

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】 第 6 部門第 1 区分
 【発行日】 平成 18 年 12 月 28 日 (2006.12.28)

【公表番号】 特表 2006-506613 (P2006-506613A)
 【公表日】 平成 18 年 2 月 23 日 (2006.2.23)
 【年通号数】 公開・登録公報 2006-008
 【出願番号】 特願 2004-551020 (P2004-551020)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/50 (2006.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)
G 0 1 N 27/62 (2006.01)
G 0 1 N 30/72 (2006.01)
G 0 1 N 30/88 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/28	
G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	27/62	X
G 0 1 N	30/72	C
G 0 1 N	30/88	Z

【手続補正書】
 【提出日】 平成 18 年 11 月 10 日 (2006.11.10)
 【手続補正 1】
 【補正対象書類名】 明細書
 【補正対象項目名】 0 0 4 9
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【0 0 4 9】

図 17 A は、大腸菌 X L 1 ブルーに対する抗体の殺菌作用に対するカタラーゼの影響を明らかにしている [実験開始時点 (t = 0 分) での回復したコロニー形成単位 (C F U) のパーセントとして、採取された C F U として記録されている]。カタラーゼは、H₂O₂ を水 (H₂O) および酸素分子 (O₂) に変換する。各グループを、4℃で 60 分間白色光 (2.7 mW/cm) により照射した。細菌細胞密度は ~10⁻⁷ 細胞/mL であった。実験グループ (1~7) を以下の要領で処理した：グループ 1 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞およびヘマトポルフィリン I X (40 μM)。グループ 2 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞および非特異的マウスモノクローナル抗体 8 4 G 3 (20 μM)。グループ 3 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X (40 μM) およびモノクローナル抗体 8 4 G 3 (20 μM)。グループ 4 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X (40 μM)、モノクローナル抗体 8 4 G 3 (20 μM) およびカタラーゼ (13 mU/mL)。グループ 5 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞および特異的ウサギポリクローナル抗体 (20 μM)。グループ 6 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X (40 μM) および特異的ウサギポリクローナル抗体 (20 μM)。グループ 7 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X (40 μM)、特異的ウサギポリクローナル抗体 (20 μM) お

よびカタラーゼ (13 mU/mL)。各点は、多重実験の平均値 $\pm$ SEM として記録されている ($n = 6$)。記号 * * は、同じ時点での対照に対する < 0.01 の p 値を示す。殺菌活性は、暗所対照のいずれからとも観察されなかった (データは示さず)。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

図 20A は、 37°C で PBS ($\text{pH } 7.4$) 中のホルボールミリスチン酸 ($1 \mu\text{g/mL}$) で活性化された好中球 (PMN、 1.5×10^7 細胞/mL) による インジゴカルミン 1 ($30 \mu\text{M}$) の酸化 ($>$) および 2 の形成 ($\square$) の時間経過を示す。インジゴカルミン 1 の酸化は、活性化されていない PMN では全く起こらなかった (データは示さず)。前記要領で好中球を調製した。次亜塩素酸 (HOCl) は、好中球により生成されることが知られているオキシダントである。我々の実験では、PBS ($\text{pH } 7.4$) 中の NaOCl (2 mM) は、1 ($100 \mu\text{M}$) を酸化するが、1 の二重結合を開裂してイサチンスルホン酸 2 を生じさせることはない。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

本明細書で使用されている「活性酸素種」の語は、抗体により生成される酸素種を意味する。いくつかの態様によっては、例えば好中球が抗体をそれらの表面上に有することから、活性酸素種が「好中球により生成」される場合もある。これらの活性酸素種は、1 個またはそれ以上の不対電子を有し得るか、またはそれらは容易に他の分子と反応するため、他の点で反応性である。かかる活性酸素種は、スーパーオキシドフリーラジカル、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、ペルオキシラジカル、オゾンおよびオゾンと同じ化学特性を有する他の短命の三酸素 (オゾン) 付加物を包含するが、これらに限定されるわけではない。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

(4) Fv、2 本の鎖として発現された軽鎖の可変域および重鎖の可変域を含む 人工 フラグメントとして定義される。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

(5) 1 本鎖抗体 (「sFv」)、遺伝子融合 1 本鎖分子として適切なポリペプチドリンカーにより連結された、軽鎖の可変域、重鎖の可変域を含む 人工 分子として定義される。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 0 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 0 1】

免疫学のおよび炎症応答

免疫学のおよび炎症応答の誘因は、一般的に感染性かまたは非感染性のいずれかとして類別される。主に感染および病気と闘うヒト免疫系の細胞は、血液を通して循環している白血球である。白血球は、好中球、血小板、赤血球、リンパ球および他の白血球を生成する骨髓により生成される。全白血球の約50～65パーセントは「好中球」である。造血系が正しく機能しているときには、血小板および好中球は、寿命の長いリンパ球および赤血球とは異なり、急速に増殖し、高速で代謝される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 2 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 2 2】

本発明はまた、付加的還元中心を含むように改変された加工された抗体を含む加工された分子の使用に関するものであり、一重項酸素からの活性酸素種の生成が望まれる場合に、その存在により生成能力が付加される。活性酸素種の産生促進が要望されるときには、2個の保存トリプトファン残基を有する天然抗体と比べて2個を越える還元中心を有する人工分子の使用が正当化される。

【手続補正8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 2 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 2 4】

1つの態様において、本発明は、微生物増殖の阻害方法であって、一重項酸素からかかる活性酸素種を生成させ得る抗体を含む組成物を微生物と接触させる方法に関するものである。この方法は、非特異的または免疫特異的（抗原結合）な、完全またはフラグメント抗体を用いると有効である。かかる抗体フラグメントとしては、1本鎖抗体ならびに人工分子および本明細書記載の抗体が包含される。しかしながら、微生物に対する局在活性が所望されるとき、抗体は、微生物に随伴する抗原に特異的であり得る。例えば、抗体は、微生物表面上の抗原と選択的に結合し得る。

【手続補正9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 6 0】

本発明の治療組成物である、人工および抗体活性を高めるための本明細書記載の付加的還元中心を含む他分子の両方を含む抗体は、投薬処方物と適合し得る方法で、そして治療有効量で投与される。投与すべき量およびタイミングは、処置される対象、対象の有効成分利用系の受容力、および所望される治療効果の程度により異なる。投与されるのに要求される有効成分の正確な量は、担当医の判断に左右され、各個体独特のものである。しかしながら、様々な適用タイプについての適当な用量範囲は、投与経路により異なる。投与に適切な摂取法も変化し得るが、治療処置の所望の成果を得るために初回投与、それに続いて間隔をあけた反復投与を典型的な特徴としている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0241

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0241】

大腸菌(E.coli)XL-1ブルーに特異的なマウスモノクローナルIgG

第0日目、129Gix+マウス(6~8週、1群当たり4匹)に、50μlのリン酸緩衝食塩水、PBS pH7.4を含む150μlの容量中、加熱殺菌した(65℃、15分)化学的感応性大腸菌XL-1(OD₆₀₀=1)の腹腔内注射をした。第14日目、マウスに一回目と同じ方法で二回目の注射をした。第28日目、マウスに一回目および二回目の注射と同じ方法で三回目の注射をした。第35日目、マウスから眼内穿刺により採血した。

標準プロトコールを用いて、XL-1ブルーに特異的な12のモノクローナル抗体を調製した。抗体調製物を硫酸アンモニウム沈澱により精製し、次いでプロテインGカラム(アマシャム・ガンマーバインドG、10mgタンパク質/mlビーズ)へローディングして精製した。結合抗体を3カラム容量のPBS、pH7.4で洗浄し、次いで2カラム容量の酢酸(0.1M、pH3.0)により溶出した。溶出ピークをトリス緩衝液(1M、pH9.0)で中和し(4ml画分中0.5ml)、次いでPBSへ透析した。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0290】

【図1】図1は、食細胞の酸素依存的殺菌作用を示す。¹O₂ およびO₂^{・-}の相互変換が示されている。この活性はまた、抗体に固有の能力である。

【図2】図2は、アンプレックス・レッド検定方法に關与する化学変換段階を示す。抗体(この概略図においてIgGとして特定される)は、¹O₂をO₂^{・-}に変換し、これは、過酸化水素を自発的に形成できる。西洋ワサビペルオキシダーゼの存在下において、過酸化水素は、アンプレックス・レッド基質を脱アセチル化および酸化することにより、587nmでの蛍光を放射する分子を生成する。

【図3】図3は、マウスモノクローナルIgG EP2-19G2(20μM)の存在下(□)または非存在下(△)でのPBS(pH7.4)におけるH₂O₂生成の初期時間経過を示す。エラー・バーは、平均からのデータの範囲を示す。

【図4】図4は、UV照射およびアンプレックス・レッド試薬によるH₂O₂検出の後におけるマウス抗体1D4 Fabフラグメントの単結晶の蛍光顕微鏡写真を示す。

【図5】図5は、活性酸素種の抗体を介する触媒についての時間推移および必要とされる反応条件を示す。図5Aは、31127抗体(ウマIgG、20μM)の存在下(O)または非存在下(◆)における、ヘマトポルフィリン(40μM)および可視光線によるPBS(pH7.4)中でのH₂O₂形成の時間推移を示す。図5Bは、PBS(pH7.4)中に他に何も添加しない場合(□)、またはNaN₃をPBS(pH7.4)(O、100μM)中もしくはPBSのD₂O溶液(pH7.4)(◇)中に含む場合(◇)の、31127抗体(ウマIgG、6.7μM)の存在下におけるヘマトポルフィリン(40μM)および可視光線によるH₂O₂生成の初期時間推移を示す。図5Cは、H₂O₂形成速度に対する抗体タンパク質濃度(31127、ウマIgG)の影響を示す。図5Dは、31127抗体(ウマIgG、6.7μM)によるH₂O₂生成速度に対する酸素濃度の影響を示す。測定値は全て、少なくともデュプリケートの実験測定の平均値である。エラー・バーは、平均値からの実験測定値の範囲である。

【図6】図6は、タンパク質の集団について測定されたH₂O₂形成の初期速度および抗体との比較(表1からのデータ)を示す棒グラフである。測定値は全て、少なくともデュ

プリケートの実験測定の実験測定値の範囲である。O V A、鶏卵オボアルブミン；S O D、スーパーオキシドジスムターゼ。

【図7】図7Aは、P B S (p H 7.4) 中におけるウマ I g G (6.7 μ M) のU V照射によるH₂ O₂ 形成速度を示す。図7Bは、H₂ O₂ 形成と同時に測定した、ウマ I g G の326 nm (励起=280 nm) での蛍光放射を示す。

【図8】図8は、様々な条件下における抗体によるH₂ O₂ 生成を示す。図8Aは、免疫グロブリンおよび非免疫グロブリンタンパク質によるH₂ O₂ 生成を示す。20 ECでの好気的環境条件下にて、トランスイルミネーター（フィッシャー・バイオテック）の密封バイアルに入れたリン酸緩衝食塩水（P B S）[10 mMのリン酸ナトリウム、150 mMのNaCl (p H 7.4)] 中における個々の抗体／タンパク質試料（100 μ L、6.7 μ M）の近U V（312 nm、800 μ W c m⁻²）照射により検定を実施した。検定の間中、定期的間隔でアリコート（10 μ L）を除去した。アンプレックス・レッド法によりH₂ O₂ 濃度を測定した。各データ点を、少なくともデュプリケートの測定の平均±S E Mとして記録する：●ポリクローナル（ポリ）免疫グロブリン（I g）G、ヒト；○ポリー I g G、ウマ；□ポリー I g G、ヒツジ；▽モノクローナル（m）I g G（W D 1-6 G 6）、マウス；△ポリー I g M、ヒト；◇m I g G（9 2 H 2）、マウス；■ β -ガラクトシダーゼ（ β -g a l）；▲鶏卵オボアルブミン（O V A）；▼ α -ラクトアルブミン（ α -l a c t）；◆ウシ血清アルブミン（B S A）。図8Bは、ヒツジポリー I g G（6.7 μ M、200 μ L）によるH₂ O₂ の長期生産を示す。96ウェル石英板の密封ウェルにおいてP B S中8時間近U V照射する。図8A記載の要領でH₂ O₂ 濃度を測定した。図8Cは、時間経過に伴うH₂ O₂ の抗体触媒生産に対するカタラーゼの影響を示す。マウスモノクローナル抗体P C P-21 H 3（I g G）の溶液（6.7 μ M、200 μ L）を、96ウェル石英板の密封ウェルにおいてP B S中で510分間照射した。アンプレックス・レッド法によりH₂ O₂ 濃度を測定し、次いでオイパーギット（Eupergit）Cに固定化したカタラーゼ（10 mg、288 mU）の添加により破壊した。カタラーゼを濾過により除去し、抗体溶液を420分間再照射した。速度（0～510分）=0.368 μ M分⁻¹（ r^2 =0.998）；速度（511～930分）=0.398 μ M分⁻¹（ r^2 =0.987）。図8Dは、ウマポリー I g G抗体による触媒の最大速度パーセントにおけるH₂ O₂ 濃度の影響を示す。かかるグラフにより、ウマポリー I g GによるH₂ O₂ の光生成に対するH₂ O₂ のI C₅₀が測定され得る。ウマ I g Gの溶液（6.7 μ M）を様々な濃度のH₂ O₂（0～450 μ M）とインキュベーションし、図8A記載の要領でH₂ O₂ 形成の初期速度を測定した。グラフは、H₂ O₂ 形成速度対H₂ O₂ 濃度のプロットであり、225 μ MのI C₅₀を表す。図8Eは、H₂ O₂ によるH₂ O₂ の抗体光生成の長期阻害およびH₂ O₂ 除去後における活性の完全な再確立を示す。この検定法では、H₂ O₂（450 μ M）の存在下における360分間のウマポリー I g G（P B S、p H 7.4中6.7 mM）の初期U V照射を伴う。次いで、H₂ O₂ をカタラーゼ（オイパーギットCに固定化）により除去し、ポリー I g G試料をさらに480分間U V光線で再照射した。検定の間中、H₂ O₂ 形成をアンプレックス・レッド検定法により測定した。図8Fは、H₂ O₂ 生成に対するカタラーゼの影響を示す。 α β -T C Rの溶液（6.7 μ M、200 μ L）を、360分間、367分間および389分間、図8C記載の要領で照射した。図8C記載の要領で各照射中に生成されたH₂ O₂ を検定し、破壊した。速度（0～360分）=0.693 μ M分⁻¹（ r^2 =0.962）。200 μ Mを超える増殖曲線（progress curve）における曲率は、予測されたH₂ O₂ による阻害と一致する（下記参照）。速度（361～727分）=0.427 μ M分⁻¹（ r^2 =0.987）；速度（728～1117分）=0.386 μ M分⁻¹（ r^2 =0.991）。

【図9】図9は、天然4 C 6 F a b（カラー写真における淡青色およびピンク色）およびH₂ O₂ の存在下における4 C 6 F a b（カラー写真における紺青色および赤色）の重なりを示す。図9Aについては、天然4 C 6結晶を、4 mMのH₂ O₂ 中に3分間浸し、S S R L B L 9-1でのデータ収集用に直ちに急速冷凍した。二次および三次構造の全体的構造完全性は、H₂ O₂ の存在下で明らかに保存されている（R M S D C α =0.

33オングストローム、側鎖=0.49オングストローム)。RMSDをCNS中で計算した。図9Bは、Fab 4C6への安息香酸の結合を示す。高解像度X線構造は、Fab 4C6が安息香酸と交差反応性であることを示す。 H_2O_2 の存在下および非存在下での4C6連結部位の重なりにより、結合部位内における側鎖立体構造も保存されていることが立証されている（カラー写真において薄く、そして濃く着色した側鎖は、それぞれ $+H_2O_2$ および $-H_2O_2$ に対応する）。さらに、安息香酸についての明白な電子密度は、Fab 4C6の結合特性が4mMの H_2O_2 において変化されていないままであることを明らかにしている。電子密度マップは、 1.5σ で輪郭を示した $2f_0 - f_c$ シグマ加重マップであり、図面をBobscriptで作製した。

【図10A】図10Aは、ダイオードアレイHP8452A分光光度計、Abs_{max} 280nmで測定されたウマポリクローナルIgGの吸光度スペクトルを示す。

【図10B】図10Bは、260および320nm間の波長における、ウマポリクローナルIgGの作用スペクトルを提供しており、280nmで H_2O_2 形成の最大活性を示す。この検定は、デュプリケートで実施され、抗体溶液[PBS中(pH7.4)6.7μM]を石英ガラス管へ加え、次いでそれを1時間SLM分光蛍光計のキセノンアークランプおよびモノクロメーターにより発せられる光ビーム中に置いた。アンプレックス・レッド検定法により H_2O_2 濃度を測定した。

【図11A】図11Aは、トリプトファン(20μM)による時間経過に伴う H_2O_2 の生成を示す。条件および検定手順は、図8Aにおける記載と同様であった。

【図11B】図11Bは、 H_2O_2 の抗体を介する光生成に対する塩素イオンの影響を示す。ヒツジポリマーIgG■(6.7μM、200μL)またはウマポリマーIgG▲(6.7μM、200μL)の溶液を、凍結乾燥により乾固し、次いで塩素イオンの最終濃度が0~160mMとなるように脱イオン水またはNaCl(水溶液)に溶かした。次いで、試料を、20ECでの好氣的環境条件下、トランスイルミネーター(800μWcm⁻²)の密封バイアルにおいてデュプリケートで照射した。検定の間中、アリコート(10μL)を除去し、アンプレックス・レッド検定法により H_2O_2 濃度を測定した。 H_2O_2 形成速度を、各抗体試料について平均±SEM対[NaCl]としてプロットする。

【図11C】図11Cは、 H_2O_2 の抗体を介する光生成に対するEDTA含有緩衝液中における透析の影響を示す。2つの抗体調製物である、マウスモノクローナル抗体PCP21H3およびウマポリクローナルIgGによる H_2O_2 の光生成を、EDTA含有PBS(20mM)での透析の前および後に比較した。条件および検定手順は、図8Aにおける記載と同様であった。各データポイントを、少なくともデュプリケートの測定値の平均±SEMとして記録する：[●透析前のマウスmIgG PCP21H3；■透析後のマウスmIgG PCP21H3；▲透析前のポリマーIgG、ウマ；◆透析後のポリマーIgG、ウマ]。

【図12】図12は、¹⁶O含有 H_2O_2 または¹⁸O含有 H_2O_2 による基質トリスカルボキシエチルホスフィン(TCEP)の酸化を示す質量スペクトルを共する。ESI(負の極性)質量スペクトルは、 H_2O_2 による酸化後のTCEP[(M-H)⁻249]およびその酸化物[(M-H)⁻265(¹⁶O)および(M-H)⁻267(¹⁸O)]のものを示した。図12Aは、 $H_2^{18}O$ (98%¹⁸O)PB中における¹⁶O₂好氣的条件下でのヒツジポリマーIgG(6.7/μM)の照射後におけるTCEPおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。¹⁶O含有TCEP(265での大きいピーク)および¹⁸O含有TCEP(267での小さいピーク)の混合物が生成される。図12Bは、 $H_2^{16}O$ PB中における濃縮された¹⁸O₂(90%¹⁸O)好氣的条件下でのヒツジポリマーIgG(6.7μM)の照射後におけるTCEPおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。¹⁶O含有TCEP(265での小さいピーク)および¹⁸O含有TCEP(267での大きいピーク)の混合物が生成される。図12Cは、 $H_2^{16}O$ PB中における¹⁶O₂好氣的濃縮下で実施されたポリマーIgGの照射後におけるTCEPおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。 $H_2^{16}O$ を $H_2^{18}O$ に変えた以外、検定条件および手順は方法および材料(実施例2)に記載のとおりであった。¹⁶O含有TCEP(

265での大きいピーク)のみ観察される。図12Dは、 20EC で8時間、 H_2^{18}O PB中、嫌氣的(脱気およびアルゴン下)条件下でのヒツジポリ-IgG ($6.7\text{ }\mu\text{M}$) および $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ ($200\text{ }\mu\text{M}$) の照射後におけるTCPEおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。TCPEの添加は、方法および材料(実施例2)における記載と同様であった。 ^{16}O 含有TCPE(265での大きいピーク)のみ観察される。図12Eは、 H_2^{18}O PB中での $^{16}\text{O}_2$ 好氣的条件下での3-メチルインドール($500\text{ }\mu\text{M}$) の照射後におけるTCPEおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。 ^{16}O 含有TCPE(265での大きいピーク)のみ観察される。3-メチルインドールは分子量が低すぎるため、サイズ排除濾過を実施しなかったこと以外、検定条件および手順は、方法および材料(実施例2)に記載のとおりであった。従って、TCPEを、3-メチルインドール含有PB溶液に加えた。図12Fは、 H_2^{18}O PB中での $^{16}\text{O}_2$ 好氣的条件下、 $\beta\text{-gal}$ ($50\text{ }\mu\text{M}$) の照射後におけるTCPEおよびその酸化物の質量スペクトルを示す。 ^{16}O 含有TCPE(265での大きいピーク)のみ観察される。検定条件および手順は、方法および材料(実施例2)に記載のとおりであった。

【図13】図13は、材料および方法(実施例2)に記載された抗体4C6におけるXe結合部位を示す。図13Aは、Fab 4C6のC α トレースの標準側面図であり、カラー写真においてピンク色は軽鎖および青色は重鎖である。3個の結合したキセノン原子(カラー写真における緑色)を、 5σ で輪郭を示した初期 F_0-F_c 電子密度マップと共に示されている。図13Bは、保存されたキセノン部位1の周囲のFab 4C6および2C $\alpha\beta$ TCR(PDB/TCR)のオーバーレイである。V_L主鎖C α トレース(カラー写真におけるピンク色)および側鎖(カラー写真における黄色)、ならびに2C $\alpha\beta$ TCRの対応するV α (カラー写真における赤色および金色)を重ね合わせる(Insight 2000を用いて作製された図面)。

【図14】図14は、抗体による細菌致死力を示す。図14Aは、異なる実験条件下における大腸菌(E.coli)XL1-ブルーおよびO112a,c株の生存を示す棒グラフである。生存は、実験開始時点($t=0$ 分)でのコロニー形成単位(CFU)のパーセントとして、回復したCFUとして記録されている。黒色(斜線)バーおよび淡灰(白)色バーは、淡灰色グループ(2、4、6、8、10および12)が可視光線(2.7 mW cm^{-2})に60分間暴露され、黒色グループ(1、3、5、7、9および11)が60分間暗所に置かれたこと以外、同一実験条件に対応している。細菌細胞密度は約 10^7 細胞/mLであった。記録された各データポイントは、以下の条件下における大腸菌XL1-ブルー(グループ1~6)およびO112a,c(グループ7~12)の平均 $\pm$ SEM($n=6$)である。グループ1~2は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるXL1-ブルー細胞。グループ3~4は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるHP IX ($40\text{ }\mu\text{M}$)、XL1-ブルー細胞。グループ5~6は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるXL1-ブルー特異的モノクローナル抗体(25 D11 、 $20\text{ }\mu\text{M}$)、ヘマトポルフィリンIX ($40\text{ }\mu\text{M}$)、XL1-ブルー細胞。グループ7~8は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるO112a,c細胞。グループ9~10は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるHP IX (40°M)、O112a,c細胞。グループ11~12は、 4°C でPBS、pH 7.4中におけるO112a,c-特異的モノクローナル抗体(15404 、 $20\text{ }\mu\text{M}$)、ヘマトポルフィリンIX ($40\text{ }\mu\text{M}$)、O112a,c細胞。図14Bは、大腸菌O112a,cの生存に対する抗体濃度の影響をグラフに示したものである。使用した抗体は、O112a,c特異的モノクローナル抗体である、15404であった。記録された各データポイントは、平均値 $\pm$ SEM($n=3$)である。細胞の50%の致死(EC_{50})に対応する15404抗体の濃度は、 $81\pm6\text{ nM}$ であった。図14Cは、大腸菌XL1-ブルー特異的マウスモノクローナル抗体12B2の殺菌作用に対する照射時間の影響をグラフで示したものである。グラフは、ヘマトポルフィリンIX ($40\text{ }\mu\text{M}$) および12B2 ($20\text{ }\mu\text{M}$) の存在下における照射時間(2.7 mW cm^{-2})対大腸菌XL1-ブルーの生存を示す。記録された各データ点は、平均値 $\pm$ SEM($n=3$)である。細胞の50%の致死に対応する照射時間は、 30 ± 2 分であった。図14Dは、ヘマトポルフィリ

ン I X 濃度に対する抗体駆動殺菌作用の依存性を示す。使用した抗体は、大腸菌 X L 1 - ブルー特異的マウスモノクローナル抗体 2 5 D 1 1 であった。グラフは、大腸菌 X L 1 - ブルーの生存対ヘマトポルフィリン I X の一連濃度への暴露を示す。以下の条件を使用した：60 分間 (>)、暗所中 4℃で P B S、p H 7.4 中における X L 1 - ブルー細胞。白色光 (2.7 mW cm^{-2}) 中、4℃で P B S、p H 7.4 中における X L 1 - ブルー細胞 (Δ)。60 分間暗所中、4℃で P B S、p H 7.4 中における 2 5 D 1 1 ($20 \mu\text{M}$)、X L 1 - ブルー細胞 ($\blacklozenge$)。60 分間白色光 (2.7 mW cm^{-2}) 中、4℃で P B S、p H 7.4 中における 2 5 D 1 1 ($20 \mu\text{M}$)、X L 1 - ブルー細胞 ($\diamond$)。

【図 1 5】図 1 5 は、抗原特異的マウスモノクローナル I g G (15404 、 $20 \mu\text{M}$)、P B S 中のヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$) および可視光線への、4℃で 1 時間の暴露後の大腸菌 O 1 1 2 a, c 細胞の電子顕微鏡写真である (< 5% 生存可能)。抗体付着部位を視覚化するため、金標識したヤギ抗マウス抗体を殺菌検定完了後に加えた。抗原非特異的抗体の殺菌活性の効力は、抗原特異的抗体と非常に類似していることが観察された。典型的には、 $20 \mu\text{M}$ の抗体 (非特異的) は、本検定系において > 95% 殺菌性であった。

【図 1 6】図 1 6 A ~ C は、非特異的マウスモノクローナル I g G 抗体 ($84G3$ 、 $20 \mu\text{M}$)、P B S 中のヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$) および可視光線への 4℃で 1 時間暴露後の大腸菌 X L - 1 - ブルー細胞の電子顕微鏡写真である (1% 生存可能)。図 1 6 A における矢印は、細胞質内容物からの細胞膜の予備的分離に向いている。図 1 6 D は、抗原特異的マウスモノクローナル I g G (15404 、 $10 \mu\text{M}$)、P B S 中のヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$) および可視光線への室温で 1 時間暴露後の大腸菌 O 1 1 2 a, c 血清型の電子顕微鏡写真である (< 5% 生存可能)。当業界で利用可能な手順を用いて金標識を実施した。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、大腸菌 X L 1 - ブルーに対する抗体の殺菌作用に対するカタラーゼの影響を明らかにしている [実験開始時点 ($t = 0$ 分) での回復したコロニー形成単位 (C F U) のパーセントとして、採取された C F U として記録されている]。カタラーゼは、 H_2O_2 を水 (H_2O) および酸素分子 (O_2) に変換する。各グループを、4℃で 60 分間白色光 (2.7 mW cm^{-2}) により照射した。細菌細胞密度は $\sim 10^{-7}$ 細胞 / mL であった。実験グループ (1 ~ 7) を以下の要領で処理した：グループ 1 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞およびヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$)。グループ 2 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞および非特異的マウスモノクローナル抗体 $84G3$ ($20 \mu\text{M}$)。グループ 3 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$) およびモノクローナル抗体 $84G3$ ($20 \mu\text{M}$)。グループ 4 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$)、モノクローナル抗体 $84G3$ ($20 \mu\text{M}$) およびカタラーゼ (13 mU/mL)。グループ 5 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞および特異的ウサギポリクローナル抗体 ($20 \mu\text{M}$)。グループ 6 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$) および特異的ウサギポリクローナル抗体 ($20 \mu\text{M}$)。グループ 7 は、P B S (p H 7.4) 中における大腸菌 X L 1 - ブルー細胞、ヘマトポルフィリン I X ($40 \mu\text{M}$)、特異的ウサギポリクローナル抗体 ($20 \mu\text{M}$) およびカタラーゼ (13 mU/mL)。各点は、多重実験の平均値 $\pm$ S E M として記録されている ($n = 6$)。記号 * * は、同じ時点での対照に対する < 0.01 の p 値を示す。殺菌活性は、暗所対照のいずれからも観察されなかった (データは示さず)。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、大腸菌 X L 1 - ブルーおよび O 1 1 2 a, c 血清型の生存能力に対する H_2O_2 の濃度依存的毒性を示す。垂直な点線は、上記図 1 4 および Hofman らの、Infect.Immun. 68、449 (2000) に記載の条件を用いることによる、60 分間インキュベーション中に抗体により生成されると予測される H_2O_2 の濃度である。 $35 \pm 5 \mu\text{M}$ H_2O_2 の値は、12 の異なるモノクローナル抗体の少なくともデュプリケートの検定から測定された平均値である。

【図 18】図 18 は、カタラーゼの存在下および非存在下での P B S (p H 7.4) 中における抗体の U V 照射 (312 nm 、 0.8 W cm^{-2}) 中におけるインジゴカルミン 1 (1 mM) からのイサチンスルホン酸 2 の光生成の進行を示す (Steinbeck et al., J. Biol. Chem. 267、13425 (1992))。各ポイントは、少なくともデュプリケートの測定の前平均 $\pm$ S E M として記録されている。G r a p h p a d P r i s m v.3 ソフトウェアにより一次回帰分析を実施した。イサチンスルホン酸 2 の形成速度 (v) は、以下の条件下で観察された：ヒツジ ポリクローナル I g G ($20\text{ }\mu\text{M}$) (●) $v = 34.8 \pm 1.8\text{ nM/分}$ ；マウス モノクローナル抗体 33 F 1 2 ($20\text{ }\mu\text{M}$) (□) $v = 40.5 \pm 1.5\text{ nM/分}$ ；ヒツジ ポリクローナル I g G ($20\text{ }\mu\text{M}$) および可溶性カタラーゼ (13 mU/mL) (△) $v = 33.5 \pm 2.3\text{ nM/分}$ ；マウス モノクローナル抗体 33 F 1 2 ($20\text{ }\mu\text{M}$) および可溶性カタラーゼ (13 mU/mL) (▽) $v = 41.8 \pm 1.2\text{ nM/分}$ 。

【図 19】図 19 A ~ C は、様々な条件下における室温での H_2^{18}O ($>95\%^{18}\text{O}$) リン酸緩衝液 (P B、 100 mM 、p H 7.4) 中におけるインジゴカルミン 1 (1 mM) の酸化中に生成されたイサチンスルホン酸 2 [(M H) - 226、(M - H) - 228 (^{18}O) および (M - H) - ($2 \times ^{18}\text{O}$)] の電子スプレーイオン化 (負の極性) 質量スペクトルを示す。図 19 A は、5 分間化学的オゾン分解 (P B 中 $600\text{ }\mu\text{M}$) によりインジゴカルミン 1 の酸化中に生成されたイサチンスルホン酸 2 の質量スペクトルである。図 19 B は、4 時間ヘマトポルフィリン I X ($40\text{ }\mu\text{M}$) およびヒツジポリ I g G ($20\text{ }\mu\text{M}$) の白色光 (2.7 mW cm^{-2}) での照射によりインジゴカルミン 1 の酸化中に生成されたイサチンスルホン酸 2 の質量スペクトルを示す。図 19 C は、4 時間白色光 (2.7 mW cm^{-2}) でのヘマトポルフィリン I X ($40\text{ }\mu\text{M}$) の照射によりインジゴカルミン 1 の酸化中に生成されたイサチンスルホン酸 2 の質量スペクトルを示す。

【図 20 A】図 20 A は、 37°C で P B S (p H 7.4) 中のホルボールミリスチン酸 ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) で活性化されたヒト好中球 (P M N、 1.5×10^7 細胞/mL) によるインジゴカルミン 1 ($30\text{ }\mu\text{M}$) の酸化 (>) および 2 の形成 (□) の時間経過を示す。インジゴカルミン 1 の酸化は、活性化されていない P M N では全く起こらなかった (データは示さず)。前記要領で好中球を調製した。次亜塩素酸 (HOCl) は、好中球により生成されることが知られているオキシダントである。我々の実験では、P B S (p H 7.4) 中の NaOCl (2 mM) は、1 ($100\text{ }\mu\text{M}$) を酸化するが、1 の二重結合を開裂してイサチンスルホン酸 2 を生じさせることはない。

【図 20 B】図 20 B は、図 20 A 記載の条件下、活性化されたヒト好中球によるインジゴカルミン 1 の酸化中に生成されたイサチンスルホン酸 2 の陰イオン電子スプレー質量スペクトルを示す。