(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月22日(22.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/196816 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/012823

(22) 国際出願日： 2022年3月18日(18.03.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-046301 2021年3月19日(19.03.2021) JP
特願 2021-173381 2021年10月22日(22.10.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人三重大学 (**MIE UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ Mie (JP). ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ イリノイ (**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS**) [US/US]; 61801 イリノイ州アーバナ サウス ライト ストリート ５０６ ヘンリー アドミニストレーション ビルディング ３５２ Illinois (US).

(72) 発明者: ガバザ, エステバン (**GABAZZA, Esteban**); 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ 国立大学法人三重大学内 Mie (JP). ガバザ, コリナ (**GABAZZA, Corina**); 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ 国立大学法人三重大学内 Mie (JP). カーン, アイサック (**CANN, Isaac**); 61801 イリノイ州イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校内 Illinois (US).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (**YAMAO, Norihito** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2022/196816 A1

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR AMELIORATING ACUTE LUNG INJURY AND ACUTE WORSENING OF PULMONARY FIBROSIS

(54) 発明の名称： 急性肺障害および肺線維症の急性増悪を改善するための医薬組成物

(57) **Abstract:** Provided are a colicin-fighting monoclonal antibody molecule or a derivative thereof, and a pharmaceutical composition containing the same, for ameliorating acute lung injury and acute worsening of pulmonary fibrosis. The pharmaceutical composition of the present invention contains a monoclonal antibody molecule that fights against colicin, which is a peptide that stores a variety of staphylococcus strains including staphylococcus nepalensis, or a derivative of the monoclonal antibody molecule.

(57) 要約：急性肺障害および肺線維症の急性増悪を改善するための、コリシンに対するモノクローナル抗体分子またはその誘導体、およびそれを含有する医薬組成物を提供する。 本発明の医薬組成物は、ブドウ球菌ネパレンシス等の多様なブドウ球菌に保存されているペプチドであるコリシンに対するモノクローナル抗体分子またはその誘導体を含有する。

明　細　書

発明の名称 ：

急性肺障害および肺線維症の急性増悪を改善するための医薬組成物

技術分野

[0001] 本特許出願は、日本国特許出願２０２１－０４６３０１号（２０２１年３月１９日出願）及び日本国特許出願２０２１－１７３３８１号（２０２１年１０月２２日出願）に基づくパリ条約上の優先権および利益を主張するものであり、ここに引用することによって、上記出願に記載された内容の全体が本明細書中に組み込まれるものとする。

[0002] 本発明は、肺線維症の急性増悪を改善するための医薬組成物およびそのための方法に関し、詳細には、肺細菌叢由来ペプチドの阻害物質を含有する、肺線維症の急性増悪を改善するための医薬組成物およびそのための方法に関する。

背景技術

[0003] 特発性肺線維症（IPF）は慢性の病因不明の疾患であり、不治の病である。IPFでは、肺胞上皮細胞のアポトーシス増加と、それに続く異常肺組織修復がその進行の中心である。IPFの治療に現在使用されているピルフェニドンとニンテダニブの二種類の抗線維化薬は、診断後2-3年程度の生存期間しか期待できない（非特許文献１）。これら抗線維化薬は、肺機能の損失をわずかに減少させるに過ぎず、患者の生存や生活の質を改善するものではない（非特許文献２－４）。最近の疫学研究では、IPF患者は世界で500万人を超えており、その数は世界的に増加していることが示されている（非特許文献５）。トランスフォーミング増殖因子-β１（Transforming Growth Factor-β1）などの肺線維化因子の分泌増加、肺における筋線維芽細胞の過剰な動員、および細胞外マトリックスの沈着に起因する肺胞上皮細胞の損傷と異常な組織修復が、IPFの原因として中心的な役割を果たしている（非特許文献１）。この進行は最終的には、肺組織の瘢痕化、肺の構造的破壊、および呼吸不全を導く

（非特許文献５）。IPFの自然経過は予測不能であり、変化しやすく（非特許文献６）、それには、緩徐に進行する場合、急速に進行する場合、および急性増悪（AE）と呼ばれる急激な臨床的悪化がみられる場合がある（非特許文献７、８）。IPFにおける最も頻度の高い死因は、IPFの約46%にみられるAEである（非特許文献９、１０）。AEでは、発症中の高い死亡率（最大50%）と急性発症後の短期生存率が予測され、AEと診断されると、患者はわずか3-4ヶ月しか生存できない（非特許文献８、９）。人工呼吸器を必要とする症例では、死亡率は最大90%上昇する（非特許文献９）。感染症および診断または外科手術がAEを誘発する可能性があるが、その正確な機序は不明である（非特許文献８）。現在のところ、AEに対する有効な治療法は存在していない（非特許文献３）。

[0004] 特発性肺線維症（IPF）の原因として、肺内細菌叢（肺ミクロビオーム）がその役割を担っていることを示す証拠が増加している。IPF患者では、共生バランスが不調の、または多量の肺内細菌叢が、宿主防御に関与する遺伝子の持続的な発現変化、免疫応答の低下、肺上皮細胞障害、異常な線維芽細胞反応性、肺機能異常の重症度、胸部X線写真所見の悪化、疾患進行および生存性の低下と関係している（非特許文献１１－１６）。肺内細菌叢の変化および細菌負荷は、急性増悪を伴うIPFではさらに悪化する（非特許文献１７、１８）。しかし、肺内線維症を伴う肺細菌叢に関連する機序は、依然として不明である。本発明らは最近、肺内細菌叢においてコリシンと称されるプロアポトーシスペプチドを同定したが、これは、肺線維症における病因的役割を説明するかもしれない（非特許文献１９）。コリシンは、多様なブドウ球菌および種々の病原性細菌株に保存されているペプチドである（非特許文献１９）。

[0005] コリシンのアミノ酸配列は細菌のトランスグリコシラーゼ断片に対応している（非特許文献１９）。肺線維症が確立されたマウスにコリシンまたはコリシン保有細菌を肺内投与すると、肺胞上皮細胞にアポトーシスが起こり、急性増悪（AE）が起こる（非特許文献１９）。また、疾患が緩徐に進行するI

PF患者は、健常人と比較してコリシンの肺レベルが増加し、AEを有する患者は、安定患者と比較して肺コリシンのレベルが著しく高かった（非特許文献１９）。

[0006] そこで、本発明者らは既に、コリシンに対する抗体による治療は、コリシンのアポトーシス活性を遮断することによって肺線維症のAE（AE－IPF）を直接的に阻害できると仮定し、種々実験を重ね、コリシンに対する抗体を作成し、その肺組織中コリシンのウエスタンブロッティングに利用できることを証明した（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO2021/126957

非特許文献

[0008] 非特許文献1：1 King, T. E., Jr., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet 378, 1949-1961, doi: 10.1016/S0140-6736(l 1)60052-4 (2011).

非特許文献2：2 Richeldi, L. et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. N EnglJ Med370, 2071-2082, doi: 10.1056/NEJMoal402584 (2014).

非特許文献3：King, T. E., Jr., Noble, P. W. & Bradford, W. Z. Treatments for idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 371, 783-784, doi: 10.1056/NEJMcl407776 (2014).

非特許文献4：King, T. E., Jr. et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 370, 2083-2092, doi: 10.1056/NEJMoal402582 (2014).

非特許文献5：5 Lederer, D. J. & Martinez, F. J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med 378, 1811-1823, doi: 10.1056/NEJMral705751 (2018).

非特許文献6：6 Sgalla, G., Biffi, A. & Richeldi, L. Idiopathic pulmon

ary fibrosis: Diagnosis, epidemiologyand natural history. Respirology 21, 427-437, doi: 10.1111/resp.l2683 (2016).

非特許文献7：Kreuter, M. et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: international survey and call for harmonisation. Eur Respir J 55, doi: 10.1183/13993003.01760-2019(2020).

非特許文献8：Collard, H. R. et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. Am J Respir Crit Care Med 194, 265-275, doi: 10.1164/rccm.201604-0801CI (2016).

非特許文献9：Natsuizaka, M. et al. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. Am J Respir Crit Care Med 190, 773-779, doi: 10.1164/rccm.201403-05660C (2014).

非特許文献10：Ley, B., Collard, H. R. & King, T. E., Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 183, 431-440, doi: 10.1164/rccm.201006-0894CI (2011).

[0009] 非特許文献11：Dickson, R. P. et al. Radiographic Honeycombing and Altered Lung Microbiota in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med200, 1544-1547, doi: 10.1164/rccm.201903-0680LE (2019).

非特許文献12：Han, M. K. et al. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. Lancet Respir Med 2, 548-556, doi: 10.1016/S2213-2600(14)70069-4 (2014).

非特許文献13：Huang, Y. et al. Microbes Are Associated with Host Innate Immune Response in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 196, 208-219, doi: 10.1164/rccm.201607-15250C (2017).

非特許文献14：Molyneaux, P. L. et al. Host-Microbial Interactions in

Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 195, 1640-1650, doi:10.1164/rccm.201607-14080C (2017).

非特許文献15：Takahashi, Y. et al. Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Resl9, 34, doi:10.1186/sl2931-018-0736-9 (2018).

非特許文献16：Wang, J. et al. Lung microbiome and host immune tone in subjects with idiopathic pulmonary fibrosis treated with inhaled interferon-gamma. ERJ Open Res 3, doi: 10.1183/23120541.00008-2017 (2017).

非特許文献17：Molyneaux, P. L. et al. Changes in the respiratory microbiome during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res 18, 29, doi: 10.1186/sl2931-017-0511-3 (2017).

非特許文献18：Weng, D. et al. The Role of Infection in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Mediators Inflamm 2019, 5160694, doi: 10.1155/2019/5160694 (2019).

非特許文献19：D'Alessandro-Gabazza, C. N. etal. A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis. Nat Commun 11, 1539, doi: 10.1038/s41467-020-15344-3 (2020).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明者らはさらに研究を進め、スタフィロコッカス ネパレンシス（Staphylococcus nepalensis）CNDG株以外の既知の病原性細菌由来のコリシン様ペプチドの存在とアポトーシス活性を示し、従ってこの毒性ペプチドがより広く分布していることを示した。さらに、いくつかのモノクローナル抗体を作成し、特性化することで、コリシンおよび関連ペプチドの毒性活性を中和する能力を有するモノクローナル抗体A21を同定した。

課題を解決するための手段

[0011] 上記知見を利用し、2つの異なる肺線維症モデルにおいて中和モノクローナ

ル抗体の有効性を試験し、この抗体が、ヒトトランスフォーミング増殖因子-β1トランジェニックマウスモデルにおける急性増悪およびブレオマイシンモデルにおける急性肺損傷を有意に阻害することにより、肺線維症を改善することを証明し、本発明を完成した。

[0012] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

＜モノクローナル抗体分子＞

［１］

コリシンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

［２］

コリシンがIVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）である、［１］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

［３］

PESSGNP（配列番号６８）またはNPAGY（配列番号６９）をエピトープとする、［１］または［２］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0013] ＜モノクローナル抗体分子をCDRで特定：Aシリーズ＞

［４］

(IA)

（ｉ)配列番号３７のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号３８のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号３９のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号４１のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４２のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号４３のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

(IIA)

（ｉ)配列番号７０のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４９のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５０のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号５２のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号５３のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５４のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

または

(IVA)

(ｉ)配列番号７２のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７３のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７４のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号７６のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７７のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７８のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

を含む、［１］または［２］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0014] ＜モノクローナル抗体分子をH鎖可変領域および変異型で特定：Bシリーズ＞

［５］

(IB) 配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

(IIB) 配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；または

(IVB) 配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸

残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

を有する、［１］から［３］までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0015] ＜モノクローナル抗体分子をL鎖可変領域および変異型で特定：Cシリーズ＞

［６］

（IC） 配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIC） 配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIIC） 配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；または

（IVC） 配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

を有する、［１］から［３］までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

［７］

［５］記載のいずれかのH鎖可変領域、および［６］記載のいずれかのL鎖可変領域を有する、［１］から［３］までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0016] ＜モノクローナル抗体分子のH鎖およびL鎖可変領域の組み合わせを特定＞

［８］

［５］記載の(IB)のH鎖可変領域および［６］記載の(IC)のL鎖可変領域、

［５］記載の(IIB)のH鎖可変領域および［６］記載の(IIC)のL鎖可変領域、または［５］記載の(IVB)のH鎖可変領域および［６］記載の(IVC)のL鎖可変領域；

を有する、［７］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

＜モノクローナル抗体分子をH鎖およびL鎖の可変領域で特定＞

［９］

［５］記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ［６］記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列であり；または

［５］記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ［６］記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列であり；または

［５］記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ［６］記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列である、

［８］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0017] ＜モノクローナル抗体分子の変異型１＞

［１０］

［５］記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ

酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域であり；または

［５］記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域であり；または

［５］記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域である、

［８］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[0018] ＜モノクローナル抗体分子の変異型２＞

［１１］

［５］記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域であり；または

［５］記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１

または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域であり；または

［５］記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ［６］記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域である、

［８］記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

［１２］

Fab、$F(ab')_2$、Fvまたは単鎖Fv断片(scFv)である、［１］から［１１］のいずれか記載の抗体分子の誘導体。

［１３］

コリシンが引き起こすアポトーシスを中和および／または阻害する、［１］から［１２］のいずれか］記載の抗体分子またはその誘導体。

[0019] ＜医薬組成物＞

［１４］

［１］から［１３］までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の有効量を含有する、急性肺障害または線維症を処置または予防するための医薬組成物。

［１５］

急性肺障害が、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎である［１４］記載の医薬組成物。

［１６］

線維症が、特発性肺線維症（IPF）、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨

髄線維症、および乳腺線維症からなる群より選択される、［１４］記載の医薬組成物。

[0020] ＜ワクチン＞

［１７］

アミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体を有効成分とする、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン組成物。

[0021] ＜バイオマーカー＞

［１８］

コリシンの、急性肺障害または線維症の進行度を判定するためのバイオマーカーとしての使用。

発明の効果

[0022] 本発明者らは、急性肺損傷の一般モデルにおける抗コリシンモノクローナル抗体の影響をさらに調査し、このような疾患に対するコリシンの潜在的影響についての成績を得た。本発明は、肺線維症およびおそらくは他の急性肺損傷関連肺疾患の病因および進行におけるコリシンの役割をさらに明らかにするとともに、この不治の病を処置するための新たなアプローチ、すなわち新たな医薬、治療方法等を提供するものと考えられる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1は、スタフィロコッカス ネパレンシス（Staphylococcus nepalensis）菌株CNDG(CNDG)のコリシンペプチドを含む推定トランスグリコシラーゼと、マウスの同じ肺線維組織から分離されたスタフィロコッカス ヘモリティカスの3つの菌株の相同性を示すアラインメントである。コリシンペプチドは4列目にバー付きで示している。コリシンペプチド配列の外側では、保存されているアミノ酸は黒で網掛けし、類似のアミノ酸は灰色で網掛けしている。Staphylococcus haemolyticusは、スタフィロコッカス ヘモリチィカスであり、1bp_00353、12bp_00350、7bp_00350はそれぞれS. haemolyticus菌株1タン

パク質番号353、S. haemolyticus菌株12タンパク質番号350、およびS. haemolyticus菌株7タンパク質番号350である。S. ネパレンシス菌株CNDGのタンパク質は、DnaAをコードする遺伝子（ORF00001）からカウントするゲノムのオープンリーディングフレーム（ORF）の351位にコードされている。類似の性質を有するアミノ酸は、LIMV、AG、YWF、DEQN、KRHおよびSTにグループ分けされる。アラインメントは、Log-Expectation(MUSCLE(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/))によるマルチプルシークセンス比較を使用して実行した。

[0024] [図2]図2は、スタフィロコッカス ヘモリチィカスの3つの菌株からの培養上清は、肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導することを示している。図2a：A549肺胞上皮細胞を、スタフィロコッカス ヘモリチィカスの菌株1、7および12からの培養上清(1/10希釈)の存在下で48時間培養した際のフローサイトメトリーの結果を示す。フルオレセイン標識アネキシンVとヨウ化プロピジウム染色を指標にしている。スタフィロコッカス ネパレンシスCNDG株の培養上清で処理したA549細胞を陽性対照とし、生理食塩水で処理した細胞を陰性対照とした。図2b：フローサイトメトリーによって決定し、定量化したアポトーシス細胞のパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 4。データは平均±SDとして表している。統計分析はスチューデントのt検定を使用して実行した。*** p <0.0001。図2c：A549細胞をS. ヘモリチィカスの培養上清の存在下で48時間培養し、透過型電子顕微鏡で評価した結果を示す。図2d：3つのS. ヘモリチィカス菌株1、7および12ならびにS. ネパレンシスの培養上清の存在下で培養したA549細胞におけるカスパーゼ-3切断のウエスタンブロッティングの結果を示す。図2e：3つのS. ヘモリチィカス菌株1、7および12ならびにS. ネパレンシスの培養上清の存在下で培養したA549細胞におけるカスパーゼ-3切断の結果を示すグラフである。データは平均±SDとして表される。統計分析は対応のないt検定を使用して実行した。** p <0.001、*** p <0.0001。

[0025] [図3]図3は、いくつかの病原体からのトランスグリコシラーゼの合成コリシン様ペプチドが、肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導することを示している

。図3a、b：A549肺胞上皮細胞を10μMのコリシン様ペプチドの存在下で培養し、アポトーシスを評価した結果を示すフローサイトメトリーの検討結果である。合成コリシン配列またはスクランブルペプチドで処理したA549細胞を、それぞれ陽性対照および陰性対照とした。図3b、c：フローサイトメトリーによって決定し、定量化したアポトーシス細胞のパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 4。データは平均±SDとして表している。統計分析はスチューデントのt検定を使用して実行された。* p <0.05; *** p <0.0001。

[0026] [図4]図4は、種々の細菌性病原体からのコリシン含有推定トランスグリコシラーゼのアラインメントを示す。生物の名前は、Wconf (Weissella confusa、ジーンバンクプロテイン受入れ番号WP_112464134.1)、CNDG-00351 (S. nepalensis株CNDGタンパク質00351)、L. monocyt-2(リステリア モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) 、ジーンバンクプロテイン受入れ番号HAB0417320.1)、Myabs-2 (マイコバクテロイデス アブセサス (Mycobacteroides abscessus) 、ジーンバンクプロテイン受入れ番号SKR69498.1)、Myabs-1 (Mycobacteroides abscessus、ジーンバンクプロテイン受入れ番号SKT99287.1)、Shem_00350 (Staphylococcus hemolyticus 12bタンパク質00350)、およびLmonocyt-1 (L.monocytogenes-ジーンバンクプロテイン受入れ番号ECO1693478.1)と略称している。コリシンペプチドは太字で示し、アミノ酸が保存されている部分はコリシンと表示している（5段目）。コリシンペプチド配列の外側では、保存されたアミノ酸は黒で網掛けし、類似のアミノ酸は灰色で網掛けしている。同様の特性を持つアミノ酸は、LIMV、AG、YWF、DEQN、KRHおよびSTとしてグループ化される。S、ブドウ球菌。アラインメントは、Log-Expectationによるマルチプルアラインメント比較(MUSCLE(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/))を使用して実行した。

[0027] [図5]図5は、S. ヘモリチィカス培養上清によって誘導されるアポトーシス経路を示す。図5a：アポトーシスは外因性および内因性経路によって発生する。外因性経路は、リガンドが膜結合型デスレセプターに結合することによって開始され、その結果、細胞内シグナル伝達が活性化され、プロカスパーゼ-

8がカスパーゼ-8に切断される。内因性経路はミトコンドリアによって調節されている。刺激の存在下で、ミトコンドリア膜の摂動はその透過性を増加させ、アポトーシスリピート含有(BIRC)タンパク質およびアポトーシス促進因子のバキュロウイルス阻害剤のサプレッサーの放出を引き起こし、これはプロカスパーゼ-9をカスパーゼ-9に切断するアポトソーム形成に寄与する。カスパーゼ-8とカスパーゼ-9はどちらも、アポトーシスのエフェクターであるカスパーゼ-3を活性化できる。図5b：A549肺胞上皮細胞を、S. ヘモリチィカス株12の(1/10希釈)培養上清の存在下で24時間培養し、切断されたカスパーゼ-8、切断されたカスパーゼ-9、および切断されたカスパーゼ-3に陽性の細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーで分析した結果を示す。下段は、陽性細胞の対照に対するパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 6。データは平均±SDとして表される。統計分析はスチューデントのt検定を使用して実行された。** p <0.01; *** p <0.0001。

[0028] [図6]図6は、コリシンが、アポトーシス促進因子と抗アポトーシス因子のmRNA発現を変化させることを示しているグラフである。各群でN = 6。データは平均±SDとして表している。統計分析は対応のないt検定を使用して実行した。* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001。

[0029] [図7]図7は、スタフィロコッカス ネパレンシス株CNDGの培養上清によるコリシン含有トランスグリコシラーゼの分解とペプチダーゼ画分の調製を示す。図7a：スタフィロコッカス ネパレンシス株CNDGのトランスグリコシラーゼおよびコリシン部分のアミノ酸配列を示す。図7b：スタフィロコッカス ネパレンシス培養上清を特定の画分に濃縮するまでの手順を示す。図7c：高い消化活性を有する画分を得るまでのデータと手順を示す。図7d：OD（280 nm）での吸光度が高い画分について、組換えトランスグリコシラーゼ351に対する高い消化活性を有する画分を得るまでのデータと手順を示す。

[0030] [図8]図8は、細菌分泌産物が、トランスグリコシラーゼを分解して肺上皮細胞のアポトーシスを誘導することを示している。図8a：組換えトランスグリコシラーゼを種々の量のスタフィロコッカス ネパレンシス培養上清から調製

したペプチダーゼ画分の存在下、2時間インキュベートした後の、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルにかけた結果を示す写真である。図8b：組換えトランスグリコシラーゼを一定量のペプチダーゼ画分の存在下、種々の時間間隔でインキュベートした後の、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルにかけた結果を示す写真である。図8c：示された反応混合物で処理した後のA549肺胞上皮細胞のアポトーシスを評価するフローサイトメトリー分析結果を示す。ｃの上段図の第三象限を除いた部分の点が、アポトーシス細胞であり、ｃの下段図のＸ軸の右側のコブがアポトーシス細胞である。図8d：アポトーシス細胞の対照に対するパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 4。データは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析である。*** p <0.0001。

[0031] [図9]図9は、スタフィロコッカス ヘモリチィカスの培養上清が、組換えトランスグリコシラーゼを分解することを示すドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルの写真である。スタフィロコッカス ネパレンシスの上清を対照とした。

[0032] [図10]図10は、細菌由来の推定セリンプロテアーゼがトランスグリコシラーゼを切断することを示している。図10a、b：トランスグリコシラーゼ分解に対するセリンプロテアーゼ阻害剤ペファブロックSC（a、b）の作用を示す写真およびグラフである。図10c、d：トランスグリコシラーゼ分解に対するジイソプロピルフルオロリン酸（DFP）の作用を示す写真およびグラフである。図10e、f：トランスグリコシラーゼ分解に対するキレート剤エチレンジアミン四酢酸（EDTA）の作用を示す写真およびグラフである。図10g、h：トランスグリコシラーゼ分解に対するシステインプロテアーゼ阻害剤E-64の作用を示す写真およびグラフである。

[0033] [図11]図11は、異なるクラスの抗コリシンモノクローナル抗体が、トランスグリコシラーゼ351上のコリシンペプチドおよびコリシン配列に結合することを示している。図11a：各モノクローナル抗体のアイソタイプを示す。図11b：トランスグリコシラーゼ351に対する各モノクローナル抗体の結合性を示す

ウエスタンブロッティングの結果である。図11c：抗コリシンモノクローナル抗体の各クローンの結合を評価したグラフである。データは平均±SDとして表している。26kDaの分子量マーカーの下の小さいバンドは、組換えタンパク質の精製中に分解することが知られているトランスグリコシラーゼ351の分解産物である。

[0034] [図12]図12は、ラット抗コリシンモノクローナル抗体が、コリシンのコンセンサスモチーフPESSGNPまたはNPAGYに結合することを示している。図12a、b：全体的なペプチドマイクロアレイの完全性およびアッセイの質を検証したペプチドマイクロアレイコピーの染色の結果を示す。図12c、d：ラットモノクローナル（mAtb）抗体9Aのスキャン強度を示す。図12e、f：ラットモノクローナル（mAtb）抗体21Aのスキャン強度を示す。図12g、h：ラットモノクローナル（mAtb）抗体2Aのスキャン強度を示す。図12i、j：ラットモノクローナル（mAtb）抗体4Aのスキャン強度を示す。

[0035] [図13]図13は、抗コリシンモノクローナル抗体クローンの可変フレームワークおよび相補性決定領域の配列を示す。小文字はフレームワーク領域(FR1、FR2、FR3、FR4)を示し、太字大文字は抗体可変領域のCDR領域(CDR1、CDR2、CDR3)を示す。

[0036] [図14]図14は、抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aが、ヒト肺胞上皮細胞のコリシン誘導アポトーシスに対して強力な中和活性を有することを示すグラフ等である。図14a：抗コリシンモノクローナル抗体の培養肺胞上皮細胞上のコリシンアポトーシス促進活性の阻害作用を示すフローサイトメトリー分析の結果である。ａの上段の図の第三象限を除いた部分の点が、アポトーシスした細胞である。ａの下段の図のＸ軸の右側のコブがアポトーシスした細胞を示す。図14b：フローサイトメトリーによって決定し、定量化したアポトーシス細胞の対照に対するパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 3。データは平均±SDとして表している。統計分析はスチューデントのt検定を使用して実行した。*** $p < 0.0001$。

[0037] [図15]図15は、抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aが、ヒト肺胞上皮

細胞に対するスタフィロコッカス ヘモリティカスからの培養上清のアポトーシス活性を中和することを示す。図15a：抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aのスタフィロコッカス ヘモリティカスのコリシンアポトーシス促進活性の阻害作用を示すフローサイトメトリー分析の結果である。ａの上段の図の第三象限を除いた部分の点が、アポトーシスした細胞である。ａの下段の図のＸ軸の右側のコブがアポトーシスした細胞を示す。図15b：フローサイトメトリーによって決定し、定量化したアポトーシス細胞の対照に対するパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 4。データは平均±SDとして表している。統計分析は、Tukey’s検定による一元配置分散分析を使用して実行した。*** p <0.0001。

[0038] [図16]図16は、抗コリシン中和モノクローナル抗体が、トランスグリコシラーゼ分解産物によって誘導される肺細胞のアポトーシスを阻害することを示している。図16a：抗コリシン中和モノクローナル抗体におけるトランスグリコシラーゼ分解産物によって誘導される肺細胞のアポトーシスの阻害作用を示すフローサイトメトリー分析の結果である。ａの上段の図の第三象限を除いた部分の点が、アポトーシスした細胞である。ａの下段の図のＸ軸の右側のコブがアポトーシスした細胞を示す。図16b：フローサイトメトリーによって決定したアポトーシス細胞の対照に対するパーセンテージを示すグラフである。各群でN = 4。データは平均±SDとして表している。統計分析は、Tukey’s検定による一元配置分散分析を使用して実行した。*** p <0.0001。図16c：反応混合物をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動し、銀染色で染色した結果を示す。

[0039] [図17]図17は、血漿中の抗コリシン中和抗体の平均半減期を示すグラフである。

[0040] [図18]図18は、コリシンの気管内注入前に抗コリシン抗体を投与したTGFβ1 TGマウスとアイソタイプ抗体を投与したTGFβ1 TGマウスの間の肺線維症の一致したスコアを示す。図18a：抗コリシンモノクローナル抗体(mAtb)またはアイソタイプ抗体(Atb)による処置を開始する前に実施したコンピューター断層

撮影(CT)の結果である。TGFβ1-TG/線維症(+)/抗コリシン抗体/コリシンおよびTGFβ1-TG/線維症(+)/アイソタイプ抗体/コリシン群ではN = 6、TGFβ1-T/線維症(-)/コリシン群ではn = 5。図18b：専門家8人がCTにおける肺線維症のグレードを記録したスコアの平均値を示すグラフである。データは平均±SDとして表している。統計分析は、Tukey’s検定による一元配置分散分析を使用して実行した。TGFβ1：トランスフォーミング成長因子β1、TG：トランスジェニック。

[0041] [図19]図19は、モノクローナル抗コリシン抗体が、TGFβ1 TGマウスの肺のCT所見の悪化を防ぐことを示している。図19a：肺線維症を有するTGFβ1 TGマウスにおけるCT所見を得るためのスケジュールを示す。肺線維症のCT所見のグレードは、専門家によって盲検化してスコア化した。図19b、c：TGFβ1-TG/線維症(-)/コリシン群におけるコリシンの気管内注入前後のCT所見およびそのスコアを示すグラフである。統計分析は、対応のあるスチューデントのt検定によって実行した。ns、有意ではない。図19d、e：TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/アイソタイプ群におけるコリシンの気管内注入前後のCT所見およびそのスコアを示すグラフである。バーはスコアの平均値を示す。対応のあるt検定により統計分析を行った。* p <0.05。TGFβ1：トランスフォーミング成長因子β1、TG：トランスジェニック。図19f、g：TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/抗コリシン群におけるコリシンの気管内注入前後のCT所見およびそのスコアを示すグラフである。バーはスコアの平均値を示す。対応のあるt検定により統計分析を行った。** p <0.01。

[0042] [図20]図20は、モノクローナル抗コリシン抗体が、TGFβ1 TGマウスの肺線維症の急性増悪（AE）を抑制することを示している。図20a：細胞分画数のギムザ染色の結果を示す。スケールバーは50μmを示す。図20b：BALFの細胞と好中球の総数を示すグラフである。データは平均±SDである。統計分析は、Neuman-Keuls検定による一元配置分散分析によって実行した。* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.0001。図20c：界面活性タンパク質D(SP-D)、MUC5Bタンパク質、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)、デコリンおよびMUC-1の

レベルを、市販の酵素免疫アッセイキットによって測定した結果を示すグラフである。ヒドロキシプロリンのレベルは、製造元の指示に従って、市販の比色分析キットを使用して測定した。データは平均±SDである。統計分析は、Neuman-Keuls検定による一元配置分散分析によって実行した。＊ p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.0001。図20d、e：マッソン染色による各群の肺組織へのコラーゲン沈着を示す写真とグラフである。スケールバーは200μmを示す。データは平均±SDである。統計分析は、Neuman-Keuls検定による一元配置分散分析によって実行した。＊ p <0.05; *** p <0.0001。図20f：線維症領域と図20bに記載している炎症細胞の総数との相関関係を示すグラフである。スピアマンの相関係数による統計分析。

[0043] [図21]図21は、ブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける急性増悪の誘発の実験スケジュールおよび肺線維症のCT基準クライテリアを示す。図21a：ブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける急性増悪の誘発の実験スケジュールを示す。図21b：肺線維症のCT基準クライテリアを示す。以下のCTスコアシステムを使用し、肺線維症のグレードを決定した。スコア1：正常な所見。スコア2：肺密度がわずかに増加した。スコア3：斑点のあるすりガラスの不透明度と中隔の肥厚。スコア4：中程度のすりガラスの不透明度と中隔の肥厚。スコア5：胸膜下肥厚、びまん性すりガラス状混濁、および網状中隔肥厚。スコア6：胸膜下肥厚、びまん性すりガラス状混濁、網状中隔肥厚、および牽引性気管支拡張症。スコア7：胸膜下肥厚、重度のすりガラス状混濁、網状中隔肥厚、およびびまん性牽引性気管支拡張症。

[0044] [図22]図22は、コリシンの気管内注入後のブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける肺CT所見の悪化を示す。図22a、b、c： コリシンの気管内注入後のブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける肺CT所見とそのスコアを示すグラフである。WT/BLM/スクランブルペプチドにおけるマウスの数:n = 5、WT/BLM/コリシン群: n = 6。スチューデントの対応のあるt検定による統計分析。＊ p <0.05; ns、有意ではない。図22d、e、f：コリシンの気管内注入後の生理食塩水投与肺線維症のマウスにおける肺CT所見とそのスコアを

示すグラフである。マウスの数:WT/SAL/スクランブルペプチドおよびWT/SAL/コリシン群でn = 3。対応のあるt検定による統計分析。ns、有意ではない。

[0045] [図23]図23は、コリシンの気管内注入後のブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける肺線維症の急性増悪を示す。図23a：コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおける各処置群のBALF細胞染色の代表的な顕微鏡写真を示している。図23b：コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおける各処置群の染色BALF細胞数を示すグラフである。スケールバーは20μmを示す。データは、t検定による平均±SD統計分析である。＊ p <0.05; ＊ p <0.01。WT/SAL/スクランブルペプチドおよびWT/SAL/コリシン群におけるマウスの数:n = 3、WT/BLM/スクランブルペプチドおよびWT/BLM/コリシン群:n = 5。図23c：コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおける血清アミロイドP成分(SAP)、MUC-1、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、ペリオスチン、コラーゲンI、およびオステオポンチンのレベルを示すグラフである。データは、対応のないt検定による平均±SD統計分析である。＊ p <0.05; ＊ p <0.01; ＊＊＊ p <0.001。図23d：コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおけるカスパーゼ-3の切断をウエスタンブロッティングで評価し、定量した結果を示す。図23e：コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおける切断されたカスパーゼ-3とβアクチンとの比のグラフを示す。バーは、対応のないt検定による平均±SD統計分析を示す。＊ p <0.05。図23f：コラーゲン沈着を定量化した結果を示している。図23g：コラーゲン沈着を定量化した結果のグラフを示す。データは、対応のないt検定による平均±SD統計分析である。＊ p <0.05。図23h：ヒドロキシプロリンの肺組織含有量の測定結果のグラフを示す。バーは、対応のないt検定による平均±SD統計分析を示す。＊ p <0.05、＊＊ p <0.001。

[0046] [図24]図24は、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける肺CT所見の改善および肺炎症細胞浸潤の減少を示している。図24a：抗コリシンモノクローナル抗体の肺線維症抑制作用を調査するスケジュールを示す。図24b、c：bは、抗コリシンモノクローナル抗

体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける肺CT所見を示す。cは、ｂの結果を反映するCTスコアのグラフである。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群におけるマウスの数:n = 4、WT/BLM/抗コリシンおよびWT/BLM/アイソタイプ群:n = 9。データは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析である。*** p <0.001。図24d、ｅ：dは、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスのBALF中の細胞の写真を示す。eは、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおけるBALFの総細胞数および細胞分画の数を示す。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群におけるマウスの数:n = 4、WT/BLM/抗コリシンおよびWT/BLM/アイソタイプ群:n = 9。スケールバーは50μmを示す。データは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析である。** p <0.01、*** p <0.0001。

[0047] [図25]図25は、抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウスの肺における急性組織損傷、実質細胞のアポトーシスおよび組織線維症の改善を示している。図25a：抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウスの肺におけるオステオポンチン、MUC-1およびMUC5Bのレベルを示すグラフである。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群ではN = 4、WT/BLM/アイソタイプおよびWT/BLM/抗コリシン群ではn = 9。バーは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析を示す。* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.0001。図25b：抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウスの肺におけるDNA断片化を示す写真である。矢印は、アポトーシス細胞を示す。図25c：抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウスの肺におけるアポトーシス細胞を定量化したグラフである。スケールバーは20μmを示す。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群ではN = 4、WT/BLM/アイソタイプおよびWT/BLM/抗コリシン群ではn = 9。バーは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析を示す。*** p <0.0001。図25d、ｅ：抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウ

スの肺における肺線維症のグレードを、7人の専門家が盲検的に、Ashcroftのスコアを使用してスコア化した結果を示す。スケールバーは200μmを示す。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群ではN = 4、WT/BLM/アイソタイプおよびWT/BLM/抗コリシン群ではn = 9。バーは、Tukey’s検定による分散分析による平均±SD統計分析を示す。* p <0.05、*** p <0.0001。図25f、g：fは、肺のコラーゲン沈着についてマッソンのトリクローム染色した写真であり、gは、それをWindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化したグラフである。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群ではN = 4、WT/BLM/アイソタイプおよびWT/BLM/抗コリシン群ではn = 9。バーは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析を示す。* p <0.05、*** p <0.0001。図25h：比色分析によって測定したヒドロキシプロリンの肺組織含有量を示すグラフである。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群ではN = 4、WT/BLM/アイソタイプおよびWT/BLM/抗コリシン群ではn = 9。バーは、Tukey’s検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析を示す。*** p <0.0001。

[0048] [図26]図26は、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける9日目の肺CT異常および肺炎症細胞の減少を示している。図26a：急性期に処置する抗コリシンモノクローナル抗体におけるBLM誘発肺損傷肺線維症の改善作用を調べるスケジュールを示す。図26b、c：bは、急性期に処置する抗コリシンモノクローナル抗体におけるBLM誘発肺損傷肺線維症におけるCT肺不透明度を示す写真であり、cは、bの結果を反映するCTスコアのグラフである。抗コリシンモノクローナル抗体(WT/BLM/抗コリシン)またはアイソタイプ抗体(WT/BLM/アイソタイプ)で処置したマウスではN = 7。データは平均±SDである。統計分析は対応のないt検定によって実行した。* p <0.05。図26d、e：dは、急性期に処置する抗コリシンモノクローナル抗体におけるBLM誘発肺損傷肺線維症における血液中細胞を示す写真であり、eは、その総細胞数および細胞分画数を示すグラフである。抗コリシンモノクローナル抗体(WT/BLM/抗コリシン)またはアイソタイプ抗体(W

T/BLM/アイソタイプ)で処置したマウスではN = 7。スケールバーは20μmを示す。データは、対応のないt検定による平均±SD統計分析である。** p <0.01。

[0049] [図27]図27は、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける22日目の肺CT異常および肺の炎症細胞の減少を示す。図27a、b：aは、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおけるBLMポンプ注入後21日目(慢性期)のCT画像を示す写真であり、bは、22日目におけるCT線維症スコアのグラフである。両方の処置群でN = 7。データは平均±SDである。統計分析は対応のないt検定によって実行した。** p <0.01。図27c、d：cは、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおけBLMポンプの22日後の気管支肺胞洗浄液(BALF)におけるギムザ染色後の細胞分画を示す写真であり、dは、その総細胞数を示すグラフである。両方の処置群でN = 7。スケールバーは20μmを示す。データは、対応のないt検定による平均±SD統計分析である。*** p <0.0001。

[0050] [図28]図28は、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で処置したブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける22日目の肺損傷、肺実質アポトーシスおよびコラーゲン沈着の改善を示す。図28a：BLMポンプ注入の22日後に採取したBALFおよび血漿におけるMUC-1、サーファクタントプロテインC(SP-C)、SP-D、コラーゲンI、ペリオスチン、オステオポンチンおよび総TGFβ1のレベルを示すグラフである。データは平均±SDである。統計分析は対応のないt検定によって実行した。* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001。図28b、c：bは、切断されたカスパーゼ-3およびβアクチンのウエスタンブロッティングの結果を示し、cは、ｂの結果である切断されたカスパーゼ３とβアクチンとの比のグラフを示す。WT/BLM/アイソタイプ群ではN = 7、WT/BLM/抗コリシン群ではn = 6。データは平均±SDである。統計分析は対応のないt検定によって実行した。* p <0.05。図28d、e：7人の専門家が盲検的に、Ashcrof

tのスコアを使用して肺線維症のグレードをスコア化した。スケールバーは200μmを示す。WT/BLM/アイソタイプ群とWT/BLML /抗コリシン群の両方でN = 7。バーは、平均±SD統計分析が対応のないt検定によって実行したことを示す。* p <0.05。図28f、g：fは、肺のコラーゲン沈着についてマッソンのトリクローム染色した写真であり、gは、それを、WindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化したグラフである。図28h：肺のヒドロキシプロリン含有量を示すグラフである。WT/BLM/アイソタイプ群とWT/BLML/抗コリシン群の両方でN = 7。バーは、平均±SD統計分析が対応のないt検定によって実行したことを示す。* p <0.05; *** p <0.0001。

[0051] [図29]図29は、抗コリシンモノクローナル抗体が、肺線維症の急性増悪を伴うマウスの生存率を延長することを示している。図29a、b：aは、肺線維症の急性増悪を伴うマウスにおけるコンピューター断層撮影(CT)の結果を示し、bは、bの結果を反映するCTスコアのグラフである。WT/BLM/アイソタイプとWT/BLM/抗コリシン群の両方でN = 22、WT/SAL/アイソタイプとWT/SAL/抗コリシン群の両方でn = 5。バーは、平均±SD統計分析がTukey’s検定による一元配置分散分析によって実行したことを示す。* p <0.05。図29c：生存率をモニターした結果を示すグラフである。統計分析は、ログランク検定によって実行した。p = 0.001。

[0052] [図30]図30は、抗コリシンモノクローナル抗体が、重度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を軽減することを示している。図30a：抗コリシンモノクローナル抗体が、重度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を軽減することを調べるスケジュールを示す。図30b：各処置群のBALF細胞染色の代表的な顕微鏡写真を示している。図30c：各処置群のBALFにおける細胞数を示すグラフである。スケールバーは20μmを示す。SAL/アイソタイプおよびSAL/抗コリシン群でN = 4、LPS /アイソタイプ群でn = 5、LPS /抗コリシン群でn = 8。データは、Neuman-Keuls検定による一元配置分散分析による平均±SD統計分析である。#p = 0.1、*** p <0.0001。図30d：重度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を有するマウスにおける乳酸デヒドロゲナーゼA(LDHA)、サーファクタントプロテインD(SP-D)、

マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)、MUC-1および腫瘍壊死因子α(TNFα)のレベルを示すグラフである。SAL/アイソタイプおよびSAL/抗コリシン群でN = 4、LPS /アイソタイプ群でn = 5、LPS /抗コリシン群でn = 8。データは、ニューマン・コイルス法による分散分析による平均±SD統計分析である。#p = 0.1、* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001。

[0053] [図31]図31は、抗コリシンモノクローナル抗体による処置が、重度のリポ多糖誘発性急性肺損傷のあるマウスのCT所見を改善することを示している。図31a：リポ多糖(LPS)の気管内注入の1日後に実行したコンピューター断層撮影(CT)の結果を示す。WT/SAL/アイソタイプおよびWT/SAL/抗コリシン群でN = 4、WT/LPS /アイソタイプ群でn = 5、WT/LPS /抗コリシン群でn = 8。図31b：WindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化した肺の頂点から基底領域までのCT不透明度を示すグラフである。データは平均±SDであるNeuman-Keuls’検定による一元配置分散分析による統計分析。* p <0.05、*** p <0.001。

[0054] [図32]図32は、抗コリシンモノクローナルが、中程度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を軽減することを示している。図32a：抗コリシンモノクローナルが、中程度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を軽減するかを調べるスケジュールを示す。図32b：各処置群のBALF細胞染色の代表的な顕微鏡写真を示している。図32c：各処置群の染色BALF細胞数を示すグラフである。スケールバーは20μmを示す。LPS /アイソタイプでN = 4、LPS /抗コリシン群でn = 5。データは、対になっていないテストによる平均±SD統計分析である。*** p <0.001。図32d：抗コリシンモノクローナルを投与した中程度のリポ多糖誘発性急性肺損傷マウスにおける界面活性剤タンパク質D(SP-D)、単球走化性プロテイン-1(MCP-1)、TNFα、乳酸デヒドロゲナーゼA(LDHA)、MUC-5Bおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)のBALFおよび血漿中レベル血漿を示すグラフである。LPS /アイソタイプ群ではN = 4、LPS /アイソタイプ群ではn = 5。データは、ニューマン・コイルス法による分散分析による平均±SD統計分析である。* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001。

[0055] [図33]図33は、コリシンの循環レベルの上昇が、肺線維症のマーカーと相関

していることを示している。図33a：TGFβ1トランスジェニックマウス（TG）および野生型（WT）マウスにおけるコリシンの血漿レベルを測定し、線維症マーカーとの相関を評価するためのスケジュールを示す。WTマウス群ではN = 16、TGFβ1TGマウス群ではn = 20。図33b：TGFβ1TGマウスおよびWTマウスにおける肺線維症のAshcroftスコア、および血漿コリシンと肺ヒドロキシプロリンの測定結果を示すグラフである。群間の統計的差異は、対応のないt検定によって分析し、関係の強さはピアソン-積率相関によって分析した。* p <0.05、** p <0.01 *** p <0.001。

[0056] [図34]図34は、TGFβ1TGマウスにおける肺線維症のCTスコアの増加を示している。図34a：TGFβ1TGマウスにおける肺線維症のCTスコアの結果を示す。図34b：WindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化した肺の頂点から基底領域までのCT不透明度を示すグラフである。WTマウス群ではN = 16、TGFB1TGマウス群ではn = 20。WT：野生型、TGFβ1TG：トランスフォーミング成長因子β1、CT：コンピューター断層撮影。データは平均±SDである。統計分析は対応のないスチューデントのt検定によって実行した。*** p <0.001。

[0057] [図35]図35は、特定のアミノ酸変異を有するコリシンペプチドにおけるアポトーシス活性を示すグラフである。

[0058] [図36]図36は、いくつかの種のブドウ球菌および連鎖球菌におけるトランスグリコシラーゼのプロアポトーシスセグメントの保存された配列の多重配列アラインメントを示す。

[図37]図37は、いくつかの種のブドウ球菌および連鎖球菌におけるトランスグリコシラーゼのプロアポトーシスセグメントの保存された配列の多重配列アラインメントを示す。

[図38]図38は、いくつかの種のブドウ球菌および連鎖球菌におけるトランスグリコシラーゼのプロアポトーシスセグメントの保存された配列の多重配列アラインメントを示す。図36、37および38Cに示されるコリシンとしては、例えば、IVMPESGGNPNAVNPAGYR（配列番号５８）、IIMPESGGNPNIVNPYGYS（配列番号５９）、IVMPESGGNPNAVNPYGYR（配列番号６０）、IVLPESSGNPNAVNPAGYR（配

列番号６１）、IVLPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６２）、IVMPESGGNPNAVNELGYR（配列番号６３）、IVMPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６４）、IVMPESSGNPDAVNELGYR（配列番号６５）、IAQRESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６６）、またはIAERESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６７）のアミノ酸配列が挙げられ、これらは、本発明の一つまたは複数の態様において使用することができる。

[0059] [図39]図39は、大腸粘膜上皮細胞、小腸粘膜上皮細胞、皮膚のケラチノサイト、網膜上皮細胞、腎臓のポドサイトおよび尿管上皮細胞を、コリシン、コリシン様ペプチドまたはスクランブルペプチドとともに培養し、切断されたカスパーゼ-3陽性細胞を示す写真、およびそのカスパーゼ-3陽性細胞と対照のβアクチン陽性細胞との比率をグラフ化したものである。

[図40]図40は、健常者、安定した突発性肺線維症（IPF）患者、急性増悪を伴う突発性肺線維症（IPF）患者における血清中のコリシン濃度を比較しているグラフである。コリシンは、兎ポリクローナル抗トランスグリコシラーゼと抗体ラットモノクローナル抗コリシン抗体を用いて酵素免疫アッセイ法で測定した。健常者、n = 8；IPF患者、n = 22；急性増悪を伴うIPF患者、n = 22。バーは、平均±SDを示す。統計分析はt検定で行った。* p <0.05、** p <0.001

[図41]図41aおよびb：A549 肺胞上皮細胞を、スタフィロコッカス ネパレンシスの培養上清（1 :10 希釈）と抗コリシン抗体の存在下で培養し、アポトーシスを評価した結果を示すフローサイトメトリーの検討結果である。バーは平均±SDを示す。統計分析はANOVA法とNewman-Keuls検定を用いて行った。****p <0.0001。図41c：スタフィロコッカス ネパレンシスおよびスタフィロコッカス ヘモリチィカスの未希釈培養上清中の天然のコリシンの濃度を測定したグラフである。バーは平均±SDを示す。図41d：A549 肺胞上皮細胞は、健常者（図中、HC；n = 5）および特発性肺線維症の急性増悪を伴う患者（図中、IPF；n = 14）の気管支肺胞洗浄液（BALF）（1: 2 希釈）、抗コリシン中和抗体（クローン 21A）（図中、Anticorisin）または対照lgG（図中、Control IgG）の存在下で培養してアポトーシスを評価した結果を示すフローサイト

メトリーの検討結果である。バーは平均±SDを示す。図41e：図41dにおけるすべての健常者（n = 5）と IPF 患者（n = 14）の BALF によって誘導されたアポトーシス細胞の割合を抗コリシン抗体群と対照lgG群の間で比較した結果である。バーは平均±SDを示す。統計分析は Wilcoxon 検定を用いて行った。 ***p<0.001. ns, 有意差なし。図41f：健常者（n = 5）と IPF 患者（n = 14）の未希釈の BALF の天然コリシンの濃度を示すグラフである。バーは平均±SDを示す。 **p<0.01. 図41g：A549 肺胞上皮細胞を培養し、合成コリシンを最終濃度 10μg/ml で細胞培養培地に添加し、0、1、3、6、12、24時間後に培地を採取して、コリシン濃度を測定したグラフである。結果コリシンの in. vitro 半減期を示す。

発明を実施するための形態

[0060] ＜モノクローナル抗体分子＞

本発明は、ひとつの形態として、コリシンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。

本発明において、コリシンとは、一般に、肺線維症の急性増悪を誘発することが見出されているブドウ球菌プロアポトーシスペプチドを意味する。コリシンは、例えば、IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）、IVMPESGGNPNAVNPAGYR（配列番号５８）、IIMPESGGNPNIVNPYGYS（配列番号５９）、IVMPESGGNPNAVNPYGYR（配列番号６０）、IVLPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号６１）、IVLPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６２）、IVMPESGGNPNAVNELGYR（配列番号６３）、IVMPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６４）、IVMPESSGNPDAVNELGYR（配列番号６５）、IAQRESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６６）、またはIAERESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６７）のアミノ酸配列の一つを有していてもよい。好ましくは、コリシンは、IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）のアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0061] 配列番号１の配列はスタフィロコッカス ネパレンシスが起源であり得る。図36、37および38を参照しつつ、他の配列番号の配列の起源を記す：

・配列番号58：ｗｐ022791177（最上段236）1つ

・配列番号59：ｗｐ049409534　ｗｐ103371985（最上段248）2つ

・配列番号60：ｗｐ103328722　ｗｐ126565453（最上段239、244）2つ

・配列番号61：ｗｐ069827045　ｗｐ099091381（最上段246）2つ

・配列番号62：ｗｐ061853755（最上段244）1つ

・配列番号63：ｓｕｋ04795　ｗｐ105995336（最上段116）2つ

・配列番号64：ｗｐ112369066（最上段252）1つ

・配列番号65：ｗｐ099090334　（最上段120）1つ

・配列番号66：ｗｐ107644182～ｗｐ119486153　（最上段222～223）92つ

・配列番号66：ｗｐ096808177～CNDG00159　（最上段229）2つ

[0062] コリシンの保存は、系統解析により明らかにした。異なる細菌によって発現されるトランスグリコシラーゼの進化的関係を明らかにするため、スタフィロコッカス ネパレンシス菌株CNDGのゲノムで同定された6つのトランスグリコシラーゼのアミノ酸配列とそれらの相同体に基づき、公開されているデータベース（www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)に従って系統樹を構築した。系統樹のトポロジーは、祖先配列に近いトランスグリコシラーゼの誘導体が2つのIsaAクラスターに分かれ(IsaA-1とIsaA-2)、IsaA-1関連配列からSceDメンバーと呼ばれるタンパク質が進化したらしいことを示している(SceD-1、SceD-2、SceD-3、SceD-4)。IsaAおよびSceDアミノ酸配列のマルチプルアラインメントは一般的に、プロアポトーシスコリシンを表すアミノ酸残基の保存を明らかにし、その機能的意義を強調した(図36、37、38)。スタフィロコッカス キシロサス（Staphylococcus xylosus）、スタフィロコッカス コーニイ（Staphylococcus cohnii）およびスタフィロコッカス ネパレンシス由来のコリシン相同トランスグリコシラーゼのアミノ酸配列同一性は100%であった。さらに、これらのブドウ球菌は、IsaA－1およびIsaA－2クラスターの他のメンバーからのトランスグリコシラーゼの対応するコリシン領域と98%以上の同一性、およびSceDクラスターのメンバーの対応する領域と60%の同一性を共有した(図36、37、38)。トランスグリコシラーゼ（シンテニー）周囲の遺伝子クラスタリングのゲノム構築物は、スタフィロコッカス コーニイおよびスタフ

ィロコッカス ネパレンシスにおいて保存される傾向があった。

[0063] 本発明は、一つの実施態様として、PESSGNP（配列番号６８）またはNPAGY（配列番号６９）のアミノ酸配列を有するアミノ酸をエピトープとする、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。本発明において、コリシン分子に対する結合特性を有する抗コリシンモノクローナル抗体を種々作成し、その結合部位を同定するエピトープマッピングを行うことで、PESSGNP（配列番号６８）またはNPAGY（配列番号６９）のアミノ酸配列を有するエピトープを見出した（図12）。このエピトープを標的とするモノクローナル抗体分子またはその誘導体は、当該コリシンに対する同等の結合特性と同等の機能、例えばアポトーシス阻害および／または中和活性を有すると考えられる。よって、好ましい本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体は、コリシン対する中和活性を有するものである。これには、中和抗体が含まれる。

[0064] 本発明は、一つの具体的な実施態様として、

(IA)

（ｉ)配列番号３７のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号３８のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号３９のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号４１のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４２のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号４３のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域； (IIA) ；

（ｉ)配列番号７０のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４９のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５０のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号５２のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号５３のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５４のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

または

(IVA)

(ｉ)配列番号７２のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７３のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７４のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号７６のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７７のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７８のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

を含む、本発明のモノクローナル抗体をCDRで特定するAシリーズモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。

[0065] 本発明において、「モノクローナル抗体分子」は、2本の同一のH鎖（重鎖）と2本の同一のL鎖（軽鎖）との間でジスルフィド結合により相互に結合されたテトラペプチド鎖構造の免疫グロブリン分子を意味する。抗体H鎖およびL鎖のN末端に隣接する約110個のアミノ酸配列は、高度に変化しやすく、可変領域（Fv領域）として知られている。C末端に近い残りの部分のアミノ酸配列は、相対的に安定であり、定常領域として知られている。可変領域は、３つの超可変領域（HVR）と相対的に保存された４つのフレームワーク領域（FR）を備える。３つの超可変領域は、抗体の特異性を決定し、相補性決定領域（CDR）としても知られている。各L鎖可変領域（LCVR）および各H鎖可変領域（HCVR）は、アミノ末端からカルボキシル末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の連続した順番で、３つのCDR領域および４つのFR領域からなる。３つのL鎖CDRは、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を指し、また３つのH鎖CDRは、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を指す。抗体分子には、非ヒト抗体分子、ヒト化抗体分子、ヒト抗体分子が含まれる。

[0066] 本発明において、「単離された」とは、その本来の天然環境から分離された試料を意味する。例えば、生きている動物に存在する天然起源のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然の系において共存する試料の一部または全部から人為的に分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。

[0067] 本発明において、「モノクローナル抗体分子の誘導体」とは、ダイアボディおよび単鎖分子、ならびに「抗原結合断片」を意味する。「抗原結合断片」は、抗原結合活性を有するFab断片、Fab'断片、F(ab')2断片、およびコリシンと結合するFv断片、scFv断片を指し、本発明で規定されている抗体における１つ以上のCDR領域を含むことができる。Fv断片は、H鎖可変領域、L鎖可変領域、および定常領域を持たないすべての抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一般に、Fv抗体は、H鎖可変領域およびL鎖可変領域ドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、抗原結合に必要な構造を形成することができる。また、異なるリンカーが、２つの抗体の可変領域を連結するのに用いられ、単鎖抗体または単鎖Fv（scFv)と名付けられたポリペプチドを形成する。本明細書では、本発明の「抗原結合部位」は、本発明の抗体または抗原結合断片により認識される、抗原上の不連続の３次元部位を指す。本明細書では、「コリシンを特異的に認識する」とは、コリシンに結合する能力を有することを意味し、これは、「コリシンに結合する抗体」、または「コリシンに対する抗体」と同義である。

[0068] 本発明は、さらなる一つの具体的な実施態様として、

（IB） 配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

（IIB） 配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；または

（IVB） 配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号７１の

H鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

を有する、本発明のモノクローナル抗体をH鎖可変領域および変異型で特定するBシリーズモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。本発明において、変異を有するモノクローナル抗体分子またはその誘導体は、元の変異の無いモノクローナル抗体分子が有している結合特性および機能と同等の結合特性および機能を有するものである。

[0069] 本発明は、さらなる一つの具体的な実施態様として、

（IC） 配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIC） 配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIIC） 配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；または

（IVC） 配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくと

も１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

を有する、本発明のモノクローナル抗体をL鎖可変領域および変異型で特定するCシリーズモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。本発明において、変異を有するモノクローナル抗体分子またはその誘導体は、元の変異の無いモノクローナル抗体分子が有している結合特性および機能と同等の結合特性および機能を有するものである。

[0070] 本発明は、さらなる一つの具体的な実施態様として、

本発明のいずれかのH鎖可変領域、および本発明のいずれかのL鎖可変領域を有する、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。好ましいH鎖およびL鎖可変領域の組み合わせは、単離したモノクローナル抗体クローン4A、9A、2Aおよび21Aそれぞれの組み合わせである。具体的には、次の組み合わせである。

[0071] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン4A：モノクローナル抗体(IA)、(IB)、(IC)関連：

H鎖 (4A-HC.7331): 配列番号３６

evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvss、および

L鎖 (4A-LC.7395): 配列番号４０

divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkllyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleik

[0072] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン9A：モノクローナル抗体(IIIC)関連：

L鎖 (9A-LC.7402): 配列番号４４

divmtqspssqavsagekvtmsckssQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspkllyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPRTfgggtklelk

[0073] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン2A：モノクローナル抗体(IIA)、(IIB)、(IIC)関連：

H鎖 (2A-HC.7352): 配列番号４８

evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrft
isrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvss、および
L鎖 (2A-LC.7413): 配列番号５１
divmtqtpssravsagekvtmscksSQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkllyWAStresgvpdrfi
gtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk

[0074] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン21A：モノクローナル抗体(IVA)、(IVB)、(IVC)関連：
H鎖 (KK1410-2_VH_pep): 配列番号７１
evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrft
isrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss、および
L鎖 (KK1410-2_VL_pep): 配列番号７５
divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllyWASTRESgvpdrfi
gsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk。

[0075] 上記の通り、本発明のモノクローナル抗体分子は、いずれかのH鎖可変領域、および／またはいずれかのL鎖可変領域を有することができる。(IB)、(IIB)、(IVB)、(IC)、(IIC)、(IIIC)および(IVC)において、８０％は、好ましくは８５％、より好ましくは９０％、さらに好ましくは９５％である。H鎖可変領域およびL鎖可変領域は、「フレームワーク領域」(FRまたはFW)と命名されるより保存された領域が散りばめられた、「相補性決定領域」(CDR)と命名される高頻度可変性の領域へと細分することができることからの変異体である。

[0076] ある実施態様では、コリシンに対するモノクローナル抗体分子のL鎖またはH鎖可変フレームワークは、ヒトコンセンサス配列に由来するL鎖もしくはH鎖可変フレームワーク残基の少なくとも８０％、８５％、８７％、９０％、９３％、９５％、９７％、９９％を含むL鎖またはH鎖可変フレームワークを含むことができる。

[0077] 本発明は、さらなる一つの具体的な実施態様として、本発明のいずれかの変異型H鎖可変領域、および本発明のいずれかの変異型L鎖可変領域を有する

、本発明の変異型モノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。好ましい変異型H鎖および変異型L鎖可変領域の組み合わせは、単離したモノクローナル抗体クローン4A、9A、2Aおよび21Aそれぞれの組み合わせである。具体的には、次の組み合わせである。

[0078] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン4A：モノクローナル抗体(IA)、(IB)、(IC)関連：

H鎖: 配列番号３６

evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号４０

divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkllyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleikのL鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域

[0079] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン2A：モノクローナル抗体(IIA)、(IIB)、(IIC)関連：

H鎖: 配列番号４８

evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号５１

divmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkllyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkのL鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域

[0080] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン21A：モノクローナル抗体(IVA)、(IVB)、(IVC)関連：

H鎖: 配列番号７１

evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号７５

divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkのH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域。

[0081] 本発明は、さらなる一つの具体的な実施態様として、本発明のいずれかの変異型H鎖可変領域、および本発明のいずれかの変異型L鎖可変領域を有する、本発明の変異型モノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。好ましい変異型H鎖および変異型L鎖可変領域の組み合わせは、単離したモノクローナル抗体クローン4A、9A、2Aおよび21Aそれぞれの組み合わせである。具体的には、次の組み合わせである。

[0082] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン4A：モノクローナル抗体(IA)、(IB)、(IC)関連：

H鎖: 配列番号３６

evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号４０

divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkllyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleikのL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(

FW)領域を含むL鎖可変領域

[0083] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン2A：モノクローナル抗体(IIA)、(IIB)、(IIC)関連：

H鎖: 配列番号４８

evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号５１

divmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkllіyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkのL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域

[0084] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン21A：モノクローナル抗体(IVA)、(IVB)、(IVC)関連：

H鎖: 配列番号７１

evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvssのH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域、および

L鎖: 配列番号７５

divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllіyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkのL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(

FW)領域を含むL鎖可変領域。

[0085] 本発明のモノクローナル抗体分子は、ハイブリドーマにより産生される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換細胞により産生される遺伝子組換え抗体であり得る。本発明のモノクローナル抗体分子、本発明のいずれかのH鎖可変領域および本発明のいずれかのL鎖可変領域を有する本発明のモノクローナル抗体分子、および変異型モノクローナル抗体分子は、当技術分野において既知の方法により調製することができる。例えば、本発明の抗体分子をコードする核酸分子を、宿主細胞内に導入できるベクターに組み込む。本発明の抗体分子は、少なくとも２つのポリペプチド鎖を必ず含有するため、それらの鎖をコードする核酸は、単一ベクターまたは２つ以上のベクターのいずれかに存在させ得る。２つ以上のベクターが使用される場合、それらのベクターは、宿主細胞内に一緒に導入され得る。そのような抗体分子をコードする核酸を含むベクターおよび宿主細胞は、タンパク質が発現する条件下、培養すればよい。次いで、発現した抗体分子は、細胞が培養された培地から、または細胞自体から得ることができ、当技術分野において既知の多くの適切な手段のいずれかにより精製され得る。

[0086] 本発明において、コリシンが引き起こすアポトーシスは、外因性または内因性経路の活性化によって起こる（参考文献25）。外因性経路は、膜に結合する死亡受容体によって媒介されており、その受容体は、リガンドが結合してプロカスパーゼ-8がカスパーゼ-8に切断された後、細胞内死亡ドメインを介して細胞内死亡シグナルを伝達する（図5a）（参考文献25）。内因性経路は、ミトコンドリアによって調節される。アポトーシス促進刺激は、ミトコンドリア膜透過性を増加させるミトコンドリア摂動を引き起こし、アポトーシスリピート含有（BIRC）タンパク質のバキュロウイルス阻害物質のサプレッサーおよびアポトーシス促進因子を放出させ、これらはアポトーシス形成に寄与し、プロカスパーゼ-9をカスパーゼ-9に切断する（参考文献26、27）。カスパーゼ-8とカスパーゼ-9の切断型は、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3を活性化する(図5 a)。これら一連のアポトーシス経路を利用し

、種々の周知の方法により、アポトーシス活性を調べることができる。本発明の抗体分子またはその誘導体は、好ましくは、コリシン中和抗体分子またはその誘導体であり、さらに好ましくは、コリシンが引き起こすアポトーシスを中和および／または阻害する抗体分子またはその誘導体である。

[0087] ＜医薬組成物＞

本発明は、ひとつの形態として、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の有効量を含有する、急性肺障害または線維症を処置または予防するための医薬組成物に関する。

[0088] 本発明において、急性肺障害は、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎である。COVID-19と重症急性呼吸器症候群（SARS）を含む重要なヒト肺障害は、肺線維症の続発症を伴う（with sequelae of pulmonary fibrosis）急性肺損傷によって特徴付けられる。

[0089] 本発明において、線維症は、特発性肺線維症（IPF)、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨髄線維症および/または乳腺線維症などを含む。特に、特発性肺線維症は病因不明の不治の病である。肺胞上皮細胞のアポトーシス増加とそれに続く異常肺組織修復がその進行の中心である。本発明者らは、肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導し、肺線維症の急性増悪を誘発するペプチド、コリシンを同定することにより、本発明を見出した。本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体は、中和抗体、例えば線維症を患う患者の肺または他の組織におけるコリシンの負の作用を遮断または阻害する抗体であり得る。

[0090] 本発明において、「処置」とは（１）疾患または状態の発症を遅延または予防する；（２）疾患または状態の症状の進行、増悪、または悪化を減速または停止させる；（３）疾患または状態の症状の寛解をもたらす；あるいは（４）疾患または状態を治癒させることを目的とする方法またはプロセスを意味する。処置は、予防的措置として疾患または状態の発症前に施してもよいし、あるいはまた、処置は、疾患の開始後に施してもよい。

[0091] 本発明において、「予防」とは、炎症性および／または線維症性状態の発症を予防することを意味する。

[0092] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患または病態の処理、処置もしくは予防、または検査・診断のための薬剤を意味する。

[0093] 本明細書で用いられる「対象」または「患者」は、動物を意味し、それは治療、観察または試験の対象となる。単なる例示として、対象は、ヒトを含む哺乳動物であってもよい。コリシンに対する抗体は、好ましくはヒトのために、単独でまたは医薬組成物として提供され得る。この目的を達成するため、化合物は、予防的または治療的目的に従って種々の医薬的剤形に製造され得る。医薬的剤形の例は、経口剤、注射、坐剤、軟膏、膏薬等である。そのような剤形は、当業者に周知であり、従来の方法で製剤化され得る。

[0094] 本発明において、「医薬組成物」は、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤および／または賦形剤等の１つ以上の他の化学成分を含む、１つ以上のコリシンに対する抗体を含有する。医薬組成物は、コリシンに対する抗体の生物への投与を容易にする。コリシンに対する抗体を投与する複数の技術が知られており、例えば、経口投与、または局所投与、静脈投与、エアロゾル投与、点眼投与等の非経口投与を含む。

[0095] 「希釈剤」の用語は、輸送前に所望の薬剤（例えばコリシンに対する抗体）を希釈するのに用いられる化合物を意味する。希釈剤は、より安定な環境を提供できるため安定剤のためにも用いられ得る。pHを制御または維持できる緩衝液に溶解された塩は、希釈剤として有益であり、これには、リン酸緩衝生理食塩水を含む。

[0096] 「有効量」または「治療的有効量」は、治療される疾病、障害または状態の症状の１つ以上の程度を緩和するのに投与される本発明のコリシンに対する抗体の十分な量を意味する。その結果、疾病の兆候、症状若しくは原因の軽減および／または緩和を可能とする。例えば、治療用途における「有効量」は、過度の副作用がなく、所望の薬理効果、治療的改善または疾病症状の臨床的に顕著な低減を提供するのに必要とするコリシンに対する抗体の量で

ある。「有効量」は、コリシンに対する抗体の代謝、遺伝学、組合せ、または対象における年齢、体重、全身状態、治療される条件、治療される条件の重症度、および処方医師の判断の違いにより対象毎に異なり得る。

[0097] 「有効量」は「予防的有効量」を含み、これは、治療される疾病、状態または障害の症状の１つ以上の程度を緩和するのに患者に適用される本発明のコリシンに対する抗体の量を意味する。そのような予防的適用において、そのような量は、対象の健康状態、体重等に変動し得る。

[0098] 単位剤形のそれぞれに組み込まれるコリシンに対する抗体の量は、対象の健康状態または製剤の型によって異なり得る。好ましい単位剤形当たりの量は、経口投与では約１～1000mg、注射では約0.1～500mgである。１日当たりの用量は、患者の症状、体重、年齢、性別および他の要因で異なり、通常の範囲は１日当たり成人で約0.1～5000mg、好ましくは約1～1000mgである。製剤は、好ましくは単回投与または２～４回の分割投与で投与される。

[0099] 経口投与用の固形製剤の製剤化のために、賦形剤、および必要な場合は結合剤、崩壊剤、潤滑剤、着色剤、矯正剤、香料等が抗ＰＤ－１製剤に加えられ、製剤は通常の方法により錠剤、コーティング錠、顆粒剤、粉末剤またはカプセル剤等に製剤化される。そのような添加剤は、本分野において周知であり、有用な例は、ラクトース、スクロース、塩化ナトリウム、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロースおよびケイ酸等の賦形剤、水、エタノールプロパノール、単シロップ、グルコース溶液、デンプン溶液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウムおよびポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、アガー粉末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリドおよびラクトース等の崩壊剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂およびポリエチレングリコール等の潤滑剤、スクロース、橙皮、クエン酸および酒石酸等の矯正剤である。

[0100] 経口投与用液体製剤の製剤化のために、矯正剤、緩衝剤、安定剤、香料等が化合物に加

えられ、その混合物は、従来の方法により経口液製剤、シロップ剤またはエリキシル剤等に製剤化され得る。有用な矯正剤の例は、上記の通りである。緩衝剤の例は、クエン酸ナトリウム等である。安定剤の例は、トラガカント、アラビアガム、ゼラチン等である。非限定的実施形態として、シロップ剤は、以下に示す割合の成分を用いて従来の方法で調整され得る。

[0101] 注射剤は、コリシンに対する抗体に、pH調整剤、緩衝剤、安定剤、等張剤、局所麻酔剤等を加えることにより、従来の方法で、皮下、筋肉内または静脈注射剤として調製される。pH調整剤および緩衝剤の例は、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等である。安定剤の例は、ピロ亜硫酸ナトリウム、ＥＤＴＡ、チオグリコール酸等である。局所麻酔剤の例は、プロカリン塩酸塩、リドカイン塩酸塩等である。等張剤の例は、塩化ナトリウム、グルコース等である。非限定的実施形態として、注射剤は、以下に示す割合の成分を用いて従来の方法で調整され得る。

[0102] 本発明はこの形態において別の態様として、急性肺障害または線維症を処置または予防するための方法であって、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体を、そのような処置等を必要としている対象に投与することを含む方法、好ましくは、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の有効量をそのような対象に投与することを含む方法に関する。好ましくは、急性肺障害が、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎であり、または線維症が、特発性肺線維症（IPF）、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨髄線維症、および乳腺線維症からなる群より選択される、本発明の方法である。

[0103] さらに、本発明は別の態様として、急性肺障害または線維症を処置または予防するための本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体に関する。好ましくは、急性肺障害が、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎であり、または線維症

が、特発性肺線維症（IPF）、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨髄線維症、および乳腺線維症からなる群より選択される、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体である。

本発明はさらなる別の態様として、急性肺障害または線維症を処置または予防するための医薬を製造するための、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の使用に関する。好ましくは、急性肺障害が、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎であり、または線維症が、特発性肺線維症（IPF）、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨髄線維症、および乳腺線維症からなる群より選択される、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体である。

[0104] ＜ワクチン＞

本発明は、別の形態として、アミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体を有効成分とする、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン組成物に関する。好ましいコリシン変異体は、コリシンN14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR（配列番号５５）およびコリシンP15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR（配列番号５６）である。

[0105] 本発明において、「ワクチン組成物」は、特異的免疫反応（特異的抗体の産生）を誘導する抗原を含む生物学的製剤を意味する。本発明において、ワクチンは、修飾されていてもよいペプチドを含み得る。本発明のワクチン組成物に含まれるコリシン変異体は、特定の変異またはアミノ酸位置の変化によってコリシンにおけるアポトーシス促進活性を弱め、かつ抗原性を有するものである。すなわち、コリシンペプチドの異なる位置にあるアミノ酸を変化させ、アポトーシスを誘導しないが、プロアポトーシスコリシンペプチドを中和する抗体を誘導するのに十分コリシンと類似しているペプチドである。

[0106] 本発明において、変異には、「アミノ酸残基の置換」、「アミノ酸残基の欠失」、「アミノ酸残基の挿入」または「アミノ酸残基の付加」が含まれる

。「アミノ酸残基の置換」としては、例えば非保存的アミノ酸置換があげられる。非保存的アミノ酸置換とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と異なる性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、非保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と別のグループに属する他のアミノ酸により置換される。異なる性質の側鎖を有するアミノ酸のグループは、当該分野で公知である。このような例としては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、中性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、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）という同じ性質を有するアミノ酸グループとは別のグループのアミノ酸を選択する。

[0107] また、中性側鎖を有するアミノ酸は、さらに、極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、および非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、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）に分類することができ、この場合も、異なる性質を有するグループのアミノ酸を選択する。また、他のグループとして、例えば、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、水酸基（ アルコール性水酸基、フェノール性水酸基）を含む側鎖を有するアミノ酸（例えば、セリン、トレオニン、チロシン）等も利用できる。

[0108] 「アミノ酸残基の欠失」としては、例えば、コリシンペプチドの部分配列の中から、任意のアミノ酸残基を選択して欠失させることがあげられる。「アミノ酸残基の挿入」または「アミノ酸残基の付加」としては、例えばコリシンペプチドの部分配列の内部にアミノ酸残基を挿入するか、あるいは、該部分配列のN末端側またはC末端側に、アミノ酸残基を付加させることがあげ

られる。

[0109] 本発明はこの形態において別の態様として、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン療法であって、アミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体を、そのような処置等を必要としている対象に投与することを含む療法、好ましくは、本発明のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の有効量をそのような対象に投与することを含む療法に関する。好ましいコリシン変異体は、コリシンN14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR（配列番号５５）およびコリシンP15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR（配列番号５６）である。

[0110] さらに、本発明は別の態様として、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン療法に使用するアミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体に関する。

本発明はさらなる別の態様として、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン療法に使用する医薬を製造するための、アミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体の使用に関する。

[0111] ＜バイオマーカー＞

本発明は別の態様として、コリシンの、急性肺障害または線維症の進行度を判定するためのバイオマーカーとしての使用に関する。コリシンのバイオマーカーとしての使用は、線維症を有するか、または発症していると疑われる被験者を評価または診断も包含する。被験者から生物学的試料を採取し、その生物学的試料中に存在するコリシンの量を検出する。生物学的試料中のコリシンの検出された量を、1以上の所定の閾値と比較すればよい。所定の閾値とは、例えば健常人に典型的な、通常、存在するコリシンのレベルに基づいて設定され得る。

[0112] 生物学的試料は、例えば痰、気管支分泌物、胸水、気管支肺胞洗浄液（BALF）、および気管支または肺から採取された組織であり得る。生物学的試料は、血液であってもよい。ここに、コリシンは、例えば、IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）、IVMPESGGNPNAVNPAGYR（配列番号５８）、IIMPESGGNPNIVNPYGYS（配列番号５９）、IVMPESGGNPNAVNPYGYR（配列番号６０）、IVLPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号６１）、IVLPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６２）、IVMPESGGNPNAVNELGYR（配列番号６３）、IVMPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６４）、IVMPESSGNPDAVNELGYR（配列番号６５）、IAQRESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６６）、またはIAERESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６７）のアミノ酸配列の一つを有していてもよい。好ましくは、コリシンは、IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）のアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0113] コリシンは、質量分析、ウエスタンブロッティング、または酵素結合免疫吸着検定法(例えば、ELISAは、例えば、IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）、IVMPESGGNPNAVNPAGYR（配列番号５８）、IIMPESGGNPNIVNPYGYS（配列番号５９）、IVMPESGGNPNAVNPYGYR（配列番号６０）、IVLPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号６１）、IVLPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６２）、IVMPESGGNPNAVNELGYR（配列番号６３）、IVMPESSGNPNAVNELGYR（配列番号６４）、IVMPESSGNPDAVNELGYR（配列番号６５）、IAQRESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６６）、またはIAERESGGDLKAVNPSSGA（配列番号６７）のアミノ酸配列のアミノ酸配列のいずれかを認識する抗体に結合したコリシンを検出することによって、例えば、標識された抗体を、例えば基質に結合する抗体に結合することによって検出することができる。このような方法を実施するためのキットは、このような抗体および生物学的試料中のコリシンの検出を行うための1以上の試薬を含み得る。

[0114] かかる態様において、本発明は、線維化の進行度を判定する方法であって、

（a10）被検者のコリシンの量（被検バイオマーカー量）を測定する工程、

（b10）被検バイオマーカー量と、基準のコリシンの量（対照バイオマーカー量）とを比較する工程、および

（c10）被検バイオマーカー量が対照バイオマーカー量よりも多い場合に、被検者を、急性肺障害または線維症の進行度が高いと判定する方法、を提供する。基準のコリシンの量は、（a10）工程より前に測定された同一被検者のコリシンの量であってもよく、健常者の筋線維芽細胞のコリシンの量であってもよい。

[0115] 本発明者らは、コリシンが線維症特異的なマーカー分子であり、それが線維化疾患、特に重篤な線維化疾患に関連していることを見出した。本発明の方法、バイオマーカーおよびコリシンの使用により、急性肺障害または線維症の進行度を予測することが可能となり、急性肺障害または線維症の予防または治療にとって有益である。

[0116] 本明細書で用いられているアミノ酸の３文字表記と１文字表記の対応は以下の通りである。

アラニン：Ala：A

アルギニン：Arg：R

アスパラギン：Asn：N

アスパラギン酸：Asp：D

システイン：Cys：C

グルタミン：Gln：Q

グルタミン酸：Glu：E

グリシン：Gly：G

ヒスチジン：His：H

イソロイシン：Ile：I

ロイシン：Leu：L

リジン：Lys：K

メチオニン：Met：M

フェニルアラニン：Phe：F

プロリン：Pro：P

セリン：Ser：S

スレオニン：Thr：T

トリプトファン：Trp：W

チロシン：Tyr：Y

バリン：Val：V

[0117] 以下、本発明を参考例および実施例により、詳細に説明する。これらは、単なる例示であり、本発明は、特許請求の範囲に記載した発明の範囲内で種々の変形が可能であり、それらも本発明の範囲内に含まれることに留意すべきである。

実施例

[0118] 参考結果１

アポトーシス促進性コリシン様ペプチドを有する広範囲の病原体群

本発明者らは以前、スタフィロコッカス ネパレンシス（Staphylococcus nepalensis）CNDG株、および肺線維症の終末期マウス由来の肺線維症標本を接種した培地で増殖したブドウ球菌種（Staphylococcus spp.）の混合物からの培養上清が、肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導することを示した（非特許文献１９）。また、スタフィロコッカス ネパレンシスから放出されるコリシンと称されるトランスグリコシラーゼ断片が、確立されたトランスジェニックマウスにおける肺上皮細胞アポトーシスの原因であり、慢性肺線維症の急性増悪を引き起こすことを報告した（非特許文献１９）。コリシンまたはその誘導体の配列はブドウ球菌族の多くのメンバー間にて高度に保存されていることから（非特許文献１９）、スタフィロコッカス ネパレンシスに加え、他のブドウ球菌の種でもトランスグリコシダーゼからコリシン様ペプチドが放出され、肺上皮細胞においてアポトーシスを誘導するものと予想した。

[0119] この予想を検証するため、肺線維症標本を接種した培地において増殖させたブドウ球菌種の混合物を線条接種し、個々の細菌コロニーを単離した。得られた12個のコロニーをスクリーニングし、菌株1、7および12の3つのコロニーがアポトーシス因子を分泌し、残りの単離体ではアポトーシス活性が検出されなかった。これらの結果は、先に発見していた菌株6の培養物（非特許文

献１９）はアポトーシス促進性細菌および非アポトーシス細菌の混合物であったことを示している。全ゲノム配列を決定すると、これら3つのアポトーシス細菌単離体は、スタフィロコッカス ヘモリチィカス（Staphylococcus haemolyticus）の別個の菌株であるであることが分かった。スタフィロコッカス ヘモリチィカス菌株1、7および12の全ゲノム配列はジーンバング・データベースにて、受託番号が振られて寄託されていた。これらのゲノム分析は、菌株1（トランスグリコシラーゼ_1bp_353）、菌株7（トランスグリコシラーゼ_7bp_350）および菌株12（トランスグリコシラーゼ_12bp_350)において保存されているコリシン様断片の存在を示した（図1）。各菌株の対応するトランスグリコシラーゼ(非特許文献１９)において、コリシン様断片の配列は同一であった（図1）。

[0120] 次に、各細菌株の細菌培養上清の存在下でA549肺胞上皮細胞を培養し、アポトーシスを評価した。各菌株の培養上清は、肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導した(図2a、b)。透過型電子顕微鏡により、スタフィロコッカス ヘモリチィカス菌株12の培養上清で処理した後のアポトーシス細胞が増加していることが確認された（図2c)。各スタフィロコッカス ヘモリチィカス菌株由来の培養上清の存在下で培養したA549肺胞上皮細胞も、カスパーゼ-3の切断の有意な増加を示した(図2d、e)。製造業者(ThermoFisher Scientific)により調製されたスタフィロコッカス ヘモリチィカスコリシン様配列の合成ペプチドは、既報の配列(非特許文献19)と比較して単一の位置でのみ異なっていたが、これは、A549肺上皮細胞に対する各菌株(菌株1、7および12)の上清のアポトーシス促進効果を再現した(図3a、b、c)。スタフィロコッカス ヘモリチィカスは共生細菌であるが、日和見性かつ多剤耐性の病原体としてもよく知られている（参考文献20）。この細菌は、酸素および塩（10% NaCl）の条件下にてより至適に成長する（参考文献21）。スタフィロコッカス ヘモリチィカスを原因とするヒト感染症には、敗血症、腹膜炎、心内膜炎、髄膜炎、および創傷、骨や尿路の感染症が含まれる。興味深いことに、本明細書で単離したスタフィロコッカス ヘモリチィカス菌株由来のトランスグリコシラー

ゼホモログのコリシン様配列は、Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus（Genbank protein受入番号SKR 69498.1）およびListeria monocytogenes（Genbank protein受入番号ECO 1693478.1)菌株由来のトランスグリコシラーゼで観察された配列と同一である(図4)。Listeria monocytogenesは、最も毒性の強い食品媒介病原体であり（参考文献22）、Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus（参考文献23）は、一般的に慢性肺感染症を引き起こす多剤耐性の非結核性抗酸菌である。Listeria monocytogenesおよびMycobacteroides abscessus subsp. abscessusの他の菌株由来の相同トランスグリコシラーゼ、ならびに日和見病原体であるWeissella confusa（参考文献24）由来の仮想上のタンパク質もまた、アポトーシス促進活性を有するコリシン様配列を含む(図3 a、b、c)。これらの観察事項は、広範囲の病原体がこの毒性ペプチドの誘導体を担持していることを示している。

[0121] 参考結果２

細菌培養上清およびコリシンによる細胞内アポトーシス経路の活性化

図5aは、アポトーシスの外因性または内因性経路を示している。A549肺胞上皮細胞を、S. ヘモリチィカス株12の(1/10希釈)培養上清の存在下で24時間培養した。切断されたカスパーゼ-8、切断されたカスパーゼ-9、および切断されたカスパーゼ-3に陽性の細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定し、定量化した。S. ヘモリチィカスの培養上清は、対照刺激と比較して、活性化カスパーゼ-8および活性化カスパーゼ-3を有する肺胞上皮細胞の数を有意に増加させることを見出した（図5b）。

[0122] 次に、コリシンが、Baxなどのアポトーシス促進因子および抗アポトーシス因子BIRC1、BIRC5、BIRC7、Bcl2、BclXL、サイクリンD1、増殖細胞核抗原、増殖Ki-67のマーカーのmRNA発現に対する作用を調べた。A549肺胞上皮細胞を50μMコリシンの存在下で24時間培養し、全mRNAを抽出し、cDNAを調製してからRT-PCRで増幅した。結果、コリシンは、抗アポトーシス因子のmRNA発現を有意に低下させ、そしてスクランブルペプチドと比較して、Baxなどのアポトーシス促進因子およびアポトーシスプロテアーゼ活性化因子-1（APAF-1）のm

RNA発現を有意に増加させることも見出した（図6、表1）。これらの結果は、細菌由来ペプチドがアポトーシスの内因性経路を選択的に活性化することを示している。

[0123] [表1-1]

表１：RT-PCRで使用したプライマー

遺伝子		配　列 (5' -> 3')	長さ	Tm	Reference	位置	サイズ
BIRC1	センス鎖	TACGAAGAACTACGGCTGGAC（配列番号２）	21	61.2	NM_004536	829-849	180 bp
	アンチセンス鎖	GGTGTGATCGTCTAATGGGTCA（配列番号３）	22	61.5		1008-987	
BIRC2	センス鎖	GTTCAGTGGTTCTTACTCCAGC（配列番号４）	22	60.6	NM_001166	444-465	91 bp
	アンチセンス鎖	ACTGTAGGGGTTAGTCCTCGAT（配列番号５）	22	61.4		534-513	
BIRC3	センス鎖	TTTCCGTGGCTCTTATTCAAACT（配列番号６）	23	60.2	NM_001165	399-421	96 bp
	アンチセンス鎖	GCACAGTGGTAGGAACTTCTCAT（配列番号７）	23	61.9		494-472	
BIRC4	センス鎖	TATCAGACACCATATACCCGAGG（配列番号８）	23	60.2	NM_001167	446-468	98 bp
	アンチセンス鎖	TGGGGTTAGGTGAGCATAGTC（配列番号９）	21	60.7		543-523	
BIRC5	センス鎖	AGGACCACCGCATCTCTACAT（配列番号１０）	21	62.5	NM_001012270	44-64	118 bp
	アンチセンス鎖	AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG（配列番号１１）	21	61.7		161-141	
BIRC6	センス鎖	TGCACAGTTTCCTTGTACGGA（配列番号１２）	21	61.6	NM_016252	1128-1148	207 bp
	アンチセンス鎖	GAGCTTGGGTCTCCTGATAGAA（配列番号１３）	22	60.6		1334-1313	

[表1-2]

BIRC7	センス鎖	GCTCTGAGGAGTTGCGTCTG（配列番号１４）	20	62.5	NM_139317	254-273	245 bp
	アンチセンス鎖	CACACTGTGGACAAAGTCTCTT（配列番号１５）	22	60.1		498-477	
BIRC8	センス鎖	GCGCTCAGAAAGACACTACAG（配列番号１６）	21	60.7	NM_033341	464-484	93 bp
	アンチセンス鎖	CCTCTTGCAGACGCCTTAGC（配列番号１７）	20	62.9		556-537	
GAPDH	センス鎖	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT（配列番号１８）	21	61.6	NM_001256799	108-128	197 bp
	アンチセンス鎖	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG（配列番号１９）	23	60.9		304-282	
BCL2	センス鎖	GCCTTCTTTGAGTTCGGTGG（配列番号２０）	20	60.9	NM_000657	445-464	53 bp
	アンチセンス鎖	ATCTCCCGGTTGACGCTCT（配列番号２１）	19	62.7		497-479	
BAX	センス鎖	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG（配列番号２２）	21	62.1	NM_138763	116-136	155 bp
	アンチセンス鎖	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT（配列番号２３）	21	61.9		270-250	
BCL-XL	センス鎖	GACTGAATCGGAGATGGAGACC（配列番号２４）	22	61.6	NM_001191	120-141	179 bp
	アンチセンス鎖	GCAGTTCAAACTCGTCGCCT（配列番号２５）	20	63.0		298-279	
APAF1	センス鎖	GTCACCATACATGGAATGGCA（配列番号２６）	21	60.1	NM_181868	448-468	177 bp

[表1-3]

	アンチセンス鎖	CTGATCCAACCGTGTGCAAA（配列番号２７）	20	60.9		624-605	
CCND1	センス鎖	CAATGACCCCGCACGATTTC（配列番号２８）	20	61.7	NM_053056	461-480	146 bp
	アンチセンス鎖	CATGGAGGGCGGATTGGAA（配列番号２９）	19	61.8		606-588	
PCNA	フォワード	ACACTAAGGGCCGAAGATAACG（配列番号３０）	22	61.8	NM_002592	265-286	209 bp
	リバース	ACAGCATCTCCAATATGGCTGA（配列番号３１）	22	61.2		473-452	
MKI67	フォワード	AGAAGAAGTGGTGCTTCGGAA（配列番号３２）	21	61.3	NM_002417	1936-1956	202 bp
	リバース	AGTTTGCGTGGCCTGTACTAA（配列番号３３）	21	61.7		2137-2117	
CASP3	センス鎖	CATGGAAGCGAATCAATGGACT（配列番号３４）	22	60.7	NM_004346	64-85	139 bp
	アンチセンス鎖	CTGTACCAGACCGAGATGTCA（配列番号３５）	21	60.6		202-182	

[0124] [表中、

BIRC、アポトーシスリピート含有（BIRC）タンパク質のバキュロウイルス阻害物質;

GAPDH、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ;

Bcl-2、B細胞リンパ腫2;

Bax、Bcl-2関連Xタンパク質;

BclXL：B細胞リンパ腫-過剰ラージ;

APAF-1：アポトーシスプロテアーゼ活性化因子1;

CCND1、サイクリンD1;

PCNA、増殖細胞核抗原;

MPKi-67、増殖マーカーKi-67]

[0125] 参考結果３

細菌分泌因子におけるコリシン含有トランスグリコシラーゼ分解能および肺上皮細胞のアポトーシス誘導能

本発明者らは、アポトーシスペプチドであるコリシンが、S.ネパレンシストランスグリコシラーゼから切断され、肺線維症のAEを誘導する可能性があることを以前に報告している（非特許文献19）。この切断に関連する因子は未知である。ここでは、コリシン排出細菌がそれぞれのトランスグリコシラーゼからアポトーシスペプチドを切断するプロテアーゼを分泌すると予想した(図7a)。この予想を検証するために、まずS.ネパレンシス CNDG菌株の培養上清からペプチド画分を部分精製した。S.ネパレンシスの培養上清を>50 kDaフィルターを用いて連続的に濃縮し、次いで通過(<50 kDa)画分を>10 kDaフィルターを用いて濃縮した(図7b)。濃縮した画分をセファクリルS-300カラムに負荷し、ゲル電気泳動により産物を分離した後、コリシン含有組換トランスグリコシラーゼに対する採取画分の消化活性を測定した(図7c)。高い消化活性を有する画分をプールし、濃縮し、セファクリルS-300カラムへ2回目の負荷を行い、消化活性の高い画分を分離した(図7d)。

[0126] 次に、消化緩衝液、組換えトランスグリコシラーゼ、およびスタフィロコッカス ネパレンシス培養上清から調製した種々の量のペプチダーゼ画分(>10 kDa)を含む反応混合物を37℃で2時間インキュベートした後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、次いで銀染色で染色した。また、消化緩衝液、組換えトランスグリコシラーゼ、およびスタフィロコッカス ネパレンシス培養上清から調製したペプチダーゼ画分(> 10kDa)の用量を含む反応混合物を、種々の時間間隔で37℃にてインキュベートした後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを行い、次いで銀染色で染色した。結果、ゲルの銀染色は、組換えトランスグリコシラーゼの用量かつ時間依存的な分解を示した(図8a、b)。別の実験として、スタフィロコッカス ヘモリチィカスの培養上清のトランスグリコシラーゼの分解作用を調べた。消化緩衝液、組換えトランスグリコシラーゼおよびスタフィロコッカス ヘモリチィカス菌株12の培養上清を含む反応混合物を37℃で14時間インキュベー

トした後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、次いで、銀染色で染色した。結果、スタフィロコッカス ヘモリチィカスの培養上清も、組換えトランスグリコシラーゼを切断することを示した(図9)。次に、A549肺胞上皮細胞をサブコンフルエントまで培養し、その培養細胞を、スタフィロコッカス ネパレンシスの細菌上清中の組換えトランスグリコシラーゼを2時間インキュベートして調製した分解産物で処理した。結果、細胞培養の48時間後に実施したフローサイトメトリー分析により、対照と比較して、分解産物の存在下で培養した上皮細胞のアポトーシスが有意に増加していることが明らかにされた(図8c、d)。これらの結果は、プロテアーゼのような細菌分泌因子がトランスグリコシラーゼを切断し、それにより肺上皮細胞のアポトーシスを誘導するコリシンペプチドを与えることを示している。

[0127] 参考結果４

トランスグリコシラーゼを切断する細菌分泌因子：推定セリンプロテアーゼ

トランスグリコシラーゼ切断因子がプロテアーゼであるかどうかを決定するため、組換えトランスグリコシラーゼ（2mg/ml）、スタフィロコッカス ネパレンシスの培養上清から調製したペプチダーゼ画分（> 10kDa）を含む反応混合物に、セリンプロテアーゼ阻害剤のペファブロックSCまたはジイソプロピルフルオロリン酸（DFP）、システインプロテアーゼ阻害剤のE-64、またはキレート剤のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を種々の濃度(0.1、0.3、1mM)で添加し、0.5、1および2時間、37℃にてインキュベートした。結果、銀染色によるタンパク質ゲル上で産物を分離した後、セリンプロテアーゼ阻害剤ペファブロックSCおよびDFPがトランスグリコシラーゼ分解を抑制することを見出した(図10 a、b、c、d)。しかし、E-64もEDTAも、トランスグリコシラーゼ分解を抑制しなかった(図10 e、f、g、h)。これらの結果は、スタフィロコッカス ネパレンシスが分泌する推定セリンプロテアーゼはそのコリシン含有トランスグリコシラーゼを分解し、コリシンを含むより小さなペプチドにすることを示している。

[0128] 材料および方法

本明細書における参考結果、実施例にて使用する試薬等は、次のようにして入手または調製した。

試薬：

ヒト肺上皮細胞株A549および過塩培地(ATCCメディア1097、2168)をアメリカン タイプ カルチャー コレクション（マナサス、バージニア州（アメリカ合衆国))から、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）をSigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州（アメリカ合衆国))から、ウシ胎児血清（FBS）をBio Whittaker（ウォーカーズビル、メリーランド州（アメリカ合衆国))から購入した。

L－グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンはInvitrogen（カールズバード、CA)から購入した。

合成コリシンおよび対応する合成スクランブルペプチド：NRVYNGPAASPVSEGMPIN（配列番号１）は、Peptide Institute Incorporation（大阪市)およびThermoFisher Scientific（ウォルサム、MA)は調製し提供した。

ブレオマイシン（BLM）は、日本化薬(日本、東京)から、Alzet浸透圧ミニポンプ（モデル2001)は、Alza Corporation（パロアルト、CA）から購入した。ここに、スクランブルペプチドは、アミノ酸配列をバラバラにして機能を無くしたペプチドであり、具体的には、コリシンのアミノ酸配列をバラバラにして機能しなくなったペプチドである。

[0129] 動物：

実験動物として、日本SLC（浜松市、日本)から雌WT C 57 BL/6 Jマウスを購入し、肺損傷、肺線維症、および急性増悪を誘発させた（参考文献29）。体重20-22 gおよび8-9週齢のWTマウスをBLM誘発肺線維症実験に用いた。また、自然に進行し致死的な肺線維症を発症するC 57 BL/6 J背景の雌および雄のトランスフォーミングβ1（TGFβ1）TGマウスとそのWT同腹仔を用いた（非特許文献19、参考文献31および61）。TGマウスとWT同腹仔の体重は20-24 gで、8-10週齢であった。マウスは、三重大学の実験動物施設にて、21℃、12時間明暗サイクルの特定病原体フリー環境で飼育した。マウスのケージには木材-

羊毛営巣材料を供給し、マウスは自由に水と食物にアクセスできた。TGマウスは、マウスの尾から単離したDNAおよび特異的プライマー対を用い、標準的PCR分析により遺伝子型を決定した（非特許文献19）。

[0130] 倫理的声明：

組換えDNA実験安全委員会(認可番号:I-614 (henko 1);日付:2013/15/12;認可番号:I-708、日付:13/02/2019)および三重大学動物実験委員会は、実験計画書(認可番号:25-20-hen 1-sai 1、日付:23/07/2015;認可番号29-23、日付15/01/2019)を承認した。すべての実験手順は、国立衛生研究所（https://ola w.nih.gov/）によって公表された国際的に承認された実験動物ケア原則に従って実施した。研究は、動物研究のためのARRIVEガイドラインに従っており、変数は処置群の盲検下で測定した。

[0131] ペプチダーゼ画分の調製：

連続的に濃縮した、100 mlのスタフィロコッカス ネパレンシス培養上清を>50 kDaのフィルターを用いて調製し、得られた通過画分を>10 kDaのフィルターを用いて図7 bに記載のようにして濃縮した。次に、>10 kDaに濃縮した試料をセファクリルS-300カラムに負荷し、いくつかの画分(各1 ml)を分離した。コリシン含有組換えトランスグリコシラーゼ上の各画分のタンパク質分解活性の産物を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色によって分離した(図7 c)。銀染色は第一2-D銀染色キット(第一（東京都))を用いて行った。反応混合物は、1×消化緩衝液（20 mM TrisCl、140 mM NaCl、pH7.5）0.5μL、2 mg/ml組換えトランスグリコシラーゼおよび各画分6μLを含有していた。次いで、高い消化活性を有する画分(図7 cの画分10から13)のプールを調製し、0.5 mlに濃縮した。次に、濃縮試料をセファクリルS-300カラムに負荷し、いくつかの画分に分離し、280 nmで吸光度を測定した（図7 d)。次いで、組換えトランスグリコシラーゼ351上の各画分の消化活性を、上記のようにして評価した(図7 d)。実験では、タンパク質分解活性の高い画分を用いた。

[0132] 組換えトランスグリコシラーゼの分解アッセイ：

反応混合物50μlに組換えトランスグリコシラーゼ(2μg/mL) 12.5μl、10×消化緩衝液(TrisCl、1.4 NaCl、pH 7.5) 5μl、スタフィロコッカス ネパレンシス培養上清25μlおよび蒸留水7.5μlを加えた。反応混合物を37℃で一晩インキュベートし、次いで、反応混合物10μlをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にかけ、産物を銀染色で可視化した。別の実験において、スタフィロコッカス ネパレンシス培養上清、抗コリシンモノクローナル抗体、またはアイソタイプ抗体のいくつかの量を反応混合物に加え、その後の銀染色のためにSDS-PAGE上で走らせた。

[0133] トランスグリコシラーゼ分解阻害のアッセイ：

組換えトランスグリコシラーゼ(2μg/mL)を含む消化緩衝液、スタフィロコッカス ネパレンシス培養上清、種々の濃度(0.1、0.3、1 mM)のセリンプロテアーゼ阻害剤(ペファブロックSCまたはジイソプロピルフルオロリン酸 [DFP])、システインプロテアーゼ阻害剤（E-64）またはキレート剤(エチレンジアミン四酢酸 [EDTA])との反応混合物を調製した。次に、SDS-PAGEと銀染色を行う前に、混合物を、0.5、1、および2時間インキュベートした。

[0134] 細胞培養：

ヒトA549肺胞上皮細胞の培養を、10%ウシ胎児血清、0.03%（w/v）L-グルタミン、100 IU/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを補充したDMEM中、5% CO2加湿雰囲気中、37℃で行った。

[0135] アポトーシスアッセイ：

A549細胞(4 x 105細胞/ウエル)を12ウエルプレートでサブコンフルエンシーまで培養し、24時間の血清飢餓後、48時間後のアポトーシスを評価するためにコリシンまたはコリシン様ペプチド、あるいはコリシン配列に基づくスクランブルペプチドで処置した。アポトーシスは、フローサイトメトリー(英国オックスフォード、BD Biosciences、FACScan)により、フルオレセイン標識アネキシンVとヨウ化プロピジウム(FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI、Bioelgend、サンジエゴ、CA)染色後に評価した。切断型カスパーゼ-8、切断型カスパーゼ-9および切断型カスパーゼ-3に関して陽性細胞の

割合を、Cell signaling Technology（ビバリー、マサチューセッツ州（アメリカ合衆国））由来の抗体を用いたフローサイトメトリーにより評価した。

[0136] アポトーシス細胞の透過型電子顕微鏡観察。

A549細胞(10×104細胞/ml)をコラーゲン被覆8ウエルチャンバースライド(BD Bioscience、カリフォルニア州サンノゼ)上に平板培養し、セミコンフルエントするまで培養した。細胞を6時間血清飢餓にし、アポトーシス促進ペプチド(5μM)で16時間刺激した。細胞を、0.1 Mカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)中、2%新鮮ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒドで室温にて2時間固定した。0.1 Mカコジル酸緩衝液(pH 7.4)で洗浄後、1% OsO4を同緩衝液中4℃で2時間後固定し、蒸留水ですすぎ、1%酢酸ウラニル水溶液で室温で2時間または一晩染色し、エタノールとプロピレンオキシドで脱水し、エポン(エポン812樹脂、ナカライ)中に包埋した。ガラスから細胞を除去した後、超薄切片(94 nm)を切断し、酢酸ウラニルおよびReynoldsのクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡(日本、東京、JEOL、JEM-1010)で観察した。

[0137] トランスグリコシラーゼ分解産物の活性の評価。

A549肺胞上皮細胞(2×105細胞/ウエル)を12ウエルプレートでコンフルエントまで培養した。一晩の血清飢餓の後、5μM組換えトランスグリコシラーゼ351、1/10容量のスタフィロコッカス ネパレンシス上清、および5μM抗コリシンモノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体を含む反応混合物を、細胞培養物に添加し、48時間インキュベートした。上述のようにして、アポトーシスを評価した。

[0138] ゲノムDNA配列決定とゲノムアノテーション。

ゲノム配列決定は、以前の報告（非特許文献19）と同様に、Oxford Nanopore配列決定とIllumina Miseqナノ配列決定の組み合わせで行った。簡単に述べれば、各細菌株(400 ng)由来のゲノムDNAを、Rapid Barcoding library kit SQK-RAD 004を用いてナノポアライブラリーに変換し、得られたライブラリーについて、GridIONシークエンサーを用い、SpotON R 9.4.1 FLOMIN-MIN 106フローセル上で48時間配列決定した。読み取りの大部分は6 kbから30 kbの

長さであったが、94 kbの長さの読み取りも得られた。Illumina Miseq配列決定は、Kapa Biosystems（Roche）からのHyper Library構築キットを用いてショットガンゲノムライブラリーを調製することによって行った。ライブラリーをqPCRによって定量し、一つのMiSeq Nanoフローセル上で251サイクルにわたって配列決定した。Fastqファイルは、bcl 2 fastq v 2.20変換ソフトウェア（Illumina）で生成および分離した。

[0139] Canu（参考文献62）を用いて、Oxfordナノポアデータの最初のアッセンブリーを行い、続いてNanopolish（参考文献63）とPilon（Illumina MiSeq読み込みの利用）（参考文献64）を用いて精緻化を行い、最後にCirclator（参考文献65）を用いてゲノムを再配向した。SPAdes（参考文献66）を用いて別のハイブリッドゲノムアッセンブリーを行い、次いでCirclatorを用いてゲノムを再配向した。また、Unicycler（参考文献67）を用いてハイブリッドゲノムアセンブリーを行った。Canuアッセンブリーをアッセンブリー骨格とするUnicyclerを用い、最終的なハイブリッドゲノムアッセンブリーを作製した。

[0140] 全てのアッセンブリーをBUSCO（参考文献68）とQUAST（参考文献69）で品質評価し、MUMmer（参考文献70）を用いて関連する参照ゲノムと比較した。ゲノムアッセンブリーは、ツールProkka（参考文献71）を用いてアノテート（注釈を付け）し、評価後、最良の全体的BUSCOスコアを全体的アセンブリ測定基準と組み合わせることにより、最良の全体的アッセンブリーを決定した。

[0141] 実施例１

抗コリシン中和モノクローナル抗体におけるトランスグリコシラーゼ分解産物により誘導される肺細胞アポトーシスの阻害

１－１：アポトーシス促進ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）に対するモノクローナル抗体の調製

上記参考結果の所見に基づき、抗コリシン中和抗体が、推定細菌セリンプロテアーゼのタンパク質分解活性に由来するトランスグリコシラーゼ分解産物のアポトーシス促進活性を阻害すると予想した。この予想を検証するため

、まず、抗コリシン中和モノクローナル抗体として、アポトーシス促進ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYRに対するモノクローナル抗体を調製し、特徴づけた。なお、アポトーシス促進ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYRは、図3および図4に示すスタフィロコッカス ネパレンシスのコリシン様配列であり、これは、製造業者(ThermoFisher Scientific)により調製した。

[0142] Eurofins Genomics Inc.(日本、東京)にて、モノクローナル抗体を調製した。簡単に述べれば、免疫に使用するペプチド（NH2-C+IVMPESSGNPNAVNPAGYR-COOH）を合成し、高速液体クロマトグラフィーによって精製し、次いでマレイミド法によって、一般的に使用される担体タンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニンに結合させた（参考文献72、73）。実験動物免疫のため、2匹のWistarラットに0、2、4、6週目に免疫原を皮下注射1回行い、次に最初の免疫後8週目に同じペプチドを静脈内注射1回行った。初回免疫後5週目に採血し、免疫測定法により抗体価を測定した。一方のラットの脾細胞を骨髄腫細胞(P 3 U 1とSp 2)との細胞融合に用いた。細胞融合は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地を用いてポリエチレングリコール法により行った（参考文献74）。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのクローニングを限界希釈法により行った（参考文献74）。得られたハイブリドーマは、以降の使用のために液体窒素中に貯蔵した。アイソタイピングは、Antagen Pharmaceuticals、Inc.(ボストン、マサチューセッツ州（アメリカ合衆国))から購入したRapid RAT Monoclonal Antibody Isotyping XpressCardを用いて実施した。

[0143] 種々の量の組換えトランスグリコシラーゼ351をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、抗コリシンモノクローナル抗体の各クローンを産生するハイブリドーマの上清の1:1000希釈を使用してウエスタンブロッティングを行った。詳細には、組織または試料を氷冷リン酸緩衝食塩水で2回洗浄し、次いでプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤（1 mMオルトバナジン酸、50 mMβ-グリセロリン酸、10 mMピロリン酸ナトリウム、5μg/mLロイペプチン、2μg/mLアプロチニン、5 mMフッ化ナトリウム）を補充したラジオイムノ沈降アッセイ（R

IPA) 緩衝液(10 mM Tris-Cl (pH 8.0)、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、140 mM NaCl、1 mMフッ化フェニルメチルスルホニル)中にて細胞溶解した。17,000×gで10分間、4℃で遠心分離した後、Pierce BCAプロテインアッセイキット(Thermo Fisher Scientific社、マサチューセッツ州ウォルサム)を用いてタンパク質濃度を測定した。等量のタンパク質を含む試料をLaemmli試料緩衝液と混合し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分離した。次に、ニトロセルロース膜と抗開裂カスパーゼ-3または抗β-アクチン抗体（セルシグナリング、ダンバース、マサチューセッツ州（アメリカ合衆国））（参考文献61）を用いてウエスタンブロット法を実施し、パブリックドメインNIH ImageJプログラム(wayne@codon.nih.gov;Wayne Rasband、NIH、研究サービス部門)を用いてブロット上のバンド強度を定量した。

[0144] また、ここに使用する組換えトランスグリコシラーゼ351は、次のようにして、発現させた。組換えトランスグリコシラーゼ351を調製するため、そのタンパク質をコードする遺伝子を大腸菌（Escherichia coli）最適化コドンを用いて合成し、末端Aを付加して増幅し、TAクローニングベクターpGEM-T Easy (Promega、Madison、ウィスコンシン州（アメリカ合衆国))にクローンニングした。次いで、遺伝子を切除して改変pET 28 aベクターにクローニングし、大腸菌BL 21 DE 3細胞に形質転換し、6-ヒスチジンタグ（His-tag）化タンパク質として発現し精製した（非特許文献19）。

[0145] 上記のようにして、免疫グロブリン（Ig）IgG2bκ、IgMκ、IgG2aκ、IgG2aκ、IgG2aκおよびIgG2bκをそれぞれ産生するハイブリドーマクローン2A、3Aa、4A、9Aおよび21Aを樹立した(図11a)。各モノクローナル抗体のアイソタイプの決定は、Rapid Monoclonal Antibody IsotypingKitを使用して実行した。

[0146] 組換えトランスグリコシラーゼの増加量を用いて実施したウエスタンブロット法は、全てのモノクローナル抗体クローンがS.ネパレンシス由来のコリシン含有トランスグリコシラーゼを認識し、結合することが明らかになった

（図11b)。次に、コリシンペプチドをマイクロプレートにコーティングし、ハイブリドーマの上清のさまざまな希釈液を使用して、抗コリシンモノクローナル抗体の各クローンの結合を評価した。各ハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体は、種々の希釈レベルで表面被覆コリシンに差異的に結合した。特に、クローン9Aと21Aは、強い結合活性を示した(図11c)。

[0147] １－２：アポトーシス促進ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）に対するモノクローナル抗体のエピトープマッピング

コリシン分子における抗コリシンモノクローナル抗体の結合部位を同定するため、エピトープマッピングを行った。この目的のために、コリシン配列の長さが異なる小ペプチドのマイクロアレイに対する各モノクローナル抗体の結合を評価した。対照としてヘマグルチニンペプチドと抗ヘマグルチニン抗体を用い、ペプチドマイクロアレイにおける完全性とアッセイの質を検証した。PEPPerPRINT Incorporation（ハイデルベルク)にてマッピングを行った。

[0148] 詳細には、ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYRは最初に、C末端およびN末端に中性GSGSGリンカーを用いて伸長し、断頭ペプチドになることを避けた。伸長したペプチド配列は、4、9および14アミノ酸のペプチド-ペプチド重複を伴った5、10および15アミノ酸ペプチドに翻訳された。得られたペプチドマイクロアレイは、72の異なる直鎖状ペプチドを二重に（144スポット)、および付加的なヘマグルチニン(YPYDVPDYAG、17スポット)対照ペプチドを含有していた。インキュベーション緩衝液（洗浄緩衝液［リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4、0.05% Tween 20、10% Rocklandブロッキング緩衝液MB-070）中、ペプチドマイクロアレイコピーの前染色を、二次(ヤギ抗ラットIgG［H+L］DyLight 680)抗体および対照(マウスモノクローナル抗HA［12 CA 5］DyLight 800)抗体を用いて行い、マイクロアレイの72の異なるペプチドとのバックグラウンド相互作用を決定した。その後、インキュベーション緩衝液中1μg/mlの濃度にて、他のペプチドマイクロアレイコピーをラットモノクローナル抗体9A、21A、2Aおよび4Aとインキュベートし、次いで、二次抗体および対照抗体で染色し、L

I-CORオデッセイイメージングシステムを用いて7/7（中スポット/周縁スポット（上および左の縁スポット））の走査強度で読み取った。ペプチドマイクロアレイを構成する付加的なヘマグルチニンペプチドを内部品質対照として同時に染色し、アッセイの質とペプチドマイクロアレイの完全性を確認した(図12a、b)。

[0149] スポット強度とペプチドアノテーションの定量化は、16ビットカラー化tiffファイルより高いダイナミックレンジを示す7/7の走査強度での24ビットグレースケールtiffファイルに基づいた。マイクロアレイ画像分析は、PepSlide（登録商標）アナライザーを用いて実施し、その結果は、補足マイクロアレイデータに記載されている。ソフトウエアアルゴリズムは、各スポットの蛍光強度を生、前景および背景信号に分解し、平均前景強度中央値およびスポット重複のスポット間偏差を計算する。平均前景強度の中央値に基づいて強度マップを生成し、強度カラーコードは高スポット強度に対して中スポット、低スポット強度に対して白のペプチドマップにおける相互作用を強調した。スポットからスポットへの最大偏差は40%であった。そうでなければ、対応する強度値はゼロにされた。さらに、ペプチドIVMPESSGNPNAVNPAGYRのN末端からC末端までの抗原配列に対するラット抗体を用いたアッセイの平均スポット強度をプロットし、総スポット強度およびシグナル対ノイズ比を可視化した。ラット抗体9A、21A、2Aおよび4Aのエピトープを同定するために、強度プロットをペプチドおよび強度マップならびにマイクロアレイの目視検査と相関させた。本件の場合、特定のアミノ酸が抗体結合性に寄与しているか否か不明であるが、対応するアミノ酸文字を灰色で描いている。

[0150] 上記エピトープマッピングの結果、対照抗体によるヘマグルチニンペプチドの染色のみが、どの走査強度レベルでもバックグラウンド相互作用のないように確立されたスポットパターンを示した(図12a、b)。インキュベーション中の1μg/ mlの濃度でのラットモノクローナル抗体9A(c、d)、21A(e、f)、2A(g、h)、および4A(i、j)との他のペプチドマイクロアレイコピーのその後のインキュベーション緩衝液に続いて、二次抗体と対照抗体で染色し、LI-CO

R Odyssey Imaging Systemを使用して7/7(中スポット/周縁スポット)のスキャン強度で読み取った。すると、9A、21Aおよび2Aモノクローナル抗体クローンに対するコンセンサスモチーフPESSGNP（配列番号６８）を含む中スポットのエピトープ様スポットパターンに対して中等度で明白な抗体応答を示し（図12c、d、e、f、g、h)、および4Aモノクローナル抗体クローンに対するコンセンサスモチーフNPAGY（配列番号６９）を含み（図12i、j)、高いシグナル対ノイズ比(補足マイクロアレイデータ)を有していた。

[0151] １－３：抗コリシンモノクローナル抗体クローンの可変フレームワークおよび相補性決定領域の配列決定

抗コリシンモノクローナル抗体クローン4A、9Aおよび2Aの可変領域の配列を、syb labs Incorporation（ホプキントン、マサチューセッツ州（アメリカ合衆国))にて決定した。各ハイブリドーマ由来の全RNAを用いて合成したcDNAを用い、cDNA末端の5'迅速増幅反応を行った。PCR分析で得られた陽性バンドをクローニングし、配列決定した。各クローンの相補性決定領域（CDR）の配列を決定した。CDR領域は、IMGT/V-QUEST（http://www.imgt.org）を用いて定義した。また、抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aの可変領域の配列を、同様にして決定した。CDRの同定は、Kabatのシステムに基づいて行った。

図13は、モノクローナル抗体の可変フレームワークおよび相補性決定領域を示す。

[0152] 詳細には、次の通りである：

抗コリシンモノクローナル抗体クローン4A

H鎖（4A-HC.7331)：可変領域

evqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvss（配列番号３６）

H鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：GFTFSTAW（配列番号３７）

H鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：IKAKSNSYAT（配列番号３８）

H鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：ASTDAFYFSHSY（配列番号３９）

H鎖（4A-HC.7331）：全長

MELCMMWIFLVAFLKGVQCevqvlesgggLvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyrqfpekrlewvar
IKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedtaiyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtv
ssAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSS
VTVPSSTWSSQAVTCNVAH（配列番号７９）

（ただし、配列：MELCMMWIFLVAFLKGVQC（配列番号８０）は、シグナルペプチドであり、

配列：AETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGL
YTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAH（配列番号８１）は、定常領域である）

L鎖（4A-LC.7395）：可変領域

divmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrspkLliyWASTgesgvpdrfi
gsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleik（配列番号４０）

L鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：QSLLYSENKKNY（配列番号４１）

L鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：WAST（配列番号４２）

L鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：QQYYNFPLT（配列番号４３）

L鎖（4A-LC.7395）：全長

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKKNYlawyqqkpgrs
pkLliyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYNFPLTfgsgtkleikRADAA
PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSL
TKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号８２）

（ただし、配列：MESQTQVLMSLLLWVSGTCG（配列番号８３）は、シグナルペプチドであり、

配列：RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDS
KDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号８４）は、定常領域である）

[0153] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン9A

L鎖（9A-LC.7402）：可変領域

divmtqspssqavsagekvtmsckssQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspkLliyWAStresgvpdrfi
gsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPRTfgggtklelk（配列番号４４）

L鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：QNLLYSEDKKNY（配列番号４５）

L鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：WAS（配列番号４６）

L鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：QQYYNFPRT（配列番号４７）

L鎖（9A-LC.7402）：全長

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqspssqavsagekvtmscksSQNLLYSEDKKNYlawyqqkpgqspklliyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyycQQYYNFPRTfgggtklelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号８５）

（ただし、配列：MESQTQVLMSLLLWVSGTCG（配列番号８６）は、シグナルペプチドであり、

配列：RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号８７）は、定常領域である）

[0154] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン2A

H鎖（2A-HC.7352）：可変領域

evklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvss（配列番号４８）

H鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：GFTFTNYG（配列番号７０）

H鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：IYYDSSKM（配列番号４９）

H鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：AAEGFGTPFPY（配列番号５０）

H鎖（2A-HC.7352）：全長

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwirqapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamyycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH（配列番号８８）

（ただし、配列：MDFRLNLVFLVFILKGVWC（配列番号８９）は、シグナルペプチドであり、

配列：AQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH（配列番号９０）は、定常領域である）

L鎖（2A-LC.7413）：可変領域

divmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqspkl liyWAStresgvpdrfi gtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk（配列番号５１）

L鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：QSLLYSENEKNY（配列番号５２）

L鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：WAS（配列番号５３）

L鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：QQYYHFPRT（配列番号５４）

L鎖（2A-LC.7413）：全長

MESQTQVLMSLLLWVSGSCGdivmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEKNYlawyqqrpgqs pkl liyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelkRADAA PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSL TKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号９１）

（ただし、配列：MESQTQVLMSLLLWVSGSCG（配列番号９２）は、シグナルペプチドであり、

配列：RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDS KDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS（配列番号９３）は、定常領域である）

[0155] 抗コリシンモノクローナル抗体クローン21A：

H鎖（KK1410-2_VH_pep）：可変領域

evklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIYYDSSKMSYADTVKGrft isrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss（配列番号７１）

H鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：NYGMH（配列番号７２）

H鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：MIYYDSSKMSYADTVKG（配列番号７３）

H鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：EGFGTPFPY（配列番号７４）

H鎖（KK1410-2_VH_pep）：全長

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigM IYYDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss（配列番号９４）

（ただし、配列：MDFRLNLVFLVFILKGVW（配列番号９５）は、シグナルペプチドである）

L鎖（KK1410-2_VL_pep）：可変領域
divmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllіyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk（配列番号７５）
L鎖可変領域CDR1アミノ酸配列：KSSQSLLYREDTKNYLA（配列番号７６）
L鎖可変領域CDR2アミノ酸配列：WASTRES（配列番号７７）
L鎖可変領域CDR3アミノ酸配列：QQYYHFPRT（配列番号７８）
L鎖（KK1410-2_VL_pep）：全長
MESQTQVLMSLLLWVSGTYGdivmtqtpssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyqqrpgqspkllіyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk（配列番号９６）
（ただし、配列：MESQTQVLMSLLLWVSGTYG（配列番号９７）は、シグナルペプチドである）

[0156] １－４：抗コリシンモノクローナル抗体クローンにおけるコリシンアポトーシス促進活性の阻害

コリシンに対する高い結合能を有するモノクローナル抗体(2A、9Aおよび21A)が、培養肺胞上皮細胞上のコリシンのアポトーシス促進活性を阻害できるかどうかを評価した。

アポトーシス阻害アッセイは、A549肺胞上皮細胞をサブコンフルエントにまで培養し、一晩、血清飢餓させ、次いで抗コリシンモノクローナル抗体クローン2A、9Aまたは21Aで前処置し、さらに48時間培養を継続して行った。アポトーシス細胞の数は、上記のようにしてフローサイトメトリーによって評価した。

A549肺胞上皮細胞は、抗コリシンモノクローナル抗体の各クローン(1:100希釈のハイブリドーマ上清)で前処理した後、コリシンまたはスクランブルペプチドの存在下で培養した。ラット抗コリシン血清で前処理したA549細胞を陽性対照として使用し、前処理なしの細胞を陰性対照として使用した。フローサイトメトリー分析は、クローン21Aモノクローナル抗体のみがインビトロで肺胞上皮細胞のコリシン誘導アポトーシスを有意に中和することを明らか

にした(図14a、b)。

[0157] さらに、クローン21A中和モノクローナル抗体が、スタフィロコッカス ネパレンシスおよびスタフィロコッカス ヘモリチィカスの両方のアポトーシス活性を阻害するか否か調べた。A549肺胞上皮細胞を、抗コリシンモノクローナル抗体クローンA21のハイブリドーマ上清（1:100希釈）で前処理した後、スタフィロコッカス ヘモリティカス菌株12の培養上清の存在下で培養した。モノクローナル抗体A21またはアイソタイプIgGのみで前処置したA549細胞は陰性対照として、スタフィロコッカス ネパレンシシの上清で前処理した細胞は陽性対照として使用した。結果、クローン21A中和モノクローナル抗体は、A549肺胞上皮細胞上のスタフィロコッカス ネパレンシスおよびスタフィロコッカス ヘモリチィカスの両方の細菌上清のアポトーシス活性も有意に阻害した(図15a、b)。

[0158] 従って、以降の実験では、クローン21Aモノクローナル抗体を用い、抗コリシンモノクローナル抗体が、スタフィロコッカス ネパレンシスコリシン含有トランスグリコシラーゼの分解産物のアポトーシス促進活性を阻害できるかどうかを評価した。組換えトランスグリコシラーゼ(2mg/ml)、スタフィロコッカス ネパレンシス培養上清由来のペプチダーゼ画分(>10kDa)、および20μg/ mlの抗コリシンモノクローナル抗体クローンA21またはアイソタイプ抗体を含む反応混合物を2時間インキュベートし、それをA549細胞培養物に加えた。培養の48時間後、フローサイトメトリー分析によってアポトーシスを評価した。コリシンおよび抗コリシン抗体、またはアイソタイプ抗体で処置した細胞を陽性対照として、抗コリシン抗体またはアイソタイプ抗体のみで処理した細胞を陰性対照として使用した。結果、フローサイトメトリー分析は、抗コリシンモノクローナル抗体クローンA21が、アイソタイプ抗体対照と比較して、肺胞上皮細胞上のトランスグリコシラーゼ分解産物のアポトーシス活性を有意に阻害することを示した(図16a、b)。しかし、注目すべきは、ゲル電気泳動と銀染色により、抗コリシン中和モノクローナル抗体クローン21Aが組換えトランスグリコシラーゼのタンパク質分解を阻害できないことが判明

した点である(図16c)。全体として、これらの観察は、推定セリンプロテアーゼの細菌分泌がトランスグリコシラーゼタンパク質分解を引き起こし、トランスグリコシラーゼタンパク質分解がコリシンを放出して肺上皮細胞のアポトーシスを誘発し、そしてトランスグリコシラーゼへの抗コリシン中和モノクローナル抗体の結合がトランスグリコシラーゼ分解を妨害しないことを示している。

[0159] 実施例２

抗コリシン中和抗体における肺線維症のコリシン誘発AEの阻害作用

コリシンがTGFβ1 TGマウスにおいて肺線維症のAEを誘導することを以前に示した。この所見に基づき、抗コリシン中和抗体が線維症疾患のAEを抑制するかを検討した。最初に、腹腔内投与後の抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aの循環レベルの変化を評価し、その半減期を計算した。5匹の完全長ヒトTGFβ1をコードする遺伝子を肺特異的に過剰発現させて引き起こした肺線維症を有するTGFβ1トランスジェニックマウス（TGFβ1 TGマウス）に20 mg/kg抗コリシン抗体クローンA21の腹腔内注射を行い、3、6、24、48 168、336、および504時間後に血液を採取した。遠心分離後に血漿を分離し、材料および方法に記載されているように酵素免疫アッセイを使用して抗コリシン抗体のレベルを測定した。結果、抗コリシン中和モノクローナル抗体の血漿中の平均半減期は3.8±2.5日であった(図17)。

[0160] 次いで、肺線維症を有するTGFβ1 TGマウスを、対応するコンピューター断層撮影(CT)スコアを有する二つの群に割り当てた(図18a、b)。CT検査は次のようにして行った。

肺のCTは、Hitachi Aloka Medical (日本、東京)から購入したマイクロCT Latheta LCT-200で実施した。マウスにイソフルランを吸入させて麻酔した後、腹臥位にしてデータを収集した（非特許文献19、参考文献61）。処置群に盲検化した肺放射線学の専門家7-9名が、肺線維症を有するTGFβ1 TGマウスにおけるCT所見を、以前に報告され検証された基準に基づいてスコア化した:

スコア1、正常な肺所見; スコア2、中間所見; スコア3、軽度の肺線維症;

スコア4、中間所見；スコア5、中等度の肺線維症；スコア6、中間所見；およびスコア7、進行性肺線維症（非特許文献19）。BLM誘発性肺線維症マウスモデルにおいて、同じ基準を用いて肺の炎症と線維症をスコア化している(図21b)。

[0161] 気管内コリシンを投与した線維症の無いTGFβ1 TGマウス群を、対照として用いた(図18a、b)。肺線維症の1群には、抗コリシンモノクローナル抗体クローン21Aを投与し、肺線維症の他の群には、AEを誘発するためにコリシンを気管内注入する前の2週間の間に、3日ごとに1回、無関係なアイソタイプ抗体を腹腔内注射した(図19a)。すなわち、肺線維症のTGFβ1-TGマウス(n = 6)群には、抗コリシンモノクローナル抗体（mAtb）を腹腔内注射し、肺線維症の別の群(n = 6)には、アイソタイプ抗体（Atb）を2日前に5回投与した。コリシンの気管内注入。線維症のないTGFβ1-TGマウス群（n = 5）には気管内コリシンのみを投与した。比較のため、コリシンまたは生理食塩水を気管内注入する前後にCTを実施した。

[0162] 結果、生理食塩水、アイソタイプ抗体または抗コリシン抗体で処置した線維症の無い対照TGFβ1 TGマウスは、変化を示さなかった(図18b)。コリシンを投与し、アイソタイプ抗体で処置したTGFβ1 TGマウスは、CT所見の有意な悪化を示し(図19c)、他方、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスは、肺線維症のCTスコアの有意な改善を示した(図19d)。

[0163] 次に、モノクローナル抗コリシン抗体が、TGFβ1 TGマウスの肺線維症の急性増悪（AE）を抑制するか否かを評価した。

TGFβ1TGマウスを、肺線維症のグレードが一致する2つの群と、肺線維症のない1つの群に無作為に割り当てた。肺線維症のTGFβ1-TGマウス(n = 6)群には、抗コリシンモノクローナル抗体を腹腔内注射し、肺線維症の別の群(n = 6)には、アイソタイプ抗体を2日前に5回投与した。コリシンは気管内注入した。線維症のないTGFβ1-TGマウス群(n = 5)には、気管内コリシンのみを投与した。麻酔の過剰摂取による安楽死後、各群のマウスから気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、BALF液を遠心分離し、ペレットを使用して総細胞数と細

胞分画を処置群間で評価した。

[0164] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したTGFβ1 TGマウスでは、対照およびアイソタイプ抗体で処置したマウスと比較して、BALF中の全細胞数およびリンパ球数は有意に減少していた(図20a、b)。界面活性タンパク質-D（SP-D）、MUC5B、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1（MMP-1）、デコリンなどの肺損傷のマーカー、およびSP-D、MUC5B、MUC-1の気管支肺胞洗浄液（BALF）レベルは、対照およびアイソタイプ抗体で処置したマウスと比較して、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスで有意に低下した（図20c)。肺におけるヒドロキシプロリン含量およびコラーゲン沈着は、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスにおいて、アイソタイプ抗体で処置したマウスよりも有意に低かった(図20c、d、e)。肺線維症のグレードは、肺炎症細胞数と有意に相関した(図20f)。これらの観察は、コリシンが肺線維症におけるAEの潜在的治療標的であることを示す。

[0165] 実施例３

コリシンにおけるブレオマイシン誘発肺線維症のAE誘発作用

マウスまたはラットにおけるブレオマイシン（BLM）誘発肺線維症は、IPF研究のための最も特徴付けられ、一般的に使用される前臨床モデルである（参考文献28）。コリシンがBLM誘発肺線維症の疾患を悪化させるかどうかは不明である。この問題に取り組むため、浸透圧ミニポンプを介してBLMを注入し、気管内注入によりコリシンを投与することにより、野生型（WT）マウスにおいて実験モデルを開発した(図21a)。図21aに示すブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける急性増悪の誘発の実験スケジュールによれば、ブレオマイシン(BLM)または生理食塩水(SAL)を、マウスの背中の皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプから注入した。コンピューター断層撮影(CT)は、マウス安楽死の前にコリシンまたはスクランブルペプチドの気管内投与の前後に実行した。浸透圧ミニポンプおよび気管内コリシンまたはスクランブルペプチドを介してSALを投与したマウスを対照として使用した。BLMまたはSALポンプ移植後22日目にマウスを安楽死させた。

[0166] このように胸部CTによる肺線維症発症を確認した後、自家CTスコア基準(図21b)を用いて、一致したCTスコアを有する二つの群にマウスを割り付けた。

[0167] 野生型(WT)マウスに対し、0日目に浸透圧ミニポンプによってブレオマイシン(BLM)を投与し、ポンプ移植後20日目にコリシンまたはスクランブルペプチド(300μg/マウス)を気管内注入(75μl)した。CTは、実施例２に記載しているように実行した。結果、肺線維症マウスのCTスコアは、気管内コリシン投与後に有意に悪化した(図22a、b、c)。次いで、野生型(WT)マウスに対し、0日目に浸透圧ミニポンプによって生理食塩水(SAL)を投与し、ポンプ移植後20日目にコリシンまたはスクランブルペプチド(300μg/マウス)を気管内注入(75μl)した。結果、CTスコアは、スクランブルペプチドを気管内注入した肺線維症マウス、または気管内コリシンもしくはスクランブルペプチドのいずれかを受けた肺線維症の無いマウスでは、変化しなかった(図22d、e、f)。

[0168] 次に、気管内コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスにおける炎症細胞等を検査した。野生型(WT)マウスに対し、0日目に浸透圧ミニポンプによってブレオマイシン(BLM)または生理食塩水(SAL)を投与し、ポンプ移植後20日目にコリシンまたはスクランブルペプチド(300μg/マウス)を気管内注入(75μl)した。BALFの総細胞数はヌクレオカウンターを使用して決定し、細胞分画数は、WindRoof画像ソフトウェアを使用したギムザ染色後に実行した。血清アミロイドP成分(SAP)、MUC-1、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、ペリオスチン、コラーゲンIおよびオステオポンチンのレベルは、製造元の指示に従って酵素免疫アッセイによって測定した。結果、気管内コリシンを投与したBLM誘発肺線維症マウスは、気管内スクランブルペプチドを投与した対照マウスと比較して、BALF中のリンパ球総数が有意に増加し、血清アミロイドP成分の循環レベルが増加し、またMUC-1、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) 、ペリオスチン、コラーゲンIおよびオステオポンチンのレベルが増加した(図23a、b、c)。

[0169] 次に、カスパーゼ-3の切断をウエスタンブロッティングで評価し、定量した。カスパーゼ-3の切断は、スクランブルペプチドを投与したマウスの対応

物と比較して、気管内コリシンを投与したマウスで有意に増加した(図23d、e)。コラーゲン沈着は、マッソンのトリクローム染色によって評価し、WindRoof画像化ソフトウェアを使用して定量化した。ヒドロキシプロリンの肺組織含有量は、製造元の指示に従って市販のキットを使用した比色分析によって測定した。結果、肺におけるコラーゲン沈着とヒドロキシプロリン含量も、スクランブルペプチド(図23f、g、h)で処理したマウスと比較して、コリシンを投与したマウスで増加した。浸透圧ミニポンプを介して生理食塩水を投与し、コリシンまたはスクランブル処理したマウスは有意な変化を示さなかった。これらの所見は、コリシンがBLM誘発肺線維症においても疾患を悪化させることを示した。

[0170] 実施例４

抗コリシンモノクローナル抗体におけるBLM誘発肺線維症の抑制作用。

コリシンはBLM誘発性肺線維症を悪化させることから、この致死性ペプチドはこの実験モデルにおいて役割を果たすと予想した。この予想を検証するために、浸透圧ミニポンプを介してマウスにBLMを注入し、抗コリシン中和モノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体を3週間の間、週3回腹腔内経路で処置した(図24a)。野生型(WT)マウスに浸透圧ミニポンプでブレオマイシン(BLM)を投与し、腹腔内経路で抗コリシンモノクローナル抗体（WT/BLM/抗コリシン）またはアイソタイプ抗体(WT/BLM/アイソタイプ)で週3回、3週間、処置した。浸透圧ミニポンプで生理食塩水(SAL)を投与し、腹腔内経路で抗コリシンモノクローナル抗体(WT/SAL/抗コリシン)またはアイソタイプ抗体(WT/SAL/アイソタイプ)で週3回、3週間、処置したWTマウスを対照マウスとした。コンピューター断層撮影(CT)は、マウス安楽死の1日前に実施し、治療群を知らされていない9人の専門家がCT所見を記録した。BLMまたは生理食塩水(SAL)ポンプ移植後21日目にマウスを安楽死させた。浸透圧ミニポンプを介して生理食塩水（SAL）を投与したマウスは、抗体の二次的影響を除外するために準備した対照マウスであった。

[0171] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したBLM誘発肺線維症マウスは

、アイソタイプ抗体で処置した対応マウスと比較して、CT線維症スコアが有意に減少した(図24b、c)。生理食塩水注入後に抗コリシンモノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体で処置したマウスでは、CT変化はなかった。

[0172] 次に、BALFの総細胞数を、ヌクレオカウンターを使用して決定し、細胞分画数は、WindRoof画像ソフトウェアを使用したギムザ染色後に実行した。BALF中の炎症細胞を評価すると、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したBLM誘導肺線維症マウスが、アイソタイプ抗体で処置したマウスと比較して、全てのタイプの細胞の総数、リンパ球の総数および好中球を有意に減少したことを示した(図24d、e)。

[0173] 加えて、抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症マウスの肺における急性組織損傷、実質細胞のアポトーシスおよび組織線維症を調べた。野生型(WT)マウスに対して、浸透圧ミニポンプでブレオマイシン(BLM)を投与し、腹腔内経路で抗コリシンモノクローナル抗体（WT/BLM/抗コリシン）またはアイソタイプ抗体（WT/BLM/アイソタイプ)で週3回、3週間、処置した。浸透圧ミニポンプで生理食塩水(SAL)を投与し、腹腔内経路で抗コリシンモノクローナル抗体（WT/SAL/抗コリシン）またはアイソタイプ抗体（WT/SAL/アイソタイプ）で週3回、3週間治療したWTマウスを対照マウスとした。オステオポンチン、MUC-1およびMUC5Bのレベルは、市販のキットを使用した酵素免疫アッセイによって測定した。DNA断片化は、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)による染色によって評価した。肺線維症のグレードは、7人の専門家が盲検的に、Ashcroftのスコアを使用してスコア化した。肺のコラーゲン沈着は、マッソンのトリクローム染色によって評価し、WindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化した。ヒドロキシプロリンの肺組織含有量は、製造元の指示に従って市販のキットを使用した比色分析によって測定した。

[0174] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したBLM誘導肺線維症のマウスは、アイソタイプ抗体を投与したマウスと比較し、オステオポンチン、MUC-1およびMUC5Bの低い血漿およびBALFレベル、アポトーシス肺上皮細胞数の減少

、および肺におけるAshcroftスコアおよびコラーゲン沈着とヒドロキシプロリンの減少を示した（図25a、b、c、d、e、f、g、h)。全体として、これらの知見は、コリシンがBLM誘発肺線維症の発症においても役割を果たすことを示している。

[0175] 実施例５

急性期に処置する抗コリシンモノクローナル抗体におけるBLM誘発肺損傷肺線維症の改善作用。

浸透圧ミニポンプを介して皮下投与されたBLMにより誘発された肺損傷は、11日目にピークとなる急性期の肺炎症、続いて慢性期の肺線維症によって特徴付けられる（参考文献29）。抗コリシンモノクローナル抗体が、BLMにより誘導された初期急性期の肺損傷を阻害することにより肺線維症を改善するかどうかを調べた。

[0176] ブレオマイシン(BLM)を、マウスの背中に皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプを介して注入した。注入後2、4、6、9および11日目に、マウスを、アイソタイプ抗体(WT/BLM/アイソタイプ)または抗コリシンモノクローナル抗体(WT/BLM/抗コリシン)で20mg/kgの用量で腹腔内経路により処置した。マウスは、12日目から22日目の安楽死までの慢性期には処置を行わなかった。採血は9日目に行い、コンピューター断層撮影(CT)は9日目とマウス安楽死の前に行った。BLMポンプ移植後22日目に、マウスを安楽死した。CT肺不透明度は、WindRoof画像ソフトウェアを使用して各群で測定した。BLMポンプの埋め込み後9日目に採血し、血液中の総細胞数を、ヌクレオカウンターを使用して決定し、ギムザ染色後に細胞分画数を計数した。WindRoofイメージソフトウェアを使用した。

[0177] 結果、肺損傷のCT所見および血液中の好中球数は、IgG2であるアイソタイプ抗体で処置した対照と比較して、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスで9日目に有意に改善した(図26b、c、d、e)。

[0178] 次に、野生型(WT)マウスに浸透圧ミニポンプによってブレオマイシン(BLM)を投与し、ブレオマイシンポンプ注入後2、4、6、9および11日目に腹腔内経

路によって抗コリシンモノクローナル抗体(WT/BLM/抗コリシン)またはアイソタイプ抗体(WT/BLM/アイソタイプ)で処置した。CTは、BLMポンプ移植後21日目(慢性期)に実施した。また、BLMポンプの22日後に気管支肺胞洗浄液(BALF)を収集し、BALFの総細胞数をヌクレオカウンターを使用して決定し、微分細胞数はWindRoof画像ソフトウェアを使用したギムザ染色後に実行した。

[0179] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスは、対照抗体を受けたマウスと比較して、疾患の慢性期(BLM注入開始後22日目)の間、CT線維症スコアとBALF中のリンパ球数の有意な改善を示した（図27a、b、c、d)。

[0180] さらに、疾患の急性期に抗コリシンモノクローナル抗体で治療されたブレオマイシン誘発性肺線維症のマウスにおける22日目の肺損傷、肺実質アポトーシスおよびコラーゲン沈着を調べた。野生型(WT)マウスに浸透圧ミニポンプでブレオマイシン(BLM)を投与し、BLMポンプ注入後の2、4、6、9および11日目に腹腔内経路で抗コリシンモノクローナル抗体(WT/BLM/抗コリシン)またはアイソタイプ抗体(WT/BLM/アイソタイプ)で処置した。気管支肺胞洗浄液(BALF)と血漿は、BLMポンプの22日後に採取した。MUC-1、界面タンパク質C(SP-C)、SP-D、コラーゲンI、ペリオスチン、オステオポンチンおよび総TGFβ1のレベルは、製造元の指示に従って、市販の酵素免疫アッセイキットで測定した（図28a）。また、切断されたカスパーゼ-3およびβアクチンのウエスタンブロッティングを行った（図28b、c）。肺のコラーゲン沈着についてマッソンのトリクローム染色した写真およびWindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化した（図28f、g）。肺のヒドロキシプロリン含有量は、製造元の指示に従って市販の比色分析によって測定した（図28h）。

[0181] 結果、22日目におけるMUC-1、SP-C、SP-D、コラーゲンI、ペリオスチン、オステオポンチンの血漿レベル、およびMUC-1のBALFレベルと総TGFβ1は、アイソタイプ抗体で処置したマウスより抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスで有意に低かった(図28a)。抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスは、アイソタイプ抗体で処置したマウスと比較して、Ashcroftスコア、コラーゲン沈着、ヒドロキシプロリン含量が有意に低下しており、肺

においてカスパーゼ-3切断が低下していた(図28b、c、d、e、f、g)。これらの観察は、急性期のコリシン関連急性肺損傷が疾患の慢性期における肺線維症の重要な決定因子であることを示している。

[0182] 実施例６

抗コリシンモノクローナル抗体における肺線維症AEマウスの生存率に対する延長作用

コンピューター断層撮影(CT)は、ヒトトランスフォーミング増殖因子β1(TGFβ1)トランスジェニック(TG)マウスで実施した。7人の専門家が盲検的に、肺線維症のグレードを記録し、個々のマウスにおける7人の専門家のスコアの平均値を、マウスのCTスコアと見なした。肺線維症のTGFβ1TGマウスは、CT線維症スコアが一致する2つの群に分け、浸透圧ミニポンプを介してブレオマイシン(BLM)を投与した。これら2つの群の1つには抗コリシンモノクローナル抗体（TGFβ1-TG/BLM/抗コリシン）を腹腔内注射し、もう1つの群にはアイソタイプ抗体（TGFβ1-TG/BLM/アイソタイプ）を腹腔内注射した。抗コリシンモノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体で週3回、3週間処置した。浸透圧ミニポンプを介して生理食塩水を注入し、抗コリシンモノクローナル抗体（TGFβ1-TG/SAL/抗コリシン）またはアイソタイプ抗体（TGFβ1-TG/SAL/アイソタイプ）処置した肺線維症のないTGFβ1TGマウスをマウス対照とした(図29a、b)。このようにして処置したマウスいおける生存率を図29cに示す。

[0183] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置した肺線維症とBLM誘導AEを有するTGFβ1 TGマウスは、アイソタイプ抗体で処置したマウスよりも、有意に長い生存率を示した(図29c)。予想通り、浸透圧ミニポンプを介して生理食塩水を投与した対照群では、生存率に変化はみられなかった。

[0184] 実施例７

抗コリシンモノクローナル抗体におけるリポ多糖誘発急性肺損傷を抑制する。

以上の結果を踏まえて、リポ多糖（LPS）のような他の物質に起因する急性肺損傷の発症にも、コリシンが影響を及ぼすか調べた。

野生型(WT)マウスに対し、アイソタイプ抗体または抗コリシンモノクローナル抗体を20mg/kgの用量で1日おきに1日1回、腹腔内経路で3回処置した。マウスは、抗体による最後の処置の2日後に高用量(150μg)のリポ多糖(LPS)または生理食塩水(SAL)を気管内(IT)点滴し、LPS注入の2日後に安楽死させた。気管内生理食塩水(SAL)を投与し、アイソタイプ抗体(WT/SAL/アイソタイプ)または抗コリシン抗体(WT/Sal /抗コリシン)で処置したマウスを対照マウスとした(図30a)。気管内LPS注入後2日目に安楽死させたマウスから、気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、得られたBALF細胞を、ヌクレオカウンターを使用してカウントし、細胞分画をギムザ染色し、カウントした（図30b、c）。また、乳酸デヒドロゲナーゼA(LDHA)、サーファクタントプロテインD(SP-D)、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)、MUC-1および腫瘍壊死因子α(TNFα)のレベルを、製造元の指示に従って、市販の免疫アッセイキットを使用して測定した（図30d）。

[0185] また、抗コリシンモノクローナル抗体による処置が、重度のリポ多糖誘発性急性肺損傷のあるマウスのCT所見を改善するかを調べた。野生型(WT)マウスにアイソタイプ抗体(WT/LPS /アイソタイプ)または抗コリシン抗体(WT/LPS /抗コリシン)を20mg/kgの用量で腹腔内経路により、1日おきに1日1回、1週間処置し、次いで安楽死させた。マウスには、高用量(150μg)のリポ多糖(LPS)または生理食塩水を気管内(IT)点滴した。気管内生理食塩水(SAL)を投与し、アイソタイプ抗体(WT/SAL/アイソタイプ)または抗コリシン抗体(WT/Sal /抗コリシン)で処置したマウスを対照マウスとした。コンピューター断層撮影(CT)は、リポ多糖(LPS)の気管内注入の1日後に実行した（図31a）。肺の頂点から基底領域までのCT不透明度は、材料と方法で説明されているようにしてWindRoof画像ソフトウェアを使用して定量化した（図31b）。

[0186] 結果、抗コリシンモノクローナル抗体で処置したマウスは、アイソタイプコントロールで前処置したマウスと比較して、有意に低下した肺CT不透明度が有意に減少し(図31a、b)、肺浸潤好中球数は低下し、そして乳酸デヒドロゲナーゼA（LDHA）、SP-DおよびMMP-1の血漿とBALFレベル、およびMUC-1と腫

瘍壊死因子-α（TNFα）のBALFレベルは有意に減少しており、このことは、LPSに対する急性炎症反応ではコリシンが関与していることを示している（図30c、d)。

[0187] 次に、抗コリシンモノクローナルが、中程度のリポ多糖誘発性急性肺損傷を軽減するかを調べた。WTマウスを、20mg/kgの用量のアイソタイプ抗体または抗コリシンモノクローナル抗体で、1日おきに1日1回、腹腔内経路で3回処置した。マウスは、抗体による最後の処置の2日後に、低用量(75μg)のLPSをIT注入し、LPS注入の2日後に安楽死させた。その後、BALFを採取し、BALF細胞を、ヌクレオカウンターを使用してカウントし、材料と方法で説明したように、細胞分画のカウントのためにギムザで染色した（図32b、c）。界面活性剤タンパク質D(SP-D)、単球走化性プロテイン-1(MCP-1)、TNFα、乳酸デヒドロゲナーゼA(LDHA)、MUC-5Bおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)のBALFおよび血漿中レベルを、製造元の指示に従って、市販の免疫アッセイキットを使用して測定した（図32d）。

[0188] このように、より少ない量の気管内LPSを用い、より軽度の急性肺損傷を誘導する別の実験を行ったところ、結果、抗コリシンモノクローナル抗体で前処置したマウスは、アイソタイプで前処置した対照マウスと比較して、肺浸潤好中球の数は有意に減少し、またSP-D、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）およびTNFαの血漿およびBALFレベルは有意に減少し、LDHAのBALFレベルおよびMUC5BとMMP-1の血漿レベルは有意に減少していた(図32a、b、c、d)。全体として、これらの観察でも、急性肺損傷の発症において、コリシンが関与していることをさらに支持する。

[0189] 実施例８

肺線維症の潜在的バイオマーカーとしてのコリシンの血漿レベル

IPF患者におけるAEの発生と頻度は、肺線維症の加速と好ましくない臨床的帰結を予測させる（非特許文献1）。循環コリシンは、肺線維症のバイオマーカーとなるのではないかと予想した。この予想を検証するため、抗コリシンモノクローナル抗体を用いた酵素免疫アッセイを設計した。

[0190] ８－１：コリシンの測定

抗コリシンモノクローナル抗体クローン9Aを捕捉抗体とし、ビオチン化抗コリシンモノクローナル抗体を検出抗体とする酵素免疫測定法を開発した。簡単に述べれば、捕捉抗体を、96ウエルプレート上に、最終濃度2μg/mlのリン酸緩衝生理食塩水にて4℃にて一晩コーティングした。リン酸緩衝食塩水中、1%ウシ血清アルブミンでブロッキングし、リン酸塩で適切に洗浄した後、Tween中の緩衝食塩水、標準としてのコリシンの種々の濃度および血漿試料をウエルに添加し、4℃で一晩インキュベートした。次いで、ウエルを洗浄した後、リン酸緩衝生理食塩水に西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(R&D Systems)を添加した。適切な洗浄およびインキュベーションの後、発色のために基質溶液を添加し、450 nmで吸光度を読み取った。値はコリシンのいくつかの濃度を用いて描いた標準曲線から外挿した。

[0191] ８－２：肺線維症の潜在的バイオマーカーとしてのコリシンの評価

完全長ヒトTGFβ1をコードする遺伝子を肺特異的に過剰発現させて引き起こした肺線維症を有するTGFβ1トランスジェニックマウス（TG）および野生型（WT）マウスにおけるコリシンの血漿レベルを測定し、線維症マーカーとの相関を評価した(図33a)。具体的には、トランスフォーミング増殖因子β1(TGFβ1)トランスジェニック(TG)マウスの遺伝子型を特定し、コンピューター断層撮影(CT)を実施し、肺線維症の程度について所見を記録した。血液および肺組織のサンプリングのためにマウスを安楽死させた。肺線維症のAshcroftスコア、および血漿コリシンと肺ヒドロキシプロリンの測定は、材料と方法で説明されているように実行した。

[0192] 結果、予想通り、TGFβ1 TGマウスにおける肺線維症のコンピューター断層撮影（CT）スコア、線維症のAshcroftスコアおよび肺ヒドロキシプロリン含量は、WTマウスと比較し、有意に増加した(図32b；図34a、b)。TGFβ1 TGマウスはWTマウスと比較して、コリシンの血漿濃度が有意に上昇し、コリシンの血漿濃度はCT線維症スコア、Ashcroftスコアおよび肺ヒドロキシプロリン含量と有意に相関しており、これらは、肺線維症における疾患進行のバイオ

マーカーとしての循環コリシンの潜在的応用を支持している(図31b)。

[0193] 実施例９

ワクチンの調製

スラフィロコッカス ネパレンシスのコリシン含有トランスグリコシラーゼ(すなわち、S.nepalensis株CNDGタンパク質00351)と同じファミリーのいくつかのトランスグリコシラーゼについて、図4のアラインメントで示されるように、コリシン位置のアミノ酸配列を調べた。ある種の細菌では特定の位置にアミノ酸の変化があることは非常に明らかである。Weissella confusa（コンフューザ)コリシンペプチドはAsp14Ser（またはN14S）とAla16Asp（またはA16N）の二つのアミノ酸変化を示した。突然変異/変化のすべての命名は、S.nepalensisコリシン番号に基づいている。すなわち、位置1はイソロイシン（I）であり、位置19はアルギニン（R）である。図3に示すように、(3)W.confusaペプチド(Shem_00350または1bまたは7bまたは12b)が合成され(受入番号WP_112464134.1)、そのアポトーシス活性は、Wconfペプチドに示された二つの変化を除いて同じ配列を有するスラフィロコッカス ヘモリティカス コリシンペプチドと比較した(すなわち、N14SおよびA16N-ペプチド受託番号WP_112464134.1)。図3（3）に示すように、これらの変異がW.confusaペプチド(Shem_00350または1 bまたは7 bまたは12 bの活性の25%)のアポトーシス活性を劇的に低下させたことは非常に明らかである。コリシンペプチドのアポトーシス誘導能を低下させる変異の別の例は、Mycobacterium abscessusコリシンペプチド1（Myco アラインメント中のAbsc-1またはGenbankアクセッション番号SKT99287.1)である。Myco abc-1ペプチドは、S.haemolyticus corisinペプチドと比較して、図4のアラインメント（4）に示されるように、3つのアミノ酸変化と1つのアミノ酸欠失を有する。図3（3）に示したアポトーシス誘導能に関するデータは、アミノ酸の変化および欠失がMyabs-1ペプチドのはるかに低い誘導能(溶血性連鎖球菌ペプチド-Shem 00350または1 bまたは7 bまたは12 bの活性の約30%)をもたらしたことを示している。元のコリシン、すなわちスラフィロコッカス ネパレンシス菌株のCNDGペプチド(またはアラインメント

中のCNDG-00351)とスラフィロコッカス ヘモリティカス ペプチド(Shem_00350または1 bまたは7 bまたは12 b)では、逆の効果が見られた。ここでは、スラフィロコッカス ヘモリティカス ペプチド(すなわち、S.nepalensisペプチド中のGly 7 SerまたはG 7 S)と比較して、スラフィロコッカス ネパレンシス ペプチドに単一アミノ酸変化があった。以前の例とは異なり、スラフィロコッカス ヘモリティカス ペプチドと比較して、常にわずかに高いアポトーシス誘導活性を示した。

[0194] 上記の分析に基づいて、コリシンにおいてアミノ酸変異を行い、以下の3つのペプチドを合成した。

コリシンN14S: IVMPESSGNPNAVSPAGYR（配列番号５５）

コリシンP15A: IVMPESSGNPNAVNAAGYR（配列番号５６）

コリシンA16N: IVMPESSGNPNAVNPNGYR（配列番号５７）

[0195] 合成後、それらの親（ペプチド）配列（IVMPESSGNPNAVNPAGYR）と比較し、それらの活性が低下しているかどうかを決定した。1つのアミノ酸が変化するとコリシンペプチドは不活性になると予想した。得られた結果を、図35に示す。予想通り、コリシンN14SおよびP15Aが、機能を有さないスクランブルペプチドと同等、アポトーシス活性が無いことが判明した。

[0196] 引き続きアミノ酸の変更（抗体結合はN末端側の半分にあると思われるので、C末端側の半分に焦点を当てる）を行う。現在、1個のアミノ酸の変化を調べているが、この結果をもとに、2～3個のアミノ酸を組み合わせることで、コリシンペプチドのアポトーシス誘導性を完全になくせるはずである。この死んだ（または減衰）ペプチドは、コリシン放出細菌またはコリシンペプチド投与からマウス患者を保護する能力を決定するために、筋肉内注射または鼻腔内（吸入）投与のいずれかを介してマウスモデルにおいて試験することができる。

[0197] 実施例１０

コリシンの追加的活性

近位尿細管上皮由来のCaki-2細胞株、成人皮膚由来のケラチノサイトHaCaT

の細胞株、網膜色素上皮のARPE-19の細胞株、結腸癌由来Caco-2の細胞株、および正常なヒト小腸上皮細胞由来HIEC-6の細胞株は、アメリカン タイプ カルチャー コレクション（American Type Culture Collection；Manassas、VA）から入手した。RPMI 1640培地はシグマ-アルドリッチ（セントルイス、ミズーリ州）から購入し、ウシ胎児血清（FBS）はバイオ ウォーカー（Bio Whittaker；ウォーカーズビル、メリーランド州）から購入した。L-グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシンは、インビトロジェン（Carlsbad、CA）から入手した。Caki-2細胞、Caco-2細胞、およびihPOD細胞はRPMI 1640培地、HaCaT細胞はDMEM培地、ARPE-19細胞はDMEM / F12培地、HIEC-6細胞はDMEM培地で培養した。

[0198] ウエスタンブロッティングによるカスパーゼ-3の切断を検討するため、各細胞株をサブコンフルエントになるまで培養した。次に、細胞を洗浄し、FCSを含まない培地で一晩培養した。細胞を10 μg/ml のスクランブルペプチド、コリシン、またはコリシン様ペプチドで刺激し、２４時間培養してからウエスタンブロッティングを行った。

[0199] 得られた結果を図39に示す。カスパーゼ-3活性の検討は、スクランブルペプチドで処理された細胞と比較して、コリシンおよびコリシン様ペプチドで処理されたすべての細胞でカスパーゼ-3の切断が有意に増加したことを示し、アポトーシス経路の活性化を示している。即ち、図39は、コリシンが大腸粘膜上皮細胞、小腸粘膜上皮細胞、皮膚のケラチノサイト、網膜上皮細胞、腎臓のポドサイト、および尿管上皮細胞においてアポトーシスを有することを示している。これらの結果から、本発明の抗コリシンモノクローナル抗体は、肺線維症以外、これらの細胞に起因する疾患、例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、網膜症、腎炎・腎線維症、慢性皮膚炎、強皮症、肝硬変などに対する治療効果を期待することができる。

[0200] 実施例１１

血清中コリシン濃度の比較

兎ポリクローナル抗トランスグリコシラーゼポリクローナル抗体とビオチ

ン化された抗コリシン9Aモノクローナル抗体を用いて酵素免疫測定法を開発した。健常者、病態が安定している特発性肺線維症（IPF）患者、および急性増悪のあるIPF患者の間で血清中のコリシンレベルを比較した。

得られた結果を図40に示す。図40は、血清中のコリシン濃度は、健常者と比較して安定したIPF患者では有意に高く、さらに安定したIPF患者と比較して急性増悪のIPF患者では有意に増加していることを示す。以上の結果よりコリシンの測定はIPF患者のバイオマーカーとしての有用性が明らかになった。

[0201] 実施例１２

合成コリシンよりも天然コリシンが強烈なアポトーシス活性を示す

これまでの実験において、合成コリシンは10 μg/mlの濃度でアポトーシス活性を有することが示された。合成コリシンに比較して細菌が分泌している天然コリシンはどのくらいの活性を持つかを検討した。まず、細菌培養上清のアポトーシス活性を調べた。10倍（1/10）希釈したスタフィロコッカス ネパレンシスの培養上清を抗コリシンモノクローナル抗体（クローンＡ２１）（20 μg/ml）の存在下または非存在下、A59肺胞上皮細胞の培地に添加した。A549細胞を48時間培養した後、フローサイトメトリーでアポトーシスを検討した。

[0202] 得られた結果を図41a、bおよびcに示す。図41aは、10倍希釈された細菌上清によるA549細胞のアポトーシスが、抗コリシンモノクローナル抗体によって有意かつほぼ完全に抑制されることを示している。

[0203] 次に、希釈されてない細菌上清中の天然コリシンの濃度を酵素免疫測定法で測定した。

得られた結果を図41bおよびcに示す。図41bおよびcは、スタフィロコッカス ネパレンシスの未希釈培養上清中の天然コリシンの平均濃度が1042±174.6 pg/mlであることと、スタフィロコッカス ヘモリティカス未希釈培養上清中の天然コリシンの平均濃度が802.4±57.7 pg/mlであることを示している。

[0204] 以上の結果より、A549細胞のアポトーシスの誘導実検では細菌の上清を1:10希釈で使用したため、天然コリシンは約100 pg/mlの濃度で強力な生物活性

を持つことが明らかとなった。合成コリシンは10 μg/mlの濃度でアポトーシス活性を示すが、図41a、bおよびcの通り、天然コリシンは約100 pg/mlの濃度でアポトーシス活性を示す。従って、天然コリシンは（10 μg/100 pg = 100000）合成コリシンよりも100000倍のアポトーシス活性を持つことが判る。

[0205] 実施例１３

抗コリシンモノクローナル抗体（クローンＡ２１）はヒト体液（気管支肺胞洗浄液）中の天然コリシンのアポトーシス活性も抑制する

IPF患者の気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）に存在する天然コリシンのアポトーシス促進活性を検討するために上記と同様の実験を実施した。急性増悪のあるIPF患者（n = 14）および健常者（n = 5）から収集したＢＡＬＦを、抗コリシンモノクローナル抗体（クローンA21）または対照IgG（20 μg/ml）の存在下、A59肺胞上皮細胞の培地に添加し、４８時間後、アポトーシスをフローサイトメトリーで検討した。

[0206] 図41dは、各IPF患者又は各健康者で得られた結果を示す。図41eは、すべてのIPF患者又はすべての健康者で得られた結果を示す。図41eは、本発明の抗コリシンモノクローナル抗体が、IPF患者のBALFのアポトーシス活性を有意に抑制することを示す。一方、図41fは、IPF患者（n = 14）のBALF中の天然コリシンの濃度（650.9 ± 218.3 pg/ml）および健常者（n = 5）のBALF中の天然コリシンの濃度（458.4 ± 60.7 pg/ml)を示す。A549細胞のアポトーシスの誘導実検ではBALFを1: 2希釈で使用したため、ヒト体液中の天然コリシンも強力な生物活性を持つことが判る。

[0207] また、図41gは、試験管内・細胞培養上清中のコリシンの半減期を示す。どのくらいの速さで細胞培養システムにおいてコリシンが代謝されるかを知るため、コリシンの半減期を調べた。A549肺胞上皮細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したDMEMでコンフルエントになるまで培養した。次に、コリシンを最終濃度10 microgram/mlで細胞培養培地に接種し、0、1、3、6、12、および24時間後に細胞上清を採取した。コリシンの濃度を酵素免疫測定法で測定し、コリシンの半減期を検討した。その結果、図41gに示される通り、溶液中の（

合成）コリシンの半減期は、ヒト肺胞細胞培養システムでは1時間未満であることが明らかになった。この結果から、IPF患者の急性増悪が発症する時に患者の血清中（天然）コリシンの濃度は高くなるが、半減期が短いため、その濃度が素早く低下するということが分かる。従って、急性増悪の発症の直後に血清コリシンの測定を行うべきである。

[0208] 以下、本明細書に引用している参考文献である。

参考文献

20. Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K. & Prevost, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. Int JMol Sci20, doi:10.3390/ijms20051215 (2019).

21. Czekaj, T., Ciszewski, M. & Szewczyk, E. M. Staphylococcus haemolyticus - an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. Microbiology (Reading) 161, 2061-2068, doi: 10.1099/mic.0.000178 (2015).

22. Yin, Y. et al. A hybrid sub-lineage of Listeria monocytogenes comprising hypervirulent isolates. Nat Commun 10, 4283, doi: 10.1038/s41467-019-12072-l (2019).

23. Johansen, M. D., Herrmann, J. L. & Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nat Rev Microbiol 18, 392-407, doi: 10.1038/s41579-020-0331-1 (2020).

24. Fusco, V. et al. The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front Microbiol 6, 155, doi:10.3389/fmicb.2015.00155 (2015).

25. Bedoui, S., Herold, M. J. & Strasser, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. Nat Rev Mol Cell Biol 21, 678-695, doi: 10.1038/s41580-020-0270-8 (2020).

26. Batandier, C., Leverve, X. & Fontaine, E. Opening of the mitochon

drial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. J Biol Chem 279, 17197-17204, doi: 10.1074/jbc.M310329200 (2004).

27. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 102, 33-42, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00008-8 (2000).

28. Jenkins, R. G. et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol56, 667-679, doi: 10.1165/rcmb.2017-0096ST (2017).

29. Urawa, M. et al. Protein S is protective in pulmonary fibrosis. J Thromb Haemost 14, 1588-1599, doi: 10.1111/jth.l3362 (2016).

[0209] 30. Drakopanagiotakis, F., Xifteri, A., Polychronopoulos, V. & Bouros, D. Apoptosis in lung injury and fibrosis. Eur Respir J32, 1631-1638, doi:10.1183/09031936.00176807 (2008).

31. D'Alessandro-Gabazza, C. N. et al. Development and preclinical efficacy of novel transforming growth factor-betal short interfering RNAs for pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol46, 397-406, doi: 10.1165/rcmb.2011-01580C (2012).

32. Upagupta, C., Shimbori, C., Alsilmi, R. & Kolb, M. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis. Eur Respir Rev 27, doi:10.1183/16000617.0033-2018 (2018).

33. Ryerson, C. J., Cottin, V., Brown, K. K. & Collard, H. R. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm. Eur Respir J 46, 512-520, doi: 10.1183/13993003.00419-2015 (2015).

34. Jeon, K. et al. Prognostic factors and causes of death in Korean patients with idiopathic pulmonary fibrosis. RespirMedl00, 451-457, d

oi:10.1016/j.rmed.2005.06.013 (2006).

35. Kondoh, Y. et al. Risk factors of acute exacerbation of idiopathi c pulmonary fibrosis. Sarcoidosis Vase Diffuse Lung Dis 27, 103-110 (2010).

36. Raghu, G. et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An O fficial ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Cri t Care Med 198, e44-e68, doi:10.1164/rccm.201807-1255ST (2018).

37. Kreuter, M. & Maher, T. M. Treatment of Acute Exacerbation of Idi opathic Pulmonary Fibrosis. A Call to Arms. Am J Respir Crit Care Med 201, 1030-1032, doi: 10.1164/rccm.202001 -0057ED (2020).

38. Collard, H. R. et al. Suspected acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis as an outcome measure in clinical trials. Respir R es 14, 73, doi:10.1186/1465-9921-14-73 (2013).

39. Barbas-Filho, J. V. et al. Evidence of type II pneumocyte apoptos is in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual i nterstitial pneumonia (UIP). J Clin Pathol54, 132-138, doi: 10.1136/j cp.54.2.132 (2001).

[0210] 40. Sauler, M., Bazan, I. S. & Lee, P. J. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. Annu Rev Physiol 81, 375-402, doi:10.114 6/annurev-physiol-020518-114320 (2019).

41. Uhal, B. D. etal. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. Am J Physiol 269, L819-828, doi: 10.1152/ajplung.l995.269.6.L819 (1995).

42. Bellani, G. et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Ca re Units in 50 Countries. JAMA 315, 788-800, doi: 10.1001/jama.2016.0 291 (2016).

43. Force, A. D. T. et al. Acute respiratory distress syndrome: the B

erlin Definition. JAMA 307, 2526-2533, doi:10.1001/jama.2012.5669 (2012).

44. Marchioni, A. et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons learned from acute respiratory distress syndrome? Crit Care 22, 80, doi:10.1186/s13054-018-2002-4 (2018).

45. Matthay, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. Nat Rev Dis Primers 5, 18, doi: 10.1038/s41572-019-0069-0 (2019).

46. Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. NEnglJ Med342, 1334-1349, doi:10.1056/NEJM200005043421806 (2000).

47. Domscheit, H., Hegeman, M. A., Carvalho, N. & Spieth, P. M. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. Front Physiol 11, 36, doi: 10.3389/fphys.2020.00036 (2020).

48. Menezes, S. L. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. J Appl Physiol (1985) 98, 1777-1783, doi: 10.1152/japplphysiol.01182.2004 (2005).

49. Chiba, H., Otsuka, M. & Takahashi, H. Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: A mini review. Respir Investig 56, 384-391, doi: 10.1016/j.resinv.2018.06.001 (2018).

[0211] 50. Collard, H. R. et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299, L3-7, doi: 10.1152/ajplung.90637.2008 (2010).

51. Moodley, Y. P. et al. Analysis by proteomics reveals unique circulatory proteins in idiopathic pulmonary fibrosis. Respirology 24, 1111-1114, doi:10.1111/resp.13668 (2019).

52. O'Dwyer, D. N. et al. The peripheral blood proteome signature of idiopathic pulmonary fibrosis is distinct from normal and is associated with novel immunological processes. Sci Repl, 46560, doi:10.1038/s

rep46560 (2017).

53. Rosas, I. O. etal. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS Med5, e93, doi:10.1371/journal.pmed.0050093 (2008).

54. Todd, J. L. et al. Peripheral blood proteomic profiling of idiopathic pulmonary fibrosis biomarkers in the multicentre IPF-PRO Registry. Respir Res 20, 227, doi: 10.1186/s12931-019-1190-z (2019).

55. White, E. S. et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med 194, 1242-1251, doi: 10.1164/rccm.201505-08620C (2016).

56. Yang, I. V. et al. The peripheral blood transcriptome identifies the presence and extent of disease in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One 7, e37708, doi: 10.1371/journal.pone.0037708 (2012).

57. Maranville, J. C. & Di Rienzo, A. Combining genetic and nongenetic biomarkers to realize the promise of pharmacogenomics for inflammatory diseases. Pharmacogenomics 15, 1931-1940, doi: 10.2217/pgs.14.129 (2014).

58. Wang, J. et al. [Research advances in the mechanism of pulmonary fibrosis induced by coronavirus disease 2019 and the corresponding therapeutic measures]. Zhonghua Shao ShangZaZhi36, 691-697, doi:10.3760/cma.j.cn501120-20200307-00132 (2020).

59. Das, K. M. et al. Follow-up chest radiographic findings in patients with MERS-CoV after recovery. Indian J Radiol Imaging 27, 342-349, doi:10.4103/ijri.IJRI_469_16 (2017).

[0212] 60. George, P. M., Wells, A. U. & Jenkins, R. G. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. LancetRespirMed8, 807-815, doi:10.1016/S2213-2600(20)30225-3 (2020).

61. Fujiwara, K. et al. Inhibition of Cell Apoptosis and Amelioration of Pulmonary Fibrosis by Thrombomodulin. Am JPathoim, 2312-2322, doi :10.1016/j.ajpath.2017.06.013 (2017).

62. Koren, S. et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. Genome Res 21, 722-736, doi:10.1101/gr.215087.116 (2017).

63. Loman, N. J., Quick, J. & Simpson, J. T. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. Nat Methods 12, 733-735, doi: 10.1038/nmeth.3444 (2015).

64. Walker, B.J. et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. PLoS One 9, el 12963, doi: 10.1371/journal.pone.0112963 (2014).

65. Hunt, M. et al. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. Genome Biol 16, 294, doi:10.1186/sl3059-015-0849-0 (2015).

66. Bankevich, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. JComputBiol 19, 455-477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021 (2012).

67. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 13, el005595, doi: 10.1371/journal.pcbi. 1005595 (2017).

68. Waterhouse, R. M. etal. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. MolBiolEvol35, 543-548, doi: 10.1093/molbev/msx319 (2017).

69. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29, 1072-1075, doi:10.1093/bioinformatics/btt086 (2013).

[0213] 70. Delcher, A. L., Salzberg, S. L. & Phillippy, A. M. Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. Curr Protoc Bioinformatics Chapter 10, Unit 10 13, doi: 10.1002/0471250953.bil003s00 (2003).

71. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068-2069, doi:10.1093/bioinformatics/btul53 (2014).

72. Francis, M. B. & Carrico, I. S. New frontiers in protein bioconjugation. Curr Opin Chem BiolU, 771-773, doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.006 (2010).

73. Koniev, O. & Wagner, A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. Chem Soc Rev44, 5495-5551, doi: 10.1039/c5cs00048c (2015).

74. Macardle, P. J. & Bailey, S. in Cell Biology: A Laboratory Handboksol. 1 (ed J.E. Celis) Ch. 57, 475-490 (Elsevier, 2006).

75. Tomaru, A. et al. Oligonucleotide-targeting periostin ameliorates pulmonary fibrosis. Gene TherlA, 706-716, doi:10.1038/gt.2017.80 (2017).

76. Yasui, H. et al. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. Am J Respir Crit Care Med 163, 1660-1668, doi: 10.1164/ajrccm. 163.7.9911068 (2001).

77. Ashcroft, T., Simpson, J. M. & Timbrell, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. J Clin Pathol 41, 467-470, doi:10.1136/jcp.41.4.467 (1988).

請求の範囲

[請求項1] コリシンに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項2] コリシンがIVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）である、請求項１記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項3] PESSGNP（配列番号６８）またはNPAGY（配列番号６９）をエピトープとする、請求項１または２記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項4] (IA)

（ｉ)配列番号３７のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号３８のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号３９のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号４１のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４２のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号４３のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

(IIA)

（ｉ)配列番号７０のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号４９のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５０のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号５２のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号５３のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号５４のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

または

(IVA)

（ｉ)配列番号７２のH鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７３のH鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７４のH鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むH鎖可変領域、ならびに

(ii)配列番号７６のL鎖可変領域CDR1アミノ酸配列、配列番号７７

のL鎖可変領域CDR2アミノ酸配列および配列番号７８のL鎖可変領域CDR3アミノ酸配列を含むL鎖可変領域；

を含む、請求項１または２記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項5] （IB） 配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

（IIB） 配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；または

（IVB） 配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域、または配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域；

を有する、請求項１から３までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項6] （IC） 配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有す

るアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIC） 配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

（IIIC） 配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号４４のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；または

（IVC） 配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれと少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域、または配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク領域を含むL鎖可変領域；

を有する、請求項１から３までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項7] 請求項５記載のいずれかのH鎖可変領域、および請求項６記載のいずれかのL鎖可変領域を有する、請求項１から３までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項8] 請求項５記載の(IB)のH鎖可変領域および請求項６記載の(IC)のL鎖可変領域、

請求項５記載の(IIB)のH鎖可変領域および請求項６記載の(IIC)のL

鎖可変領域、または請求項５記載の(IVB)のH鎖可変領域および請求項６記載の(IVC)のL鎖可変領域；

を有する、請求項７記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項9] 請求項５記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ請求項６記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列であり；または

請求項５記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ請求項６記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列であり；または

請求項５記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列であり、かつ請求項６記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列である、

請求項８記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項10] 請求項５記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域であり；または

請求項５記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域であり；または

請求項５記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のH鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも８０％同一である

アミノ酸配列を含むH鎖可変領域である、
請求項８記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項11] 請求項５記載の(IB)のH鎖可変領域が、配列番号３６のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IC)のL鎖可変領域が、配列番号４０のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域であり；または

請求項５記載の(IIB)のH鎖可変領域が、配列番号４８のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IIC)のL鎖可変領域が、配列番号５１のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域であり；または

請求項５記載の(IVB)のH鎖可変領域が、配列番号７１のH鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むH鎖可変領域であり、かつ請求項６記載の(IVC)のL鎖可変領域が、配列番号７５のL鎖可変領域アミノ酸配列において、それと比較して１または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む少なくとも１個のフレームワーク(FW)領域を含むL鎖可変領域である、
請求項８記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体。

[請求項12] Fab、F(ab')$_2$、Fvまたは単鎖Fv断片(scFv)である、請求項１から１１のいずれか記載の抗体分子の誘導体。

[請求項13] コリシンが引き起こすアポトーシスを中和および／または阻害する、請求項１から１２のいずれか記載の抗体分子またはその誘導体。

[請求項14] 請求項１から１３までのいずれか記載のモノクローナル抗体分子またはその誘導体の有効量を含有する、急性肺障害または線維症を処置または予防するための医薬組成物。

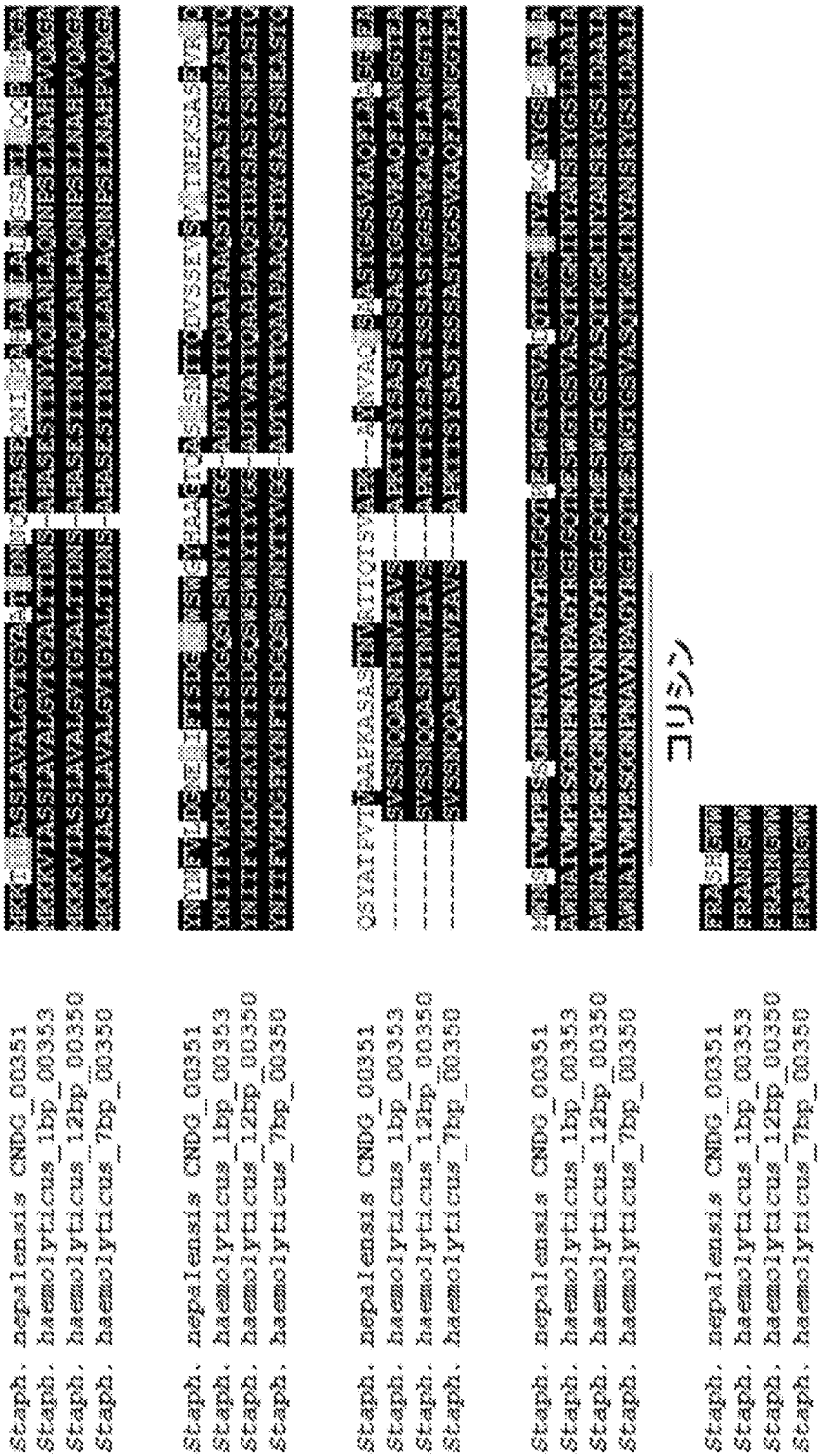
[請求項15] 急性肺障害が、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を引きおこして肺機能が低下し、呼吸管理が必要となる致命的な肺炎である請求項１４記載の医薬組成物。

[請求項16] 線維症が、特発性肺線維症（IPF）、肝硬変、腎線維症、嚢胞性線維症、骨髄線維症、および乳腺線維症からなる群より選択される、請求項１４記載の医薬組成物。

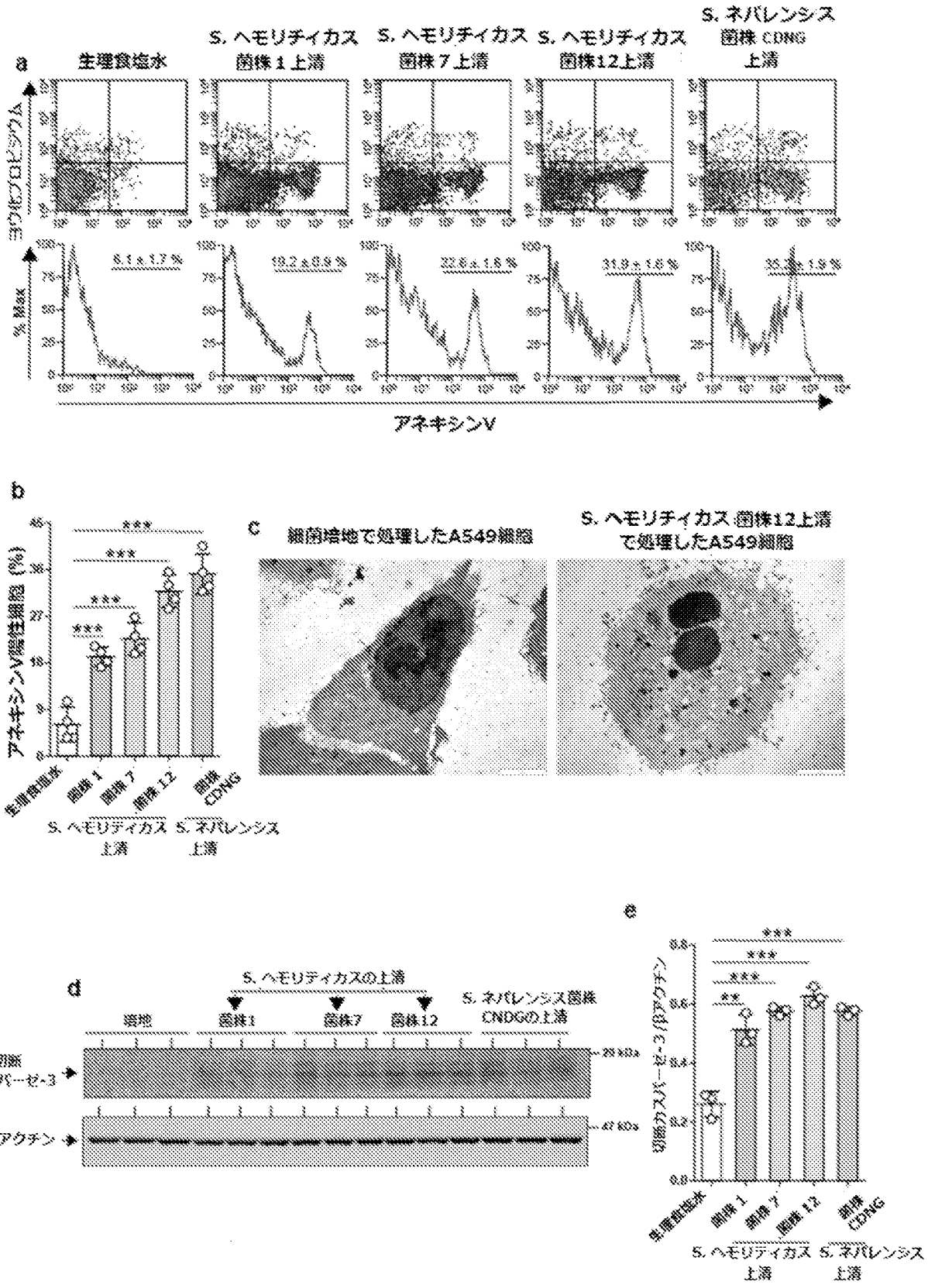
[請求項17] アミノ酸配列：IVMPESSGNPNAVNPAGYR（配列番号１）を有するコリシンの配列内の１つ、または数個の変異を有するコリシン変異体であって、アポトーシス活性を示さない該変異体を有効成分とする、急性肺障害または線維症を予防するためのワクチン組成物。

[請求項18] コリシンの、急性肺障害または線維症の進行度を判定するためのバイオマーカーとしての使用。

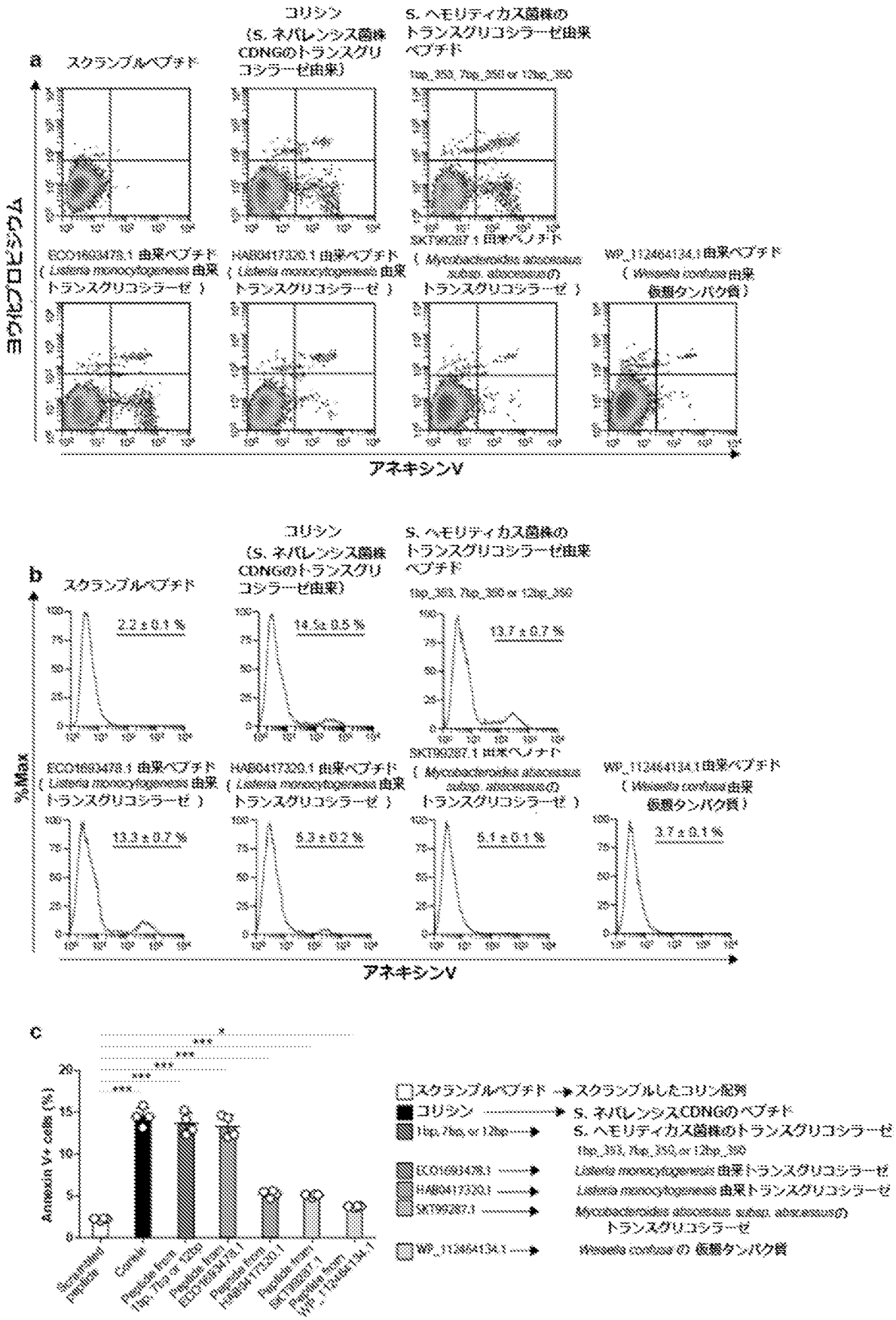
[図1]


Staph. nepalensis CNDG_00351
Staph. haemolyticus_1bp_00353
Staph. haemolyticus_12bp_00350
Staph. haemolyticus_7bp_00350
コンセンサス

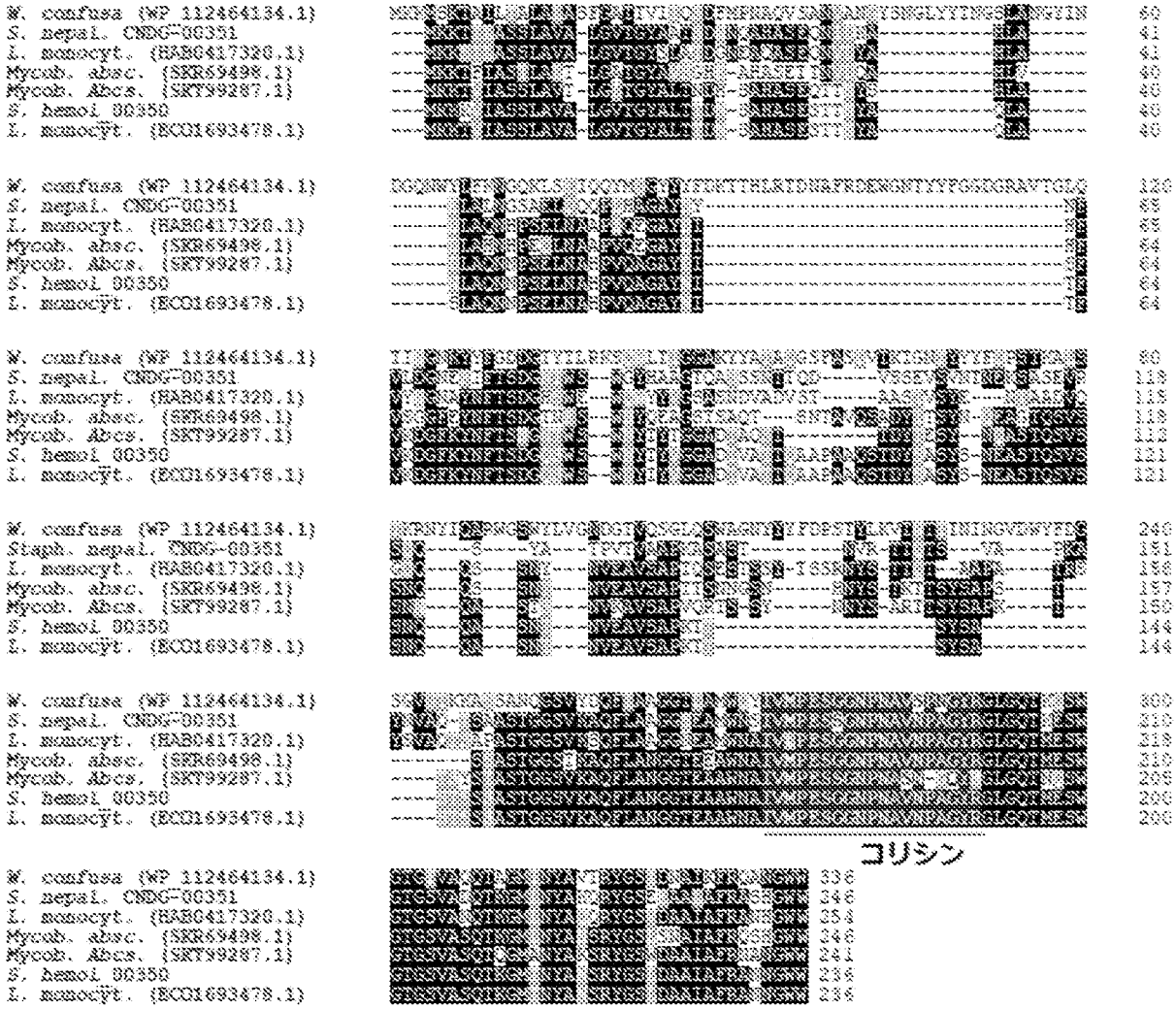
[図2]


a
生理食塩水
S. ヘモリティカス 菌株1上清
S. ヘモリティカス 菌株7上清
S. ヘモリティカス 菌株12上清
S. ネバレンシス 菌株 CDNG 上清
ヨウ化プロピジウム
% Max
アネキシンV
b
アネキシンV陽性細胞 (%)
生理食塩水
菌株1
菌株7
菌株12
菌株 CDNG
S. ヘモリティカス 上清
S. ネバレンシス 上清
c
細菌培地で処理したA549細胞
S. ヘモリティカス 菌株12上清で処理したA549細胞
d
S. ヘモリティカスの上清
S. ネバレンシス菌株 CNDGの上清
培地
菌株1
菌株7
菌株12
切断 カスパーゼ-3
βアクチン
e
切断カスパーゼ-3/βアクチン

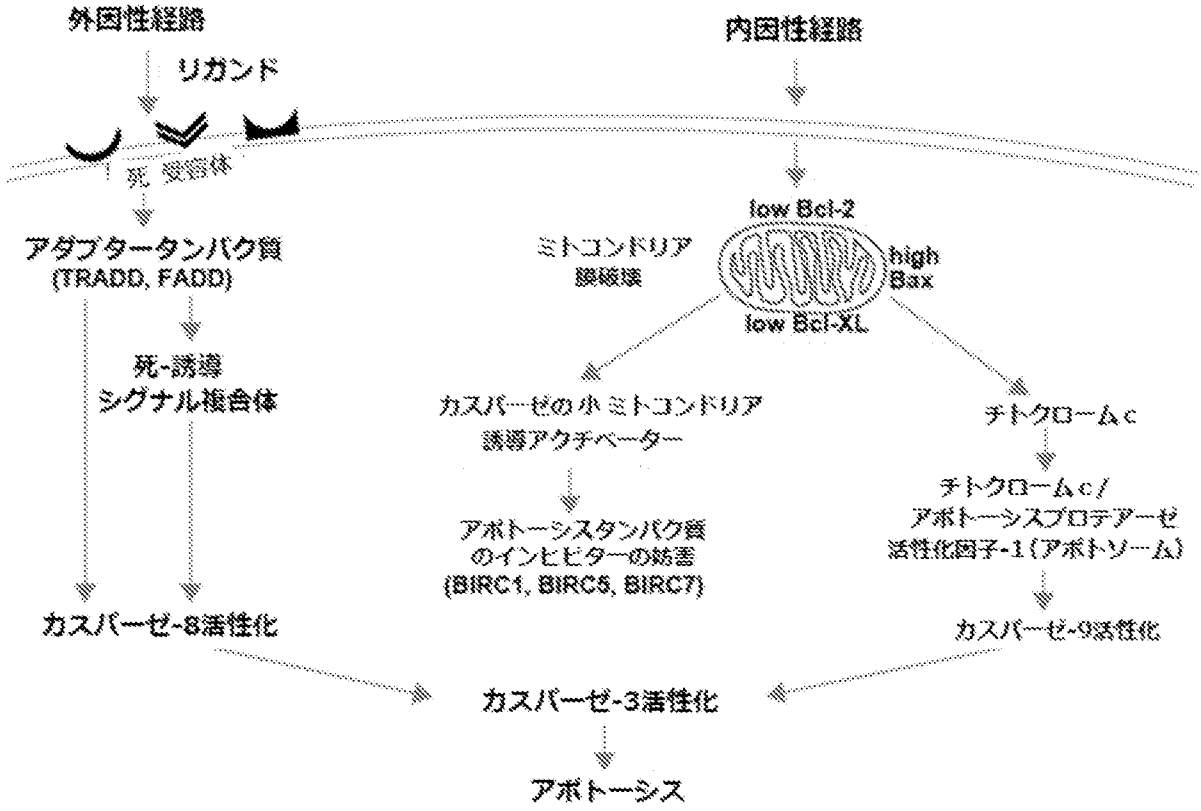
[図3]

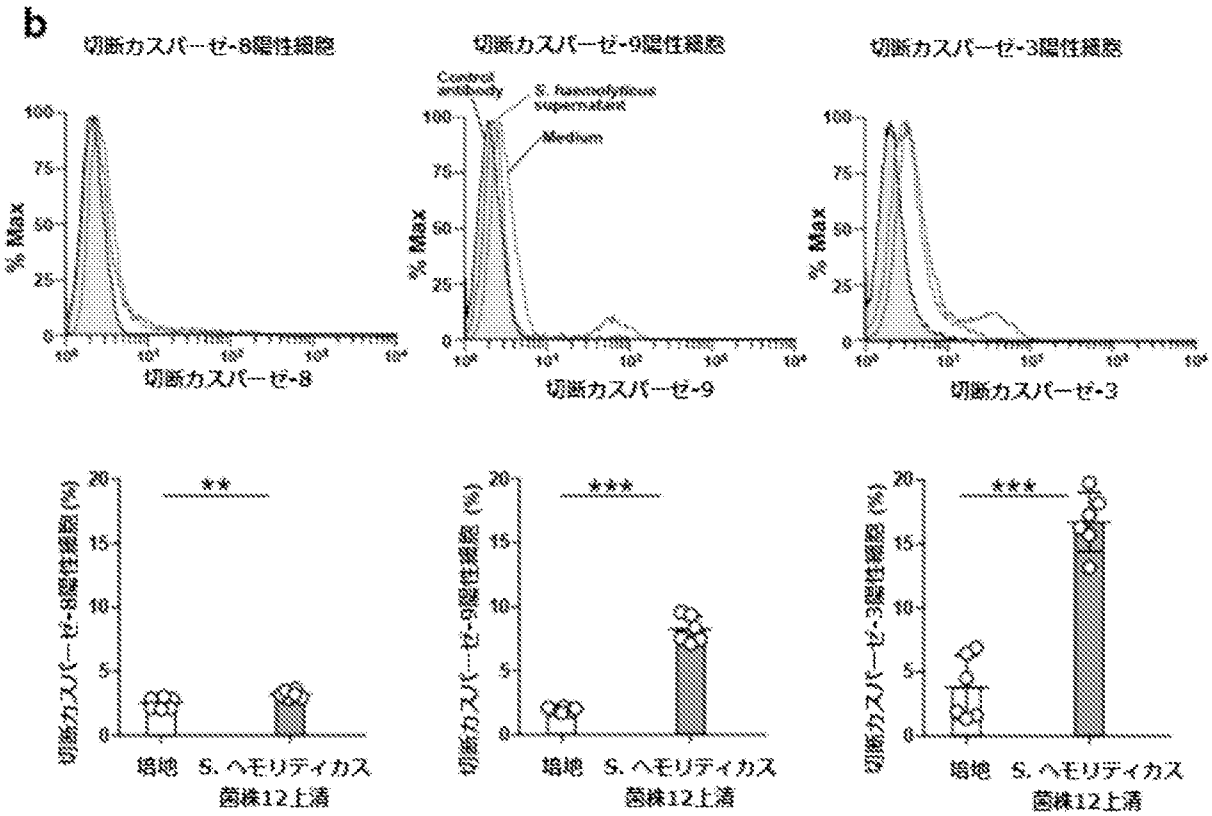

a
スクランブルペプチド
コリシン
(S. ネバレンシス菌株
CDNGのトランスグリ
コシラーゼ由来)
S. ヘモリティカス菌株の
トランスグリコシラーゼ由来
ペプチド
ECO16934781 由来ペプチド
(Listeria monocytogenes 由来
トランスグリコシラーゼ)
HAB0417320.1 由来ペプチド
(Listeria monocytogenes 由来
トランスグリコシラーゼ)
SKT99287.1 由来ペプチド
(Mycobacteroides abscessus
subsp. abscessus の
トランスグリコシラーゼ)
WP_112464134.1 由来ペプチド
(Weeksella virosa 由来
仮想タンパク質)
ヨウ化プロピジウム
アネキシンV
b
2.2 ± 0.1 %
14.5± 0.5 %
13.7 ± 0.7 %
13.3 ± 0.7 %
5.3 ± 0.2 %
5.1 ± 0.1 %
3.7 ± 0.1 %
%Max
アネキシンV
c
Annexin V+ cells (%)
Scrambled peptide
Colicin
Peptide from Ser. Tsp. or 12bp
Peptide from ECO16934781.1
Peptide from HAB0417320.1
Peptide from SKT99287.1
Peptide from WP_112464134.1
スクランブルペプチド → スクランブルしたコリン配列
コリシン → S. ネバレンシスCDNGのペプチド
Tsp./Ssp. or 12bp → S. ヘモリティカス菌株のトランスグリコシラーゼ
(Tsp_353, Tsp_350 or 12bp_350)
ECO16934781 → Listeria monocytogenes 由来トランスグリコシラーゼ
HAB0417320.1 → Listeria monocytogenes 由来トランスグリコシラーゼ
SKT99287.1 → Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus の
トランスグリコシラーゼ
WP_112464134.1 → Weeksella virosa の 仮想タンパク質

[図4]

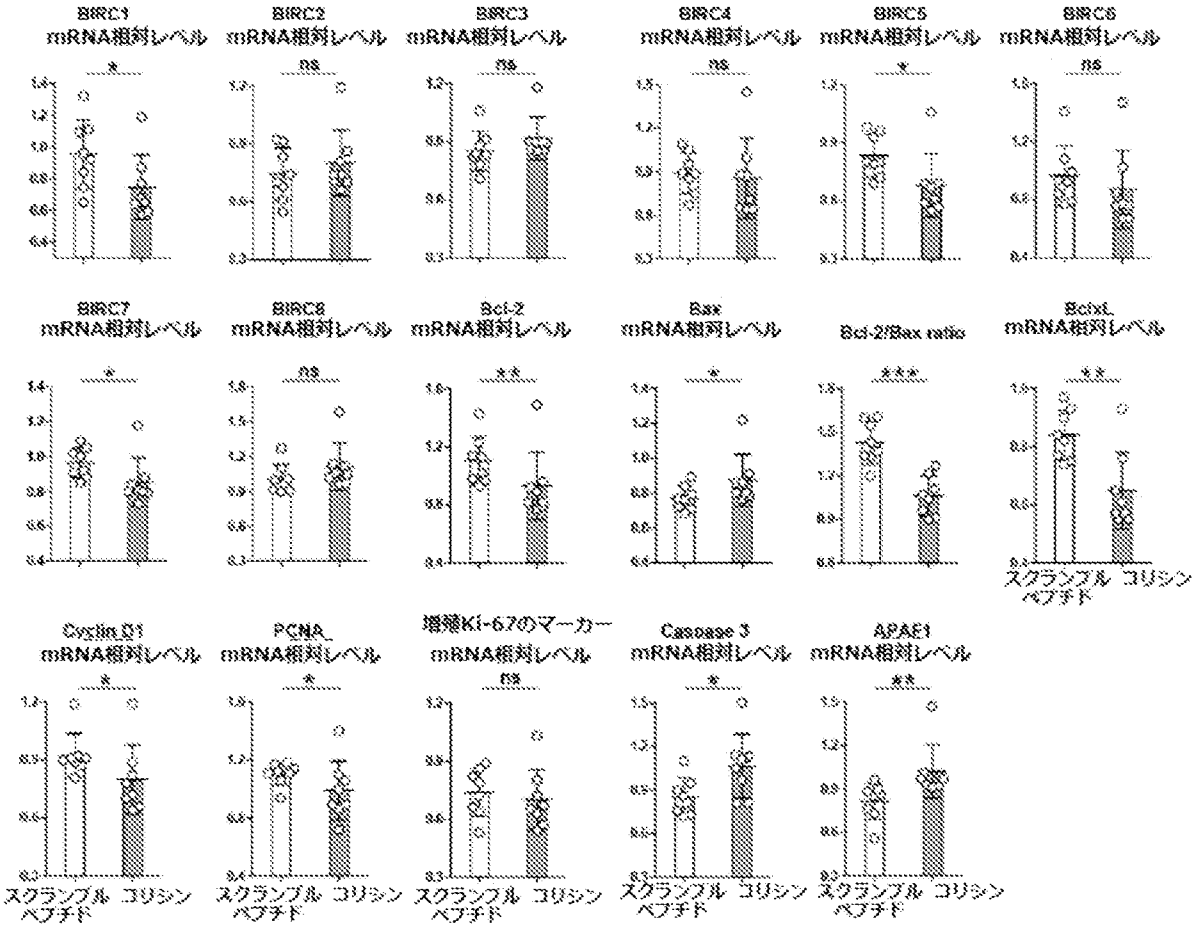

W. confusa (WP_112464134.1)
S. nepal. CNDG-00351
L. monocyt. (HAB0417320.1)
Mycob. absc. (SRR69498.1)
Mycob. Abcs. (SRT99287.1)
S. hemol 00350
L. monocyt. (ECO1693478.1)
コリシン

[図5]

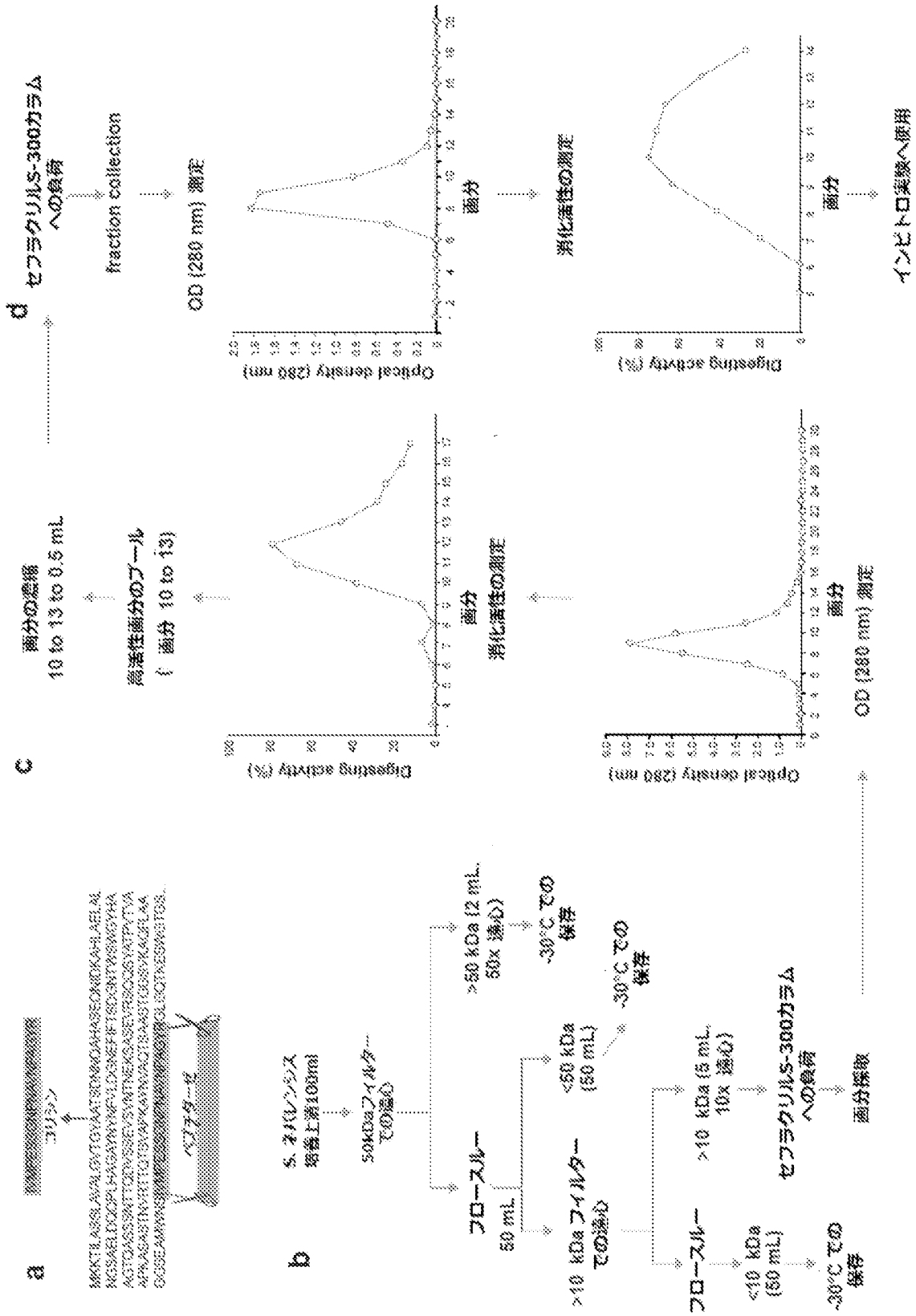

外因性経路
リガンド
死 受容体
アダプタータンパク質
(TRADD, FADD)
死-誘導
シグナル複合体
カスパーゼ-8活性化
内因性経路
low Bcl-2
ミトコンドリア
膜破壊
high
Bax
low Bcl-XL
カスパーゼの小ミトコンドリア
誘導アクチベーター
アポトーシスタンパク質
のインヒビターの妨害
(BIRC1, BIRC5, BIRC7)
チトクロームc
チトクロームc/
アポトーシスプロテアーゼ
活性化因子-1(アポトソーム)
カスパーゼ-9活性化
カスパーゼ-3活性化
アポトーシス


b
切断カスパーゼ-8陽性細胞
切断カスパーゼ-9陽性細胞
切断カスパーゼ-3陽性細胞
% Max
切断カスパーゼ-8
切断カスパーゼ-9
切断カスパーゼ-3
**
***
***
培地
S. ヘモリティカス
菌株12上清

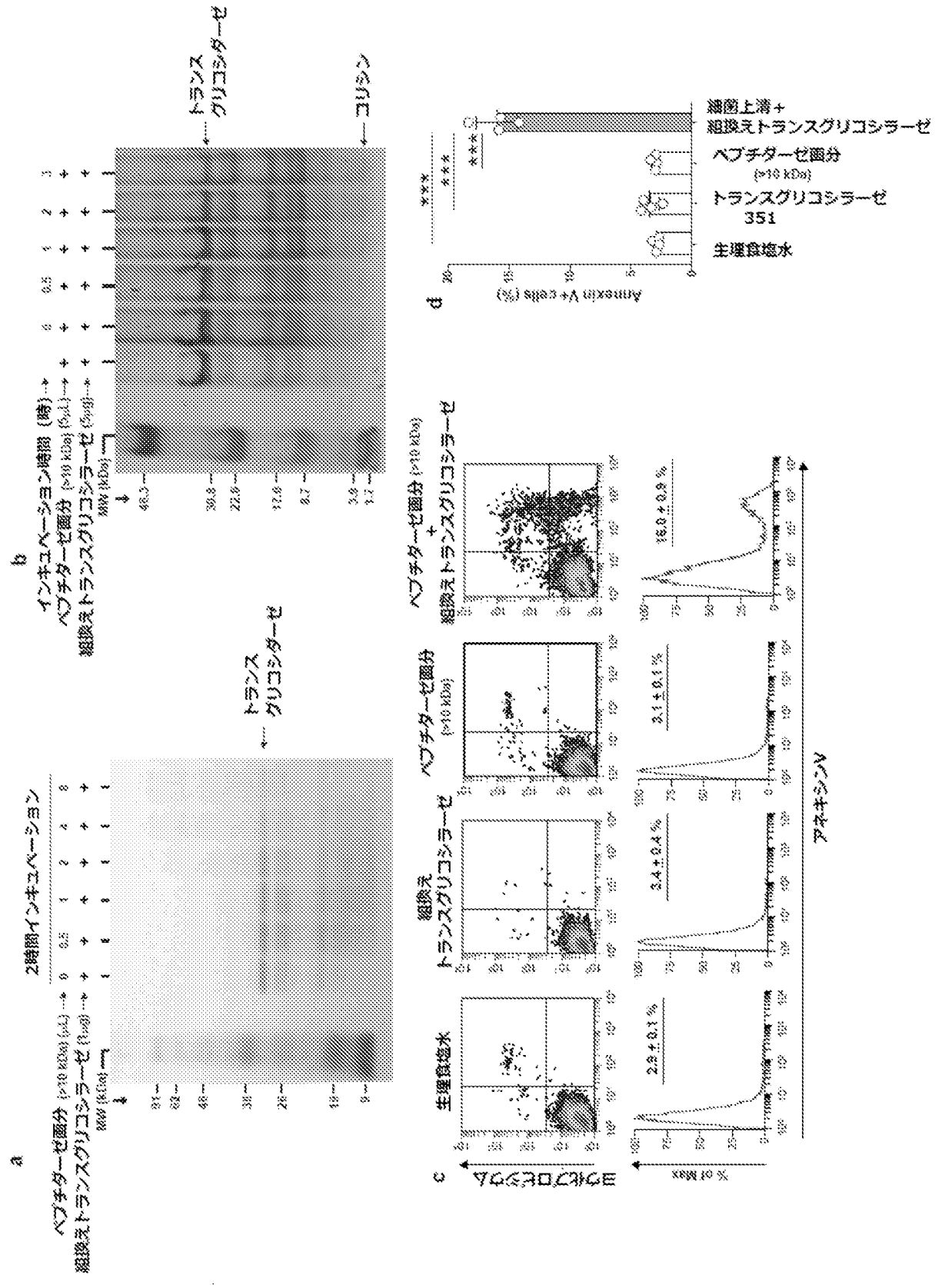
[図6]


BIRC1
mRNA相対レベル
*
BIRC2
mRNA相対レベル
ns
BIRC3
mRNA相対レベル
ns
BIRC4
mRNA相対レベル
ns
BIRC5
mRNA相対レベル
*
BIRC6
mRNA相対レベル
ns
BIRC7
mRNA相対レベル
*
BIRC8
mRNA相対レベル
ns
Bcl-2
mRNA相対レベル
**
Bax
mRNA相対レベル
*
Bcl-2/Bax ratio
***
BclxL
mRNA相対レベル
**
スクランブルペプチド
コリシン
Cyclin D1
mRNA相対レベル
*
PCNA
mRNA相対レベル
*
増殖Ki-67のマーカー
mRNA相対レベル
ns
Caspase 3
mRNA相対レベル
*
APAF1
mRNA相対レベル
**

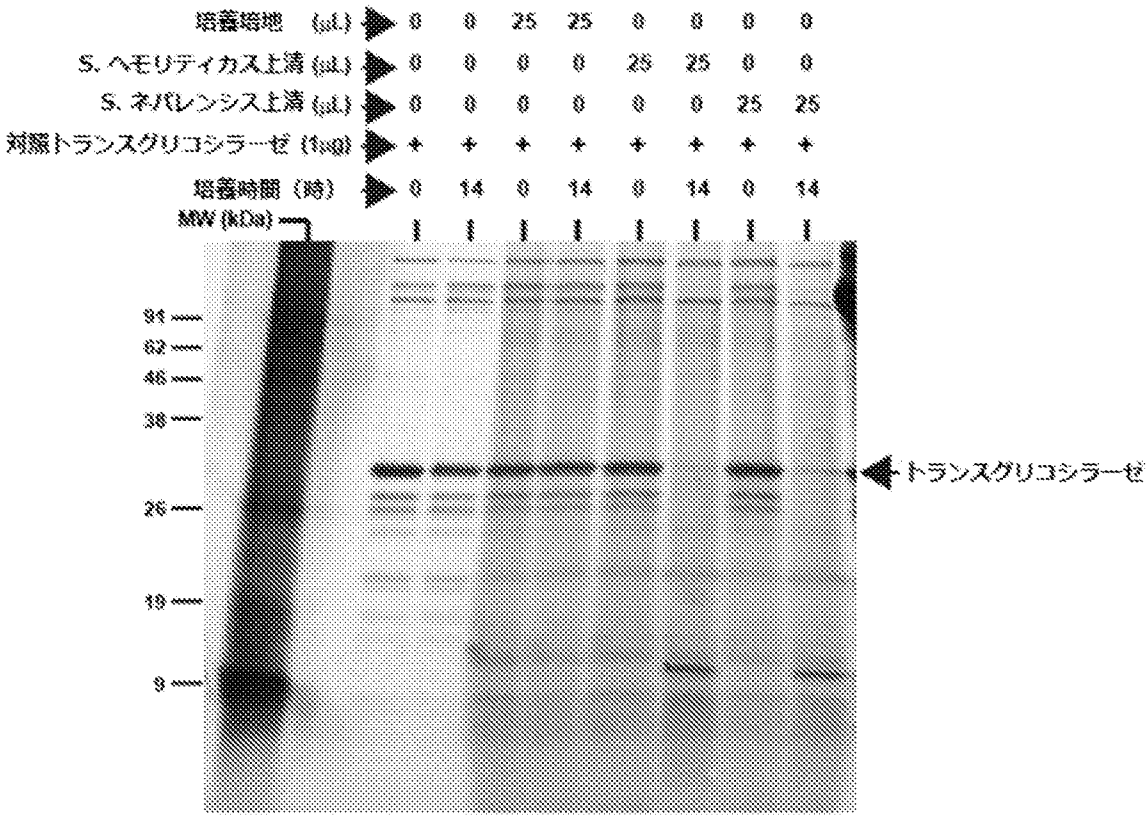
[図7]


a
コリシン
MKKTLASRAVALFVTGMAATIRNKGAHAAEEKKKAHLAELAL
KGSAELEDGPLHKGAAVVNGFLDSNEFRTSDGNTWSWGTHA
AGTLDASSRTLDANSEELSWTNEKGSELVRGDVSATFLTVA
APASAETNVSRTLTEIPSVKKANNAGTDAASTEEGKKGRLAA
GGSEAAWKSPEFRKWQLQTVEGRNTGL
ベクター
b
S. ネオ(ハンシュス
培養上清100ml
50kDaフィルター
(TOSO)
フロースルー
60 mL
>50 kDa (2 mL,
50x 濃心)
-30℃での
保存
<50 kDa
(50 mL)
>10 kDa フィルター
(TOSO)
-30℃での
保存
フロースルー
<10 kDa
(60 mL)
>10 kDa (5 mL,
10x 濃心)
セファクリルS-300カラム
への負荷
画分採取
-30℃での
保存
c
画分の採取
10 to 13 to 0.5 mL
高活性画分のプール
(画分 10 to 13)
画分
消化活性の測定
Digesting activity (%)
画分
OD (380 nm) 測定
Optical density (280 nm)
d
セファクリルS-300カラム
への負荷
fraction collection
OD (280 nm) 測定
Optical density (280 nm)
画分
消化活性の測定
Digesting activity (%)
画分
インビトロ実験へ使用

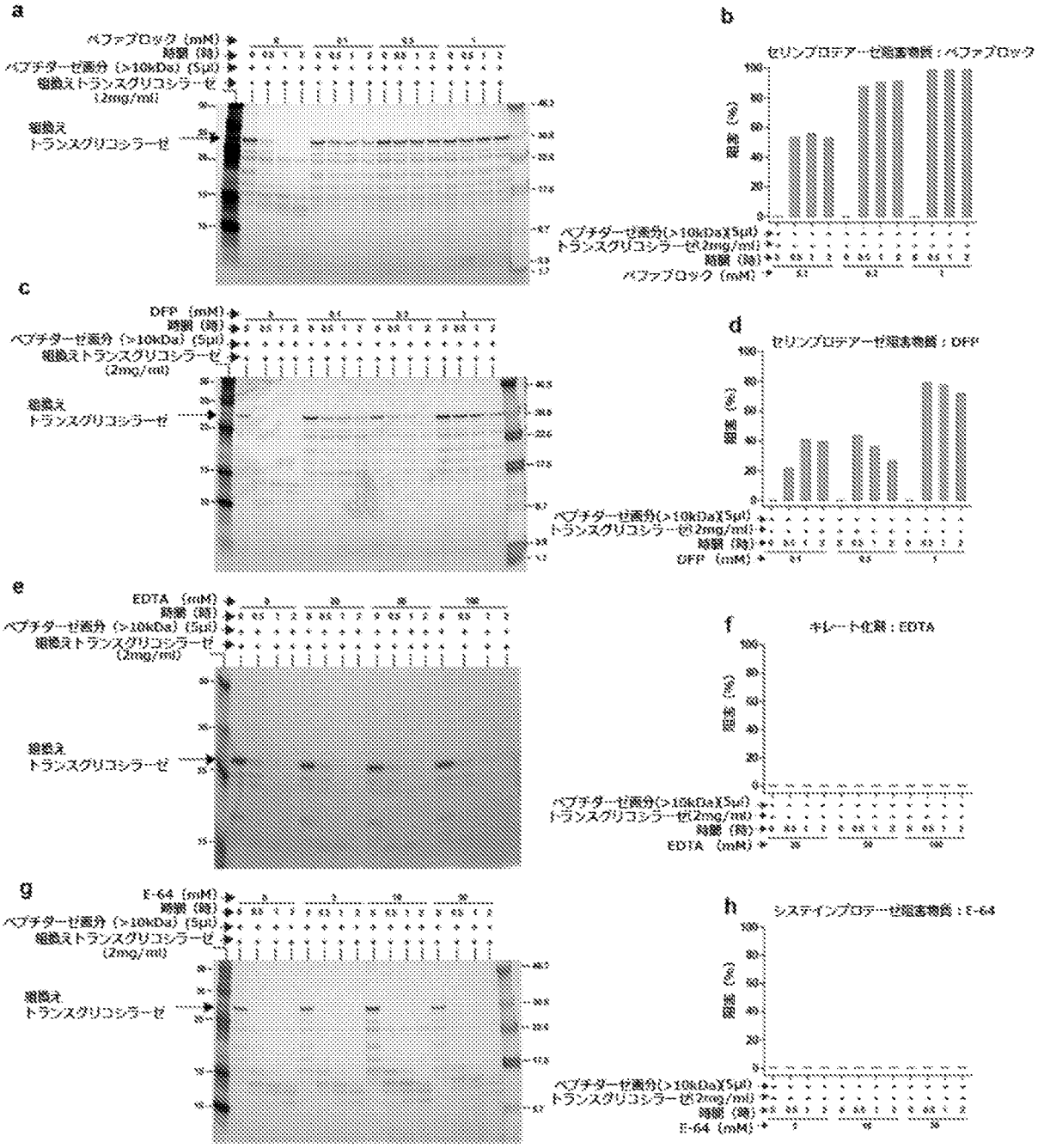
[図8]


a
2時間インキュベーション
ペプチダーゼ画分 (>10 kDa) (μL)
組換えトランスグリコシラーゼ (μg)
kDa (Mr)
トランスグリコシダーゼ
コリシン
b
インキュベーション時間 (時)
ペプチダーゼ画分 (>10 kDa) (μL)
組換えトランスグリコシラーゼ (μg)
kDa (Mr)
トランスグリコシダーゼ
コリシン
c
生理食塩水
組換えトランスグリコシラーゼ
ペプチダーゼ画分 (>10 kDa)
ペプチダーゼ画分 (>10 kDa) + 組換えトランスグリコシラーゼ
2.9 ± 0.1 %
3.4 ± 0.4 %
3.1 ± 0.1 %
16.0 ± 0.9 %
% of Max
アネキシンV
d
Annexin V+ cells (%)
細菌上清 + 組換えトランスグリコシラーゼ
ペプチダーゼ画分 (>10 kDa)
トランスグリコシラーゼ 351
生理食塩水

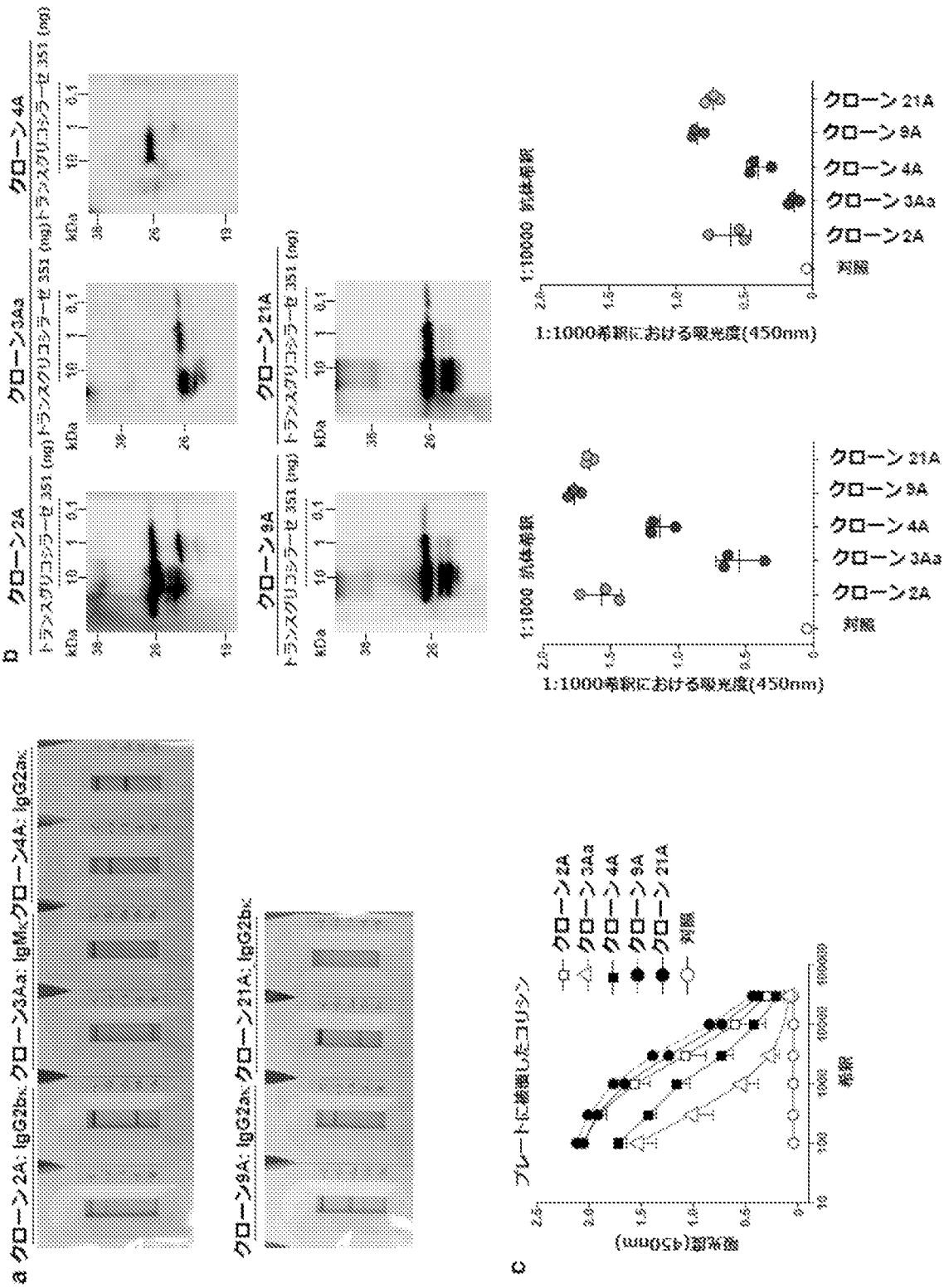
[図9]


培養培地 (μL)
S. ヘモリティカス上清 (μL)
S. ネバレンシス上清 (μL)
対照トランスグリコシラーゼ (1μg)
培養時間 (時)
MW (kDa)
0 0 25 25 0 0 0 0
0 0 0 0 25 25 0 0
0 0 0 0 0 0 25 25
+ + + + + + + +
0 14 0 14 0 14 0 14
91
62
46
38
26
19
9
トランスグリコシラーゼ

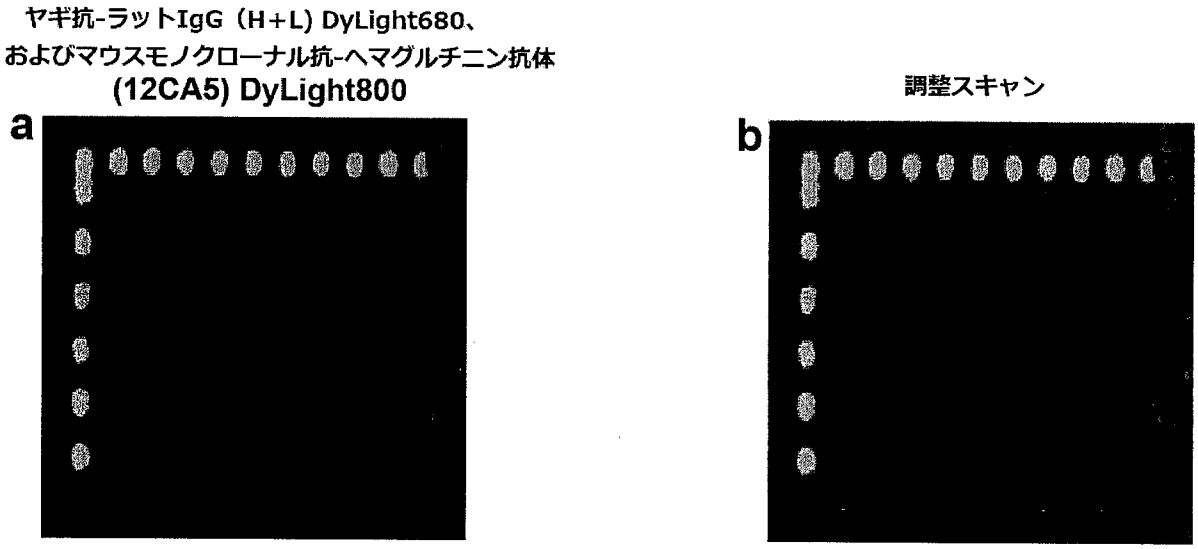
[図10]


a
ペファブロック (mM)
時間 (時)
ペプチダーゼ画分 (>10kDa) (5μl)
組換えトランスグリコシラーゼ (2mg/ml)
組換え
トランスグリコシラーゼ
b
セリンプロテアーゼ阻害物質：ペファブロック
相対活性 (%)
c
DFP (mM)
d
セリンプロテアーゼ阻害物質：DFP
e
EDTA (mM)
f
キレート化剤：EDTA
g
E-64 (mM)
h
システインプロテアーゼ阻害物質：E-64

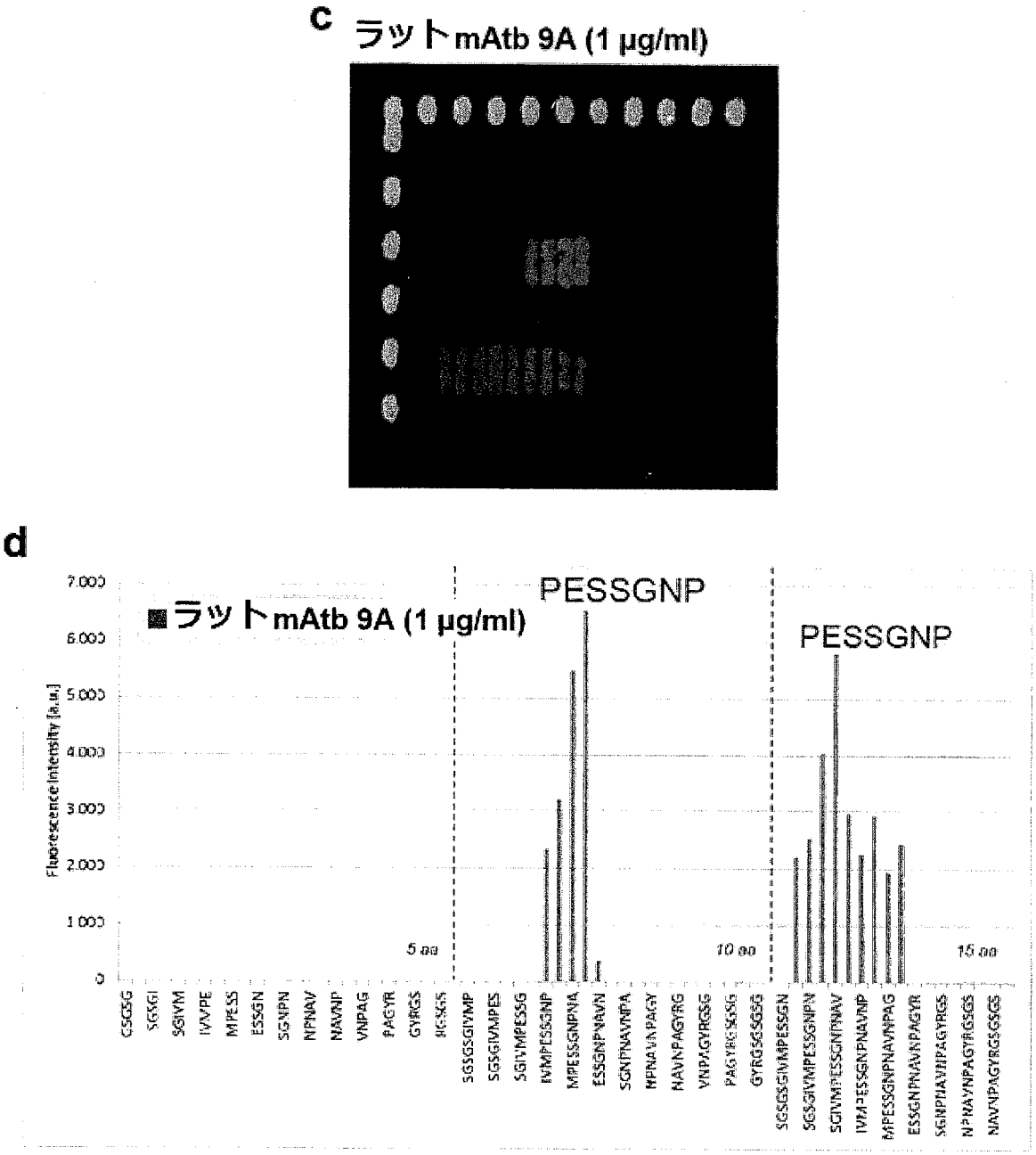
[図11]


a クローン2A: IgG2bκ, クローン3Aa: IgMκ, クローン4A: IgG2aκ,
クローン9A: IgG2aκ, クローン21A: IgG2bκ
b クローン2A
クローン3Aa
クローン4A
クローン9A
クローン21A
トランスグルコミナーゼ 351 (mg)
kDa
38
26
18
c プレートに固相したコロジン
吸光度(450nm)
希釈
対照
1:10000 抗体希釈
1:1000希釈における吸光度(450nm)

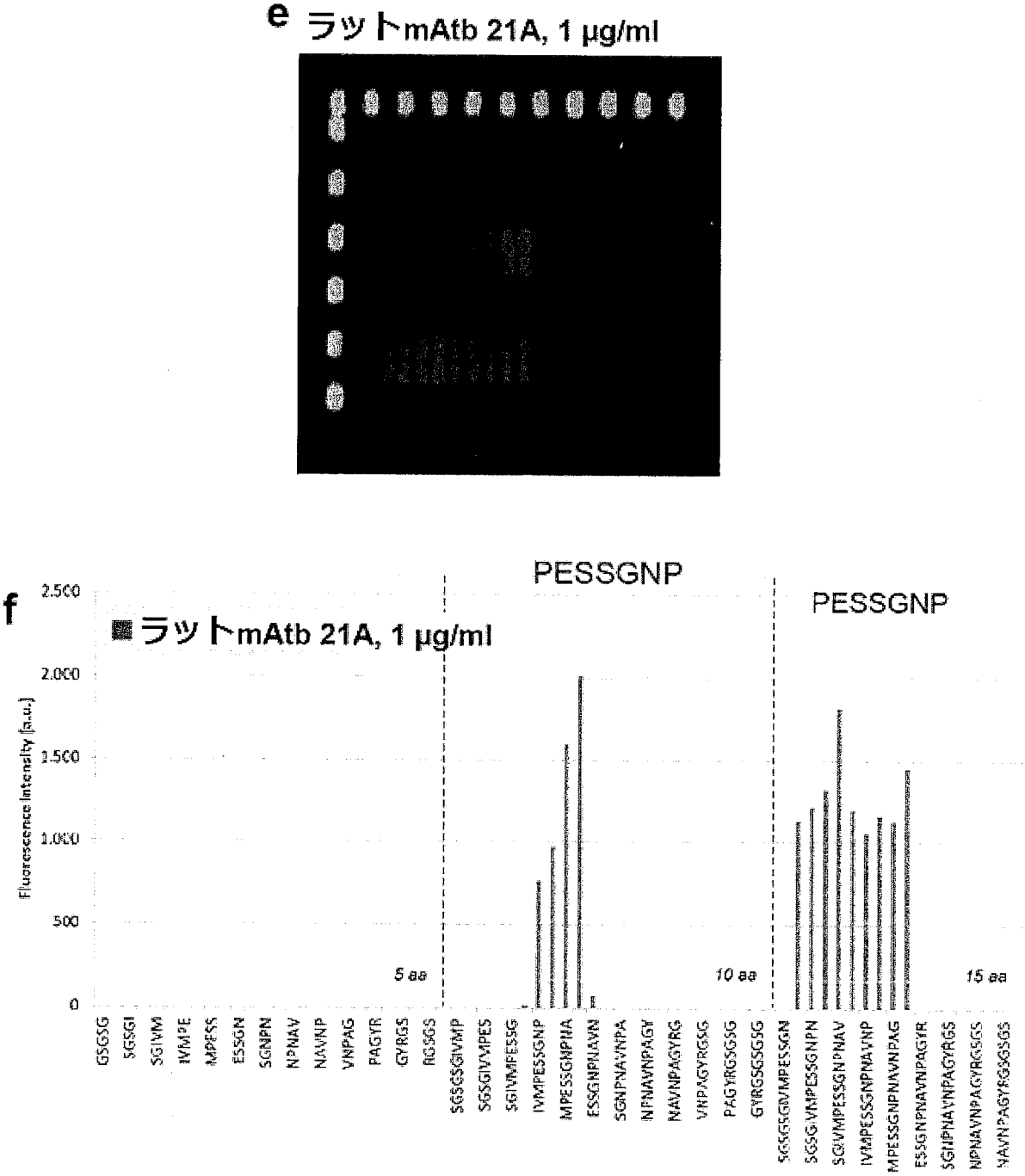
[図１２]


ヤギ抗-ラットIgG（H+L) DyLight680、
およびマウスモノクローナル抗-ヘマグルチニン抗体
(12CA5) DyLight800
a
調整スキャン
b

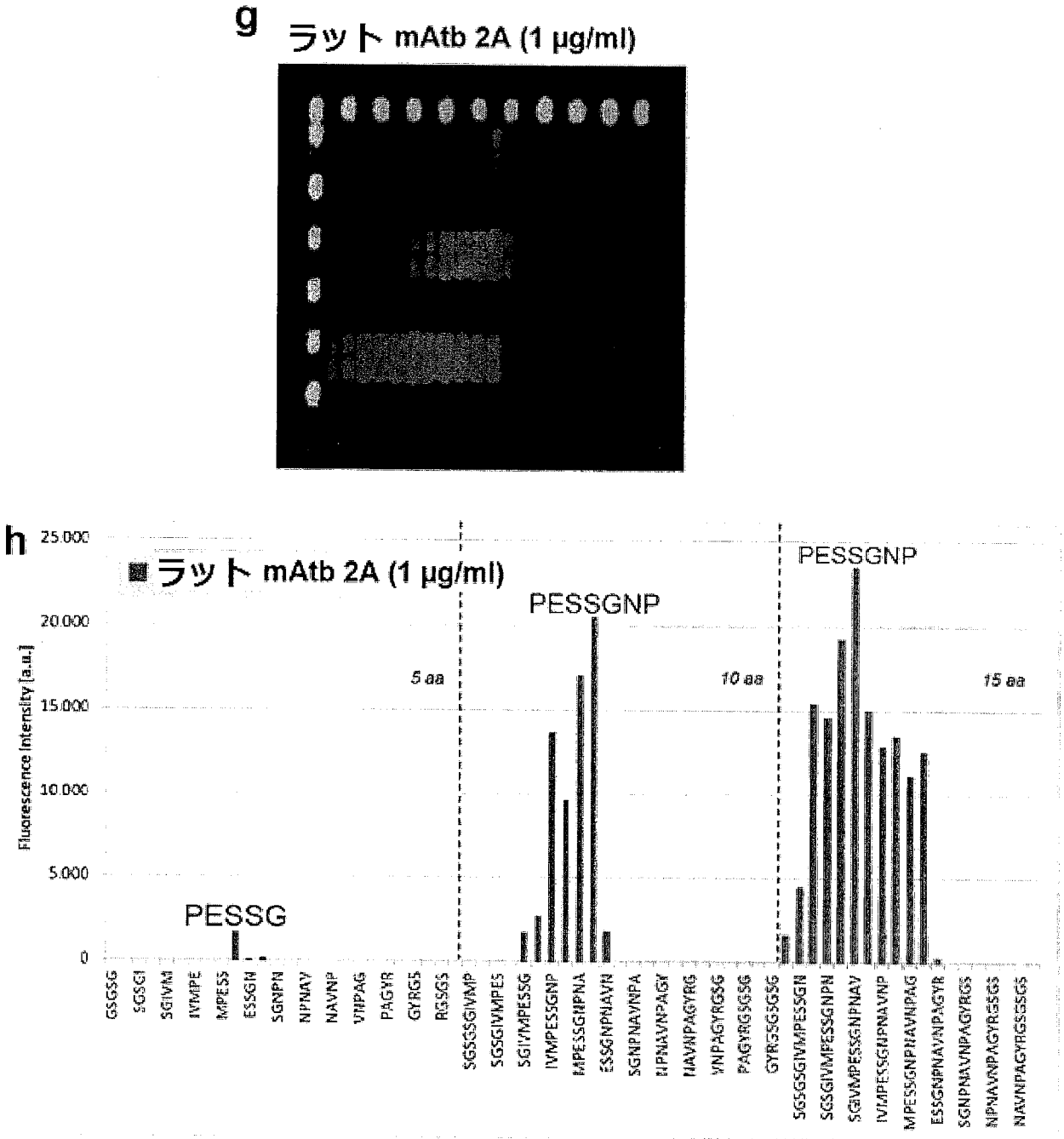
［図１２］の続き


c
ラットmAtb 9A (1 μg/ml)
d
■ラットmAtb 9A (1 μg/ml)
PESSGNP
PESSGNP
Fluorescence Intensity [a.u.]
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
5 aa
10 aa
15 aa

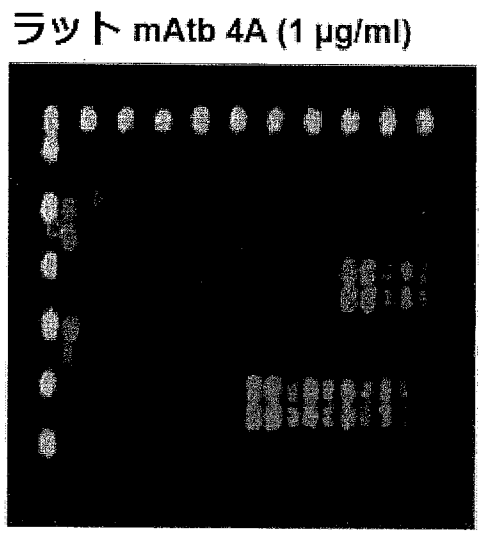
［図１２］の続き

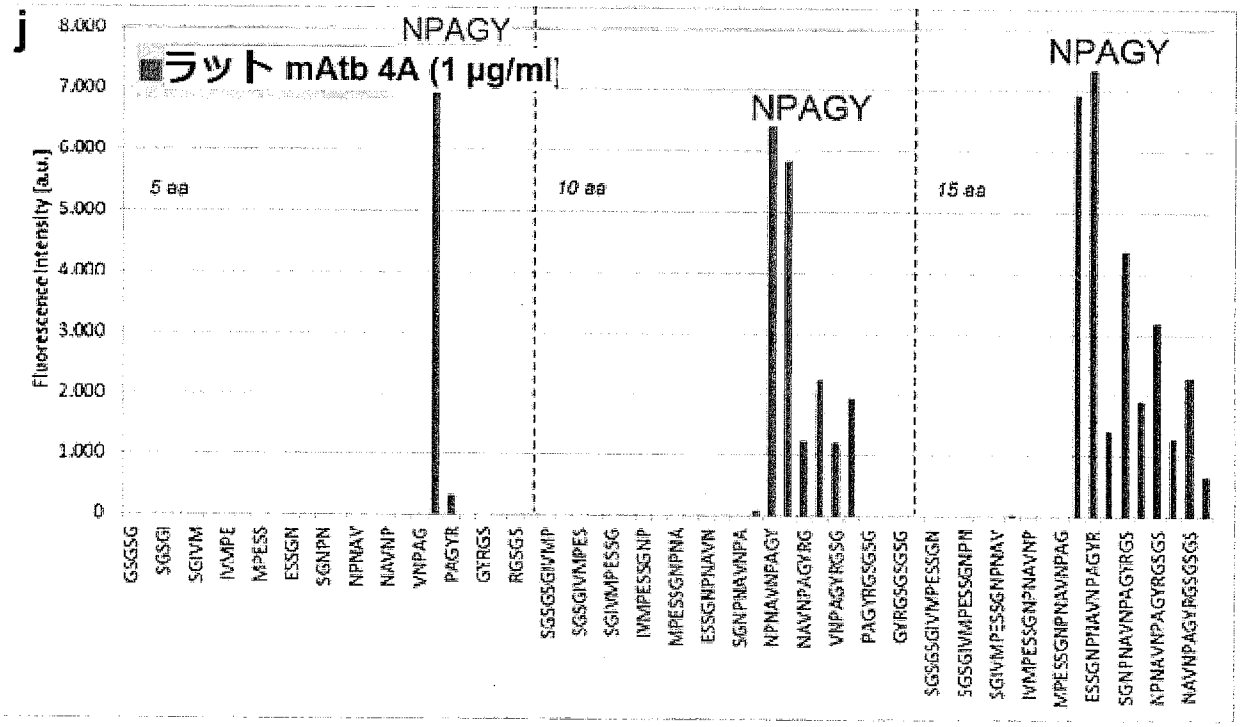

e ラットmAtb 21A, 1 μg/ml
f
■ラットmAtb 21A, 1 μg/ml
PESSGNP
PESSGNP
Fluorescence Intensity [a.u.]
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
5 aa
10 aa
15 aa
GSGSG
SGSGI
SGIVM
IVMPE
MPESS
ESSGN
SGNPN
NPNAV
NAVNP
VNPAG
PAGYR
GYRGS
RGSGS
SGSGSGIVMP
SGSGIVMPES
SGIVMPESSG
IVMPESSGNP
MPESSGNPNA
ESSGNPNAVN
SGNPNAVNPA
NPNAVNPAGY
NAVNPAGYRG
VNPAGYRGSG
PAGYRGSGSG
GYRGSGSGSG
SGSGSGIVMPESSGN
SGSGIVMPESSGNPN
SGIVMPESSGNPNAV
IVMPESSGNPNAVNP
MPESSGNPNAVNPAG
ESSGNPNAVNPAGYR
SGNPNAVNPAGYRGS
NPNAVNPAGYRGSGS
NAVNPAGYRGSGSGS

［図１２］の続き


g
ラット mAtb 2A (1 μg/ml)
h
ラット mAtb 2A (1 μg/ml)
Fluorescence intensity [a.u.]
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0
PESSG
PESSGNP
PESSGNP
5 aa
10 aa
15 aa

［図１２］の続き


i
ラット mAtb 4A (1 μg/ml)


j
ラット mAtb 4A (1 μg/ml)
Fluorescence Intensity (a.u.)
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
5 aa
10 aa
15 aa
NPAGY
NPAGY
NPAGY
GSGSG
SGSGI
SGIVM
IVMPE
MPESS
ESSGN
SGNPN
NPNAV
NAVNP
VNPAG
PAGYR
GYRGS
RGSGS
SGSGSGIVMP
SGSGIVMPES
SGIVMPESSG
IVMPESSGNP
MPESSGNPNA
ESSGNPNAVN
SGNPNAVNPA
NPNAVNPAGY
NAVNPAGYRG
VNPAGYRGSG
PAGYRGSGSG
GYRGSGSGSG
SGSGSGIVMPESSGN
SGSGIVMPESSGNPN
SGIVMPESSGNPNAV
IVMPESSGNPNAVNP
MPESSGNPNAVNPAG
ESSGNPNAVNPAGYR
SGNPNAVNPAGYRGS
NPNAVNPAGYRGSGS
NAVNPAGYRGSGSGS

[図13]

抗コリシンモノクローナル抗体クローン 4A

H鎖 (4A-HC.7331)：1 文字表記，可変および定常領域配列

MELCMMWIFLVAFLKGVQCevqvlesggglvqpgnslklscatsGFTFSTAWmywyr
qfpekrlewvarIKAKSNSYATdytesvkgrftisrddskgsiylrmnnlkeedta
iyycASTDAFYFSHSYwgqgvlvtvssAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCL
VKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAH

L鎖 (4A-LC.7395)：1 文字表記，可変および定常領域配列

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqtpssqavsagekvtmrcrssQSLLYSENKK
NYlawyqqkpgrspklliyWASTgesgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavy
ycQQYYNFPLTfgsgtkleikRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPR
DISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

抗コリシンモノクローナル抗体クローン 9A

L鎖 (9A-LC.7402)：1 文字表記，可変および定常領域配列

MESQTQVLMSLLLWVSGTCGdivmtqspssqavsagekvtmsckssQNLLYSEDKK
NYlawyqqkpgqspklliyWAStresgvpdrfigsgsgtdftltvtsvqaedlavyy
cQQYYNFPRTfgggtklelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRD
ISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

抗コリシンモノクローナル抗体クローン 2A

H鎖 (2A-HC.7352)：1 文字表記，可変および定常領域配列

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesggglvqpgnsltlscvasGFTFTNYGmhwir
qapkkglewiamIYYDSSKMsyadtvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtamy
ycAAEGFGTPFPYwgqgtlvtvssAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKG
YFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQTVTCNVAH

L鎖 (2A-LC.7413)：1 文字表記，可変および定常領域配列

MESQTQVLMSLLLWVSGSCGdivmtqtpssravsagekvtmsckssQSLLYSENEK
NYlawyqqrpgqspklliyWAStresgvpdrfigtgsgtdftltissvqaedlavyy
cQQYYHFPRTfgggtrlelkRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRD
ISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLYTCEVVHKTS

抗コリシンモノクローナル抗体クローン 21A

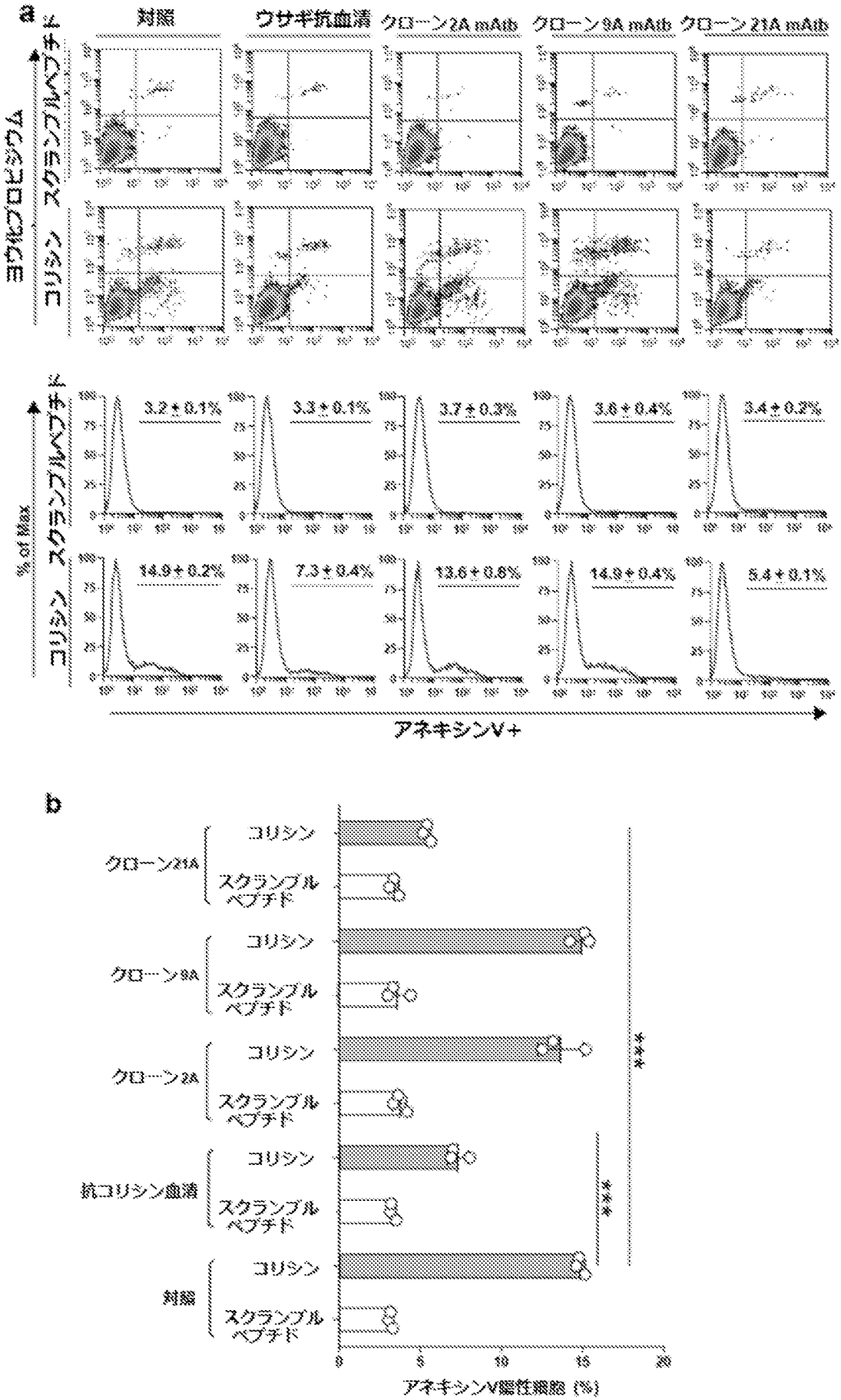
H 鎖(KF1410-2_VH_pep)：1 文字表記、可変領域配列

MDFRLNLVFLVFILKGVWCevklvesgggivqpgnsltlscgasgftftNYGMHwirqapkkglewigMIY
YDSSKMSYADTVKGrftisrdnsknilylemnslrsedtamyycaaEGFGTPFPYwgqgtlvtvss

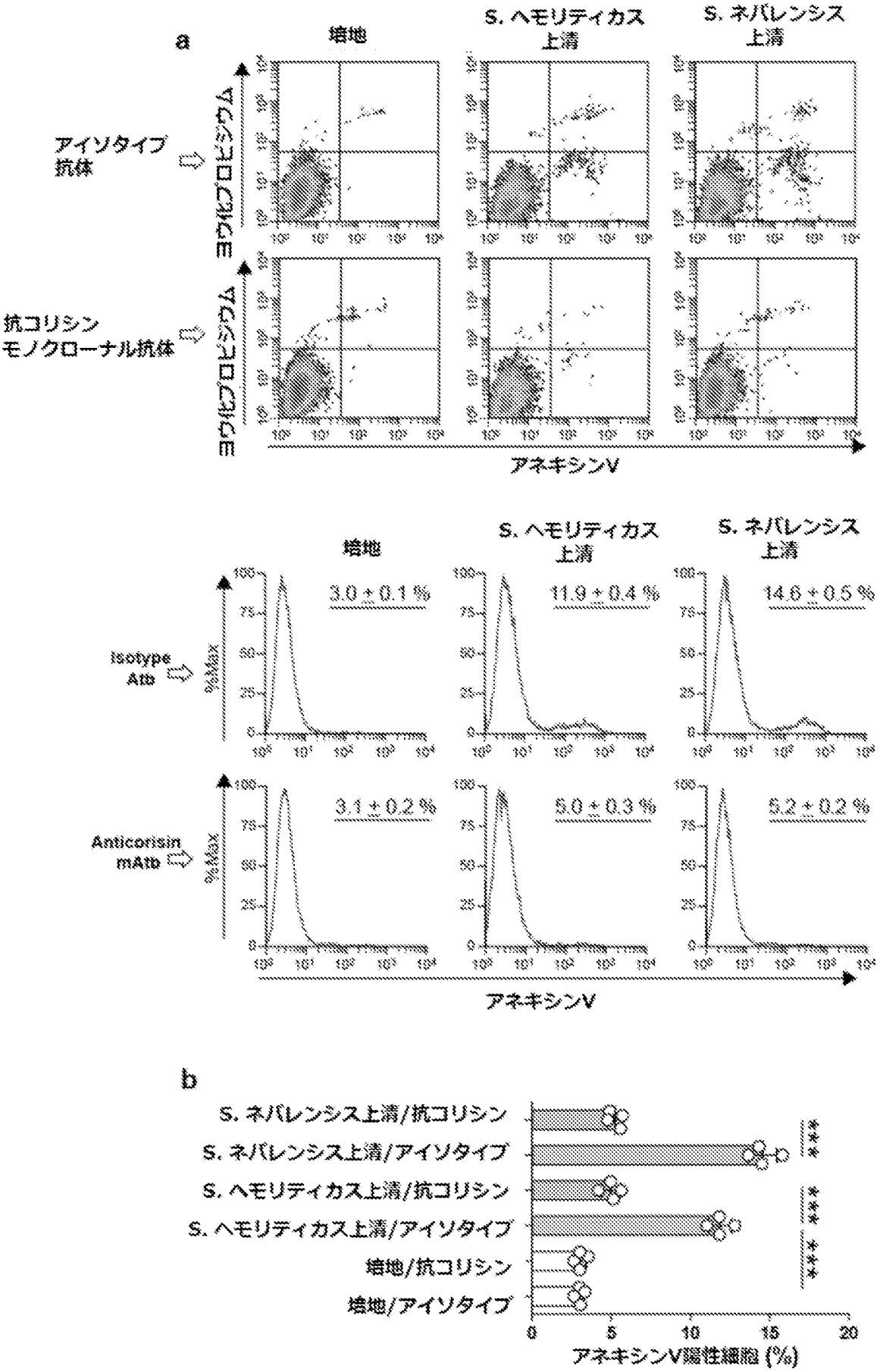
L 鎖 (KF1410-2_VL_pep)：1 文字表記，可変領域配列

MESQTQVLMSLLLWVSGTYGdivmtqipssqavsagekvtmscKSSQSLLYREDTKNYLAwyq
qrpgqspkliyWASTRESgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycQQYYHFPRTfgggtrlelk

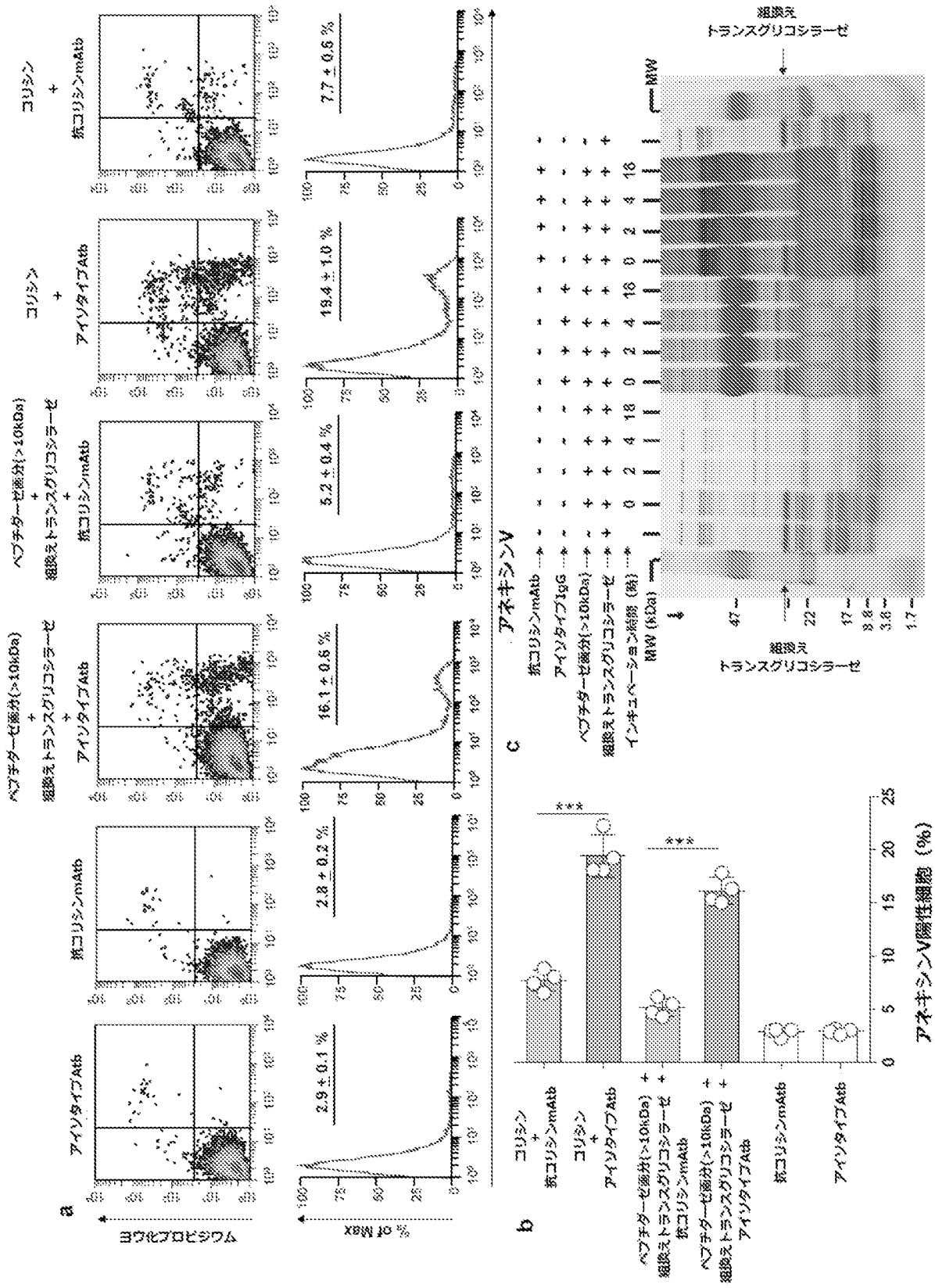
[図14]


a
対照
ウサギ抗血清
クローン2A mAb
クローン9A mAb
クローン21A mAb
ヨウ化プロピジウム
3.2 ± 0.1%
3.3 ± 0.1%
3.7 ± 0.3%
3.6 ± 0.4%
3.4 ± 0.2%
14.9 ± 0.2%
7.3 ± 0.4%
13.6 ± 0.6%
14.9 ± 0.4%
5.4 ± 0.1%
% of Max
アネキシンV+
b
クローン21A
クローン9A
クローン2A
抗コリシン血清
対照
コリシン
スクランブルペプチド
***
0
5
10
15
20
アネキシンV陽性細胞 (%)

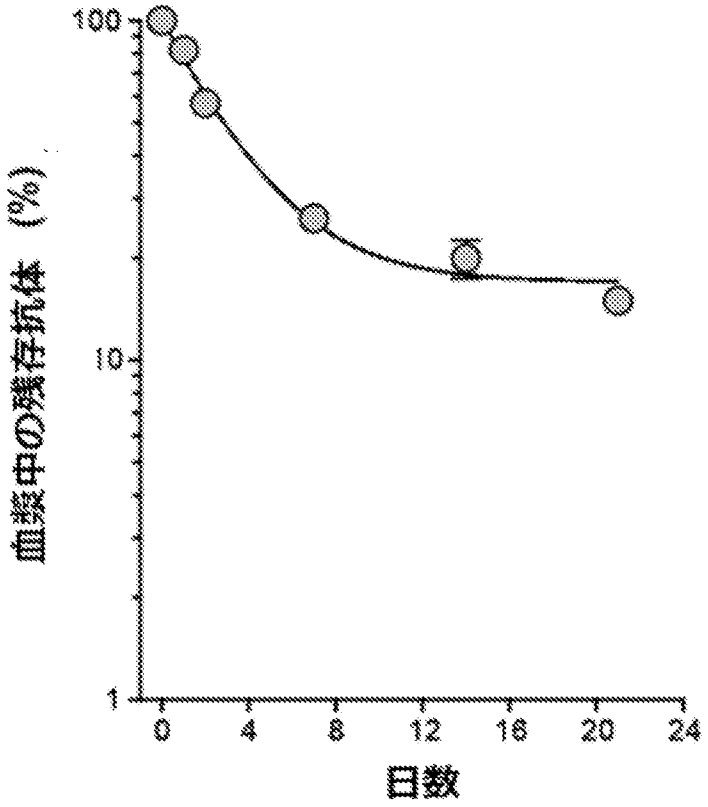
[図15]


a
培地
S. ヘモリティカス 上清
S. ネパレンシス 上清
アイソタイプ 抗体
抗コリシン モノクローナル抗体
マクシロクロシン
アネキシンV
3.0 ± 0.1 %
11.9 ± 0.4 %
14.6 ± 0.5 %
3.1 ± 0.2 %
5.0 ± 0.3 %
5.2 ± 0.2 %
Isotype Atb
Anticorisin mAtb
%Max
b
S. ネパレンシス上清/抗コリシン
S. ネパレンシス上清/アイソタイプ
S. ヘモリティカス上清/抗コリシン
S. ヘモリティカス上清/アイソタイプ
培地/抗コリシン
培地/アイソタイプ
アネキシンV陽性細胞 (%)

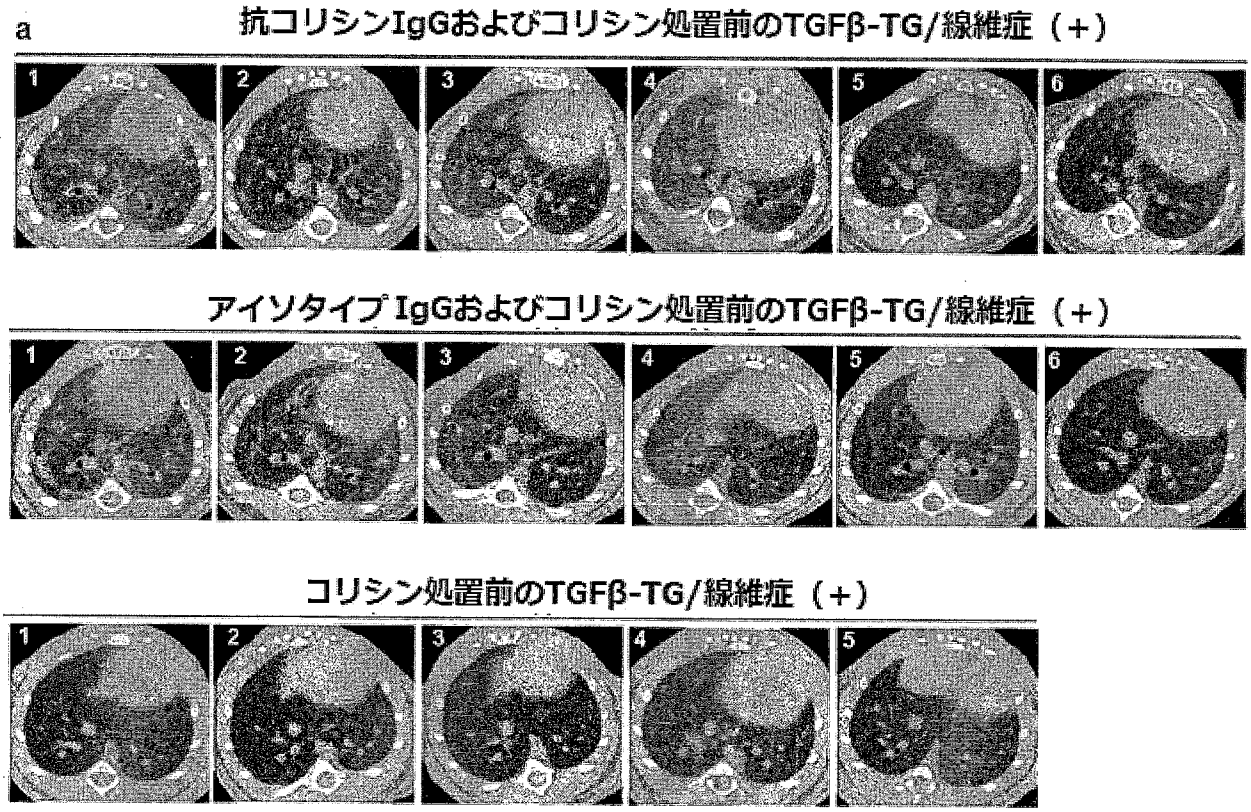
[図16]


a
アイソタイプAtb
抗コリシンmAtb
ヘプチダーゼ画分(>10kDa)
+
組換えトランスグリコシラーゼ
+
アイソタイプAtb
ヘプチダーゼ画分(>10kDa)
+
組換えトランスグリコシラーゼ
+
抗コリシンmAtb
コリシン
+
アイソタイプAtb
コリシン
+
抗コリシンmAtb
2.9 ± 0.1 %
2.8 ± 0.2 %
16.1 ± 0.6 %
5.2 ± 0.4 %
19.4 ± 1.0 %
7.7 ± 0.6 %
% of Max
b
コリシン
+
抗コリシンmAtb
コリシン
+
アイソタイプAtb
ヘプチダーゼ画分(>10kDa) +
組換えトランスグリコシラーゼ +
抗コリシンmAtb
ヘプチダーゼ画分(>10kDa) +
組換えトランスグリコシラーゼ +
アイソタイプAtb
抗コリシンmAtb
アイソタイプAtb
***
***
0
5
10
15
20
25
アネキシンV陽性細胞（%）
c
アネキシンV
抗コリシンmAtb
アイソタイプIgG
ヘプチダーゼ画分(>10kDa)
組換えトランスグリコシラーゼ
インキュベーション時間（時）
MW (kDa)
MW
47
22
17
8.8
3.6
1.7
組換え
トランスグリコシラーゼ
組換え
トランスグリコシラーゼ

[図17]

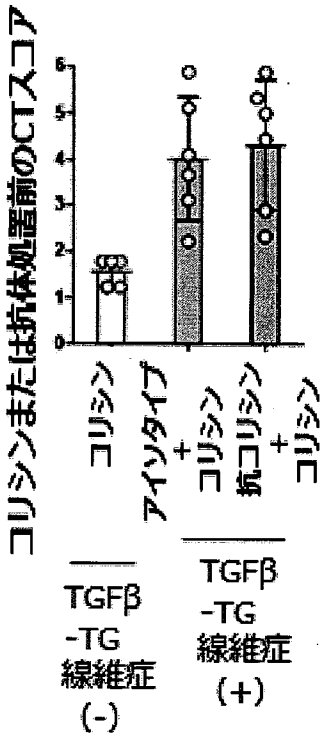


[図１８]

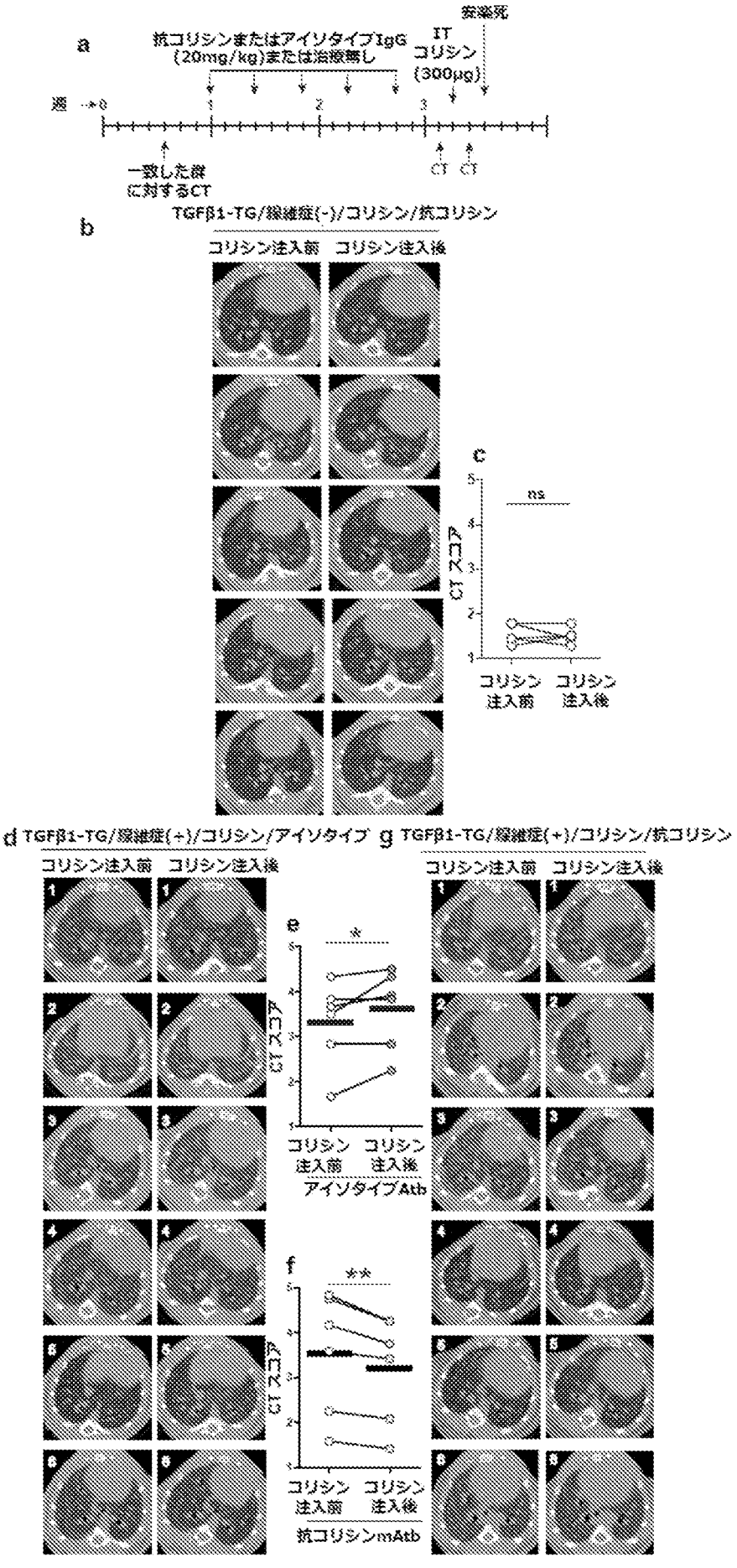

a
抗コリシンIgGおよびコリシン処置前のTGFβ-TG/線維症（+）
1
2
3
4
5
6
アイソタイプIgGおよびコリシン処置前のTGFβ-TG/線維症（+）
1
2
3
4
5
6
コリシン処置前のTGFβ-TG/線維症（+）
1
2
3
4
5

［図１８］の続き

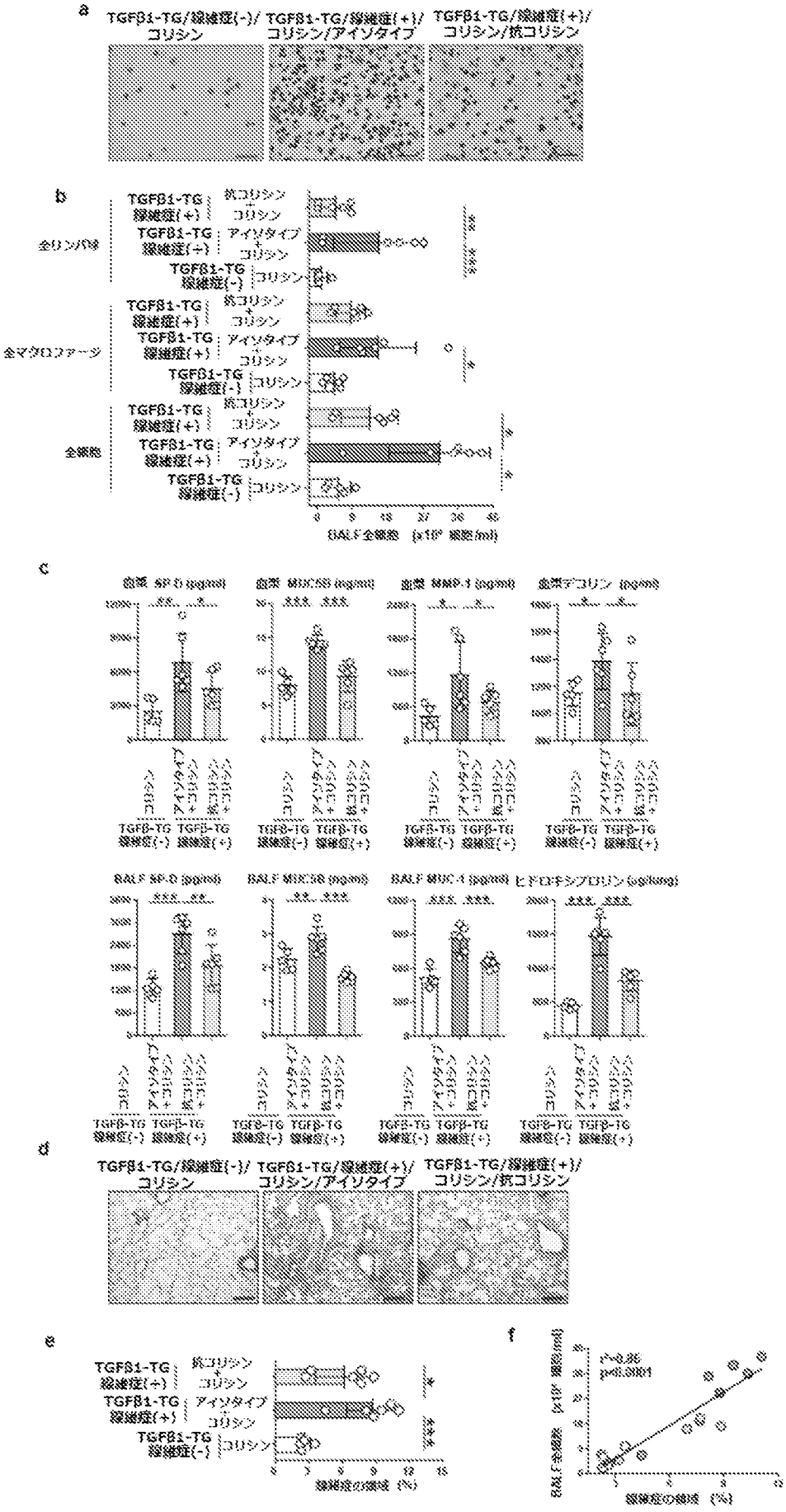
b


コリシンまたは抗体処置前のCTスコア
0
1
2
3
4
5
6
コリシン
アイソタイプ
+
コリシン
抗コリシン
+
コリシン
TGFβ
-TG
線維症
(-)
TGFβ
-TG
線維症
(+)

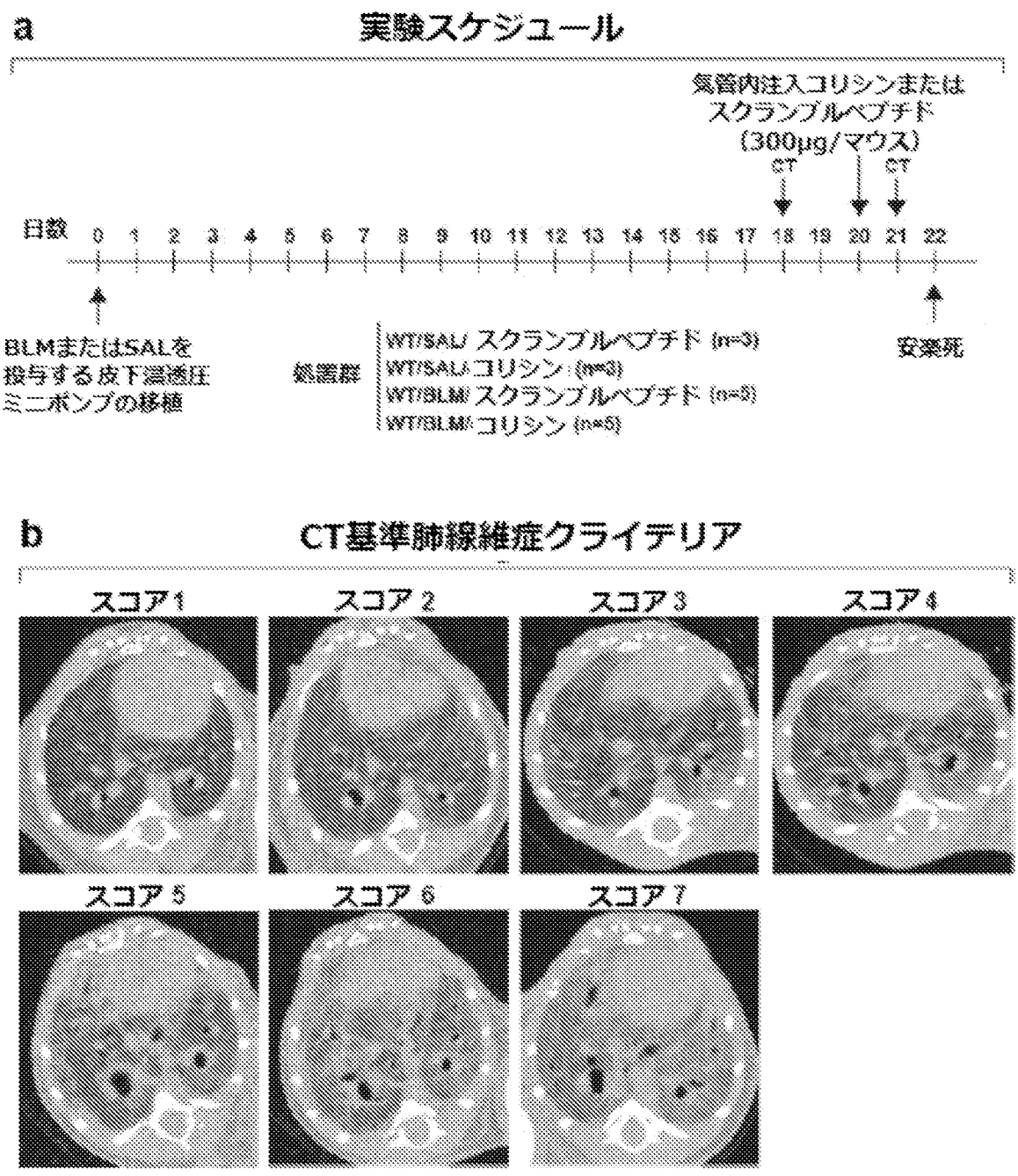
[図19]


a
抗コリシンまたはアイソタイプIgG
(20mg/kg)または治療無し
IT
コリシン
(300μg)
安楽死
週
0
1
2
3
CT
CT
一致した群
に対するCT
b
TGFβ1-TG/線維症(-)/コリシン/抗コリシン
コリシン注入前
コリシン注入後
c
ns
CT スコア
コリシン
注入前
コリシン
注入後
d TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/アイソタイプ
コリシン注入前
コリシン注入後
e
*
CT スコア
コリシン
注入前
コリシン
注入後
アイソタイプAtb
f
**
CT スコア
コリシン
注入前
コリシン
注入後
抗コリシンmAtb
g TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/抗コリシン
コリシン注入前
コリシン注入後

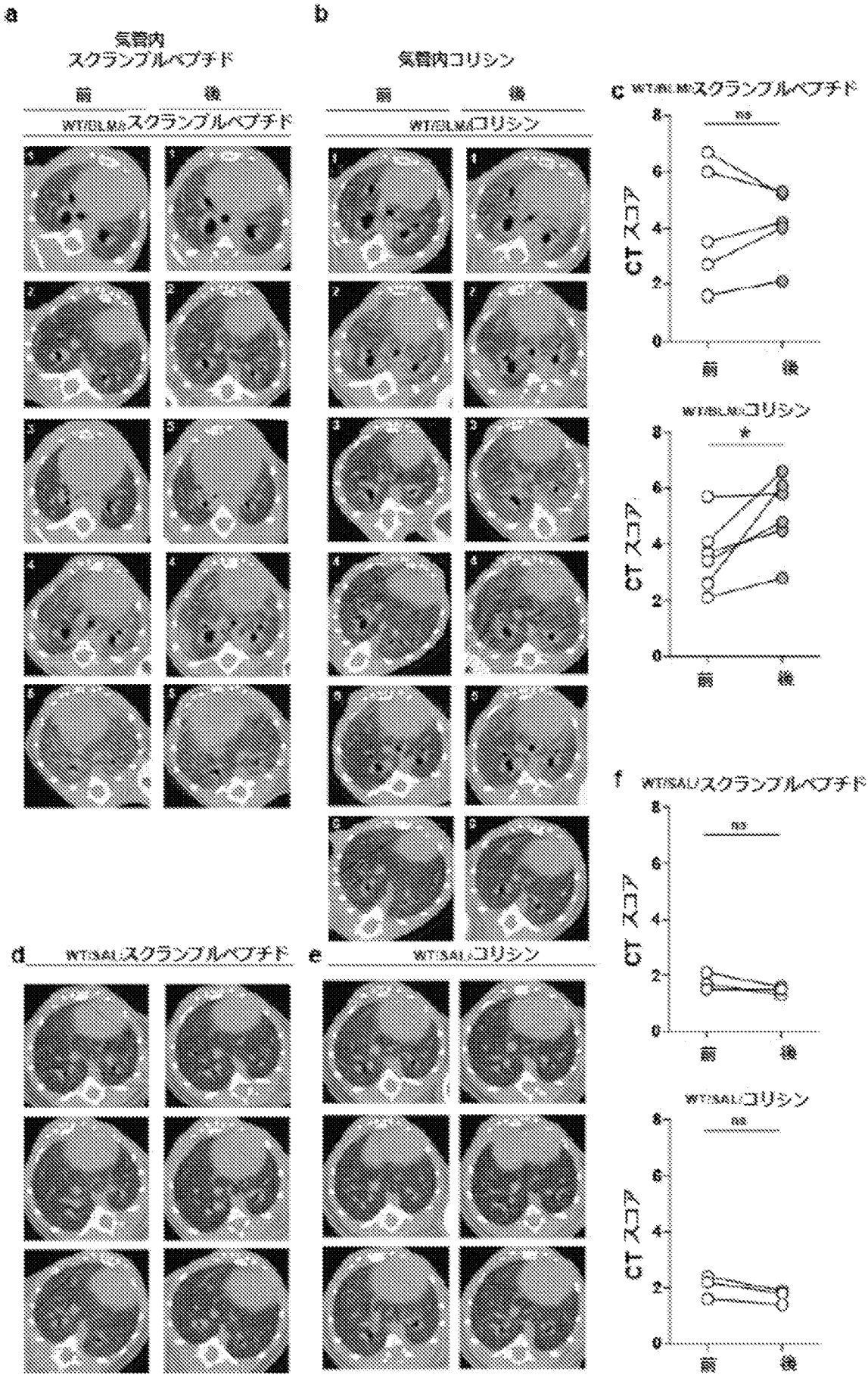
[図20]


a
TGFβ1-TG/線維症(-)/コリシン
TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/アイソタイプ
TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/抗コリシン
b
全リンパ球
全マクロファージ
全顆粒
TGFβ1-TG 線維症(+) 抗コリシン+コリシン
TGFβ1-TG 線維症(+) アイソタイプ+コリシン
TGFβ1-TG 線維症(-) コリシン
BALF全細胞 (x10⁶ 細胞/ml)
c
血清 SP-D (ng/ml)
血清 MUC5B (ng/ml)
血清 MMP-1 (ng/ml)
血清ヒコリン (ng/ml)
BALF SP-D (ng/ml)
BALF MUC5B (ng/ml)
BALF MUC1 (ng/ml)
ヒドロキシプロリン (g/lung)
TGFβ-TG 線維症(-)
TGFβ-TG 線維症(+)
d
TGFβ1-TG/線維症(-)/コリシン
TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/アイソタイプ
TGFβ1-TG/線維症(+)/コリシン/抗コリシン
e
線維症の領域 (%)
f
r=0.86
P<0.0001
BALF全細胞 (x10⁶ 細胞/ml)
線維症の領域 (%)

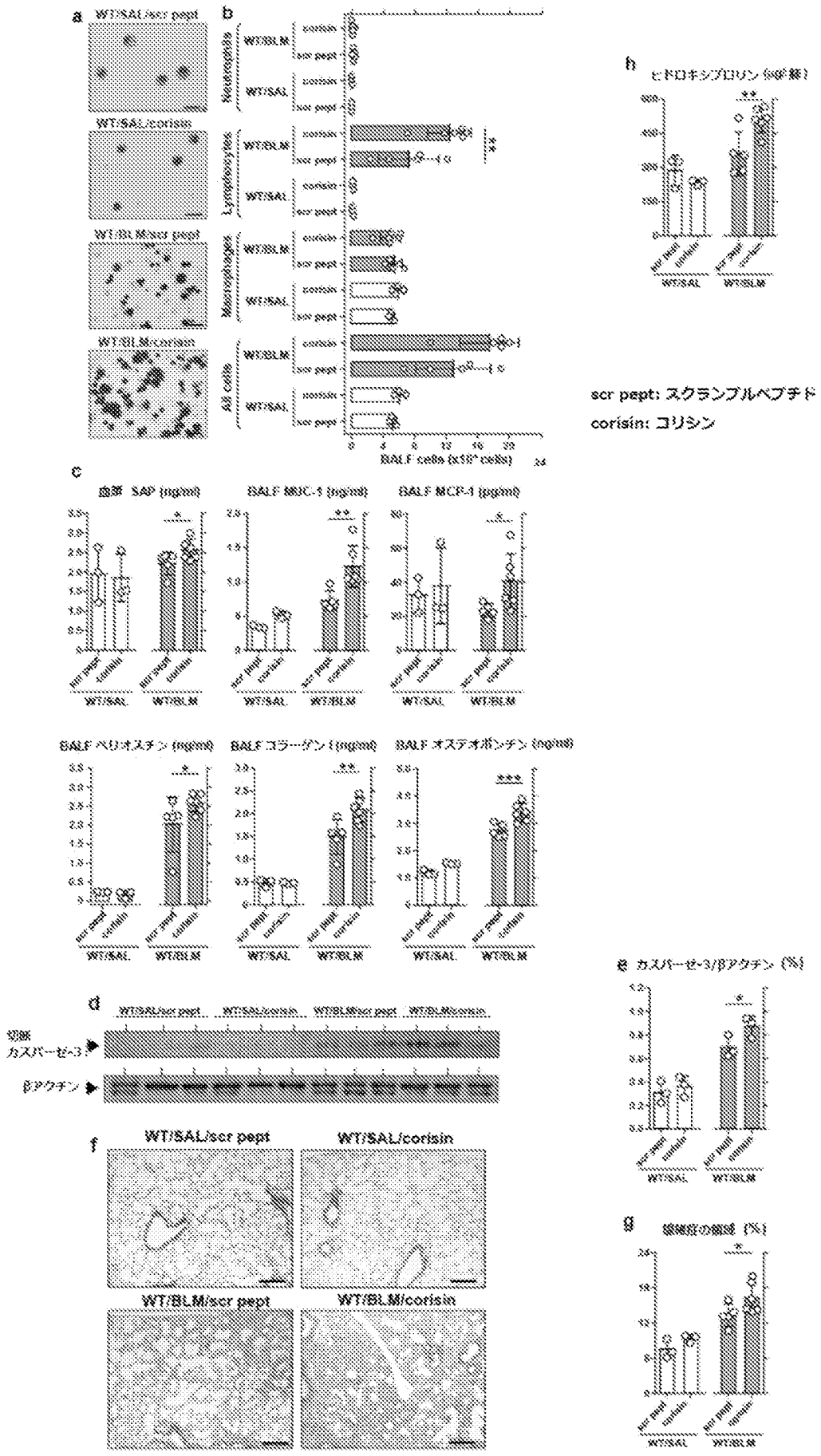
[図21]


a
実験スケジュール
気管内注入コリシンまたは
スクランブルペプチド
(300μg/マウス)
CT
CT
CT
日数
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
BLMまたはSALを
投与する皮下浸透圧
ミニポンプの移植
処置群
WT/SAL/ スクランブルペプチド (n=3)
WT/SAL/ コリシン (n=3)
WT/BLM/ スクランブルペプチド (n=5)
WT/BLM/ コリシン (n=5)
安楽死
b
CT基準肺線維症クライテリア
スコア1
スコア2
スコア3
スコア4
スコア5
スコア6
スコア7

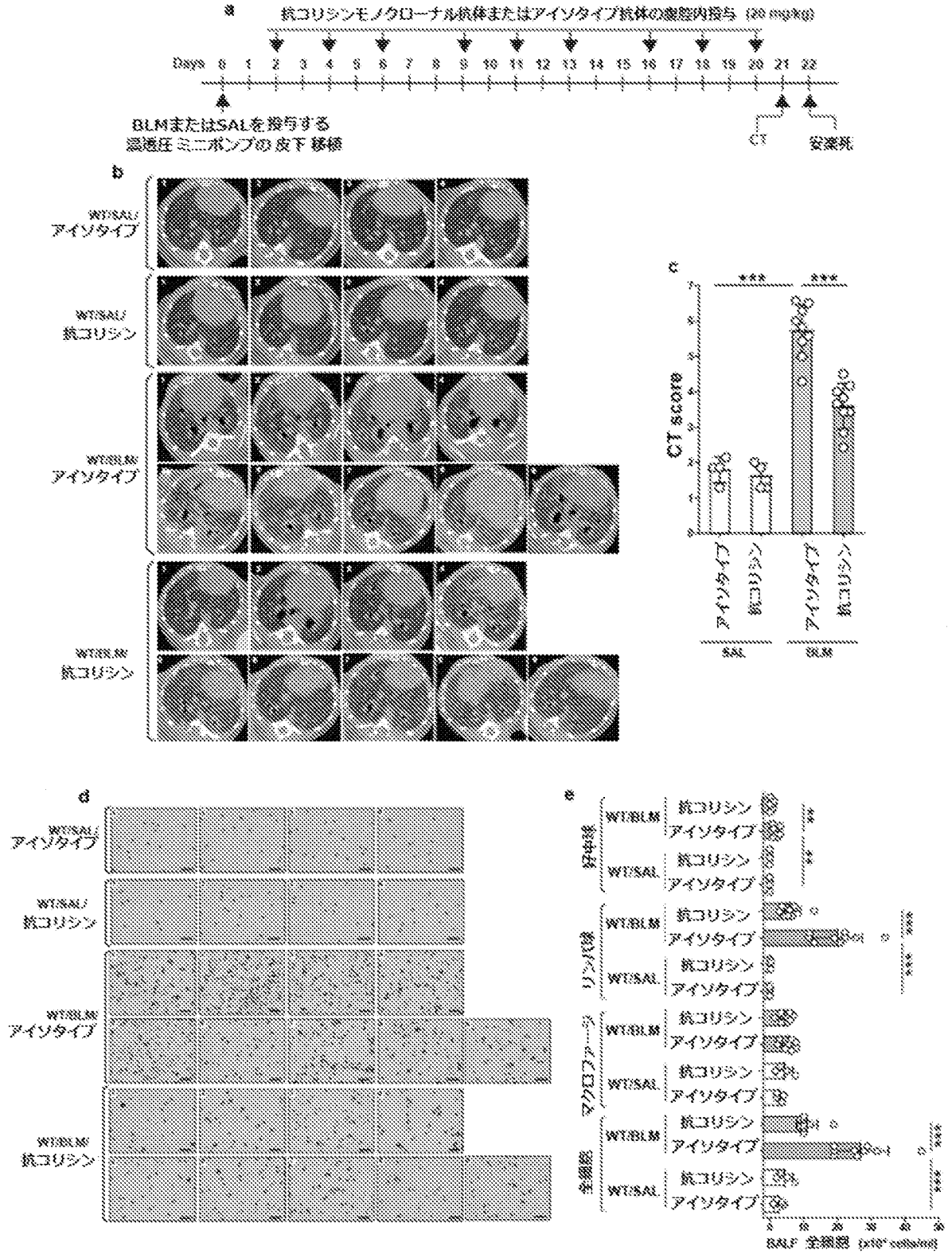
[図22]


a
気管内
スクランブルペプチド
前
後
WT/SLMのスクランブルペプチド
b
気管内コリシン
前
後
WT/SLMのコリシン
c WT/SLMのスクランブルペプチド
ns
CT スコア
前
後
WT/SLMのコリシン
*
CT スコア
前
後
d WT/SALのスクランブルペプチド
e WT/SALのコリシン
f WT/SALのスクランブルペプチド
ns
CT スコア
前
後
WT/SALのコリシン
ns
CT スコア
前
後

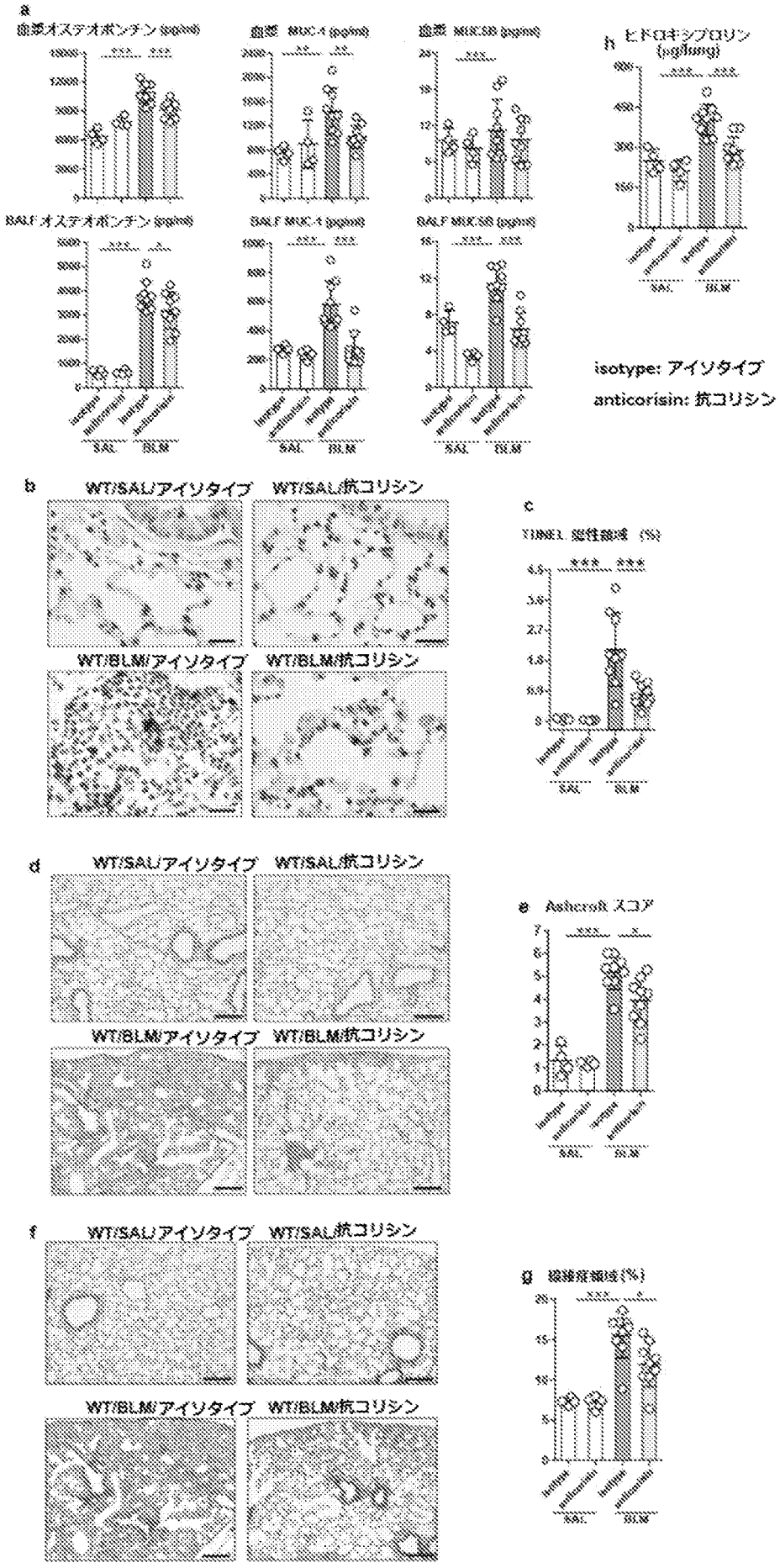
[図23]



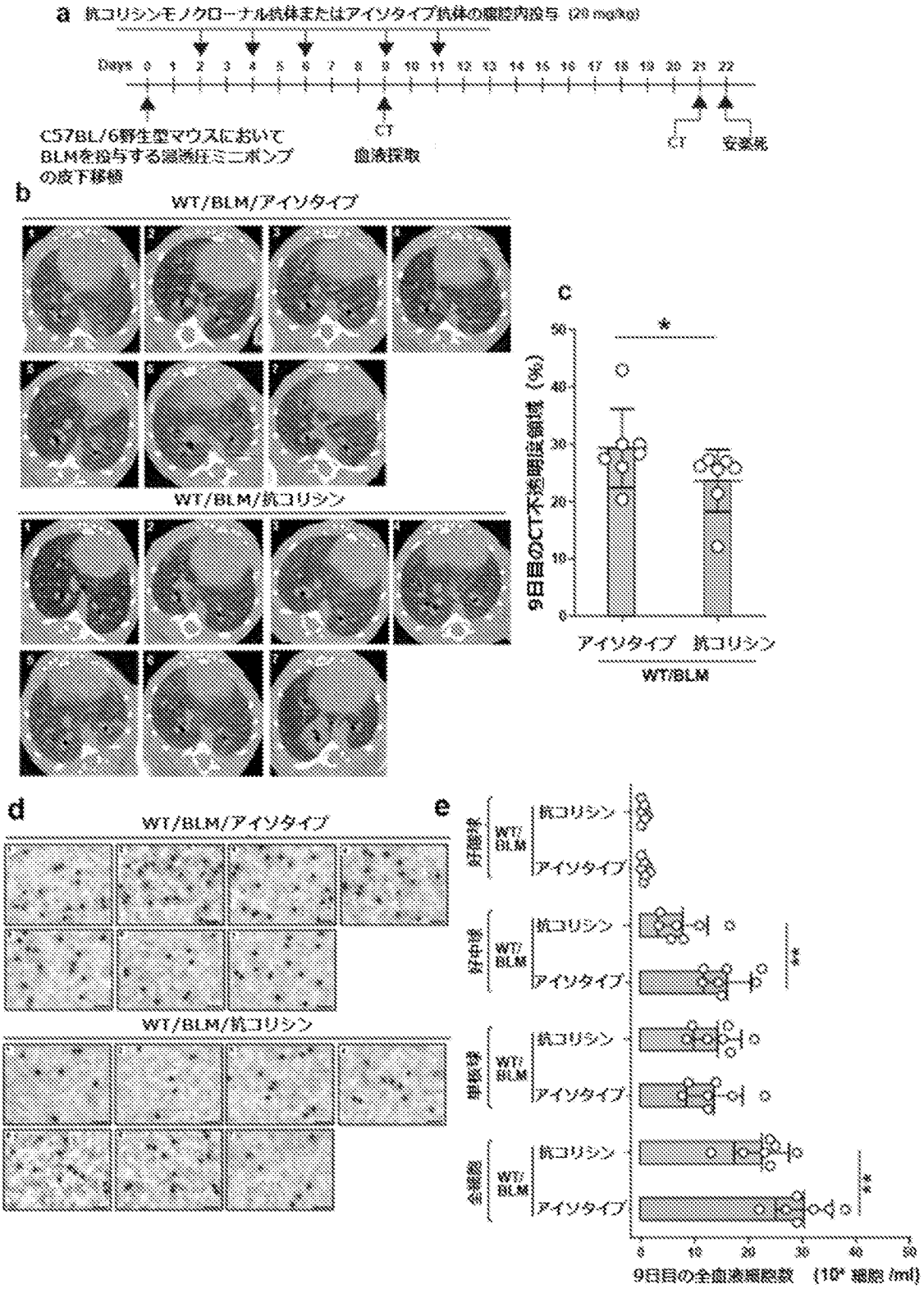
[図24]


a
抗コリシンモノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体の腹腔内投与 (20 mg/kg)
Days
BLMまたはSALを投与する
浸透圧ミニポンプの皮下移植
CT
安楽死
b
WT/SAL/
アイソタイプ
WT/SAL/
抗コリシン
WT/BLM/
アイソタイプ
WT/BLM/
抗コリシン
c
CT score
アイソタイプ
抗コリシン
SAL
BLM
d
e
WT/BLM
WT/SAL
抗コリシン
アイソタイプ
好中球
リンパ球
マクロファージ
全細胞
BALF 全細胞 (x10⁴ cells/ml)

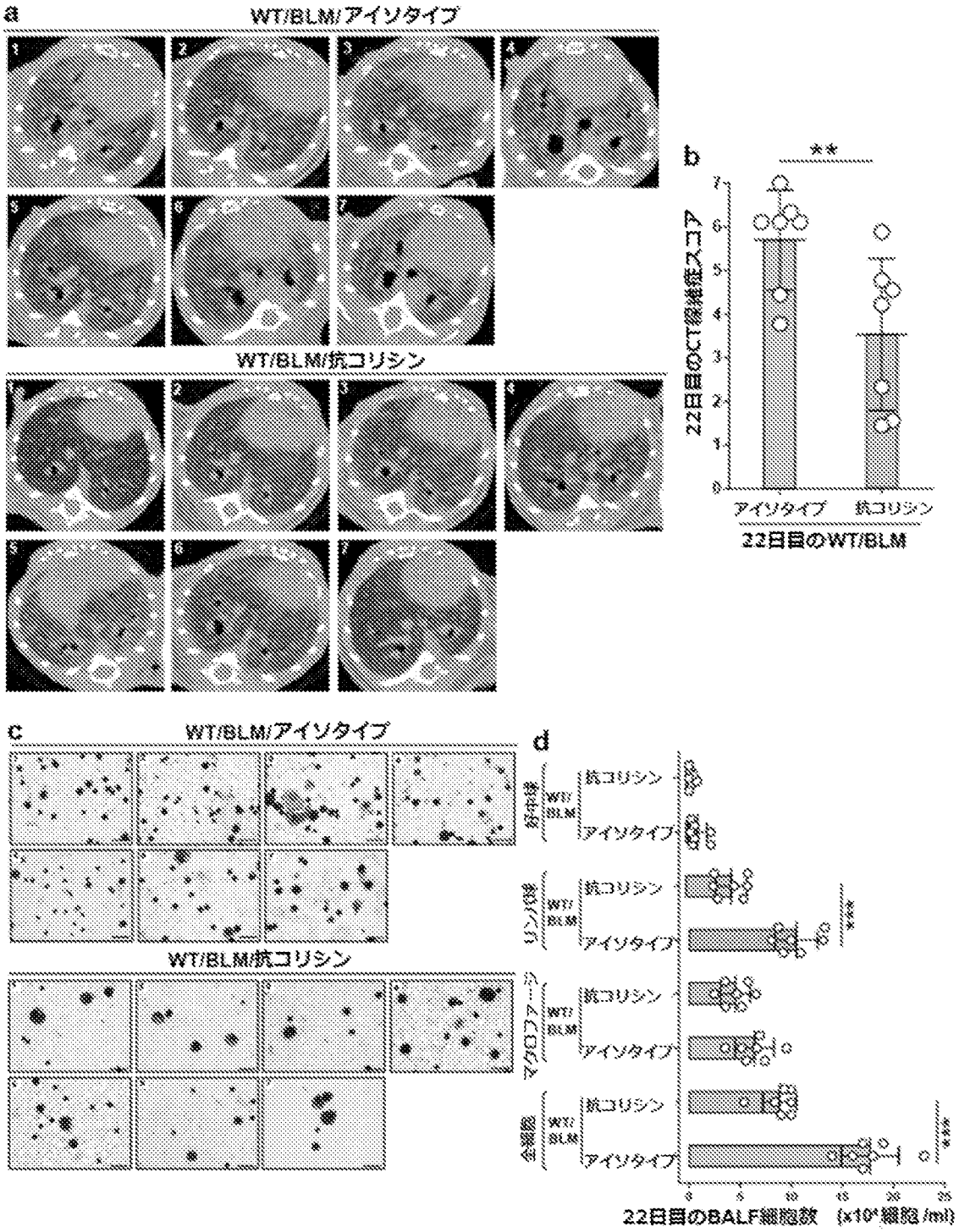
[図25]


a
血漿オステオポンチン (ng/ml)
血漿 MUC1 (pg/ml)
血漿 MUC5B (pg/ml)
ヒドロキシプロリン (μg/lung)
BALF オステオポンチン (ng/ml)
BALF MUC1 (pg/ml)
BALF MUC5B (pg/ml)
isotype: アイソタイプ
anticorisin: 抗コリシン
b
WT/SAL/アイソタイプ
WT/SAL/抗コリシン
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
c
d
e Ashcroft スコア
f
g

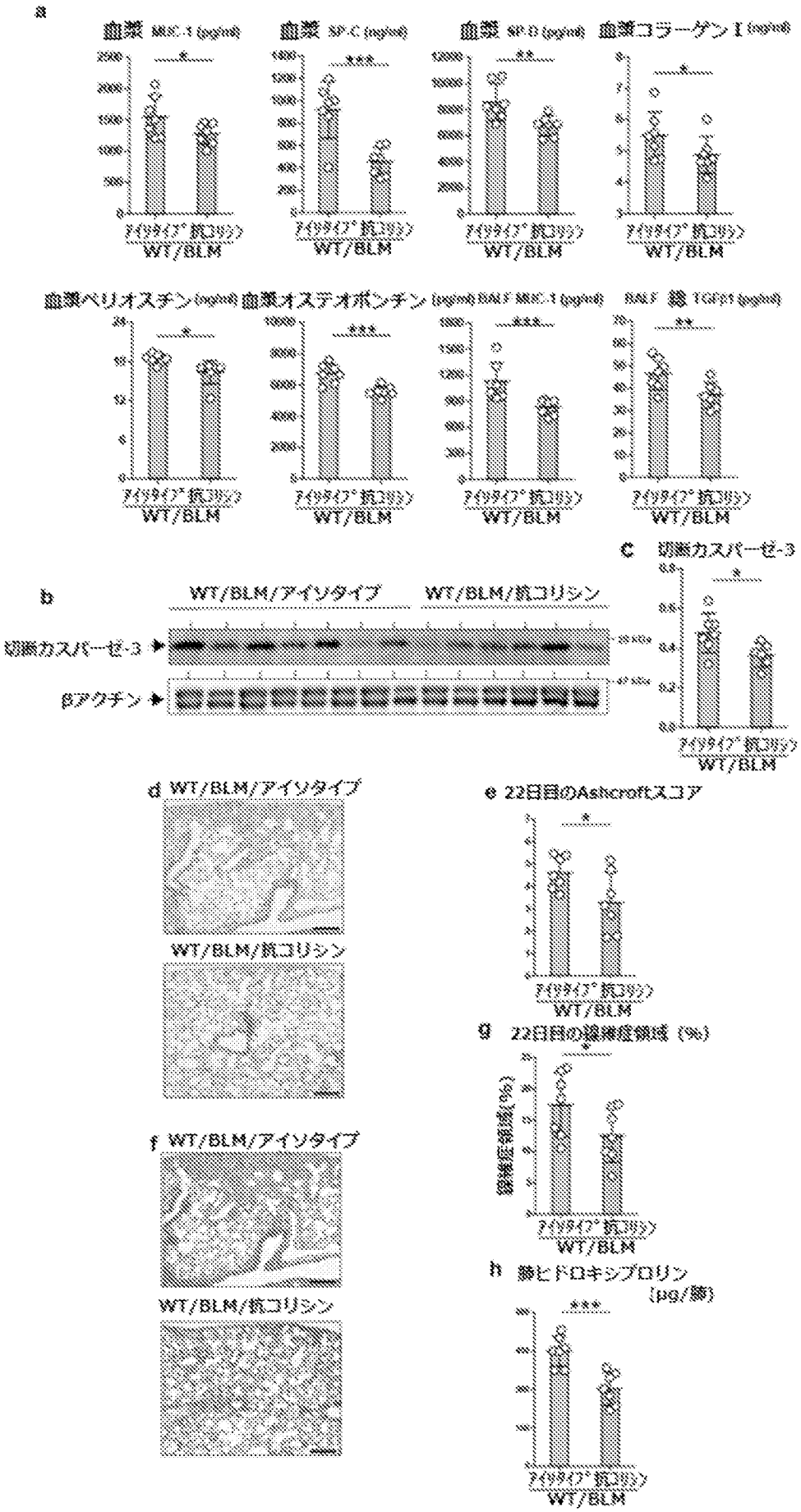
[図26]


a
抗コリシンモノクローナル抗体またはアイソタイプ抗体の腹腔内投与 (20 mg/kg)
Days 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
C57BL/6野生型マウスにおいて
BLMを投与する浸透圧ミニポンプ
の皮下移植
CT
血液採取
CT
安楽死
b
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
c
9日目のCT不透明陰影領域 (%)
アイソタイプ
抗コリシン
WT/BLM
d
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
e
好酸球
好中球
単核球
全細胞
WT/BLM
抗コリシン
アイソタイプ
9日目の全血液細胞数 (10⁴ 細胞 /ml)

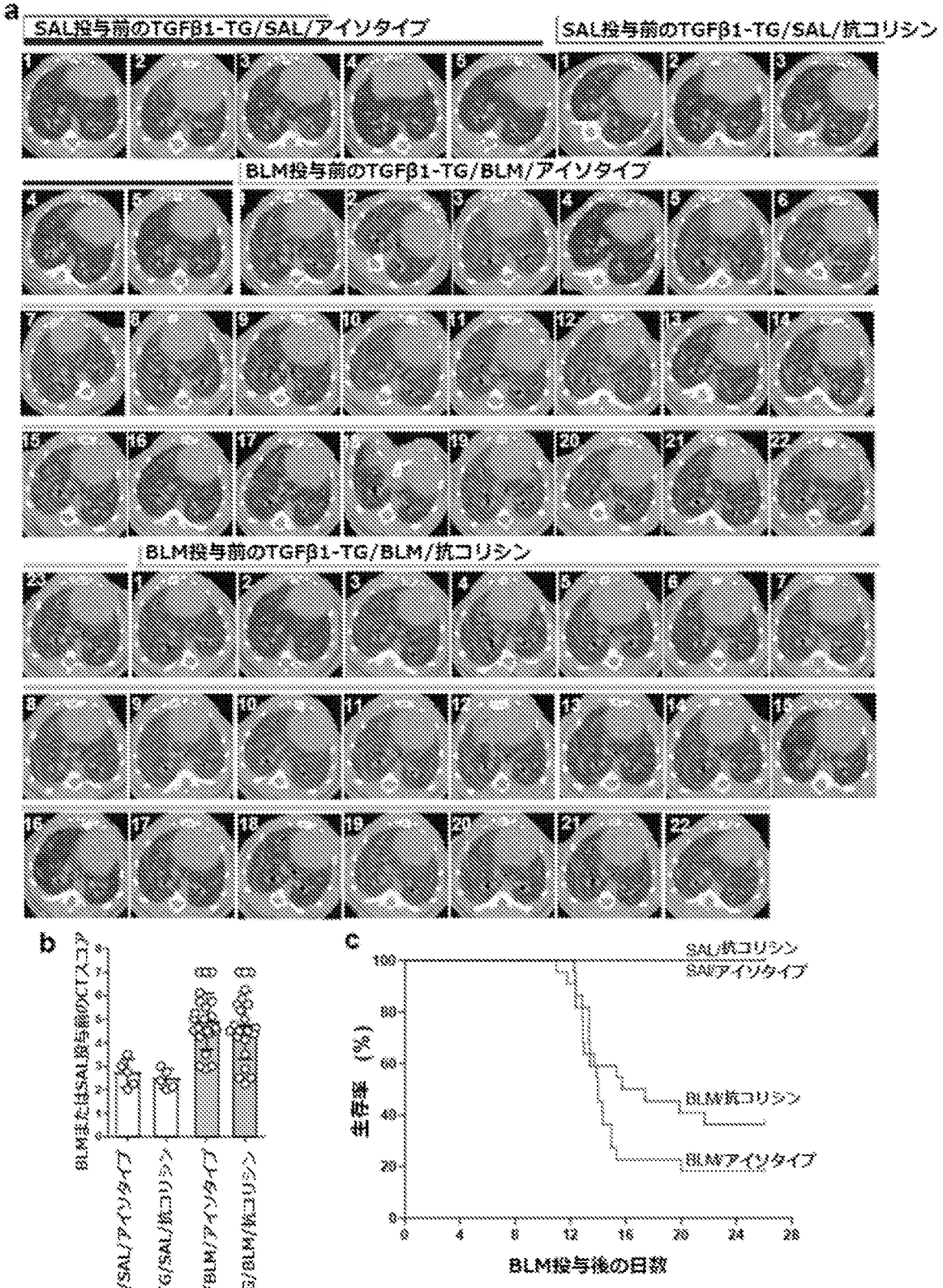
[図27]


a
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
b
**
22日目のCT線維症スコア
アイソタイプ
抗コリシン
22日目のWT/BLM
c
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
d
好中球
リンパ球
マクロファージ
総細胞
WT/BLM
抗コリシン
アイソタイプ
***
22日目のBALF細胞数 (x10⁴細胞/ml)

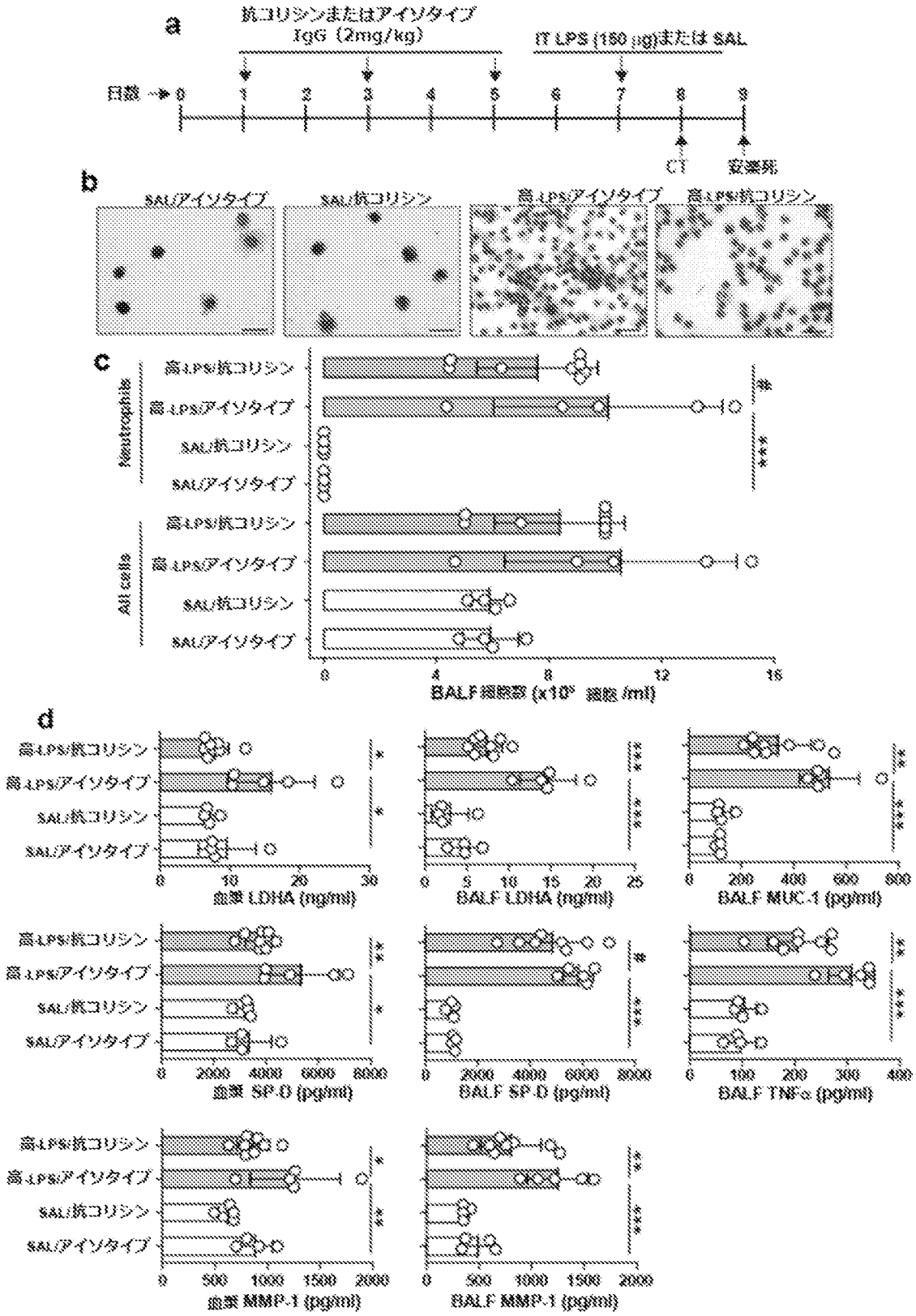
[図28]


a
血漿 KL-6 (ng/ml)
血漿 SP-C (ng/ml)
血漿 SP-D (ng/ml)
血漿コラーゲンI (ng/ml)
血漿ペリオスチン (ng/ml)
血漿オステオポンチン (ng/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
BALF 総 TGF-β1 (pg/ml)
アイソタイプ抗コリシン
WT/BLM
b
WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
切断カスパーゼ-3
βアクチン
c 切断カスパーゼ-3
d WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
e 22日目のAshcroftスコア
f WT/BLM/アイソタイプ
WT/BLM/抗コリシン
g 22日目の線維化領域 (%)
線維化領域(%)
h 肺ヒドロキシプロリン
(μg/肺)

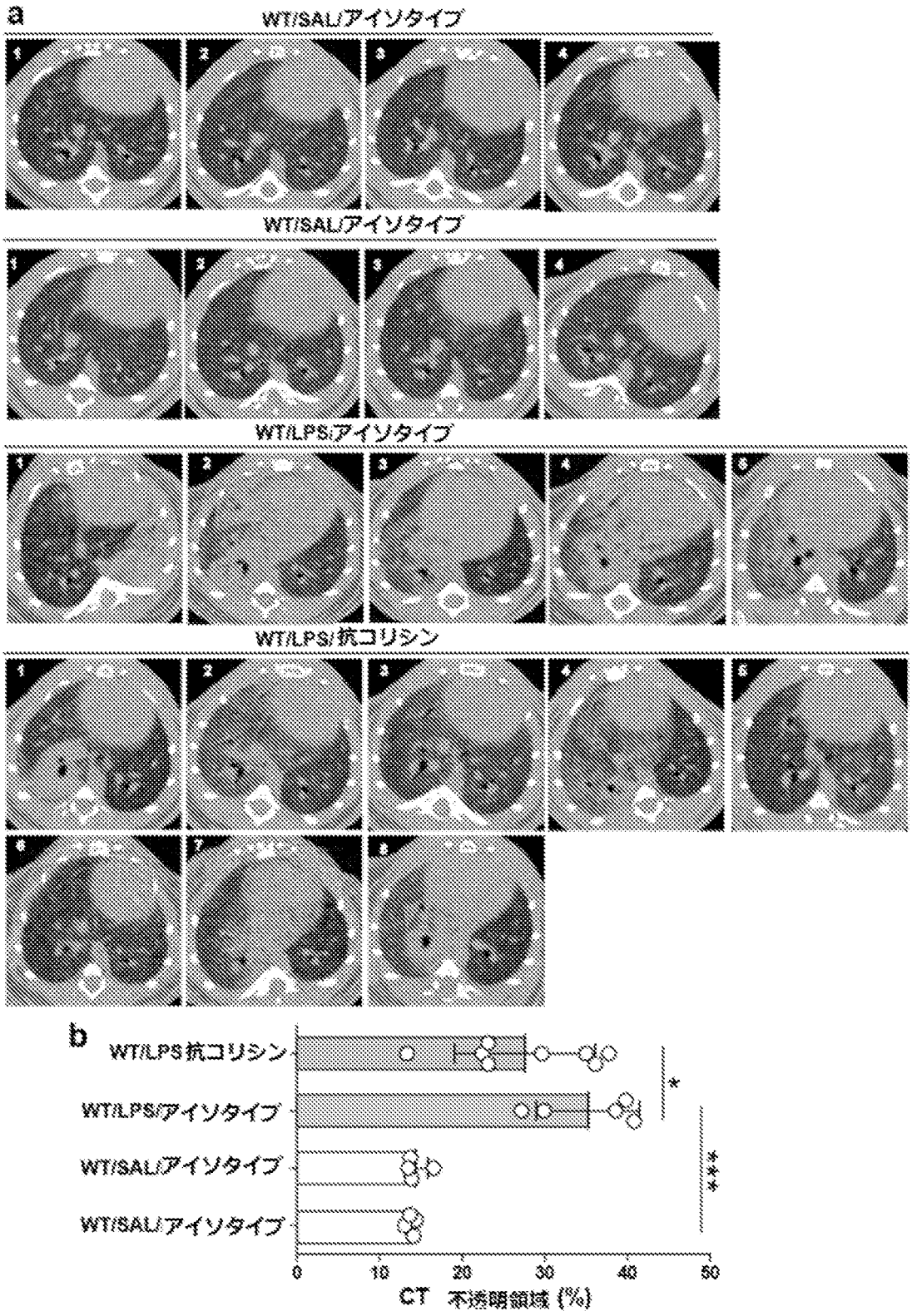
[図29]


a
SAL投与前のTGFβ1-TG/SAL/アイソタイプ
SAL投与前のTGFβ1-TG/SAL/抗コリシン
BLM投与前のTGFβ1-TG/BLM/アイソタイプ
BLM投与前のTGFβ1-TG/BLM/抗コリシン
b
BLMまたはSAL投与前のCTスコア
TGFβ1-TG/SAL/アイソタイプ
TGFβ1-TG/SAL/抗コリシン
TGFβ1-TG/BLM/アイソタイプ
TGFβ1-TG/BLM/抗コリシン
c
生存率（%）
SAL/抗コリシン
SAL/アイソタイプ
BLM/抗コリシン
BLM/アイソタイプ
BLM投与後の日数

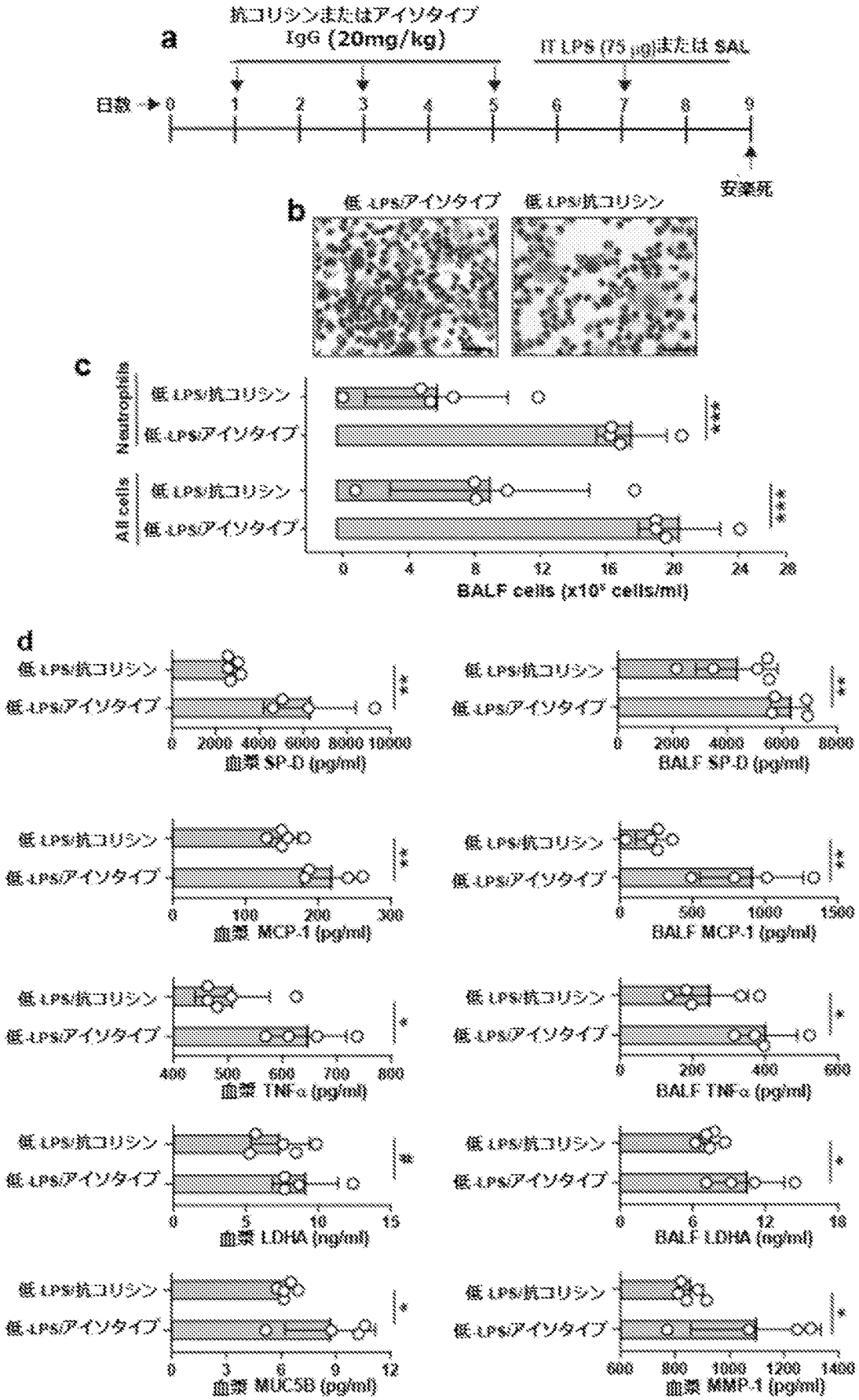
[図30]


a
抗コリシンまたはアイソタイプ
IgG (2mg/kg)
IT LPS (180 μg)または SAL
日数
CT
安楽死
b
SAL/アイソタイプ
SAL/抗コリシン
高LPS/アイソタイプ
高LPS/抗コリシン
c
Neutrophils
All cells
高LPS/抗コリシン
高LPS/アイソタイプ
SAL/抗コリシン
SAL/アイソタイプ
BALF 細胞数 (x10⁶ 細胞 /ml)
d
血漿 LDHA (ng/ml)
BALF LDHA (ng/ml)
BALF MUC-1 (pg/ml)
血漿 SP-D (pg/ml)
BALF SP-D (pg/ml)
BALF TNFα (pg/ml)
血漿 MMP-1 (pg/ml)
BALF MMP-1 (pg/ml)

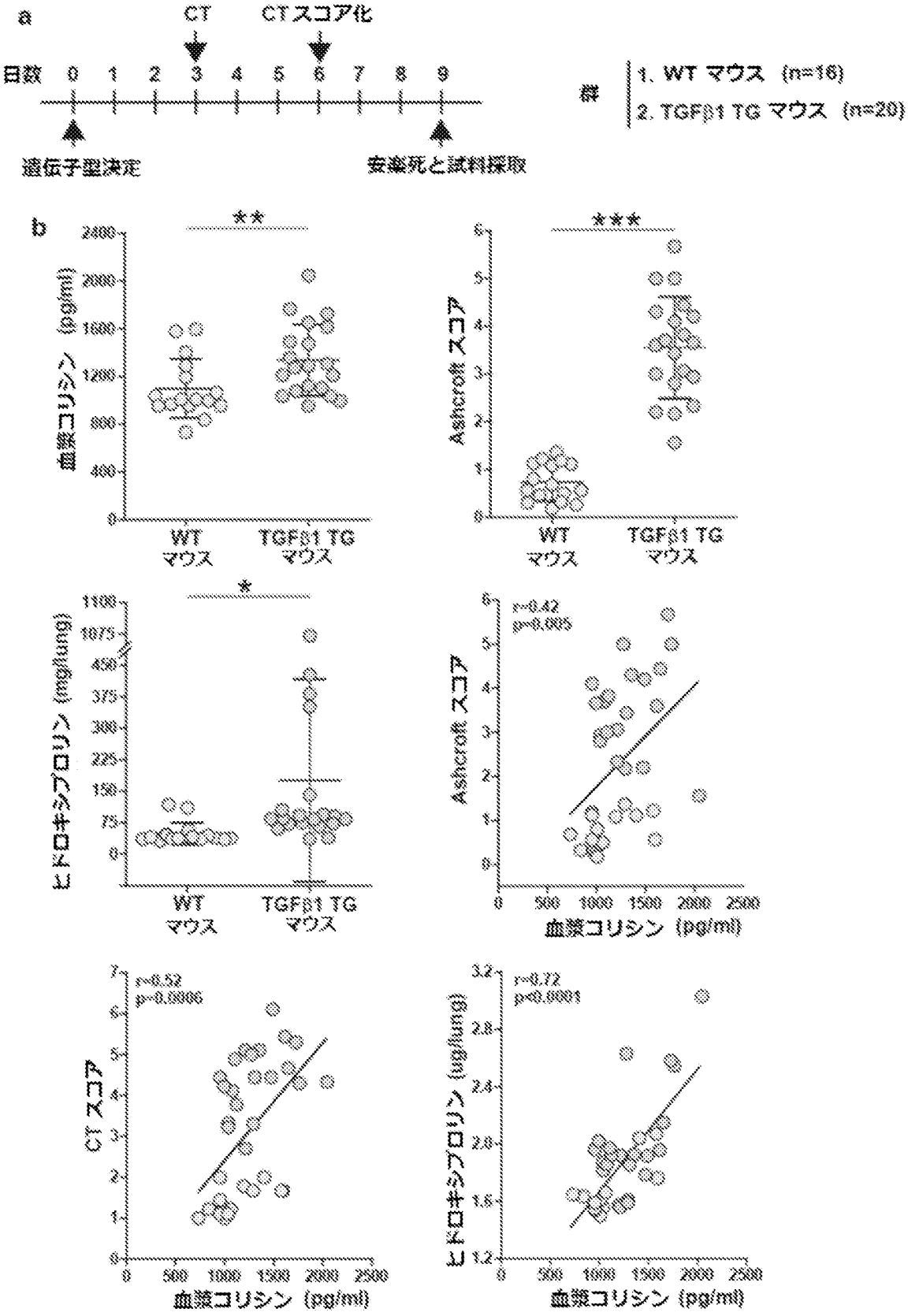
[図31]


a
WT/SAL/アイソタイプ
WT/SAL/アイソタイプ
WT/LPS/アイソタイプ
WT/LPS/抗コリシン
b
WT/LPS抗コリシン
WT/LPS/アイソタイプ
WT/SAL/アイソタイプ
WT/SAL/アイソタイプ
*
***
0
10
20
30
40
50
CT 不透明領域 (%)

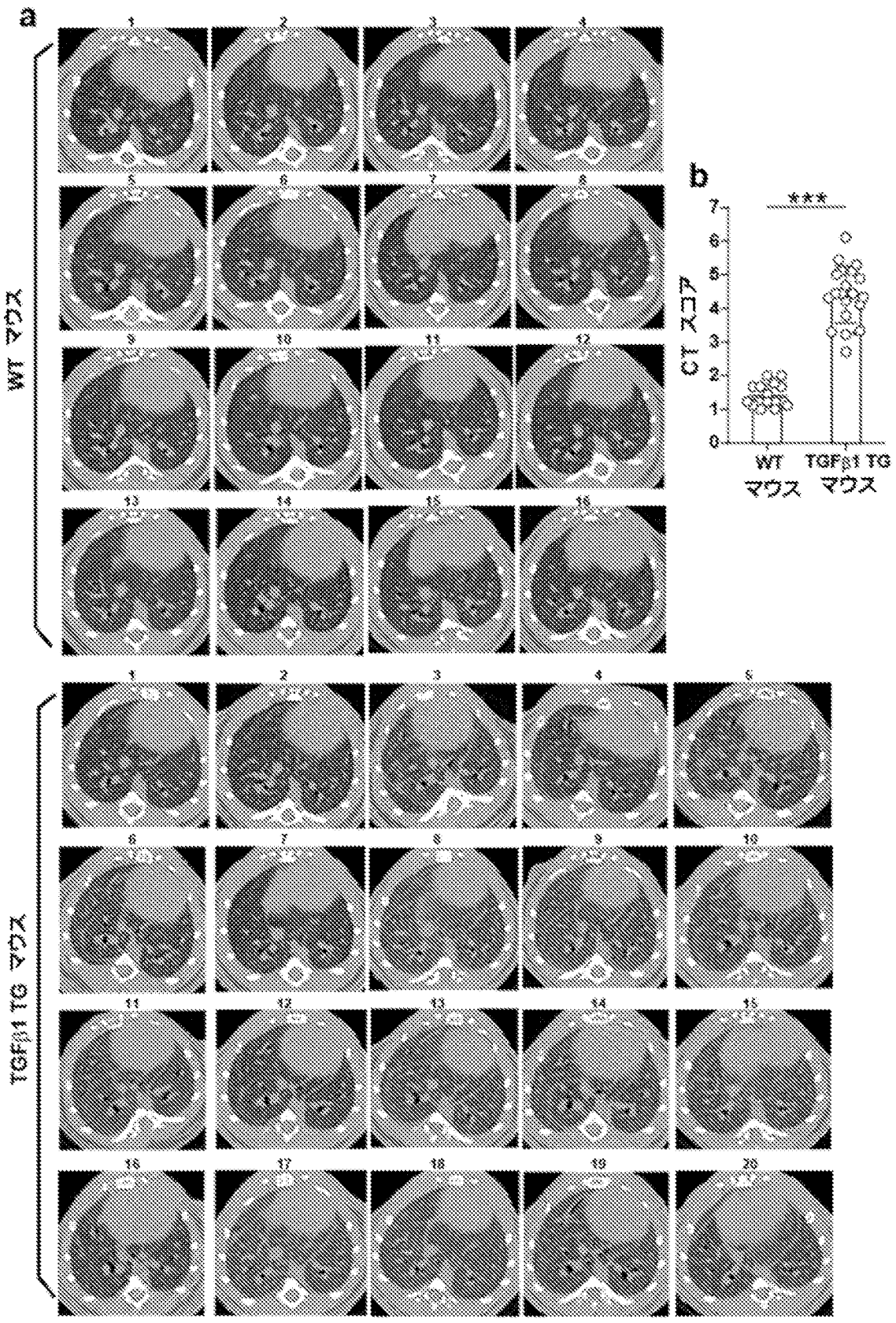
[図32]


a
抗コリシンまたはアイソタイプ
IgG (20mg/kg)
IT LPS (75 μg)または SAL
日数
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
安楽死
b
低 LPS/アイソタイプ
低 LPS/抗コリシン
c
Neutrophils
All cells
低 LPS/抗コリシン
低 LPS/アイソタイプ
0 4 8 12 16 20 24 28
BALF cells (x10⁶ cells/ml)
d
血漿 SP-D (pg/ml)
BALF SP-D (pg/ml)
血漿 MCP-1 (pg/ml)
BALF MCP-1 (pg/ml)
血漿 TNF-α (pg/ml)
BALF TNF-α (pg/ml)
血漿 LDHA (ng/ml)
BALF LDHA (ng/ml)
血漿 MUC5B (pg/ml)
血漿 MMP-1 (pg/ml)

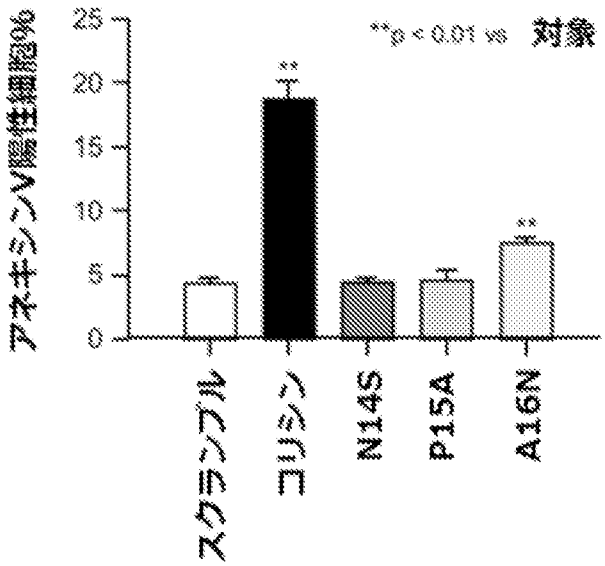
[図33]


a
CT
CTスコア化
日数 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
群
1. WTマウス (n=16)
2. TGFβ1 TGマウス (n=20)
遺伝子型決定
安楽死と試料採取
b
**
***
*
血漿コリシン (pg/ml)
Ashcroft スコア
ヒドロキシプロリン (μg/μmg)
CT スコア
WT マウス
TGFβ1 TG マウス
r=0.42
p=0.005
r=0.52
p=0.0006
r=0.72
p<0.0001

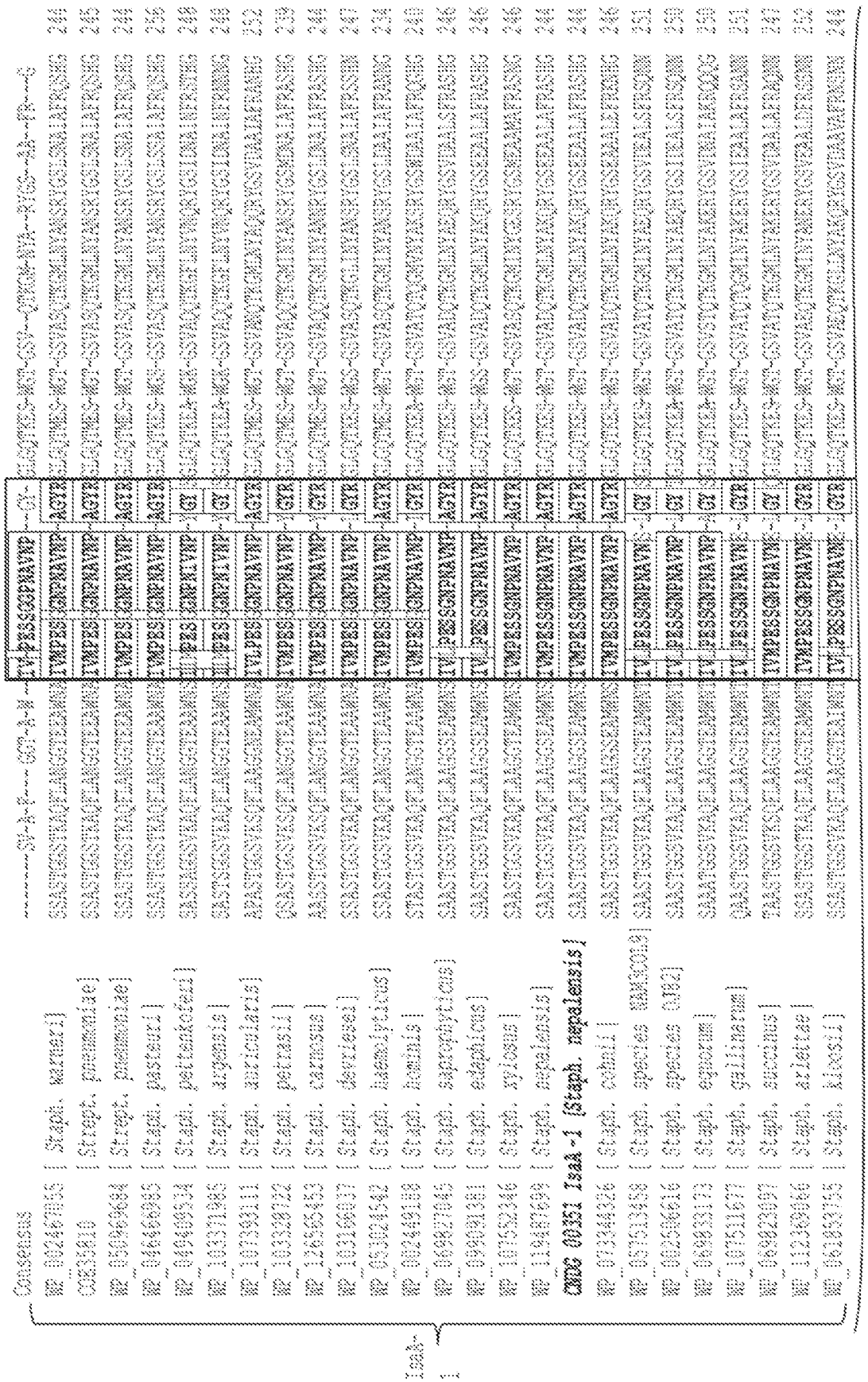
[図34]



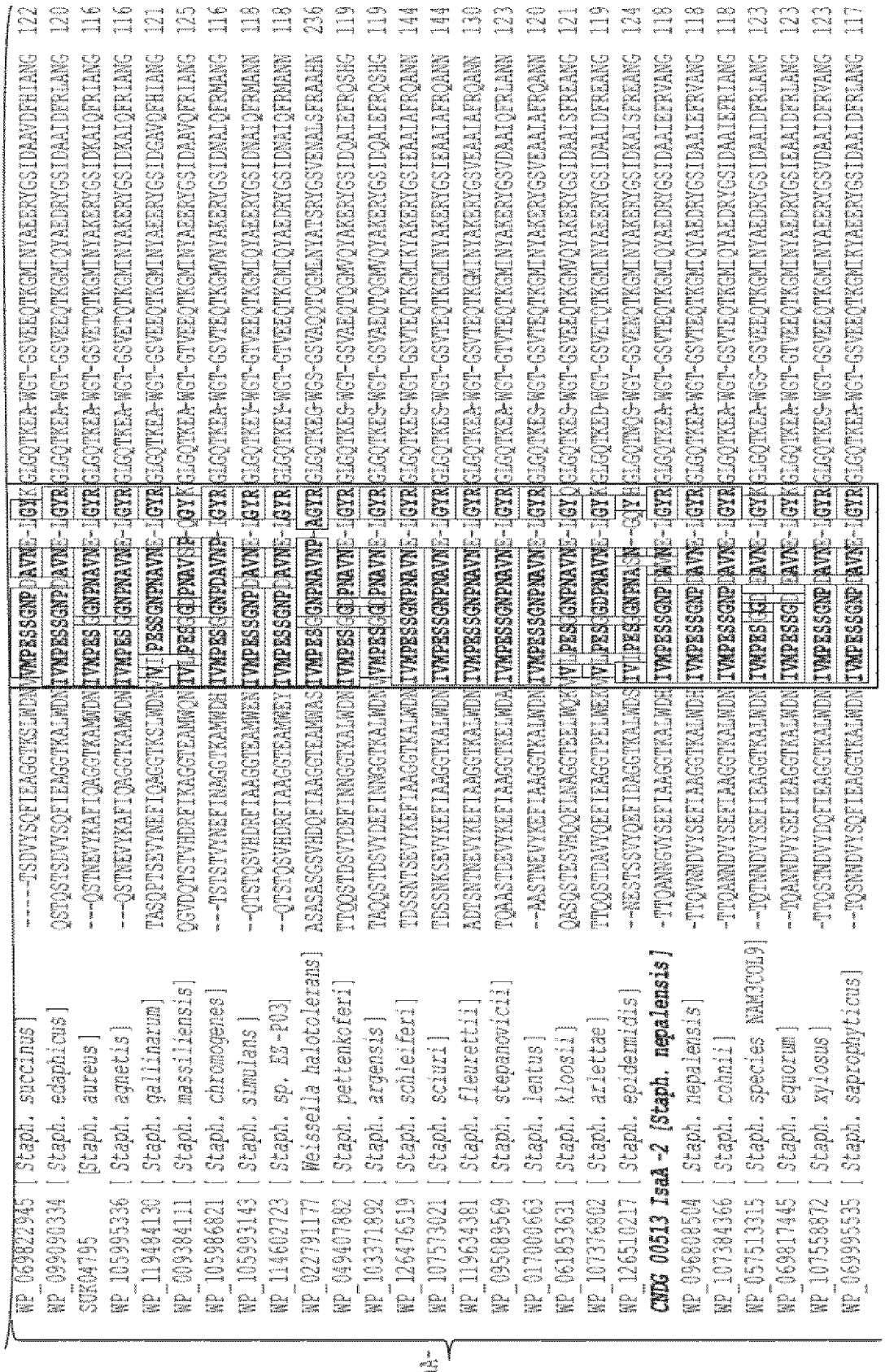
[図35]


アネキシンV陽性細胞(%)
25
20
15
10
5
0
**p < 0.01 vs 対象
**
**
**
アクラシンブル
コリシン
N14S
P15A
A16N

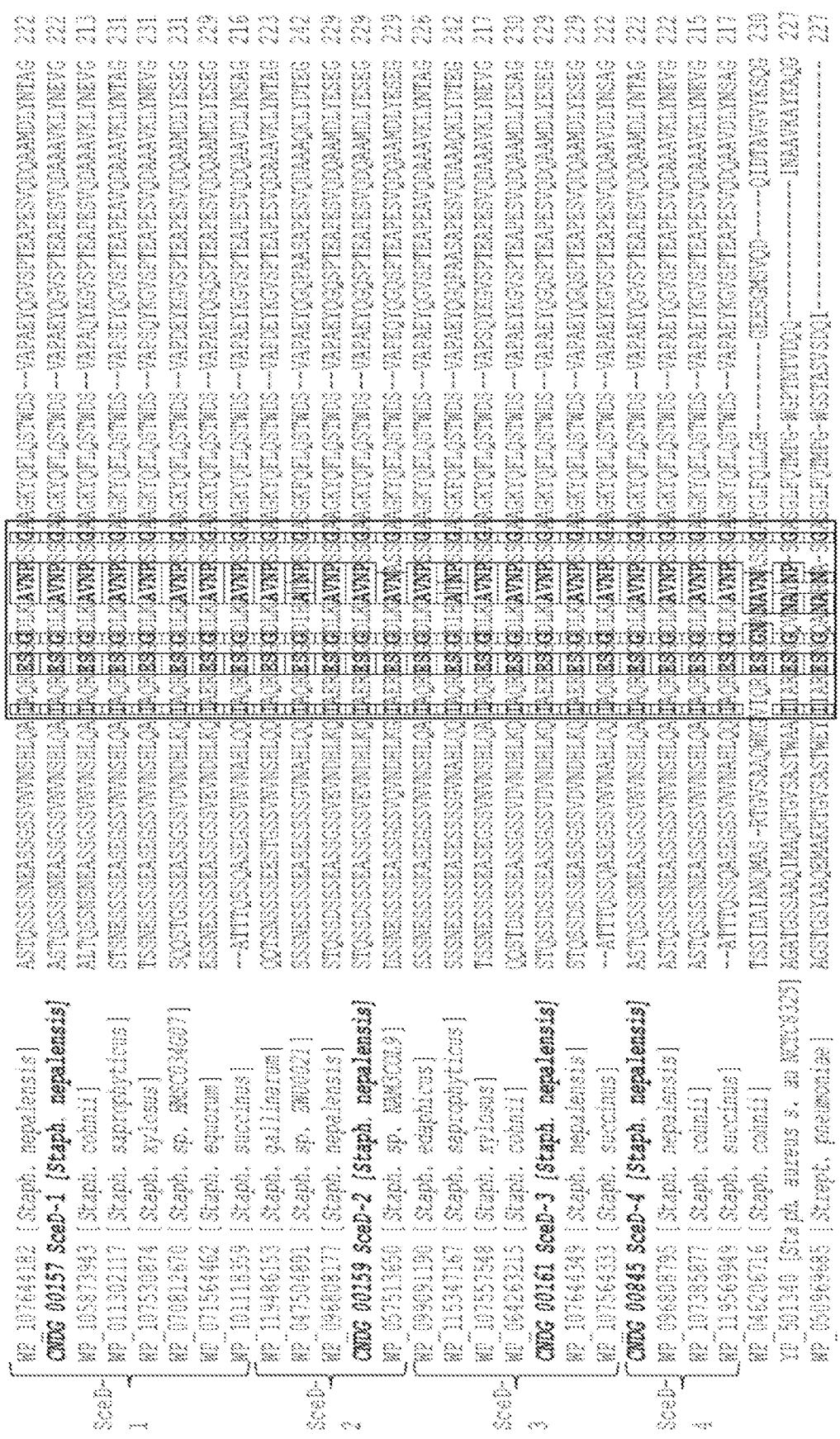
[図36]



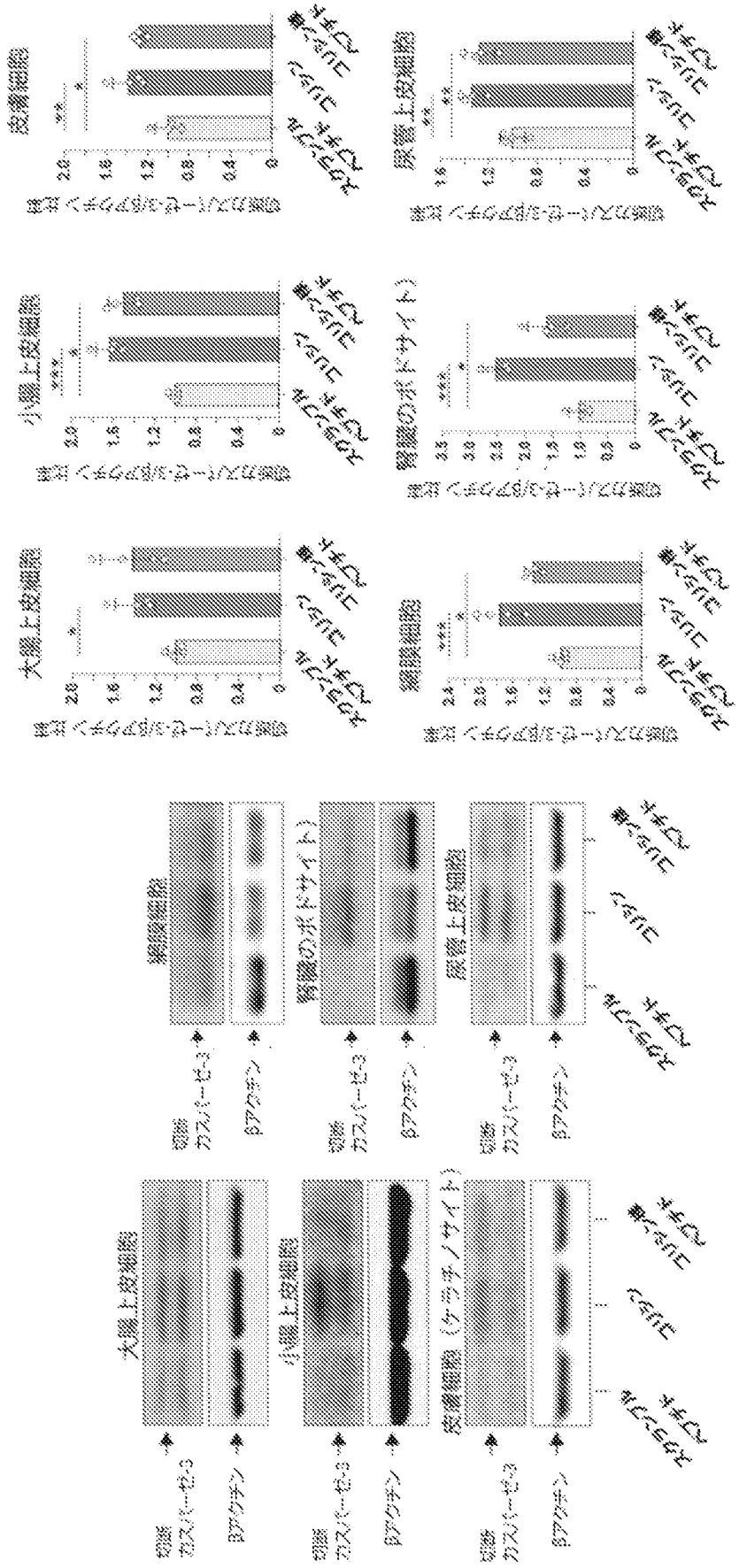
[図37]



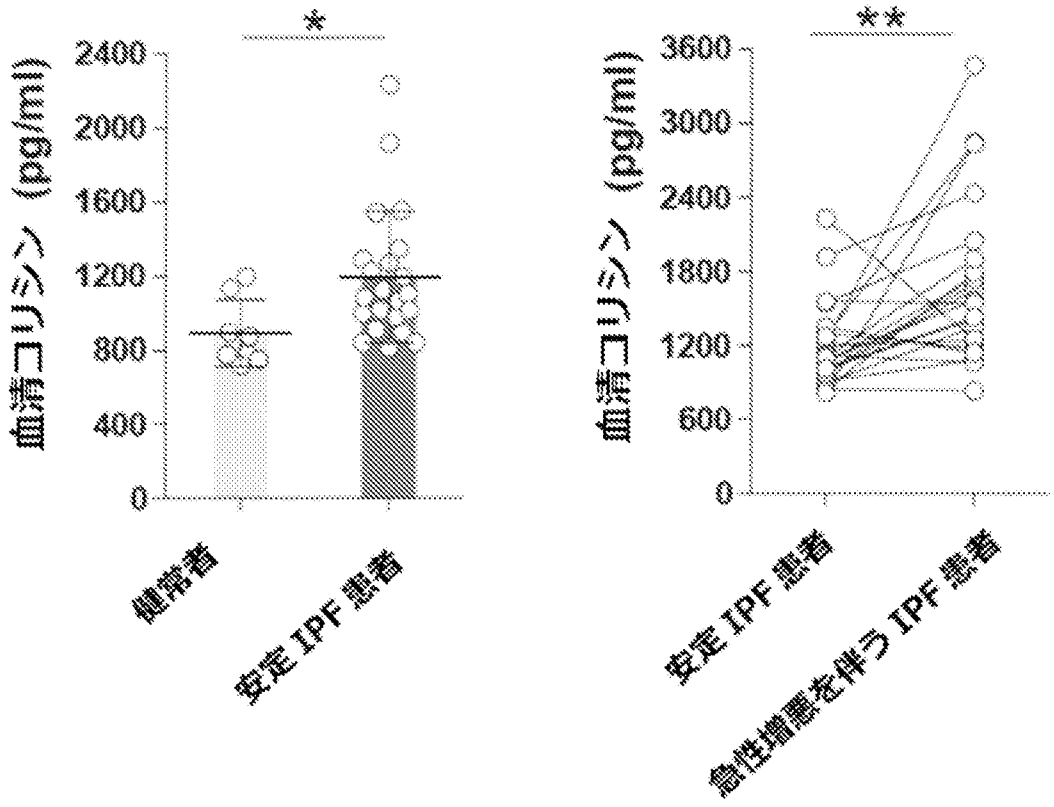
[図38]



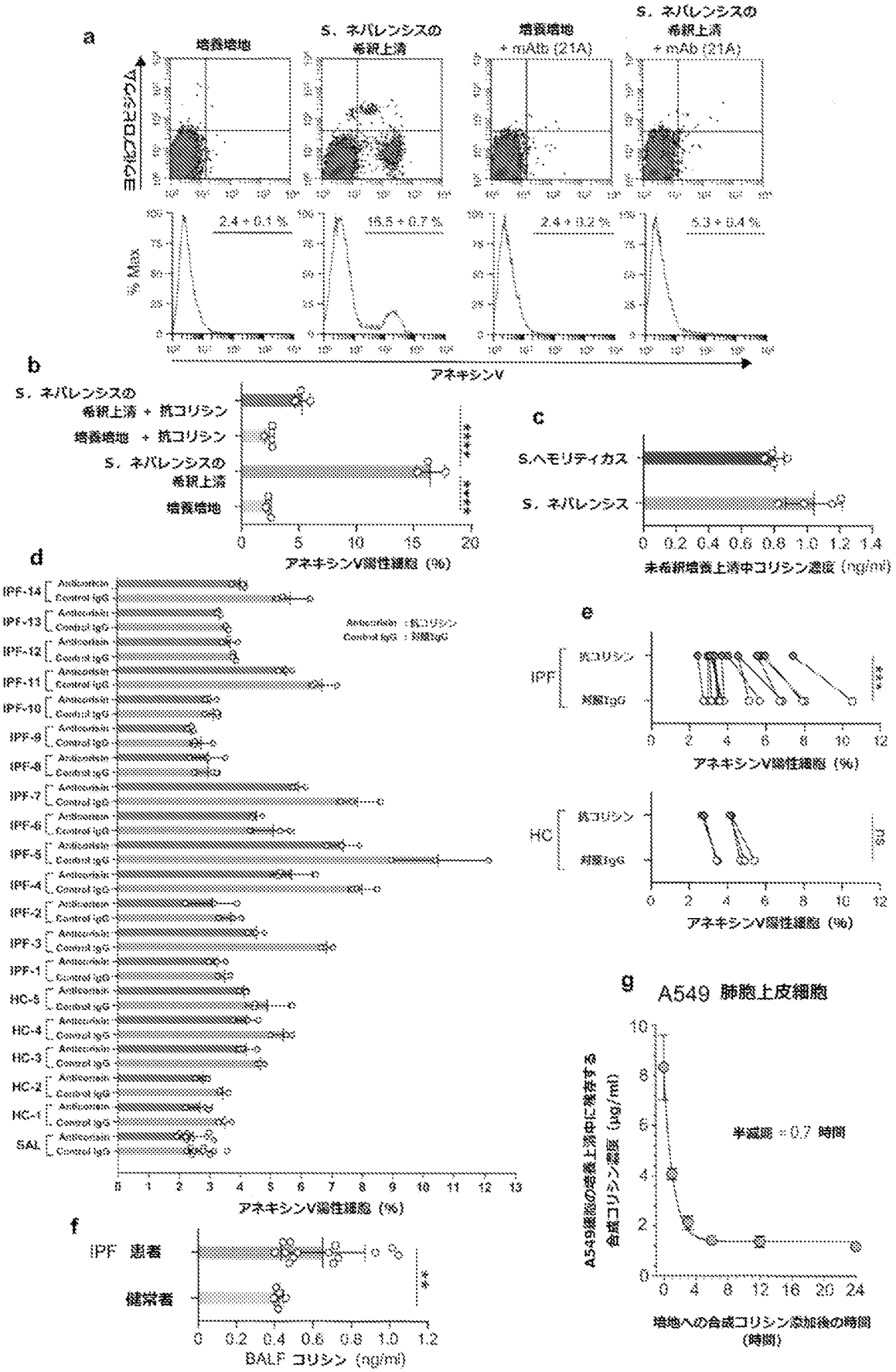
[図39]


皮膚細胞
尿管上皮細胞
小腸上皮細胞
膀胱のボドサイト（ヒト）
大腸上皮細胞
網膜細胞
皮膚細胞（ケラチノサイト）
β2ミクログロブリン
β2ミクログロブリン
ペプチド
ペプチドなし

[図40]


*
血清コリン (pg/ml)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
健常者
安定 IPF 患者
**
血清コリン (pg/ml)
3600
3000
2400
1800
1200
600
0
安定 IPF 患者
急性増悪を伴う IPF 患者

[図41]


a
培養培地
S．ネバレンシスの希釈上清
培養培地 + mAb (21A)
S．ネバレンシスの希釈上清 + mAb (21A)
ヨウ化プロピジウム
% Max
2.4 ± 0.1 %
16.5 ± 0.7 %
2.4 ± 0.2 %
5.3 ± 0.4 %
アネキシンV
b
S．ネバレンシスの希釈上清 + 抗コリシン
培養培地 + 抗コリシン
S．ネバレンシスの希釈上清
培養培地
アネキシンV陽性細胞 (%)
c
S.ヘモリティカス
S．ネバレンシス
未希釈培養上清中コリシン濃度 (ng/ml)
d
IPF-14
IPF-13
IPF-12
IPF-11
IPF-10
IPF-9
IPF-8
IPF-7
IPF-6
IPF-5
IPF-4
IPF-2
IPF-3
IPF-1
HC-5
HC-4
HC-3
HC-2
HC-1
SAL
Anticolicin
Control IgG
Anticolicin：抗コリシン
Control IgG：対照IgG
アネキシンV陽性細胞 (%)
e
IPF
HC
抗コリシン
対照IgG
ns
アネキシンV陽性細胞 (%)
f
IPF 患者
健常者
BALF コリシン (ng/ml)
g
A549 肺胞上皮細胞
A549細胞の培養上清中に残存する合成コリシン濃度 (ng/ml)
半減期 = 0.7 時間
培地への合成コリシン添加後の時間 (時間)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/012823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/12(2006.01)i; ***A61K 38/10***(2006.01)i; ***A61K 39/00***(2006.01)i; ***A61K 39/085***(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61P 1/16***(2006.01)i; ***A61P 7/00***(2006.01)i; ***A61P 11/00***(2006.01)i; ***A61P 13/12***(2006.01)i; ***A61P 37/04***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C07K 7/06***(2006.01)i; ***C07K 7/08***(2006.01)i; ***C07K 16/40***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i; ***C12N 15/31***(2006.01)i; ***C12P 21/08***(2006.01)i; ***G01N 33/53***(2006.01)i; ***G01N 33/68***(2006.01)i

FI: C07K16/12 ZNA; A61K39/395 N; A61K39/00 H; G01N33/68; G01N33/53 D; C12N15/31; C07K7/08; C07K7/06; C07K16/40; C12N15/13; A61P11/00 ZNA; A61P43/00 105; A61P1/16; A61P13/12; A61P7/00; A61K38/10; A61P37/04; A61K39/085; A61K39/00 G; C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/12; A61K38/10; A61K39/00; A61K39/085; A61K39/395; A61P1/16; A61P7/00; A61P11/00; A61P13/12; A61P37/04; A61P43/00; C07K7/06; C07K7/08; C07K16/40; C12N15/13; C12N15/31; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	D'ALESSANDRO-GABAZZA, C. N. et al. A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis. Nat. Commun. 2020, 11:1539 abstract, page 6, right column, line 9 to page 7, left column, line 8, page 7, left column, lines 37-49, page 13, left column, lines 56-61	1-18
Y	JP 2005-247868 A (CHIRON SRL) 15 September 2005 (2005-09-15) paragraphs [0012]-[0023], [0030]	1-18
Y	FONTANA, M. R. et al. Construction of nontoxic derivatives of cholera toxin and characterization of the immunological response against the A subunit. Infect. Immun. 1995, vol. 63, no. 6, pages 2356-2360 abstract	1-18

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 May 2022	**07 June 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/012823

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/157222 A1 (CEVA SANTE ANIMALE S.A.) 06 August 2020 (2020-08-06) page 7, lines 4-13	1-18
P, X	WO 2021/126957 A1 (MIE UNIVERSITY) 24 June 2021 (2021-06-24) claims, paragraph [0179]	18
P, A	claims, paragraph [0179]	1-17
A	KOEDIJK, D. G. A. M. et al. Differential epitope recognition in the immunodominant staphylococcal antigen A of Staphylococcus aureus by mouse versus human IgG antibodies. Sci. Rep. 2017, 7:8141 abstract, fig. 1	1-18
A	LORENZ, U. et al. Functional antibodies targeting IsaA of Staphylococcus aureus augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 2011, vol. 55, no. 1, pages 165-173 abstract	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/012823

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/012823

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2005-247868 A	15 September 2005	US 2003/0170262 A1 paragraphs [0013]-[0024], [0031]	
WO 2020/157222 A1	06 August 2020	EP 3689373 A1	
WO 2021/126957 A1	24 June 2021	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/012823

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 16/12(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/085(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i

FI: C07K16/12 ZNA; A61K39/395 N; A61K39/00 H; G01N33/68; G01N33/53 D; C12N15/31; C07K7/08; C07K7/06; C07K16/40; C12N15/13; A61P11/00 ZNA; A61P43/00 105; A61P1/16; A61P13/12; A61P7/00; A61K38/10; A61P37/04; A61K39/085; A61K39/00 G; C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K16/12; A61K38/10; A61K39/00; A61K39/085; A61K39/395; A61P1/16; A61P7/00; A61P11/00; A61P13/12; A61P37/04; A61P43/00; C07K7/06; C07K7/08; C07K16/40; C12N15/13; C12N15/31; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	D'ALESSANDRO-GABAZZA C.N. et al., A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis, Nat. Commun., 2020, 11:1539 要約, 第6頁右欄第9行-第7頁左欄第8行, 第7頁左欄第37-49行, 第13頁左欄第56-61行	1-18
Y	JP 2005-247868 A (カイロン ソチエタ ア レスポンサビリタ リミタータ) 15.09.2005 (2005-09-15) 段落[0012]-[0023], [0030]	1-18

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
16.05.2022	07.06.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
市島　洋介 4B 5804
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	FONTANA M.R. et al., Construction of nontoxic derivatives of cholera toxin and characterization of the immunological response against the A subunit, Infect. Immun., 1995, Vol. 63, No. 6, pp.2356-2360 要約	1-18
Y	WO 2020/157222 A1 (CEVA SANTE ANIMALE S.A.) 06.08.2020 (2020-08-06) 第7頁第4-13行	1-18
P, X	WO 2021/126957 A1 (MIE UNIVERSITY) 24.06.2021 (2021-06-24) 特許請求の範囲, 段落[0179]	18
P, A	特許請求の範囲, 段落[0179]	1-17
A	KOEDIJK D.G.A.M. et al., Differential epitope recognition in the immunodominant staphylococcal antigen A of Staphylococcus aureus by mouse versus human IgG antibodies, Sci. Rep., 2017, 7:8141 要約, 図1	1-18
A	LORENZ U. et al., Functional antibodies targeting IsaA of Staphylococcus aureus augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy, Antimicrob. Agents Chemother., 2011, Vol. 55, No. 1, pp.165-173 要約	1-18

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/012823

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2005-247868 A	15.09.2005	US 2003/0170262 A1 段落[0013]-[0024], [0031]	
WO 2020/157222 A1	06.08.2020	EP 3689373 A1	
WO 2021/126957 A1	24.06.2021	（ファミリーなし）	