されるが、宿主対象は感染の結果として、ファミリーメンバーに対する特異的な保護的抗体を天然に生じることができない。DNA B I I タンパク質および細胞外 DNA (eDNA) は、「バイオフィルム」の格子構造に寄与する。細菌バイオフィルムに伴う主要な問題は、宿主免疫系および／または抗生物質および他の抗菌薬が、バイオフィルム内に保護された細菌に近づくことができないことである。

【0005】

バイオフィルムは、工業の場にも存在する。例えば、バイオフィルムは、生産現場からガソリンスタンドの貯蔵タンクまでの広範囲の石油の加工問題に関係づけられる。現場では、硫酸還元性バイオフィルム細菌が硫化水素を産生する (サワー・オイル (s o u r e d o i l))。加工パイプラインでは、バイオフィルム活性によりスライムが発生し、それがフィルターおよび開口部の邪魔になる。バイオフィルムおよびバイオフィルム生物は、パイプラインおよび石油加工装置の腐食も引き起こす。これらの問題は、油またはガスの生産設備全体を通して、汚損および腐食性のバイオフィルム生物が貯蔵タンクの最終製品の表面に見いだされるまで顕在化し得る。

【0006】

家庭では、バイオフィルムは、微生物の成長を支持する任意の表面の中またはその上、例えば、排水管の中、調理台の上、トイレの中、およびスイミングプールおよびスパの中に見いだされる。バイオフィルムは、家庭用と工業用の両方の広範囲の水の加工に関係づけられる。バイオフィルムは、加工装置の表面上で成長し、熱伝達の効率低下、またはフィルターおよび膜を塞ぐなど、装置の性能を害する可能性がある。冷却塔充填材上で成長しているバイオフィルムにより、充填材の崩壊を引き起こすのに十分な重量が加わる可能

10

20

30

40

50

性がある。バイオフィルムは、高度に特殊化されたステンレス鋼でさえも腐食させる。水の加工におけるバイオフィルムにより、例えば、紙加工におけるバイオフィルムの汚染、またはシリコンチップ上への単一の細胞の付着でさえ、最終製品の価値を下げる可能性がある。飲料水の配水系統において成長しているバイオフィルムは、水の美的品質を劣化させる潜在的な病原生物、腐食性の生物体または細菌を有し得る。

#### 部分配列表

配列番号1：全長野生型(wt) 86-028NP *Haemophilus influenzae* IhfA; Genbank 受託番号: AAX88425.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

MATITKLDII EYLS DKYHLSKQDTKNVVENFLEEIRLSLE  
SGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVV  
ITKPGQKLRRARVEKIK.

10

配列番号2：全長野生型(wt) 86-028NP *Haemophilus influenzae* IhfB; Genbank 受託番号: AAX88699.1 (2015年5月13日が最近のアクセスである) :

MTKSELMEKLSAKQPTLSAKEIENMVKDI LEFISQSL ENG  
DRVEVRGFGSFS LHHRQPR LGRNPKTGDSVNLSAKSVPYF  
KAGKELKARV DVQA.

配列番号3：全長wt 86-028NP *Haemophilus influenzae* HU; Genbank 受託番号: YP\_248142.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

20

MRFTVTFINHA FNSSQVRLSFAQFLRQIRKDTFKESNFLF  
NRRYKFMNKTDLIDAIANA AE LNKKQAKAA LEATLDAITA  
SLKEGEPVQLIGFGTFKVNERAARTGRNPQTGA EI QIAAS  
KVP AFVSGKALKDAIK.

配列番号4：全長wt R2846 *Haemophilus influenzae* IhfA; Genbank 受託番号: ADO96375 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

MATITKLDII EYLS DKYHLSKQDTKNVVENFLEEIRLSLE  
SGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVV  
TFKPGQKLRRARVEKTK.

30

配列番号5：全長wt Rd *Haemophilus influenzae* IhfA; Genbank 受託番号: AAC22959.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

MATITKLDII EYLS DKYHLSKQDTKNVVENFLEEIRLSLE  
SGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVV  
TFKPGQKLRRARVEKTK.

配列番号6：全長wt E. coli K12 IhfA; Genbank 受託番号: AAC74782.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

MALTKAEMSEYLF DKLGLSKRDAKELVELFFEEIRRALEN  
GEQVKLSGFGNF DLRDKNQRPGRNPKTGEDIPI TARRVV T  
FRPGQKLKSRVENASPKDE; DNA Genbank No. NC\_000913.

40

配列番号7：全長wt E. coli K12 IhfB; Genbank 受託番号: BAA35656 (2015年5月19日が最近のアクセスである) :

MTKSELIERLATQQSHIPAKTVEDAVKEMLEHMASTLAQG  
ERIEIRGFGSFS LHYRAPRTGRNPKTGDKVELE GKYPHF  
KPGKELRDRANIYG.

配列番号8：E. coli hupA; Genbank 受託番号: AP\_003818 (2011年3月21日が最近のアクセスである) :

50

MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGD  
AVQLVGFGTTFKVNHRARTGRNPQTGKEIKIAAANVPFV  
SGKALKDAVK.

配列番号9: *E. coli* hupB; Genbank 受託番号: AP\_001090.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである):

MNKSQQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGD  
DVALVGFGTFAVKERAARTGRNPQTGKEIAAAKVPSPFRAG  
KALKDAVN.

配列番号10: 全長 *P. aeruginosa* PA 01 IhfA; Genbank 受託番号: AAG06126.1 (2011年3月21日が最近のアクセスである):

MGALTKAETIAERLYEELGLNKRKAEKELVELFFEEIRQALE  
HNEQVKLSGFGNFDLRDKRQRPGRNPKTGEEIPITARRVV  
TFRPGQKLKARVEAYAGTKS.

配列番号11: 全長 *P. aeruginosa* PA 01 IhfB; Genbank 受託番号: AAF72950.1 (2015年5月19日が最近のアクセスである):

MTKSELIERIVTHQGQLSAKDVELAIKTMLEQMSQALATG  
DRIEIRGFGSFSLSHYRAPRVGRNPKTGESVRLDGKFVPHF  
KPGKELRDRVNEPE.

配列番号12: *Haemophilus influenzae* IhfA, A-3断片:

FLEEIRLSLESQGQDVKLSTGF.

配列番号13: *Haemophilus influenzae* IhfA, A5断片:  
RPGRNPKTGDVVPVSARRVV.

配列番号14: *Haemophilus influenzae* HU, A5断片:  
RTGRNPQTGAETIQIAASKVP.

配列番号15: *Haemophilus influenzae* IhfB, B2断片:  
TLSAKEIENMVKDILEFISQ.

配列番号16: *Haemophilus influenzae* IhfB, B4断片:  
RGFGSFSLSHHRQPRRLGRNPK.

配列番号17: *Haemophilus influenzae* IhfB, modified B4 (mB4)断片:

FSLHHRQPRRLGRNPKTGDSV.

配列番号18: *Haemophilus influenzae* IhfA, A-1断片:

MATITKLDIIEYLSDKYHLS.

配列番号19: *Haemophilus influenzae* IhfA, A2断片:  
KYHLSKQDTKNVVENFLEEI.

配列番号20: *Haemophilus influenzae* IhfA, A4断片  
KLSGFGNFELRDKSSRPGRN.

配列番号21: *Haemophilus influenzae* IhfA, A6断片:  
ARRVVTFKPGQKLARVEKTK.

配列番号22: *Haemophilus influenzae* IhfB, B1断片:  
MTKSELMEKLSAKQPTLSAK.

配列番号23: *Haemophilus influenzae* IhfB, B3断片:  
EFISQSLENGDRVEVRGFGS.

配列番号24: *Haemophilus influenzae* IhfB, B5断片:  
GRNPKTGDSVNLSAKSVPYF.

配列番号25: *Haemophilus influenzae* IhfB, B6断片:

10

20

30

40

50

SVPYFKAGKELKARVDVQA.

配列番号26: Haemophilus influenzae IhfA, A先端断片:

NFELRDKSSRPGRNPKTGDVV.

配列番号27: Haemophilus influenzae IhfB, B先端断片:

SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL.

配列番号28: Haemophilus influenzae HU断片:  
MNKTDLIDAIANA AELNKKQAK.

配列番号29: Haemophilus influenzae HU断片:  
KKQAKAALEATLDAITASLKEG.

配列番号30: Haemophilus influenzae HU断片:  
SLKEGEPVQLIGFGTFKVNERA.

配列番号31: Haemophilus influenzae HU断片:  
VNERAARTGRNPQTGA EIQIAA.

配列番号32: Haemophilus influenzae HU断片:  
IQIAASKVP AFVSGKALKDAIK.

配列番号33: Haemophilus influenzae HU断片、A3断片:  
KKQAKAALEATLDAITASLKEG.

配列番号34: ヒトIgD定常領域、UniProt: P01880:

APTKAPDVFP IISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTV  
TWYMG TQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQG  
EYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE SPKAASSVPTAQPQAEG  
SLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKEKEEKEE QEERETKTPE  
CPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDA  
HLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSL  
WNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAAPVKLSLNL  
ASSDPPEAA SWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGF  
APARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHE  
DSRTL LNASRSLEVSYVTDHGP MK.

配列番号35: ヒトIgG1定常領域、UniProt: P01857:

ASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE  
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK.

配列番号36: ヒトIgG2定常領域、UniProt: P01859:

ASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSNFGTQT  
YTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKC  
KVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDISEVWESNGQPENNYKTTPPMLDSD  
GSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

10

20

30

40

50

配列番号37: ヒトIgG3定常領域、Uniprot: P01860:

ASTKGPSVFPLA PCSRSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP VTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC  
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS VLT VLVH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT  
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQ PENN  
YNTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE  
ALHNRFTQKSLSLSPGK.

10

配列番号38: ヒトIgM定常領域、Uniprot: P01871:

GSASAPTLFPLVSCENSPTSSTSSVAVGCLAQDFLPDSITL  
SWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQ  
GTDEHVVCVKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS V FV PPR  
DGGFFGNPRKSKLICQATGFS PRQIQVSWLREGKQVGS GVT  
TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVD  
HRGLTFQQNAS SMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLT KST  
KLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESH PNA  
TFSAVGEASICE DDWNSGERFTCTVTHTDLP SPLKQTISR  
PKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLR ESATITCLVTGFSPAD  
VFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSI LTV  
SEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNV  
SLVMSDTAGTCY.

20

配列番号39: ヒトIgG4定常領域、Uniprot: P01861:

ASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KT  
YTCNVNDHKPSNTKVDKRVE SKYGP CPCPAPEFLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VLVH QDWLNGKEYK  
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDS  
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSLGLK.

30

配列番号40: ヒトIgA1定常領域、Uniprot: P01876:

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIA CLVQGFFFPQEPLSVT  
WSESGQGV TARNFP PSQDASGDLYTTSSQLTLPATQC LAG  
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPSTPPTPSPSTPPTPSP  
SCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF  
TWTPSSSGKS AVQGP PERDLCGCYSVSSVLP GCAEPWNHGK  
TFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL  
ALNELVTLTCLARGFSPKDV LVRWLQGSQELPREKYLTWA  
SRQEPSQGTTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEAL  
PLAFTQKTI DRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY.

40

配列番号41: ヒトIgA2定常領域、Uniprot: P01877:

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFFPQEPLSVT  
WSESGQNV TARNFP PSQDASGDLYTTSSQLTLPATQC PDG  
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPPPPPCCHPRLSLHRPA  
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSSGKS AVQG  
PPERDLCGCYSVSSVLP GCAQPWNHGETFTCTAAHPELKT

50

P L T A N I T K S G N T F R P E V H L L P P P S E E L A L N E L V T L T C L A R  
G F S P K D V L V R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R Q E P S Q G T T T F A  
V T S I L R V A A E D W K K G D T F S C M V G H E A L P L A F T Q K T I D R M A  
G K P T H V N V S V V M A E V D G T C Y .

配列番号 42 : ヒト Ig カッパ 定常領域、UniProt : P01834 :

T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W  
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K  
H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C .

配列番号 43 : 非限定的な例示のリンカー : G P S L K L .

配列番号 44 : 非限定的な例示のリンカー : G G G .

配列番号 45 : 非限定的な例示のリンカー : G P S L .

配列番号 46 : 非限定的な例示のリンカー : G P S .

配列番号 47 : 非限定的な例示のリンカー : P S L K .

配列番号 48 : 非限定的な例示のリンカー : G P S L K .

配列番号 49 : 非限定的な例示のリンカー : S L K L .

配列番号 50 : 非限定的な例示の重鎖可変領域ヌクレオチド配列、I h f A 5 断片 :

G A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T G A C G C  
C C T C A C A G A G C C T G T C C A T G A C T T G C A C T G T C T C T G G G T T  
T T C A T T A A C C A G C T A T A G T G T A C A C T G G G T T C G C C A G C C T  
C C A G G A A A G A G T C T G G A G T G G C T G G G A G T A A T A T G G G C T G  
G T G G A A G C A C A A A T T A T A A T T C G G C T C T C A T G T C C A G A C T  
G A G C A T C A G C A A A G A C A A C T C C A A G A G C C A A G T T T T C T T A  
A A A A T G G A C A G T C T G C A A A C T G A T G A C A C A G C C A T A T A C T  
A C T G T G C C A G A G A G G A C T C C T G G G G T C A A G G A A C C T C A G T  
C A C C G T C T C C T C A .

配列番号 51 : 非限定的な例示の重鎖可変領域アミノ酸配列、I h f A 5 断片 :

E V Q L Q E S G P G L V T P S Q S L S M T C T V S G F S L T S Y S V H W V R Q P  
P G K S L E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S R L S I S K D N S K S Q V F L  
K M D S L Q T D D T A I Y Y C A R E D S W G Q G T S V T V S S .

配列番号 52 : 非限定的な例示の重鎖可変領域ヌクレオチド配列、I h f m B 4 断片 :

G A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G G G C A G A G C T T G T G A G G T  
C A G G G G C C T C A G T C A A G T T G T C C T G C A C A G C T T C T G G C T T  
C A A C A T T A A A G A C T A C T A T A T G C A C T G G G T G A A G C A G A G G  
C C T G A A C A G G G C C T G G A G T G G A T T G G A T G G A T T G A T C C T G  
A A A A T G A T G A T A C T G A A T A T G T C C C G A A G T T C C A G G G C A A  
G G C C A G T A T G A C T G C A G A C A C A T C C T C C A A C A C A G C C T A C  
C T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A G G A C A C T G C C G T C T  
A T T A C T G T A C A G A G C T C G G A G C T T A C T G G G G C C A G G G G A C  
T C T G G T C .

配列番号 53 : 非限定的な例示の重鎖可変領域アミノ酸配列、I h f m B 4 断片 :

E V Q L Q E S G A E L V R S G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y M H W V K Q R  
P E Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y V P K F Q G K A S M T A D T S S N T A Y  
L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T E L G A Y W G Q G T L V .

配列番号 54 : 非限定的な例示の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列、I h f A 5 断片 :

G A C A T T G T G A T G A C C C A G T C T C A A A A A T T C A T G T C C A C A T  
C A G T A G G A G A C A G G G T C A G C G T C A C C T G C A A G G C C A G T C A  
G A A T G T G G G T A C T A A T G T A G C C T G G T A T C A A C A G A A A C C A  
G G G C A A T C T C C T A A A G C A C T G A T T T A C T C G G C A T C C T A C C  
G G T A C A G T G G A G T C C C T G A T C G C T T C A C A G G C A G T G G A T C  
T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A A T G T G C A G T C T

10

20

30

40

50



G A A G A C T T G G C A G A G T A T T T C T G T C A G C A A T A T A A C A G C T  
A T C C C A C G T T C G G A G G G G G G A C C A A G T T G G A A A T A A A A .

配列番号 55 : 非限定的な例示の軽鎖可変領域アミノ酸配列、I h f A 5 断片 :

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y Q Q K P  
G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S  
E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P T F G G G T K L E I K .

配列番号 56 : 非限定的な例示の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列、I h f m B 4 断片 :

G A T G T T G T G A T G A C C C A G A T T C C A C T C A C T T T G T C G G T T A  
C C A T T G G A C A A C C A G C C T C C A T C T C T T G C A A G T C A A G T C A  
G A G C C T C T T A G A T A G T A A T G G A A A G A C A T A T T T G A A T T G G  
T T G T T T C A G A G G C C A G G C C A G T C T C C A A A G C G C C T A A T C T  
A T C T G G T G T C T A A A C T G G A C T C T G G A G T C C C T G A C A G G T T  
C A C T G G C A G T G G A T C A G G G A C A G A T T T C A C A C T G A A A A T C  
A G C A G A G T T G A G G C T G A G G A T T T G G G A A T T T A T T A T T G C T  
G G C A A A G T A C A C A T T T T C C T C A C A C G T T C G G A G G G G G G A C  
C A A G T T G G A A A T C A A A .

10

配列番号 57 : 非限定的な例示の軽鎖可変領域アミノ酸配列、I h f m B 4 断片 :

D V V M T Q I P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S N G K T Y L N W  
L F Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D L G I Y Y C W Q S T H F P H T F G G G T K L E I K .

20

配列番号 58 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f A 5 断片 :

F S L T S Y S .

配列番号 59 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f A 5 断片 :

F S L T S Y S V .

配列番号 60 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f A 5 断片 :

F S L T S Y S V H .

配列番号 61 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f A 5 断片 :

G F S L T S Y S .

配列番号 62 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

I W A G G S T .

30

配列番号 63 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

V I W A G G S T .

配列番号 64 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

G V I W A G G S T .

配列番号 65 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

L G V I W A G G S T .

配列番号 66 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

W L G V I W A G G S T .

配列番号 67 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

I W A G G S T N .

40

配列番号 68 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

V I W A G G S T N .

配列番号 69 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

G V I W A G G S T N .

配列番号 70 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

L G V I W A G G S T N .

配列番号 71 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

W L G V I W A G G S T N .

配列番号 72 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f A 5 断片 :

I W A G G S T N Y .

50

配列番号 73 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
V I W A G G S T N Y .

配列番号 74 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
G V I W A G G S T N Y .

配列番号 75 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
L G V I W A G G S T N Y .

配列番号 76 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
W L G V I W A G G S T N Y .

配列番号 77 : 非限定的な例示の部分 C D R H 3 配列、 I h f A 5 断片 :  
R E D S .

10

配列番号 78 : 非限定的な例示の部分 C D R H 3 配列、 I h f A 5 断片 :  
A R E D S .

配列番号 79 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f A 5 断片 :  
Q N V G T N .

配列番号 80 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f A 5 断片 :  
Q N V G T N V .

配列番号 81 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f A 5 断片 :  
Q N V G T N V A .

配列番号 82 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
S A S .

20

配列番号 83 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
Y S A S .

配列番号 84 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
I Y S A S .

配列番号 85 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
L I Y S A S .

配列番号 86 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
A L I Y S A S .

配列番号 87 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
S A S Y .

30

配列番号 88 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
Y S A S Y .

配列番号 89 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
I Y S A S Y .

配列番号 90 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
L I Y S A S Y .

配列番号 91 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
A L I Y S A S Y .

配列番号 92 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
S A S Y R .

40

配列番号 93 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
Y S A S Y R .

配列番号 94 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
I Y S A S Y R .

配列番号 95 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
L I Y S A S Y R .

配列番号 96 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
A L I Y S A S Y R .

配列番号 97 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f A 5 断片 :  
S A S Y R Y .

50

- 配列番号 98 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 :  
Y S A S Y R Y .
- 配列番号 99 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 :  
I Y S A S Y R Y .
- 配列番号 100 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : L I Y S A  
S Y R Y .
- 配列番号 101 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : A L I Y S  
A S Y R Y .
- 配列番号 102 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : S A S Y R  
Y S . 10
- 配列番号 103 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : Y S A S Y  
R Y S .
- 配列番号 104 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : I Y S A S  
Y R Y S .
- 配列番号 105 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : L I Y S A  
S Y R Y S .
- 配列番号 106 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、I h f A 5 断片 : A L I Y S  
A S Y R Y S .
- 配列番号 107 : 非限定的な例示のリンカー : G G S G G S .
- 配列番号 108 : 非限定的な例示の部分 C D R L 3 配列、I h f A 5 断片 : Q Q Y N S  
Y P . 20
- 配列番号 109 : 非限定的な例示の部分 C D R L 3 配列、I h f A 5 断片 : Q Q Y N S  
Y P T .
- 配列番号 110 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f m B 4 断片 : F N I K  
D Y Y .
- 配列番号 111 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f m B 4 断片 : F N I K  
D Y Y M .
- 配列番号 112 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f m B 4 断片 : F N I K  
D Y Y M H .
- 配列番号 113 : 非限定的な例示の部分 C D R H 1 配列、I h f m B 4 断片 : G F N I  
K D Y Y . 30
- 配列番号 114 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : I D P E  
N D D T .
- 配列番号 115 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : W I D P  
E N D D T .
- 配列番号 116 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : G W I D  
P E N D D T .
- 配列番号 117 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : I G W I  
D P E N D D T .
- 配列番号 118 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : W I G W  
I D P E N D D T . 40
- 配列番号 119 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : I D P E  
N D D T E .
- 配列番号 120 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : W I D P  
E N D D T E .
- 配列番号 121 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : G W I D  
P E N D D T E .
- 配列番号 122 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : I G W I  
D P E N D D T E .
- 配列番号 123 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、I h f m B 4 断片 : W I G W 50

I D P E N D D T E .

配列番号 1 2 4 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I D P E N D D T E Y .

配列番号 1 2 5 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f m B 4 断片 : W I D P E N D D T E Y .

配列番号 1 2 6 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f m B 4 断片 : G W I D P E N D D T E Y .

配列番号 1 2 7 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I G W I D P E N D D T E Y .

配列番号 1 2 8 : 非限定的な例示の部分 C D R H 2 配列、 I h f m B 4 断片 : W I G W I D P E N D D T E Y .

10

配列番号 1 2 9 : 非限定的な例示の部分 C D R H 3 配列、 I h f m B 4 断片 : T E L G A Y .

配列番号 1 3 0 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f m B 4 断片 : Q S L L D S N G K T Y .

配列番号 1 3 1 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f m B 4 断片 : Q S L L D S N G K T Y L .

配列番号 1 3 2 : 非限定的な例示の部分 C D R L 1 配列、 I h f m B 4 断片 : Q S L L D S N G K T Y L N .

配列番号 1 3 3 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L V S .

20

配列番号 1 3 4 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : Y L V S .

配列番号 1 3 5 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I Y L V S .

配列番号 1 3 6 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L I Y L V S .

配列番号 1 3 7 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : R L I Y L V S .

配列番号 1 3 8 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L V S K .

配列番号 1 3 9 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : Y L V S K .

30

配列番号 1 4 0 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I Y L V S K .

配列番号 1 4 1 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L I Y L V S K .

配列番号 1 4 2 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : R L I Y L V S K .

配列番号 1 4 3 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L V S K L .

配列番号 1 4 4 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : Y L V S K L .

40

配列番号 1 4 5 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I Y L V S K L .

配列番号 1 4 6 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L I Y L V S K L .

配列番号 1 4 7 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : R L I Y L V S K L .

配列番号 1 4 8 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L V S K L D .

配列番号 1 4 9 : 非限定的な例示の部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : Y L V S K L D .

50

配列番号 150 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I Y L V S K L D .

配列番号 151 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L I Y L V S K L D .

配列番号 152 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : R L I Y L V S K L D .

配列番号 153 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L V S K L D S

配列番号 154 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : Y L V S K L D S .

配列番号 155 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : I Y L V S K L D S .

配列番号 156 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : L I Y L V S K L D S .

配列番号 157 : 非限定的な例示的部分 C D R L 2 配列、 I h f m B 4 断片 : R L I Y L V S K L D S .

配列番号 158 : 非限定的な例示的部分 C D R L 3 配列、 I h f m B 4 断片 : W Q S T H F P H .

配列番号 159 : 非限定的な例示的部分 C D R L 3 配列、 I h f m B 4 断片 : W Q S T H F P H T .

#### 【 0 0 0 7 】

表の説明

表 1 は、非限定的な例示的抗体を産生するハイブリドーマについての列挙である。

#### 【 0 0 0 8 】

表 2 は、例示的抗体およびそれらの対応する C D R についての非限定的なリストである。

#### 【 0 0 0 9 】

表 3 は、例示的抗体ならびにそれらの対応する重鎖可変領域および軽鎖可変領域についての非限定的なリストである。

#### 【 0 0 1 0 】

表 4 は、粘膜バイオマススコアを作製するための実施例 3 の中耳炎モデルで使用されるスコアリング法についての概要である。

#### 【 0 0 1 1 】

表 5 は、無傷のウサギポリクローナル I g G およびマウスモノクローナル I g G に対する I g G F a b 断片の効力の概要である。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 1 2 】

細菌細胞内では、D N A B I I タンパク質は、結合すると、D N A 基質を必然的に屈曲させる D N A 結合性タンパク質である。同様に、既に屈曲した立体構造の D N A は、屈曲させるために必要なエネルギーが不必要となるので、例示的な基質である。

#### 【 0 0 1 3 】

D N A B I I ファミリーは、細胞内の細菌性核封入体を部分的に形作る細菌性タンパク質である、核封入体関連タンパク質 ( N A P ) と称するタンパク質のクラスのメンバーである ( Browning ら ( 2 0 1 0 年 ) 、 Curr. Opin. Microbiol. 、 1 3 巻 : 7 7 3 ~ 7 8 0 頁 ) 。加えて、このファミリーは、遍在性であり、事実上全ての真正細菌が発現する。現時点で特徴づけられている全ての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のいずれかとして機能する。ファミリーは、H U ( ヒストン様タンパク質 ) および I H F ( 組込み宿主因子 ) の 2 つの種類に分けられている。これらのファミリーメンバーの間の主要な区別は、H U が、D N A に配列非依存的に結合するのに対し、I H F は、属にわたり保存されている、コンセンサス配列 ( W A T C A A N N N N T T R [

10

20

30

40

50

配列中、Wは、AまたはTであり、Rは、プリンであり、Nは、任意の塩基である ] (配列番号 160) ) に結合するということである (Swingerら (2004年)、Curr. Opin. Struct. Biol., 14巻: 28~35頁)。全てのDNABIIタンパク質は、DNAに結合し、これを大きく屈曲させる、例えば、E. coli IHFは、DNAを、事実上のU字型ターンに屈曲させることができる (Riceら (1996年)、Cell, 87巻: 1295~1306頁)。加えて、全てのファミリーメンバーは、あらかじめ屈曲または湾曲したDNA構造、例えば、DNAの組換えに中心的な、ホリデイ接合部、十字型様構造を取る可能性が高い。実際、DNABIIタンパク質は、遺伝子の発現、組換え、修復、および複製を含む、細胞内の全てのDNA機能を容易とするアクセサリ因子として機能する (Swingerら (2004年)、Curr. Opin. Struct. Biol., 14巻: 28~35頁)。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本開示の一態様では、出願人らは、DNABIIポリペプチドに特異的である抗体または抗体の抗原結合性断片を提供する。抗体または抗原結合性断片は、宿主に投与されると、既存のまたはあらかじめ形成されたバイオフィルムを低減または根絶する。したがって、一態様では、本開示は、DNABIIポリペプチドと特異的に結合する、1つまたは複数の抗体または抗原結合性断片およびin vitroまたはin vivoにおけるバイオフィルムの分解、治療 (remediating) または破壊におけるそれらの使用に関する。

【0015】

別の態様では、抗体または抗原結合性断片は、任意の適切な生物によって産生されるDNABII結合性ポリペプチド、例えば、Haemophilus influenzae IHFアルファ、IHFベータまたはHUポリペプチドの立体構造先端部領域を特異的に認識し、それに特異的に結合する抗体のFab断片を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離されたポリペプチドとして記載される。このようなものの非限定的な例は、設計された立体構造先端部領域の群、A5またはmB4ペプチド断片またはその各々の等価物から選択される。一態様では、断片は、mIhfB4<sub>NTHI</sub>抗体またはその抗体の等価物に由来する。一態様では、断片は、IHF A5抗体またはその抗体の等価物に由来する。

20

【0016】

ある特定の態様では、本開示は、mIhfB4<sub>NTHI</sub>抗体またはA5抗体のFab断片またはこれらの各ポリペプチドの等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる単離されたポリペプチドに関する。他の態様では、本開示は、IHF断片B4、mIhfB4またはA5抗体のFab断片または各ポリペプチドの等価物から本質的になる単離されたポリペプチドに関する。一部の実施形態では、抗体断片または抗原結合性断片は、ポリクローナル血清に由来する。他の態様では、抗体断片または抗原結合性断片は、ポリクローナル抗体に由来しない。一部の実施形態では、抗体断片または抗原結合性断片は、モノクローナル抗体に由来する。表1は、本開示の断片および断片を含有するポリペプチドを誘導し得る非限定的な例示的モノクローナル抗体ならびにそれらを産生するハイブリドーマを列挙する。例えば、Haemophilus influenzaeのIhfA断片であるA5 (配列番号13) またはIhfB断片であるB4 (配列番号16) およびIhfB断片であるmB4 (配列番号17) 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株は、2015年7月30日に、ブダペスト条約の規定に従い、表1に列挙される受託番号下、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託された。さらなる非限定的な例示的抗体は、ハイブリドーマ細胞株であるIhfA3<sub>NTHI</sub> 9B10.F2.H3、IhfB2<sub>NTHI</sub> 7A4.E4.G4、およびIhfB2<sub>NTHI</sub> 7A4.E4.G11 (2016年8月1日に、ブダペスト条約の規定に従い、表1に列挙される受託番号下、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託された) により産生されたHaemophilus influenzaeのIhfA断片であるA3 (配列番号12) またはIhfB断片であるB2 (配列番号15) を特

30

40

50

異的に認識し、それに特異的に結合するものと；配列番号 31、配列番号 33、アミノ酸配列 N P X T（式中、X は、任意のアミノ酸であるか、あるいは、X は、アミノ酸 Q、R、K、S もしくは T から選択される）を含む DNA B I I ポリペプチド、またはそれらのそれぞれの等価物の群から選択されるポリペプチドを含むポリペプチドを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体とを含む。

【0017】

本開示の抗体および抗体に由来する断片は、哺乳動物ポリクローナル抗体に由来し得る。別の態様では、哺乳動物ポリクローナル抗体は、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヒツジポリクローナル抗体、ウマポリクローナル抗体、イヌポリクローナル抗体またはヒトポリクローナル抗体の群から選択される。別の態様では、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、ヒト化抗体またはヒト抗体である。別の態様では、哺乳動物モノクローナル抗体は、ウサギモノクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒツジモノクローナル抗体、ウマモノクローナル抗体またはイヌモノクローナル抗体の群から選択される。別の態様では、抗体は、表 1 に列挙されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体である。抗体は、任意のアイソタイプ、例えば、Ig M または Ig G のものであり得る。

【0018】

別の態様では、単離された抗体断片は、検出可能な標識および/または精製標識を含む。

【0019】

さらなる態様において、本明細書に記載のポリペプチドおよびキャリアを含む、それから本質的になる、またはなおさらにそれからなる組成物がまた提供され、キャリアの非限定的な例として、保存剤または安定化剤が挙げられる。一態様では、組成物は、輸送の容易性、例えば、凍結乾燥のために処理される。

【0020】

別の態様では、本明細書に記載の抗体断片または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も提供される。別の態様では、単離されたポリヌクレオチドは、検出可能な標識および/または精製標識をさらに含む。別の態様では、検出可能な標識は、コンジュゲートされた天然に存在する蛍光 (fluorescent) ポリヌクレオチドではない。別の態様では、単離されたポリヌクレオチドは、複製および/または発現のために 1 つまたは複数の調節エレメントに作動可能に連結され、これが、必要に応じて発現ベクターまたは宿主細胞内に含有される。

【0021】

別の態様では、本明細書において記載されたような単離されたポリヌクレオチドおよびキャリアを含む、それから本質的になる、またはなおさらにそれからなる組成物も提供される。別の態様では、キャリアは、保存剤または安定化剤を含む。

【0022】

別の態様では、必要に応じて、本明細書に記載の発現ベクターまたは複製ベクターを含む、単離されたポリヌクレオチドを含むベクターおよび/または宿主細胞も提供される。一態様では、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり、このようなものの非限定的な例は、本明細書に開示されている。

【0023】

別の態様では、本明細書に記載のポリペプチドを産生するための方法であって、本明細書において開示された単離された宿主細胞を、ポリヌクレオチドのポリペプチドへの発現を可能にする条件下で培養するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法が提供される。別の態様では、方法は、宿主細胞または細胞培養培地からポリペプチドから発現されたポリペプチドを単離するステップをさらに含む。宿主細胞は、真核細胞または原核細胞であり得る。

【0024】

別の態様では、産業プロセスと関連するバイオフィルムの形成を防止する、またはバイオフィルムを破壊する方法であって、バイオフィルムに対して感受性の表面またはバイオ

10

20

30

40

50

フィルムを含有する表面を、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを用いて処置するステップを含む方法が提供される。

【0025】

別の態様では、バイオフィルムを破壊する結合性部分、例えば、抗体、抗原結合性断片、小分子または他の作用剤を同定する方法であって、候補結合性部分を、バイオフィルム構成成分、および本明細書に記載の少なくとも1種のポリペプチドと接触させるステップと、結合性部分の、バイオフィルム中のDNA B I Iとの結合について、本明細書に記載のポリペプチドの、バイオフィルム中のDNA B I Iとの結合と比較してアッセイするステップとを含み、ポリペプチドの結合と比較して実質的に同一またはより強い結合を有する結合性部分が、バイオフィルムを破壊する結合性部分である方法が提供される。

10

【0026】

別の態様では、複数の細菌種において薬物耐性を逆転させる作用剤、例えば、抗体、抗原結合剤、小分子、ポリヌクレオチドまたはその他の治療剤または診断剤を同定する方法であって、作用剤を複数の種によって産生されたバイオフィルムを破壊する活性について評価するステップを含み、本明細書において記載される抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドと実質的に等しい活性を有する作用剤であってバイオフィルムを破壊する作用剤（および必要に応じて、多数の前記タンパク質と結合する作用剤）が、薬物耐性を逆転させる作用剤と同定される、方法が提供される。一態様では、作用剤は、グラム陽性種およびグラム陰性種を含む少なくとも2種の細菌種に由来するバイオフィルムに対して有効であり、このような細菌種の非限定的な例には *S. aureus*、*P. aeruginosa* および *B. cenocepacia* が挙げられる。

20

【0027】

別の態様では、対象におけるバイオフィルムの形成を特徴とする状態を処置し、かつ/または対象におけるバイオフィルムの形成を検出する方法であって、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片もしくはポリペプチドを用いて、それを必要とする対象に投与するステップ、またはそれを必要とする対象を処置するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法が提供される。投与されるべき量は、バイオフィルム (biofilm) を破壊または検出するのに有効な量でなくてはならない。一態様では、バイオフィルムを検出しようとする場合、方法は、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを含有する組成物の投与の前、その間およびその後の、対象におけるバイオフィルム形成および/または破壊をイメージングおよび/またはモニタリングするステップをさらに含む。一態様では、バイオフィルムを検出しようとする場合、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、化学修飾されている。一態様では、バイオフィルムを検出しようとする場合、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、診断剤または検出可能な標識または作用剤にコンジュゲートされている。一態様では、バイオフィルムを検出しようとする場合、方法は、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドの、存在する任意のバイオフィルムとの複合体形成を観察するステップをさらに含む。一態様では、処置されるべき状態は、静脈性潰瘍および糖尿病性足部潰瘍、耳感染症、副鼻腔感染症、尿路感染症、肺感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、カテーテル関連感染症、植え込まれたプロテーゼに関連する感染症、または歯周病を含む慢性非治癒創傷の群から選択される。

30

40

【0028】

別の態様では、対象におけるバイオフィルムの形成を特徴とする状態の発生または進行をモニタリングする方法であって、対象を処置するステップまたは、対象に、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与するステップを含む方法が提供される。一態様では、方法は、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドの、存在する任意のバイオフィルムとの複合体形成を観察するステップをさらに含む。一態様では、ポリペプチドは、化学修飾されている。一態様では、ポリペプチドは、診断剤または検出可能な標識または作用剤にコンジュゲートされている。

【0029】

50



別の態様では、対象におけるバイオフィルムの形成を特徴とする状態の処置をモニタリングする方法であって、対象に、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法が提供される。一態様では、方法は、対象におけるバイオフィルム形成および/または破壊をイメージングおよび/またはモニタリングするステップをさらに含む。一態様では、ポリペプチドは、化学修飾されている。一態様では、ポリペプチドは、検出可能な標識または診断剤にコンジュゲートされている。

#### 【0030】

別の態様では、バイオフィルムの形成防止またはバイオフィルムの破壊を必要とする対象におけるバイオフィルムの形成を防止する、またはバイオフィルムを破壊する方法であって、対象に、有効量の本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法が提供される。

#### 【0031】

別の態様では、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドでコーティングされた非生理学的表面が提供され、必要に応じて、表面は、パイプ中などの産業的環境にある。

#### 【0032】

一態様では、バイオフィルムを産生する生物に感染した対象を処置するための、対象においてバイオフィルムを破壊するための、および/またはバイオフィルムの存在と関連している状態に苦しむ対象を処置するためなどの1つまたは複数の方法であって、対象に有効量の本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与するステップであって、さらに、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが、対象における抗炎症性サイトカインの産生を誘導するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法が本明細書において提供される。別の態様では、抗炎症性サイトカインは、IL-4、IL-13またはIL-10のうち1つまたは複数を含む。別の態様では、対象は、哺乳動物である。別の態様では、哺乳動物は、ヒトである。さらにもう1つの態様では、対象は、小児患者である。

#### 【0033】

別の態様では、上記の方法は、有効量の抗生物質の投与と組み合わせられる。別の態様では、方法は、有効量の本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを投与することによって、抗生物質の効力を増加させるために提供される。

#### 【0034】

本明細書に記載の単離された抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドおよび使用のための指示を含むキットも提供される。一態様では、キットは、診断的使用または治療的使用のために使用されてもよく、したがって、本明細書に記載の単離された抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドおよび使用のための指示を含む。別の態様では、キットは、バイオフィルム形成および/または破壊をモニタリングするために使用され得る。別の態様では、キットは、有効量の検出可能な標識または診断用標識および/または抗生物質をさらに含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0035】

【図1】図1は、モノクローナル抗体の消化によるFabの作製を指示する。Fab断片を、マウスモノクローナル抗体の、システインの存在下でのフィシンを用いる消化によって作製した(Marianiら、A new enzymatic method to obtain high-yield Fab2 suitable for clinical use from mouse IgG1, Molec. Immunol. (1991年) 1月~2月、28巻(1~2号): 69~77頁、PMID: 2011130を参照のこと)。Fab断片を精製し、10% Bis-Tris PAGE(BioRad)およびCoomassie Fluor Orangeを使用して各調製物の純度を評価した。

10

20

30

40

50

## 【0036】

【図2】図2は、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fab（本開示においてIHf mB4と、または代替としてmB4とも呼ばれる）とのインキュベーションによる、Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NPによって形成されたバイオフィルムの破壊を指示する。NTHIバイオフィルムを、培地（対照）、mAb IgG1 Fab（対照）、mAb IhfB2<sub>NTHI</sub> FabおよびmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabと共にインキュベートした。

## 【0037】

【図3】図3は、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabとのインキュベーションによる、Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NP、S. aureus 29213、P. aeruginosa 27853およびB. cenocepacia K56-2によって形成されたバイオフィルムの破壊を指示する。Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NP、S. aureus 29213、P. aeruginosa 27853およびB. cenocepacia K56-2によって形成されたバイオフィルムを、マウスIgG1、マウスIgG1 Fab、mAb IhfB2<sub>NTHI</sub>、mAb IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub>およびmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabと共にインキュベートした。

## 【0038】

【図4】図4は、成体チンチラの中耳における、Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NPによって形成されたバイオフィルムの破壊が解析された方法を指示する。0日目（0）に、1000コロニー形成単位（CFU）Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NPを、成体チンチラの中耳に接種した。示されるように、4日目に、83～100%の耳が、粘膜バイオフィルムを発生する。4および5日目に、Fab断片を、中耳中への直接送達によって投与した（342nM）。6日目に、耳鏡検査、粘膜バイオフィルムのイメージング、中耳液、中耳粘膜および接着した細菌バイオフィルムの収集、細菌負荷の列挙および中耳液中のサイトカインレベルの評価を使用して解析を実施して、バイオフィルムを評価した。実験は、マウスmAb IgG1 Fab断片（4匹のチンチラ）、マウスmAb IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab断片（4匹のチンチラ）およびマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fab断片（4匹のチンチラ）を使用するコホートを含んでいた。

## 【0039】

【図5A】図5（A）は、IgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかを投与されたチンチラについての、Haemophilus influenzae（NTHI）86-028NPチャレンジ後の4、5および6日目の平均耳鏡検査スコアを指示する。Welch Allyn MacroView耳鏡を使用して、各動物の鼓膜を可視化し、0～4+スケールで盲検的にランク付けし、2.0のスコアは、中耳腔内の流体の存在、すなわち、中耳炎の存在を示した（Novotnyら、（2006年）Vaccine 24巻：4804頁）。mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの投与は、対照IgG1 FabおよびIhfB2<sub>NTHI</sub> Fabと比較して、より低い平均耳鏡検査スコアを実証した。P値が示されている：\*P 0.05および\*\*P 0.01。図5（B）は、IgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラについてのHaemophilus influenzae（NTHI）86-028NPチャレンジ後の0日目、4日目および6日目の代表的な耳鏡検査画像を示す。4日目に、鼓膜の後ろに中耳液が見られる。6日目に、IgG1 Fab（対照）を投与されたチンチラにおいて中耳液が見られ、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、鼓膜の肥厚が見られることもあり、これは、これらの動物における中耳炎の存在を示す。6日目に、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、非炎症鼓膜が見られる。

【図5B】図5（A）は、IgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fabまたはマウスm

Ab mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかを投与されたチンチラについての、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の4、5および6日目の平均耳鏡検査スコアを提示する。Welch Allyn Macro View耳鏡を使用して、各動物の鼓膜を可視化し、0~4+スケールで盲検的にランク付けし、2.0のスコアは、中耳腔内の流体の存在、すなわち、中耳炎の存在を示した(Novotnyら、(2006年) Vaccine 24巻: 4804頁)。mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの投与は、対照IgG1 FabおよびIhfB2<sub>NTHI</sub> Fabと比較して、より低い平均耳鏡検査スコアを実証した。P値が示されている: \*P 0.05および\*\*P 0.01。図5(B)は、IgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラについてのHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の0日目、4日目および6日目の代表的な耳鏡検査画像を示す。4日目に、鼓膜の後ろに中耳液が見られる。6日目に、IgG1 Fab(対照)を投与されたチンチラにおいて中耳液が見られ、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、鼓膜の肥厚が見られることもあり、これは、これらの動物における中耳炎の存在を示す。6日目に、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、非炎症鼓膜が見られる。

10

#### 【0040】

【図6A】図6(A)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける粘膜バイオフィルムのミリグラム(mg)あたりのコロニー形成単位(CFU) Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPの定量を示す。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後(処置は、4および5日目に実施した)の6日目に実施した。

20

#### 【0041】

【図6B】図6(B)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける中耳液のミリグラム(mg)あたりのコロニー形成単位(CFU) Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPの定量を示す。

30

#### 【0042】

【図7A】図7(A)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから集められた中耳粘膜および粘膜バイオフィルムの量(mass)(グラム、g)の定量を示す。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後(処置は、4および5日目に実施した)の6日目に実施した。図7(B)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから回収された中耳液(MEF)の容量(マイクロリットル、mL)の定量を示す。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後(処置は、4および5日目に実施した)の6日目に実施した。

40

【図7B】図7(A)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから集められた中耳粘膜および粘膜バイオフィルムの量(mass)(グラム、g

50

）の定量を示す。定量は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジ後（処置は、4および5日目に実施した）の6日目に実施した。図7（B）は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから回収された中耳液（MEF）の容量（マイクロリットル、mL）の定量を示す。定量は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジ後（処置は、4および5日目に実施した）の6日目に実施した。

#### 【0043】

【図8A】図8（A）は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラについての7名の個人によって盲検的によく調べられた粘膜バイオマススコアを示す。粘膜バイオフィルムスコアスケールを使用して中耳腔内の残存するバイオフィルムをランク付けした。確立された規程を使用して、0～4のスコアを以下の通りに各画像に割り当てた：ゼロ（0）：見ることができるバイオフィルムなし、1：バイオフィルムが中耳腔の>0～25%を満たす、2：バイオフィルムが中耳腔の>25%～50%を満たす、3：バイオフィルムが、中耳腔の>50%～75%を満たす、4：バイオフィルムが、中耳腔の>75%～100%を満たす。IgG1 Fab対照またはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照が投与されたチンチラと比較して、mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて、有意に低い粘膜バイオマススコアが観察された。P値が示されている：\*P 0.05および\*\*\*P 0.001。図8（B）は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabの最終用量の受容1日後の耳鏡検査によって得られた代表的な中耳画像を描示する。

【図8B】図8（A）は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラについての7名の個人によって盲検的によく調べられた粘膜バイオマススコアを示す。粘膜バイオフィルムスコアスケールを使用して中耳腔内の残存するバイオフィルムをランク付けした。確立された規程を使用して、0～4のスコアを以下の通りに各画像に割り当てた：ゼロ（0）：見ることができるバイオフィルムなし、1：バイオフィルムが中耳腔の>0～25%を満たす、2：バイオフィルムが中耳腔の>25%～50%を満たす、3：バイオフィルムが、中耳腔の>50%～75%を満たす、4：バイオフィルムが、中耳腔の>75%～100%を満たす。IgG1 Fab対照またはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照が投与されたチンチラと比較して、mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて、有意に低い粘膜バイオマススコアが観察された。P値が示されている：\*P 0.05および\*\*\*P 0.001。図8（B）は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabの最終用量の受容1日後の耳鏡検査によって得られた代表的な中耳画像を描示する。

#### 【0044】

【図9】図9は、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける、清澄化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、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17A、IL-12p70およびTNF）の相対量を示す。定量は、ミリリットル（mL）MEFあたりのピコグラム（pg）サイ

トカインを提供するように実施した。

【0045】

【図10】図10は、チンチラにおける中耳の組織学的解析を示す。左側の画像は、マウスIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照を投与された動物に由来する中耳を示す。右側の画像は、マウスmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabが投与された動物に由来する中耳を示す。染色は、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を用いて実施した。画像は、10X対物レンズを使用して入手した。スケールバーは、100 μmに相当する。

【0046】

【図11】図11は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPにより形成されたバイオフィルムの破壊が、成体チンチラの中耳において、ポリクローナルウサギ抗Ihfb2<sub>NTHI</sub>、抗mIhfb4<sub>NTHI</sub>およびナイーブウサギ血清から生成したFab断片を使用して分析された方法を示す。実験は、ナイーブウサギ血清IgGFab断片、ウサギ抗Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab断片およびウサギ抗mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fab断片を使用するコホートを含んだ。ゼロ(0)日目に、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPをチンチラの中耳に接種した。その後、4および5日目(2用量実験)または4、5および6日目(3用量実験)のいずれかに、Fab断片を中耳に直接送達によって投与した(342 nM)。4および5日目に投与したものについては、6日目または12日目のいずれかにコホート1つ当たり3(3)匹のチンチラを殺した。4、5および6日目に投与したものについては、13日目に1つコホート当たり3(3)匹のチンチラを殺した。殺後、チンチラをイメージングし、中耳粘膜を収集し、接着したバイオフィルムを評価し、中耳液を収集し、細菌の定量を実施し、中耳液はサイトカイン多重アッセイを使用して評価した。10%ピストリスPAGE (BioRad)およびSYPROオレンジタンパク質ゲル染色(Invitrogen)によって裏付けられたように、各Fab調製物の純度も示す(3つの別々の調製物：ナイーブ、Ihfb2およびmIhfb4)。

【0047】

【図12】図12は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後に、ウサギIgG1Fab、ウサギIhfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはウサギmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかを投与されたチンチラにおける粘膜バイオフィルムの1ミリグラム(mg)当たりのHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPのコロニー形成単位(CFU)の定量を示す。定量は、以下の通りの3つの異なる実験で実施した：(1)それぞれのFabの2用量を投与して1日後に殺した；(2)それぞれのFabの2用量を投与して7日後に殺した；および(3)それぞれのFabの3用量を投与して7日後に殺した。Fabの用量をHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の4および5日目(2用量)または4、5および6日目(3用量)に投与した。P値を示す：\*\*P 0.01。

【0048】

【図13】図13は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後に、ウサギIgG1Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかを投与されたチンチラにおける中耳液の1ミリリットル(ml)当たりのHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPのコロニー形成単位(CFU)の定量を示す。定量は、以下の通りの3つの異なる実験で実施した：(1)それぞれのFabの2用量を投与して1日後に殺した；(2)それぞれのFabの2用量を投与して7日後に殺した；および(3)それぞれのFabの3用量を投与して7日後に殺した。Fabの用量をHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の4および5日目(2用量)または4、5および6日目(3用量)に投与した。P値を示す：\*P 0.05および\*\*P 0.01。

【0049】

【図14】図14は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後に、ウサギIgG1Fab、Ih f B2<sub>NTHI</sub>FabまたはmIh f B4<sub>NTHI</sub>Fabのいずれかを投与されたチンチラの平均粘膜バイオフィルムスコア（7人の盲検検査者）を示す。定量は、以下の通りの3つの異なる実験で実施した：（1）それぞれのFabの2用量を投与して1日後に殺した；（2）それぞれのFabの2用量を投与して7日後に殺した；および（3）それぞれのFabの3用量を投与して7日後に殺した。Fabの用量をHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の4および5日目（2用量）または4、5および6日目（3用量）に投与した。粘膜バイオフィルムスコアスケールは、中耳腔内に残存するバイオフィルムをランク付けするために使用した。確立された規程を使用して、以下の通りに0から4までのスコアを各画像に割り当てた：ゼロ（0）：見ることができるバイオフィルムはない；1：バイオフィルムは中耳腔の>0から25%を満たす；2：バイオフィルムは中耳腔の>25%から50%を満たす；3：バイオフィルムは中耳腔の>50%から75%を満たす；および4：バイオフィルムは中耳腔の>75%から100%を満たす。P値を示す：\*P 0.05および\*\*P 0.01。

10

#### 【0050】

【図15】図15は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後に、ナীবウサギIgGFab、ウサギ抗mIh f B2<sub>NTHI</sub>IgGFabまたはウサギ抗mIh f B4<sub>NTHI</sub>IgGFabのいずれかを投与されたチンチラにおける清澄化した中耳液における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の相対量を示す。測定された炎症誘発性サイトカインには、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12p70、IL-17A、TNFおよびIFNが含まれた。測定された抗炎症性サイトカインには、IL-4、IL-10およびIL-13が含まれた。

20

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0051】

##### 詳細な説明

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、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意味と同じ意味を有する。本明細書で提供される全てのヌクレオチド配列は、5'から3'への方向で提示される。本開示の実施または試行では、本明細書で記載される方法および材料と類似または同等の、任意の方法および材料を使用しうるが、ここでは、特定の、非限定的で、例示的な方法、デバイス、および材料について記載する。本明細書で引用される全ての技術的刊行物および特許公開は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本開示が、先行発明として、このような開示に先行する権利がないことの容認とはみなされないものとする。

30

#### 【0052】

本開示の実施では、そうでないことが指し示されない限りにおいて、当技術分野の技術の範囲内にある、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についての従来の技法を利用する。例えば、GreenおよびSambrook編（2012年）、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、4版；Ausubelら編（2015年）、「Current Protocols in Molecular Biology」；「Methods in Enzymology」シリーズ（Academic Press, Inc., N.Y.）；MacPhersonら（2015年）、「PCR 1: A Practical Approach」（Oxford University Press内、IRL Press）；MacPhersonら（1995年）、「PCR 2: A Practical Approach」；McPhersonら（2006年）、「PCR: The Basics」、（Garland Science）；HarlowおよびLane編

40

50

(1999年)、「Antibodies, A Laboratory Manual」; Greenfield編(2014年)「Antibodies, A Laboratory Manual」; Freshney(2010年)、「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」、6版; Gait編(1984年)、「Oligonucleotide Synthesis」; 米国特許第4,683,195号; HamesおよびHiggins編(1984年)、「Nucleic Acid Hybridization」; Anderson(1999年)、「Nucleic Acid Hybridization」; Herdewijn編(2005年)、「Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications」; HamesおよびHiggins編(1984年)、「Transcription and Translation」; BuzdinおよびLukyanov編(2007年)、「Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications」; 「Immobilized Cells and Enzymes」(IRL Press(1986年)); Grandi編(2007年)、「In Vitro Transcription and Translation Protocols」、2版; Guisan編(2006年)、「Immobilization of Enzymes and Cells」; Perbal(1988年)、「A Practical Guide to Molecular Cloning」、2版; MillerおよびCalos編(1987年)、「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編(2003年)、「Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells」; MayerおよびWalker編(1987年)、「Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology」(Academic Press, London); LundbladおよびMacdonald編(2010年)、「Handbook of Biochemistry and Molecular Biology」、4版; ならびにHerzenbergら編(1996年)、「Weir's Handbook of Experimental Immunology」、5版を参照されたい。

#### 【0053】

範囲を含めた全ての数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は近似であり、1.0または0.1単位で、必要に応じて、またはその代わりに、+/-15%、あるいは10%あるいは5%あるいは2%の変動で(+)または(-)に変動する。必ずしも明記されているとは限らないが、全ての数字表示に「約」という用語が先行することが理解されるべきである。本明細書に記載の試薬はただ単に例示的なものであり、その等価物が当技術分野で公知であることも、必ずしも明記されているとは限らないが、理解されるべきである。

#### 【0054】

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(1つの)」、「an(1つの)」および「the(その)」は、文脈によりそうでないことが明確に規定されない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「ポリペプチド」という用語は、複数のポリペプチドを、それらの混合物を含めて包含する。

#### 【0055】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」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ものとする。「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、意図された使用のための組合せのための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べきである。したがって、本明細書で定義されてい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汚染物質および薬学的に許容されるキャリア、例えば、リン酸生理食塩水、保存料(例

10

20

30

40

50

えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウムおよびヒドロキシ安息香酸メチル)などを排除しない。「からなる (consisting of)」は、他の成分の微量要素および本明細書に開示される組成物を投与するための実質的な方法のステップ以上のものを排除することを意味するべきである。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。

#### 【0056】

「バイオフィルム」とは、微生物が分泌および/または放出するDNAなどのポリマーと一緒に、有機体または無機体であり得る構造物の表面に時折接着す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、微生物 (microbiotics) および抗菌剤に対して非常に耐性である。バイオフィルムは、歯肉組織、歯および修復物に生息し、歯周ブランク疾患としても公知の齲歯および歯周病を引き起こす。バイオフィルムは、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、カテーテル線およびコンタクトレンズの表面上にも形成され得る。バイオフィルムは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科用インプラントの上で成長する。Centers for Disease Control) は、院内の感染 (nosocomial infection) (院内感染 (hospital-acquired infection)) の65%超は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。バイオフィルムは、膣感染症を引き起こし、免疫系が妨げられている人において生命にかかわる全身感染症を導く。バイオフィルムはまた、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) により引き起こされる疾患を含むがこれらに限定されない、多数の疾患にも関与する。バイオフィルムと関連する、かつ/またはこれを形成することが公知の、さらなる生物は、Campylobacter 種、Candida 種、Legionella pneumophila、およびListeria mon

10

20

30

40

50



ocytogenesを含むがこれらに限定されない。例えば、嚢胞性線維症患者は、抗生物質耐性バイオフィルムを結果としてもたらすことが多い、Pseudomonas感染症を有する。バイオフィルムと関連する他の疾患は、嚢胞性線維症患者の肺感染症、中耳炎、鼓膜切開後耳漏（post-tympanostomy tube otorrhea）、慢性化膿性中耳炎、自然弁感染性心内膜炎（native valve infectious endocarditis）、骨髓炎、鼻副鼻腔炎（rhinosinosis）、前立腺炎、尿路感染症、創傷、齲歯、および歯周炎を含むがこれらに限定されない。上記で列挙した生物（例えば、Listeria monocytogenes、Escherichia coli、Salmonella enterica）のうちの一部などであるがこれらに限定されない食品媒介性病原体もまた、それらが汚染する食品上で、バイオフィルムを形成しうる。動物において疾患を引き起こすバイオフィルム（例えば、Escherichia coli、Salmonella種、およびShigella種）はまた、下流のヒト宿主における食品汚染および／または疾患も引き起こしうる。さらに、バイオフィルムは、1つの均質な微生物集団である必要はなく、他の病原体を組み込む場合があり、宿主細胞であってもなお組み込む場合がある。疾患（院内およびその他の両方における）および食品汚染と関連することに加えて、バイオフィルムはとりわけ、プロセス水およびそれとの接触表面と関連する工業汚染の原因であることが多い。工業汚染物質としての、バイオフィルムを形成する生物に關与する問題は、バイオフィルム形成の結果としての、生物腐食、生物付着（biofouling）、および装置破損を含むがこれらに限定されない。工業の場における非限定的な例示的、バイオフィルムと関連する生物は、Ferreraら（2015年）、Biofouling、31巻（2号）：173～180頁において開示されている生物と、Desulfovibrio種とを含む。バイオフィルムに関するさらなる詳細は、例えば、Donlan（2002年）、Emerging Infectious Diseases、8巻（9号）：881～890頁において見出すことができる。

#### 【0057】

用語「の形成を防止すること」または「バイオフィルムを破壊すること」とは、微生物バイオフィルムの構成成分であるDNA／タンパク質マトリックスの形成の防止、低減もしくは破壊または該DNA／タンパク質マトリックスの構造の防止、低減もしくは破壊を意味する。

#### 【0058】

本明細書で使用する「核封入体関連タンパク質」または「NAP」という用語は、原核細胞の核封入体内の核酸の動的な空間組織化に影響を与える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、および凝集の実行を介して、ゲノムを組織化する。ある特定のNAPは、DNA結合性タンパク質であり、DNABIIタンパク質、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：BAA03950）、およびCbpB（Genbank受託番号：NP\_418813）を含むバイオフィルムと関連しうる。NAPのうち、DNABIIタンパク質は、別個のものであり、アルファヘリックス二量体化ドメインとの強力な配列同一性を全般的に有し、アンチパラレルベータリボンを含むことがあり、これは、DNAの副溝と結合し、その中に挿入し、それを屈曲させる、先端部を含む

#### 【化1】

#### NPXT

[配列中、Xは、任意のアミノ酸であるか、またはアミノ酸Q、R、K、SもしくはTから選択され得る]を有することが多い。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。

#### 【0059】

「DNABIIポリペプチドまたはDNABIIタンパク質」とは、DNA結合性ドメ

インで構成され、したがって、微生物DNAに対して特異的または一般的な親和性を有するDNA結合性のタンパク質またはポリペプチドを意味する。一態様では、DNA BIIポリペプチドまたはDNA BIIタンパク質は、DNAに、副溝において結合する。DNA BIIタンパク質の非限定的な例は、組込み宿主因子 ( IHF ) タンパク質およびヒストン様タンパク質 ( HU ) である。

【 0 0 6 0 】

「組込み宿主因子」または「 IHF 」タンパク質は、バクテリオファージがそのDNAを宿主細菌に組み入れるために使用する細菌のタンパク質である。これらは、細胞外の微生物DNAにも結合する。E. coliにおいてIHF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いだされ、他の生物由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、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10において見いだされ得る。

【 0 0 6 1 】

「 HMGB1 」は、DNAの副溝に結合する、およびそれを歪めると報告されている高移動度群ボックス ( HMGB ) 1タンパク質であり、作用剤の一例である。組換えの、または単離されたタンパク質およびポリペプチドは、Atgenglobal、ProSpecBio、Protein1およびAbnovaから市販されている。

【 0 0 6 2 】

「 HU 」または「ヒストン様タンパク質」とは、一般にはE. coliに付随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接合部に結合することが公知である。他の微生物から関連するタンパク質が単離されている。E. coli HUの完全なアミノ酸配列は、Laineら ( 1980年 ) Eur. J. Biochem. 103巻 ( 3号 ) : 447~481頁によって報告された。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8および9に対応するhupAおよびhupBである。分類不能型Haemophilus influenzae ( NTHI ) に由来するHaemophilus influenzaeのホモログは、配列番号3に対応する。これらの遺伝子のホモログは、他の生物において見出され、他の生物に由来するこれらの遺伝子に対応するペプチドは、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10に見出すことができる。

【 0 0 6 3 】

用語「表面抗原」または「表面タンパク質」とは、細胞外環境に対して少なくとも部分的に曝露されている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。表面抗原の例として、OMP P5 ( Genbank受託番号: YP\_\_004139079.1 )、OMP P2 ( Genbank受託番号: ZZX87199.1 )、OMP P26 ( Genbank受託番号: YP\_\_665091.1 )、rsPilAまたは組換え可溶性PilA ( Genbank受託番号: EFU96734.1 ) およびIV型Pilin ( Genbank受託番号: Yp\_\_003864351.1 ) などの外膜タンパク質がある。

【 0 0 6 4 】

用語「Haemophilus influenzae」とは、例えば、耳感染症、目感染症、および副鼻腔炎などの多くの異なる感染症を引き起こすことが可能な病原性細菌を指す。Haemophilus influenzaeの多くの異なる株が単離されており、それはIhfA遺伝子またはタンパク質を有する。Haemophilus influenzaeの異なる株のいくつか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。

【 0 0 6 5 】

「微生物DNA」は、バイオフィルムを生じる微生物由来の一本鎖DNAまたは二本鎖

10

20

30

40

50

DNAを意味する。

【0066】

ポリペプチドの「立体構造先端ドメイン」とは、構造が、典型的にプロリン残基に媒介される急旋回を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。

【0067】

「バイオフィルムを阻害または予防すること」とは、バイオフィルムの構造を治療的に低減させることまたは予防することを意味する。

【0068】

「感染症を処置すること」とは、バイオフィルムの形成に関連する、微生物、例えば、細菌の数の低減を意図する。当技術分野では、微生物の数が低減されたのかどうかを決定する方法が公知であり、*in vivo*アッセイおよび*ex vivo*アッセイ、ならびに感染症の臨床症状の軽減を含む。細菌は、バイオフィルムにより保護されるため、細菌は、抗菌薬の使用に対して耐性となる。バイオフィルムを破壊することにより、抗菌薬および他の作用剤に対する細菌の耐性を低減または阻害することができ、ならびに細菌感染を処置することができる。

【0069】

「屈曲したポリヌクレオチド」とは、他の鎖と対にならない1本の鎖上に小さなループを含有する二本鎖ポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態では、ループは、1塩基から約20塩基までの長さ、あるいは2塩基から約15塩基までの長さ、あるいは約3塩基から約12塩基までの長さ、あるいは約4塩基から約10塩基までの長さである、あるいは、約4塩基、5塩基、または6塩基、または7塩基、または8塩基、または9塩基、または10塩基を有する。

【0070】

「DNAへの結合においてDNA BIIタンパク質と競合するポリペプチド」とは、屈曲したDNA構造または歪んだDNA構造への結合においてIHFまたはHUと競合するが、DNAとバイオフィルムを形成しないタンパク質またはペプチドを意味する。例としては、これらに限定することなく、IHFの1つまたは複数のDNA結合ドメインを含むIHFの断片、またはその生物学的等価物が挙げられる。

【0071】

本明細書で使用された、「～を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する」という用語は、作用剤、例えば、Fab（抗原結合性断片（fragment antigen binding））またはモノクローナル抗体の、意図されるその標的または結合パートナーへの結合が、非結合より可能性が高いことを意図する。

【0072】

診断または処置の「対象」は、細胞または動物、例えば、哺乳動物またはヒトなどである。非ヒト動物は、診断または処置に供され、感染を受けやすい動物または動物モデル、例えば、サル、ラット、マウス、チンチラなどのネズミ（murine）、イヌなどのイヌ（canine）、ウサギなどのウサギ（leporid）、家畜、スポーツ動物、およびペットである。

【0073】

「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つ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸の類似体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、エステル結合、エーテル結合などによって連結されていてよい。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、アミノ酸の最大数に対する制限はなく、タンパク質の配列またはペプチドの配列を含んでよい。本明細書で 사용되는場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および/また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、グリシンおよびD光学異性体とL光学異性体の両方、アミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 4 】

「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、任意の長さのポリマーの形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してよく、公知または未知の任意の機能を果たし得る。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タグまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、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、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に、またはその後付与することができる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で遮ることができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識化構成成分とコンジュゲートすることによってさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子の両方を指す。別段の指定または要求がない限り、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、二本鎖の形態と、二本鎖の形態を成すことが公知であるまたは予測される2つの相補的な一本鎖の形態のそれぞれの両方を包含する。

10

## 【 0 0 7 5 】

ポリヌクレオチドは、特異的な配列の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である場合はチミンの代わりにウラシル（U）で構成される。したがって、「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示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベースに入力し、バイオインフォマティクスの適用、例えば、機能ゲノム科学および相同性検索などのために使用することができる。

20

## 【 0 0 7 6 】

「単離された」または「組換え型の」という用語は、本明細書において核酸、例えば、DNAまたはRNAなどに関して使用される場合、それぞれ、巨大分子ならびにポリペプチドの天然の供給源に存在する他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。「単離されたかまたは組換え型の核酸」という用語は、断片として天然に存在せず、自然の状態で見いだされない核酸断片を含むものとする。「単離された」という用語は、本明細書では、他の細胞タンパク質から単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびタンパク質を指すためにも使用され、精製されたポリペプチドと組換え型のポリペプチドの両方を包含するものとする。他の実施形態では、「単離されたかまたは組換え型の」という用語は、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（複数可）が天然で通常付随する構成成分、細胞および他の物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、異なる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。単離されたポリヌクレオチドは、そのネイティブな環境または天然の環境、例えば、染色体上では通常付随する3'および5'の連続したヌクレオチドから分離されている。当業者には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（複数可）は、その天然に存在する対応物と区別するために「単離」を必要としない。

30

40

## 【 0 0 7 7 】

明示的な列举がなくとも、また別段の意図がなければ、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、本開示の範囲内でその等価物または生物学的等価物が意図されることが推定されるべきである。本明細書で使用される場合、「生物学的なその等価物」は、参照のタンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸について言及される場合、「その等価物」という用語と同義であるものとし、所望の構造ま

50

たは機能性を依然として維持しながら最小の相同性を有するものを意味する。本明細書において具体的に列挙されていなければ、本明細書で言及されているポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質はいずれも、その等価物も包含すると考えられる。一態様では、等価なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で本明細書記載の、記載されている方法において使用するための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ポリヌクレオチドである。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とは、参照抗体または参照抗原結合性断片またはF a b（抗原結合性断片）と、少なくとも70%、あるいは少なくとも75%、あるいは少なくとも80%、あるいは少なくとも85%、あるいは少なくとも90%、あるいは少なくとも95%の親和性またはそれを超える親和性で結合する抗体または抗原結合性ポリペプチドを意味する。別の態様では、その等価物は、競合E L I S Aアッセイにおいて、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、等価物とは、少なくとも約80%の相同性または同一性、あるいは、少なくとも約85%、あるいは少なくとも約90%、あるいは少なくとも約95%、あるいは98%の相同性または同一性の百分率を意味し、参照タンパク質、参照ポリペプチドまたは参照核酸と実質的に等しい生物活性を示す。生物学的に等価のポリペプチドの例は、開示されるアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換を同定する、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に提供されている。

#### 【0078】

別の配列に対して特定の百分率（例えば、80%、85%、90%、または95%）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、ポリペプチドまたはポリペプチド領域）は、アラインメントすると、その百分率の塩基（またはアミノ酸）が、比較している2つの配列において同じであることを意味する。アラインメントおよび相同性または配列同一性の百分率は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編、1987年）付録30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載のものを使用して決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントのために初期状態のパラメータが使用される。非限定的な例示的アラインメントプログラムは、初期状態のパラメータを使用したBLASTである。具体的には、例示的プログラムは、以下の初期状態のパラメータを使用したBLASTNおよびBLASTPを含む：遺伝暗号（Genetic code）=標準；フィルター（filter）=なし；鎖（strand）=両方；カットオフ（cutoff）=60；期待値（expect）=10；行列（Matrix）=BLOSUM62；記載（Descriptions）=50配列；ソート（sort by）=HIGH SCORE；データベース（Databases）=非冗長性、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+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において見いだすことができる：[ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。配列同一性および同一性の百分率は、それらをclustalWに取り込むことによって決定した（ウェブアドレス：[genome.align.jp](http://genome.align.jp)（2011年3月7日に最終アクセス）において利用可能。

#### 【0079】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、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、比較するためにアラインメントすることができる各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、それらの分子は、その位置において相同である。配列間の相同性の程度は、それらの配列が共有する、一致するまたは相同である位置の数の関数である。「無関係の」または「非相同な」配列は、本開示の配列の1つと40%未満の同一性、あるいは25%未満の同一性を共有する。

#### 【0080】

10

20

30

40

50

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指す場合もある。

【0081】

「ハイブリダイゼーション」とは、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によって安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、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な様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成している2つの鎖、複数鎖複合体を形成している3つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ性 (self-hybridizing) 鎖、またはこれらの任意の組合せを含んでよい。ハイブリダイゼーション反応は、より大規模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などを構成し得る。

10

【0082】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、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の濃度；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。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、約40 ~ 約50 のインキュベーション温度；約9 × SSC ~ 約2 × SSCの緩衝液の濃度；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の緩衝液の濃度；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分から24時間の間であり、1つ、2つ、またはそれ以上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分、2分、または15分である。SSCは0.15 MのNaClおよび15 mMのクエン酸緩衝液である。他の緩衝系を用いた同等のSSCを使用することができることが理解される。

20

【0083】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、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、また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よい。

30

【0084】

「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、そのネイティブな状態にある場合、または当業者に周知の方法によって操作される場合、転写および/または翻訳してポリペプチドおよび/またはその断片に対するmRNAを作製することができるポリペプチドを「コードする」と考えられてい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物であり、それからコード配列を推定することができる。

【0085】

本明細書で使用される場合、「処置すること (treating)」、「処置 (treatment)」などの用語は、本明細書では、所望の薬理的効果および/または生理的効果を得ることを意味するために使用される。効果は、障害またはその徴候または症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であってよい、および/または、障害および/または障害に起因する有害作用に対する部分的または完全な治療という点で治療的であってよい。当技術分野では、処置が行われたのかどうかを決定する方法が公知であり、本明細書でも略述される。

40

【0086】

予防するとは、障害または影響の素因がある系または対象において障害または影響を *in vitro* または *in vivo* で予防することを意味する。その例は、バイオフィルムを生じることが公知の微生物に感染した系においてバイオフィルムの形成を予防することである。

50

## 【 0 0 8 7 】

「組成物」は、活性作用剤、および不活性な別の化合物または組成物（例えば、検出可能な作用剤または標識）または活性な別の化合物または組成物、例えば、アジュバントなどの組合せを意味するものとする。

## 【 0 0 8 8 】

「医薬組成物」は、*in vitro*、*in vivo*または*ex vivo*での診断または治療における使用に適した組成物を成す活性作用剤と不活性または活性なキャリアの組合せを含むものとする。

## 【 0 0 8 9 】

「薬学的に許容されるキャリア」とは、本明細書で開示される組成物中で使用しうる任意の希釈剤、賦形剤、またはキャリアを指す。薬学的に許容されるキャリアは、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、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸塩などの緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、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、亜鉛塩などの塩または電解質、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、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボ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 - ポリオキシプロピレン - ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、マイクロスフェア、マイクロ粒子、またはナノ粒子（例えば、Poly（乳酸 - コ - グリコール酸）など生体分解性ポリマーを含む）、および羊毛脂を含む。適切な医薬キャリアは、この分野における標準の参照テキストである Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company に記載されている。適切な医薬キャリアは、意図された投与形態、すなわち、経口錠剤、カプセル、エリキシル剤、シロップ剤などに関して選択すること、および従来の医薬の実施と一致し得る。

## 【 0 0 9 0 】

本明細書に開示される「生物学的に活性な作用剤」または活性作用剤とは、単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、ベクター、単離された宿主細胞、または抗体、ならびにそれらのうちの1つまたは複数を含む組成物のうちの1つまたは複数を含む。

## 【 0 0 9 1 】

治療薬または他の作用剤の「投与」または「送達」は、処置の過程全体を通して、1回用量で、連続的に、または断続的に実施することができる。最も有効な手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、療法に使用される組成物、療法の目的、処置されている標的細胞、および処置されている対象によって変動する。単回投与または多数回の投与は、処置にあたっている医師によって選択された用量のレベルおよびパターンを用いて行うことができる。適切な投薬の処方および作用剤を投与する方法は当技術分野で公知である。投与経路を決定することができ、最も有効な投与経路を決定する方法は当業者に公知であり、処置に使用される組成物、処置の目的、処置されている対象の健康状態または疾患の病期、および標的細胞または組織によって変動する。投与経路の非限定的な例は、経口投与、経鼻投与、吸入、注射、および局所塗布を含む。投与は、工業適用ならびに治療適用における使用のための投与でありうる。

## 【 0 0 9 2 】

本開示の作用剤（抗体もしくはその断片、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドまたは細胞）は、任意の適切な投与経路によって治療のために投与することが可能である。最適経路は、レシピエントの状態および年齢、ならびに処置されている疾患により変動することも理解されたい。作用剤は産業環境においておよび動物の処置のために使用してもよい。産業環境において使用される場合、バイオフィルムは作用剤、例えば、Fab（断片抗原結合（fragment antigen binding））または抗体と接触させる。

## 【 0 0 9 3 】

用語「有効量」とは、所望の効果を達成するのに十分な量を指す。治療または予防的使用という文脈では、有効量は問題の状態のタイプおよび重症度ならびに健康全般、年齢、性別、体重、種、および医薬組成物に対する耐性などの個々の対象の特徴に依存する。本開示の文脈では、一部の実施形態では、有効量は、バイオフィルム塊の低減またはバイオフィルムの分解をもたらすのに十分な量である。他の態様では、その量は、対象においてバイオフィルムに関連する細菌感染を処置するのに効果的である。他の実施形態では、F a b（断片抗原結合）または抗体という文脈では、有効量はバイオフィルムを分解する、減らすまたは破壊するのに十分な量である。他の実施形態では、作用剤または免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体産生をもたらすのに十分な量である。一部の実施形態では、有効量は、受動免疫の付与を必要とする対象に受動免疫を与えるのに必要な量である。組成物に関しては、一部の実施形態では、上記の要因に加えて、有効量は、意図されている使用、対象の免疫系の健康／応答性に依存する。当業者であれば、これらのおよび他の要因に応じて、適切な量を決定することができる。

10

#### 【0094】

*in vitro*での適用の場合では、いくつかの実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズおよび性質に左右される。有効量は、*in vitro*における標的および使用されている方法の性質および感受性にも左右される。当業者は、これらおよび他の考察に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に応じて、組成物を1回または複数回投与することを含んでよい。

#### 【0095】

20

抗生物質などの薬物の効力に関する用語「効力」とは、所与の強度の効果を生じるのに必要な量という点から表される薬物活性の尺度を指す。高効力薬物は低濃度で所与の応答を誘起し、効力がもっと低い薬物はもっと高い濃度でのみ同じ応答を誘起する。効力は、親和性と有効性の両方に依存する。

#### 【0096】

「コンジュゲートした部分」という用語は、単離されたキメラポリペプチドに、キメラポリペプチドの残基と共有結合を形成することによって付加することができる部分を指す。部分は、キメラポリペプチドの残基と直接結合させることができる、または、リンカーとの共有結合を形成し、次にリンカーとキメラポリペプチドの残基の共有結合を形成することができる。「ペプチドコンジュゲート」とは、1つまたは複数のポリペプチドの、および別の化学化合物もしくは生物化合物との共有結合または非共有結合による会合を指す。非限定的例では、ポリペプチドと化学化合物との「コンジュゲーション」により、その意図された目的のためのポリペプチドの安定性または有効性が改善される。一実施形態では、本開示のポリペプチドはキャリアにコンジュゲートされ、キャリアはリボソーム、ミセル、または薬学的に許容されるポリマーである。

30

#### 【0097】

「リボソーム」は、同心脂質二重層からなる顕微鏡レベルの小胞である。リボソームは、キャリア、例えば、薬学的に許容されるキャリアの例である。構造的に、リボソームは、数百オングストロームから数分の1ミリメートルまでの寸法を有する長い管から球体まで、サイズおよび形状に幅がある。小胞形成性脂質は、外層の脂質組成物をもたらす最終的な複合体の特定の程度の流動性または剛性が達成されるように選択する。これらは、中性（コレステロール）または双極性であり、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジリエタノールアミン（PE）、ホスファチジイルノシトール（PI）、およびスフィンゴミエリン（SM）など、およびこれらに限定されないが、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミン（DOPE）を含めた他の種類の双極性の脂質を含み、炭化水素の鎖長は14～22の範囲内であり、飽和型であるまたは1つまたは複数のC=C2重結合を有する。単独で、または他の脂質構成成分と組み合わせて安定なリボソームを作製することができる脂質の例は、リン脂質、例えば、水素化大豆ホスファチジルコリン（HSPC）、レシチン、ホスファチジリエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール

40

50



、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジステアロイルホスファチジルエタン (distearoylphosphatidylethanolamine) - オラミン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、パルミトイルオテオイルホスファチジルコリン (palmitoyl oteoyl phosphatidylcholine) (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (palmitoyl oleoyl phosphatidylethanolamine) (POPE) およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 4 - (N - マレイミド - トリエチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (DOPE - mal) などである。さらなるリボソームに組み入れることができる、リンを含有しない脂質としては、ステアシルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル - アリールスルフェート、アセチルパルミテート (acetyl palmitate)、グリセロールリシノレエート (glycerol ricinoleate)、ヘキサデシルステアレート (hexadecyl stearate)、両性のアクリルポリマー、ポリエチルオキシレート化 (polyethyl oxylated) 脂肪酸アミド、および上記のカチオン性脂質 (DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP (DOTMA)、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC - Chol) が挙げられる。負に荷電した脂質としては、小胞を形成することができるホスファチジン酸 (PA)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオテオイルホスファチジルグリセロール (dioteoyl phosphatidyl glycerol) (DOPG)、およびジセチルホスフェート (dicetyl phosphate) が挙げられる。一般には、リボソームは、それらの全体的なサイズおよびラメラ構造の性質に基づいて3つのカテゴリーに分けることができる。New York Academy Sciences Meeting、「Liposomes and Their Use in Biology and Medicine」、1977年12月によって開発された3つの分類は、多層状の小胞 (MLV)、小さな単層の小胞 (SUV) および大きな単層の小胞 (LUV) である。生物活性のある作用剤を、本明細書に記載の方法に従って投与するためにそのようなものに封入することができる。

#### 【0098】

「ミセル」は、液体コロイド中に分散した界面活性物質分子の凝集体である。典型的な水溶液中ミセルは、周囲の溶媒と接触した親水性の「頭部」領域を有し、ミセルの中心に疎水性の尾部領域が隔離された凝集体を形成する。この種類のミセルは、順相ミセル (水中油ミセル) として公知である。逆ミセルは、頭部基を中心に有し、尾部が突き出している (油中水ミセル)。ミセルは、本明細書に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または組成物を付着させて、標的の細胞または組織への効率的な送達を容易にするために使用することができる。

#### 【0099】

「薬学的に許容されるポリマー」という句は、本明細書に記載の1つまたは複数のポリペプチドまたは抗体とコンジュゲートすることができる化合物の群を指す。ポリマーをポリペプチドまたは抗体とコンジュゲートすることにより、in vivo および in vitro でのポリペプチドの半減期を延長することができると考えられる。非限定的な例としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、セルロース誘導体、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、糖、ポリオールならびにそれらの混合物が挙げられる。生物活性のある作用剤は、本明細書に記載の方法に従って投与するために、薬学的に許容されるポリマーとコンジュゲートすることができる。

#### 【0100】

「遺伝子送達ビヒクル」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞内に運ぶことができる任意の分子と定義される。遺伝子送達ビヒクルの例は、リボソーム、ミセル、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含めた生体適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド

10

20

30

40

50

；多糖；リボ多糖；人工ウイルスエンベロープ；金属粒子；および細菌、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など、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌のベクター、ならびに、種々の真核生物宿主および原核生物宿主における発現について記載されており、遺伝子療法のために、ならびに単純なタンパク質の発現のために使用することができる、当技術分野で一般に使用される他の組換え型ビヒクルである。

#### 【 0 1 0 1 】

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、導入するために使用する方法に関係なく、外因性のポリヌクレオチド（時には「導入遺伝子」と称される）を宿主細胞に導入することに関する用語である。そのような方法としては、種々の周知の技法、例えば、ベクターに媒介される遺伝子移入（例えば、ウイルス感染／トランスフェクション、または種々の他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子送達複合体による）、ならびに、「裸の」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技法などが挙げられる（例えば、電気穿孔、「遺伝子銃」送達およびポリヌクレオチドを導入するために使用する種々の他の技法など）。導入したポリヌクレオチドは、宿主細胞内で安定にまたは一過性に維持することができる。安定に維持するためには、一般には、導入したポリヌクレオチドが宿主細胞と適合する複製開始点を含むこと、または、宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外のレプリコン（例えば、プラスミド）または核内染色体またはミトコンドリア染色体などに組み込まれることが必要である。当技術分野で公知であり、また本明細書に記載されている通り、いくつかのベクターが、遺伝子の哺乳動物の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。

#### 【 0 1 0 2 】

本明細書で使用される場合「eDNA」という用語は、病原性のバイオフィルムに対する構成成分として見いだされる細胞外のDNAを指す。

#### 【 0 1 0 3 】

「プラスミド」は、染色体DNAと独立して複製することができる、染色体DNAから分離される染色体外のDNA分子である。多くの場合、プラスミドは環状の二本鎖である。プラスミドにより、微生物の集団内に水平に遺伝子移入するための機構がもたらされ、また、一般には、所与の環境状態で選択的な利点をもたらされる。プラスミドは、競合的な環境的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もたらす遺伝子を保有してよい、あるいは、産生されるタンパク質は同様の状況の下で毒素としての機能を果たし得る。

#### 【 0 1 0 4 】

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」と称される。そのような使用のための多くのプラスミドが市販されている。複製しようとする遺伝子を、細胞を特定の抗生物質に対して耐性にする遺伝子およびDNA断片をこの場所に容易に挿入することを可能にするいくつかの一般に使用される制限部位を含む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）を含むプラスミドのコピーに挿入する。プラスミドの別の主要な使用は、大量のタンパク質を生産することである。この場合、研究者は、目的の遺伝子を有するプラスミドを含む細菌を成長させる。細菌はタンパク質を産生してその抗生物質耐性を付与するのと同じように、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、または次にそれがコードするタンパク質を大量生産する安価かつ容易なやり方である。

#### 【 0 1 0 5 】

「酵母人工染色体」または「YAC」とは、大きなDNA断片（100 kbよりも大きく、最大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、酵母細胞において複製および保存されるために必要なテロメア配列、セントロメア配列、および複製開始点配列を含む。最初の環状のプラスミドを使用して築き、制限酵素を使用することによって直線化し、次いでDNAリガー

10

20

30

40

50

ぜにより、突出末端を使用することによって目的の配列または遺伝子を線形の分子内に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（酵母エピソードプラスミド）などは、酵母はそれ自体が真核細胞であるので、翻訳後修飾された真核生物のタンパク質産物を得ることができるので非常に有用であるが、YACはBACよりも不安定であり、キメラ的な影響を生じることが見いだされている。

#### 【0106】

「ウイルスベクター」は、宿主細胞に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のいずれかで組換えによって作製されるウイルスまたはウイルス粒子と定義される。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、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。感染性のタバコモザイクウイルス（TMV）ベースのベクターは、タンパク質の製造に使用することができ、タバコの葉においてGriffithsを発現することが報告されている（O'Keefeら（2009年）*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106巻（15号）：6099～6104頁）。アルファウイルスベクター、例えば、セムルキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターなどが、遺伝子療法および免疫療法において使用するために開発されている。Schlesinger & Dubensky（1999年）*Curr. Opin. Biotechnol.* 5巻：434～439頁およびYingら（1999年）*Nat. Med.* 5巻（7号）：823～827頁を参照されたい。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、ベクター構築物とは、レトロウイルスのゲノムまたはその一部、および治療的な遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子移入における使用のための最新のベクター法についてのさらなる詳細は、例えばKottermanら（2015年）、「*Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook Annual Review of Biomedical Engineering*」、17頁において見出すことができる。

#### 【0107】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス媒介性遺伝子移入」または「レトロウイルスの形質導入」は同じ意味を有し、ウイルスが細胞に侵入し、そのゲノムを宿主細胞ゲノム内に組み込むことによって遺伝子または核酸配列が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、その通常の感染機構によって宿主細胞に侵入することができる、または、細胞に侵入するために異なる宿主細胞の表面受容体またはリガンドに結合するように修飾することができる。本明細書で使用される場合、レトロウイルスベクターとは、ウイルスまたはウイルス様の侵入機構によって外因性の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。

#### 【0108】

レトロウイルスは、それらの遺伝情報をRNAの形態で保有する；しかし、ウイルスが細胞に感染すると、RNAはDNAの形態に逆転写され、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態はプロウイルスと称されている。

#### 【0109】

遺伝子移入が、アデノウイルス（Ad）またはアデノ随伴ウイルス（AAV）などのDNAウイルスベクターにより媒介される態様では、ベクター構築物とは、ウイルスゲノムまたはその部分、およびトランス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、50を超えるセロタイプを含む、比較的よく特徴付けられている歴史的相同の（homogenous）ウイルス群である。例えば、PCT国際特許出願公開第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、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の潜在性を低下させる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への組込みに高い感染性お

よび特異性を有する。Hermonat&Muzyczka ( 1 9 8 4 年 ) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8 1 巻 : 6 4 6 6 ~ 6 4 7 0 頁およびLebkowskiら ( 1 9 8 8 年 ) Mol.Cell.Biol. 8 巻 : 3 9 8 8 ~ 3 9 9 6 頁を参照されたい。

【 0 1 1 0 】

プロモーターと、ポリヌクレオチドを作動可能に連結することができる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で周知である。そのようなベクターはRNAを *in vitro* または *in vivo* で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 ' 非翻訳部分および / または 3 ' 非翻訳部分を除去、付加または変更して、転写レベルまたは翻訳レベルのいずれかで発現に干渉するまたは発現を低下させる可能性がある余分の潜在的な不適切な代替翻訳開始コドンまたは他の配列を排除することが必要であり得る。あるいは、発現を増強するために、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンのすぐ 5 ' 側に挿入することができる。

【 0 1 1 1 】

遺伝子送達ビヒクルは、DNA / リボソーム複合体、ミセルおよびターゲティングされたウイルスタンパク質 - DNA 複合体も包含する。本明細書に開示される方法では、ターゲティング抗体またはその断片も含むリボソームを用いることができる。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り、ポリヌクレオチドを細胞または細胞集団に送達することに加えて、本明細書に記載のタンパク質を細胞または細胞集団に直接導入することができる、あるいは発現を増強し、かつ / または本明細書に開示されるタンパク質の活性を促進する培養条件が他の非限定的な技法である。

【 0 1 1 2 】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、全抗体および任意の抗原結合性断片またはその鎖を含む。したがって、「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包含する。「抗体」、「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、これらに限定されないが、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFv、Fd断片、dAb、VH、VL、VhH、およびV-NARドメインを含めた、抗原への特異的な結合を保持する抗体の断片 ; ミニ抗体 ( minibody )、ダイアボディ ( diabody )、トリアボディ ( triabody )、テトラボディ ( tetrabody ) およびカッパ抗体 ( kappa body ) ; 抗体断片から形成された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包含する。そのようなものの例としては、これらに限定されないが、重鎖また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、重鎖または軽鎖の可変領域、重鎖または軽鎖の定常領域、フレームワーク ( FR ) 領域、または任意のその部分、結合性タンパク質の少なくとも1つの部分、キメラ抗体、ヒト化抗体、種化抗体 ( species-sized antibody )、単鎖抗体、および抗体の抗原結合性部分を含む融合タンパク質および非抗体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することができる。「抗」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IHF、抗HU、抗OMP P5は、特定のタンパク質に結合し、かつ / 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またはポリクローナル抗体を指す。例えば、「抗IHF」とは、IHFタンパク質に結合する抗体を指す。特異的な抗体は、それが生じた対象の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、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によって関連する他のタンパク質にも結合し得る。

【 0 1 1 3 】

抗体は、それらが所望の生物活性を示す限りは、ポリクローナル、モノクローナル、多

10

20

30

40

50

特異性（例えば、二重特異性抗体）、ダイアボディ、および抗体断片であってよい。抗体は、任意の適切な生物学的な供給源、例えば、ヒト、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。

#### 【0114】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、そのそれぞれが抗原上の単一の決定因子に指向されるので、高度に特異的である。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を用いて検出可能に標識化することができる。抗体は、さらに他の部分、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）などとコンジュゲートすることができる。抗体は、ポリスチレンプレートまたはビーズなどを含むがこれらに限定されない固体支持体に結合させてもよい。

10

#### 【0115】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のハイブリドーマ法または組換えDNA法を用いて生成することができる。ハイブリドーマは、研究室において、抗体産生リンパ球と非抗体産生癌細胞、通常、骨髄腫またはリンパ腫を融合させることで作製される細胞である。ハイブリドーマは、増殖し、特異的なモノクローナル抗体の連続的なサンプルを産生する。抗体を生成または選択するための代替の技法としては、*in vitro*でリンパ球を目的の抗原に曝露させること、および細胞、ファージ、または同様の系において抗体ディスプレイライブラリーをスクリーニングすることが挙げられる。

20

#### 【0116】

「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ものとする。本明細書に開示されるヒト抗体としては、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えば、*in vitro*でのランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって、または*in vivo*での体細胞変異によって導入された変異）を挙げることができる。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まないものとする。したがって、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全ての部分（例えば、CDR、フレームワーク、CLドメイン、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、軽微な配列の変化または変異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）、げっ歯類（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に指定された抗体は、そのような種、亜属、属、サブファミリー、ファミリーに特異的な抗体を示す。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異は、場合によって、ヒトまたは他の種において、修飾されていない抗体と比較して、免疫原性を保持する、または免疫原性が低い。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは異なる。ヒト抗体は、機能的に再編成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または真核細胞によって作製することができることが指摘されている。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、ヒト抗体は、ネイティブなヒト抗体においては見いだされないリンカーペプチドを含んでよい。例えば、Fvは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域をつなぐリンカーペプチド、例えば、2個～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基などを含んでよい。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みなされる。

30

40

#### 【0117】

本明細書で使用される場合、ヒト抗体は、抗体が、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫化することによって、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ヒト免疫グロブリン配列を用いて系から得られる場合、特定の生殖系列配列「に由来する」。ヒト生殖系列免疫グロブ

50

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とヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列を比較することによって、そのようなものとして同定することができる。選択されたヒト抗体は、一般には、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、他の種（例えば、マウス生殖系列配列）の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列と比較してヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。ある場合では、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、少なくとも95%、または、少なくとも96%、97%、98%、または99%までも、アミノ酸配列が同一である。一般には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と10アミノ酸以下の差異を示す。ある場合では、ヒト抗体は、5以下、または、さらには4以下、3以下、2以下、1以下までの、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列とのアミノ酸の差異を示し得る。

10

#### 【0118】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、ヒト生殖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単一の結合特異性を示す抗体を指す。この用語は、組換えヒト抗体も意味する。これらの抗体を作製する方法は、本明細書に記載されている。

#### 【0119】

「組換えヒト抗体」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した、発現させた、創出した、または単離したヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたは染色体導入体 (transchromosomal) である動物（例えば、マウス）またはそれから調製される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 (transfectoma) から単離された抗体、組換え型の、コンビナトリアルなヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングして他のDNA配列にすることを伴う任意の他の手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離した抗体などの全てを包含する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖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。しかし、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、in vitro での変異誘発（または、ヒトIg配列に対してトランスジェニックな動物を使用する場合は、in vivo での体細胞の変異誘発）に供することができ、したがって、組換え型の抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVH配列およびVL配列に由来し、それと関連するが、in vivo でのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然に存在しない可能性がある配列である。これらの抗体を作製する方法は、本明細書に記載されている。

20

30

#### 【0120】

本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、その軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子が、一般には、遺伝子工学によって、異なる種に属する抗体可変性領域遺伝子および抗体定常領域遺伝子から構築された抗体である。

#### 【0121】

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配列を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体を指す。ほとんどの部分に関して、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギなど、または非ヒト霊長類の可変領域由来の残基と交換さ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、レシピエント抗体またはドナー抗体においては見いだされない残基を含んでよい。ヒト化抗体は、場合によって、一般にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部分も含んでよい。非ヒト抗体は、フレームワーク領域、定常領域またはCDRに、ヒト抗体由来の同様に位置づけされたアミノ酸と置換されている1つまたは複数のアミノ酸を含有する。一般に、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化型と比較して、ヒト宿主において生じる免疫応答

40

50

を低減することが予測される。ヒト化抗体は、抗原結合性または他の抗体機能に対する影響を実質的に有さない保存されたアミノ酸置換を有し得る。保存された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、リジン - 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。「種化された」という用語は、非ヒト種に向けても、同じまたは同様の形で修飾された抗体を指す。

#### 【 0 1 2 2 】

「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。これらは、それぞれが異なるエピトープを認識する、特異的な抗原に対して分泌される免疫グロブリン分子の混合物である。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ポリクローナル抗体ではない。

10

#### 【 0 1 2 3 】

本明細書で使用される場合、「抗体誘導体」という用語は、例えば、第 2 の分子に対する抗体を連結するために、アミノ酸の 1 つまたは複数がアルキル化、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修飾されている全長の抗体または抗体の断片を含む。抗体誘導体としては、これらに限定されないが、ペグ化された抗体、システイン - ペグ化された抗体、およびその改変体が挙げられる。本開示は、抗体断片の抗体誘導体、例えば、別の分子、例えば、P E G にコンジュゲートされているまたはアシル化によりさらに改変されているポリペプチドも提供した。

20

#### 【 0 1 2 4 】

本明細書で使用される場合、用語「免疫コンジュゲート」は、細胞傷害性薬剤、検出可能な薬剤、放射性薬剤、ターゲティング剤、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、半合成抗体、または多特異性抗体などの第 2 の薬剤に会合しているまたは連結されている抗体、抗体断片または抗体誘導体を含む。本開示は、1 つの構成成分として、本明細書に記載のとおり抗体ポリペプチドを含む免疫コンジュゲートを提供する。

#### 【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「標識化された」組成物を生成するために、検出しようとする組成物に直接または間接的にコンジュゲートした、直接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 - H i s )、磁気的に活性な同位元素、例えば、 $^{115}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$  および  $^{119}\text{Sn}$ 、非放射性同位元素、例えば、 $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  など、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば抗体などを意味する。この用語は、ポリヌクレオチドとコンジュゲートした、挿入配列が発現されるとシグナルをもたらす配列、例えば、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) などを含む。この用語は、混合集団からの生体材料の単離を助ける精製タグまたは標識も含む。「標識」という用語は一般に、検出される組成物に共有結合により付着させた組成物を意図するが、一態様では、「標識」という用語は具体的に、その天然環境において、ポリヌクレオチド内またはタンパク質内に配置された場合、特定の条件 (例えば、温度、pH など) 下で蛍光発光することが公知である、天然に存在するヌクレオシドおよびアミノ酸を除外し、一般に、検出される組成物内に存在しうる、任意の天然蛍光も除外する。標識は、それ自体で検出可能な場合 (例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識) もあり、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的変更を触媒する場合もある。標識は、小規模な検出に適してよい、またはハイスループットなスクリーニングのために適してよい。そのように、適切な標識としては、これらに限定されないが、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、および酵素を含めたタンパク質が挙げられる。標識は、単に検出することができる、または、数量化することができる。単に検出する反応は、一般には、ただ単にその存在が確認される反応を含み、一方、数量化する反応は、一般には、数量化できる (例えば、数値で報告することができる) 値、例えば、強度、偏光、および / または他の性質などを有する反応を含む。発光アッセイまたは蛍光アッセイでは、検出可能な反応を、

30

40

50

実際に結合に関与するアッセイの構成成分と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して直接生成する、または別の構成成分（例えば、レポーターまたは指示薬）と結びつけ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することができる。シグナルを生じる発光標識の例としては、これらに限定されないが、生物発光および化学発光が挙げられる。検出可能な発光反応は、一般には、発光シグナルの変化または出現を含む。発光標識化アッセイの構成成分のための適切な方法および発光団は、当技術分野で公知であり、例えば、Haugland, Richard P. (1996年) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第6版)に記載されている。発光プローブの例としては、これらに限定されないが、エクオリンおよびルシフェラーゼが挙げられる。

10

#### 【0126】

適切な蛍光標識の例としては、これらに限定されないが、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、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン (Malachite green)、スチルベン、ルシファーイエロー、CASCAD E BLUE (商標)、およびTexas Redが挙げられる。他の適切な光学色素は、Haugland, Richard P. (1996年) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第6版)に記載されている。

#### 【0127】

別の態様では、蛍光標識に官能性をもたせて、細胞または組織の内部または表面上に存在する細胞の構成成分、例えば、細胞表面マーカーなどへの共有結合性の付着を容易にする。これらに限定されないが、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、およびハロゲン化スルホニルを含めた適切な官能基は全て、蛍光標識を第2の分子に付着させるために使用することができる。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、作用剤、マーカー、または第2の標識化作用剤のいずれかに付着させる部位に左右される。

20

#### 【0128】

「真核細胞」は、モネラ界を除いた生物界の全てを含む。真核生物は、膜に結合した核によって容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、その細胞が内部の膜および細胞骨格によって複雑な構造に組織化された真核生物または生物体である。最も特徴的な膜に結合した構造は核である。特に列举がなければ、「宿主」という用語は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞を含めた真核生物の宿主を包含する。真核細胞または宿主の非限定的な例としては、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラット、鳥類、爬虫類およびヒトが挙げられる。

30

#### 【0129】

「原核細胞」は、通常、核または任意の他の膜に結合した細胞小器官を欠き、2つのドメイン、細菌および古細菌に分けられる。染色体DNAに加えて、これらの細胞は、エピソームと称される環状のループ内に遺伝情報も含有し得る。細菌細胞は、非常に小さく、およそ動物ミトコンドリアのサイズである（直径約1~2 μm、長さ10 μm）。原核細胞は、3つの主要な形状：ロッド形状、球状、およびスパイラルを特徴とする。真核生物のような精巧な複製プロセスを行う代わりに、細菌細胞は二分裂によって分裂する。例としては、これらに限定されないが、Bacillus細菌、E. coli細菌、およびSalmonella細菌が挙げられる。

40

#### 【0130】

「ネイティブな」または「天然の」抗原は、エピトープを含有する、天然の生物学的な供給源から単離された、かつ対象において抗原受容体、具体的には、T細胞抗原受容体 (TCR) に特異的に結合することができるポリペプチド、タンパク質または断片である。

#### 【0131】

「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か、さもなければ抗体-リガンド対のメンバーとして働く能力を有する分子を指す。「特異的な結合」とは、抗原と免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の相互作用を指す。抗体-抗原結合は

50



、*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、リボ多糖および多糖を含めた巨大分子は、抗原としての機能を果たす潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、抗体リガンドとしての機能を果たす潜在性を有するタンパク質をコードする核酸は、必ず抗原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、抗原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子も含んでよいことを理解されよう。「抗原性」という用語は、抗原の性質を有する分子に対する形容詞的参照である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち免疫原、ならびに免疫学的不応答性、またはアネルギーを誘導する物質、すなわちアネルゲン (*anergen*) を包含する。

#### 【0132】

「変化した抗原」は、対応する野生型抗原の一次配列とは異なる一次配列を有する抗原である。ポリペプチド mB4 (配列番号 17) は変化した抗原 (配列番号 16) の例である。変化した抗原は、合成方法または組換え方法によって作出することができ、それらとしては、これらに限定されないが、翻訳の間に、または翻訳後に、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性の切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって示差的に修飾された抗原性ペプチドが挙げられる (Ferguson ら (1988 年) *Ann. Rev. Biochem.* 57 巻: 285 ~ 320 頁)。本明細書に開示される合成抗原または変化した抗原は、天然のエピトープと同じ TCR に結合するものとする。

#### 【0133】

本明細書ではネイティブな抗原または野生型抗原とも称される「自己抗原」は、対象において、抗原に対する自己寛容に起因して、免疫応答をわずかに誘導する、または全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の例は、黒色腫特異的抗原 gp100 である。

#### 【0134】

「免疫応答」とは、広範には、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的な応答を指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を引き出す能力を持つ分子を指す。免疫原は全て抗原であるが、全ての抗原が免疫原性なのではない。本明細書に開示される免疫応答は体液性 (抗体活性による) または細胞媒介性 (T 細胞の活性化による) であってよい。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、リボ多糖および多糖を含めた種々の巨大分子が免疫原性である潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、免疫応答を引き出すことができる分子をコードする核酸は必ず免疫原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、免疫原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子を含んでよいことを理解されよう。

#### 【0135】

「受動免疫」という用語は、ある対象から別の対象への、抗体の伝達を通じた免疫の伝達を指す。受動免疫は、母親の抗体が胎児に伝達される場合など、天然に起こり得る。受動免疫は、抗体組成物を非免疫の対象に投与する場合など、人工的にも起こり得る。抗体のドナーおよびレシピエントはヒト対象または非ヒト対象であってよい。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、*in vitro*または*in vivo*で生成することができ、また、実施形態に応じて、精製されていてよい、部分的に精製されていてよい、または精製されていない。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、受動免疫は、それを必要とする対象に、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに結合する抗体または抗原結合性断片を投与することによって付与される。いくつかの実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識する、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、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを投与することによって付与される。

#### 【0136】

本明細書で使用される場合、「対象において免疫応答を誘導すること」という用語は、当技術分野ではよく理解されている用語であり、対象に抗原 (またはエピトープ) を導入

10

20

30

40

50

した後、対象に抗原（またはエピトープ）を導入する前の免疫応答（もしあれば）と比較して、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 500 倍、または少なくとも約 1000 倍またはそれを超える抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答の増加を検出または測定することができることを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答としては、これらに限定されないが、抗原特異的な（またはエピトープ特異的な）抗体の産生、およびその表面上に抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子を発現している免疫細胞の産生が挙げられる。所与の抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答が誘導されたかどうかを決定する方法は当技術分野で周知である。例えば、抗原特異的な抗体は、これに限定されないが、E L I S A を含めた、当技術分野で公知の種々の免疫測定法のうちの任意のものを用いて検出することができ、例えば、試料中の抗体の、固定した抗原（またはエピトープ）への結合を、検出可能に標識化した第 2 の抗体（例えば、酵素標識したマウス抗ヒト I g 抗体）を用いて検出する。

10

#### 【0137】

本明細書で使用される場合、用語「抗炎症性サイトカイン」は、炎症誘発性サイトカイン応答を制御する免疫調節分子を含む。サイトカインは特定のサイトカイン阻害剤および可溶性サイトカイン受容体と一緒に作用してヒト免疫応答を調節する。主要な抗炎症性サイトカインは、インターロイキン（I L）- 1 受容体アンタゴニスト、I L - 4、I L - 6、I L - 10、I L - 11 および I L - 13 を含む。I L - 1、腫瘍壊死因子アルファおよび I L - 18 に対する特定のサイトカイン受容体も炎症誘発性サイトカイン阻害剤として機能する。抗炎症性サイトカインレベルを含むサイトカインレベルを測定する方法は、当技術分野では周知である。例えば、血清サイトカインレベルは、市販の酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）キットを使用して測定することが可能である。

20

#### 【0138】

「有効量」という用語は、所望の効果を達成するために十分な量を指す。治療的または予防的な適用の状況では、有効量は、問題の状態の種類および重症度ならびに個々の対象の特性、例えば、全体的な健康、年齢、性別、体重、および医薬組成物に対する寛容性に左右される。免疫原性組成物の文脈における一部の実施形態では、有効量とは、病原体に対する保護的応答をもたらすのに十分な量である。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、受動免疫の付与を必要とする対象に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、上記の因子に加えて、意図された使用、特定の抗原性化合物の免疫原性の程度、および対象の免疫系の健康 / 応答性に左右される。当業者は、これらおよび他の因子に応じて適量を決定することができる。

30

#### 【0139】

i n v i t r o 適用の場合には、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性質に左右される。それは、i n v i t r o における標的および使用されている方法の性質および感受性にも左右される。当業者は、これらおよび他の考察に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に応じて、組成物を 1 回または複数回投与することを含んでよい。

40

#### 【0140】

本明細書で使用される場合、「固相支持体」または「固体支持体」は互換的に使用され、特定の種類の支持体に限定されない。それどころか、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、綿、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」は、合成の抗原提示マトリックス、細胞、およびリポソームも包含する。適切な固相支持体は、所望の最終用途および種々のプロトコールに対する適合性に基づいて選択することができる。例えば、ペプチド合成に関しては、固相支持体は、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、B a c h e m I n c .、P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s などから得られる P A M - 樹脂）、P O L Y H I P E

50

(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をグラフトしたポリスチレン樹脂(TentaGel(登録商標)、Rapp Polymer、Tubingen、Germany)またはポリジメチルアクリルアミド樹脂(Milligen/Bioscience、Calif.から得られる)を指し得る。  
【0141】

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、天然セルロース、修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑靱岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの性質は、いくらかの程度まで可溶性であってよい、または不溶性であってよい。支持材料は、カップリングされた分子が、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は、実質的にいかなる可能性のある構造上の構成を有してもよい。したがって、支持体の構成は、ビーズのように球状であってよい、または、試験管の内側表面、またはロッド外面のように円柱状であってよい。あるいは、表面は、例えばシート、試験紙など平らであってよい、あるいはポリスチレンビーズであってよい。当業者は、抗体または抗原に結合する多くの他の適切なキャリアを知っている、または常套的な実験を使用することによってそれらを確認することができるであろう。

【0142】

発明を実施するための形態

抗体断片およびその誘導体

本開示は、抗体断片(例えば、Fab断片または抗原結合性断片)を提供する。本開示はまた、Fab断片または抗原結合性断片(例えば、Fab断片)のアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離されたポリペプチドを提供し、断片もしくはポリペプチドは、DNABIIポリペプチドおよび/またはDNABIIタンパク質もしくはポリペプチドを含むバイオフィルム構成成分と結合する、および/またはそれを特異的に認識する。

【0143】

抗体断片を含む、それから本質的になる、またはなおさらにそれからなる抗体断片または単離されたポリペプチドは、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、抗体誘導体または組換えヒト化抗体に由来するFab断片のいずれかであり得る。抗体は、任意の適切な種、例えば、哺乳動物種、例えば、マウス、ネコ、イヌ、ウサギまたはヒトに由来し得る。Fab抗体断片を調製する方法は、当技術分野で公知であり、本明細書において手短に記載されている。1つの例示的方法は、図1に概説されている。

【0144】

抗体断片は、DNABIIタンパク質を特異的に認識し、それに特異的に結合する抗体に由来する、またはそれから生成され、このような抗体断片の非限定的な例には、IHFAルファ、IHFBータおよびHUが含まれる。このようなポリペプチドおよびこのようなポリペプチドと結合する抗体の非限定的な例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,999,291号に提供される。一態様では、抗体は、立体構造エピトープを含有するDNABIIポリペプチドの「先端部ドメイン(tip domain)」と特異的に結合する。一態様では、DNABIIポリペプチド(polyeptide)は、配列番号1~33のうち1つを含む、または本質的にそれからなる、またはなおさらにそれからなる。例示的DNABIIポリペプチドのさらなる非限定的な例には、例えば、配列番号13、14、17、26~32に提供される、例えば、IHFAルファ、IHFBータまたはHUの先端部ドメイン内の立体構造エピトープが含まれる。一態様では、配列番号13、14、17および26~32は、一態様では、野生型天然ポリペプチド、例えば、配列番号1~11ではない大きなポリペプチド内に含有される。より大きなポリペプチドは、アミン末端および/またはカルボキシ末端にさらなるアミノ酸を、例えば、一方または両方の末端に少なくとも3または4または5または10または15または20個またはそれより多い

10

20

30

40

50

アミノ酸を含有し得る。

【 0 1 4 5 】

加えて、抗体は、DNA B I I タンパク質の「先端部」領域であって、一態様では、アンチパラレルのベータリボンのターンおよび／または配列

【化 2】

**NPXT**

〔配列中、「X」は、任意のアミノ酸を指すか、あるいは、Xは、アミノ酸Q、R、K、SもしくはTから選択される〕を含有する、またはそれを含有するように変更された「先端部」領域に対して生成させることもできる。このような抗体は、必要に応じて、この配列の片側または両側における、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16アミノ酸の間のアミノ酸が隣接した、

10

【化 3】

**NPXT**

配列を含むDNA B I I タンパク質の断片を使用して生成させることができる。このようなものの非限定的な例、すなわち、コンセンサスアミノ酸配列

【化 4】

**NPXT**

20

を有するものが、本明細書において開示される。別の態様では、抗体は、DNA B I I タンパク質の先端部領域であって、コンセンサス配列

【化 5】

**NPXT**

〔配列中、「X」は、任意のアミノ酸である、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〕をもたらす先端部領域に対して生成される。当業者は、これらの配列のうちの任意の1つでは、X位における残基を、任意のアミノ酸、例えば、Q、R、K、S、またはTで置換し得ることを十分に理解する。例は、：

配列番号13：Haemophilus influenzae Ihf A、A5断片：

30

【化 6】

**RPGRNPKTGDVVPVSARRVV**

配列番号14：Haemophilus influenzae HU、A5断片：

【化 7】

**RTGRNPQTGAIEQIAASKVP**

配列番号17：Haemophilus influenzae Ihf B、修飾B4 (m B 4) 断片：

【化 8】

40

**FSLHHRQPRLGRNPKTGDSV**

配列番号26：Haemophilus influenzae Ihf A、A先端部断片：

【化 9】

**NFELRDKSSRPGRNPKTGDVV**

配列番号27：Haemophilus influenzae Ihf B、B先端部断片：

50

【化 1 0】

SLHHRQPRLGRN**PKT**GD~~SV~~NL

配列番号 3 1 H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e H U、断片：

【化 1 1】

VNERAARTGRN**PQT**GAEIQIAA

を含む。

【 0 1 4 6】

一部の実施形態では、

【化 1 2】

**NPXT**

を含むポリペプチドは、少なくとも約 2 0 アミノ酸の長さであり、

【化 1 3】

**NPXT**

は、配列内の中心にある。このような配列の非限定的な例は、配列番号 1 3、1 4、および 3 1 を含む。代替的に、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り

【化 1 4】

**NPXT**

モチーフを除去するように、

【化 1 5】

**NPXT**

モチーフ（例えば、上記で言及した）を有するポリペプチドを修飾することもでき、これらのポリペプチドに対して、モノクローナル抗体を生じさせることもできる。出願人らは、

【化 1 6】

**NPXT**

モチーフを欠く D N A B I I ポリペプチドに対して生じる抗体の F a b 断片が、バイオフィルムの形成および/または破壊をイメージングおよびモニタリングする診断法において有用であると決定した。一態様では、

【化 1 7】

**NPXT**

モチーフを有する D N A B I I に対して生じた、またはこれに結合する抗体の F a b 断片と、

【化 1 8】

**NPXT**

モチーフを欠く D N A B I I（例えば、修飾ポリペプチドまたは天然に存在するポリペプチド）に対して生じた、またはこれに結合する抗体の F a b 断片とを含むキットも提供される。例えば、キットは、ポリペプチド A 5、B 4、または m B 4 を認識し、それに結合する抗体を含み得（治療的）、キット中で、ポリペプチド A 3 または B 2 を認識し、それに結合する抗体の F a b 断片と組み合わせてもよい（診断的）。キットは、バイオフィルム処置の診断、処置、およびモニタリングに有用である。

【 0 1 4 7】

一態様では、単離されたポリペプチドは、m I h f B 4 N T H I 抗体の F a b 断片または

10

20

30

40

50

m I h f B 4 N T H I 抗体の等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなり、このようなものの例は、本明細書に提供されている。

【 0 1 4 8 】

別の態様では、F a b 断片は、ハイブリドーマ細胞株、例えば、表 1 において列挙されるハイブリドーマによって産生される抗体から調製される。

【表 1】

表 1

特異性	配列番号	ATCC 受託番号	ハイブリドーマ細胞株
IhfA frag. A5	配列番号 13	PTA-122334	IhfA5 NTHI 14G8. F5. G6
IhfB frag. B4	配列番号 16	PTA-122336	IhfB4 NTHI 4E11. E5. G2
IhfB frag. mB4	配列番号 17	PTA-122335	mIhfB4 NTHI 12E6. F8. D12. D5
IhfA frag. A3	配列番号 12	PTA-123393	IhfA3 NTHI 9B10. F2. H3
IhfB frag. B2	配列番号 15	PTA-123392	IhfB2 NTHI 7A4. E4. G4
		PTA-123394	IhfB2 NTHI 7A4. E4. G11

【 0 1 4 9 】

上記で言及したように、本開示はまた、表 1 に開示される抗体、例えば、I h f m B 4 N T H I 抗体または抗体の等価物の F a b 断片を含む、または本質的にそれからなる、なおまたはそれからなる抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドも提供する。別の態様では、単離されたポリペプチドは、I h f A 5 N T H I 抗体または抗体の等価物の F a b 断片を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【 0 1 5 0 】

さらなる態様において、本開示は、表 1 に開示された単離された抗体または表 1 に開示された、もしくは ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 により産生された抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 により産生された抗体、および ( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 により産生された抗体からなる群より選択される抗体に由来する抗体断片に対して少なくとも 8 5 % 同一である、代替的に少なくとも 9 0 %、もしくは代替的に少なくとも 9 5 %、もしくは代替的に少なくとも 1 0 0 % 同一である表 1 に開示された抗体の抗原結合性断片を提供する。

【 0 1 5 1 】

一態様では、本開示は、( i ) 表 1 に開示されるハイブリドーマ細胞株、例えば、I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 により産生された抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 により産生された抗体、または ( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 により産生された抗体の C D R を含む単離された抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを提供する。一態様では、本開示は、( i ) 表 1 に開示されるハイブリドーマ、例えば、細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 により産生された抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 により産生された抗体、または ( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 により産生された抗体と少なくとも 8 5 %、もしくは代替的に少なくとも 9 0 %、もしくは代替的に少なくとも 9 5 %、もしくは代替的に少なくとも 1 0 0 % 同一である C D R を有する抗体に由来する単離された抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドを提

供する。

【 0 1 5 2 】

本明細書において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一部の態様では、このようなものを提供する抗体のH C可変ドメイン配列は、( i ) 表 1 に開示されるハイブリドーマ細胞株、例えば、I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体または( i i i ) ハイブリドーマ細胞株M I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体のH C可変ドメイン配列を含み、および/またはL C可変ドメイン配列は、表 1 に開示される抗体、例えば、( i ) ハイブリドーマ細胞株I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体または( i i i ) ハイブリドーマ細胞株m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体のL C可変ドメイン配列を含む。

10

【 0 1 5 3 】

本明細書において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一部の態様では、このような配列を提供する抗体のH C可変ドメイン配列は、表 1 に開示される抗体、例えば、( i ) ハイブリドーマ細胞株I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体のH C可変ドメイン配列に対して少なくとも8 5 %同一である、または代替的に少なくとも9 0 %、または代替的に少なくとも9 5 %、または代替的に少なくとも1 0 0 %同一であるH C可変ドメイン配列を含み、および/またはL C可変ドメイン配列は、表 1 に開示される抗体、例えば、( i ) ハイブリドーマ細胞株I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体のL C可変ドメイン配列に対して少なくとも8 5 %同一、または代替的に少なくとも9 0 %、または代替的に少なくとも9 5 %、または代替的に少なくとも1 0 0 %同一であるL C可変ドメイン配列を含む。

20

【 0 1 5 4 】

一態様では、本開示は、F a b 断片であって、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み、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と結合する抗原結合性部位を形成するF a b 断片を提供する。

30

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば( i ) ハイブリドーマ細胞株I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか1 種のC D R H 1 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるC D R H 1 配列を含む。

40

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば( i ) ハイブリドーマ細胞株I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって産生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって産生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって産生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか1 種のC D R H 2 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるC D R H 2 配列を含む。

50

## 【 0 1 5 7 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種の C D R H 3 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 3 配列を含む。

## 【 0 1 5 8 】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種の重鎖可変領域配列を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

## 【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種の C D R L 1 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R L 1 配列を含む。

## 【 0 1 6 0 】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種の C D R L 2 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R L 2 配列を含む。

## 【 0 1 6 1 】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種の C D R L 3 を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R L 3 配列を含む。

## 【 0 1 6 2 】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の抗体：表 1 に開示される抗体、例えば ( i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 によって產生される抗体、( i i ) ハイブリドーマ細胞株 I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 によって產生される抗体および( i i i ) ハイブリドーマ細胞株 m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 によって產生される抗体またはそれらの各々の等価物のうちいずれか 1 種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、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

## 【 0 1 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、F S L T S Y S ( 配列番

10

20

30

40

50



号 58) を含むアミノ酸配列であって、F S L T S Y S V (配列番号 59)、F S L T S Y S V H (配列番号 60)、G F S L T S Y S (配列番号 61)、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 1 配列を含む。

【0164】

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 110) を含むアミノ酸配列であって、F N I K D Y Y M (配列番号 111)、F N I K D Y Y M H (配列番号 112)、G F N I K D Y Y (配列番号 113)、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 1 配列を含む。

10

【0165】

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 62) を含むアミノ酸配列であって、V I W A G G S T (配列番号 63)、G V I W A G G S T (配列番号 64)、L G V I W A G G S T (配列番号 65)、W L G V I W A G G S T (配列番号 66)、I W A G G S T N (配列番号 67)、V I W A G G S T N (配列番号 68)、G V I W A G G S T N (配列番号 69)、L G V I W A G G S T N (配列番号 70)、W L G V I W A G G S T N (配列番号 71)、I W A G G S T N Y (配列番号 72)、V I W A G G S T N Y (配列番号 73)、G V I W A G G S T N Y (配列番号 74)、L G V I W A G G S T N Y (配列番号 75)、W L G V I W A G G S T N Y (配列番号 76)、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 2 配列を含む。

20

【0166】

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 D P E N D D T (配列番号 114) を含むアミノ酸配列であって、W I D P E N D D T (配列番号 115)、G W I D P E N D D T (配列番号 116)、I G W I D P E N D D T (配列番号 117)、W I G W I D P E N D D T (配列番号 118)、I D P E N D D T E (配列番号 119)、W I D P E N D D T E (配列番号 120)、G W I D P E N D D T E (配列番号 121)、I G W I D P E N D D T E (配列番号 122)、W I G W I D P E N D D T E (配列番号 123)、I D P E N D D T E Y (配列番号 124)、W I D P E N D D T E Y (配列番号 125)、G W I D P E N D D T E Y (配列番号 126)、I G W I D P E N D D T E Y (配列番号 127)、W I G W I D P E N D D T E Y (配列番号 128)、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 2 配列を含む。

30

【0167】

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、R E D S (配列番号 77) を含むアミノ酸配列であって、A R E D S (配列番号 78) またはその等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 3 配列を含む。

40

【0168】

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、T E L G A Y (配列番号 129) またはその等価物を含むアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R H 3 配列を含む。

【0169】

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、下記で言及されるポリヌ

50

クレオチド配列：

G A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T G A C G C  
C C T C A C A G A G C C T G T C C A T G A C T T G C A C T G T C T C T G G G T T  
T T C A T T A A C C A G C T A T A G T G T A C A C T G G G T T C G C C A G C C T  
C C A G G A A A G A G T C T G G A G T G G C T G G G A G T A A T A T G G G C T G  
G T G G A A G C A C A A A T T A T A A T T C G G C T C T C A T G T C C A G A C T  
G A G C A T C A G C A A A G A C A A C T C C A A G A G C C A A G T T T T C T T A  
A A A A T G G A C A G T C T G C A A A C T G A T G A C A C A G C C A T A T A C T  
A C T G T G C C A G A G A G G A C T C C T G G G G T C A A G G A A C C T C A G T  
C A C C G T C T C C T C A (配列番号 50) またはその等価物によってコードされるポリ  
ペプチドを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

10

【0170】

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：

E V Q L Q E S G P G L V T P S Q S L S M T C T V S G F S L T S Y S V H W V R Q P  
P G K S L E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S R L S I S K D N S K S Q V F L  
K M D S L Q T D D T A I Y Y C A R E D S W G Q G T S V T V S S (配列番号 51) また  
はその等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれか  
らなる。

20

【0171】

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、下記で言及されるポリヌ  
クレオチド配列：

G A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G G G C A G A G C T T G T G A G G T  
C A G G G G C C T C A G T C A A G T T G T C C T G C A C A G C T T C T G G C T T  
C A A C A T T A A A G A C T A C T A T A T G C A C T G G G T G A A G C A G A G G  
C C T G A A C A G G G C C T G G A G T G G A T T G G A T G G A T T G A T C C T G  
A A A A T G A T G A T A C T G A A T A T G T C C C G A A G T T C C A G G G C A A  
G G C C A G T A T G A C T G C A G A C A C A T C C T C C A A C A C A G C C T A C  
C T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A G G A C A C T G C C G T C T  
A T T A C T G T A C A G A G C T C G G A G C T T A C T G G G G C C A G G G G A C  
T C T G G T C (配列番号 52) またはその等価物によってコードされるポリペプチドを  
含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

30

【0172】

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：

E V Q L Q E S G A E L V R S G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y M H W V K Q R  
P E Q G L E W I G W I D P E N D D T E Y V P K F Q G K A S M T A D T S S N T A Y  
L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T E L G A Y W G Q G T L V (配列番号 53) または  
その等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0173】

40

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  
79) を含むアミノ酸配列であって、Q N V G T N V (配列番号 80)、Q N V G T N V  
A (配列番号 81)、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、または  
それから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含  
む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる C D R L 1 配  
列を含む。

【0174】

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 130) を含むアミノ酸配列であって、Q S L L D S N G K T Y L (配列番号  
131)、Q S L L D S N G K T Y L N (配列番号 132)、またはそれらのそれぞれの

50

等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCDRL1配列を含む。

#### 【0175】

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、SAS（配列番号82）を含むアミノ酸配列であって、YSAS（配列番号83）、IYSAS（配列番号84）、LIYSAS（配列番号85）、ALIYSAS（配列番号86）、SASY（配列番号87）、YSASY（配列番号88）、IYSASY（配列番号89）、LIYSASY（配列番号90）、ALIYSASY（配列番号91）、SASYR（配列番号92）、YSASYR（配列番号93）、IYSASYR（配列番号94）、LIYSASYR（配列番号95）、ALIYSASYR（配列番号96）、SASYRY（配列番号97）、YSASYRY（配列番号98）、IYSASYRY（配列番号99）、LIYSASYRY（配列番号100）、ALIYSASYRY（配列番号101）、SASYRYS（配列番号102）、YSASYRYS（配列番号103）、IYSASYRYS（配列番号104）、LIYSASYRYS（配列番号105）、ALIYSASYRYS（配列番号106）、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCDRL2配列を含む。

#### 【0176】

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、LVS（配列番号133）を含むアミノ酸配列であって、YLV（配列番号134）、ILV（配列番号135）、LILV（配列番号136）、RLILV（配列番号137）、LVSK（配列番号138）、YLVSK（配列番号139）、ILVSK（配列番号140）、LILVSK（配列番号141）、RLILVSK（配列番号142）、LVSKL（配列番号143）、YLVSKL（配列番号144）、ILVSKL（配列番号145）、LILVSKL（配列番号146）、RLILVSKL（配列番号147）、LVSKLD（配列番号148）、YLVSKLD（配列番号149）、ILVSKLD（配列番号150）、LILVSKLD（配列番号151）、RLILVSKLD（配列番号152）、LVSKLDS（配列番号153）、YLVSKLDS（配列番号154）、ILVSKLDS（配列番号155）、LILVSKLDS（配列番号156）、RLILVSKLDS（配列番号157）、またはそれらのそれぞれの等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCDRL2配列を含む。

#### 【0177】

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、QQYNSYP（配列番号108）を含むアミノ酸配列であって、QQYNSYPT（配列番号109）、またはその等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCDRL3配列を含む。

#### 【0178】

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、WQSTHFPH（配列番号158）を含むアミノ酸配列であって、WQSTHFPH（配列番号159）またはその等価物で始まる、それで終わる、またはそれから本質的になるアミノ酸配列などであるがこれらに限定されないアミノ酸配列を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCDRL3配列を含む。

#### 【0179】

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：GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAATTCATGTCCACAT

C A G T A G G A G A C A G G G T C A G C G T C A C C T G C A A G G C C A G T C A  
G A A T G T G G G T A C T A A T G T A G C C T G G T A T C A A C A G A A A C C A  
G G G C A A T C T C C T A A A G C A C T G A T T T A C T C G G C A T C C T A C C  
G G T A C A G T G G A G T C C C T G A T C G C T T C A C A G G C A G T G G A T C  
T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A A T G T G C A G T C T  
G A A G A C T T G G C A G A G T A T T T C T G T C A G C A A T A T A A C A G C T  
A T C C C A C G T T C G G A G G G G G A C C A A G T T G G A A A T A A A A (配  
列番号54) またはその等価物によってコードされるポリペプチドを含む、または代替的  
にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0180】

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：

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y Q Q K P  
G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S  
E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P T F G G G T K L E I K (配列番号55) またはその等  
価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0181】

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：

G A T G T T G T G A T G A C C C A G A T T C C A C T C A C T T T G T C G G T T A  
C C A T T G G A C A A C C A G C C T C C A T C T C T T G C A A G T C A A G T C A  
G A G C C T C T T A G A T A G T A A T G G A A A G A C A T A T T T G A A T T G G  
T T G T T T C A G A G G C C A G G C C A G T C T C C A A A G C G C C T A A T C T  
A T C T G G T G T C T A A A C T G G A C T C T G G A G T C C C T G A C A G G T T  
C A C T G G C A G T G G A T C A G G G A C A G A T T T C A C A C T G A A A A T C  
A G C A G A G T T G A G G C T G A G G A T T T G G G A A T T T A T T A T T G C T  
G G C A A A G T A C A C A T T T T C C T C A C A C G T T C G G A G G G G G G A C  
C A A G T T G G A A A T C A A A (配列番号56) またはその等価物によってコードさ  
れるポリペプチドを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれ  
からなる。

【0182】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、アミノ酸配列：

D V V M T Q I P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S N G K T Y L N W  
L F Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D L G I Y Y C W Q S T H F P H T F G G G T K L E I K (配列番号57)  
またはその等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれ  
からなる。

【0183】

抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが由来する、開示されたCDR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は、表2および表3にそれぞれ開示されて  
いる。代替的なCDR予測は、重鎖配列および/または軽鎖配列に基づき、行うことがで  
きる(例えば、Kabatの定義、Clothiaの定義、AbMの定義、またはCDR  
特異性についての接触定義(contact definition)に基づく; 当技術  
分野では、これらのCDR予測法についての詳細が公知であり(例えば、bioinf.  
org.uk/abs/#cdridを参照されたい)、かつ/または市販されている)。表2に開示されるものは、Ofra  
n Labにより提供されているCDR予測アル  
ゴリズム(ofranservices.biu.ac.il/site/services/paratome/index.htmlにおいて入手可能なParatome)  
およびGreen Mountain Antibodies' CDR予測プログラムを活用する結果である。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Ihf A5	配列番号 60 また は配列番 号 61	配列番号 62 または 配列番号 76	配列番号 77 または 配列番号 78	配列番号 79 または 配列番号 81	配列番号 82 または 配列番号 106	配列番号 108 また は配列番 号 109
Ihf mB4	配列番号 112 また は配列番 号 113	配列番号 114 また は配列番 号 128	配列番号 129	配列番号 131 また は配列番 号 132	配列番号 133 または 配列番号 157	配列番号 158 また は配列番 号 159

10

【表 3】

表 3

抗体	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
Ihf A5	配列番号 51	配列番号 55
Ihf mB4	配列番号 53	配列番号 57

20

## 【0184】

一態様では、本開示は、表 1 に開示される抗体、例えば、I h f A 5、I h f m B 4 またはそれらの各々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 8 5 %、または代替的に少なくとも 9 0 %、または代替的に少なくとも 9 5 %または 1 0 0 % 同一である単離された抗体の抗体断片（例えば、F a b 断片）を提供する。

30

## 【0185】

一態様では、本開示は、I h f A 5 の C D R を含む単離された抗体断片を提供する。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 8 5 %、または代替的に少なくとも 9 0 %、または代替的に少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % 同一である抗体の単離された抗体断片を提供する。

## 【0186】

一態様では、本開示は、I h f m B 4 の C D R を含む単離された抗体断片を提供する。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 8 5 %、または代替的に少なくとも 9 0 %、または代替的に少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % 同一である単離された抗体の単離された抗体断片を提供する。

40

## 【0187】

本明細書において提供される抗体断片の一部の態様では、H C 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、L C 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。

## 【0188】

本明細書において提供される抗体断片の一部の態様では、H 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み、L C 可変ドメイン配列は、I h f m B 4 の可変

50

ドメイン配列を含む。

【0189】

本技術の別の態様では、抗体断片は、以下の特徴：

(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と、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%、または100%同一な、1つまたは複数のCDRを含むこと；

(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と、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%、または100%同一な、1つまたは複数のCDRを含むこと；

(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と、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%、または100%同一であること；

(d) HC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と、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%、または100%同一であること；および

(e) 抗体が、開示される配列のいずれかが結合するエピトープと重複するエピトープに結合すること

のうち1つまたは複数を含む。

【0190】

本明細書において提供される抗体の態様の一部では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、DNABIIタンパク質と $10^{-4}$  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未満の解離定数(KD)で結合する。本明細書において提供される抗体断片またはポリペプチドの態様の一部では、抗原結合性部位は、DNABIIタンパク質と特異的に結合する。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)、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および8 pM未満または約1000ピコモル(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および8 pMである。

【0191】

本明細書で提供される抗体についての態様のうちの一部では、抗体断片または抗原結合性断片は、可溶性Fabである。別の態様では、ポリペプチドは、本明細書において開示される抗体の可溶性Fabまたは可溶性Fabの等価物を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0192】

本明細書で提供される抗体についての態様のうちの一部では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが由来する抗体は、ウサギ抗体である。本明細書で提供される抗体についての態様のうちの一部では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが由来する抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体である、またはヒトにおいて非免疫原性である。

【0193】

本明細書で提供される抗体についての態様のうちの一部では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが由来する抗体は、ヒト抗体のフレームワーク領域を含む(例えば、ヒト化抗体)。本明細書において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が由来する抗体の一部の態様では、抗体は、サル、ウマ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ヤギ、またはヒツジなど、非ヒト種に由来する抗体フレームワーク領域を含む。抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドが由来する抗体の一部の態様では、抗体は、キメラ抗体である。これらの態様のうちのいずれか1つまたは複数では、抗体は、本明細書で開

10

20

30

40

50

示されるCDR領域ならびにノまたは重鎖およびノもしくは軽鎖のうちの1つまたは複数をさらに含み得る。

【0194】

他の態様では、本明細書で提供される抗体のCDR内の、1つまたは複数の残基を、別のアミノ酸と置換する。置換は、同じアミノ酸ファミリー内の置換であるという意味で、「保存的」でありうる。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ることができ、保存的置換は、これらのファミリー内で生じるであろう。

1) 塩基性側鎖のあるアミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン。

2) 酸性側鎖のあるアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸。

3) 非電荷極性側鎖のあるアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン。

4) 非極性側鎖のあるアミノ酸：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。

【0195】

別の態様では、1つまたは複数の残基を、抗体の1つまたは複数のCDRに付加する、またはこれから欠失させる。このような付加または欠失は、CDRのN末端もしくはC末端またはCDR内の位置において生じる。

【0196】

抗体のCDRのアミノ酸配列を、アミノ酸の付加、欠失、または置換により変化させることにより、標的抗原に対する結合親和性の増加など、多様な効果を得ることができる。

【0197】

CDR配列のこのような変動を含む本開示の抗体もなお、DNA BIIタンパク質に、開示される抗体と同様の特異性および感受性プロファイルで結合することを認識されたい。これは、結合アッセイにより調べることができる。

【0198】

また、抗体の定常領域も変化させることができる。例えば、任意のアイソタイプ：IgA (IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、またはIgMのFc領域を伴う抗体を提供することができる。さらに、抗体の定常領域は、例えば、Iraniら(2015年)、Molecular Immunol. 67巻：171～182頁の教示に従い、具体的な治療適応に適合させることもできる。

【0199】

Iraniら(2015年)において言及されている通り、Fc操作は、強力で特異的な活性を伴い、したがって、投与量および潜在的な副作用の両方を低減する治療的抗体を開発するのに重要である。Fc操作では、IgGサブクラスにわたる差違についての理解が使用されており、研究は、1つのサブクラスに由来する特異的残基を、別のサブクラス導入することにより、他のエフェクター機能を保持しながら、ある特定のエフェクター機能を変換し得ることを示している(Armourら(1999年)、Eur. J. Immunol.、29巻：2613～2624頁；Armourら(2003年)、Mol. Immunol.、40巻：585～593頁；Hessellら(2007年)、Nature、449巻：101～104頁；Redpathら(1998年)、Hum. Immunol.、59巻：720～727頁；Vafaら(2014年)、Methods(San Diego, CA)、65巻：114～126頁)。これらのFc操作法は、感染性疾患の文脈において、特異的抗体のエフェクター機能が、病原体の効率的な除去において極めて重要なことが多いので、適切である。

【0200】

IgGサブクラスの構造的特性および機能的な特性は、異なる感染性疾患に対するそれらの応答プロファイルと同様に様々であり、これらの差違を、有効な治療用抗体の開発において活用することができる(Carter(2006年)、Nat. Rev. Immunol.、6巻：343～357頁；Jefferis(2012年)、Arch. Biochem. Biophys.、526巻：159～166頁)。重鎖は、IgGサブクラスにわたり、90%を超える配列同一性を共有するが(RispensおよびVidarsson(2014年)、Nimmerjahn、M.E.A.(編)、

10

20

30

40

50

9 章、Human IgG Subclasses、Academic Press. Boston、159～177頁）、定常（CH1、CH2、およびCH3）ドメイン上の、表面に露出された残基には差違があるほか、ヒンジ領域内でも、実質的な変動がある。安定性、可撓性、および2つのFabおよび随伴するFcが広がる（spanned）距離など、各IgGサブクラスに固有の特性の多くを付与するのは、ヒンジ構造である（LiuおよびMay（2012年）、mAbs、4巻：17～23頁；Rouxら（1997年）、J.Immunol.（Baltimore、MD：1950）、159巻：3372～3382頁；Tianら（2014年）、Pharm. Sci.、103巻：1701～1710頁）。IgGサブクラスの間で異なる、Fcおよびヒンジの一部の領域が、活性化および阻害性Fc受容体（FcR）の両方、IgGに対する胎児性受容体（neonatal receptor for IgG）（FcRn）、および補体成分C1qへの結合に関与することが公知の残基と明らかに重複することは重要なことである。これらのエフェクター分子の結合性部位内の、鍵となるアミノ酸の差違の発生は、IgGサブクラスのエフェクター特性において観察される差違を説明する一助となる。この構造的情報および分子的情報は、治療用抗体のサブクラス骨格を選び出す場合、または具体的目的で、抗体を調整するように、鍵となるアミノ酸の変化を導入する場合に重要である。

#### 【0201】

定常領域配列の非限定的な例は以下を含む：

ヒトIgD定常領域、Uniprot：P01880 配列番号34：

```
A P T K A P D V F P I I S G C R H P K D N S P V V L A C L I T G Y H P T S V T V
T W Y M G T Q S Q P Q R T F P E I Q R R D S Y Y M T S S Q L S T P L Q Q W R Q G
E Y K C V V Q H T A S K S K K E I F R W P E S P K A Q A S S V P T A Q P Q A E G
S L A K A T T A P A T T R N T G R G G E E K K K E K E K E E Q E E R E T K T P E
C P S H T Q P L G V Y L L T P A V Q D L W L R D K A T F T C F V V G S D L K D A
H L T W E V A G K V P T G G V E E G L L E R H S N G S Q S Q H S R L T L P R S L
W N A G T S V T C T L N H P S L P P Q R L M A L R E P A A Q A P V K L S L N L L
A S S D P P E A A S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q R E V N T S G F
A P A R P P P Q P G S T T F W A W S V L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S H E
D S R T L L N A S R S L E V S Y V T D H G P M K .
```

ヒトIgG1定常領域、Uniprot：P01857 配列番号35：

```
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K .
```

ヒトIgG2定常領域、Uniprot：P01859 配列番号36：

```
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K .
```

ヒトIgG3定常領域、Uniprot：P01860 配列番号37：

```
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
```



WNSGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C  
D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P  
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H  
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T  
L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N  
Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E  
A L H N R F T Q K S L S L S P G K .

ヒトIgM定常領域、UniProt: P01871 配列番号38:

G S A S A P T L F P L V S C E N S P S D T S S V A V G C L A Q D F L P D S I T L  
S W K Y K N N S D I S S T R G F P S V L R G G K Y A A T S Q V L L P S K D V M Q  
G T D E H V V C K V Q H P N G N K E K N V P L P V I A E L P P K V S V F V P P R  
D G F F G N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S G V T  
T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K E S D W L G Q S M F T C R V D  
H R G L T F Q Q N A S S M C V P D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T  
K L T C L V T D L T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A  
T F S A V G E A S I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R  
P K G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D  
V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V  
S E E E W N T G E T Y T C V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V  
S L V M S D T A G T C Y .

ヒトIgG4定常領域、UniProt: P01861 配列番号39:

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T  
Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V  
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D  
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K  
C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K  
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S  
D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S  
L S L S L G K .

ヒトIgA1定常領域、UniProt: P01876 配列番号40:

A S P T S P K V F P L S L C S T Q P D G N V V I A C L V Q G F F P Q E P L S V T  
W S E S G Q G V T A R N F P P S Q D A S G D L Y T T S S Q L T L P A T Q C L A G  
K S V T C H V K H Y T N P S Q D V T V P C P V P S T P P T P S P S T P P T P S P  
S C C H P R L S L H R P A L E D L L L G S E A N L T C T L T G L R D A S G V T F  
T W T P S S G K S A V Q G P P E R D L C G C Y S V S S V L P G C A E P W N H G K  
T F T C T A A Y P E S K T P L T A T L S K S G N T F R P E V H L L P P P S E E L  
A L N E L V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A  
S R Q E P S Q G T T T F A V T S I L R V A A E D W K K G D T F S C M V G H E A L  
P L A F T Q K T I D R L A G K P T H V N V S V V M A E V D G T C Y .

ヒトIgA2定常領域、UniProt: P01877 配列番号41:

A S P T S P K V F P L S L D S T P Q D G N V V V A C L V Q G F F P Q E P L S V T  
W S E S G Q N V T A R N F P P S Q D A S G D L Y T T S S Q L T L P A T Q C P D G  
K S V T C H V K H Y T N P S Q D V T V P C P V P P P P P C C H P R L S L H R P A  
L E D L L L G S E A N L T C T L T G L R D A S G A T F T W T P S S G K S A V Q G  
P P E R D L C G C Y S V S S V L P G C A Q P W N H G E T F T C T A A H P E L K T  
P L T A N I T K S G N T F R P E V H L L P P P S E E L A L N E L V T L T C L A R  
G F S P K D V L V R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R Q E P S Q G T T T F A

10

20

30

40

50

V T S I L R V A A E D W K K G D T F S C M V G H E A L P L A F T Q K T I D R M A  
G K P T H V N V S V V M A E V D G T C Y .

ヒトIgC $\alpha$ 1定常領域、Uniprot: P01834 配列番号42:

T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W  
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K  
H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C .

【0202】

一部の実施形態では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、Ih f A断片A5（配列番号13）に対して特異的な抗体に由来し、IgG2などであるがこれらに限定されない（ある特定の態様では、IgG2aである）IgMまたはIgGに由来する定常領域を含む。親抗体が、モノクローナル抗体である場合、例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4などのIgG、IgM、IgA1およびIgA2などのIgA、IgD、ならびにIgEを含むがこれらに限定されず、IgGおよびIgMを含むことが好ましい場合がある。モノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスは、例えば、オクタロニー試験、ELISA、またはラジオイムノアッセイ（本明細書の以下では、「RIA」と称する）により決定することができる。同定のための市販のキット（例えば、Mouse Typer Kit; Bio-Rad Laboratories, Inc.、およびRAT MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST KIT: AbD Serotec）を使用することができる。

【0203】

一部の実施形態では、抗体断片、抗原結合性断片またはポリペプチドは、Ih f B断片であるmB4（配列番号17）に特異的な抗体またはその等価物に由来し、IgG1などであるがこれらに限定されないIgGに由来する定常領域を含む。

【0204】

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は、以下の抗体：（i）ハイブリドーマ細胞株Ih f A5 NTHI 14G8.F5.G6により産生された抗体、（ii）ハイブリドーマ細胞株Ih f B4 NTHI 4E11.E5.G2により産生された抗体、および（iii）ハイブリドーマ細胞株mIh f B4 NTHI 12E6.F8.D12.D5により産生された抗体またはそれらのそれぞれの等価物のうちの任意の1つの重鎖定常領域配列と、少なくとも80%同一な、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%、または代替的に少なくとも100%同一な重鎖定常領域を含む抗体に由来する。

【0205】

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は、以下の親抗体：（i）ハイブリドーマ細胞株Ih f A5 NTHI 14G8.F5.G6により産生された抗体、（ii）ハイブリドーマ細胞株Ih f B4 NTHI 4E11.E5.G2により産生された抗体、および（iii）ハイブリドーマ細胞株mIh f B4 NTHI 12E6.F8.D12.D5により産生された抗体またはそれらのそれぞれの等価物のうちの任意の1つの軽鎖定常領域配列と、少なくとも80%同一の、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%、または代替的に少なくとも100%同一な軽鎖定常領域を含む抗体に由来する。

【0206】

本明細書で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由来の抗体についての一部の態様では、親抗体またはFab（断片抗原結合）断片は、DNABII抗体が結合するエピトープに結合する。

【0207】

本明細書で提供される親抗体についての一部の態様では、抗体断片は、迅速な結合ならびに細胞への取込みおよび/または緩徐放出を容易にする構造的修飾を含有する。

【0208】

抗体断片、抗原結合性断片およびポリペプチドおよびそれらの等価物を、検出可能な標

10

20

30

40

50

識または精製標識および／またはキャリア、例えば、薬学的に許容されるキャリアまたは他の作用剤と組み合わせて、使用および／または貯蔵のための製剤をもたらすことができる。

抗体産生のための方法

【0209】

当技術分野では、抗体の一般的構造が、公知であり、ここでは、簡単にまとめるにとどめる。免疫グロブリンの単量体は、ジスルフィド結合により接続された、2つの重鎖と、2つの軽鎖とを含む。各重鎖を、ジスルフィド結合を介してそれを直接結合させる軽鎖のうちの1つと対合させる。各重鎖は、定常領域（抗体のアイソタイプに応じて変動する）と、可変領域とを含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3と表記され、フレームワーク領域内で支持されている、3つの超可変領域（または相補性決定領域）を含む。各軽鎖は、定常領域と、可変領域とを含み、可変領域は、重鎖の可変領域と同様に、フレームワーク領域により支持されている、3つの超可変領域（CDRL1、CDRL2、およびCDRL3と表記される）を含む。

10

【0210】

重鎖と軽鎖との各対の超可変領域は、相互に協同して、標的抗原に結合することが可能な抗原結合性部位をもたらす。重鎖と軽鎖との対の結合特異性は、重鎖および軽鎖の、CDR1、CDR2、およびCDR3の配列により規定される。したがって、特定の結合特異性をもたらす、CDR配列のセット（すなわち、重鎖および軽鎖の、CDR1、CDR2、およびCDR3の配列）を決定したら、同じ抗原結合特異性を伴う異なる抗体をもたらすために、原則として、CDR配列のセットを、任意の抗体の定常領域と連結された、他の任意の抗体フレームワーク領域内の、適切な位置に挿入することができる。

20

【0211】

Fab断片の産生のための抗体は、当技術分野で公知の、文献において十分に記載されている従来技術を使用して作製することができる。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存在する。例えば、ポリクローナル抗体は、通常、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適した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すると、これが、Bリンパ球を誘導して、この抗原に特異的な免疫グロブリンを産生させる。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製することができる。IHFサブユニットおよび／またはIHFサブユニットに特異的な抗体は、IHFおよびIHFの異なるエピトープに対応するポリペプチドを注射することにより生成させることができる。例えば、IHFには、配列番号12および13（それぞれ、IHFの断片A3およびA5）、HUには、配列番号14（HUの断片A5）、IHFには、配列番号15から17まで（IHFの断片B2、B4、およびmB4）など、各サブユニットの20アミノ酸を使用して、抗体を生成させることができる。

30

【0212】

この方法の変化形には、産生を最適化し、動物を人道的に取り扱うための、アジュバント、投与経路および投与部位、部位1カ所当たりの注射容量および動物1匹当たりの部位数の改変が含まれる。例えば、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために、アジュバントを用いることが典型的である。大半のアジュバントは、注射部位における抗原貯留をもたらし、それにより、抗原の排出リンパ節内への緩徐な（slow）放出が可能となる。他のアジュバントには、タンパク質抗原分子の濃縮を広大な表面積にわたり促進する界面活性剤、および免疫賦活性分子が含まれる。ポリクローナル抗体を生成させるためのアジュバントの非限定的な例は、フロイントアジュバント、Ribiアジュバント系、MPLに由来するアジュバント、E.coliの易熱性エンテロトキシン（例えば、dmLT＝二重変異体不安定毒素）に由来するアジュバント、およびTitertmaxを含む。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用いて産生することができ、それらのうちの一部は、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

40

50

第 6 , 3 2 2 , 7 8 8 号 ; 同第 5 , 6 8 6 , 0 7 3 号 ; および同第 5 , 6 7 0 , 1 5 3 号  
において説明されている。

【 0 2 1 3 】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来のハイブリドーマ法を用いて産生することができる。例えば、ハイブリドーマは、適切な不死細胞株（例えば、Sp2/0細胞、Sp2/0-AG14細胞、NSO細胞、NS1細胞、NS2細胞、AE-1細胞、L.5細胞、P3X63Ag8,653細胞、Sp2SA3細胞、Sp2MAI細胞、Sp2SS1細胞、Sp2SA5細胞、U397細胞、MIA144細胞、ACTIV細胞、MOLT4細胞、DA-1細胞、JURKAT細胞、WEHI細胞、K-562細胞、COS細胞、RAJI細胞、NIH313細胞、HL-60細胞、MLA144細胞、NAMAIWA細胞、NEURO2A細胞、CHO細胞、PerC.6細胞、YB2/O細胞などであるがそれらに限定されない骨髓腫細胞株）など、あるいはヘテロ骨髓腫、これらの融合産生物、またはそれらに由来する任意の細胞もしくは融合細胞、あるいは当技術分野において公知の他の任意の適切な細胞株（以下のウェブアドレス、例えば、2007年11月26日に最終アクセスされたatcc.org、lifetech.comにおける細胞株を参照されたい）を、単離されたか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、げっ歯類、ウマ、ヒツジ（ovine）、ヤギ、ヒツジ（sheep）、霊長類、真核生物のゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAもしくはミトコンドリアRNA、クロロプラストDNAもしくはクロロプラストRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本鎖核酸、二本鎖核酸、または三本鎖核酸、ハイブリダイズした核酸など、あるいはそれらの任意の組合せの核酸としての内因性核酸または異種核酸としての、重鎖定常配列もしくは重鎖可変配列もしくは重鎖フレームワーク配列もしくは重鎖CDR配列または軽鎖定常配列もしくは軽鎖可変配列もしくは軽鎖フレームワーク配列もしくは軽鎖CDR配列を発現する他の任意の細胞などであるがそれらに限定されない抗体産生細胞と融合させることにより産生する。抗体産生細胞はまた、目的の抗原で免疫化したヒトまたは他の適切な動物の末梢血、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。また、他の任意の適切な宿主細胞も、本開示の抗体、指定された断片、またはそれらの改変体をコードする異種核酸または内因性核酸を発現させるのに用いることができる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択培養条件または他の適切な公知の方法を用いて単離することができ、限界希釈法、もしくは細胞分取法、または他の公知の方法を介してクローニングすることができる。本明細書で開示される一部の実施形態は、IHF断片に対するモノクローナル抗体を産生する特異的ハイブリドーマに関し、非限定的な例は、Ih f A 5 N T H I 1 4 G 8 . F 5 . G 6 ( A T C C 番号 : P T A - 1 2 2 3 3 4 )、I h f B 4 N T H I 4 E 1 1 . E 5 . G 2 ( A T C C 番号 : P T A - 1 2 2 3 3 6 )、m I h f B 4 N T H I 1 2 E 6 . F 8 . D 1 2 . D 5 ( A T C C 番号 : P T A - 1 2 2 3 3 5 )を含む。

【 0 2 1 4 】

ペプチドライブラリーまたはタンパク質ライブラリー（例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリー、リボソームディスプレイライブラリー、オリゴヌクレオチドディスプレイライブラリー、cDNAディスプレイライブラリーなどであるがそれらに限定されないライブラリー；例えば、当技術分野において公知の方法を用いる、MorphoSys (Martinsreid / Planegg, Del.), BioInvent (Lund, Sweden), Affitech (Oslo, Norway) など、各販売元から市販されているライブラリー) から組換え抗体を選択する方法が含まれるがそれらに限定されない、必須の特異性を有する抗体を産生または単離する他の適切な方法を用いることができる。当技術分野で公知の方法は、特許文献において説明されており、それらのうちの一部には、米国特許第 4 , 7 0 4 , 6 9 2 号 ; 同第 5 , 7 2 3 , 3 2 3 号 ; 同第

10

20

30

40

50

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号が含まれる。代替的な方法は、トランスジェニック動物(例えば、SCIDマウス; Nguyenら(1977年)、Microbiol. Immunol., 41巻: 901~907頁(1997年); Sandhuら(1996年)、Crit. Rev. Biotechnol., 16巻: 95~118頁; Erenら(1998年)、Mumma, 93巻: 154~161頁の免疫化に依存し、それにより、当技術分野において公知であり、かつ/または本明細書でも説明されるヒト抗体のレパートリーを産生することが可能である。このような技法には、リボソームディスプレイ(例えば、Wanesら(1997年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94巻: 4937~4942頁; Hanesら(1998年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95巻: 14130~14135頁)、単一細胞による抗体産生法(例えば、選択リンパ球抗体法(「SLAM」)(米国特許第5, 627, 052号、Wenら(1987年)、J. Immunol., 17巻: 887~892頁; Babcookら(1996年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93巻: 7843~7848頁)、ゲルマイクロ液滴およびフローサイトメトリー(Powellら(1990年)、Biotechnol., 8巻: 333~337頁; One Cell Systems (Cambridge, Mass); Grayら(1995年)、J. Imm. Meth., 182巻: 155~163頁; ならびにKennyら(1995年)、Bio. Technol., 13巻: 787~790頁)、B細胞選択(Steenbakkersら(1994年)、Molec. Biol. Reports, 19巻: 125~134頁)が含まれるがそれらに限定されない。さらなる方法は、当技術分野で公知の技術を使用するヒト血清からのヒト抗体の単離に依拠する、米国特許第7, 939, 344号を参照されたい。

#### 【0215】

抗体はまた、リンパ球集団における*in vivo*の産生を誘導することにより産生することもでき、組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合性試薬のパネルをスクリーニングすることにより生成することもできる(Orlandiら(1989年)、PNAS, 86巻: 3833~3837頁; Winterら(1991年)、Nature, 349巻: 293~299頁)。

#### 【0216】

代替的に、単鎖抗体を産生するための技法も使用することができる。単鎖抗体(s c F<sub>v</sub>)は、リンカーペプチド(約5から25アミノ酸までの長さであることが典型的である)により接続された、重鎖可変領域と、軽鎖可変領域とを含む。s c F<sub>v</sub>内では、重鎖および軽鎖の可変領域は、同じ抗体に由来する場合もあり、異なる抗体に由来する場合もある。s c F<sub>v</sub>は、組換え技術を使用して、例えば、E. coliなどの宿主生物において、s c F<sub>v</sub>をコードするベクターの発現により合成することができる。s c F<sub>v</sub>をコードするDNAは、鋳型として、上記で言及された抗体の重鎖または重鎖の可変領域をコードするDNAと、その軽鎖または軽鎖の可変領域をコードするDNAとから選択されるDNAのうち、アミノ酸配列の全体または所望のアミノ酸配列をコードする部分DNAを使用して、その両方の末端を規定するプライマー対を使用するPCRによる増幅を実施し、ポリペプチドリンカー部分をコードするDNAと、その両方の末端を規定するプライマー対とを組み合わせる増幅をさらに実施して、該リンカーの両方の末端を該重鎖および該軽鎖のそれぞれにライゲートすることにより得ることができる。s c F<sub>v</sub>をコードするDNAを含有する発現ベクターと、発現ベクターで形質転換された宿主は、当技術分野で公知の従来の方法に従い得ることができる。

#### 【0217】

抗原結合性断片、例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片は、抗体分子のペプシン消化により生成させることができ、Fab断片はF(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成させることができる。Fab断片、特に、マウスモノクローナル抗体から生成されたマウスFab断片も、システインの存在下での抗体のチオールプロテアーゼフィシンを

10

20

30

40

50

用いる消化によって生成させることができる。F a b 断片、特に、ウサギポリクローナル抗体から生成されたウサギF a b 断片もまた、システイン - H C l の存在下での抗体のプロテアーゼパインを用いる消化によって生成させることができる。代替的に、F a b 発現ライブラリーを構築して所望の特異性を伴うモノクローナルF a b 断片の迅速かつ容易な同定を可能とすることができる (Huseら ( 1 9 8 9 年 )、Science、2 5 6 巻 : 1 2 7 5 ~ 1 2 8 1 頁 )。断片を生成すると、従来技術を使用して断片を単離し、シーケンシングでき、アミノ酸配列が決定される。

#### 【 0 2 1 8 】

本開示の抗体誘導体はまた、本明細書に開示されるとおりの抗体断片、抗原結合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、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど、これらのミルク中にこのような抗体を産生するトランスジェニック動物またはトランスジェニック哺乳動物を提供するように、適切な宿主に送達することにより調製することもできる。当技術分野ではこれらの方法が公知であり、例えば、米国特許第 5 , 8 2 7 , 6 9 0 号 ; 同第 5 , 8 4 9 , 9 9 2 号 ; 同第 4 , 8 7 3 , 3 1 6 号 ; 同第 5 , 8 4 9 , 9 9 2 号 ; 同第 5 , 9 9 4 , 6 1 6 号 ; 同第 5 , 5 6 5 , 3 6 2 号 ; および同第 5 , 3 0 4 , 4 8 9 号において説明されている。

#### 【 0 2 1 9 】

「抗体誘導体」という用語は、抗体または断片の直鎖状ポリペプチド配列に対する翻訳後修飾を包含する。例えば、米国特許第 6 , 6 0 2 , 6 8 4 B 1 号は、免疫グロブリンの F c 領域と等価の領域を包含し、F e を介する細胞傷害作用が増強されている全抗体分子、抗体断片、または融合タンパク質を含めた抗体の修飾グリコール形態を産生する方法、およびこのようにして産生された糖タンパク質について説明している。

#### 【 0 2 2 0 】

本明細書で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由来の親抗体はまた、任意の種類の分子を抗体に共有結合させることにより修飾した誘導体を含み、それにより、抗体が抗イディオタイプ応答を引き起こすことを共有結合が妨げることはない。抗体誘導体には、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 / 遮断基 ( p r o t e c t i n g / b l o c k i n g g r o u p ) を介する誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞内リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾されている抗体が含まれるがそれらに限定されない。本明細書で想定される修飾抗体の非限定的な例は、グリコシル化されていない、全抗体分子、抗体断片、または免疫グロブリンの F c 領域と等価な領域を含む融合タンパク質である。このような非グリコシル化形態は、例えば、タンパク質を、N 結合型グリカンで修飾する能力を欠く宿主細胞内で生成させることもでき、目的の抗体上の、N 結合型コンセンサス部位を変異させることにより生成させることもできる。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得る。

#### 【 0 2 2 1 】

親抗体の抗体誘導体はまた、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを送達して、このような抗体、指定された部分、または改変体を、植物部分またはそれらに由来して培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物および培養植物細胞 ( 例えば、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサであるがこれらに限定されない ) を作製することにより調製することもできる。例えば、C r a m e r ら ( 1 9 9 9 年 )、C u r r . T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o l .、2 4 0 巻 : 9 5 ~ 1 1 8 頁、およびこの文献において引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを用いる、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のタバコ葉の産生について説明している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系で産生されたまたは天然の供給源から精製された哺乳動物タンパク質と等価の生物学的活性を伴う哺乳動物タンパク質を、商業的生産レベルで発現させるのに用いられている。例えば、H o o d ら ( 1 9 9 9 年 )、A d v . E x p . M e d . B i o l .、4 6 4 巻 : 1 2 7 ~ 1 4 7 頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。抗体誘導体はまた、タバコの種子および馬鈴薯の塊

10

20

30

40

50

茎を含め、単鎖抗体 ( s c F v ) などの抗体断片を包含するトランスジェニック植物の種子からも大量に産生されている。例えば、Conradら ( 1998 年 )、Plant Mol. Biol.、38 巻 : 101 ~ 109 頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。したがって、抗体はまた、公知の方法に従いトランスジェニック植物を用いても産生することができる。

#### 【 0 2 2 2 】

親抗体の抗体誘導体はまた、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を修飾する、または結合、親和性、オン速度、オフ速度、アビディティ、特異性、半減期、もしくは他の任意の適切な特徴を低減、増強、もしくは修飾することにより産生することもできる。一般に、可変領域および定常領域の非ヒト配列をヒトアミノ酸または他のアミノ酸で置換しながら、非ヒト C D R 配列またはヒト C D R 配列のうちの一部または全部を維持する。

10

#### 【 0 2 2 3 】

抗体のヒト化または操作は、米国特許第 5 , 7 2 3 , 3 2 3 号 ; 同第 5 , 9 7 6 , 8 6 2 号 ; 同第 5 , 8 2 4 , 5 1 4 号 ; 同第 5 , 8 1 7 , 4 8 3 号 ; 同第 5 , 8 1 4 , 4 7 6 号 ; 同第 5 , 7 6 3 , 1 9 2 号 ; 同第 5 , 7 2 3 , 3 2 3 号 ; 同第 5 , 7 6 6 , 8 8 6 号 ; 同第 5 , 7 1 4 , 3 5 2 号 ; 同第 6 , 2 0 4 , 0 2 3 号 ; 同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号 ; 同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号 ; 同第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号 ; 同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号 ; 同第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ; および同第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号において説明されている方法などであるがそれらに限定されない任意の公知の方法を用いて実施することができる。

#### 【 0 2 2 4 】

本明細書において記載されるように検出可能な標識または精製標識をさらに含む、本明細書で開示される F a b 断片または抗原結合性断片またはポリペプチドを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなお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。

20

#### 【 0 2 2 5 】

本開示の抗体断片、抗原結合性断片もしくはポリペプチドの、キメラ親抗体、ヒト化親抗体、または霊長類化親抗体は、標準的な分子生物学の技法を用いて調製される基準のモノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。このような抗体を使用して、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 ) を生成してもよい。

#### 【 0 2 2 6 】

重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする D N A は、目的のハイブリドーマから得、標準的な分子生物学の技法を用いて、基準以外の ( 例えば、ヒトの ) 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、キメラ抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法 ( 米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 ) を用いて、マウス可変領域を、ヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法 ( 米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号、ならびに米国特許第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号 ; 同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号 ; 同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号 ; および同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号 ) を用いて、マウス C D R 領域を、ヒトフレームワーク内に挿入することができる。同様に、霊長類化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法 ( P C T 国際特許出願公開番号 W O 9 3 / 0 2 1 0 8 および W O 9 9 / 5 5 3 6 9 ) を用いて、マウス C D R 領域を、霊長類フレームワーク内に挿入することができる。

30

40

#### 【 0 2 2 7 】

当技術分野では、部分ヒト抗体 ~ 完全ヒト抗体を作製する技法が公知であり、任意のこのような技法を用いることができる。一実施形態によれば、トランスジェニックマウスにおいて完全ヒト抗体配列を作製し、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現させるように操作する。異なるクラスの抗体を産生させ得る、複数のこのようなトランスジェニックマウス系統が作製されている。所望の抗体を産生しているトランスジェニックマウスに由来する B 細胞を融合させて、所望の抗体を持続的に産生するためのハイブリドーマ細胞株を作製することができる ( 例えば、Russellら ( 2000 年 )、Infection and Immunity、2000 年 4 月 : 1820 ~ 1826 頁 ; Gal

50

lorā (2000年)、European J. of Immun., 30巻: 534 ~ 540頁; Green (1999年)、J. of Immun. Methods、231巻: 11 ~ 23頁; Yangら (1999年A)、J. of Leukocyte Biology、66巻: 401 ~ 410頁; Yang (1999年B)、Cancer Research、59巻(6号): 1236 ~ 1243頁; Jakobovits (1998年)、Advanced Drug Reviews、31巻: 33 ~ 42頁; GreenおよびJakobovits (1998年)、J. Exp. Med., 188巻(3号): 483 ~ 495頁; Jakobovits (1998年)、Exp. Opin. Invest. Drugs、7巻(4号): 607 ~ 614頁; Tsudaら (1997年)、Genomics、42巻: 413 ~ 421頁; Sherman-Gold (1997年)、Genetic Engineering News、17巻(14号); Mendezら (1997年)、Nature Genetics、15巻: 146 ~ 156頁; Jakobovits (1996年)、「Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System」、IV巻、194.1 ~ 194.7頁; Jakobovits (1995年)、Current Opinion in Biotechnology、6巻: 561 ~ 566頁; Mendezら (1995年)、Genomics、26巻: 294 ~ 307頁; Jakobovits (1994年)、Current Biology、4巻(8号): 761 ~ 763頁; Arbonesら (1994年)、Immunity、1巻(4号): 247 ~ 260頁; Jakobovits (1993年)、Nature、362巻(6417号): 255 ~ 258頁; Jakobovitsら (1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻(6号): 2551 ~ 2555頁; および米国特許第6,075,181号を参照されたい。

#### 【0228】

本明細書に開示される抗体はまた、キメラ抗体を創出するように修飾することもできる。キメラ抗体とは、抗体の重鎖および軽鎖の多様なドメインが、複数の種に由来するDNAによりコードされる抗体である。例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。

#### 【0229】

代替的に、本明細書に開示される抗体はまた、ベニア化抗体を創出するように修飾することもできる。ベニア化抗体とは、第1の種の抗体が、第2の種において免疫原性とならず、それにより、この抗体の免疫原性を低減するように、1つの種の抗体の外部のアミノ酸残基を、第2の種の外部のアミノ酸残基で慎重に置換または「ベニア化」された抗体である。タンパク質の免疫原性は、主に、その表面の性質に依存するので、別の哺乳動物種の抗体中に通常見いだされる残基とは異なる露出残基を置換することによれば、抗体の免疫原性を低減し得るであろう。このように外部残基を慎重に置換すれば、内部ドメインまたはドメイン間の接触にはほとんどまたは全く影響が及ばないはずである。したがって、可変領域のフレームワーク残基に限定される変更の結果として、リガンドの結合特性に影響が及ぶことはないはずである。変更するのは抗体の外表面またはスキン(skin)だけであり、支持残基は攪乱されずに維持されるので、この工程を、「ベニア化」と称する。

#### 【0230】

「ベニア化」の手順は、Kabatra (1987年)、「Sequences of Proteins of Immunological interest」、4版、Bethesda, Md., National Institutes of Healthにより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な配列データ、このデータベースに対する更新、ならびに米国および海外の他のアクセス可能なデータベース(核酸およびタンパク質両方のデータベース)を活用する。ベニア化抗体を産生するのに用いられる方法の非限定的な例には、EP519596、米国特許第6,797,492号が含まれ、Padlanら (1991年)、Mol. Immunol., 28巻(4~5号): 489 ~ 498頁においても説明されている。



## 【 0 2 3 1 】

本明細書に開示されるとおりの抗体断片、抗原結合断片およびポリペプチドは、プロテインA精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィー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、親和性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が含まれるがそれらに限定されない公知の方法により、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。精製にはまた、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）も用いることができる。

## 【 0 2 3 2 】

本開示の抗体断片、抗原結合断片または の調製のための抗体には、天然の精製産生物、化学合成手順の産生物、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めた真核生物宿主に由来する組換え法、または、代替的に、上記で説明した原核生物宿主に由来する組換え法を介して産生される産生物が含まれる。BirchおよびRadner（2006年）、Adv. Drug Delivery Rev.、58巻：671～685頁では、多くの抗体産生系が説明されている。

## 【 0 2 3 3 】

被験抗体断片が、タンパク質またはポリペプチドと結合すれば、被験抗体断片と本開示により提供される（sprovided）抗体断片とは等価である。また、本開示の抗体断片が、抗体断片が通常反応性であるタンパク質またはポリペプチドに結合することを、被験抗体が妨げるかどうかを決定することにより、ある抗体断片が、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、過度の実験なしに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低下により示される通り、被験抗体断片が、本明細書に開示される抗体断片と競合する場合は、2つの抗体断片が、同じエピトープまたは近縁のエピトープに結合する可能性がある。代替的に、本明細書に開示される抗体断片を、それが通常反応性であるタンパク質と共にプレインキュベートして、被験抗体断片が、抗原に結合するその能力を阻害されるかどうかを決定することができる。被験抗体断片が阻害されれば、この抗体は、ほぼ確実に、本明細書に開示される抗体断片と同じエピトープ特異性または近縁のエピトープ特異性を有する。

## 【 0 2 3 4 】

「抗体」および「抗体断片」という用語はまた、全ての免疫グロブリンアイソタイプおよび免疫グロブリンサブクラスの抗体を包含することも意図する。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、最初の融合体から選択することにより直接調製することもでき、Steplewskiら（1985年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻：8653頁、またはSpiraら（1984年）、J. Immunol. Methods、74巻：307頁において説明されている手順を用いてクラススイッチ改変体を単離するためのsib選択法を用いることにより、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することもできる。代替的に、組換えDNA法も用いることができる。

## 【 0 2 3 5 】

また、本明細書で説明されるモノクローナル抗体の特異性を伴う抗体断片、抗原結合断片およびポリペプチドを作製する際に使用するための他のモノクローナル抗体の単離も、抗イディオタイプ抗体を産生することを介して、当業者により達成され得る（Herlynら（1986年）、Science、232巻：100頁）。抗イディオタイプ抗体とは、目的のモノクローナル抗体において存在する固有の決定基を認識する抗体である。

## 【 0 2 3 6 】

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。適切な標識については、本明細書に記載されている。当技術分野では、抗体およびポリペプチドを、これらの作用剤とコンジュゲートする方法が公知である。例示だけを目的として述べると、例えば、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどの検出可能な部分で抗体断片、抗原結合性断片または

10

20

30

40

50

ポリペプチドを標識することができる。このような標識抗体は、*in vivo*または単離された被験試料のいずれかにおける診断技法に用いることができる。

【0237】

抗体、断片およびポリペプチドを、低分子量のハプテンにカップリングすることにより、アッセイにおける抗体断片またはポリペプチドの感度を増大させることができる。次いで、第2の反応により、ハプテンを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、または特定の抗ハプテン抗体と反応し得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用いることが一般的である。HarlowおよびLane (1988年)、前出を参照されたい。

【0238】

VH CDR 1領域および/もしくはVL CDR 1領域、VH CDR 2領域および/もしくはVL CDR 2領域、ならびに/またはVH CDR 3領域および/もしくはVL CDR 3領域内のアミノ酸残基を変異させて、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り、本開示の親抗体の可変領域を修飾することができる。変異は、部位指向性変異誘発またはPCR媒介変異誘発を介して導入することができ、抗体の結合または目的の他の機能的特性に対する効果は、適切な*in vitro*アッセイまたは*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、保存的修飾を導入し、典型的にCDR領域内の1、2、3、4、または5つ以下の残基を変化させる。変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失であり得る。

【0239】

例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列の配列へと「復帰変異」させることにより、抗体にフレームワーク修飾を施し、免疫原性を低下させることができる。

【0240】

加えて、本明細書に開示される抗体断片、抗原結合断片またはポリペプチドを操作して、Fc領域内に、血清半減期(*serum half-life*)、補体の結合、Fc受容体の結合、および/または抗原依存性細胞傷害作用など、抗体の1つまたは複数の機能的特性を変化させる修飾を包含させることもできる。このような修飾には、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にする、または抗体の安定性を増大させる、もしくは減少させる、ヒンジ領域におけるシステイン残基数の変化(米国特許第5,677,425号)、ならびに抗体の生物学的半減期を短縮する、Fcヒンジ領域におけるアミノ酸の変異(米国特許第6,165,745号)が含まれるがそれらに限定されない。

【0241】

加えて、本明細書に開示される抗体断片は、化学修飾することもできる。例えば、抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を修飾して、抗原に対する抗体の親和性を増大させることにより、抗体のグリコシル化を変化させることができる(米国特許第5,714,350号;および同第6,350,861号)。代替的に、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用を増大させるには、グリコシル化機構を変化させた宿主細胞内で抗体を発現させることにより、フコシル残基の量を低減した低フコシル化抗体、またはバイセクティングGlcNAc構造を増大させた抗体を得ることもできる(Shieldsら、(2002年)、J. Biol. Chem.、277巻:26733~26740頁;Umañaら、1999年、Nat. Biotech.、17巻:176~180頁)。

【0242】

本明細書に開示される抗体またはその断片を、1つまたは複数のポリエチレングリコール(PEG)基がこの抗体または抗体断片に結合する条件下で、PEGまたはPEGの反応性エステルもしくはPEGのアルデヒド誘導体と反応させることにより、これらの抗体断片、抗原結合断片またはポリペプチドをペグ化して、生物学的半減期を延長することができる。ペグ化は、反応性のPEG分子(または類似する反応性の水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施することができる。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(C1~C10)アルコキシポリエチ

10

20

30

40

50

レングリコールもしくはアリア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、他のタンパク質を誘導体化するのに用いられている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、非グリコシル化抗体であり得る。当技術分野では、タンパク質をペグ化する方法が公知であり、本明細書に開示される抗体に適用することができる（EP0154316およびEP0401384）。

#### 【0243】

加えて、抗原結合領域を、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質とコンジュゲートする、または融合させることにより、抗体結合断片、抗原結合断片またはポリペプチドを化学修飾して、結果として得られる分子の半減期を延長することもできる。このような手法は、例えば、EP0322094およびEP0486525において説明されている。

10

#### 【0244】

本明細書に開示されるとおりの抗体断片、抗原結合断片またはポリペプチドを、診断薬とコンジュゲートして診断に用い、例えば、疾患の発症または増悪をモニタリングし、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。診断薬の例には、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、各種の陽電子放射トモグラフィーを用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、抗体またはその断片に直接的にカップリングまたはコンジュゲートすることもでき、当技術分野で公知の技法を用いるリンカーを介して、抗体またはその断片に間接的に連結またはコンジュゲートすることもできる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-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含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光材料の例には、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、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれる。発光材料の例には、ルミノールが含まれる。生物発光材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。適切な放射性材料の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、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が含まれる。モノクローナル抗体は、これらの抗体に共有結合する二官能性のキレート化剤を用いることにより、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートすることができる。キレート化剤は、アミン(amities)(Mearesら、(1984年)Anal. Biochem.、142巻:68~78頁)、アミノ酸残基のスルフィドラル基(Koyama(1994年)Chem. Abstr.、120巻:217262t)、および炭水化物基(Rodwellら、(1986年)、PNAS USA、83巻:2632~2636頁; Quadriら、(1993年)、Nucl. Med. Biol.、20巻:559~570頁)を介して結合させることができる。

20

30

40

#### 【0245】

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、治療薬とコンジュゲートすることもできる。適切な治療薬には、抗生物質または例えば、抗微生物薬、または宿主防御ペプチド(例えば、特異的にターゲティングされた抗微生物ペプチド(STAMP))が含まれる。

#### 【0246】

追加的な適切なコンジュゲートされた分子には、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)、DNアーゼ、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

50

、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が含まれる。アプタマーとは、ステムループまたはGカルテットなど、規定の二次構造および三次構造へとフォールディングされる、15～50塩基の範囲の長さの小型核酸であり、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）などの小分子のほか、逆転写酵素（米国特許第5,786,462号）およびトロンピン（米国特許第5,543,293号）などの大型分子にも結合し得る。リボザイムとは、化学反応を分子内的にまたは分子間的に触媒することが可能な核酸分子である。リボザイムは、その後に切断される標的基質を認識し、それに結合することにより、核酸基質を切断することが典型的である。三重鎖形成機能を有する核酸分子は、三重鎖を形成することにより二本鎖核酸と相互作用する場合もあり、一本鎖核酸と相互作用する場合もあり、この場合、DNAの三本鎖は、ワトソン-クリックによる塩基対合およびフーグスティーンによる塩基対合の両方に依存して複合体を形成する。三重鎖分子は、高度な親和性および特異性により、標的領域と結合し得る。適切なコンジュゲート分子は、バイオフィルムアーキテクチャーを生み出しも安定化もせず、このようなタンパク質の少なくともサブセットが、本明細書で開示される作用剤についての結合の動態を促進し得ると想定されるという条件で、DNAに結合する、任意のタンパク質をさらに含み得る。

#### 【0247】

機能性核酸分子は、標的分子により保有される特異的活性のエフェクター、阻害剤、調節剤、および刺激剤として作用する場合もあり、他の分子には依存しない新規の活性を保有する場合もある。

#### 【0248】

利用可能な多数の方法のうちのいずれかを用いて、治療薬を、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、作用剤を、還元した抗体成分のヒンジ領域に、N-スクシニル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPPDP)などの架橋形成剤を用いるジスルフィド結合形成を介して結合させることもでき、抗体のFc領域における炭水化物部分を介して結合させることもできる(Yuら(1994年)Int. J. Cancer、56巻:244頁;Upeslaciisら、「Monoclonal antibodies: principles and applications」内の「Modification of Antibodies by Chemical Methods」、Birchら(編)、187~230頁(Wiley-Liss, Inc., 1995年);Price、「Monoclonal antibodies: Production, Engineering and Clinical Application」内の「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」、Ritterら(編)、60~84頁(Cambridge University Press, 1995年))。

#### 【0249】

治療薬を抗体および抗体断片とコンジュゲートする技法は、周知である(Amonら、「Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy」内の「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy」、Reisfeldら(編)、243~56頁(Alan R. Liss, Inc., 1985年);Hellstromら、「Controlled Drug Delivery」(2版)内の「Antibodies For Drug Delivery」、Robinsonら(編)、623~53頁(Marcel Dekker, Inc., 1987年);Thorpe、「Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications」内の「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Pincheraら(編)、475~506頁(1985年);「Monoclonal Antibodies For Cancer Detect

ion And Therapy」内の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Baldwinら(編)、303~16頁(Academic Press、1985年);およびThorpeら(1982年)Immunol. Rev.、62巻:119~58頁)。

#### 【0250】

断片またはポリペプチドは、別の抗体または受容体のリガンドなど、別の機能性分子に連結して、少なくとも2種以上の異なる結合部位または標的分子に結合する、二重特異性分子または多特異性分子を産生することができる。抗体を、別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合模倣体など、1種または複数種の他の結合分子に連結することは、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を介し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包含し得る。

10

#### 【0251】

当技術分野で公知の方法を用いて、二重特異性分子および多特異性分子を調製することができる。例えば、二重特異性分子(hi-specific)の各結合単位を個別に産生し、次いで、これらを互いと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は、各種のカップリング剤または架橋形成剤を、共有結合的コンジュゲーションに用いることができる。架橋形成剤の例には、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-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸(2-nitrobenzoic acid))(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-I-カルボキシレート(スルホ-SMCC)(Karpovskiyら(1984年)J. Exp. Med.、160巻:1686頁;Liuら(1985年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻:8648頁)が含まれる。結合分子が抗体である場合は、2つの重鎖のC末端のヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることにより、それらをコンジュゲートすることができる。

20

#### 【0252】

本明細書に開示されるとおりの抗体断片、抗原結合断片またはポリペプチドはまた、固体支持体に結合させることもでき、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。このような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれるがそれらに限定されない。

30

#### 【0253】

抗体断片、抗原結合断片またはポリペプチドはまた、多くの異なるキャリアにも結合させることができる。したがって、本開示はまた、抗原またはポリペプチドおよび活性または不活性な別の物質を含有する組成物も提供する。周知のキャリアの例には、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、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱が含まれる。キャリアの性質は、本明細書に開示される目的に応じて、可溶性の場合もあり、不溶性の場合もある。当業者は、モノクローナル抗体を結合させるのに適する他のキャリアについても承知している、または日常的な実験を用いて、このようなキャリアを確認し得るであろう。

40

#### 【0254】

上記の実施形態のうち1つまたは複数を含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる組成物が、本明細書においてさらに提供される。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のほか、断片およびポリペプチドを組換えにより産生するまたは化学合成する方法もさらに提

50

供される。抗体ポリペプチドおよび断片は、真核細胞においてまたは原核細胞において產生することもでき、当技術分野で公知であり、本明細書でも略述される、他の方法により產生することもできる。

#### 【0255】

本明細書に開示される断片を含む断片および単離されたポリペプチドは、それらが、バイオフィルムに対する、高レベルのエピトープ結合特異性および高結合親和性を有するように選択することができる。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結合親和性が大きいほど、イムノアッセイにおいて、よりストリンジェントな洗浄条件を実施して、標的を除去せずに、非特異的に結合した物質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断片を含む断片および単離されたポリペプチドは通例、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、抗体断片を含む断片および単離されたポリペプチドは、標準的な条件下、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分間で、平衡に達するのに十分な動力学的結合速度 (kinetic on-rate) 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) 未満または約1000ピコモル (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、もしくは約10 pM、もしくは約9 pM、もしくは約8 pM、もしくは代替的に、約4 pM 未満、もしくは代替的に、約2 pM 未満である。

#### 【0256】

上記の実施形態のいずれにおいても、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末端にペプチドリinkerを付加することができる。「リンカー」または「ペプチドリinker」とは、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したペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは、約1アミノ酸残基から約20アミノ酸残基までの長さ、またはあるいは2アミノ酸残基から約10アミノ酸残基まで、約3アミノ酸残基から約5アミノ酸残基までの長さである。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) を含む。

#### 【0257】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本明細書ではさらに、上記で言及した抗体断片、抗原結合性断片および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、ならびにそれらを含むベクターおよび宿主細胞、ならびに、当技術分野で公知であり、本明細書に記載される組換え細胞系を使用して、ポリペプチドを組換えにより產生するための方法も提供される。ポリヌクレオチドは、DNAである場合も、RNAである場合もある。ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの組換え再生 (recombinant reproduction) および/またはポリペプチド (polypeptides) の組換え產生のために、調節配列、プロモーター、エンハンサーなどに作動的に連結することができる。ポリヌクレオチドを、ベクター (例えば、プラスミドまたはウイルス) に挿入することができ、また組換え再生または発現のために適当な宿主細胞 (真核生物または原核生物) 中に挿入することができる。したがって、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ことによって、抗体断片またはポリペプチドを組換えによって產生することができる。一態様では、ポリペプチドは、細胞または培養培地から単離される。また、本出願によって、診断法において使用するための、検出可能な作用剤にコンジュゲートされた本明細書に記載のポリヌクレオチドも提供される。

#### 【0258】

単離されたまたは組換えのポリヌクレオチドを含むベクターまたは抗体がさらに提供され、その例は当技術分野では公知であり本明細書では手短に記載されている。1つよりも多い単離されたまたは組換えポリヌクレオチドが単一ユニットとして発現されることになる一態様では、単離されたまたは組換えポリヌクレオチドはポリ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siRNA、miRNAもしくはdsRNAなどの干渉RNAであり得る。

#### 【0259】

本開示はさらに、RNA転写のプロモーター、ならびにDNAまたはRNAの複製および/または一過性発現もしくは安定的発現のための他の調節配列に作動可能に連結した、単離されたまたは組換え型のポリヌクレオチドも提供する。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結した」という用語は、プロモーターが、DNA分子からRNAの転写を導くように位置づけられていることを意味する。こ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、挿入されたポリヌクレオチドを細胞特異的に発現させるために、細胞特異的なプロモーターを使用する。当技術分野では、プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーを、終結コドンおよび選択マーカー配列、ならびに、挿入されるDNAの小片をそのプロモーターに作動可能に連結しうるクローニング部位と共に含有するベクターが公知であり、市販されている。一般的な方法およびクローニング戦略については、「Gene Expression Technology」(Goeddel編、Academic Press, Inc. (1991年))およびそこで引用されている参考文献、ならびに種々の適切なベクターについてのマップ、機能的特性、販売元、およびGenEMBL受託番号の参照を含有する、「Vectors: Essential Data Series」(GacsaおよびRamji編、John Wiley & Sons、N.Y. (1994年))を参照されたい。

#### 【0260】

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では、本明細書で記載される、診断的有用性および治療的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、存在する場合もあり、存在しない場合もある、タンパク質の転写物を同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、より大型のポリヌクレオチドを制限酵素消化することにより調製することができ、次いで、検出可能なマーカーで標識することができる。代替的に、分子のニックトランスレーションを使用してランダムな断片を生成させることもできる。そのような断片を調製および標識するための方法については、Sambrookら(1989年)、前出を参照されたい。

#### 【0261】

これらの核酸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は宿主生物体において、エピソームとして、または染色体DNAの不可欠な一部として複製可能でなければならないことが示されている。適切な発現ベクターの非限定的な例は、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を含む。アデノウイルスベクターは、in vitroおよびin vivoのいずれにおいても発現が高レベルであり、細胞を効率的に形質転換するため、in vivoにおいて、遺伝子を組織に導入するために特に有用である。核酸を、適切な宿主細胞、例えば、原核細胞または真核細胞および宿主細胞複製物に挿入する場合、タンパク質は、組換えによって産生することができる。適切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した哺乳動物細胞、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うる。Sambrookら(1989年)、前出を参照されたい。外因性の核酸を細胞に挿入するためのウイルスベクターの使用に加えて、核酸は、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降を使用した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など、当技術分野で公知の方法により、宿主細胞に挿入することができる。方法についてはSambrookら(1989年)、前出を参照されたい。したがって、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

10

20

30

40

50

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、または細菌細胞などの原核細胞も提供する。

【0262】

ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体など、修飾されたヌクレオチドを含みうる。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に付与することもでき、組立ての後で付与することもできる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で中断することができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、標識化構成成分とコンジュゲートすることなどにより、さらに修飾することもできる。この用語はまた、二本鎖分子および一本鎖分子の両方を指す。そうでないことが指定または要請されない限り、ポリヌクレオチドである本明細書で開示される任意の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を成すことが公知である、または予測される2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれとの両方を包含する。

10

【0263】

本開示はまた、本明細書で開示されるポリヌクレオチドを含有し、かつ／または発現させる、遺伝子改変された細胞も提供する。遺伝子改変された細胞は、プロモーターまたは遺伝子活性化因子など、上流の調節配列を挿入することにより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）。

【0264】

ポリヌクレオチドは、細胞中での核酸および／または遺伝子の発現の検出のために、検出可能マーカー、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可能である。当技術分野では、検出可能なシグナルを生じることができる蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素リガンド、またはアビジン／ビオチンなど、他のリガンドを含む、多種多様な適切な検出可能なマーカーが公知である。一態様では、放射性試薬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などの酵素タグを使用することが所望される可能性が高い。酵素タグの場合、熱量測定的指示基質を利用して、相補的な核酸含有試料との特異的なハイブリダイゼーションを同定するための、目視可能な手段または分光光度的に検出可能な手段をもたらしすることができる。したがって、本開示はさらに、標的の一本鎖ポリヌクレオチドを、本明細書で開示されるポリヌクレオチドの一部である、標識化された一本鎖のポリヌクレオチド（プローブ）と、相補的な一本鎖ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが可能になる条件下で（任意選択で、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）、または任意選択で、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させることにより、一本鎖ポリヌクレオチドまたはその相補物を検出するための方法も提供する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、ハイブリダイズしなかった一本鎖ポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、当業者に公知の方法、例えば、Sambrookら（1989年）、前出に明示されている方法を使用して検出する。

20

30

【0265】

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法、PCR、またはこれらの任意の組合せを用いて得ることができる。当技術分野では、化学的なポリヌクレオチド合成法が公知であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。当業者は、DNA合成機を利用することにより、または市販のサービスを依頼することにより、所望のポリヌクレオチドを得るのに、本明細書で提供される配列データを使用することができる。

40

【0266】

本明細書で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ら編、Birkhauser Press、Boston（1994年））またはMacPh

50



ersonら(1991年)および(1995年)、前出、ならびにそこに引用されている参考文献において記載されている。代替的に、当業者は、本明細書で提供される配列および市販のDNA合成機を使用して、DNAを複製することもできる。したがって、本開示はまた、ポリヌクレオチドの直鎖状配列、ヌクレオチド、適切なプライマー分子、酵素などの化学物質、およびそれらを複製するための指示をもたらし、ポリヌクレオチドを得るように、ヌクレオチドを、適切な方向に化学的に複製または連結することにより、本明細書で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。別の実施形態では、これらのポリヌクレオチドをさらに単離する。なおさらに、当業者は、複製し、増幅するために、ポリヌクレオチドを適切な複製ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞(原核細胞または真核細胞)に挿入することができる。こうして増幅されたDNAは、当業者に公知の方法により、細胞から単離することができる。本明細書では、この方法によりポリヌクレオチドを得るためのプロセス、ならびにこうして得られたポリヌクレオチドもさらに提供される。

10

#### 【0267】

RNAは、まず、DNAポリヌクレオチドを、適切な宿主細胞に挿入することにより得ることができる。DNAは、任意の適切な方法により、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)を使用することにより送達することもでき、電気穿孔により送達することもできる。細胞が複製され、DNAがRNAに転写されたら、次いで、当業者に公知の方法、例えば、Sambrookら(1989年)、前出において明示されている方法を使用して、RNAを単離することができる。例えば、mRNAは、Sambrookら(1989年)、前出において明示されている手順に従い、種々の溶菌酵素または化学溶液を使用して単離することもでき、製造者によって提供される添付の説明書に従い、核酸結合性樹脂により抽出することもできる。

20

#### 【0268】

本明細書で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配列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、または本明細書で同定される特異的なポリヌクレオチドの等価物として有用である。転写物の完全なコード配列は公知であるので、この配列または相同な配列の任意の部分を、本明細書で開示される方法において用いることができる。

#### 【0269】

当技術分野では、特異的なハイブリダイゼーションのために、「完全に一致する」プローブは必要とされないことが公知である。少数の塩基の置換、欠失、または挿入により達成される、プローブ配列の軽微な変化は、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(最適にアラインメントした場合)が容認されうる。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、相同領域と少なくとも約80%同一である。一部の実施形態では、プローブは、相同な領域とアラインメントした後で、対応する遺伝子配列と85%同一であり、一部の実施形態では、プローブは90%の同一性を示す。

30

#### 【0270】

これらのプローブをラジオアッセイ(例えば、サザンブロット分析およびノーザンブロット分析)において使用して、これらの細胞を含有する種々の細胞または組織を検出、予後診断、診断、またはモニタリングすることができる。プローブはまた、本明細書で開示されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するためのハイスループットスクリーニングアッセイにおいて使用するために、チップなどの固体支持体または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いて使用するために固体支持体に付着させた、本明細書で開示されるポリヌクレオチド、またはその等価物、またはその相補物、またはその断片を含む、またはそれに対応するプローブも提供する。

40

#### 【0271】

断片の全体のサイズ、ならびに相補的なストレッチのサイズは、特定の核酸セグメント

50

の、意図される使用または適用に依存する。より小型の断片は、一般に、ハイブリダイゼーションの実施形態において使用され、相補領域の長さは、少なくとも5～10ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの間など、変動する場合もあり、なおまたは、検出することが望まれる相補配列に従い、全長の場合もある。

#### 【0272】

ハイブリッドの安定性および選択性を増大させ、これにより、得られる特定のハイブリッド分子の特異性を改善するために、5ヌクレオチド超から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が一般に好適である。ある特定の実施形態では、10ヌクレオチドもしくはこれを超える長さ、または50ヌクレオチドを超える長さの遺伝子相補的ストレッチ、あるいは、所望の場合、さらに長い遺伝子相補的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。このような断片は、例えば、化学的手段を介して、断片を直接合成することによりたやすく調製することもでき、米国特許第4,603,102号において記載されている、2つのプライミングオリゴヌクレオチドを伴うPCR技術などの核酸複製(reproduction)技術を適用することによりたやすく調製することもでき、組換えによる産生のために、選択された配列を、組換えベクターに導入することによりたやすく調製することもできる。一態様では、プローブは、約50～75ヌクレオチドもしくはこれを超える長さ、代替的に、50～100ヌクレオチドの長さである。

10

#### 【0273】

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せる遺伝子または遺伝子転写物を検出するためのプライマーとして用いられうる。この文脈では、増幅とは、標的配列を妥当な忠実度で複製すること(replicating)ができるプライマー依存性のポリメラーゼを利用する、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DNAポリメラーゼまたは組換えDNAポリメラーゼにより行うことができる。例示だけを目的として、プライマーは、プローブについて同定された長さと同じ長さである。

20

#### 【0274】

ポリヌクレオチドを増幅するための1つの方法はPCRであり、PCR増幅のためのキットは市販されている。増幅後、結果として得られるDNA断片は、当技術分野で公知の任意の適切な方法、例えば、アガロースゲル電気泳動、その後の臭化エチジウム染色および紫外線照射を伴う視覚化により検出することができる。

30

#### 【0275】

有効量の遺伝子送達ベクターまたはビヒクルを細胞に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。当技術分野では、細胞における遺伝子発現を検出するための方法が公知であり、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、RNAアーゼ保護アッセイおよびノーザンブロット分析などの技法を含む。このような方法は、細胞における遺伝子の発現を検出し、定量化するために有用である。代替的に、コードされるポリペプチドの発現は、種々の方法によって検出することもできる。特に、標的ポリペプチドと特異的に反応性である、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が有用である。このような抗体は、例えば、免疫組織学法、ELISA、およびウェスタンブロット法などの技法を使用して、ポリペプチドを発現させる細胞を視覚化するために有用である。これらの技法を使用して、発現させ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。

40

#### 【0276】

上記で注記したとおり、抗体、抗体断片、タンパク質およびポリペプチドは、当業者に公知の、多数のプロセスによって得られ、これらのプロセスは、精製、化学合成、および組換え法を含む。ポリペプチドは、宿主細胞株などの調製物から、抗体を伴う免疫沈降などの方法、ならびにゲル濾過、イオン交換、逆相、および親和性クロマトグラフィーなど

50

の標準的な技法により単離することができる。このような方法については、例えば、Deutscherら(1999年)、「Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology」(182巻、Academic Press)を参照されたい。したがって、本開示はまた、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り得ることができる生成物および得られる生成物も提供する。

#### 【0277】

ポリペプチドはまた、Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc.、モデル430Aまたは431A、Foster City, Calif.、USAにより製造された自動ペプチド合成機など、市販の自動ペプチド合成機を使用する化学合成によっても得ることができる。合成されたポリペプチドは、沈殿させ、さらに、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製することができる。したがって、本開示はまた、アミノ酸および酵素など、タンパク質の配列および試薬を提供し、アミノ酸を、適切な方向および直鎖状配列に、併せて連結することにより、本明細書で開示されるタンパク質を化学的に合成するためのプロセスも提供する。

#### 【0278】

##### 組成物

組成物がさらに提供される。組成物は、キャリアと、本明細書に開示される抗体断片または抗原結合性断片または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、小分子、抗体または本明細書に開示される抗体断片(例えば、Fab(断片抗原結合性)断片)のうちの1つまたは複数とを含む。キャリアは、固体支持体または薬学的に許容されるキャリアのうちの1つまたは複数であり得る。組成物は、ワクチンとしての投与に適するアジュバントまたは他の成分をさらに含み得る。一態様では、組成物を、1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリア、および/またはアジュバントと共に製剤化する。加えて、本開示の組成物についての実施形態は、1種または複数種の薬学的に許容される物質と共に製剤化された、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、抗体または本開示の抗体断片(例えば、Fab(断片抗原結合性)断片)のうちの1つまたは複数を含む。

#### 【0279】

経口調製物の場合、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリヌクレオチド、本明細書で説明されるベクター、本明細書で説明されるとおりの単離された宿主細胞、小分子、または本明細書で説明される抗体のうちの任意の1つまたは複数、単独で用いることもでき、錠剤、粉末、顆粒、またはカプセルを作製するのに適切な添加剤と組み合わせた化合物、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、またはバレイショデンプンなど、従来の添加剤；微晶質セルロース(crySTALLINE cellulose)、セルロース誘導体、アカシアガム、トウモロコシデンプン、またはゼラチンなどの結合剤；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、また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；滑石またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ならびに、所望の場合は、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、および矯味矯臭剤と組み合わせた化合物を含む、またはこの化合物から本質的になる本明細書に開示される医薬処方物中で用いることもできる。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は、組成物の一部として組み入れることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の成分または類似の性質の化合物：微晶質セルロース、トラガcant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、Primogel、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Sterotesなどの潤滑剤；コロイド性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

10

20

30

40

50

レンジ香料などの矯味矯臭剤のうちのいずれかを含有し得る。

【0280】

経口投与に適する医薬処方物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療法において特に有用である。一態様では、処方物が、小児科投与に特異的である。

【0281】

本開示は、医薬製剤を提供し、これでは、本明細書に各々開示される抗体断片、抗原結合性ドメイン、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つまたは複数を、水性溶媒、あるいは植物油もしくは他の類似の油、合成脂肪族系酸グリセリド、高級脂肪族系酸のエステル、またはプロピレングリコールなどの非水性溶媒中で、かつ、所望の場合は、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤（例えば、アラビアガム、アルギン酸およびアルギン酸ナトリウム）および保存剤、または他の抗微生物薬など、従来の添加剤と共に、溶解させる、懸濁させる、または乳化させることにより、本開示に従い注射用の調製物へと製剤化する。このようなものの非限定的な例は、表面抗原、例えば、OMP P5、OMP 26、OMP P2、またはワクチン成分、例えば、IV型ピリントキニンタンパク質（JurcisekおよびBakaletz（2007年）、J. of Bacteriology、189巻（10号）：3868～3875頁；ならびにMurphy、T.F.ら（2009年）、The Pediatric Infectious Disease Journal、28巻：S121～S126頁を参照されたい）および抗微生物薬など、他のワクチン成分に対する抗体である別の治療剤である。静脈内投与のために、適切なキャリアには、生理学的静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany、N.J.）、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。いずれの場合にも、非経口投与のための組成物は、無菌でなければならず、容易な注射針通過性（syringability）が存在する程度の流体であるべきである。

【0282】

本開示により提供されるエアゾール処方物は、吸入を介して投与することができ、噴霧体に基づく場合もあり、非噴霧体に基づく場合もある。例えば、本明細書に開示される医薬処方物の実施形態は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など、加圧された許容可能な噴霧体へと処方される本明細書に開示される化合物を含む。吸入投与の場合、化合物は、適切な噴霧体、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分注器、または噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で送達することができる。非噴霧体の非限定的な例は、機械的な力により（すなわち、指でピストンを押し下げる、または容器の壁面に適用される圧縮力、または壁面自体により加えられる弾性力（例えば、弾性の袋（bladder）を介する）などを介する容器の圧縮により）閉鎖容器から駆出されるポンプスプレーである。

【0283】

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、各種の基剤のうちのいずれかと混合することにより調製することができる。本明細書に開示される化合物によるこの医薬処方物についての実施形態は、坐剤を介して直腸に投与することができる。坐剤は、体温では溶融するが、室温では固化するココアバター、カーボワックス、およびポリエチレングリコールなどのビヒクルを包含し得る。

【0284】

シロップ、エリキシル、および懸濁物など、経口投与または直腸投与のための単位剤形を提供することが可能であり、各用量単位、例えば、茶さじ1杯分、料理用スプーン1杯分、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、通常の生理食塩水、または薬学的に許容される別のキャリア中の溶液としての組成物中に本明細書に開示される化合物を含み得る。

【0285】

10

20

30

40

50

本明細書に開示される医薬処方物についての実施形態は、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ター、本開示で用いられる小分子、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のうちの1つまたは複数が、注射用組成物へと処方される医薬処方物を包含する。本明細書に開示される注射用医薬処方物は、溶液または懸濁物として調製される、または注射前に液体のビヒクル中で溶解または懸濁させるのに適する固体形態として調製される。調製物はまた、本明細書に開示される医薬処方物についての他の実施形態に従い、乳化させることもでき、有効成分をリボソームビヒクル中に封入することもできる。

#### 【0286】

10

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、本明細書に開示される抗体もしくは抗体断片（例えば、Fab（断片抗原結合）断片）のうちの1つまたは複数、持続送達系を介する送達のために処方する。本明細書では、「持続送達系」という用語を、「制御送達系」と互換的に用い、それらのうちの多種多様なデバイスが当技術分野において公知である、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた持続（例えば、制御）送達デバイス（例えば、ポンプ）を包含する。

#### 【0287】

20

機械的注入ポンプまたは電気機械的注入ポンプもまた、本開示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、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号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、本明細書に開示される化合物の送達は、各種の再充填可能なポンプシステムのうちのいずれかを用いて達成することができる。ポンプは、ある時間にわたり、一定の制御放出をもたらす。一部の実施形態では、本明細書に開示される化合物が、薬物不透過性レザバ内の液体処方物であり、個体に持続的に送達される。

#### 【0288】

30

一実施形態では、薬物送達系が、少なくとも部分的に植え込み式のデバイスである。植え込み式デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下（subdermal、subcutaneous）部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。一部の実施形態では、薬物送達デバイスの植え込みおよび除去が簡便であるため、皮下（subcutaneous）の植え込み部位を用いる。

#### 【0289】

40

本開示で用いるのに適する薬物放出デバイスは、各種の作動方式のうちのいずれかに基づき得る。例えば、薬物放出デバイスは、拡散システムに基づく場合もあり、対流システムに基づく場合もあり、浸食システム（例えば浸食ベースのシステム）に基づく場合もある。例えば、薬物放出デバイスは、電気化学式ポンプ、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（osmotic bursting matrix）であることが可能であり、例えば、薬物をポリマー中に組み込み、このポリマーが、薬物含浸性ポリマー材料（例えば、生体分解性の薬物含浸性ポリマー材料）の分解と共時的に薬物処方物を放出するポンプであり得る。他の実施形態では、薬物放出デバイスが、電気拡散システム、電気溶解式ポンプ、気泡ポンプ、圧電ポンプ、加水分解システムなどに基づく。

#### 【0290】

50

機械的注入ポンプ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また、本開

示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、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 号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、対象の処置法は、各種の再充填可能な非交換型ポンプシステムのうちのいずれかを用い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、ある時間にわたる一般に一定である程度の高い制御放出のために、利用され得る。一部の実施形態では、浸透圧ポンプが、一定である程度の高い制御放出と比較的小型のサイズとを組み合わせた利点のために用いられる（例えば、PCT 国際特許出願公開第 WO 97/27840 号；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）。本開示で用いるのに適する例示的な浸透圧駆動式デバイスには、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 号などにおいて説明されているデバイスが含まれるが必ずしもそれらに限定されない。本開示に適合させ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

20

#### 【0291】

一部の実施形態では、薬物送達デバイスが、植え込み式デバイスである。薬物送達デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。本明細書で言及される通り、植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下 (subdermal、subcutaneous) 部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。

#### 【0292】

本明細書に開示される化合物に適する賦形剤ビヒクルは、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、およびこれらの組合せである。加えて、所望の場合、ビヒクルは、湿潤剤、または乳化剤、または pH 緩衝剤など、微量の補助物質も含有し得る。本開示について考慮するとき、当業者には、このような剤形を調製する方法が公知である、または明らかであろう。例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Company、Easton、Pa、17 版、1985 年を参照されたい。いずれにせよ、投与される組成物または処方物は、処置される対象において所望の状態を達成するのに十分な量の化合物を含有する。

30

#### 【0293】

本開示の組成物には、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組成物が含まれる。加えて、本開示の実施形態は、持続放出处方物を用いる他の処置と共に用いることもできる。本明細書で用いられる持続放出マトリックスとは、通常はポリマーである、酵素的加水分解もしくは酸ベースの加水分解、または溶解を介して分解可能な材料から作製されるマトリックスである。体内に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液により作用を受ける。持続放出マトリックスは、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-co-グリコリド (乳酸とグリコール酸とのコポリマー)、ポリ無水物、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、硫酸コンドロイチン、カルボン酸、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、ポリビニルプロピレン、ポリビニ

40

50

ルピロリドン、およびシリコンなどの生体適合性材料から選択することが望ましい。例示的な生体分解性マトリックスには、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（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）マトリックスが含まれる。

#### 【0294】

別の実施形態では、制御放出系により抗体断片（ならびに組合せ組成物）を送達する。例えば、本明細書に開示される化合物は、静脈内注入、植え込み式浸透圧ポンプ、経皮的パッチ、リポソーム、または他の投与方式を用いて投与することができる。一実施形態では、ポンプを用いることができる（S e f t o n（1987年）、C R C C r i t . R e f . B i o m e d . E n g .、14巻：201頁；B u c h w a l d ら（1980年）S u r g e r y、88巻：507頁；S a u d e k ら（1989年）、N . E n g l . J . M e d .、321巻：574頁）。別の実施形態では、ポリマー材料を用いる。さらに別の実施形態では、制御放出系を、治療標的、すなわち、肝臓の近傍に配置し、それにより、全身用量の一部しか必要としない。さらに別の実施形態では、制御放出系を、治療標的の近傍に配置し、それにより、全身用量の一部しか必要としない。他の制御放出系については、L a n g e r（1990年）、S c i e n c e、249巻：1527～1533頁により総説されている。

#### 【0295】

別の実施形態では、本開示の組成物（ならびに個別または一体の組合せ組成物）に、本明細書で説明される阻害剤を縫合糸、包帯、およびガーゼなどの吸収性材料中に含浸させることにより形成される組成物、または組成物を送達するための手術用ステープル、ジッパー、およびカテーテルなどの固相材料の表面上にコーティングされる組成物が含まれる。本開示を念頭に置く当業者には、この種の他の送達系も容易に明らかであろう。

#### 【0296】

本開示は、微生物感染症を処置するために、1種または複数種の抗体断片を投与するための方法および組成物を提供する。多様な実施形態では、本明細書に開示されるこれらの方法が、i n v i v o法およびe x v i v o法のほか、全身投与経路および局所投与経路を含め、薬物を送達するのに適する、利用可能なほとんど任意の方法および経路にわたる。

#### 【0297】

具体的な態様では、本開示は、D N A B I Iタンパク質もしくはポリペプチドまたは配列番号12から17まで、配列番号33、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、単離されたもしくは組換えポリペプチドを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）を含む製剤または共製剤（co-formulation）を提供する。本明細書で開示される抗体または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）は、それらが、バイオフィルムに対する、高レベルのエピトープ結合特異性および高結合親和性を有するように選択することができる。一般に、抗体または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）の結合親和性が大きいほど、イムノアッセイにおいて、よりストリンジェントな洗浄条件を実施して、標的を除去せずに、非特異的に結合した物質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、本技術の抗体または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）は通例、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、抗体または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）は、標準的な条件下、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分間で、平衡に達するのに十分な動力的結合速度を有する。別の実施形態では、抗体または抗原結合性断片の親和性は、1000ピコモル（pM）、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未満または約1000ピコモル（pM）、900 pM

M、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。

【0298】

一部の実施形態では、抗体は、約0.1 mg/mLから約200 mg/mLまで、または代替的に、約1から約150 mg/mLまで、または代替的に、約2 mg/mLから約100 mg/mLまで、または代替的に、約3 mg/mLから約80 mg/mLまで、または代替的に、約4 mg/mLから約50 mg/mLまで、または代替的に、約5 mg/mLから約20 mg/mLまでの濃度で、処方物中に存在する。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。

【0299】

複数の異なる抗体が、抗体併合処方物に含まれる、一部の実施形態では、異なる抗体は、実質的に等濃度で存在しうる。このような実施形態についての別の態様では、異なる抗体のうちの1つまたは複数は、他の抗体より実質的に高濃度で、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の比で存在しうる。抗体製剤および共製剤を安定的に製剤化する方法は、当技術分野で開示される技法（例えば、米国特許出願第12/875,083号（US 2011/0059079として公開されている）を参照されたい）に従い行うことができる。

【0300】

診断法および治療法

また、DNA BIIポリペプチドもしくはタンパク質または微生物DNAを、本明細書に記載の抗体断片、抗原結合性断片または組成物と接触させ、これにより、DNA BII

10

20

30

40

50



タンパク質またはポリペプチドの、微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはそれを滴定することにより、DNABIIポリペプチドまたはタンパク質の、微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはそれを滴定するための方法も提供される。さらなる態様では、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAを、例えば、互いに緊密に接触するとシグナルを発する発光分子で検出可能に標識する。接触は、*in vitro*において実施することもでき、*in vivo*において実施することもできる。

#### 【0301】

別の態様では、バイオフィルムを、本明細書に記載の抗体断片、その抗原結合性断片またはポリペプチドと接触させ、これにより、微生物バイオフィルムを阻害、防止、または破壊することにより、微生物バイオフィルムを阻害、防止、または破壊するための方法が提供される。さらなる態様では、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAを、例えば、互いに緊密に接触するとシグナルを発生する発光分子で検出可能に標識する。接触は、*in vitro*において実施することもでき、*in vivo*において実施することもできる。

#### 【0302】

*in vitro*において実施する場合、方法は、本明細書で開示されるポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、抗体断片（例えば、Fab（断片抗原結合性）断片）、宿主細胞、小分子、および組成物と同じ能力、同様の能力、または反対の能力を有する抗体断片およびポリペプチドを、スクリーニングまたは確認するために有用である。代替的に、それらを使用して、微生物感染を処置するためにはどの抗体断片またはポリペプチドが適しているかを同定することができる。例えば、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAおよび被験作用剤を含有する2つの試料を有することにより、例えば、新たな作用剤または組合せ療法をスクリーニングすることができる。第2の試料は、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAおよび活性であることが公知の作用剤、例えば、抗IHf抗体または陽性対照として用いられる小分子を含有する。さらなる態様では、いくつかの試料を提供し、希釈率を増大させながら、作用剤を、系に添加して、臨床の場で対象を処置するのに有効である可能性が高い、最適な用量を決定する。当業者に明らかである通り、DNABII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、DNABIIポリペプチドおよび微生物DNAを、互いに緊密に接触させるとシグナルを発生させる発光分子で検出可能に標識化する。試料を、作用剤がDNABIIポリペプチドと微生物DNAとの相互作用を阻害する、それと競合する、またはそれを漸減するために有効な時間にわたり、同様の条件下に保ち、次いで、試料を、発光分子からのシグナルの発生についてアッセイする。試料がシグナルを発生させれば、その作用剤は結合を阻害するのに有効ではない。

#### 【0303】

別の態様では、ヒト/動物から、感染症を引き起こす微生物の（例えば細菌などの）単離株を単離し、次いで、培養して、*in vitro*においてバイオフィルムとして成長させることができる、小型化チャンバースライドシステムにおいて、*in vitro*法を実施するが、例えば、下記の実験1を参照されたい。作用剤（抗IHf抗体など）または潜在的な作用剤バイオフィルムを、抗IHfなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）、潜在的な作用剤または作用剤の希釈率を増大させながら、または増大させずに、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、培養物に添加して、感染症が存在する対象に送達した場合に、その患者を処置するのに有効である可能性が高い、最適用量を見出す。当業者に明らかである通り、陽性対照および陰性対照を同時に実施することができる。

#### 【0304】

さらなる態様では、抗体断片および/または潜在的な作用剤（単独で、または別の作用剤と組み合わせて）をフローセル内に伴う、ハイスループットプラットフォームにおいて、方法を実施する。抗IHf抗体もしくはその断片または潜在的な作用剤を、抗IHfなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）、潜在的な作用剤または作用剤の希釈率を増大させながら、または増大させずに、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、培養物

に添加して、感染症が存在する対象に送達した場合に、その患者を処置するのに有効である可能性が高い、最適用量を見出す。バイオフィルム単離体を超音波処理して、微生物DNAに結合したIHFなどのDNABIIポリペプチドからバイオフィルム細菌を分離する。DNABIIポリペプチド-DNA複合体を、プラットフォーム上の抗IHF抗体によって単離する。次いで、微生物DNAを、例えば、塩洗浄により放出させ、添加したバイオフィルム細菌を同定するのに使用する。次いで、遊離したDNAを、例えば、PCRシーケンシングにより同定する。DNAが遊離しなければ、作用剤は、首尾よく機能した、または微生物DNAに結合した。DNAが試料中に見出されれば、作用剤は、DNABIIポリペプチド-微生物DNA間の結合に干渉しなかった。当業者に明らかである通り、陽性対照および/または陰性対照を同時に実施することができる。

10

#### 【0305】

別の態様では、本明細書で開示される抗体断片、抗原結合性断片、ポリペプチドまたは組成物のうちの1つまたは複数を、*in vivo*でバイオフィルムを検出する方法において使用する。さらなる実施形態では、抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を、例えば、発光分子または蛍光分子で、検出可能に標識する。本明細書で開示される方法のさらなる適用は、このような抗体断片、ポリペプチドまたは組成物の使用方法であって、例えば、バイオフィルムに結合すると、検出可能なシグナルをもたらす、検出可能に標識された一次抗体断片、ポリペプチドもしくは組成物、または一次抗体断片、ポリペプチドもしくは組成物がバイオフィルムに結合したときに、それに結合する、検出可能に標識された二次抗体断片、ポリペプチド、または組成物を使用して、バイオフィルムをイメージングする

20

使用法を含む。

#### 【0306】

上記の方法はまた、所与の細菌種が、ある作用剤によって、別の作用剤によりもそのバイオフィルムの逆転によく応答する可能性があるので、診断検査としても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であれば、当業者が可能性のある抗IHF様作用剤のパネルをアッセイして、最も効果的な群を同定することを可能とするであろう。

#### 【0307】

これらの方法の利点は、病院内の大半の臨床微生物学検査室には既に、液体培養物中で（または浮遊状態で）成長する細菌を使用してこれらの種類のアッセイ（すなわち、MIC値、MBC値の決定）を実施する設備が整っていることである。当業者には明らかである通り、細菌は一般に、疾患を引き起こすときには浮遊状態では持続しない。その代わりに、細菌は、安定なバイオフィルムとして成長し、これらのバイオフィルムは、抗生物質、抗体、または他の治療薬による処置に対する耐性が著明に大きい。この耐性が、大半のMIC/MBC値により、*in vivo*における有効性を正確に予測することができない理由である。したがって、作用剤のどの「用量」が*in vitro*において、細菌バイオフィルムを逆転しうるのかを決定することにより（上記で記載した通り）、出願人らの前臨床的なアッセイは、個別化医療の適用としてもなお、臨床的有效性についての、信頼性の大きな予測因子となるであろう。

30

#### 【0308】

臨床の場に加えて、この方法は、感染症を引き起こす微生物を同定し、かつ/または例えば、パイプにおいてなどの工業の場において有効な代替的な作用剤を確認するのに使用することができる。

40

#### 【0309】

上記の方法のさらなる態様では、感染症を阻害しうるのかどうかを決定するために、根底的な感染症の進行を阻害することが公知である抗生物質または抗菌薬を、逐次的または同時に添加する。バイオフィルムの阻害をアッセイするためには、複合体を添加する前に、抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を、微生物DNAまたはDNABIIポリペプチドに添加することも可能である。

#### 【0310】

50

チンチラなどの非ヒト動物において、*in vivo*で実施する場合、方法は、バイオフィルムを分解するのに、単独で、または他の作用剤と組み合わせて使用しうる、抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を同定するための、前臨床なスクリーニングを提供する。

【0311】

別の態様では、本明細書では、対象に、有効量の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、微生物バイオフィルムを阻害、防止、または破壊することにより、対象におけるバイオフィルムを阻害、防止、または破壊する方法が提供される。

【0312】

代替的にまたは加えて、バイオフィルムを阻害、防止、または破壊する方法は、*in vitro*において実施することもでき、かつ/または*ex vivo*において実施することもでき、バイオフィルムの試料（対象から採取された、または*in vitro*において発生した）を提供するステップと、有効量の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、微生物バイオフィルムを阻害、防止、または破壊するステップとを伴う。同様に、本明細書で開示される抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、院内器具、工業装置、および生体組織に含まれない他の物質などであるがこれらに限定されない、バイオフィルムによりコロニー形成される、表面上の微生物バイオフィルムを阻害、防止、または破壊するための方法実施形態においても使用することができる。

【0313】

さらなる態様では、方法は、対象に、有効量の、抗菌薬、抗原性ペプチド、またはアジュバントのうちの1つまたは複数を投与するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、なおまたはさらにそれからなる。

【0314】

抗菌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Pilinタンパク質などのワクチン構成成分に対して方向づけられた抗体である（JurcisekおよびBakaletz（2007年）、*J. Bacteriology*、189巻（10号）：3868～3875頁；Murphyら（2009年）、*The Pediatric Infectious Disease Journal*、28巻：S121～S126頁；Novotnyら（2015年）、*Mol Microbiol.*、96巻（2号）：276～92頁を参照されたい）。

【0315】

本明細書で開示される作用剤および組成物は、他の抗菌剤および/または表面抗原と、同時にまたは逐次的に投与することができる。特定の一態様では、投与は、例えば、直接的な注射または吸入による、感染部位への局所投与である。投与の他の非限定的な例は、経皮的に、尿道に、舌下に、直腸に、膣に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、鼻腔内に、吸入により、または経口的に投与することを含む、1つまたは複数の方法による投与を含む。

【0316】

本明細書で開示される方法により処置されうる微生物感染症および疾患は、実施例4～実施例9において開示されている生物を含むがこれらに限定されない、バイオフィルムの形成と関連する多様な生物による感染症を含むがこれらに限定されない。関与性の生物（およびそれらの括弧中の例示的な株）の非限定的な例は、*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 c*

10

20

30

40

50

*atarrhalis* (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、MGAS 10270)、*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)を含む。バイオフィルムと関連する、かつ/またはこれを形成することが公知の、さらなる生物は、*Campylobacter*種、*Candida*種、*Legionella pneumophila*、および*Listeria monocytogenes*を含むがこれらに限定されない。例えば、嚢胞性線維症患者は、抗生物質耐性バイオフィルムを結果としてもたすことが多い、*Pseudomonas*感染症を有する。バイオフィルムと関連する例示的な疾患は、嚢胞性線維症患者の肺感染症、中耳炎、自然弁感染性心内膜炎、骨髓炎、鼻副鼻腔炎、前立腺炎、再発性尿路感染症、創傷、齲歯、および歯周炎を含むがこれらに限定されない。感染した人工デバイス、関節、カテーテル、ステントまたは他の外科用インプラントなどの状態もまた、バイオフィルムの形成と関連する。

#### 【0317】

これらの微生物感染症は、上気道、中気道および下気道に存在しうる（耳炎、副鼻腔炎、気管支炎であるが、また、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪、慢性咳、嚢胞性線維症（CF）の合併症および/または主因、ならびに市中感染性肺炎（CAP）でもある）。したがって、本明細書で開示される*in vivo*法を実施することにより、これらの感染症由来の、これらの疾患および合併症も、予防または処置することができる。

#### 【0318】

感染症は、口腔においても生じる可能性があり（齲歯、歯周炎）、*Streptococcus mutans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*により引き起こされる。感染症はまた、皮膚に局在する可能性もあり（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*により引き起こされる。尿路（UTI）の感染症は、*Escherichia coli*により引き起こされることが典型的であり、これもまた処置することができる。消化管（GI）の感染症（下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍）は、*Salmonella enterica* serovar、*Vibrio cholerae*、および*Helicobacter pylori*によって引き起こされることが典型的である。生殖管の感染症は、*Neisseria gonorrhoeae*を含み、これによって引き起こされることが典型的である。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うる。人工股関節または人工膝関節など、植え込まれた人工デバイス、または歯科インプラント、またはポンプ、カテーテル、ステント、もしくはモニタリングシステムなどの医療デバイスと関連する感染症は、種々の細菌により引き起こされることが典型的であり、本明細書で開示される方法により処置することができる。これらのデバイスは、本明細書で記載される作用剤でコーティングすることもでき、これとコンジュゲートすることもできる。したがって、本明細書で開示される *in vivo* 法を実施することによって、これらの感染症由来の、これらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

#### 【0319】

また、*Streptococcus agalactiae* により引き起こされる感染症も、本明細書で開示される方法により処置することができるが、これは、新生児における細菌性敗血症の主要な原因である。また髄膜炎を引き起こす恐れがある、*Neisseria meningitidis* により引き起こされる感染症も、処置することができる。

10

#### 【0320】

したがって、本明細書で開示される方法に適用可能な投与経路は、鼻腔内、筋肉内、尿道、気管内、皮下、皮内、局所塗布、静脈内、直腸、経鼻、経口的、吸入、および他の経腸および非経口的な投与経路を含む。投与経路は、所望であれば組み合わせることもでき、作用剤および/または所望の効果に応じて調整することもできる。活性作用剤は、単回用量または複数回用量で投与することができる。送達に適する、これらの方法および経路の実施形態は、全身経路または局所経路を含む。一般に、本明細書で開示される方法に適する投与経路は、これらに限定されないが、直接注射経路、経腸経路、非経口的経路、または吸入による経路を含むがこれらに限定されない。

20

#### 【0321】

吸入による投与以外の非経口的投与経路は、局所経路、経皮経路、皮下経路、筋肉内経路、眼窩内経路、嚢内経路、脊髄内経路、胸骨内経路、および静脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任意の投与経路を含むがこれらに限定されない。非経口投与は、阻害剤の全身送達または局所送達をもたらすように行うことができる。全身送達が望まれる場合、投与は、医薬調製物の侵襲的または全身的に吸収される局所投与または粘膜投与を伴うことが典型的である。

30

#### 【0322】

本明細書で開示される抗体断片、ポリペプチドまたは組成物はまた、経腸投与により対象に送達することもできる。経腸投与経路は、経口的送達および直腸送達（例えば、坐薬を使用する）を含むがこれらに限定されない。

#### 【0323】

皮膚または粘膜を通じた活性物質の投与方法は、適切な医薬調製物の局所塗布、経皮的浸透（*transcutaneous transmission*）、経皮的浸透（*transdermal transmission*）、注射および表皮投与を含むがこれらに限定されない。経皮的浸透については、吸収促進剤またはイオン泳動が適切な方法である。イオン泳動的な浸透は、それらの生成物を、数日またはそれよりも長い期間にわたり、損なわれていない皮膚を通じて、電気的パルスにより連続的に送達する、市販の「パッチ」を使用して達成することができる。

40

#### 【0324】

本明細書で開示される方法の種々の実施形態では、抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を、吸入、注射により、または経口的に、連続的に、毎日、1日少なくとも1回（*QD*）投与し、種々の実施形態では、1日2回（*BID*）、1日3回（*TID*）、なおまたは1日4回投与する。毎日の治療有効用量は、少なくとも約1mg、または少なくとも約10mg、または少なくとも約100mg、または約200mg～約500mgであり、場合によっては、化合物に応じて、約1gから約2.5gまでと同程度であることが典型的であろう。

50

## 【0325】

本開示は、DNA B I I タンパク質を移出する細菌による宿主または宿主細胞の感染を阻害または予防する方法および組成物であって、細菌に曝露された、またはそれに感染した組織に、DNA B I I タンパク質を特異的に認識し、それに特異的に結合する、有効量の細菌関連 (bacteria-relevant) 抗体断片、その抗原結合性断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、細菌による宿主または宿主細胞の感染を阻害または予防することを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法および組成物を提供する。複数の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、本明細書で言及される支持療法と共に、併せて投与することもでき、逐次的に投与することもできる。

## 【0326】

本開示は、DNA B I I タンパク質を移出する細菌による細胞の感染を阻害または予防する方法を提供する。方法は、細菌に感染した組織に、DNA B I I タンパク質を特異的に認識し、それに特異的に結合する、有効量の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、細菌による感染を阻害または予防するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。複数の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、本明細書で言及される支持療法と共に、併せて投与することもでき、逐次的に投与することもできる。

## 【0327】

投与は、*in vitro*における、培養物中の投与の場合もあり、*in vivo*における、細菌に感染した患者への投与による場合もある。*in vivo*において実施する場合、方法を使用して、感染した対象に、有効量の抗体を投与することにより、細菌に感染した対象を処置することができる。加えて、対象が非ヒト動物である場合、方法を使用して、ヒトへの投与の前に、可能な治療または組合せ療法について調べることができる。*in vitro*において実施する場合、方法は、組織内の細菌による感染症を阻害または予防する小分子薬など、他の治療薬および組合せ療法についてスクリーニングするのに有用である。

## 【0328】

また、細菌感染の処置を必要とする対象であって、DNA B I I タンパク質を含む細菌に感染した対象における細菌の感染を処置する方法であって、対象に、DNA B I I タンパク質を特異的に認識し、それに特異的に結合する、有効量の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、細菌による感染を阻害または予防するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法も提供される。抗体断片は、細菌関連DNA B I I タンパク質を認識し、それに結合する、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または抗体の誘導体から生成され得る。DNA B I I タンパク質に対する抗体の供給源は、DNA B I I タンパク質による宿主への能動的ワクチン接種により誘発することもでき、DNA B I I タンパク質のタンパク質に対する抗血清または抗体の受動的移入により誘発することもできる。複数の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、本明細書で言及される支持療法と共に、併せて投与することもでき、または逐次的に投与することもできる。

## 【0329】

なおさらに、状態の処置を必要とする対象における状態であって、DNA B I I タンパク質を発現する細菌の感染と関連する状態を処置する方法であって、対象に、DNA B I I タンパク質を特異的に認識し、それに特異的に結合する、有効量の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物を投与し、これにより、細菌による感染を阻害または予防するステップを含む、または代替的にそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法も提供される。DNA B I I タンパク質に対する抗体断片、ポリペプチドまたは組成物をもたらした抗体の供給源は、DNA B I I タンパク質による宿主への能動的ワクチン接種により誘発することもでき、DNA B I I タンパク質に対する抗血清または抗体の受動的移入により誘発することもできる。抗体は、細菌関連DNA B I I タンパク質を認識し、それに結合する、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または抗体の誘導体であってよ

10

20

30

40

50

い。複数の抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、本明細書で言及される支持療法と共に、併せて投与することもでき、または逐次的に投与することもできる。

【0330】

上記の方法のうちのいずれかは、対象、または *in vitro* における組織培養物もしくは細胞培養物に、有効量の、抗菌薬、抗原性ペプチド、またはアジュバントのうちの1つまたは複数を投与するステップをさらに含む場合もあり、代替的にそれから本質的になる場合もあり、なおさらにそれからなる場合もある。一部の態様では、対象は、非ヒト動物またはヒト患者である。

【0331】

抗体断片、ポリペプチドまたは組成物は、任意の適切な方法により、局所 (*locally*) 投与または全身投与される、例えば、感染症またはバイオフィルムの部位に、局所的に (*topically*)、直腸に、膣に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、尿道に、鼻腔内に、吸入により、または経口的に投与される。

【0332】

一部の態様では、対象は、小児患者であり、抗体は、小児患者用の処方物により投与される。

【0333】

また、DNA BII タンパク質を移出する細菌による細胞の感染症を阻害もしくは予防し、かつ/またはバイオフィルムの形成を破壊もしくは防止する、潜在的な治療薬を同定するスクリーニングも開示される。スクリーニング法は、*in vitro* において、細菌に感染した組織に、作用剤を接触させるステップ、または *in vivo* において、細菌に感染した組織に、作用剤を投与するステップと、作用剤が、DNA BII タンパク質に結合するのかどうかを決定するステップとを含む、または代替的にそれから本質的になる、なおまたはさらにそれからなる。当技術分野では、結合を決定する方法が公知であり、いくつかの非限定的な例については、本明細書でも記載する。一態様では、作用剤がタンパク質に結合すれば、作用剤は、潜在的な治療薬であり、作用剤がタンパク質に結合しなければ、作用剤は、潜在的な治療薬ではない。別の態様では、感染症またはバイオフィルムが、*in vivo* において、阻害、破壊、または防止されれば、作用剤は、潜在的な治療薬であり、感染症が、阻害または防止されなければ、作用剤は、潜在的な治療薬ではない。当技術分野では、感染症が阻害または防止されるのかどうかを決定する方法が公知であり、いくつかの非限定的な例については、本明細書でも記載するが；当技術分野では、バイオフィルムが破壊または防止されるのかどうかを決定する方法も公知であり、本明細書でもさらに開示する。潜在的な治療薬の非限定的な例は、抗体、抗体誘導体、ポリペプチド、または小分子の群より選択される。複数の抗体は、本明細書で言及される支持療法と共に、共時的に投与することもでき、逐次的に投与することもできる。

【0334】

さらなる態様において、作用剤は、タンパク質に結合し、その結合を、抗DNA BII 抗血清の、抗体断片またはポリペプチドへの結合と比較する。

【0335】

DNA BII タンパク質の、微生物DNAへの結合を阻害する、それを漸減する、またはそれと競合するための抗体断片、ポリペプチドまたは組成物に関して想定される一般的特性のうちのいずれも同様に、細菌の感染症に関する、上記で開示した方法に適用されることを認識されたい。

【0336】

投薬は、本明細書で開示される方法に従って、カプセル、錠剤、経口懸濁物、筋肉内注射用懸濁物、静脈内注入用懸濁物、局所塗布用ゲルもしくはクリーム、または関節内注射用懸濁物を使用して達成することができる。

【0337】

本明細書で記載される組成物の投与量、毒性、および治療有効性は、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順であって、例えば、LD50 (集団の50%に対して

10

20

30

40

50

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)を決定する手順により決定することができる。毒性作用と治療効果との用量比は、治療指数であり、LD50/ED50比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、高い治療指標を示す。毒性の副作用を示す化合物を使用しうるが、感染していない細胞に対する潜在的な損傷を最小限にし、これにより、副作用を軽減するために、このような化合物を患部組織部位にターゲティングする送達系を設計するように注意を払うべきである。

#### 【0338】

ヒトにおける使用のための投与量の範囲を処方するために、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを使用することができる。このような化合物の投与量は、毒性をほとんどまたは全く伴わずに、ED50を含む循環濃度の範囲内にある(ある特定の実施形態では)。投与量は、利用される剤形および活用される投与経路に応じて、この範囲内で変動しうる。方法において使用される任意の化合物について、まず細胞培養アッセイから、治療有効用量を推定することができる。用量は、細胞培養物中で決定される、IC50(すなわち、最大半量の症状の阻害が達成される被験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度の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。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量を、より正確に決定することができる。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り測定することができる。

#### 【0339】

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有効量の組成物は、投与1回当たり体重1キログラム当たり約0.000001mgから投与1回当たり体重1キログラム当たり約10,000mgまでの範囲である。投与量は、投与1回当たり体重1キログラム当たり約0.0001mgから投与1回当たり体重1キログラム当たり約100mgまでの範囲であることが適切である。投与は、初回用量、その後の1回または複数回の「追加」用量として施すことができる。追加用量は、初回用量の1日後、2日後、3日後、1週間後、2週間後、3週間後、1カ月後、2カ月後、3カ月後、6カ月後または12カ月後に施すことができる。一部の実施形態では、追加用量は、前の投与に対する対象の応答を評価した後に投与される。

#### 【0340】

当業者は、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全般的健康状態および/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、ある特定の因子が、対象を効果的に処置するのに必要とされる投与量およびタイミングに影響を及ぼしうることを認識するであろう。さらに、対象の、治療有効量の、本明細書で記載される治療的組成物による処置は、単回の処置を含む場合もあり、処置のシリーズを含む場合もある。

#### 【0341】

抗体を用いた機能解析

本明細書で開示される抗体および抗体断片(例えば、Fab(断片抗原結合性)断片)を使用して、本明細書で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同定することができる。また、それらを使用して、本明細書で開示されるポリペプチドの機能を修飾する作用剤、例えば、アプタマー、ポリヌクレオチド、および小分子を同定することもできる。これらの抗体は、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、および当業者によく知られており上に記載されているこれらの調製物に由来する種々の試薬を含む。

#### 【0342】

同定された遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を中和する抗体および抗体断片(例えば、Fab(断片抗原結合性)断片)はまた、このような中和抗体を、*in vivo*および*in vitro*の試験系に追加することにより、*in vivo*および*in vitro*における機能を裏付けるのにも使用することができる。このような中和抗体もまた、本明細書で開示されるポリペプチドの活性を調節する医薬剤としても有用である。

#### 【0343】

また、多様な抗体調製物および抗体断片(例えば、Fab(断片抗原結合性)断片)も

10

20

30

40

50



、*in vitro*または*in vivo*における、同定された遺伝子によりコードされるタンパク質の、被験細胞による発現を裏付けるための、E L I S A アッセイまたはウェスタンブロットなどの分析法において使用することができる。また、代謝時のプロテアーゼ分解により発生するこのようなタンパク質の断片も、適切なポリクローナル抗血清を、実験試料に由来する試料と共に使用することにより、同定することができる。

#### 【0344】

さらに、一部の実施形態では、本明細書で開示される抗体および抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）を使用して、バイオフィルムを視覚化および／または検出することができる。このような実施形態では、抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な生成物を生成させる酵素、蛍光タンパク質などで検出可能に標識することもでき、または例えば、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、他の部分にコンジュゲートすることもできる。次いで、検出可能に標識された抗体を、バイオフィルムがコロニー形成していることが疑われる試料に導入し、顕微鏡法または関連の標識を検出することが公知の他の方法、例えば、分光法、サイトメトリー、または他の一般的な技法で、視覚化および／または検出することができる。コンジュゲート抗体または非標識抗体も同様に、それぞれコンジュゲート部分または抗体を対象とする、公知の分析法により同定することができる。例えば、一部の実施形態では、本明細書で開示される抗体および／または抗体断片（例えば、F a b（断片抗原結合性）断片）のアイソタイプに特異的な、検出可能に標識された二次抗体も、バイオフィルムの視覚化および／または検出において使用することができ、このような実施形態は、D N A B I I タンパク質の「尾部」に特異的な抗体の、バイオフィルムがコロニー形成していることが疑われる表面への投与と、それに続く、検出可能に標識された二次抗体の投与およびその後における関連の標識の検出を必然的に伴い得る。

#### 【0345】

本明細書で開示される抗体断片、抗原結合性ドメイン、ポリペプチドまたは組成物は、単独で、ペプチドもしくはタンパク質ベースのワクチンまたは樹状細胞ベースのワクチンと組み合わせて、ワクチン接種のために使用することもでき、ワクチン接種をブーストするために使用することもできる。

#### 【0346】

##### スクリーニングアッセイ

本開示は、本明細書で記載される例示的な抗体と等価なモノクローナル抗体およびその断片などの等価作用剤、ならびに本明細書で開示される活性作用剤および医薬組成物の活性、または本明細書で開示されるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド産物もしくはペプチド産物の機能を調節する各種の作用剤をスクリーニングする方法を提供する。本開示の目的では、「作用剤」に、単純なもしくは複雑な有機分子もしくは無機分子、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物学的化合物または化学的化合物を含むがこれらに限定されないことを意図する。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、および多様なコア構造に基づく合成有機化合物など、多種多様な化合物を合成することができ、これらもまた、「作用剤」という用語に含まれる。加えて、例えば、植物抽出物または動物抽出物など、各種の天然供給源も、スクリーニングのための化合物をもたらし得る。常に明示的に言及されるわけではないが、作用剤は、単独で、または本発明のスクリーニングにより同定される作用剤と同じもしくは異なる生物学的活性を有する、別の作用剤と組み合わせて使用されることを理解されたい。

#### 【0347】

本開示の目的では、「結合性部分」は、少なくとも1種のD N A B I I タンパク質に関して親和性を有する、単純なもしくは複雑な有機分子もしくは無機分子、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物学的化合物または化学的化合物を含むがこれらに限定されないことを意図する。多種多様な化合物、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、および多

10

20

30

40

50

様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、これらもまた、「結合性部分」という用語に含まれる。加えて、例えば、植物抽出物または動物抽出物など、各種の天然供給源も、スクリーニングのための化合物をもたらし得る。

【0348】

*in vitro*におけるスクリーニング法を実施するために、処置される微生物に感染した適する細胞培養物または組織をまず提供する。細胞は、密度に依存する制約なしに、指数関数的な増殖を達成するための条件下（温度、増殖培地または培養培地、およびガス（ $CO_2$ ））で、適切な長さの時間にわたり培養する。また、対照として、感染していないさらなる別個の細胞培養物を維持することも所望される。

【0349】

当業者に明らかである通り、適切な細胞は、マイクロタイタープレート内で培養することができ、遺伝子型の変化、表現型の変化、または微生物力価の低減に注目することにより、いくつかの作用剤を同時にアッセイすることができる。

【0350】

作用剤が、上記で説明した小分子など、DNAまたはRNA以外の組成物である場合は、この作用剤を、細胞培養物に直接添加することもでき、追加用の培養培地に添加することもできる。当業者に明らかである通り、実験により決定され得る「有効」量を添加しなければならない。

【0351】

作用剤が、抗体または抗原結合性断片である場合は、この作用剤を、競合的ELISAを実施するための条件下で、本明細書に記載される標的抗原およびポリクローナル抗体と接触させることもでき、これらと共にインキュベートすることもできる。当業者には、このような方法が公知である。

【0352】

アッセイはまた、対象において実施することもできる。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、ヒト患者における作用剤の臨床試験の前に使用しうる、簡便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のそれぞれが、同じ感染症を有する処置されていない動物と比較して軽減される、または消失すれば、候補作用剤が潜在的な薬物である。また、比較のためのベースを提供する、健康で処置を受けていない細胞または動物の、別個の陰性対照群を有することも有用であり得る。

【0353】

本明細書で想定される抗体に特異的な、さらなるスクリーニングアッセイは、本明細書で開示されるポリペプチドのうちの1つまたは複数に特異的に結合する抗体または作用剤を同定するのに適する方法を含む。この方法は、本発明の抗体が結合する、抗原上の部位に結合する抗体を同定するステップを伴う。

【0354】

抗体が結合する部位は、当業者に公知の方法により決定することができる。例えば、抗体が、抗原の部分的立体構造に結合する、またはそれを認識する場合、抗体が結合する部位は、X線構造解析を使用して、抗体に隣接する抗原上のアミノ酸残基を同定することにより決定することができる。例えば、抗体またはその断片と、抗原またはその断片とを、互いに結合させ、結晶させた後、構造解析を行い、抗体との相互作用距離を有する抗原上の各アミノ酸残基を同定することができる。相互作用距離は、8オングストロームまたはこれより短い、好ましくは6オングストロームまたはこれより短い、より好ましくは4オングストロームまたはこれより短い。抗体との相互作用距離を有する、1つまたは複数のこのようなアミノ酸残基は、抗体が結合する、抗原上の部位（エピトープ）を構成し得る。2つまたはそれよりも多いこのようなアミノ酸残基は、一次配列上では、互いに隣接しえない。このような構造解析は、タンパク質の三次元構造を提示することが可能であり、したがって、同定されたエピトープの配列および立体構造の両方をもたらし得る。

【0355】

被験抗体または被験作用剤を、本明細書で開示されるポリペプチドのうちの１つまたは複数と接触させることができる。その後、物質と、本明細書で開示される抗体のうちの任意の１つが結合するエピトープを構成するアミノ酸残基との距離を測定する。被験抗体または被験作用剤は、それが、残基のそれぞれと、適切な相互作用距離にあれば、特異的に結合すると決定することができる。一部の実施形態では、被験抗体は、ポリクローナル抗体ではない。

【０３５６】

一部の実施形態では、抗体 - 抗原間相互作用の構造解析により同定される、その立体構造エピトープとの相互作用に基づき、被験抗体または被験作用剤を分析する。このような立体構造エピトープの非限定的な例は、本明細書で開示されるポリペプチドのうちの１つまたは複数の中に含まれ得る ヘアピンである。さらなる非限定的な例示的エピトープは、コンセンサスのアミノ酸配列

10

【化１９】

### **NPXT**

[ 配列中、「X」は、任意のアミノ酸を指す ] など、アンチパラレルのベータリボンの一部としての鋭角ターンと一致するアミノ酸配列である。一部の実施形態では、Xを、アミノ酸Q、R、K、S、またはTから選択する。本明細書では、このようなものの非限定的な例を、コンセンサスアミノ酸配列

【化２０】

20

### **NPXT**

に下線を付して太字にして開示する。当業者は、これらの配列のうちの任意の１つでは、X位における残基（下記の例では、

【化２１】

二重下線

でマークする)を、任意のアミノ酸（例えば、Q、R、K、S、またはT）で置換し得ることを理解する。

配列番号１３：Haemophilus influenzae IhfA、A5断片：

30

【化２２】

RPGR**NP**KTGDVVPVSARRVV

.

配列番号１４：Haemophilus influenzae HU、A5断片：

【化２３】

RTGR**NP**QTGAIEQIAASKVP

.

配列番号１７：Haemophilus influenzae IhfB、修飾B4（mB4）断片：

40

【化２４】

FSLHHRQPRLGR**NP**KTGDSV

.

配列番号２６：Haemophilus influenzae IhfA、A先端部断片：

【化２５】

NFELRDKSSRPGR**NP**KTGDVV

50

配列番号 27 : *Haemophilus influenzae* I h f B、B 先端部断片 :

【化 26】

SLHHRQPRLGRNPKTGDSVNL

配列番号 31 *Haemophilus influenzae* H U、断片 :

【化 27】

VNERAARTGRNPQTGAEIQIAA

10

【0357】

一部の実施形態では、

【化 28】

**NPXT**

を含むポリペプチドは、少なくとも約 20 アミノ酸の長さであり、NPXT は、配列内のほぼ中心に位置する。このような配列の非限定的な例は、配列番号 13、14、および 31 を含む。

20

【0358】

作用剤および組成物は、医薬の製造において用いることができ、医薬組成物の有効成分など、従来の手順に従う投与によって、ヒトおよび他の動物を処置するのに用いることができる。

組合せ療法

【0359】

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用いることができる。これらには、DNアーゼ酵素、抗生物質、抗微生物薬、ワクチンアジュバントまたは他の抗体の投与が含まれるがそれらに限定されない。

【0360】

30

一部の実施形態では、方法および組成物が、抗 DNABII 抗体と共に相乗的に作用するデオキシリボヌクレアーゼ (DNアーゼ) 酵素を包含する。DNアーゼとは、DNA 骨格におけるホスホジエステル結合の切断を触媒する任意の酵素である。十字構造だけでなく、DNA の多様な二次構造もまたターゲティングすることが公知である DNアーゼ酵素についての、3 つの非限定的な例は、DNアーゼ I、T4 Endo VII、および T7 Endo I を含む。ある特定の実施形態では、DNアーゼと組み合わせると、バイオフィルムを不安定化させるのに必要とされる抗 DNABII 抗体の有効量が低減される。in vitro で投与する場合、DNアーゼは、アッセイに直接添加することもでき、この酵素を安定化させることが公知である適切な緩衝液中に添加することもできる。DNアーゼの有効単位用量およびアッセイ条件は変動する場合があります、当技術分野で公知の手順に従い最適化することができる。

40

【0361】

他の実施形態では、方法および組成物を、抗生物質および / または抗菌薬と組み合わせることもできる。抗菌薬とは、細菌、真菌、または原虫などの微生物を死滅させる、またはそれらの成長を阻害する物質である。バイオフィルムは一般に、抗生物質の作用に対して耐性であるが、本明細書で説明される組成物および方法を使用して、バイオフィルムを伴う感染症を、感染症を処置するための従来の療法に対して感作させることができる。他の実施形態では、抗生物質または抗菌薬を、本明細書で記載される方法および組成物と組み合わせる使用することにより、抗菌薬および / またはバイオフィルム低減剤の有効量を低減することが可能となる。本開示の方法との組合せに有用な抗菌薬および抗生物質につ

50

いての一部の非限定的な例には、アモキシシリン、アモキシシリン - クラバン酸、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 - トリメトプリムが含まれる。バイオフィーム低減剤と組み合わせられる抗菌薬および/または抗生物質の治療有効量は、従来の方法により容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィーム低減剤と組み合わせられる抗菌薬の用量が、他の細菌感染症、例えば、感染症の病因がバイオフィームを包含しない細菌感染症において有効であることが示されている平均有効用量である。他の実施形態では、用量が、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。抗生物質または抗菌薬は、抗DNA B I I抗体を添加する前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもできる。

10

#### 【0362】

他の実施形態では、方法および組成物を、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることもできる。本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせるのに有用な抗体の一例は、非類縁外膜タンパク質（すなわち、OMP P5）を指向する抗体である。この抗体単独による処置は、*in vitro*においてバイオフィームを減量することがない。この抗体と、バイオフィーム低減剤とによる組合せ療法は、同じ濃度のいずれかの試薬を単独で用いることにより達成され得る効果より大きな効果を結果としてもたらす。バイオフィーム低減剤またはバイオフィームを低減させる方法と組み合わせると相乗効果をもたらし得る他の抗体には、抗*r s P i l A*調製物、抗OMP 26調製物、抗OMP P2調製物、および抗全OMP調製物が含まれる。

20

#### 【0363】

バイオフィームが関与しない細菌感染を処置するのには有効であるが、それ以外の、バイオフィームが関与する細菌感染症を処置するには有効でない、一般的な治療モダリティに対して、本明細書に記載される組成物および方法を用いて、バイオフィームが関与する細菌感染を感作させることができる。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を、バイオフィームが関与する細菌感染を処置または予防するのに有効な治療モダリティと組み合わせると用い得るが、このような追加的な療法とバイオフィーム低減剤または方法との組合せは、バイオフィーム低減剤または追加的な治療薬のいずれかの有効量を低減し得るような相乗効果をもたらし得る。他の場合には、このような追加的な療法とバイオフィーム低減剤または方法との組合せが、処置を増強するような相乗効果をもたらし得る。処置の増強は、感染を処置するのに必要とされる時間の長さの短縮により証拠立てることができる。

30

#### 【0364】

追加的な治療的処置は、バイオフィームを低減させるのに用いられる方法または組成物の前に追加することもでき、それと併せて追加することもでき、その後で追加することもでき、同じ製剤中に含有させることもでき、別個の製剤として含有させることもできる。

キット

#### 【0365】

本明細書に記載される*in vitro*法および*in vivo*法を実施するのに必要な作用剤および指示を含有するキットもまた、特許請求される。したがって、本開示は、本明細書に開示される抗体断片またはその抗原結合性断片ならびに組織を収集するステップ、および/またはスクリーニングを実施するステップ、および/または結果を解析するステップ、および/または本明細書で規定される有効量の抗体断片またはその抗原結合性断片を投与するステップなどの本明細書に開示される方法を実施するための指示を含み得るこれらの方法を実施するためのキットを提供する。これらは、単独で用いることもでき、他の適切な抗微生物薬と組み合わせると用いることもできる。

40

#### 【0366】

例えば、キットは、任意の1つまたは複数の本開示の抗体断片、ポリペプチドまたは組

50

成物および使用のための指示を含む場合もあり、代替的にそれから本質的になる場合もあり、またはなおさらにそれからなる場合もある。キットは、アジュバント、抗原性ペプチド、または抗微生物薬のうちの1つまたは複数をさらに含み得る (can further comprising)。キャリアの例には、液体キャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相キャリア、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リボソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントが含まれる。

#### 【0367】

以下の例は、本明細書で開示される実施形態を例示することを意図するものであり、これらを限定することを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0368】

##### (実施例1)

IHFおよびHU抗体およびFab断片の生成

全体としてIHFおよびHUに対する、および特異的断片に対する、IHFおよびHU抗体、タンパク質およびポリペプチドを生成させた。

#### 【0369】

例えば、GranstonおよびNash (1993年)、J. Mol. Biol.、234巻: 45~59頁; Nashら (1987年)、Journal of Bacteriology、169巻 (9号): 4124~4127頁; ならびにRiceら (1996年)、Cell、87巻: 1295~1306頁に記載されている通り、当業者には、これらを産生する方法が周知である。略述すると、IHF - (配列番号6) を過剰産生するために、himA遺伝子を、細菌プラスミドであるpAD284におけるP<sub>L</sub>プロモーターの下流に挿入した。所望のプラスミドを施されたC600himA42株のラムダ溶原菌であるK5607株の形質転換株は、バクテリオファージミューを成長させる能力について、アンピシリン耐性形質転換株をスクリーニングすることにより同定した。標準的なDNA単離法に従い、himA<sup>+</sup>形質転換株からDNAを調製し、himA遺伝子の配向性は、制限酵素切断により決定した。P<sub>L</sub>プロモーターによる発現に適正な配向性でhimA遺伝子を有するプラスミドであるpP<sub>L</sub>himA-1を、cI857熱誘導性リプレッサーを発現するラムダ潜在プロファージを含有するN5271株へと形質転換し、K5770株を得た。

#### 【0370】

IHF - サブユニット (配列番号7) を過剰産生するために、バクテリオファージラムダのP<sub>L</sub>プロモーターとのIHF - ベータをコードする配列の融合体を含有するプラスミドであるpKT23-hip323を用いた。pKT23-hip323を、N5271に導入して、E443株を得た。別のプラスミドの存在下におけるpKT23-hip323の選択を容易にするために、変更されたその選択マーカーを、アンピシリン耐性 (bla<sup>+</sup>) から、クロラムフェニコール耐性 (cat<sup>+</sup>) へと変更した。FlammおよびWeisbergにより記載されている通りに、cat含有断片を、プラスミドpBR325から単離し、blaにおける固有のScaI部位に挿入した。ライゲーションされたDNAを、hip変異を保有し、温度感受性のXリプレッサーを合成するE403株内に導入し、低温でクロラムフェニコール耐性形質転換株を選択した。このような形質転換株の1つ (E735株) は、hip<sup>+</sup>であり、かつ、アンピシリン感受性であり、したがって、pKT23-hip323のbla<sup>+</sup> cat<sup>+</sup>誘導体 (pE735) を保有すると考えられる。

#### 【0371】

IHFのいずれのサブユニットも過剰産生する株を産生するために、E735を、プラスミドpP<sub>L</sub>himA-1で形質転換し、アンピシリン耐性となり、クロラムフェニコール耐性を保持している形質転換株 (E738) を選択した。いずれのサブユニットも過剰産生する第2の株の産生は、pheT遺伝子およびhimA遺伝子を含有する、平滑末端 (blunted) (SstII制限酵素部位) を、pKT23-hip323プラスミド内に

10

20

30

40

50

ライゲーションすることにより作製されたプラスミドである p P L h i p h i m A - 5 の構築に依存した。これについては、Nashら ( 1 9 8 7 年 )、J.Bacteriology、1 6 9 巻 ( 9 号 ) : 4 1 2 4 ~ 4 1 2 7 頁においてさらに詳細に記載されている。K 5 6 0 7 株の h i m A <sup>+</sup> 形質転換株は、H i m A <sup>+</sup> についてスクリーニングすることにより同定し、制限消化によりプラスミド DNA を解析した。プラスミド構造が明らかである全ての場合において、2 コピーの h i m A が、タンデムダイレクトリピートとしてベクター内にライゲーションされていた。このプラスミドにおける 2 コピーの h i m A 遺伝子の存在が、選択により要請されているのかどうかは未知であるが、h i m A 変異体を補完するには、プラスミド p P L h i m A - 1 における単一コピーの h i m A 遺伝子で十分であることを想起すべきである。プラスミド p P L h i p h i m A - 5 を用いて、N 5 2 7 1 株を形質転換し、K 5 7 4 6 株を得た。

10

**【 0 3 7 2 】**

同じ手順を繰り返して、H U ( 配列番号 3 ) を過剰産生した。

**【 0 3 7 3 】**

細胞は、3 1 で振とう水浴において、T B Y 培地 ( 1 リットルあたり 1 0 g のトリプトン、5 g の酵母抽出物、および 5 g の塩化ナトリウム ) 中で成長させた。中期対数増殖期 ( mid-log phase ) ( 6 5 0 n m における光学密度、約 0 . 6 ) において、細胞を 4 2 の水浴へとシフトし、引き続き振とうした。3 0 0 m l の培養物を遠心分離し、2 0 m M の N a C l を含有する 0 . 6 ~ 0 . 9 m l の T E G ( 2 0 m M のトリス塩酸 ( p H 7 . 4 )、1 m M の E D T A ナトリウム、1 0 % のグリセロール ) 中に懸濁させることが典型的であった。細胞は、各バースト間に 4 0 秒間ずつを置く、6 回の 2 0 秒間バーストの音波処理により破壊した。音波抽出物の一部は、S o m a l i S S 3 4 ローター内、1 5 , 0 0 0 r p m で 2 0 分間にわたり遠心分離した。音波抽出物の試料は、標準的な分子生物学技法に従うドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) ゲル電気泳動により解析した。

20

**【 0 3 7 4 】**

精製は、以下に従って行った：3 . 6 リットルの細胞バッチを、3 時間にわたり誘導した。その後の全てのステップは、0 ~ 4 で実施した。3 . 3 リットルからの細胞ペレットを、2 0 m M の N a C l を含有する 1 0 m l の T E G 中に懸濁させて、2 9 m l の総容量をもたらし、それぞれに、9 0 秒間の間隔を置き、3 分間の音波処理の 6 回のバーストを施した 2 つのバッチにおいて、この懸濁物を破壊した。音波抽出物を 1 5 , 0 0 0 r p m で 2 0 分間にわたり遠心分離し、1 6 . 9 m l の清澄化した抽出物を得た。ポリミン P ( B D H C h e m i c a l s L t d ) の 1 0 % ( 容量 / 容量 ) 溶液 ( 1 . 1 m l ) を、この清澄化した抽出物へとゆっくり添加し、2 0 m m にわたり攪拌した後、混合物を、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 m m にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、5 0 0 m M の N a C l を含有する 1 0 m l の T E G 中に懸濁させ、1 5 分間にわたり攪拌した後、混合物を、1 2 , 0 0 0 r p m で 2 0 分間にわたり遠心分離した。上清 ( 1 0 . 3 m l ) を、3 . 2 g の硫酸アンモニウムを添加することにより、5 0 % 飽和へと調整し、2 0 分間にわたり攪拌し、1 5 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間にわたり遠心分離した。結果として得られる上清を、1 . 6 4 g の硫酸アンモニウムを添加することにより、7 0 % 飽和へと調整し、2 0 分間にわたり攪拌し、1 5 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、1 m l の T G ( 1 0 % のグリセロールを含有する 5 0 m M のトリス塩酸 ( p H 7 . 4 ) ) 中に懸濁させ、2 回にわたり交換される T G に対して透析した。透析された物質 ( 2 . 0 m l ) を、T G で平衡化した、1 m l のホスホセルロースカラム ( P 1 1、W h a t m a n , I n c . ) ( 0 . 5 x 5 . 8 c m ) にロードした。カラムを 3 m l の T G で洗浄し、T G 中の 2 0 m l の K C I 直線勾配 ( 0 ~ 1 . 2 M ) で展開した。0 . 5 m l の画分を収集し、- 2 0 で保存し、I H F 活性についてアッセイした。

30

40

**【 0 3 7 5 】**

ポリクローナル抗 I H F は、以下の通りに調製した。ウサギに、フロイント完全アジュバントを伴う 2 5 0 μ g の精製された I H F を注射した。フロイント不完全アジュバント

50

を伴う250 µgのIHFの追加免疫による免疫を、1、7、および12週間後に施した。IHFについての免疫プロット法により決定される通り、初回注射の13週間後に収集した血清は、高力価のIHF反応性物質を有した。動物は、数年間にわたり維持し、それらの血清中の抗IHFの高力価を維持するために必要な場合は、さらなる追加免疫による免疫を施した。抗体をさらに精製することはなかった。粗血清は、-70 で保存した。ポリクローナル抗HUも、同じ方式に従い調製した。

#### 【0376】

IHFまたはHUの各サブユニットに特異的なマウスモノクローナル抗体であって、配列番号12~17に対応する合成ポリペプチドを使用することにより生成される抗体を産生するハイブリドーマは、Rockland Immunchemicals、Limerick、PAに注文した。ハイブリドーマのうちの3つは、ATCCに寄託され、ATCCにより、生存率について検証された、上記の表1を参照されたい。

#### 【0377】

ウサギポリクローナル抗IhfB2<sub>NTHI</sub>および抗mIhfB4<sub>NTHI</sub>を以下の通りに調製した。ウサギにフロイント完全アジュバントを伴う250 µgのIhfB2<sub>NTHI</sub>ペプチドまたはmIhfB4<sub>NTHI</sub>ペプチドを注射した。フロイント不完全アジュバントを伴う250 µgのIhfB2<sub>NTHI</sub>またはmIhfB4<sub>NTHI</sub>の2回の追加免疫による免疫を、21日の間隔で施した。IhfB2<sub>NTHI</sub>またはmIhfB4<sub>NTHI</sub>のELISAによって決定される通り、3回目の注射の21日後に収集した血清は、IhfB2<sub>NTHI</sub>またはmIhfB4<sub>NTHI</sub>反応性物質の40,000の逆数力価を有していた。抗体は、さらに精製しなかった。粗血清は、-70 で保存した。

#### 【0378】

マウスFab断片を、モノクローナル抗体の消化によって生成させた。特に、図1(Mariniら、A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)<sub>2</sub> suitable for clinical use from mouse IgG1, Molec. Immunol. (1991年) 1月~2月、28巻(1~2号): 69~77頁、PMID: 2011130)に示されるように、マウスFab断片を、マウスモノクローナル抗体mIhfB4<sub>NTHI</sub>(クローン12E6.F8.D12.D5)、IhfB2<sub>NTHI</sub>(クローン7A4.E4.G4)およびIgG1(クローンP3.6.2.8.1、Affymetric)の、アガロース固定したフィシン+25 mMシステイン(Thermo Scientific)を用いる5時間の消化によって生成させた。ウサギFab断片を、IgG富化ポリクローナルウサギ抗IhfB2<sub>NTHI</sub>、抗mIhfB4<sub>NTHI</sub>およびナイーブウサギ血清から、アガロース固定したパインプロテアーゼ+システイン-HCl(Thermo Scientific)を用いる4時間の消化によって生成させた。次いで、図1および図10に示されるように、断片を、プロテインAスピンカラムによって精製し、10 mMリン酸緩衝食塩水、pH 7.4に対して透析し、各調製物の純度を、10% Bis-Tris PAGE(BioRad)およびSYPROオレンジタンパク質ゲル染色(Invitrogen)によって確認した。各Fab断片調製物の濃度は、1.4の吸光係数を使用するNanodropを介して決定した。

#### 【0379】

##### (実施例2)

マウスFabを使用するバイオフィルム低減の解析

この実験は、8ウェルのチャンバースライドにおいて、確立されたバイオフィルムの破壊のin vitroモデルについて記載する。この実験で用いられる材料は、チョコレート寒天培地; sBHI(1 mLあたり2 mgのヘムおよび1 mLあたり2 mgのb-NADを伴うBHI); 8ウェルのチャンバースライド(Nunc\* Lab-Tek\* Fisher、型番12-565-18); 0.9%の滅菌食塩水; LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit(Fisher、型番NC9439023)、およびホルマリンであった。

#### 【0380】



1 日目に、NTHI を、単離のために、チョコレート寒天上にこすりつけた (struck) 。次いで、NTHI を、37 および 5 % CO<sub>2</sub> で、20 時間にわたりインキュベートした。翌日、細菌を、sBHI 中 5 mL に懸濁させ、平衡化させ (37 、5 %の CO<sub>2</sub>) 、光学密度を、OD<sub>490</sub> 約 0.65 に調整した。細菌を、平衡化した sBHI (1 mL の細菌懸濁物 + 5 mL の sBHI) 中、1 : 6 に希釈した。次いで、細菌を、37 、5 % CO<sub>2</sub> 中で 3 時間にわたり、静置してインキュベートした (OD<sub>490</sub> を、約 0.65 とする) 。次に、細菌を、平衡化した sBHI 中で、再度 1 : 2500 に希釈し、200 mL の細菌懸濁物を、チャンバースライドの各ウェルに添加した。希釈のため、10 µL の細菌を、エッペンドルフ管内の 990 µL の sBHI へと添加し、8 µL の希釈物を、各チャンバー内の 192 µL の sBHI へと添加し、37 、5 % CO<sub>2</sub> 中で静置してインキュベートした。

10

#### 【0381】

3 日目、16 時間のインキュベーション後、バイオフィルムを攪乱しないようにウェルの角から培地を吸引することにより、チャンバーから培地を吸引した。次いで、200 mL の平衡化した sBHI を各チャンバーに添加し、37 、5 % CO<sub>2</sub> で 8 時間にわたり静置してインキュベートした。8 時間後、培地を吸引し、200 mL の平衡化した sBHI を処置されていない各チャンバーに添加し、ウェルあたり sBHI 中、40 nM または 440 nM 抗体または Fab (以下の各々：マウス IgG1、マウス IgG1 Fab、mAb IHFB2<sub>NTHI</sub>、mAb IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、mAb mIHFB4<sub>NTHI</sub>、および mAb mIHFB4<sub>NTHI</sub> Fab) を添加した。次いで、それらを、37 、5 % CO<sub>2</sub> において静置してインキュベートした。

20

#### 【0382】

4 日目、約 16 時間のインキュベーション後、sBHI を吸引し (aspirate sBHI was aspirated) 、200 mL の滅菌食塩水で 2 回にわたりバイオフィルムを洗浄した。食塩水を吸引し、200 mL の Live / Dead 染料を添加した。次に、1 mL の滅菌 10 mM リン酸緩衝食塩水中に 3 mL の成分 A および 3 mL の成分 B を添加した。次いで、これを、室温で 15 分間にわたり光から保護して静置してインキュベートした。染料を吸引し、200 mL の滅菌食塩水で 2 回にわたりバイオフィルムを洗浄した。食塩水を吸引し、200 mL のホルマリンを添加して、バイオフィルムを固定した。次いで、これを、室温で 15 分間にわたり光から保護して静置してインキュベートした。ホルマリンを吸引し、200 mL の滅菌食塩水で 2 回にわたりバイオフィルムを洗浄した。ガasket を取り外し、スライドガラスにカバースリップを取り付け、カバースリップを、マニキュア液 (nail polish) で封印し、乾燥させてから、共焦点顕微鏡法で観察した。

30

#### 【0383】

別個の実験において、NTHI 86 - 028 NP コロニーをチョコレート寒天での一晚培養物から収集し、培地 (sBHI) 1 mL 当たり 2 µg の - NAD およびヘムを補充した脳心臓注入ブロス中に懸濁した。次に 490 nm での光学密度を 0.65 に調整し、培養物を sBHI で 1 : 6 に希釈してから静置して 37 、5 % CO<sub>2</sub> で 3 時間インキュベートした。次に、培養物を新鮮な sBHI で 1 : 2500 に希釈し、200 µL の懸濁液を 8 ウェルチャンバースライドの各ウェルに分注した。次にスライドを静置して 37 、5 % CO<sub>2</sub> で 3 時間インキュベートした。16 時間後、200 µL の新鮮な sBHI を各ウェルに添加し、スライドをさらに 8 時間インキュベートした。この時点で、培地を各ウェルから吸引し、171 nM の処置物 (treatment) (ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体もしくは Fab 断片) を添加した。バイオフィルムをさらに 16 時間インキュベートした。次にバイオフィルムを洗浄し、FM1 - 43 FX 細菌細胞膜染色 (Invitrogen) で染色し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶かした 16 % パラホルムアルデヒド、2.5 % グルタルアルデヒド、4.0 % 酢酸中で、4 で一晚固定した。固定剤を吸引し、200 µL の 0.9 % 食塩水を各ウェルに添加してからバイオフィルムを Zeiss 510 Meta - laser 走査共焦点顕微鏡で観察した。画像は、Zeiss Zen ソフトウェアに蓄積し、バイオフィルムバイオマスは COMSTAT 2 ソ

40

50

フトウェアで計算した。

【0384】

マウスにおいて、個別に、*I h f B 2 N T H I*および*m I h f B 4 N T H I*の各々を使用する標準的な技法に従い、*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e*のIHFに対して向けられたモノクローナル抗体を調製した。実施例1は、*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e I h f B 2 N T H I*および*m I h f B 4 N T H I*に対して向けられたモノクローナル抗体からのFab（断片抗原結合性）断片の生成について記載している。*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e m I h f B 4 N T H I*ポリペプチドに対して向けられたマウスモノクローナル抗体から生成されたFabは、培地、*m A b I h f B 2 N T H I*、およびマウスIgG1 Fab対照と比べて、バイオフィルムの頑健な破壊を有することが裏付けられた（図2）。具体的には、*m A b m I h f B 4 N T H I F a b*は、*m A b I g G 1 F a b*対照に対してバイオマスの74%の低減を示すバイオフィルムの頑健な破壊が裏付けられた。*m A b I h f B 2 N T H I F a b*は、対照に対してバイオマスの2%増加が裏付けられた（図2）。

10

【0385】

*m A b m I h f B 4 N T H I F a b*の、*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e ( N T H I ) 8 6 - 0 2 8 N P*、*S . a u r e u s 2 9 2 1 3*、*P . a e r u g i n o s a 2 7 8 5 3*、および*B . c e n o c e p a c i a K 5 6 - 2*によって形成されたバイオフィルムを破壊する能力を調べた（図3）。特に、*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e ( N T H I ) 8 6 - 0 2 8 N P*、*S . a u r e u s 2 9 2 1 3*、*P . a e r u g i n o s a 2 7 8 5 3*、および*B . c e n o c e p a c i a K 5 6 - 2*によって形成されたバイオフィルムを、ウェルあたり440nMのマウスIgG1、マウスIgG1 Fab、*m A b I h f B 2 N T H I*、*m A b I h f B 2 N T H I F a b*、*m A b m I h f B 4 N T H I*、および*m A b m I h f B 4 N T H I F a b*と共にインキュベートした（図3）。*m A b m I h f B 4 N T H I*および*m A b m I h f B 4 N T H I F a b*は、全ての被験細菌種によって形成されたバイオフィルムの頑健な破壊が裏付けられた（図3）。

20

【0386】

（実施例3）

マウスFabを使用する中耳炎解析

30

中耳の感染症（または中耳炎、OM）は、世界的に高度に蔓延した疾患であり、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罹患している。OMの社会経済的負荷もまた大きく、費用は、米国だけで、毎年50～60億ドルの間である。OMの優勢な細菌性病原体の3つ全てが、*i n v i t r o*および*i n v i v o*のいずれにおいても、バイオフィルムを形成することが公知であり、近年、臨床医らは、OMの慢性性および再発が、少なくとも部分的には、中耳腔内の細菌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。

【0387】

実際、中耳腔換気用チューブおよび遷延性耳漏を伴う小児患者に由来する耳漏固体を、微生物培養物と組み合わせたeDNAおよびIHFについて標識化した結果は、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指し示す。具体的に、分析された小児耳漏試料15例のうち、9例（60%）が、eDNA（AlexaFlour 594にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgGにより検出されるウサギ抗IHFを使用して標識化された）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%が、陽性の細菌培養物をもたらした。細菌の培養結果は、*H . i n f l u e n z a e*、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*の存在を裏付けた。これらのデータは、DNABIIタンパク質が、他の耳疾患の中でも、中耳腔換気用チューブ後の耳漏における治療標的として用いられうることを示唆する。

40

【0388】

OMについてのチンチラモデルの1つでは、若年のチンチラに、まずウイルス性の「風

50

邪」を施した1週間後、これらに、生菌による接種物で鼻腔内にチャレンジした。「私の子供は風邪をひき、1週間後に耳の感染症になりました」というヒトにおける状態と同様に、チンチラもまた、チャレンジの約1週間後に、ウイルス性の上気道感染症を患う一方で、細菌性OMを発症した。細菌の増加が中耳に到達すると（耳管の上行を介して、または中耳腔への直接的なチャレンジ後において）、細菌は、頑健なバイオフィルムを形成する。したがって、本出願人らは、本明細書で報告する通り、チンチラモデルを意図し、これをすでに実際に用いて、既存のバイオフィルムを速やかに消失させる結果をもたらすIHFによる免疫化の防御効果を裏付けた。このモデルはまた、抗DNABII抗体の受動送達を介する、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である小分子または他の作用剤の送達を介する療法にも有用である。

10

#### 【0389】

チンチラモデルを、ヒトワクチンの開発および前臨床試験に用いるため、ヒト宿主、特に、小児との有意義な免疫学的相応物を確立することが重要である。本出願人らは、NTHIに起因するAOMを伴う小児から回収された滲出物と、実験によるNTHI誘導性OMを伴うチンチラに由来する中耳液とが、OMP P5の免疫優性領域を類似した階層的な方式で認識することを示した（例えば、Novotnyら（2000年）、*Infect*、68巻（4号）：2119～2128頁；Novotnyら（2007年）、9<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, St. Pete Beach, Fla；Novotnyら（2002年）、*Vaccine*、20巻（29～30号）：3590～3597頁を参照されたい）。本出願人らはまた、実験によるOMを伴うチンチラ、自然OMを伴う小児、およびCOPDが増悪した成人のいずれもが、PilAを示すペプチドを非常に類似した方式で認識することも示した（例えば、Adamsら（2007年）、107<sup>th</sup> General Meeting, American Society for Microbiology、2007年、Toronto, ON；Adamsら（2007年）、9<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, St. Pete Beach, Fla.を参照されたい）。したがって、実験によるOMを伴うチンチラと、自然疾患を有する小児とは、少なくとも2つの非類縁NTHIタンパク質であるアドヘシンに対して免疫学的に類似して応答する。近年、この類似が最終的な試験にかけられたが、そこでは、新規の11価のプロテインD-肺炎菌多糖類コンジュゲートワクチンの前臨床有効性試験を実施するのに、チンチラのAV-NTHI重感染モデルが用いられた。チンチラにおいて得られたデータが34%の有効性を予測する一方、小児で調べたところでは、*H. influenzae*誘導性OMに対して得られた有効性が35.6%であり（例えば、Novotnyら（2006年）、*Vaccine*、24巻（22号）：4804～11頁；およびPrymulaら（2006年）、*Lancet*、367巻（9512号）：740～8頁を参照されたい）、それにより、OMワクチン候補物質の開発および試験に対するこのモデルの関与性が強く裏付けられた。

20

30

#### 【0390】

方法：

40

生成された抗体の有効性を決定するために、NTHI細菌を、チンチラの中耳腔に注射して、バイオフィルムを形成させた。特に、中耳疾患のエビデンスのない成体チンチラ（*Chinchilla lanigera*）を得（Rauscher's Chinchilla Ranch, LLC）、7日間休息させ、その後、滅菌、発熱物質不含食塩水で希釈した中耳骨胞（bulla）あたり1000コロニー形成単位（CFU）の分類不能*Haemophilus influenzae*番号86-028NPによる経中耳骨胞チャレンジ（transbullar challenge）を行った（0日目（0））（図4）。4日目および5日目に、342nMのFab断片溶液を各中耳腔中に注入した（中耳骨胞あたり100μl；342nM）（図4）。6日目（6）に、動物を殺した。実験には、マウスmAb IgG1 Fab断片（4匹のチンチラ）、マウスmAb IhfB

50

2 N T H I F a b 断片 ( 4 匹のチンチラ )、およびマウス m A b m I h f B 4 N T H I F a b 断片 ( 4 匹のチンチラ ) を使用するコホートを含めた。

【 0 3 9 1 】

中耳液を収集し、一定量を系列希釈し、相対的な浮遊細菌負荷を定量するためにチョコレート寒天に塗布した。残存液を 1 0 0 0 × 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の両画分を瞬時冷凍してから - 8 0 で保存した。中耳粘膜および接着した細菌バイオマスをデジタル的にイメージングし、予め秤量した微量遠心分離管に収集し、1 . 0 m l の滅菌した 0 . 9 % 塩化ナトリウム中でホモゲナイズした。ホモジネートはまた、組織 / バイオマスの 1 m g 当たりの中耳腔内に接着した細菌の集団を定量するために、以前の通り系列希釈してプレーティングした。残存する試料を瞬時冷凍してから - 8 0 で保存した。培養プレートを加湿した雰囲気中、3 7 で 2 4 時間インキュベートしてから P r o t o c o l 2 機器 ( S y n b i o s i s ) を介して細菌コロニーを計数した。

10

【 0 3 9 2 】

ビデオ耳鏡検査およびティンパノメトリー。デジタルカメラシステムに連結された 0 度、3 インチプローブを使用するビデオ耳鏡検査 ( M e d R x、L a r g o、F L ) を利用して O M の徴候 (例えば、鼓膜炎および / または中耳腔における液体の存在) をモニターした。ティンパノメトリーは M A D S E N O t o f l e x ティンパノメーターで実施し、データは O T O s u i t e ソフトウェア ( O t o m e t r i c s、S c h a u m b u r g、I L ) で分析した。O M の全体的な徴候は、確立された 0 から 4 + のスケールに盲検的に等級付けし、2 . 0 のスコアの中耳は、中耳液が鼓膜の後ろに見ることができる場合、O M について陽性で見なした。鼓膜が外耳道内の閉塞により (すなわち、耳垢蓄積により) 見ることができないならば、その耳は毎日の計数から除外した。確立されたプロトコールに従って、各中耳は独立していると考えられ、各コホートについて、O M の中耳の百分率を計算した。

20

【 0 3 9 3 】

中耳腔内の残存バイオフィルムをランク付けするために、中耳画像はスクランブルされ、7 人の個人が盲検的によく調べた。確立された規程を使用して、0 から 4 までのスコアを各画像に割り当てた : 0 : 見ることができるバイオフィルムはない、1 : バイオフィルムは中耳腔の 2 5 % を満たす、2 : バイオフィルムは中耳腔の > 2 5 % から 5 0 % を満たす、3 : バイオフィルムは中耳腔の > 5 0 % から 7 5 % を満たす、4 : バイオフィルムは中耳腔の > 7 5 % から 1 0 0 % を満たす。

30

【 0 3 9 4 】

このランク付け / スコア付けスケールは、以下の表 2 に詳述されており、各動物の中耳内に残存するバイオマスの相対量を示す。

40

50

## 【表 4】

表4

スコア	基準
0	バイオマスの証拠は見られない
1+	バイオマスは、中耳腔のうちの $\leq 25\%$ を満たす。骨中隔の、内部中耳骨胞との接合部は、目視可能である。
2+	バイオマスは、中耳腔のうちの $>25\%$ から $\leq 50\%$ までを満たす。骨中隔が、中耳骨胞の内部と会合する地点を視覚化することは不可能である。
3+	バイオマスは、中耳腔のうちの $>50\%$ から $\leq 75\%$ までを満たす。バイオマスは、骨中隔の全長のうちの $>50\%$ を覆う。
4+	バイオマスは、中耳腔のうちの $>75\%$ から $\leq 100\%$ までを満たす。骨中隔は目視不可能であり、バイオマスにより覆い隠されている。

10

## 【0395】

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 (TNF、IL - 1、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 10、IL - 12 p70、IL - 13 および IL - 17 A) の相対量を、BD Cytometric Bead array (BD Biosciences) を製造業者の指示に従って使用して決定し、BD Accuri C6 サイトメーターでサンプルを評価した。データを FlowJo V\_10 ソフトウェアを用いて解析した。

20

## 【0396】

中耳バイオフィルムおよび粘膜の組織学的解析を実施するために、中耳骨胞を画像処理後に 10% 中性緩衝ホルマリンに入れ、4 で保存した。中耳骨胞を室温で 2 時間、水ですすぎ、次いで、新鮮な 0.1 M Tris (pH 6.95) 中に一晚入れ、続いて、さらに水ですすいだ。次いで、中耳骨胞を 0.35 M EDTA - 0.1 M Tris (pH 6.95) 中に入れ、シュウ酸アンモニウム試験で陰性が達成されるまで、37、1000 ワットに設定した H2800 Energy Beam Sciences マイクロ波プロセッサを用いて 2 時間サイクルで脱灰した。次いで、中耳骨胞をパラフィン中に包埋し、5  $\mu$ m 厚の切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色した。

30

結果：

## 【0397】

図 5 (A) に示されるように、IgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウス mAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fab のいずれかが投与されたチンチラについて、Haemophilus influenzae (NTHI) 86 - 028 NP チャレンジ後、4、5 および 6 日目に平均耳鏡検査スコアを決定した。Welch Allyn MacroView 耳鏡を使用して、各動物の鼓膜を可視化し、0 ~ 4+ スケールで盲検的にランク付けし、2.0 のスコアは、中耳腔内の流体の存在、すなわち、中耳炎を示した (Novotny ら、(2006 年) Vaccine 第 24 巻：4804 頁)。mAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fab の投与は、IgG1 Fab および Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab 対照と比較して、より低い平均耳鏡検査スコアをもたらした (\*P 0.05 および \*\*P 0.01)。

40

## 【0398】

図 5 (B) は、IgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab またはマウス mAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fab のいずれかが投与されたチンチラについて、Haemophilus influenzae (NTHI) 86 - 028 NP チャレンジ後の 0 日目、4

50

日目および6日目の代表的な耳鏡検査画像を示す。4日目までに、鼓膜の後ろに中耳液が見られる。4日目および5日目に、チンチラにIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与された。6日目に、IgG1 Fab（対照）を投与されたチンチラにおいて中耳液が見られ、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、鼓膜の肥厚が見られることもあり、これらの両方とも、バイオフィルムの存在を示す。6日目に、mAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabを投与されたチンチラにおいて、非炎症鼓膜が見られ、これは、バイオフィルムの消散を示す。

#### 【0399】

図6(A)に示されるように、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける粘膜バイオフィルムのミリグラム(mg)あたりのHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPのコロニー形成単位(CFU)の定量を実施した。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ(処置は、4および5日目に実施した)後の6日目に実施した。IgG1 FabおよびIhfB2<sub>NTHI</sub> Fab対照と比較して、mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabを用いる2回の処置の受容1日後の中耳バイオフィルム内で、および粘膜に対して、有意に少ないHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPが接着した(図6(A))(p=0.01)。

#### 【0400】

さらに、図6(B)に示されるように、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおいて、中耳液のミリグラム(mg)あたりのHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPのコロニー形成単位(CFU)の定量を実施した。IgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの間で、中耳液中の回収可能なHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPの相対濃度間に相違は観察されなかった(図6(B))。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、この研究は短い時間枠(チャレンジから試料回収まで6日のみ)で実施したので、DNABIIタンパク質先端部に対して向けられた抗体が、バイオフィルム崩壊および残存する細菌の放出を誘導するので、相違が観察されなかった可能性があると考えられる。この短い時間枠は、放出された(浮遊)細菌のクリアランスを観察するためには十分に長くなかった可能性があると考えられる。

#### 【0401】

図7(A)に示されるように、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから集められた、中耳粘膜および粘膜バイオフィルムの量(グラム、g)の定量も実施した。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後6日目に実施した。図7(A)に示されるように、mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabを用いる2回の処置の1日後に、中耳内により少ないバイオマスが存在した。

#### 【0402】

図7(B)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラから回収された中耳液(MEF)の容量(マイクロリットル、mL)の定量を示す。定量は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチ

チャレンジ後の6日目に実施した。IgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウスmAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabが投与されたチンチラ間で、MEFの容量間に相違は観察されなかった。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、この研究は短い時間枠（チャレンジから試料回収まで6日のみ）で実施し、DNABIIタンパク質先端部に対して向けられた抗体が、バイオフィルム崩壊および残存する細菌の放出を誘導するので、相違が観察されなかった可能性があると考えられる。この短い時間枠は、IgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab、またはマウス mAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置されたチンチラ間で回収された中耳液の相対容量の相違を観察するためには十分に長くなかった可能性があると考えられる。

#### 【0403】

mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabの、チンチラの中耳において形成されたバイオフィルムを破壊する能力を評価するために、粘膜バイオマス解析も実施した。図8(A)は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab、またはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラについて7名の個人によって盲検的によく調べられた (reviewed) 粘膜バイオマススコアを示す。粘膜バイオフィルムスコアスケールを使用して、中耳腔内の残存するバイオフィルムをランク付けした。確立された規程 (rubric) を使用して、0~4のスコアを以下の通りに各画像に割り当てた：ゼロ (0)：見ることができるバイオフィルムなし、1：バイオフィルムが中耳腔の>0~25%を満たす、2：バイオフィルムが中耳腔の>25%~50%を満たす、3：バイオフィルムが、中耳腔の>50%~75%を満たす、4：バイオフィルムが、中耳腔の>75%~100%を満たす。IgG1 Fab対照またはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照が投与されたチンチラと比較して、mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて、有意に低い粘膜バイオマススコアが観察された (\* P 0.05および\* P 0.001)。

#### 【0404】

Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後のIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはマウスmAb mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかの最終用量の受容1日後の耳鏡検査によって得られた代表的な中耳画像が図8(B)に示されている。mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いる処置は、残存するバイオフィルムがほとんどないし全くないことを示すが、IgG1 FabまたはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab (対照) を用いる処置は、中耳中の残存する多量のバイオフィルムを示す。

#### 【0405】

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を測定して、炎症に対するmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabの効果を評価した。図9は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabまたはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける、清澄化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、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17A、IL-12p70およびTNF) の相対量を示す。定量は、ミリリットル (ml) MEFあたりのピコグラム (pg) サイトカインを提供するように実施した。Ihfb2<sub>NTHI</sub> FabおよびIgG1 Fab対照を用いて処置した中耳において、mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabに対してより多量の炎症誘発性サイトカインが見られた。最大量の抗炎症性サイトカインIL-4 (データは示さず)、IL-10 (図9に示されている)、およびIL-13 (データは示さず) が、IgG1 FabおよびIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照と比較してmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置した中耳において観察された。

#### 【0406】

図10は、チンチラにおける中耳の組織学的解析を示す。チンチラに、Haemoph

*influenzae* (NTHI) 86-028NP チャレンジおよびバイオフィルム形成後にマウス *I h f B 2 N T H I F a b* またはマウス *m I h f B 4 N T H I F a b* のいずれかが投与された。染色は、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を用いて実施した。画像は、10X 対物レンズを使用して入手した。スケールバーは、100  $\mu$ m に相当する。左の画像は、マウス *I h f B 2 N T H I F a b* 対照が投与された動物から得た中耳を示す。この組織切片は、中耳腔内に存在する頑健なバイオフィルムならびに PMN の流入、粘膜下浮腫および病巣の出血によって証明されるような有意な炎症の徴候を示す。全体的に、マウス *I h f B 2 N T H I F a b* 対照の投与後に、疾患の治療 (remediation) または既存の細菌バイオフィルムの破壊はなかった。逆に、右の画像は、マウス *m I h f B 4 N T H I F a b* が投与された動物から得た中耳を示す。この組織切片は、中耳腔内にバイオフィルムの痕跡が全くないことを示す。加えて、制限された粘膜下病巣の出血を伴う粘膜上皮の幾分かの細胞崩壊はあるものの、これらの変化は、左の画像と比較して格別に軽度である。全体的に、マウス *m I h f B 4 N T H I F a b* の投与は、この前臨床研究において得られた他のデータと十分に一致して、既存の細菌バイオフィルムの完全根絶および有意に低減された炎症の徴候の両方をもたらした。

10

【0407】

(実施例4)

ウサギ *F a b* を使用する中耳炎解析

方法：

実施例1は、*Haemophilus influenzae I h f B 2 N T H I* および *m I h f B 4 N T H I* に対して向けられたウサギポリクローナル抗体からの、ならびにナイーブウサギ血清 *I g G* からの *F a b* (断片抗原結合性) 断片の生成を記載する。各 *F a b* 調製物 (ウサギポリクローナルナイーブ *F a b*、ウサギポリクローナル *I h f B 2 F a b*、およびウサギポリクローナル *m I h f B 4 F a b*) の純度を、PAGE によって確認した (図11)。図11は、10% Bis-Tris PAGE (BioRad) および SYPRO オレンジタンパク質ゲル染色 (Invitrogen) によって確認されたような、各 *F a b* 調製物 (3種の別個の調製物：ナイーブ、*I h f B 2* および *m I h f B 4*) の純度を示す。

20

【0408】

図11は、ポリクローナルウサギ抗 *I h f B 2 N T H I*、抗 *m I h f B 4 N T H I*、およびナイーブウサギ血清から生成された *F a b* 断片を使用する成体チンチラの中耳において、*Haemophilus influenzae* (NTHI) 86-028NP によって形成されたバイオフィルムの破壊を解析する方法を描示する。実験には、ナイーブウサギ血清 *I g G F a b* 断片、ウサギ抗 *I h f B 2 N T H I F a b* 断片、およびウサギ抗 *m I h f B 4 N T H I F a b* 断片を使用するコホートを含んでいた。

30

【0409】

ウサギポリクローナル抗体から生成された *F a b* (断片抗原結合性) 断片の有効性を決定するために、NTHI 細菌を、チンチラの中耳腔に注射して、バイオフィルムを形成させた。特に、中耳疾患のエビデンスのない成体チンチラ (*Chinchilla lanigera*) を得 (Rauscher's Chinchilla Ranch, LLC) 、7日間休息させ、その後、滅菌、発熱物質不含食塩水で希釈した、中耳骨胞あたり1000コロニー形成単位 (CFU) の分類不能 *Haemophilus influenzae* 番号86-028NPを用いる経中耳骨胞チャレンジ (*transbullar challenge*) を行った (0日目 (0)) (図11)。次いで、4日目および5日目または4、5および6日目のいずれかに、342 nM の *F a b* 断片溶液を各中耳腔中に注入した (中耳骨胞あたり100  $\mu$ l ; 342 nM)。4および5日目に *F a b* 溶液を投与したチンチラについて、6日目または12日目のいずれかで、コホートあたり3匹のチンチラを 殺した (2用量実験) (図11)。4、5および6日目に投与されたチンチラについては、13日目にコホートあたり3匹のチンチラを 殺した (3用量実験)。殺後、チンチラを画像化し、中耳粘膜を収集し、接着したバイオフィルムを評価し、中耳液を

40

50



収集し、細菌の定量を実施し、サイトカイン多重アッセイを使用して中耳液を評価した。

【0410】

中耳液を調製する方法、ビデオ耳鏡検査およびティンパノメトリー、残存バイオフィルムランク付けおよびサイトカインの定量は、実施例3に記載されたように実施した。

【0411】

ウサギポリクローナルmIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの、粘膜バイオフィルムを低減する能力を決定した。図12は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にウサギIgG1 Fab、ウサギIhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、またはウサギmIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける粘膜バイオフィルムのミリグラム (mg) あたりのコロニー形成単位 (CFU) Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPの定量を示す。定量は、以下の用量/ 殺の組合せについて実施した：(1) それぞれのウサギFabの2用量を投与して1日後に 殺した；(2) それぞれのウサギFabの2用量を投与して7日後に 殺した；および(3) それぞれのウサギFabの3用量を投与して7日後に 殺した。Fabの用量をHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後の4および5日目(2用量)または4、5および6日目(3用量)に投与した。

10

【0412】

3つの用量/ 殺組合せ全てにおいて、非特異的IgG1 FabおよびIhfB2<sub>NTHI</sub> Fab対照と比較して、mIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの投与後に、有意に少ないHaemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPしか、中耳粘膜に対して接着せず、バイオフィルム内に存在しなかった(図12)。2用量のmIhfB4 Fab断片の投与は、確立された中耳バイオフィルムの根絶において3用量に匹敵した(図12)。図12に示されるように、2回の治療用量の投与の7日後に、mIhfB4免疫原に対するFab断片を受容した動物は、中耳から得たこの生物学的試料内に有意に少ない細菌しか有していなかった(\* \* P 0.01)。

20

【0413】

図13は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にウサギポリクローナルIgG1 Fab、IhfB2<sub>NTHI</sub> Fab、またはmIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける、中耳粘膜のミリグラム (mg) あたりのコロニー形成単位 (CFU) Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPの定量を示す。定量は、以下の用量/ 殺組合せについて実施した：(1) それぞれのFabの2用量を投与し、1日後に 殺した、(2) それぞれのFabの2用量を投与し、7日後に 殺した、および(3) それぞれのFabの3用量を投与し、7日後に 殺した。Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジ後に、Fabの用量を、4および5日目(2用量)に、または4、5および6日目(3用量)に投与した。DNABIIタンパク質先端部に対して向けられた抗体が、バイオフィルム崩壊および残存細菌の放出を誘導し得るので、最終用量の投与の1日後の中耳液中の回収可能なNTHIの相対濃度の相違は予測せず、観察もしなかった。しかし、2または3用量のmIhfB4 Fab断片の受容1週間後に、IgG1 FabまたはIhfB2<sub>NTHI</sub> Fabを受容したコホートのいずれかと比較して、中耳液内のNTHIの有意な低減が観察された(図13)(それぞれ、P 0.01およびP 0.05)。mIhfB4に対して向けられたFab断片の投与により、Fabの最後の用量の投与後少なくとも1週間治療効果を継続して媒介し、データは、この投与計画は適応性があり最適化可能であることを示唆している。

30

40

【0414】

ウサギポリクローナルmIhfB4<sub>NTHI</sub> Fabの、バイオフィルムを破壊する能力を評価するために、平均粘膜バイオフィルムスコアを決定した。図14は、Haemophilus influenzae (NTHI) 86-028NPチャレンジおよびバ

50

イオフィルム形成後にウサギポリクローナルIgG1 Fab、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fab、またはmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabのいずれかが投与されたチンチラの平均粘膜バイオフィルムスコアを示す。定量は、以下の用量/殺組合せについて実施した：(1)それぞれのFabの2用量を投与し、1日後に殺した、(2)それぞれのFabの2用量を投与し、7日後に殺した、および(3)それぞれのFabの3用量を投与し、7日後に殺した。Haemophilus influenzae(NTHI)86-028NPチャレンジ後に、Fabの用量を、4および5日目(2用量)に、または4、5および6日目(3用量)に投与した。粘膜バイオフィルムスコアスケールを使用して、中耳腔内の残存するバイオフィルムをランク付けした。確立された規格を使用して、0~4のスコアを以下の通りに各画像に割り当てた：ゼロ(0)：見ることができないバイオフィルムなし、1：バイオフィルムが中耳腔の>0~25%を満たす、2：バイオフィルムが中耳腔の>25%~50%を満たす、3：バイオフィルムが、中耳腔の>50%~75%を満たす、4：バイオフィルムが、中耳腔の>75%~100%を満たす(図14)。

#### 【0415】

図14に示されるように、ウサギポリクローナルIgG1 Fab対照またはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fab対照が投与されたチンチラと比較して、ウサギポリクローナルmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて、有意に低い平均粘膜バイオマススコアが観察された(\*P 0.05および\*\*P 0.01)。それぞれのFabの2用量を投与し、1日後に殺したデータについては、IgG1 FabまたはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fabを受容したコホートのいずれかと比較してmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて有意に低い平均粘膜バイオマススコアが観察された(P 0.05)(図14)。それぞれのFabの2用量を投与し、7日後に殺したデータについては、IgG1 Fabを受容したコホートと比較して(P 0.05)、Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fabを受容したコホートと比較して(P 0.01)、mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて有意に低い平均粘膜バイオマススコアが観察された(図14)。それぞれのFabの3用量を投与し、7日後に殺したデータについては、IgG1 FabまたはIhfb2<sub>NTHI</sub> Fabを受容したコホートのいずれかと比較してmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabを用いて処置したチンチラにおいて有意に低い平均粘膜バイオマススコアが観察された(P 0.05)(図14)。DNABIIタンパク質先端部に対して向けられた抗体が、バイオフィルム崩壊を誘導するので、mIhfb4 Fab断片が投与された動物の中耳における粘膜バイオフィルムの有意な減少が、2用量の受容1日後に観察された。2または3用量のmIhfb4 Fab断片の受容1週間後に、この減少は維持された。mIhfb4に対して向けられたFab断片の投与により、最後の用量の受容後、少なくとも1週間治療効果を継続して媒介し、データは、この投与計画は適応性があり、最適化可能であることを示唆している。

#### 【0416】

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を測定して、炎症に対するmIhfb4<sub>NTHI</sub> Fabの効果を評価した。図15は、Haemophilus influenzae(NTHI)86-028NPチャレンジおよびバイオフィルム形成後にナイーブウサギIgG Fab、ウサギ抗Ihfb2<sub>NTHI</sub> IgG Fab、またはウサギ抗mIhfb4<sub>NTHI</sub> IgG Fabのいずれかが投与されたチンチラにおける、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の相対量を示す。2用量のFab断片が投与され、第2の用量の受容1日後に殺したチンチラから流体を収集した。測定された炎症誘発性サイトカインには、以下が含まれていた：IL-1、IL-6、IL-8、IL-12p70、IL-17A、TNFおよびIFN。測定された抗炎症性サイトカインには、以下が含まれていた：IL-4、IL-10およびIL-13。ウサギ抗mIhfb4<sub>NTHI</sub> IgG Fabを用いて処置された中耳と比較して、ウサギ抗Ihfb2<sub>NTHI</sub> Fabまたは非特異的ウサギIgG Fabを用いて処置された中耳において炎症誘発性サイトカインのより大きな相対量が観察された(図15に示される)。ウサギ抗mIhfb4<sub>NTHI</sub> Fa

bを用いて処置された中耳において最大量の抗炎症性サイトカイン（IL-4、IL-10およびIL-13）が観察された（図15に示される）。

【0417】

無傷のウサギポリクローナルおよびマウスモノクローナルIgGに対するIgG Fab断片の効力のまとめを、以下の表5に示す。

【表5 - 1】

表5

特徴:		<i>in vitro</i> 対 NTHI バイオ フィルム		<i>in vivo</i> (NTHI 誘発中耳炎のチンチラモデル)			
宿主/ 標的	IgG のクロ ーン性/ IgG または Fab 断片	予め形成 されたバ イオフィ ルムに適 用された 濃度	バイオマ スの低減 <sup>1</sup>	中耳腔に 注入され た濃度	CFU NTHI/中 耳粘膜バ イオフィ ルム 1mg の Log 低 減 <sup>2</sup>	中耳バ イオフ イルム スコア <sup>3</sup>	<i>in vivo</i> 研究 コー ド <sup>4</sup>
マウス /Ihfb2	モノクロ ーナル/ IgG	171 nM	0	342.5 nM	0	3.3	Po Mo
マウス /Ihfb2	モノクロ ーナル/ Fab	171 nM	0	342.5 nM	0	2.7	mAb Fab
マウス /mIhfb4	モノクロ ーナル/ IgG	171 nM	71%	342.5 nM	1.8-log <sub>10</sub>	1.4	Po Mo
マウス /mIhfb4	モノクロ ーナル/ Fab	171 nM	77%	342.5 nM	3.9-log <sub>10</sub>	1.0	mAb Fab

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

ウサギ/ IhfB2	ポリクロ ーナル/ IgG	171 nM	0	342.5 nM	ND	ND	Po Mo
ウサギ/ IhfB2	ポリクロ ーナル/ Fab	171 nM	0	342.5 nM	0.4-log <sub>10</sub>	3.7	Rab pAb Fab
ウサギ/ mIhfB4	ポリクロ ーナル/ IgG	171 nM	75%	342.5 nM	ND	ND	Po Mo
ウサギ /mIhfB4	ポリクロ ーナル/ Fab	171 nM	78%	342.5 nM	5.5-log <sub>10</sub>	1.0	Rab pAb Fab

10

20

<sup>1</sup> COMSTAT2 によって決定される、ポリクローナル血清についてはナイーブ血清またはモノクローナル血清については非特異的マウス IgG1 それぞれに対する。

<sup>2</sup> ポリクローナル血清についてはナイーブ血清またはモノクローナル血清については非特異的マウス IgG1 それぞれに対する、最終用量の受容後 1 日。

<sup>3</sup> バイオマススコア:0=バイオマスなし;1=0~25%中耳腔が細菌バイオマスで満たされた;2=>25~50%満たされた;3=>50~75%満たされた;4=>75~100%満たされた。

30

<sup>4</sup> PoMo:ウサギポリクローナル抗体およびマウスモノクローナル抗体有効性研究;mAb Fab:マウスモノクローナル IgG Fab 断片有効性研究;Rab pAb Fab:ウサギポリクローナル IgG Fab 断片有効性研究。

<sup>5</sup> ND とは、未実施、すなわち、これらの抗体は *in vivo* 試験されていないことを指す。

40

## 【 0 4 1 8 】

表 5 は、多様なマウスモノクローナルの各々を生成するために使用される標的 (I h f B 2 および m I h f B 4 ) を示し、これらの標的の各々に対する I g G および F a b 断片のデータを提供する。表 5 はまた、多様なウサギポリクローナル血清の各々を生成するために使用される標的 (I h f B 2 および m I h f B 4 ) を示し、これらの標的の各々に対する I g G および F a b 断片のデータを提供する。示した実験はすべて、高度に制御された治療研究として実施された。表は、上記の実施例 2、3 および 4 で提示した実験に関する定量の概要を示しかつ提供し、「Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clear

50

ance in vivo.」(2016年)EBioMedicine.8月;10巻:33~44頁において発表されたデータ(「PoMo」研究コード)も提示する。in vitro対NTHIバイオフィルムについて、使用した方法は上記の実施例2において記載したとおりであった。示したような抗体またはFab断片の正確な濃度を、予め形成されたバイオフィルムに適用した。特に、使用した濃度は、in vitro分析で使用した全抗体および断片について171nMであった。in vivo研究について、使用した方法は上記の実施例3および4において記載したとおりであった。バイオフィルム形成を開始するために各動物の耳に送達された正確な接種物(Haemophilus influenzae(NTHI)86-028NP)を制御し、耳の注入は示したような抗体または断片の特定量で実施した。特に、使用した濃度は、in vivo分析で使用した全抗体および断片について342.5nMであった。

10

#### 【0419】

マウス抗体およびFab断片を使用するin vitroバイオフィルム解析において、マウスモノクローナルmIhfB4 IgGは、バイオマスの71%低減を示し、マウスモノクローナルmIhfB4 Fabは、バイオマスの77%低減を示した。NTHI誘発中耳炎のin vivoチンチラモデルについて、マウスモノクローナルmIhfB4 IgGは、CFU NTHI/mg 中耳粘膜バイオフィルムの $1.8 - \log_{10}$ 低減を示し、マウスモノクローナルmIhfB4 Fabは、CFU NTHI/mg 中耳粘膜バイオフィルムの $3.9 - \log_{10}$ 低減を示した。これらの測定は、最終用量の受容1日後に実施し、非特異的マウスIgG1との比較である。マウスIhfB2 IgGは、3.3の中耳バイオフィルムスコアを示した。マウスIhfB2 Fabは、2.7の中耳バイオフィルムスコアを示した。マウスmIhfB4 IgGは、1.4の中耳バイオフィルムスコアを示した。マウスmIhfB4 Fabは、1.0の中耳バイオフィルムスコアを示した。

20

#### 【0420】

ウサギ抗体およびFab断片を使用するin vitroバイオフィルム解析では、ウサギポリクローナルmIhfB4 IgGは、バイオマスの75%の低減を示し、ウサギポリクローナルmIhfB4 Fabは、バイオマスの78%の低減を示した。NTHI誘発中耳炎のin vivoチンチラモデルについて、ウサギポリクローナルmIhfB4 Fabは、CFU NTHI/mg 中耳粘膜バイオフィルムの $5.5 - \log_{10}$ 低減を示したが、ウサギポリクローナルIhfB2 Fab(対照)は、CFU NTHI/mg 中耳粘膜バイオフィルムの $0.4 - \log_{10}$ 低減を示した。ウサギポリクローナルmIhfB4 Fabは、1.0の中耳バイオフィルムスコアを示したが、ウサギポリクローナルIhfB2 Fab(対照)は、3.7の中耳バイオフィルムスコアを示した。

30

#### 【0421】

表5に提供した「PoMo」in vivo研究コードは、「Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo.」(2016年)EBioMedicine.8月;10巻:33~44頁において発表されたデータを指す。

(実施例5)

40

受動免疫

#### 【0422】

本明細書に記載される方法を使用して、非免疫対象に受動免疫を付与することができる。所与の抗原に対する受動免疫は、本明細書に開示される特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体断片または抗原結合性断片の移入を介して付与され得る。抗体のドナーおよびレシピエントは、ヒト対象の場合もあり、非ヒト対象の場合もある。それに加えて、またはその代わりに、抗体組成物は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体断片または抗原結合性断片をコードする、単離されたまたは組換えポリヌクレオチドを含み得る。

#### 【0423】

50

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危険性をもたらず場合、レシピエント対象が免疫無防備状態 (immuno-compromised) である場合、またはレシピエント対象が即時的な免疫を必要とする場合に付与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与方式と符合する形で調製することができる。組成物は、抗体断片および/または抗原結合性断片を、単独で、またはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、in vivoで生成された抗体、in vitroで生成された抗体、精製もしくは部分精製された抗体、もしくは全血清と組み合わせて含み得る。投与は、抗体組成物の単回用量を含む場合もあり、初回投与に続いて、1回または複数回の追加免疫用量を含む場合もある。追加免疫用量は、初回用量の1日後、2日後、3日後、1週間後、2週間後、3週間後、1カ月後、2カ月後、3カ月後、6カ月後、もしくは12カ月後、または他の任意の時点において施すことができる。追加免疫用量は、対象の抗体力価を評価した後で投与することもできる。バイオフィーム形成の間、療法の有効性をモニタリングする方法を使用できる。

10

#### 【0424】

バイオフィーム形成をモニタリングするためにビデオ耳鏡検査およびティンパノメトリーを使用できる。デジタルカメラシステム (Med Rx、Largo、FL) に接続された0度、3インチプローブを使用するビデオ耳鏡検査を使用して (iss utilized)、OMの徴候 (例えば、鼓膜炎および/または中耳腔中の流体の存在) をモニタリングする。ティンパノメトリーは、MADSEN Otoflexティンパノメーターを用いて実施し、データは、OTOSuiteソフトウェア (Otometrics、Schaumburg、IL) を用いて解析する。OMの全体的な徴候を、確立された0~4+スケールで盲検的に等級付けし、2.0のスコアを有する中耳は、鼓膜の後ろの中耳液を見ることが出来る場合にはOMについて陽性とみなした。外耳道内の閉塞により (すなわち、耳垢蓄積のために) 鼓膜を見ることができない場合には、その耳をその日のカウントから除外できる。確立されたプロトコールによって、各中耳は、独立しているとみなされ、各コホートについて、OMを有する中耳のパーセンテージを算出した。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生成は、本明細書に開示される方法を使用して評価できる。

20

#### 【0425】

(実施例6)

30

##### 口腔疾患の処置

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因には、多数の口内細菌 (例えば、Aggregatibacter actinomycetemcomitans、Porphyromonas gingivalis) が関与している。これらの細菌の病因についての探索は、有効な動物モデルの欠如により妨げられている。特定の細菌の病原性を探索することの難題の1つは、外因性細菌が、動物の口腔内に導入された場合のバイオフィームを確立することの困難である。歯周炎の動物モデルは開発されているが、接種された動物の口腔から培養可能な細菌が回収されることはまれである。特定の細菌の病原性を評価し得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ことに大きな一助となるであろう。

40

#### 【0426】

本明細書に記載の組成物を使用して、口腔疾患を処置できる。有効性を試験するために、機械加工したチタン製の歯科インプラント (1.2 x 4.5 mm) の表面は、A103によるグリットブラスト (100 μm)、およびHClによるエッチング (pH 7.8、80 で20分間にわたる) によって修飾できる。機械加工およびナノテクスチャー処理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日間にわたりインキュベートする。インプラント上の細菌バイオフィームは、LIVE/DEAD (登録商標) BacLight (商標) で染色した後、SEMにより解析するほか、共焦点レーザー走査顕微鏡法により解析する。バイオフィームが確立されたインプラントお

50

よびバイオフィルムが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。i n v i v oで配置されたインプラントにおけるバイオフィルムの存在を検出するため、2日後に唾液およびインプラントの口腔表面から細菌試料を収集する。A aは、培養によるほか、P C R解析によっても検出できる。様々な時点、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についてのマイクロCT解析および組織学的解析を実施できる。本明細書に開示される方法および組成物は、本明細書に記載の組成物を使用してこれらのバイオフィルムを低減および/または排除するための治療的戦略ならびに予防的戦略の両方を開発する。感染対照と比較した、発赤、炎症および出血の減少は、バイオフィルム減少および/または排除を示すであろう。加えて、感染対照と比較した、インプラントスクリーンの炎症性または炎症誘発性組織像の減少または不在およびトルク除去力の維持は、バイオフィルム低減および/または排除を示す。

10

## 【0427】

(実施例7)

## ライム病

この実験は、ライム病を処置するために記載されるような組成物の前臨床試験のマウスモデルを提供する。Dresserら、Pathogens、5巻(12号)、e1000680号、Epub、2009年12月4日を参照されたい。ライム病は、スピロヘータである微生物Borrelia burgdorferiにより引き起こされる。B. burgdorferiは、Ixodes種のダニの咬刺を介して伝染し、その後、血流を介して他の組織および器官へと拡散する。

20

## 【0428】

この動物モデルでは、C3H/HeNマウスに、背側皮下注射および腹腔内注射を介して、または静脈内注射を介してスピロヘータを注射する。感染の約7日後に、組織および器官における微生物負荷を評価し、病態を評価するために、血液検体および生検検体を回収する。本明細書に開示される方法および組成物は、チャレンジの後に形成され、疾患の病因および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じるB. burgdorferiのバイオフィルムを低減させ、かつ/または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略の両方を開発することを意図する。

## 【0429】

30

(実施例8)

## 嚢胞性線維症

この実験は、嚢胞性線維症を処置する作用剤についての前臨床試験のためのブタモデルを提供する。Stoltzら(2010年)、Science、Translational Medicine、2巻(29号):29~31頁を参照されたい。嚢胞性線維症とは、CF膜貫通コンダクタンス制御因子(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」と呼ばれる遺伝子内に欠損を保有するように特異的に交配され、CFブタと呼ばれているブタが、複数の細菌種による下気道感染症を包含する、CF肺疾患の顕著な特徴を自発的に発生させる。ブタを本明細書に記載のとおり作用剤で免疫化して、疾患および関連する病態の徴候の改善を評価するために、1)これらのCFブタを、ポリペプチドまたは他の免疫原性作用剤で免疫化し、これにより、肺における細菌性バイオフィルムを根絶する抗体の形成を誘導し得(能動的な免疫化の後で、IHFに対する抗体により、チンチラの中耳内に存在するバイオフィルムを根絶した方式と同様に)、これらの動物の肺に、噴霧化を介して作用剤を送達し得る。

40

## 【0430】

(実施例9)

## 結核

本出願人らはまた、結核(TB)の前臨床モデルも提供する。Ordwayら(2010年)、Anti- Agents and Chemotherapy、54巻:182

50

0 頁を参照されたい。微生物である *Mycobacterium tuberculosis* は、広がりつつある世界的な流行の原因である。最新の数字は、毎年約 800 万例の新たな TB 症例が認められ、毎年約 270 万例が TB により死亡していることを示唆する。HIV を伴う個体の共感染症としてのこの微生物の役割 (HIV に感染する約 4500 万例のうち、約 1/3 が、*M. tuberculosis* にも共感染していると推定されている) に加えて、単離菌が、複数の薬物に対して高度に耐性となっており、四半世紀超にわたり新規の TB 薬が導入されていないことも、特に、問題である。この動物モデルでは、SPF モルモットを、障壁コロニー内に維持し、約 20 cfu の *M. tuberculosis* 株である Erdman K01 桿菌を、それらの肺内に送達するエアゾール化スプレーを介して感染させる。チャレンジの 25、50、75、100、125、および 150 日後において、細菌負荷を決定し、組織病理学的評価のために組織を回収すると共に動物を 殺す。TB の古典的な徴候を発症しないマウスと異なり、このようにしてチャレンジされたモルモットは、ヒト疾患の特徴である、中央部に壊死を伴う、十分に組織された肉芽腫を発症する。さらに、ヒトと同様に、モルモットは、原発病変複合体の一部として、排出リンパ節の化膿性肉芽腫性で壊死性の重度のリンパ節炎を発症する。このモデルの使用は、チャレンジの後にこれらの動物の肺内で形成され、疾患の病因および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じる *M. tuberculosis* のバイオフィルムを低減させ、かつ/または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略を確認および同定するための前臨床スクリーニングを提供する。

【0431】

(実施例 10)

デバイスの適用

カテーテル/留置デバイスによるバイオフィルム感染症については、複数の動物モデルが公知である。Otto (2009 年)、Nature Reviews Microbiology、7 巻: 555 頁を参照されたい。通常の皮膚微生物叢であると考えられることが典型的であるが、微生物である *Staphylococcus epidermidis* は、多くの研究者が重要な日和見病原体であるとみなす微生物となっており、院内感染の原因作用物質の第 1 にランクされている。第 1 に、この細菌は、デバイス挿入時にこの一般的な皮膚コロニー形成菌により汚染される、留置医療デバイス上で発生する感染症の大半の原因である。致死性ではないことが典型的であるが、これらのバイオフィルム感染症の処置と関連する困難により、これらのバイオフィルム感染症は、それらの頻度と組み合わせ、重篤な公衆衛生負荷となっている。米国において、血管カテーテルと関連する血流感染症の処置と関連する費用は、今日、*S. epidermidis* に起因するものだけで、毎年 20 億ドルに上る。*S. epidermidis* に加えて、*E. faecalis* および *S. aureus* もまた、留置医療デバイスにおいて見いだされる汚染である。カテーテルに関連する *S. epidermidis* 感染症については、ウサギ、マウス、モルモット、およびラットを含めて複数の動物モデルが存在し、これらの全てが、病因の分子的機構を研究するのに用いられ、予防および/または治療薬の研究に役立っている。ラットの頸静脈カテーテルは、*E. faecalis*、*S. aureus*、および *S. epidermidis* によるバイオフィルムの形成に干渉する療法を評価するのに用いられている。バイオフィルムの低減は、3 つの方法: (i) カテーテルを超音波処理し、CFU を計算する方法、(ii) カテーテルをスライスする、または単純にプレート上に置き、スコア付けする方法、(iii) バイオフィルムをクリスタルバイオレットまたは別の色素で染色し、溶出させ、CFU の代用物としての OD を測定する方法で測定されることが多い。

【0432】

等価物

別段に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

【0433】



本明細書において例示的に説明された発明は、本明細書で具体的に開示されていない、1つまたは複数の任意の要素、1つまたは複数の任意の限定が存在しない場合にも、適切に実施することができる。したがって、例えば、「～を含む」、「～を包含する」、「～を含有する」などの用語は、外延的に、かつ限定なしに読まれるものとする。加えて、本明細書で用いられる用語および表現は、説明を目的として用いられるものであり、限定を目的として用いられるものではなく、示され、かつ、説明される特徴またはその部分の任意の等価物を除外する、このような用語および表現の使用を意図するものではなく、本願発明の範囲内にある多様な改変が可能であると認識される。

【0434】

したがって、本明細書で提供される材料、方法および例は、好ましい実施形態を表しており、例示的なものであり、本発明の範囲に対する限定として意図されるものではないことを理解されたい。

【0435】

本明細書では、本発明を広範かつ一般的に説明してきた。一般的な開示の範囲内に収まる、より狭い範囲内にある種類、および亜属の群分けのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これは、除外される材料が、本明細書で具体的に列挙されているかどうかにかかわらず、属から任意の対象物を除外する条件または否定的限定を伴う本発明の一般的な説明を包含する。

【0436】

加えて、本発明の特徴または態様が、マーカッシュ群との関係で説明される場合、当業者は、本発明がまた、それにより、マーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはマーカッシュ群のメンバーの亜群との関係でも説明され得ることを認識するであろう。

【0437】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それぞれが参照により個別に組み込まれるのと同程度に、参照によりそれらの全体において明示的に組み込まれる。齟齬が生じた場合は、定義を含め、本明細書に従う。

【0438】

その他の実施形態を以下の特許請求の範囲内に記載する。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

対象においてDNA B I Iタンパク質を産生する微生物による感染と関連する炎症応答を処置もしくは予防し、またはバイオフィルムに感染している、もしくはバイオフィルムの存在と関連する状態を患っている対象を処置する方法であって、該対象に、有効量の抗体F a b断片を投与するステップを含み、該抗体は、DNA B I Iタンパク質またはその等価物と特異的に結合し、さらに、該抗体F a b断片は、該対象において抗炎症性サイトカインの産生を誘導する方法。

(項目2)

前記抗体F a b断片が、

a . m I h f B 4<sub>N H T I</sub> 抗体のF a b断片を含む単離されたポリペプチドまたは該ポリペプチドの等価物、

b . m I h f B 4<sub>N T H I</sub> 抗体のF a b断片から本質的になる単離されたポリペプチドまたは該ポリペプチドの等価物、

c . 該F a b断片が、必要に応じて、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヒツジポリクローナル抗体、イヌポリクローナル抗体またはヒトポリクローナル抗体の群から選択される哺乳動物ポリクローナル抗体に由来する、aまたはbの単離されたポリペプチド、

d . 該F a b断片が、モノクローナル抗体に由来する、aまたはbの単離されたポリペプチド、または

e . 該F a b断片が、ヒト化抗体またはヒト抗体である、aまたはbの単離されたポリペプチド

10

20

30

40

50

のうちのいずれか 1 つのポリペプチドを含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 3 )

前記 F a b 断片が、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 2 3 3 5 の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体に由来する、項目 1 または 2 に記載のポリペプチド。

( 項目 4 )

前記 F a b 断片が、検出可能な標識をさらに含む、項目 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

( 項目 5 )

前記抗炎症性サイトカインが、I L - 4、I L - 1 3 または I L - 1 0 のうち 1 つまたは複数を含む、項目 4 に記載の方法。

10

( 項目 6 )

前記対象が、哺乳動物である、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 )

前記哺乳動物がヒトである、項目 6 に記載の方法。

( 項目 8 )

前記対象が、小児患者である、項目 6 または 7 に記載の方法。

( 項目 9 )

有効量の抗生物質および / またはワクチンアジュバントを投与するステップをさらに含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

( 項目 1 0 )

m I h f B 4<sub>N H T I</sub> 抗体の F a b 断片を含む単離されたポリペプチドまたは該ポリペプチドの等価物。

( 項目 1 1 )

m I h f B 4<sub>N T H I</sub> 抗体の F a b 断片から本質的になる単離されたポリペプチドまたは該ポリペプチドの等価物。

( 項目 1 2 )

前記 F a b 断片が、哺乳動物ポリクローナル抗体に由来する、項目 1 0 または 1 1 に記載のポリペプチド。

( 項目 1 3 )

前記哺乳動物ポリクローナル抗体が、ウサギポリクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体、ヒツジポリクローナル抗体、イヌポリクローナル抗体またはヒトポリクローナル抗体の群から選択される、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

30

( 項目 1 4 )

前記抗体が、モノクローナル抗体である、項目 1 0 または 1 1 に記載のポリペプチド。

( 項目 1 5 )

前記抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体である、項目 1 0 または 1 1 に記載のポリペプチド。

( 項目 1 6 )

前記抗体が、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 2 3 3 5 の下で寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体である、項目 1 0 または 1 1 に記載のポリペプチド。

40

( 項目 1 7 )

検出可能な標識をさらに含む、項目 1 0 から 1 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

( 項目 1 8 )

項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよびキャリアを含む組成物。

( 項目 1 9 )

前記キャリアが、保存剤または安定化剤を含む、項目 1 8 に記載の組成物。

( 項目 2 0 )

項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌ

50

クレオチド。

( 項目 2 1 )

検出可能な標識をさらに含む、項目 2 0 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 2 )

前記検出可能な標識が、コンジュゲートされたポリヌクレオチドではない、項目 2 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 3 )

必要に応じて発現ベクターまたは宿主細胞内に含有される調節エレメントに作動可能に連結されている、項目 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 4 )

項目 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチドおよびキャリアを含む組成物。

( 項目 2 5 )

前記キャリアが、保存剤または安定化剤を含む、項目 2 4 に記載の組成物。

( 項目 2 6 )

項目 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

( 項目 2 7 )

項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む単離された宿主細胞。

( 項目 2 8 )

項目 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む単離された宿主細胞。

( 項目 2 9 )

原核細胞または真核細胞である、項目 2 7 または 2 8 に記載の単離された宿主細胞。

( 項目 3 0 )

ポリペプチドを産生するための方法であって、項目 2 7 から 2 9 のいずれか一項に記載の単離された宿主細胞を、ポリヌクレオチドのポリペプチドへの発現を可能にする条件下で培養するステップを含む方法。

( 項目 3 1 )

前記ポリペプチドを単離するステップをさらに含む、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 2 )

産業プロセスと関連するバイオフィルムの形成を防止する、またはバイオフィルムを破壊する方法であって、バイオフィルムに対して感受性の表面またはバイオフィルムを含有する表面を、項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドを用いて処置するステップを含む方法。

( 項目 3 3 )

バイオフィルムを破壊する結合性部分を同定する方法であって、候補結合性部分を、バイオフィルム構成成分、および項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種のポリペプチドと接触させるステップと、該結合性部分の、該バイオフィルム中の前記 DNA B I I との結合について、項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドの、該バイオフィルム中の該 DNA B I I との結合と比較してアッセイするステップとを含み、該ポリヌクレオチドの結合と比較して実質的に同一またはより強い結合を有する結合性部分が、バイオフィルムを破壊する結合性部分である方法。

( 項目 3 4 )

複数の細菌種において薬物耐性を逆転させる作用剤を同定する方法であって、作用剤を複数の種によって産生されたバイオフィルムを破壊する活性について評価するステップを含み、該バイオフィルムを破壊する作用剤が、項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドと実質的に等しい活性を有し、必要に応じて、多数の前記タンパク質と結合する作用剤が、薬物耐性を逆転させる作用剤と同定される方法。

( 項目 3 5 )

対象において状態を処置し、またはバイオフィルムの形成を特徴とする該対象における

10

20

30

40

50

バイオフィルムの形成を該対象において検出する方法であって、該対象に、有効量の項目 10 から 17 のいずれか一項に記載のポリペプチドを投与するステップを含む方法。

(項目 36)

前記バイオフィルムを検出しようとする場合、前記方法は、前記対象におけるバイオフィルムの形成または破壊をイメージングまたはモニタリングするステップをさらに含む、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

前記バイオフィルムを検出しようとする場合、前記ポリペプチドが化学修飾されている、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記バイオフィルムを検出しようとする場合、前記ポリペプチドが診断剤にコンジュゲートされている、項目 36 または 37 に記載の方法。

(項目 39)

前記バイオフィルムを検出しようとする場合、前記方法は、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドの、存在する任意のバイオフィルムとの複合体形成を観察するステップをさらに含む、項目 36 に記載の方法。

(項目 40)

前記状態が、静脈性潰瘍および糖尿病性足部潰瘍、耳感染症、副鼻腔感染症、尿路感染症、肺感染症、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患、カテーテル関連感染症、植え込まれたプロテーゼに関連する感染症、または歯周病を含む慢性非治癒創傷の群から選択される、項目 36 に記載の方法。

(項目 41)

対象におけるバイオフィルムの形成を特徴とする状態の発生または進行をモニタリングする方法であって、該対象を、項目 10 から 17 のいずれか一項に記載のポリペプチドを用いて処置するステップを含む方法。

(項目 42)

項目 1 から 8 のいずれか一項に記載のポリペプチドの、存在する任意のバイオフィルムとの複合体形成を観察するステップをさらに含む、項目 41 に記載の方法。

(項目 43)

前記ポリペプチドが、化学修飾されている、項目 41 に記載の方法。

(項目 44)

前記ポリペプチドが、診断剤にコンジュゲートされている、項目 41 または 42 に記載の方法。

(項目 45)

対象におけるバイオフィルムの形成を特徴とする状態の処置をモニタリングする方法であって、該対象に項目 10 から 17 のいずれか一項に記載のポリペプチドを投与するステップを含む方法。

(項目 46)

前記対象におけるバイオフィルム形成および / または破壊をイメージングまたはモニタリングするステップをさらに含む、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

前記ポリペプチドが、化学修飾されている、項目 45 に記載の方法。

(項目 48)

前記ポリペプチドが、診断剤にコンジュゲートされている、項目 45 または 46 に記載の方法。

(項目 49)

バイオフィルムの形成防止、またはバイオフィルムの破壊を必要とする対象におけるバイオフィルムの形成を防止する、またはバイオフィルムを破壊する方法であって、項目 10 から 17 のいずれか一項に記載のポリペプチドを投与するステップを含む方法。

(項目 50)

10

20

30

40

50

項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドでコーティングされた非生理学的表面であって、必要に応じて、産業的環境にある、非生理学的表面。

( 項目 5 1 )

対象においてDNA B I I ポリペプチドを産生する微生物の感染と関連する該対象における状態を処置または予防する方法であって、該対象に、有効量の項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドならびに抗生物質および/またはワクチンアジュバントを投与するステップを含む方法。

( 項目 5 2 )

前記ポリペプチドが、前記抗生物質の効力を増加させる、項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 3 )

項目 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチドおよび使用のための指示を含むキット。

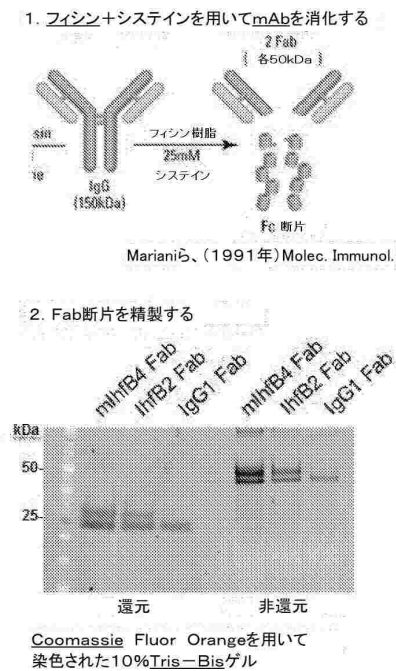
( 項目 5 4 )

抗 I h f B 2<sub>NH T I</sub> 抗体またはその断片をさらに含む、項目 5 3 に記載のキット。

【 図 面 】

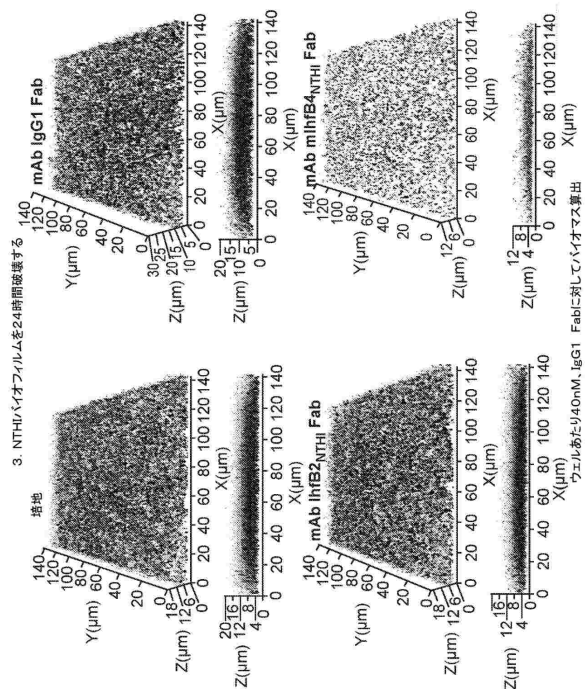
【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2



10

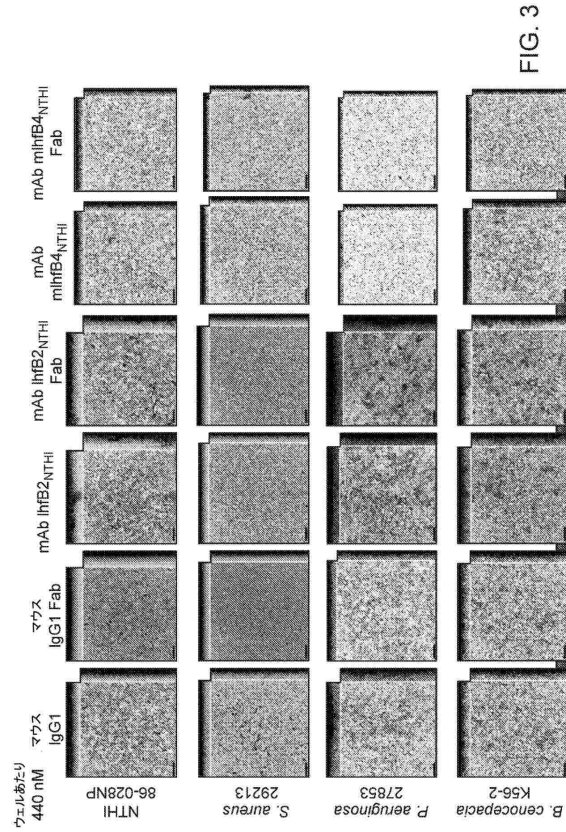
20

30

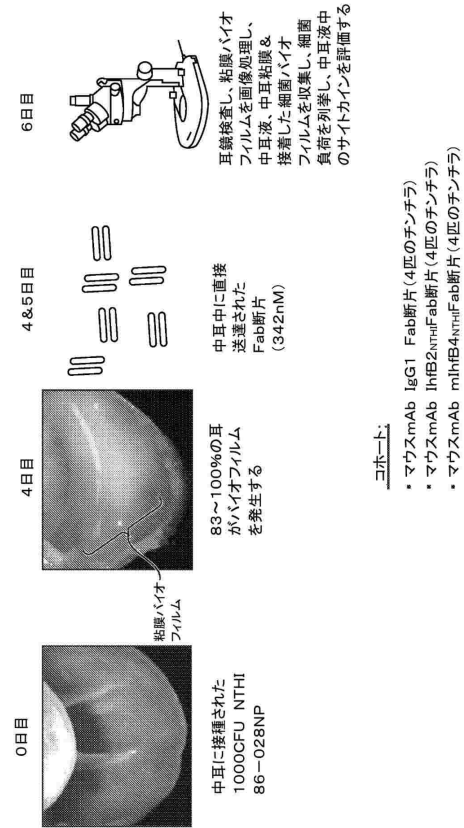
40

50

【図 3】



【図 4】



【図 5 A】

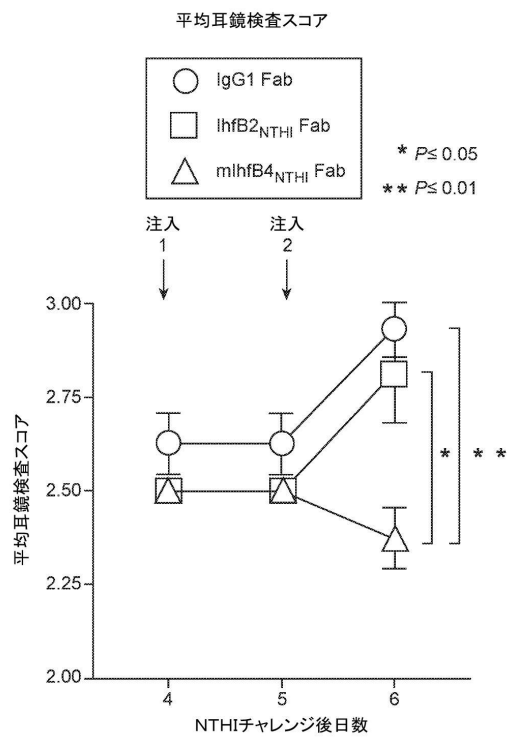


FIG. 5A

【図 5 B】

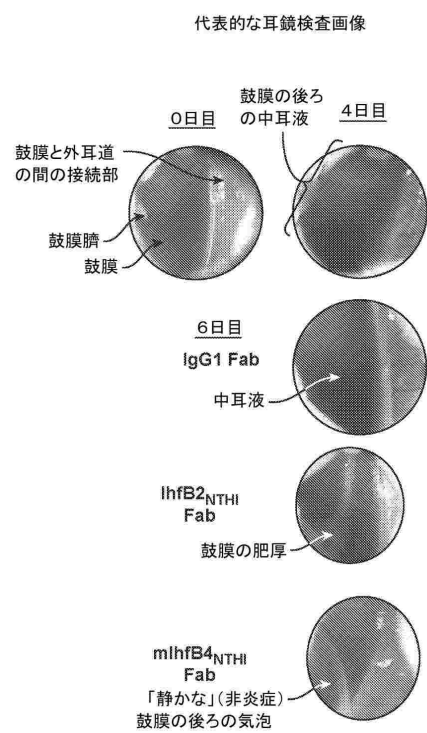


FIG. 5B

10

20

30

40

50

【図 6 A】

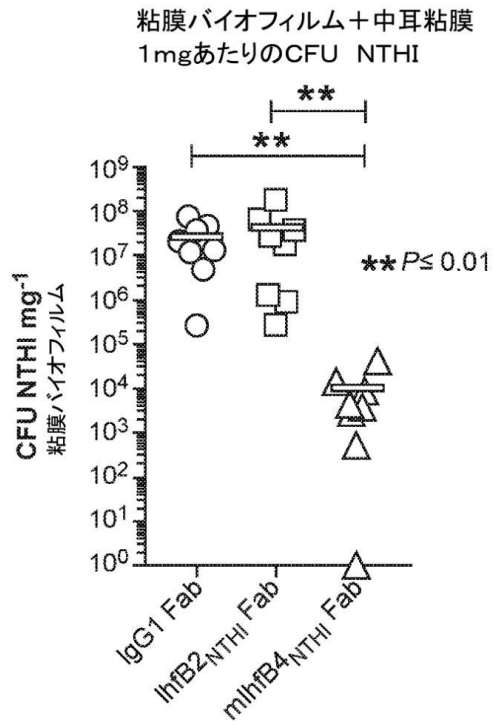


FIG. 6A

【図 6 B】

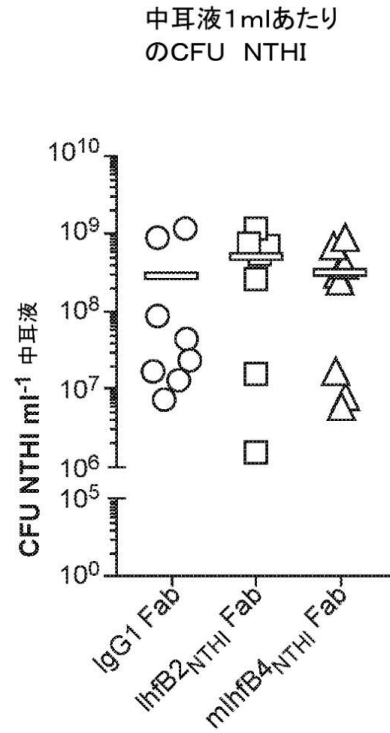


FIG. 6B

【図 7 A】

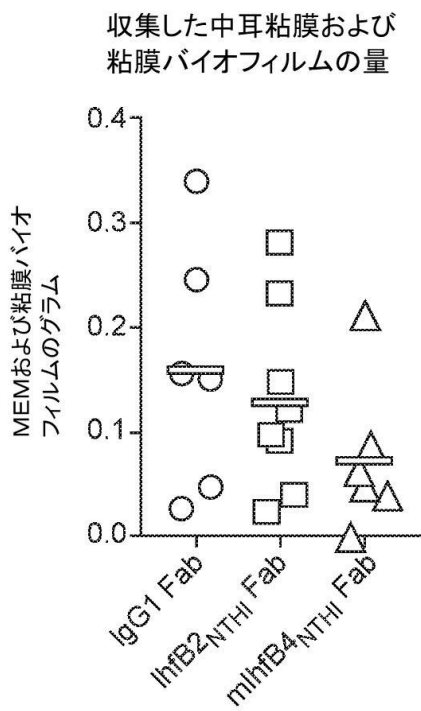


FIG. 7A

【図 7 B】

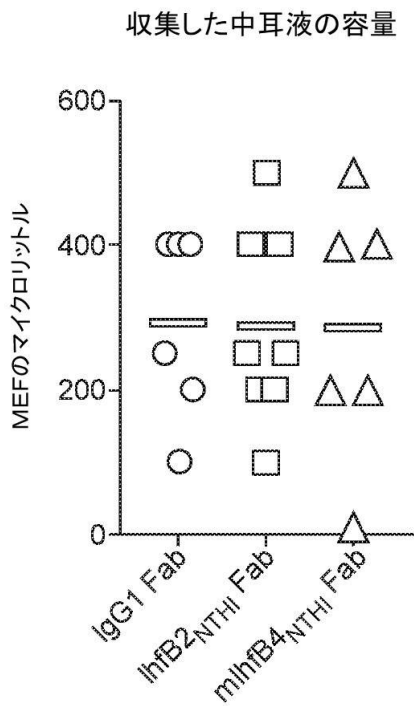


FIG. 7B

10

20

30

40

50

【図 8 A】

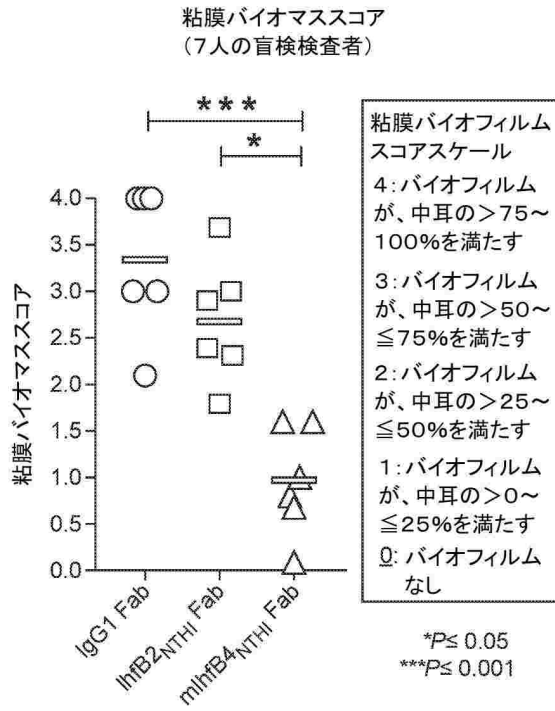


FIG. 8A

【図 8 B】

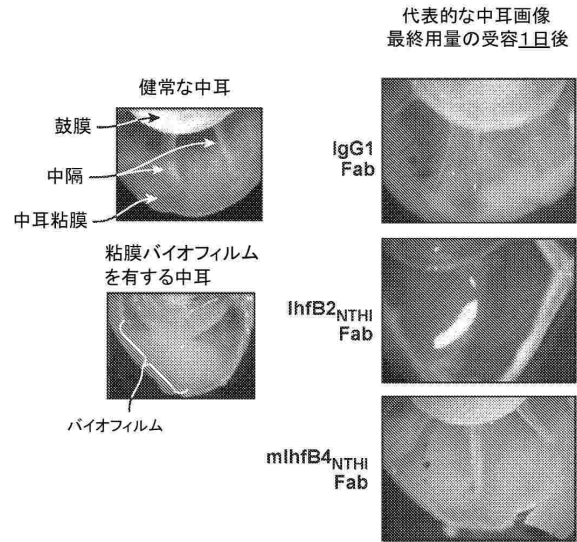


FIG. 8B

【図 9】

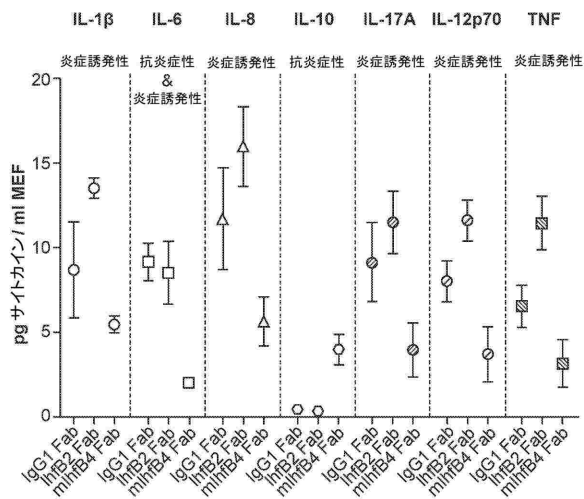


FIG. 9

【図 10】

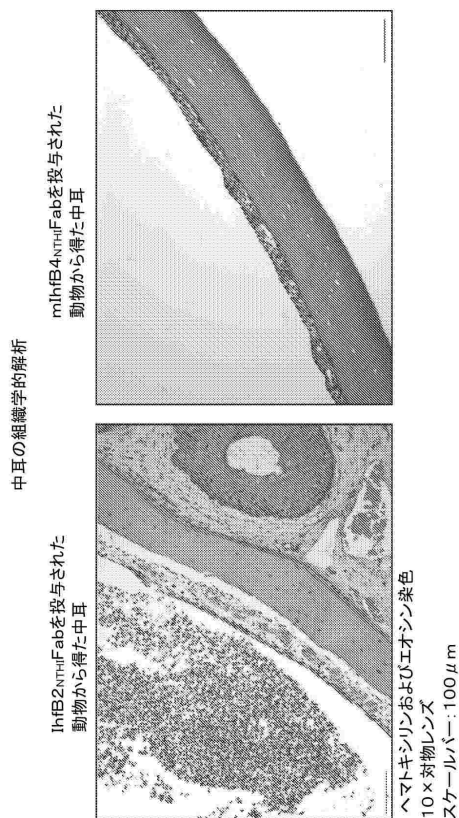


FIG. 10

10

20

30

40

50



【図 1 1】

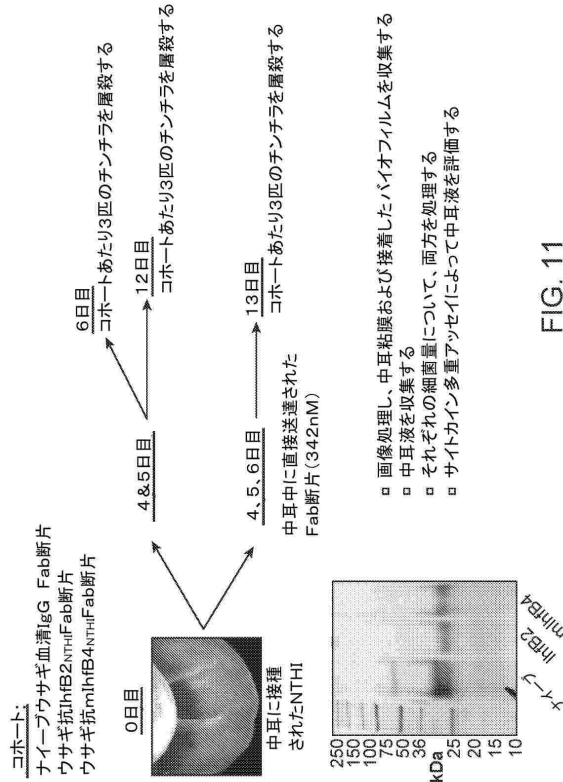


FIG. 11

【図 1 2】

中耳粘膜に対して接着したNTHIと粘膜バイオフィルムの相対量

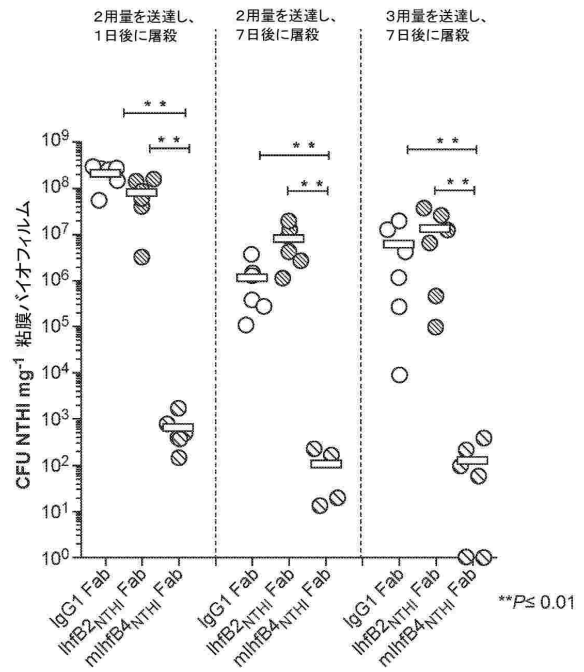


FIG. 12

【図 1 3】

中耳液1mlあたりのCFU NTHI

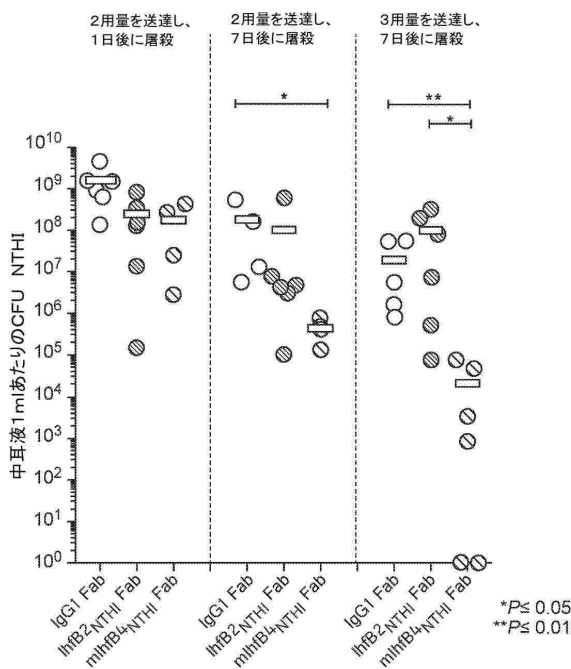


FIG. 13

【図 1 4】

粘膜バイオフィルムスコア (7人の盲検検査者)

粘膜バイオフィルムスコアスケール

4: バイオフィルムが、中耳の>75~100%を満たす

3: バイオフィルムが、中耳の>50~≤75%を満たす

2: バイオフィルムが、中耳の>25~≤50%を満たす

1: バイオフィルムが、中耳の>0~≤25%を満たす

0: バイオフィルムなし

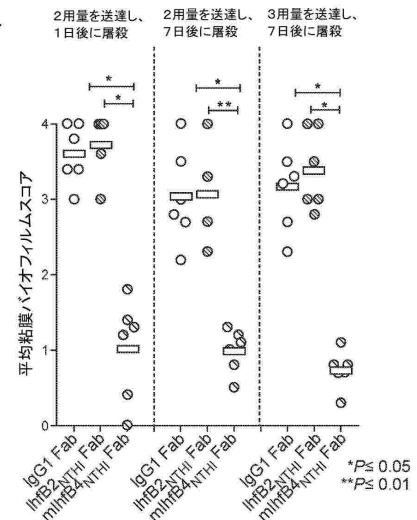


FIG. 14

【図 15】

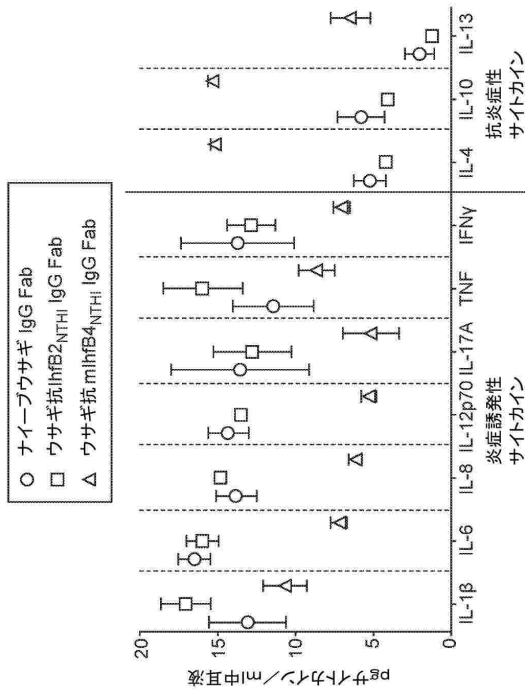


FIG. 15

【配列表】

0007661008000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/453,921

(32)優先日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-122335

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 バカレッツ, ローレン オー.

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700, リサーチ  
インスティテュート アット ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付

(72)発明者 グッドマン, スティーブン ディー.

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700, リサーチ  
インスティテュート アット ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付

合議体

審判長 富永 みどり

審判官 山村 祥子

審判官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特表2013-529893号公報(JP, A)

国際公開第2015/89502(WO, A1)

特表2016-538824号公報(JP, A)

EBioMedicine, 2016年08月, VOL:10,, PAGE(S):33 - 44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.022>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K39/00

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)