

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6251730号
(P6251730)

(45) 発行日 平成29年12月20日(2017.12.20)

(24) 登録日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	Z N A R
A 61 P 31/04	(2006.01)	A 61 P 31/04	
C 07 K 16/14	(2006.01)	C 07 K 16/14	
C 12 N 15/02	(2006.01)	C 12 N 15/00	C

請求項の数 15 (全 83 頁)

(21) 出願番号	特願2015-508964 (P2015-508964)
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(65) 公表番号	特表2015-515492 (P2015-515492A)
(43) 公表日	平成27年5月28日 (2015.5.28)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/031927
(87) 國際公開番号	W02013/162751
(87) 國際公開日	平成25年10月31日 (2013.10.31)
審査請求日	平成28年3月11日 (2016.3.11)
(31) 優先権主張番号	61/638,797
(32) 優先日	平成24年4月26日 (2012.4.26)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	399019892 ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ THE UNIVERSITY OF C HICAGO アメリカ合衆国60637イリノイ州シカ ゴ、サウス・エリス・アベニュー5801 番
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】黄色ブドウ球菌 (STAPHYLOCOCCUS AUREUS) 疾患の間にコアグラーーゼ活性を中和する抗体に関連した組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合するCoa結合ポリペプチドを含む、ブドウ球菌(Staphylococcus)感染を有すると判定された患者またはブドウ球菌感染のリスクがあると判定された患者においてブドウ球菌感染を阻害または処置するための薬学的組成物であって、前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4モノクローナル抗体の6つのCDRドメインに少なくとも90%以上同一である配列を含み、かつ、血液凝固阻害活性を有し、ここで、該5D5.4軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインの配列がそれぞれ、SSVSSSSY (SEQ ID NO:15)、STS (SEQ ID NO:16)、およびQQYHRSPPPT (SEQ ID NO:17)であり、該5D5.4重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインの配列がそれぞれ、GASITTSY (SEQ ID NO:18)、I SYSGNT (SEQ ID NO:19)、およびAATYYDFNYDGYLDV (SEQ ID NO:20)である、薬学的組成物。

【請求項 2】

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドの結合について5D5.4モノクローナル抗体と競合する、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記Coa結合ポリペプチドがモノクローナル抗体を含む、請求項1または2に記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

前記Coa結合ポリペプチドが組換え体である、請求項1~3のいずれか一項に記載の薬学

的組成物。

【請求項 5】

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4モノクローナル抗体の3つ、4つ、5つ、または6つのCDRドメインの配列と同一の配列を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4モノクローナル抗体の全6つのCDRドメインの配列と同一の配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

抗生物質またはブドウ球菌ワクチン組成物と併用される、請求項1～6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。 10

【請求項 8】

ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合する、精製されたCoA結合キメラポリペプチドであって、前記精製されたCoA結合キメラポリペプチドが、5D5.4モノクローナル抗体の6つのCDRドメインに少なくとも90%以上同一である配列を含み、かつ、血液凝固阻害活性を有し、

ここで、該5D5.4軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインの配列がそれぞれ、SSVSSSY (SEQ ID NO:15)、STS (SEQ ID NO:16)、およびQQYHRSPPPT (SEQ ID NO:17)であり、該5D5.4重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインの配列がそれぞれ、GASITTSY (SEQ ID NO:18)、I SYSGNT (SEQ ID NO:19)、およびAATYYDFNYDGYLDV (SEQ ID NO:20)である、精製されたCoA結合ポリペプチド。 20

【請求項 9】

5D5.4モノクローナル抗体の軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3ドメインの配列と同一の配列を含む、請求項8に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。

【請求項 10】

5D5.4モノクローナル抗体の重鎖CDR1、CDR2、および、CDR3ドメインの配列と同一の配列を含む、請求項8または9に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。

【請求項 11】

ヒト化されている、請求項8～10のいずれか一項に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。 30

【請求項 12】

前記精製されたCoA結合キメラポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドの結合について5D5.4モノクローナル抗体と競合する、請求項8～11のいずれか一項に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。

【請求項 13】

組換え体である、請求項8～12のいずれか一項に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。

【請求項 14】

前記精製されたCoA結合キメラポリペプチドが、5D5.4モノクローナル抗体の6つのCDRドメインの配列と同一の配列を含む、請求項8～13のいずれか一項に記載の精製されたCoA結合キメラポリペプチド。 40

【請求項 15】

前記Coa結合ポリペプチドが組換え単一ドメイン抗体である、および/またはヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項1～2、または4～7のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国立衛生研究所による助成金交付番号AI092711およびAI052474 AI52767の下での政府支援によってなされた。MM. D.M.M. およびO.S. のHD009007訓練助成金は、米国 50

立アレルギー感染病研究所(NIAID)のRegion V 「Great Lakes」 Regional Center of Excellence in Biodefense and Emerging Infectious Diseases Consortium (NIH助成金交付番号1-U54-AI-057153)の会員であることおよびそれからの支援ならびに米国立衛生研究所による助成金交付番号1-U54-AI-057153を承認するものである。米国政府は本発明においてある特定の権利を有する。

【0002】

本出願は、参照により全体が本明細書に組み入れられる、2012年4月26日付で出願された米国仮特許出願第61/638,797号に対する優先権を主張するものである。

【0003】

I. 発明の分野

10

本発明は全体として、免疫学、微生物学、および病理学の分野に関する。より具体的には、本発明は、細菌タンパク質および細菌ペプチドに対する抗体を含む方法ならびに組成物に関し、このような抗体を誘発するために該細菌タンパク質および該細菌ペプチドが用いられる。それらのタンパク質にはコアグラーーゼ(Coa)が含まれる。

【背景技術】

【0004】

II. 背景

20

北米の病院は、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の流行を経験している。この生物は、軽度の皮膚感染から致死的な敗血症、心内膜炎、および肺炎までの広範な疾患を引き起こす[2]。黄色ブドウ球菌は、その多くの疾患徵候を可能にする広範な病毒性因子が豊富である。黄色ブドウ球菌と、病原性の低いブドウ球菌(*staphylococcus*)種とを区別する黄色ブドウ球菌の決定的な特徴の1つは、抗凝固処理血液を凝固させるその能力である[48、75]。この特徴は2種のタンパク質、つまりコアグラーーゼ(Coa)およびフォン・ウィルブランド因子結合タンパク質(vWbp)によるものである。CoaおよびvWbpは、宿主プロトロンビンに結合し、宿主プロトロンビンの立体構造変化を誘導するが、これは酵素前駆体から活性化トロンビンへの移行を模倣しており、この複合体がフィブリノゲンをフィブリンへ切断することを可能にする[66、67、71、72、133、146、188]。フィブリンは血栓のメッシュネットワークを形成する。

【0005】

CoaおよびvWbpは、黄色ブドウ球菌感染の発病中に重要な役割を果たす[212]。coaおよびvwbの二重変異体の感染は、マウス敗血症モデルにおいて死亡の遅延をもたらし、膿瘍を形成するブドウ球菌の能力をほぼ取り除く(Cheng et al 2010)。CoaおよびvWbpに対する体液性免疫反応は、ブドウ球菌感染に対する防御を与える(Cheng et al 2010)。直接的なトロンビン阻害物質によるコアグラーーゼの薬理学的阻害は、CoaおよびvWbpの活性を中心化し、ブドウ球菌性敗血症に対する予防的防御を与える[20、177、213]。

30

【0006】

黄色ブドウ球菌は、乾いた表面上で生き延び、感染の機会を高めることができる。いずれの黄色ブドウ球菌感染もブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、つまり血流に吸収された外毒素に対する皮膚反応を引き起こすことがある。黄色ブドウ球菌は、命にかかわりうる敗血症と呼ばれる敗血症の一種を引き起こすこともある。メチシリジン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は院内感染の主な原因になっている。

40

【0007】

黄色ブドウ球菌の感染は典型的には、抗生素質で処置され、ペニシリンが最適な薬物であるが、しかしメチシリジン耐性分離株にはバンコマイシンが使用される。抗生素質に対して幅広い耐性を示すブドウ球菌株の割合は、増加しており、有効な抗菌療法に脅威を与えている。さらに、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌株が最近現れたことで、有効な治療を使用できないMRSA株が、出現し蔓延し始めているという恐怖心がかき立てられている。

【0008】

ブドウ球菌感染の処置において抗生素質に代わる手法は、受動免疫療法においてブドウ球菌抗原に対する抗体を用いることであった。この受動免疫療法の例には、ポリクローナ

50

ル抗血清の投与(WO00/15238、WO00/12132)およびリポタイコ酸に対するモノクローナル抗体による処置(WO98/57994)が含まれる。

【0009】

黄色ブドウ球菌を標的とするかまたは黄色ブドウ球菌が産生する細胞外タンパク質を標的とする第一世代のワクチンではもたらされる成果には限界があり(Lee, 1996)、ブドウ球菌感染を処置するためにさらなる治療的組成物を開発する必要がまだある。

【発明の概要】

【0010】

黄色ブドウ球菌は、米国において菌血症および院内感染の最多原因である。ブドウ球菌疾患を予防するFDA認可済みワクチンは、現在、使用可能ではない。

10

【0011】

ある態様には、ブドウ球菌感染を阻害、改善、および/または予防する抗体組成物がある。

【0012】

ある態様は、ブドウ球菌感染を有すると判定された患者またはブドウ球菌感染のリスクがあると判定された患者においてブドウ球菌感染を阻害する方法であって、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合するCoa結合ポリペプチドの有効量を該患者に投与する段階を含む、方法に指向している。いくつかの態様において、本方法は、2種またはそれ以上のCoa結合ポリペプチドの有効量を投与する段階をさらに含む。いくつかの態様において、本方法は、患者に抗生物質またはブドウ球菌ワクチン組成物を投与する段階をさらに含む。他の態様には、ブドウ球菌感染を有する患者またはブドウ球菌感染を有すると判定された患者を処置するための方法がある。さらなる態様には、ブドウ球菌感染を予防するための方法がある。

20

【0013】

いくつかの局面において、Coa結合ポリペプチドはブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1に特異的に結合する。他の局面において、Coa結合ポリペプチドはブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン2に特異的に結合する。さらなる態様において、Coa結合ポリペプチドはブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1およびドメイン2の両方の領域に特異的に結合する。

【0014】

30

ある態様は、SEQ ID NO: 1~8のいずれかによってコードされるポリペプチドにおけるエピトープに特異的に結合するCoa結合ポリペプチドに指向している。ある局面において、Coa結合ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1~8のいずれかによってコードされるポリペプチドのアミノ酸番号1~149、150~282、または1~282におけるエピトープに特異的に結合する。ある局面において、エピトープは、本明細書において提供される配列、もしくは本明細書において提供される配列のいずれかによってコードされる配列のいずれか由来の少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、もしくはそれ以上(またはその中における得られる任意の範囲)の連続アミノ酸を含むか、あるいは、本明細書において提供される配列、もしくは本明細書において提供される配列のいずれかによってコードされる配列のいずれか由来の多くても6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、もしくはそれ以上(またはその中における得られる任意の範囲)の連続アミノ酸を有する。

40

50

【0015】

特定の態様において、Coa結合ポリペプチドは、ブドウ球菌Coaポリペプチドの結合について5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体と競合する。さらなる態様において、モノクローナル抗体は4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7である。いくつかの態様において、Coa結合ポリペプチドは、ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coaポリペプチドに対する結合定数 約 $0.5\sim20\text{ nM}^{-1}$ 、 $1.0\sim10\text{ nM}^{-1}$ 、または $1.0\sim6.0\text{ nM}^{-1}$ を有する。ある態様において、Coa結合ポリペプチドは、ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coaドメイン1~2に対する結合定数 約 $0.5\sim20\text{ nM}^{-1}$ または $1.0\sim10\text{ nM}^{-1}$ を有する。

【0016】

10

Coa結合ポリペプチドは、ブドウ球菌由来のCoaタンパク質を特異的に結合させる任意のポリペプチドでありうる。ある態様において、Coa結合ポリペプチドは、精製されたモノクローナル抗体または精製されたポリクローナル抗体である。ポリペプチドは、例えば、単一のドメインであるか、ヒト化されているか、またはキメラである、抗体でありうる。いくつかの態様において、2種またはそれ以上のCoa結合ポリペプチド(例えば、2種またはそれ以上の精製されたモノクローナル抗体または精製されたポリクローナル抗体)が患者に投与されうる。ある局面において、Coa結合ポリペプチドは組換え体である。他の態様において、一種または複数種の化学修飾または化学的部分の付加などの、ポリペプチドに対する化学修飾が存在しうる。

【0017】

20

Coa結合ポリペプチドが、抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインを含み、該抗体が、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合する、態様が提供される。特定の態様において、Coa結合ポリペプチドは、5D5.4および7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上のCDRドメインを含む。ある局面において、Coa結合ポリペプチドは、5D5.4および7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの6つのCDRドメインを含む。いくつかの態様において、Coa結合ポリペプチドは、5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインと少なくともまたは多くても70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99% (またはその中における得られる任意の範囲)同一である配列を含む。Coa結合ポリペプチドが、5D5.4もしくは7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインおよび/または5D5.4もしくは7H4.25モノクローナル抗体のVLドメインを含む、態様が提供される。さらなる態様において、モノクローナル抗体は4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7である。

【0018】

30

いくつかの態様において、Coa結合ポリペプチドは、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合するCoa結合ポリペプチド由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィプロネクチン、または黄色ブドウ球菌プロテインZからなる群より選択されるポリペプチド由来の足場とを含む。

【0019】

40

Coa結合ポリペプチドは第二のCoa結合ポリペプチドに機能的に結合されうる。いくつかの局面において、第一および第二のCoa結合ペプチドは組換えにより機能的に結合されている。他の局面において、第一および第二のCoa結合ペプチドは化学的に機能的に結合されている。

【0020】

Coa結合ポリペプチドが、約、少なくとも約、または多くても約 $0.1\text{ mg/kg}\sim5\text{ mg/kg}$ 、 $1\text{ mg/kg}\sim5\text{ mg/kg}$ 、 $0.1\text{ mg/kg}\sim1\text{ mg/kg}$ 、もしくは $2\text{ mg/kg}\sim5\text{ mg/kg}$ (またはその中における得られる任意の範囲)の用量で投与される、態様が提供される。

【0021】

態様によって、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCoa結合ポリペプチドCDRドメインを含む、精製されたポリペプチド

50

も提供される。ある態様において、Coa結合ポリペプチドは、ブドウ球菌Coaポリペプチドの結合について4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、6C4.15、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、6C10.19、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体と競合する。ある局面において、ポリペプチドは、ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coaポリペプチドに対する結合定数 約0.1~20 nM⁻¹、0.5~10 nM⁻¹、または1.0~10 nM⁻¹を有する。ポリペプチドは、例えば、單一ドメイン抗体Coa結合ポリペプチド、ヒト化抗体、またはキメラ抗体を含みうる。

【 0 0 2 2 】

ある態様において、ポリペプチドは組換え体である。ある局面において、組換えポリペプチドは、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来またはVLドメイン由来の1つまたは複数のCDRドメインの少なくとも90%、95%、または99%を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、5D5.4、および/または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来またはVLドメイン由来の2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上のCDRドメインを含む。

【 0 0 2 3 】

いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 4H9.20の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 4H9.20の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 5D5.4の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 5D5.4の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 4B10.44の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 4B10.44の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 3B3.14の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 3B3.14の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 7H4.25の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 7H4.25の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 2A3.1の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 2A3.1の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 2H10.12の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 2H10.12の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 6D1.22の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 6D1.22の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 6C4.15の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 6C4.15の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 6C10.19の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 6C10.19の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 8C2.9の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 8C2.9の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。いくつかの態様において、組換えポリペプチドは、(i) 4F1.7の可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3; ならびに/または(ii) 4F1.7の可変重鎖由来のCDR1、CDR2、および/もしくはCDR3を含む。これらのCDRの配列は、表5において見出すことができる。

【 0 0 2 4 】

いくつかの態様には、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCoa結合ポリペプチドCDRドメインを含む、精製されたポリペプチドがある。上記の通りに、ポリペプチドはCoa抗体の軽鎖および/または重鎖可変領域

10

20

30

40

50

由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含みうる。表5は、12種の異なるCoa抗体ならびに軽鎖および重鎖可変領域の両方由来のそれらのCDR1、CDR2、およびCDR3配列を提供する。ある態様において、ポリペプチドは特定の抗体の軽鎖可変領域由来のCDR1、CDR2、および/またはCDR3を含む。いくつかの態様においてポリペプチドは軽鎖の可変領域および/または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を有するが、そのCDR1、CDR2、およびCDR3は同じ抗体由来である必要はないことが企図される。アミノ酸配列の重複を考慮すると、いくつかのポリペプチドが、同じ抗体由来のまたは同じ抗体に基づくCDR1、CDR2、およびCDR3を有するが、ある抗体由来のCDR1が、別の抗体由来のまたは別の抗体に基づくCDRと置換されてもよい。例えば、ポリペプチドは4F1.7の軽鎖可変領域由来のまたは4F1.7の軽鎖可変領域に基づくCDR1、4F1の軽鎖可変領域由来のまたは4F1の軽鎖可変領域に基づくCDR2を含みうるが、しかし6C4.15の可変軽鎖領域由来のまたは6C4.15の可変軽鎖領域に基づくCDR3を有しうる。しかしながら、単一系列のCDR1、CDR2、およびCDR3群がともに用いられる場合、それらは全て軽鎖可変領域由来または重鎖可変領域由来であるが、しかしその両方由来の混合物ではないことが一般に企図される。

【0025】

あるいは、ポリペプチドは、Coa抗体の軽鎖可変領域由来のCDR1配列である、SEQ ID NO:9、15、24、33、40、44、56、および49に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:9、15、24、33、40、44、56、および49に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:9、15、24、33、40、44、56、および49に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR1配列を含みうる。その代わりにまたはさらに、ポリペプチドは、Coa抗体の軽鎖可変領域由来のCDR2配列である、SEQ ID NO:10、16、21、25、および34に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:10、16、21、25、および34に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:10、16、21、25、および34に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR2配列を含みうる。その代わりにまたはさらに、ポリペプチドは、Coa抗体の軽鎖可変領域由来のCDR3配列である、SEQ ID NO:11、17、22、26、30、35、36、45、および57に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:11、17、22、26、30、35、36、45、および57に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:11、17、22、26、30、35、36、45、および57に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR3配列を含みうる。その代わりにまたはさらに、ポリペプチドは、Coa抗体の重鎖可変領域由来のCDR1配列である、SEQ ID NO:12、18、27、37、41、46、50、53、および58に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:12、18、27、37、41、46、50、53、および58に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:12、18、27、37、41、46、50、53、および58に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR1配列を含みうる。その代わりにまたはさらに、ポリペプチドは、Coa抗体の重鎖可変領域由来のCDR2配列である、SEQ ID NO:13、19、28、31、38、43、47、51、54、および59に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:13、19、28、31、38、43、47、51、54、および59に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97

、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:13、19、28、31、38、43、47、51、54、および59に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR2配列を含みうる。その代わりにまたはさらに、ポリペプチドは、Coa抗体の重鎖可変領域由来のCDR3配列である、SEQ ID NO:14、20、23、29、32、39、42、48、52、55、および60に記載の全配列と70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、SEQ ID NO:14、20、23、29、32、39、42、48、52、55、および60に記載の全配列と多くても70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるか、またはSEQ ID NO:14、20、23、29、32、39、42、48、52、55、および60に記載の全配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100% (もしくはその中における得られる任意の範囲)同一であるCDR3配列を含みうる。いくつかの態様において、SEQ ID NO:10、16、21、25、および34のいずれかの代わりにSEQ ID NO:61が用いられることが企図される。いくつかの態様において、CDR2はSEQ ID NO:61の配列を有する。

【0026】

他の態様によって、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1~2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィプロネクチン、または黄色ブドウ球菌プロテインZからなる群より選択されるポリペプチド由来の足場とを含む組換えポリペプチドが提供される。任意のポリペプチドが、作用物質または物質、そのような治療的部分または検出可能な部分に付着されうこと、融合されうこと、または結合されうることがさらに企図される。

【0027】

ある局面において、組換えポリペプチドは、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合する組換えポリペプチドに機能的に結合されている。

【0028】

他の態様において、ポリペプチドは、(a) VH領域ならびにIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ由来のヒトヒンジ領域、CH1領域、CH2領域、およびCH3領域を含む重鎖と；(b) VL領域およびヒト CLまたはヒト CLのいずれか一方を含む軽鎖とを含む抗体である。

【0029】

ある態様によって、ブドウ球菌Coaポリペプチドに特異的に結合し、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、1H7、6C10.19、または6C4.15モノクローナル抗体である、精製されたモノクローナル抗体が提供される。

【0030】

いくつかの局面において、精製されたポリペプチドは、4H9.20、5D5.4、4B10.44、3B3.14、7H4.25、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、および4F1.7であるマウスモノクローナル抗体からなることはない。他の態様において、精製されたポリペプチドは、単離されたマウスモノクローナル抗体ではない。

【0031】

他の態様によって、一種または複数種の精製されたCoa結合ポリペプチドを含む薬学的組成物が提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、密閉容器中の単回用量の精製されたポリペプチドを提供する。薬学的組成物は、抗生物質を含むか、ブドウ球菌ワクチン組成物を含むか、または、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合するポリペプチドを含むが、これらに限定されない、少なくとも第二の抗菌物質を含みうる。

【0032】

ある態様によって、Coa結合ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチドが提供される。

【0033】

他の態様によって、発現制御配列に機能的に連結されたCoa結合ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、発現ベクターが提供される。いくつかの態様によって、発現ベクタ

10

20

40

50

ーを含む宿主細胞が提供される。

【0034】

態様によって、発現制御配列に機能的に連結されたポリペプチドをコードする核酸配列を宿主細胞において発現させる段階を含む、Coa結合ポリペプチドを製造するための方法も提供される。

【0035】

態様によって、細菌感染および/またはブドウ球菌感染の処置のための方法および組成物におけるCoa抗体の使用も提供される。ある態様において、組成物は、細菌感染、特にブドウ球菌感染の治療的および/または予防的処置のための薬物の製造において用いられる。さらに、いくつかの態様には、細菌感染を処置するために(例えば、対象におけるブドウ球菌膿瘍の形成および/もしくは持続を制限するために)または予防するために用いられる方法および組成物がある。

10

【0036】

ある局面は、Coaポリペプチドを特異的に結合させる1つまたは複数の精製された抗体の有効量を、ブドウ球菌感染を有する患者またはブドウ球菌感染を有すると疑われる患者に投与する段階を含む、ブドウ球菌感染または膿瘍形成を減少させる方法に指向している。抗体は、精製されたポリクローナル抗体、精製されたモノクローナル抗体、組換えポリペプチド、またはその断片でありうる。ある局面において、抗体はヒト化されたものまたはヒトのものである。さらなる局面において、抗体は組換え抗体セグメントである。ある局面において、モノクローナル抗体は、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、1H7、6C10.19または6C4.15の1つまたは複数を含む。抗体は、0.1、0.5、1、5、10、50、100 mgもしくは $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~5、10、50、100、500 mgもしくは $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、またはその中における得られる任意の範囲の用量で投与されうる。組換え抗体セグメントは、第二の組換え抗体セグメントに機能的に結合されうる。ある局面において、第二の組換え抗体セグメントは第二のブドウ球菌タンパク質を結合させる。本方法は、第二のブドウ球菌タンパク質を結合させる第二の抗体を投与する段階をさらに含むことができる。ある局面において、本方法は抗生物質を投与する段階をさらに含む。

20

【0037】

態様は、モノクローナル抗体ポリペプチド、その1つまたは複数のセグメントを有するポリペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチドに指向している。ある局面において、ポリペプチドは、Coa特異的抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の全部または一部を含むことができる。さらなる局面において、ポリペプチドは、抗体、例えば、Coa特異的抗体の軽可変鎖由来および/または重可変鎖由来の第一、第二、および/または第三の相補性決定領域(CDR)に対応するアミノ酸配列を含むことができる。

30

【0038】

なおいっそうさらなる局面、態様において、態様のモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ細胞株を提供する。態様において、ハイブリドーマ細胞株は、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、1H7、6C10.19、または6C4.15モノクローナル抗体を产生する株である。さらなる局面において、MAbの軽鎖可変領域由来および/または重鎖可変領域由来の1つ、2つ、および/または3つのCDRがヒト化抗体またはその変種において含まれうる。

40

【0039】

ある局面は、Coaポリペプチドを特異的に結合させる精製された、抗体または結合ポリペプチドの有効量を、ブドウ球菌感染を有する患者またはブドウ球菌感染を有すると疑われる患者に投与する段階を含む、ブドウ球菌感染を有する対象またはブドウ球菌感染を有すると疑われる対象を処置する方法に指向している。

【0040】

さらなる局面において、方法は、ブドウ球菌の感染の前にCoaポリペプチドを結合させる抗体の有効量を、ブドウ球菌感染のリスクのある患者に投与する段階を含む、ブドウ球

50

菌感染のリスクのある対象の処置に指向している。

【0041】

ある態様は、上記のペプチドセグメントを特異的に結合させる単離されたおよび/または組換えの抗体またはポリペプチドを含む、抗体または結合ポリペプチド組成物に指向している。ある局面において、抗体またはポリペプチドは、本明細書において提供されるいずれかのモノクローナル抗体の全部または一部と、80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中において得られる任意の範囲)同一である配列、少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中において得られる任意の範囲)同一である配列、あるいは多くても80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中において得られる任意の範囲)同一である配列を有する。

10

【0042】

さらなる態様には、本明細書において論じられる1つまたは複数のポリペプチドまたは抗体もしくは抗体断片を含む薬学的組成物がある。そのような組成物はさらなる活性成分を含有してもまたは含有しなくてもよい。

【0043】

ある態様には、本明細書において論じられる1つまたは複数の抗体または抗体断片を含むポリペプチドから本質的になる薬学的組成物がある。組成物は非活性成分を含有してもよいものと企図される。

【0044】

他の局面は、有効な抗菌量の、上記ペプチドを特異的に結合させる抗体および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物に指向している。

20

【0045】

「提供」という用語は、その通常の意味にしたがって「使用のために供給するかまたは与えること」を示すように用いられる。いくつかの態様において、タンパク質は、本明細書において記述される抗体またはその断片を含む組成物を投与することによって直接的に提供される。

【0046】

対象は典型的には、ブドウ球菌感染を有する(例えば、持続性ブドウ球菌感染と診断されている)か、ブドウ球菌感染を有することが疑われるか、または、ブドウ球菌感染を発症するリスクがある。組成物には、意図した目的、すなわち、ブドウ球菌感染の処置または防御を達成するのに有効な量でCoa結合ポリペプチドが含まれる。「結合ポリペプチド」という用語は、抗原への抗体の結合などの、標的分子に特異的に結合するポリペプチドをいう。結合ポリペプチドは、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片に由来してもよいが、由来しなくてもよい。より具体的には、有効量とは、感染に対する耐性、感染の改善、または感染の緩和をもたらすのに必要な活性成分の量を意味する。より具体的な局面において、有効量は、疾患もしくは感染の症状を予防、軽減、もしくは改善するか、または、処置される対象の生存を引き延ばす。有効量の決定は十分に、とりわけ本明細書において提供される詳細な開示に照らして、当業者の能力の範囲内である。本明細書において記述される方法において用いられるどの調製物についても、有効な量または用量は、インビトロ、細胞培養、および/または動物モデルのアッセイ法から最初に推定することができる。例えば、所望の反応を達成するため、動物モデルにおいて用量を処方することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をさらに正確に決定することができる。

30

【0047】

組成物は、Coaを結合させる抗体を含むことができる。抗体は、抗体断片、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体などであることができる。ある局面において、Coa抗体は、対象においてCoaを結合させる抗体の産生をもたらすCoaペプチドまたは抗原またはエピトープを提供することによって誘発される。Coa抗体は、典型的には、薬学的に許容される組成物に製剤化される。Coa抗体組成物は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、もしくは19種、またはそれ以上のブドウ球菌抗

40

50

原またはその免疫原性断片をさらに含むことができる。ブドウ球菌抗原は、Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、IsdA、IsdB、SdrC、SdrD、SdrE、ClfA、ClfB、Coa、Hla（例えば、H35変異体）、IsdC、SasF、vWa、SpA、およびその変種(2009年4月3日付で出願された米国仮特許出願第61/166,432号；2009年4月20日付で出願された同第61/170,779号；および2009年10月6日付で出願された同第61/103,196号を参照されたい；これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる）、vWh、52 kDaのビトロネクチン結合タンパク質(WO 01/60852)、Aaa (GenBank CAC80837)、Aap (GenBank アクセッションAJ249487)、Ant (GenBank アクセッションNP_372518)、自己溶菌酵素グルコサミニダーゼ、自己溶菌酵素アミダーゼ、Cna、コラーゲン結合タンパク質(US6288214)、EFB (FIB)、エラスチン結合タンパク質(EbpS)、EPB、FbpA、フィブリノゲン結合タンパク質(US6008341)、フィブロネクチン結合タンパク質(US5840846)、FnB、FnB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫優性ABC輸送体、IsaA/PisA、ラミニン受容体、リパーゼGehD、MAP、Mg2+輸送体、MHC II類似体(US5648240)、MRP11、Npase、RNA III活性化タンパク質(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG / Fig (WO 00/12689)、SdrH (W 0 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitCおよびNi ABC輸送体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2、ならびに/またはビトロネクチン結合タンパク質(PCT公報WO2007/113222、WO2007/113223、WO2006/032472、WO2006/032475、WO2006/032500を参照されたく、これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)の全部またはセグメントを含むが、これらに限定されることはない。ブドウ球菌抗原、または免疫原性断片もしくはセグメントをCoa抗体と同時に投与することができる。ブドウ球菌抗原または免疫原性断片およびCoa抗体を、同じまたは異なる組成物中で、および同じまたは異なる時点で投与することができる。組成物は、黄色ブドウ球菌の多数株由来のCoaポリペプチドを結合させる多数の（例えば、2個、3個、4個、またはそれ以上）Coa抗体を含みうる。

【 0 0 4 8 】

Coa抗体組成物は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、もしくは19種、またはそれ以上(またはその中において得られる任意の範囲)のブドウ球菌抗原またはその免疫原性断片に対する抗体、抗体断片または抗体小断片をさらに含むことができる。そのような抗体、抗体断片または抗体小断片が対象にするブドウ球菌抗原は、Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、IsdA、IsdB、SdrC、SdrD、SdrE、ClfA、ClfB、Coa、Hla（例えば、H35変異体）、IsdC、SasF、vWa、SpA、およびその変種(2009年4月3日付で出願された米国仮特許出願第61/166,432号；2009年4月20日付で出願された同第61/170,779号；および2009年10月6日付で出願された同第61/103,196号を参照されたく；これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる）、vWh、52 kDaのビトロネクチン結合タンパク質(WO 01/60852)、Aaa (GenBank CAC80837)、Aap (GenBank アクセッションAJ249487)、Ant (GenBank アクセッションNP_372518)、自己溶菌酵素グルコサミニダーゼ、自己溶菌酵素アミダーゼ、Cna、コラーゲン結合タンパク質(US6288214)、EFB (FIB)、エラスチン結合タンパク質(EbpS)、EPB、FbpA、フィブリノゲン結合タンパク質(US6008341)、フィブロネクチン結合タンパク質(US5840846)、FnB、FnB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫優性ABC輸送体、IsaA/PisA、ラミニン受容体、リパーゼGehD、MAP、Mg2+輸送体、MHC II類似体(US5648240)、MRP11、Npase、RNA III活性化タンパク質(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG / Fig (WO 00/12689)、SdrH (W 0 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitCおよびNi ABC輸送体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2、ならびに/またはビトロネクチン結合タンパク質(PCT公報WO2007/113222、WO2007/113223、WO2006/032472、WO2006/032475、WO2006/032500を参照されたく、これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)の全部またはセグメントを含むが、これらに限定されることはない。他のブドウ球菌抗原またはその免疫原性断片に対する抗体、抗体断片または抗体小断片をCoa抗体と同時に投与することができる。他のブドウ球菌抗原またはその免疫原性断片に対する抗体、抗体断片または抗体小断片を、Coa抗体

10

20

30

40

50

と同じまたは異なる組成物中で、および同じまたは異なる時点で投与することができる。

【0049】

態様は、細菌を含有するかまたは含有しない組成物を含む。組成物は、弱毒化されたまたは生存可能なまたはインタクトなブドウ球菌を含んでもまたは含まなくてもよい。ある局面において、組成物は、ブドウ球菌ではない細菌を含むか、またはブドウ球菌を含有しない。ある態様において、細菌組成物は、単離されたもしくは組換え発現されたCoa抗体またはそれをコードする核酸を含む。なおいっそうさらなる局面において、Coa抗体は多量体化され、例えば、二量体、三量体、四量体などである。

【0050】

ある局面において、ペプチドまたは抗原またはエピトープは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のペプチドセグメントまたはペプチド模倣体の多量体として提示することができる。

10

【0051】

「単離された」という用語は、その起源の細胞物質、細菌物質、ウイルス物質もしくは培地(組換えDNA技術により產生される場合)、または化学的前駆物質もしくは他の化学物質(化学的に合成される場合)を実質的に含んでいない核酸またはポリペプチドをいうことができる。さらに、単離された化合物とは、単離されている化合物として対象に投与できるものをいい; 换言すれば、化合物は、カラムに付着されている場合、またはアガロースゲルに埋め込まれている場合には、単純に「単離されている」とは考えられない。さらに、「単離された核酸断片」または「単離されたペプチド」とは、断片として天然には存在していない、および/または典型的には機能的な状態がない、核酸またはタンパク質断片である。

20

【0052】

抗体、ペプチド、抗原、または免疫原などの組成物を、アジュバント、タンパク質、ペプチド、支持体、蛍光部分、または標識などの他の部分に、共有結合的または非共有結合的に結合または連結させることができる。「結合体」または「免疫結合体」という用語は、1つの部分と他の作用物質との機能的結合を定義するように広く用いられており、任意のタイプの機能的結合を単にいうようには意図されておらず、化学的「結合」に特に限定されることはない。組換え融合タンパク質が特に企図される。

30

【0053】

「Coa抗体」という用語は、ブドウ球菌由来のCoaタンパク質を特異的に結合させる抗体をいう。ある態様において、抗体は、特定のブドウ球菌細菌株由来の特異的なCoaタンパク質を結合させうる。

【0054】

なおいっそうさらなる局面において、組成物は、複数回以上対象に投与されてもよく、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20回、またはそれ以上(またはその中において得られる任意の範囲)の回数で投与されてもよい。組成物の投与は、吸入または吸引を含めて、経口投与、非経口投与、皮下投与および静脈内投与、またはその各種組み合わせを含むが、これらに限定されることはない。

【0055】

組成物は、典型的には、ヒト対象に投与されるが、ブドウ球菌に対する治療的有用性を提供できる他の動物、特にウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、トリ、および他の飼い慣らされた動物への投与が企図される。さらなる局面において、ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌である。なおいっそうさらなる局面において、方法および組成物は、組織または腺の感染を予防、改善、軽減、または処置するために用いられる。他の方法は、感染の兆候を呈していない対象、特に標的細菌に侵されていると疑われるかまたは標的細菌に侵されるリスクのある対象、例えば、入院、処置、および/または回復の間に感染のリスクのあるかもしくは感染しやすい患者または感染のリスクのあるもしくは感染しやすいと考えられる患者における細菌負荷量の予防的軽減を含むが、これに限定されることはない。

40

【0056】

50

なおいっそうさらなる態様には、(i) Coa抗体；もしくは(ii) それをコードする核酸分子を含む組成物の有効量を対象に投与する段階、または(iii) 本明細書において記述される細菌タンパク質の任意の組み合わせもしくは順列でCoa抗体を投与する段階を含む、ブドウ球菌に対する防御的組成物または治療的組成物を対象に提供するための方法が含まれる。

【0057】

実施例の項における態様は、組成物および方法を含む、本発明の全ての局面に適用可能な態様であると理解される。

【0058】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物だけをいうように明記されていない限りまたは代替物が相互排他的でない限り「および/または」を意味するよう用いられるが、本開示では、代替物のみと「および/または」とをいうという定義を支持する。「または」という用語を用いて記載されているどんなものでも明確に除外できることも企図される。 10

【0059】

本出願の全体を通じて「約」という用語は、値にはその値を決定するために使用される装置または方法に対しての誤差の標準偏差が含まれることを示すために用いられる。

【0060】

長年にわたる特許法にしたがって、「1つの(a)」および「1つの(an)」という単語は、特許請求の範囲または明細書において「含む(comprising)」という単語とともに用いられる場合、特に断りのない限り、1つまたは複数を意味する。 20

【0061】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる場合、「含む(comprising)」(ならびに「含む(comprise)」および「含む(comprises)」などの、含む(comprising)の任意の形態)、「有する(having)」(ならびに「有する(have)」および「有する(has)」などの、有する(having)の任意の形態)、「含む(including)」(ならびに「含む.includes)」および「含む(include)」などの、含む(including)の任意の形態)または「含有する(containing)」(ならびに「含有する(contains)」および「含有する(contain)」などの、含有する(containing)の任意の形態)という単語は、包括的または非制限的であり、さらなる、未引用の要素または方法の段階を除外しない。 30

【0062】

[本発明1001]

ブドウ球菌(Staphylococcus)感染を有すると判定された患者またはブドウ球菌感染のリスクがあると判定された患者においてブドウ球菌感染を阻害する方法であって、ブドウ球菌Coa結合ポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合するCoa結合ポリペプチドを含む組成物の有効量を該患者に投与する段階を含む、方法。

[本発明1002]

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coa結合ポリペプチドのドメイン1に特異的に結合する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coa結合ポリペプチドの結合について5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体と競合する、本発明1003の方法。 40

[本発明1004]

前記Coa結合ポリペプチドが、ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coa結合ポリペプチドに対する結合定数 約0.5～20 nM⁻¹、1.0～10 nM⁻¹、または1.0～6.0 nM⁻¹を有する、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記Coa結合ポリペプチドが、ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coaドメイン1～2に対する結合定数 約0.5～20 nM⁻¹または1.0～10 nM⁻¹を有する、本発明1001～1004のいずれかの方法。 50

[本発明1006]

精製された前記Coa結合ポリペプチドがモノクローナル抗体を含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

2種またはそれ以上の精製されたモノクローナル抗体の有効量を投与する段階をさらに含む、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記Coa結合ポリペプチドが組換え体である、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

組換えCoa結合ポリペプチドが単一ドメイン抗体である、本発明1001～1008のいずれかの方法。

10

[本発明1010]

前記Coa結合ポリペプチドがヒト化抗体またはキメラ抗体である、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインを含む、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4、7H4.25、4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの1つまたは複数のCDRドメインを含む、本発明1011の方法。

20

[本発明1013]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4、7H4.25、4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの2つまたはそれ以上のCDRドメインを含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4、7H4.25、4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの3つ、4つ、5つ、または6つのCDRドメインを含む、本発明1013の方法。

30

[本発明1015]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインと少なくとも70%同一の配列を含む、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4、7H4.25、4H9.20、4B10.44、3B3.14、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.19、8C2.9、または4F1.7モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインの中からの全6つのCDRドメインを含む、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

40

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体由来のVHドメインを含む、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

前記Coa結合ポリペプチドが、5D5.4または7H4.25モノクローナル抗体由来のVLドメインを含む、本発明1001～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合するCoa結合ポリペプチド由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィブロネクチン、または黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)プロテインZからなる群より選択されるポリペプチド由来の足場とを含む、本発明1001～1018のいずれかの方法。

50

[本発明1020]

前記Coa結合ポリペプチドが、第二の組換えCoa結合ポリペプチドに機能的に結合されている、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記第二の組換えCoa結合ポリペプチドが、第二のブドウ球菌タンパク質を結合させる、本発明1020の方法。

[本発明1022]

第二のブドウ球菌タンパク質を結合させる第二のCoa結合ポリペプチドを投与する段階をさらに含む、本発明1001～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

10 抗生物質またはブドウ球菌ワクチン組成物を投与する段階をさらに含む、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

前記Coa結合ポリペプチドが、約0.1 mg/kg～5 mg/kgの用量で投与される、本発明1001～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCoa結合ポリペプチドCDRドメインを含む、精製されたポリペプチド。

[本発明1026]

20 CDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、CDR3の各々と少なくとも80%同一である、本発明1025の精製されたポリペプチド。

[本発明1027]

前記CDR1、前記CDR2、および前記CDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、CDR3の各々と85%同一である、本発明1025または1026の精製されたポリペプチド。

[本発明1028]

前記CDR1、前記CDR2、および前記CDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、CDR3の各々と90%同一である、本発明1025～1027のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1029]

前記CDR1、前記CDR2、および前記CDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、CDR3の各々と95%同一である、本発明1025～1028のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1030]

前記CDR1、前記CDR2、および前記CDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖または重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、CDR3の各々と100%同一である、本発明1025～1029のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1031]

40 CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも80%同一である、本発明1026～1030のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1032]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも85%同一である、本発明1026～1031のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1033]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも90%同一である、本発明1026～1032のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1034]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも95%同一である、本発明1026～1033のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1035]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と100%同一である、本発明1026～1034のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1036]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1が、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:49、またはSEQ ID NO:56を含む、本発明1031～1035のいずれかの精製されたポリペプチド。 10

[本発明1037]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR2が、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:34、またはSEQ ID NO:61 (X₁X₂S、ここでX₁がA、S、K、またはWであり、かつX₂がA、T、またはVである)を含む、本発明1031～1036のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1038]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR3が、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:45、またはSEQ ID NO:57を含む、本発明1031～1037のいずれかの精製されたポリペプチド。 20

[本発明1039]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも80%同一である、本発明1026～1030のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1040]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも85%同一である、本発明1026～1030または1039のいずれかの精製されたポリペプチド。 30

[本発明1041]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも90%同一である、本発明1026～1030または1039～1040のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1042]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と少なくとも95%同一である、本発明1026～1030または1039～1041のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1043]

CDR1、CDR2、およびCDR3がそれぞれ、ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々と100%同一である、本発明1026～1030または1039～1042のいずれかの精製されたポリペプチド。 40

[本発明1044]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1が、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:49、またはSEQ ID NO:56を含む、本発明1026～1030または1039～1043のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1045]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR2が、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:43、S 50

EQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、またはSEQ ID NO:59を含む、本発明1026～1030または1039～1044のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1046]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR3が、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、またはSEQ ID NO:60を含む、本発明1026～1030または1039～1045のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1047]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の可変軽鎖および可変重鎖の各々由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該可変軽鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一であり、かつ、該可変重鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変重鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一である、本発明1026～1044のいずれかの精製されたポリペプチド。

10

[本発明1048]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の可変軽鎖および可変重鎖の各々由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該可変軽鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも85%同一であり、かつ、該可変重鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変重鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一である、本発明1026～1047のいずれかの精製されたポリペプチド。

20

[本発明1049]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の可変軽鎖および可変重鎖の各々由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該可変軽鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも90%同一であり、かつ、該可変重鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変重鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一である、本発明1026～1048のいずれかの精製されたポリペプチド。

30

[本発明1050]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の可変軽鎖および可変重鎖の各々由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該可変軽鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも95%同一であり、かつ、該可変重鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変重鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一である、本発明1026～1049のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1051]

ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の可変軽鎖および可変重鎖の各々由来のCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、該可変軽鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変軽鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも100%同一であり、かつ、該可変重鎖由来の該CDR1、該CDR2、および該CDR3がそれぞれ、可変重鎖由来のCDR1、CDR2、およびCDR3と少なくとも80%同一である、本発明1026～1049のいずれかの精製されたポリペプチド。

30

[本発明1052]

(a) ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1が、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:49、またはSEQ ID NO:56を含み；

40

(b) ブドメイン1～2ドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR2が、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:34、またはSEQ ID NO:61を含み；

(c) ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR3が、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:45、またはSEQ ID NO:57を含み；

(d) ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR1が、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:49、またはSEQ ID NO:56を含み；

(e) ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖の可変領域由来のCDR2が、SEQ ID NO:13、S

50

SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、またはSEQ ID NO:59を含み；かつ

(f) ドメイン1～2ブドウ球菌Coa抗体の重鎖由来のCDR3が、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、またはSEQ ID NO:60を含む。

本発明1047～1051のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1053]

SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、およびSEQ ID NO:11とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

10

[本発明1054]

SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、およびSEQ ID NO:17とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1055]

SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1056]

SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、およびSEQ ID NO:26とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

20

[本発明1057]

SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1058]

SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

30

[本発明1059]

SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:36とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1060]

SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1061]

SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:45とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

40

[本発明1062]

SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:25、およびSEQ ID NO:57とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1063]

SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリ

50

ペプチド。

[本発明1064]

SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1065]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:14とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1053のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1066]

SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、およびSEQ ID NO:20とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1054のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1067]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:23とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1055のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1068]

SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、およびSEQ ID NO:29とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1056のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1069]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:31、およびSEQ ID NO:32とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1057のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1070]

SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:39とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1058のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1071]

SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:42とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1059のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1072]

SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:38とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1060のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1073]

SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、およびSEQ ID NO:48とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1061のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1074]

SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、およびSEQ ID NO:52とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1101のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1075]

SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、およびSEQ ID NO:55とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1102のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1076]

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、およびSEQ ID NO:60とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1025～1052または1103のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1077]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:14とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1053の精製されたポリペプチド。

[本発明1078]

SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、およびSEQ ID NO:20とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1054の精製されたポリペプチド。

10

[本発明1079]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:23とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1055の精製されたポリペプチド。

[本発明1080]

SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、およびSEQ ID NO:29とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1056の精製されたポリペプチド。

[本発明1081]

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:31、およびSEQ ID NO:32とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1057の精製されたポリペプチド。

20

[本発明1082]

SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:39とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1058の精製されたポリペプチド。

[本発明1083]

SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:42とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1059の精製されたポリペプチド。

30

[本発明1084]

SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:38とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1060の精製されたポリペプチド。

[本発明1085]

SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、およびSEQ ID NO:48とそれぞれ配列が少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、本発明1061の精製されたポリペプチド。

[本発明1086]

SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、およびSEQ ID NO:52とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1101の精製されたポリペプチド。

40

[本発明1087]

SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、およびSEQ ID NO:55とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1102の精製されたポリペプチド。

[本発明1088]

SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、およびSEQ ID NO:60とそれぞれ配列が少なくとも80%同一である第二のCDR1、CDR2、およびCDR3をさらに含む、本発明1103の精製されたポリペプチド。

[本発明1089]

50

4H9.20の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、およびSEQ ID NO:11ならびに4H9.20の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:14の配列を含む、本発明1065の精製されたポリペプチド。

[本発明1090]

5D5.4の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、およびSEQ ID NO:17ならびに5D5.4の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、およびSEQ ID NO:20の配列を含む、本発明1066の精製されたポリペプチド。

[本発明1091]

4B10.44の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:9、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22ならびに4B10.44の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、およびSEQ ID NO:23の配列を含む、本発明1067の精製されたポリペプチド。

10

[本発明1092]

3B3.14の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、およびSEQ ID NO:26ならびに3B3.14の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、およびSEQ ID NO:29の配列を含む、本発明1068の精製されたポリペプチド。

[本発明1093]

7H4.25の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:9、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:30ならびに7H4.25の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:12、SEQ ID NO:31、およびSEQ ID NO:32の配列を含む、本発明1069の精製されたポリペプチド。

20

[本発明1094]

2A3.1の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35ならびに2A3.1の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:39の配列を含む、本発明1070の精製されたポリペプチド。

[本発明1095]

2H10.12の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:36ならびに2H10.12の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:41、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:42の配列を含む、本発明1071の精製されたポリペプチド。

[本発明1096]

6D1.22の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35ならびに6D1.22の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:38の配列を含む、本発明1072の精製されたポリペプチド。

30

[本発明1097]

6C4.15の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:44、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:45ならびに6C4.15の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、およびSEQ ID NO:48の配列を含む、本発明1073の精製されたポリペプチド。

[本発明1098]

6C10.19の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:56、SEQ ID NO:25、およびSEQ ID NO:57ならびに6C10.19の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、およびSEQ ID NO:52の配列を含む、本発明1074の精製されたポリペプチド。

40

[本発明1099]

8C2.9の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:40、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35ならびに8C2.9の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、およびSEQ ID NO:55の配列を含む、本発明1075の精製されたポリペプチド。

[本発明1100]

4F1.7の軽鎖可変領域由来のSEQ ID NO:49、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35ならびに4F1.7の重鎖可変領域由来のSEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、およびSEQ ID NO:60の配列を含む、本発明1076の精製されたポリペプチド。

[本発明1101]

4H9.20、5D5.4、4B10.44、3B3.14、7H4.25、2A3.1、2H10.12、6D1.22、6C4.15、6C10.1
9、8C2.9、および4F1.7であるマウスモノクローナル抗体からなることはない、本発明102

50

5~1061のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1102]

単離されたマウスモノクローナル抗体ではない、本発明1025~1101のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1103]

ヒト化されているかまたはキメラである、本発明1025~1102のいずれかの精製されたポリペプチド。

[本発明1104]

前記Coa結合ポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドの結合について4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体と競合する、本発明1025のポリペプチド。

10

[本発明1105]

ELISAによって測定した場合に、ブドウ球菌Coaポリペプチドに対する結合定数 約0.1~20 nM⁻¹、0.5~10 nM⁻¹、または1.0~10 nM⁻¹を有する、本発明1025のポリペプチド。

[本発明1106]

単一ドメイン抗体Coa結合ポリペプチドを含む、本発明1025のポリペプチド。

[本発明1107]

ヒト化抗体またはキメラ抗体を含む、本発明1025のポリペプチド。

[本発明1108]

組換え体である、本発明1025のポリペプチド。

20

[本発明1109]

組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来またはVLドメイン由来の1つまたは複数のCDRドメインの少なくとも90%を含む、本発明1108のポリペプチド。

[本発明1110]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来またはVLドメイン由来の2つまたはそれ以上のCDRドメインを含む、本発明1109のポリペプチド。

30

[本発明1111]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来またはVLドメイン由来の3つのCDRドメインを含む、本発明1109のポリペプチド。

[本発明1112]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインと少なくとも90%同一の配列を含む、本発明1025のポリペプチド。

[本発明1113]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメイン由来およびVLドメイン由来の6つのCDRドメインを含む、本発明1111のポリペプチド。

40

[本発明1114]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVHドメインを含む、本発明1113のポリペプチド。

[本発明1115]

前記組換えポリペプチドが、4H9.20、4B10.44、3B3.14、4F1.7、8C2.9、2A3.1、5C3.2、2H10.12、6D1.22、5D5.4、または7H4.25モノクローナル抗体のVLドメインを含む、本発明1113のポリペプチド。

[本発明1116]

50

前記組換えポリペプチドが、ブドウ球菌Coaポリペプチドのドメイン1～2に特異的に結合する抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィブロネクチン、または黄色ブドウ球菌プロテインZからなる群より選択されるポリペプチド由来の足場とを含む、本発明1109のポリペプチド。

[本発明1117]

組換えポリペプチドが、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合する組換えポリペプチドに機能的に結合されている、本発明1108のポリペプチド。

[本発明1118]

(a) 前記VH領域ならびにIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプ由来のヒトヒンジ領域、CH1領域、CH2領域、およびCH3領域を含む重鎖と；(b) 前記VL領域およびヒトCLまたはヒトCLのいずれか一方を含む軽鎖とを含む抗体である、本発明1108のポリペプチド。

10

[本発明1119]

ブドウ球菌Coaポリペプチドに特異的に結合し、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、1H7、6C10.19、または6C4.15モノクローナル抗体である、精製されたモノクローナル抗体。

[本発明1120]

本発明1025～1118のいずれかの精製されたポリペプチドを含む、薬学的組成物。

[本発明1121]

密閉容器中の単回単位用量の前記精製されたポリペプチドを含む、本発明1120の薬学的組成物。

20

[本発明1122]

少なくとも第二の抗菌物質を含む、本発明1120または1121の薬学的組成物。

[本発明1123]

前記第二の抗菌物質が、抗生物質であるか、ブドウ球菌ワクチン組成物であるか、または、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合するポリペプチドである、本発明1122の薬学的組成物。

[本発明1124]

本発明1025～1118のいずれかのポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

[本発明1125]

30

発現制御配列に機能的に連結された本発明1025～1118のいずれかのポリペプチドをコードする核酸配列を含む、発現ベクター。

[本発明1126]

本発明1125の発現ベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1127]

発現制御配列に機能的に連結されたポリペプチドをコードする核酸配列を宿主細胞において発現させる段階を含む、本発明1025～1118のいずれかのポリペプチドを製造する方法。

[本発明1128]

ブドウ球菌感染を有する患者またはブドウ球菌感染のリスクがある患者を処置する方法であって、本発明1025～1118のいずれかのCoa結合ポリペプチドを含む組成物の有効量を該患者に投与する段階を含む、方法。

40

本発明の他の目標、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなると考えられる。しかしながら、詳細な説明および具体的な例は、本発明の特定の態様を示しているが、この詳細な説明から当業者には本発明の趣旨および範囲のなかで種々の変更および修正が明らかになると考えられるので、単なる例示として与えられるものと理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0063】

本発明の上記の特徴、利点、および目標、ならびにこれ以外に明らかになるものをつか

50

み、詳細に理解できるように、上記に簡単に要約した本発明の、より具体的な説明およびある態様を添付図面に示す。これらの図面は明細書の一部をなす。しかしながら、添付図面は本発明のある態様を示すものであり、それゆえ、その範囲を限定するものと見なされるべきではないことに留意されたい。

【図1】図1Aおよび1B：黄色ブドウ球菌Newman由来コアグラーーゼ(Coa_{NM})の一次構造、およびある特定のCoa特異的モノクローナル抗体によって標的化されるコアグラーーゼの領域の例証。図1A：大腸菌(E. coli)からN末端His₆タグを介して精製された、黄色ブドウ球菌Newman由来コアグラーーゼ(Coa_{NM})の一次構造の例証を示す。Coa_{NM}は、プロトロンビン結合に関するD1およびD2ドメイン、リンカー(L)ドメイン、ならびにフィブリノゲンに結合する27残基のペプチド配列の縦列反復から構成される反復(R)ドメインを包含する。Coa_{NM}に加えて、D_{1Coa}、D_{2Coa}、D_{12Coa}、L_{Coa}、およびR_{Coa}ドメインならびにアミノ酸番号1～8のないD_{1Coa}の構築物D₁～₁₈は、N末端His₆タグで精製された。図1B：Coa特異的モノクローナル抗体5D5、8C2、6C10、3B3、6C4、および7H4によって標的化されるコアグラーーゼの領域の例証を示す。

【図2】図2Aおよび2B：Mab 5D5.4はCoa・プロトロンビン活性を乱す。(A) Coa・プロトロンビン酵素活性を発色性基質S-2238で測定した。Mab 5D5.4または(ATCCアクセッション番号_)ポリクローナル精製-Coaとのブレインキュベーションの後に、活性は減少された。一元配置ANOVA、引き続きダネットの事後多重比較検定を用いて統計解析の評価を行った。(B) Coa_{NM}とヒトプロトロンビンとの結合は、ELISAにより測定され、漸増濃度のMab 5D5.4または対照IgG1でかく乱された。アイソタイプ対照と比較、* P < 0.05、** P < 0.01。

【図3】図3Aおよび3B：凝固中和抗体の防御価値。モノクローナル抗体5D5.4、7H4.25、(ATCCアクセッション番号_)もしくはIgG1アイソタイプ対照(A)または8C2.9もしくはIgG2aアイソタイプ対照(B)を未処置BALB/cマウスの腹腔へ体重1 kgあたり5 mgの濃度で注射した。受動免疫されたマウスを黄色ブドウ球菌Newman同質遺伝子変異体vwb (2×10^8 CFU)の静脈内注射によって曝露し、動物の生存を10日間にわたりモニターした。

【図4】異なるCoa血清型の臨床分離株による感染に対するMab 5D5.4の交差防御。モノクローナル抗体5D5.4またはIgG1アイソタイプ対照を未処置BALB/cマウスの腹腔へ体重1 kgあたり5 mgの濃度で注射した。受動免疫されたマウスを黄色ブドウ球菌株(A) N315 (1×10^8 CFU)または(B) MW2 (2×10^8 CFU)の静脈内注射によって曝露し、動物の生存を10日間にわたりモニターした。

【図5】図5A～5D：マウスに5D5.4またはIgG1アイソタイプ対照の腹腔内注射を与え、その後、致死量の黄色ブドウ球菌株Newman (CoaタイプIII) (図5A)、N315 (CoaタイプII) (図5B)、CowanI (CoaタイプIV) (図5C)、またはMW2 (CoaタイプVII) (図5D)を感染させ、マウスを10日の観察期間にわたりモニターして、その防御の役割を評価した。5D5.4処理は、菌株Newman (IgG1対5D5.4, P < 0.01)、N315 (IgG1対5D5.4, P < 0.05)、CowanI (IgG1対5D5.4, P < 0.05)またはMW2 (IgG1対5D5.4, P < 0.05)で曝露された動物に対して死までの時間の遅延をもたらした。

【図6】図6A～6D：CT_{Coa}を認識するモノクローナル抗体。(AおよびB) CT_{Coa}とヒトフィブリノゲンとの結合は、ELISAにより測定され、漸増濃度のMab 3B3.14もしくは対照IgG1(A)またはMab 6C4.15もしくは対照IgG2b (B)でかく乱された。アイソタイプ対照と比較、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001。(CおよびD) モノクローナル抗体3B3.14もしくはIgG1対照(C)または6C4.15もしくはIgG2b (D)を未処置BALB/cマウスの腹腔へ体重1 kgあたり5 mgの濃度で注射した。受動免疫されたマウスを黄色ブドウ球菌株vwbの静脈内注射によって曝露し、動物の生存を10日間にわたりモニターした。

【図7】図7A～7D：マウスに3B3.14またはIgG1アイソタイプ対照の腹腔内注射を与え、その後、致死量の黄色ブドウ球菌臨床分離株USA300 (CoaタイプIII) (図7A)、N315 (CoaタイプII) (図7B)、CowanI (CoaタイプIV) (図7C)、またはMW2 (CoaタイプVII) (図7D)を感染させ、マウスを10日の観察期間にわたりモニターして、その防御の役割を評価した。3B3.14は野生型Newman (IgG1対3B3.14 p > 0.05 図7A)、N315 (IgG1対3B3.14 p < 0.05 図7B)

10

20

30

40

50

、またはMW2 (IgG1対3B3.14 p.0.05 図7D)を用いた曝露からマウスを防御しなかった。3B 3.14は菌株CowanIを用いた曝露後に死までの時間の小幅な遅延を与えた(IgG1対3B3.14 p < 0.001; 図7C)。

【図8】USA300 (SEQ ID NO:1)、N315 (SEQ ID NO:2)、MRSA252 (SEQ ID NO:4)、MW2 (SEQ ID NO:3)、およびWIS (SEQ ID NO:5)由来のCoa配列のアライメント。

【発明を実施するための形態】

【0064】

発明の詳細な説明

黄色ブドウ球菌は、ヒトの皮膚および鼻孔の片利共生生物であり、血流、皮膚、および軟組織の感染の主因である(Klevens et al., 2007)。ブドウ球菌疾患の死亡率の最近の劇的な増加は、抗生物質に対して感受性を示さないことが多いメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)株の広がりに起因する(Kennedy et al., 2008)。大規模な遡及的研究において、米国ではMRSA感染の発生率が全入院の4.6%であった(Klevens et al., 2007)。米国では94,300人のMRSA感染個体のための年間医療費は24億ドルを超える(Klevens et al., 2007)。現在のMRSA流行病は、予防ワクチンの開発によって取り組む必要がある公衆衛生の危機を引き起こしている(Boucher and Corey, 2008)。これまでに、黄色ブドウ球菌疾患を予防するFDA認可済みワクチンは使用可能ではない。

【0065】

コアグラーーゼ(Coa)は、ブドウ球菌性敗血症の発病において重要な毒性因子である。Coa:プロトロンビン複合体によるフィブリノゲンへのフィブリノゲンの変換によって、黄色ブドウ球菌は、免疫防御を回避して、全身に広がることができる。Coaに対する体液性免疫は、マウス敗血症モデルにおいて防御性である。以前の研究によって、N末端およびC末端の両方において防御性エピトープが存在すること、ならびに菌株間でのCoaのN末端の遺伝的多様性に起因するタイプ特異的な免疫が存在することが実証された。

【0066】

本発明者らは、本明細書でブドウ球菌コアグラーーゼ結合抗体およびその抗原結合決定基について記述する。詳細には、モノクローナル抗体のパネルをCoaに対して作製し、タンパク質の個々のドメインに対するその親和性およびその凝固障害に基づいて特徴決定した。インピトロでの特徴に基づき、いくつかのモノクローナル抗体をマウス敗血症モデルでの防御について試験し、N末端の保存部分における防御性エピトープの特定をもたらした。重要なことには、このエピトープを標的にする抗体は、動物へ投与される場合に、毒性黄色ブドウ球菌による曝露後のブドウ球菌性敗血症を減少させることができる。これらの分子はCoaのプロトロンビン活性化効果を遮断することができるので、そのような抗体はまた、ブドウ球菌感染後の宿主免疫反応を増強しうる。したがって、本態様のCoa結合分子により、ブドウ球菌疾患を処置または予防するための新たなかつ有効な道が拓かれる。

【0067】

I. コアグラーーゼポリペプチド

態様のある局面は、コアグラーーゼ(Coa)ポリペプチドに関する。黄色ブドウ球菌Newman (Coa_{NM})由来のCoaの一次構造の説明図は、図1Aに提供されている。8種の黄色ブドウ球菌株由来のCoaの核酸配列は、次の通りにSEQ ID NO:1~8で提供されている: USA300 (SEQ ID NO:1)、N315 (SEQ ID NO:2)、MW2 (SEQ ID NO:3)、MRSA252 (SEQ ID NO:4)、WIS (SEQ ID NO:5)、MU50 (SEQ ID NO:6)、85/2082 (SEQ ID NO:7)、およびNewman (SEQ ID NO:8)。USA300 (SEQ ID NO:1)、N315 (SEQ ID NO:2)、MRSA252 (SEQ ID NO:4)、MW2 (SEQ ID NO:3)、およびWIS (SEQ ID NO:5)由来のCoa配列のアライメントは、図6に提供されている。

【0068】

コアグラーーゼはそのN末端ドメインD1およびD2を通じて宿主プロトロンビンと相互作用する。D1およびD2の3本鎖ヘリックスバンドルは、構造類似性を共有するが、しかし配列レベルでは十分に保存されていない[66]。最初の150個のアミノ酸は、D1ドメインを含む[

10

20

30

40

50

68]。Coaのアミノ末端テトラペプチドは、プロトロンビンの活性化ポケットに挿入し、プロトロンビンAsp194と塩橋を形成する[66]。Coaとプロトロンビンとの間の2つの高親和性の結合相互作用のうちの第一のものは、プロトロンビンの148ループとともにD1内の疎水性表面溝を通じて起こる[66]。SC_{150～282}はD2ドメインを含む[68]。第二の高親和性の結合相互作用は、プロトロンビンエキソサイトIのTyr76の側鎖とD2ヘリックスとの間ににおいてである[66]。Coaは溶液中で二量体を形成し、各单量体がプロトロンビン1分子を結合させている[66]。プロトロンビンとD1D2ドメインの組換え構築物とによって形成される複合体(SC_{1～325})は、プロトロンビンの基質結合エキソサイトとは異なる相互作用によってフィブリノゲンを結合させることができる[133]。

【0069】

10

Coaのその他の2つのドメインはあまりよくわかっていない。D2の後には、未知の機能を有する高度に保存されたリンカー(L)領域が存在する[77]。C末端の近くには、27アミノ酸のペプチドの縦列反復の領域が存在し、反復の数は菌株の間で異なる[77]。反復領域はフィブリノゲンとの高親和性の結合に関与するものと考えられている[133、214]。

【0070】

Coaをコードする遺伝子(coa)は、全ての黄色ブドウ球菌の染色体上に見出されるが、しかしそれは最も可変性のタンパク質のうちの1つであり、12種の既知のタイプを有する(Watanabe et al 2005, Watanabe et al 2009)。Coa対立遺伝子間の可変性の大部分は、D1およびD2ドメインにある。リンカー領域は、血清型の間の同一性86.7%で比較的保存されている(Watanabe et al 2005)。注目すべきは、成熟Coaのアミノ末端、すなわちシグナルペプチダーゼ切断部位の後の最初の7残基は、プロトロンビンを活性化し、これらの残基は、分析された全ての菌株の間で保存されている[68]。27残基ペプチドのC末端の縦列反復は、5つから9つまで数が変化するが、しかし血清型の間で90%超の同一性を有する(Watanabe et al 2005)。SC_{1～282}におけるエピトープを認識する抗体は、Coa-プロトロンビン複合体の酵素活性を遮断することが必要である[215]。インビボで、C末端の反復に対する抗体はまた防御を付与する[215]が、防御の機構はまだ不明である。

20

【0071】

Coaポリペプチドは、サブユニットワクチンとして用いられ、体液性免疫反応を惹起し、黄色ブドウ球菌の曝露に対する防御免疫を付与することができる。ある態様において、複数の黄色ブドウ球菌株にわたるCoa異形を標的にする多価ワクチンが企図される。この態様は、Molly McAdow、Andrea DeDent、Alice Cheng、Carla Emolo、Dominique Missiaak as、Olaf Schneewindの名において「STAPHYLOCOCCAL COAGULASE ANTIGENS AND METHODS OF THEIR USE」という名称で2012年4月26日付で出願された米国仮特許出願において論じられており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0072】

II. タンパク質性組成物

タンパク質は、組換えであってもまたはインビトロで合成されてもよい。あるいは、非組換えまたは組換えタンパク質を細菌から単離してもよい。そのような変種を含有する細菌を、組成物および方法のなかで実践できることも考えられる。結果的に、タンパク質は単離されなくてもよい。

40

【0073】

「機能的に等価なコドン」という用語は、アルギニンまたはセリンに対する6種のコドンなどの、同じアミノ酸をコードするコドンをいうように、本明細書において用いられ、同様に、生物学的に等価のアミノ酸をコードするコドンもいう(以下のコドン表を参照のこと)。

【0074】

コドン表

アミノ酸			コドン
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
システイン	Cys	C	UGC UGU
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
ヒスチジン	His	H	CAC CAU
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU
リジン	Lys	K	AAA AAG
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
バリン	Val	V	GUU GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU

【0075】

10

アミノ酸および核酸の配列は、タンパク質の発現が関与している生物学的タンパク質活性の維持を含めて、上記の基準を満たす限り、それぞれ、さらなるN末端もしくはC末端アミノ酸、または5'もしくは3'配列などのさらなる残基を含むこともあり、それでも本質的には、本明細書において開示されている配列の1つに記載の通りでありうることも理解されると考えられる。末端配列の付加は核酸配列に特に当てはまり、例えば、コード領域の5'部分または3'部分のいずれか一方に隣接する種々の非コード配列を含むことができる。

【0076】

20

置換変種は、典型的には、タンパク質内の1つまたは複数の部位での1つのアミノ酸と別のアミノ酸との交換を含み、他の機能または特性を失ってかまたは失うことなく、ポリペプチドの1つまたは複数の特性を修飾するように設計されてもよい。置換は保存的であってもよく、すなわち、1つのアミノ酸が類似の形状および電荷のアミノ酸に置換されてもよい。保存的置換は当技術分野において周知であり、これには、例えば、アラニンのセリンへの、アルギニンのリジンへの、アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの、アスパラギン酸のグルタミン酸への、システインのセリンへの、グルタミンのアスパラギンへの、グルタミン酸のアスパラギン酸への、グリシンのプロリンへの、ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの、イソロイシンのロイシンまたはバリンへの、ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの、リジンのアルギニンへの、メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの、フェニルアラニンのチロシン、ロイシンまたはメチオニンへの、セリンのトレオニンへの、トレオニンのセリンへの、トリプトファンのチロシンへの、チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの、および、バリンのイソロイシンまたはロイシンへの変化が含まれる。あるいは、置換はポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように非保存的であってもよい。非保存的変化は、典型的には、非極性アミノ酸または非荷電アミノ酸の代わりに極性アミノ酸または荷電アミノ酸を用いておよびその逆など、1つの残基を化学的に異なる残基に置換することを含む。

30

【0077】

40

以下は、等価なまたは場合によっては改善された、第二世代の分子を作製するためにタンパク質のアミノ酸を変化させることに基づく考察である。例えば、ある特定のアミノ酸を、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互作用結合能をさほど失わないようにタンパク質構造中の他のアミノ酸の代わりに用いることができる。タンパク質の機能活性を規定するのはタンパク質の相互作用能および性質であるこ

50

とから、タンパク質配列の中に、およびその基礎となるDNAコード配列の中にある特定のアミノ酸置換を施し、それでも、類似の特性を有するタンパク質を產生させることができる。このように、遺伝子のDNA配列において、その生物学的有用性または活性をさほど失わないように種々の変化を施すことができるものと本発明者らは企図している。

【0078】

そのような変化を加える場合、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮してもよい。タンパク質に相互作用生物機能を付与する際の疎水性親水性アミノ酸指数の重要性は、一般的に当技術分野において理解されている(Kyte and Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的な疎水性親水性指標の特徴が、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、さらには、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することが容認されている。10

【0079】

同様に、親水性に基づいて有効に同類のアミノ酸の置換がなされることも当技術分野において理解される。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性が、タンパク質の生物特性と相關すると述べている。1つのアミノ酸を、類似の親水性値を有する別のアミノ酸に置換することができ、それでもなお、生物学的に等価かつ免疫学的に等価なタンパク質を作製することができると理解される。

【0080】

上記で概説した通り、アミノ酸の置換は一般的に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づく。前述のさまざまな特徴を考慮に入れた例示的置換は周知であり、アルギニンおよびリジン；グルタメートおよびアスパルテート；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンを含む。20

【0081】

組成物においては、1 mlあたり約0.001 mg～約10 mgの総ポリペプチド、ペプチド、および/またはタンパク質が存在することが企図される。したがって、組成物中のタンパク質の濃度は約、少なくとも約、または多くても約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mg/ml、またはそれ以上(またはその中で得られる任意の範囲)でありうる。このうち、約、少なくとも約、または多くても約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%が、Coaを結合させる抗体であってよく、他のブドウ球菌タンパク質または本明細書において記述されるタンパク質結合抗体と組み合わせて用いられてもよい。30

【0082】

A. ポリペプチドおよびポリペプチド産生

態様には、本明細書において記述されるさまざまな局面で用いるためのポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質ならびにそれらの免疫原性断片が含まれる。例えば、特定の抗体を、ブドウ球菌感染の無力化もしくは阻害についてアッセイするか、またはブドウ球菌感染の無力化もしくは阻害で用いる。特定の態様において、本明細書において記述されるタンパク質の全部または一部を、従来の技術にしたがって溶液中でまたは固体支持体上で合成することもできる。各種の自動合成機が市販されており、それらを公知のプロトコールにしたがって用いることができる。例えば、Stewart and Young, (1984); Tarn et al., (1983); Merrifield, (1986); およびBarany and Merrifield (1979)を参照されたく、これらの各々が参考により本明細書に組み入れられる。あるいは、ペプチドまたはポリペプチドをコードするスクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、これを適切な宿主細胞に40

10

20

30

40

50

形質転換または形質移入し、これを発現に適した条件の下で培養する組換えDNA技術を使用することもできる。

【0083】

1つの態様では、タンパク質の產生および/または提示のための、微生物を含めた細胞への遺伝子移入の使用を含む。関心対象のタンパク質に対する遺伝子を適切な宿主細胞に移入し、引き続いて適切な条件下での細胞の培養を行うことができる。実質的にすべてのポリペプチドをコードする核酸を、使用することができる。組換え発現ベクターの作製、およびそのベクターに含まれる要素は、本明細書において論じられている。あるいは、產生されるタンパク質は、タンパク質の產生に用いられる細胞によって通常合成される内因性タンパク質であってもよい。

10

【0084】

ある局面において、免疫原性Coa断片は、黄色ブドウ球菌から単離できるCoaタンパク質のD1および/またはD2ドメインの実質的全てを含む。

【0085】

免疫原性組成物の中に同様に含まれるのは、ブドウ球菌タンパク質またはブドウ球菌タンパク質の免疫原性断片(例えば、Coa)から構成される融合タンパク質である。あるいは、態様には、T細胞エピトープまたは精製タグの供与体などの異種配列、例えば - ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、エピトープタグ、例えばFLAG、mycタグ、ポリヒスチジン、またはウイルス表面タンパク質、例えばインフルエンザウイルス赤血球凝集素、または細菌タンパク質、例えば破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197との融合タンパク質としての、ブドウ球菌タンパク質またはその免疫原性断片の個々の融合タンパク質も含まれる。

20

【0086】

B. 抗体および抗体様分子

ある局面において、Coaに対する特異性を有する、1つまたは複数の抗体または抗体様分子(例えば、抗体CDRドメインを含むポリペプチド)が得られうるかまたは産生されうる。特定の態様において、CoaのD1および/またはD2ドメインに対する特異性を有する、1つまたは複数の抗体または抗体様分子(例えば、抗体CDRドメインを含むポリペプチド)は得られうるかまたは産生されうる。これらの抗体は、本明細書において記述されるさまざまな診断用途または治療用途において用いられうる。

30

【0087】

本明細書において用いられる場合、「抗体」という用語は、広くIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEなどの任意の免疫学的結合物質をいうこと、ならびに、抗原結合活性を保持する抗体CDRドメインを含むポリペプチドをいうことが意図される。したがって、「抗体」という用語は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子をいうように用いられ、Fab'、Fab、F(ab')₂、單一ドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv(一本鎖Fv)などの抗体断片、および抗体CDRを有するポリペプチド、CDRを提示する足場ドメイン(例えば、アンチカリン)またはナノボディを含む。例えば、ナノボディはラクダIgG2もしくはIgG3由来の抗原特異的VHH(例えば、組換えVHH)、またはそのようなラクダIg由来のCDR提示フレームでありうる。抗体に基づくさまざまな構築物および断片を調製および使用するための技術は、当技術分野において周知である。抗体を調製および特徴決定するための手段も当技術分野において周知である(例えば、参照により本明細書に組み入れられるAntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと)。

40

【0088】

「ミニ抗体」または「ミニボディ」も態様で用いるために企図される。ミニボディは、ヒンジ領域によってsFvから分離された、そのC末端にオリゴマー化ドメインを含むsFvポリペプチド鎖である。Pack et al. (1992)。オリゴマー化ドメインは、付加的なジスルフィド結合によってさらに安定化されうる、自己会合 - ヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含む。オリゴマー化ドメインは、ポリペプチドの機能的結合タンパク質へのインビオでの折り畳みを促進すると考えられる過程である、膜前後の一方向性の折り畳みと適

50

合性であるように設計される。一般的に、ミニボディは、当技術分野において周知の組換え方法を用いて產生される。例えば、Pack et al. (1992); Cumber et al. (1992)を参照されたい。

【0089】

抗体様結合ペプチド模倣体も態様において企図される。Liu et al. (2003)は、「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP)を記述しており、これは規模縮小した抗体として作用し、より長い血清半減期およびあまり煩雑ではない合成法というある特定の利点を有するペプチドである。

【0090】

CDRなどの抗原結合ペプチドの別の足場も使用可能であり、態様にしたがってCoa結合分子を作製するために用いられる。一般的に、当業者は、元の抗体に由来するCDRの少なくとも1つをグラフトするタンパク質足場のタイプを判定する方法を承知している。より詳細には、そのような足場に選択されるには、以下の基準(Skerra, 2000): 系統発生的保存が良好であること; 三次元構造が既知であること(例えば、結晶学、NMR分光、もしくは当業者に公知の他のいずれかの技術による); サイズが小さいこと; 転写後修飾がほとんどもしくは全くないこと; ならびに/または產生、発現および精製が容易であること、の最多数を満たさなければならないことが公知である。

10

【0091】

そのようなタンパク質足場の起源は、フィブロネクチン、好ましくはフィブロネクチンIII型ドメイン10、リポカリン、アンチカリン(Skerra, 2001)、黄色ブドウ球菌のプロテインAのドメインBに由来するプロテインZ、チオレドキシンA、または「アンキリンリピート」(Kohl et al., 2003)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの反復モチーフを有するタンパク質の中から選択される構造であってよいが、これらに限定されることはない。例えば、アンチカリンまたはリポカリン誘導体は、さまざまな標的分子に対する親和性および特異性を有する結合タンパク質の一種であり、SpA結合分子として用いることができる。そのようなタンパク質は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第20100285564号、同第20060058510号、同第20060088908号、同第20050106660号、およびPCT公報番号WO2006/056464に記述されている。

20

【0092】

例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物などからの毒素などの毒素に由来する足場、および神經型NO合成酵素のタンパク質阻害物質(PIN)も、ある局面において用いられる。

30

【0093】

モノクローナル抗体(MAb)にはある特定の利点、例えば、再現性および大量產生があると認識されている。態様にはヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ、およびニワトリ由来のモノクローナル抗体が含まれる。

【0094】

「ヒト化」抗体も企図され、同様にヒト定常領域および/または可変領域ドメインを持つ、マウス、ラットまたは他の種由来のキメラ抗体、二重特異性抗体、組換えのおよび遺伝子操作された抗体ならびにこれらの断片も企図される。本明細書において用いられる場合、「ヒト化」免疫グロブリンという用語は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト(通常、マウスまたはラット)免疫グロブリンからの1つまたは複数のCDRを含む免疫グロブリンをいう。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖免疫グロブリンおよびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。

40

【0095】

1. 抗体を作製するための方法

抗体(例えば、モノクローナル抗体および/またはモノクローナル抗体)を作製するための方法は、当技術分野において公知である。手短に言えば、ポリクローナル抗体は、態様にしたがって動物をCoaポリペプチドまたはその一部分で免疫する段階、および免疫した

50

動物から抗血清を採取する段階によって調製される。

【0096】

広範囲の動物種を抗血清の産生のために用いることができる。典型的には、抗血清の産生のために用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。動物を選ぶことは、当業者に公知である通り、操作の容易さ、血清の費用、または所望の量に応じて決定される可能性がある。抗体はまた、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニックである哺乳動物または植物の生成、およびそれから回収可能な形態での抗体の産生を通して遺伝子導入により産生できることが理解されると考えられる。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁において産生され、そこから回収することができる。例えば米国特許第5,827,690号、同第5,756,687号、同第5,750,172号、および同第5,741,957号を参照されたい。10

【0097】

同様に当技術分野において周知である通り、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる、免疫反応の非特異的刺激物質を用いることによって増強されうる。適したアジュバントには、サイトカイン、ケモカイン、補助因子、毒素、変形体、合成組成物、またはそのようなアジュバントをコードするベクターなどの、全ての受け入れられる免疫刺激化合物が含まれる。

【0098】

同様にしたがって用いてもよいアジュバントは、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、-インターフェロン、GMCSP、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDP、およびnor-MDPなどのMDP化合物、CGP(MTP-PE)、脂質A、ならびにモノホスホリル脂質A (MPL) を含むが、これらに限定されることはない。細菌から抽出した3つの成分を含有するRIBI、MPL、ジミコール酸トレハロース(TDM)、および2%スクアレン/Tween 80乳濁液における細胞壁骨格(CWS)も同様に企図される。MHC抗原でさえも用いてもよい。例示的なアジュバントは、フロイントの完全アジュバント(ヒト結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)死菌を含有する免疫反応の非特異的刺激物質)、フロイントの不完全アジュバントおよび/または水酸化アルミニウムアジュバントを含みうる。20

【0099】

アジュバントの他に、T細胞免疫を上方制御することまたはサプレッサー細胞活性を下方制御することが示されている生体反応修飾物質(BRM)を同時投与することが望ましい場合がある。そのようなBRMには、シメチジン(CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド(CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ)、-インターフェロン、IL-2、もしくはIL-12などのサイトカイン、またはB-7などの免疫ヘルパー機能に関係するタンパク質をコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されることはない。30

【0100】

抗体の産生に用いられる免疫原組成物の量は、免疫のために用いられる動物とともに免疫原の性質に応じて変化する。皮下、筋肉内、皮内、表皮内、静脈内、および腹腔内を含むが、これらに限定されない、種々の経路を用いて、免疫原を投与することができる。抗体の産生は、免疫後のさまざまな時点で免疫した動物の血液を採取することによってモニターしてもよい。40

【0101】

第二の追加免疫投与(例えば、注射剤として提供される)も同様に与えてもよい。適した力価が達成されるまで、追加免疫および力価測定の過程を繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られる場合には、免疫した動物から採血して、血清を単離および保存し、かつ/または動物を用いてMAbを生成することができる。

【0102】

ウサギポリクローナル抗体を産生するために、耳静脈を通してまたは心穿刺によって動物から採血することができる。採取した血液を凝固させた後、遠心分離して、全細胞および凝血から血清成分を分離する。さまざまな用途のために血清を用いてもよいか、あるいは50

はそうでなければ所望の抗体分画を、別の抗体、固相マトリクスに結合したペプチドを用いるアフィニティーコロマトグラフィー、または例えばプロテインAもしくはプロテインGコロマトグラフィーなどの周知の方法によって精製してもよい。

【0103】

MAbは参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,196,265号において例示される技術などの周知の技術を用いることによって容易に調製されうる。典型的には、この技術は、それが野生型または変異型の組成物であれば、選択された免疫原組成物、例えば精製または部分精製された、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはドメインによって、適した動物を免疫することを含む。免疫組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な方法で投与される。

10

【0104】

モノクローナル抗体(MAb)を生成するための方法は一般的に、ポリクローナル抗体を調製するための系列と同じ系列に沿って始まる。いくつかの態様において、マウスおよびラットなどのげっ歯類がモノクローナル抗体の生成において用いられる。いくつかの態様において、ウサギ、ヒツジ、またはカエルの細胞がモノクローナル抗体の生成において用いられる。ラットを用いることは、周知であり、ある特定の利点を提供しうる(Goding, 1986, pp. 60-61)。マウス(例えば、BALB/cマウス)は、日常的に用いられており、高い割合の安定融合体を一般的に与える。

【0105】

動物に、一般的に先に記述した通りに抗原を注射する。抗原をフロイントの完全または不完全アジュバントなどのアジュバントと混合してもよい。同じ抗原または該抗原をコードするDNAの追加免疫投与は、およそ2週間間隔で行われうる。

20

【0106】

免疫後、抗体を產生する可能性を有する体細胞、具体的にはBリンパ球(B細胞)をMAb生成プロトコールにおいて用いるために選択する。これらの細胞は、生検として採取された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から得てもよいか、または末梢血試料から得てもよい。一般的に、脾臓細胞は、分裂する形質芽球段階の抗体産生細胞に富む起源である。典型的には、末梢血は容易にアクセス可能であるので、末梢血細胞は容易に得られうる。

【0107】

いくつかの態様において、動物のパネルを免疫して、最高の抗体力値を有する動物の脾臓を採取し、シリンジによって脾臓をホモジナイズすることによって脾臓リンパ球を得る。典型的には、免疫したマウスからの脾臓はリンパ球約 5×10^7 ~ 2×10^8 個を含有する。

30

【0108】

次に、免疫した動物からの抗体産生Bリンパ球を、不死化骨髄腫細胞、一般的には免疫した動物と同じ種の細胞と融合させる。ハイブリドーマ産生融合手順において用いるのに適した骨髄腫細胞株は好ましくは、非抗体産生細胞であり、高い融合効率を有し、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの生育を支持するある特定の選択培地において生育不可能になる酵素欠損を有する。

【0109】

当業者に公知である通りに、いくつかの骨髄腫細胞のいずれかの1つを用いてもよい(Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984、引用)。例えば、免疫動物がマウスである場合、P3 X63/Ag8、X63 Ag8.653、NS1/1.Ag 4.1、Sp210 Ag14、FO、NSO/U、MPC 11、MPC11 X45 GTG 1.7、およびS194/5XX0 BuIを用いてもよく；ラットの場合、R210.RCY 3、Y3 Ag 1.2.3、IR983F、および4B210を用いてもよく；かつU 266、GM1500 GRG2、LICR LON HMy2、およびUC729 6は全て、ヒト細胞融合体に関連して有用である。骨髄腫発現システムに関する考察に関しては、Yoo et al. (2002)を参照されたい。

40

【0110】

1つのマウス骨髄腫細胞は、NS-1骨髄腫細胞株(P3-NS-1-Ag4-1とも呼ばれる)であり、これは細胞株寄託番号GM3573を要請することによって、NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryから容易に入手可能である。用いてもよい別のマウス骨髄腫細胞株は、8アザ

50

グアニン耐性マウス骨髄腫SP2/0非產生細胞株である。

【0111】

抗体產生脾臓またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞とのハイブリッドを生成するための方法は通常、骨髄腫細胞と体細胞とを2:1の比率で混合する段階を含むが、比率は細胞膜の融合を促進する物質(化学物質または電気物質)の存在下でそれぞれ、約20:1～約1:1まで変化してもよい。センダイウイルスを用いる融合法は、Kohler and Milstein(1975; 1976)によって記述されており、Gefter et al., (1977)による37%(v/v) PEGなどのポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法が記述されている。電気的に誘発された融合法を用いることも適切である(Goding pp. 71 74, 1986)。

【0112】

融合手順は通常、低い頻度で約 1×10^{-6} ～ 1×10^{-8} の生存ハイブリッドを产生する。しかし、生存融合ハイブリッドは、選択培地において培養することによって、親の非融合細胞(特に、通常無限に分裂し続けると考えられる非融合骨髄腫細胞)から識別されることから、これは問題とはならない。選択培地は一般的に、組織培養培地においてヌクレオチドのデノボ合成を遮断する物質を含有する培地である。例示的なおよび好ましい物質は、アミノブテリン、メトレキセート、およびアザセリンである。アミノブテリンおよびメトレキセートは、ブリンとピリミジンの両方のデノボ合成を遮断するが、アザセリンはブリン合成のみを遮断する。アミノブテリンまたはメトレキセートを用いる場合、ヌクレオチド源としてヒポキサンチンおよびチミジンを培地に補充する(HAT培地)。アザセリンを用いる場合、ヒポキサンチンを培地に補充する。

【0113】

好ましい選択培地はHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を操作することができる細胞のみがHAT培地において生存することができる。骨髄腫細胞はサルベージ経路における重要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)を欠損し、それらは生存することができない。B細胞はこの経路を操作することができるが、それらは培養において限られた寿命を有し、一般的に約2週間以内に死滅する。したがって、選択培地を生存できる細胞のみが、骨髄腫およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

【0114】

この培養は、特異的ハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ集団を提供する。典型的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートにおける単一クローン希釈によって細胞を培養する段階の後、個々のクローン上清を所望の反応性に関して試験する(約2～3週間後)ことによって行われる。アッセイ法は、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、細胞障害アッセイ法、ブラークアッセイ法、ドット免疫結合アッセイ法などのように、感度がよく、単純であり、かつ迅速であるべきである。

【0115】

次に、選択されたハイブリドーマを連続希釈して、個々の抗体產生細胞株へとクローニングし、MAbを提供するためにクローンを無限に成長させることができる。細胞株を2つの基本的な方法でMAb産生のために活用してもよい。第一に、ハイブリドーマの試料を、当初の融合体のための体細胞および骨髄腫細胞を提供するために用いられる組織適合性のタイプの動物(例えば、同系マウス)に注入(しばしば腹腔内に)することができる。任意で、動物を注射前に炭化水素、特にプリスタン(テトラメチルペンタデカン)などの油によってプライミングする。注入された動物は、融合細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。血清または腹水などの動物の体液を採取して、高濃度のMAbを提供することができる。第二に個々の細胞株をインビトロにおいて培養することができ、そこで、MAbは培養培地に自然と分泌され、そこから抗体を高濃度で容易に得ることができる。

【0116】

さらに、產生細胞株からの抗体(またはそれに由来する他の部分)の発現を、いくつかの公知の技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミンシンテターゼおよびDHFR

10

20

30

40

50

遺伝子発現システムは、ある特定の条件下で発現を増強するための一般的手法である。限界希釈クローニングおよびマイクロドロップ(Microdrop)技術などの通常の技術を用いて、高発現細胞クローンを同定することができる。GSシステムは、欧州特許第0 216 846号、同第0 256 055号、および同第0 323 997号、ならびに欧州特許出願第89303964.4号に関連して全体または部分的に論じられている。

【0117】

いずれかの手段によって產生されたMAbは、必要に応じてろ過、遠心分離、およびHPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーなどの、さまざまなクロマトグラフィー法を用いてさらに精製してもよい。モノクローナル抗体の断片は、ペプシンもしくはパパインなどの酵素による消化を含む方法によって、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって產生されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、モノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて合成することができる。

10

【0118】

分子クローニング手法を用いてモノクローナル抗体を生成してもよいことも企図される。1つの態様において、免疫動物の脾臓から単離したRNAから、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラーを調製して、適切な抗体を発現するファージミドを、抗原を発現する細胞および対照細胞を用いるパニングによって選択する。従来のハイブリドーマ技術に対するこの手法の長所は、およそ104倍もの多くの抗体を1回のラウンドで產生およびスクリーニングできる点、ならびにHおよびL鎖の組み合わせによって新しい特異性が生成され、それによって適切な抗体を発見する機会がさらに増加する点にある。

20

【0119】

別の態様は、例えば、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改变免疫グロブリン座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を產生するための方法を記述している、米国特許第6,091,001号において見い出され、開示される通り、抗体を產生することに関する。該方法は、第一のlox座が部位特異的相同組換えによりゲノム配列に挿入されるように、lox座と、改变領域に変換されるゲノム配列の免疫グロブリン座の領域に隣接する第一のDNA配列と相同な標的化配列とを含む相同性標的化ベクターを抗体產生細胞に最初に形質移入する段階を含む。次に、組み込まれたlox部位とのCre媒介組換えに適した第二のlox部位と、免疫グロブリン座の領域を改变領域に変換するための改变配列とを含むlox標的化ベクターを細胞に形質移入する。この変換は、改变配列がlox部位のCre媒介部位特異的組換えによりゲノム配列に挿入されるように、インピボにおいてCreとlox部位を相互作用させることによって行われる。

30

【0120】

あるいは、モノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて、または大腸菌における完全長の遺伝子もしくは遺伝子断片の発現によって、合成することができる。

【0121】

C. 抗体およびポリペプチド結合体

態様によって、抗体結合体またはペイロードを形成させるために少なくとも1つの作用物質に連結されている、Coaタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドに対する抗体および抗体様分子が提供される。診断物質または治療的物質としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結させること、または共有結合的に結合もしくは複合体化させることが通常である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子でありうるが、これらに限定されることはない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞毒性活性を有する分子を含む。抗体に付着されたエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、治療的酵素、抗生素質、放射性標識ヌクレオチドなどが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイ法を用いて検出されうる任意の部分と定義される。抗体に結合されたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射性同位元素、ハプテン、蛍光標識、リン光性分子、化学発光性分子、発色団、発光性分子、光親和性分子、着色粒子、またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

40

50

【0122】

抗体結合体のある例は、抗体が検出可能な標識に連結している結合体である。「検出可能な標識」は、その使用によって、それらが付着している抗体が検出され、かつ/または必要に応じてさらに定量される、その特異的機能的特性および/または化学的特徴により検出されうる化合物および/または要素である。

【0123】

抗体結合体は一般的に、診断物質として使用が好ましい。抗体診断物質は一般的に2つのクラスに分類され、種々の免疫測定法などのインビトロ診断において用いるための抗体、および/または「抗体指向性の(antibody directed)造影」として一般的に知られるインビオ診断プロトコールにおいて用いるための抗体に分類される。多くの適切な造影剤が、その抗体に対する付着法とともに、当技術分野において公知である(例えば、各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,021,236号；同第4,938,948号；および同第4,472,509号を参照のこと)。用いられる造影部分は、常時性イオン；放射活性同位元素；蛍光体；NMRにより検出可能な物質；X線造影剤でありうる。

10

【0124】

常磁性イオンの場合、例としてクロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)および/またはエルビウム(III)などのイオンが挙げられることができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線造影などの他の状況において有用なイオンは、ランタン(II)、金(III)、鉛(II)を含むが、これらに限定されることではなく、特にビスマス(III)が好ましい。

20

【0125】

治療的および/または診断的用途のための放射活性同位元素の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレン、³⁵イオウ、テクネチウム^{99m}、および/またはイットリウム⁹⁰を用いることができる。¹²⁵Iは、ある態様において用いられることが多い、テクネチウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹も、その低エネルギーのためにおよびロングレンジ検出に適切であるために用いられることが多い。放射活性標識モノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法にしたがって産生されてもよい。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはヨウ化カリウム、ならびに次亜塩素酸ナトリウムなどの化学酸化剤またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素酸化剤と接触させることによってヨウ素化することができる。モノクローナル抗体は、リガンド交換過程によって、例えば過テクネチウム酸をスズ溶液によって還元する段階、還元したテクネチウムをSephadexカラム上でキレート化する段階、および抗体をこのカラムに適用する段階によって、テクネチウム^{99m}で標識してもよい。あるいは、例えば過テクネチウム酸、 SNCI_2 などの還元剤、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液などの緩衝液、および抗体をインキュベートすることによる直接標識技術を用いてもよい。金属イオンとして存在する放射性同位元素を抗体に結合させるために用いられることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

30

【0126】

結合体として用いるために企図される蛍光標識の中には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5,6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミングリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはテキサスレッドが含まれる。

40

【0127】

抗体結合体は、抗体が二次結合リガンドおよび/または酵素(酵素タグ)に連結され、色

50

素形成基質と接触した場合に発色産物を生成する、インビボにおいて主に用いることが企図される結合体を含む。適した酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋ワサビ)水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられるが、これらに限定されることはない。好みしい二次結合リガンドは、ビオチンならびに/またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。そのような標識を用いることは当業者に周知であり、例えば、各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号、および同第4,366,241号に記述されている。

【0128】

分子を抗体に部位特異的に付着させるさらに別の公知の方法は、ハプテンに基づくアフィニティー標識と抗体との反応を含む。本質的に、ハプテンに基づくアフィニティー標識は、抗原結合部位においてアミノ酸と反応し、それによってこの部位を破壊して、特異的抗原反応を遮断する。しかし、これは抗体結合体による抗原結合の損失が起こることから、有利ではない可能性がある。10

【0129】

アジド基を含有する分子もまた、低強度紫外光によって生成される反応性のナイトレン中間体を通してタンパク質と共有結合を形成するために用いられる可能性がある(Potter and Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジド類似体は、粗細胞抽出物におけるヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的フォトプローブとして用いられている(Owens and Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも用いられており(Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; およびDholakia et al., 1989)、かつ抗体結合剤として用いられる。20

【0130】

抗体をその結合部分に付着または結合させるためにいくつかの方法が当技術分野において公知である。いくつかの付着法は、例えば抗体に付着させたジエチレントリアミン五酢酸無水物(DTPA)；エチレントリアミン四酢酸；N-クロロ-p-トルエンスルホニアミド；および/またはテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリコウリル(diphenylglycouril)-3などの有機キレート剤を使用する金属キレート錯体を用いることを伴う(各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号)。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルdehydまたは過ヨウ素酸などの結合剤の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカーとの結合体は、これらの結合剤の存在下でまたはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号において、乳腺腫瘍の造影は、モノクローナル抗体を用いて達成され、検出可能な造影部分をメチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを用いて抗体に結合させる。30

【0131】

いくつかの態様において、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。本発明の方法論にしたがって產生された抗体結合体は、改善された寿命、特異性、および感度を示すことが開示されている(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,196,066号)。Fc領域における糖質残基に結合しているエフェクターまたはレポーター分子の部位特異的付着も同様に、文献において開示されている(O'Shannessy et al., 1987)。この手法は、現在臨床評価中である診断的および治療的に有望な抗体を产生するために報告されている。40

【0132】

いくつかの態様において、抗Coa抗体は、米国特許第6,048,616号；同第5,990,479号；同第5,690,807号；同第5,505,928号；同第5,262,357号(これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)とともにPCT公報番号99/26299(1999年5月27日に公開)に記述されるような半導体ナノ結晶に連結される。特に、生物および化学アッセイ法におい50

て半導体ナノ結晶として用いるための例示的な材料には、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、GaN、GaP、GaAs、GaSb、InP、InAs、InSb、AlS、AlP、AlSb、PbS、PbSe、Ge、およびSi、ならびにその三級および四級混合物などのII~VI属、III~V、およびIV属半導体を含む、先に記述された材料が含まれるが、これらに限定されることはない。半導体ナノ結晶を抗体に連結させる方法は、米国特許第6,630,307号および同第6,274,323号に記述されている。

【0133】

III. 核酸

ある態様には、本明細書において記述されるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドがある。企図されるポリヌクレオチド配列には、Co 10 aに対する抗体またはそのCoa結合部分をコードするものが含まれる。

【0134】

本出願において用いられる場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、組換えであるか、または、全ゲノム核酸がない状態で単離されているかのいずれかの核酸分子をいう。「ポリヌクレオチド」という用語のなかに含まれるのは、オリゴヌクレオチド(長さが100残基またはそれ未満の核酸)、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む、組換えベクターである。ポリヌクレオチドは、ある局面において、天然の遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に単離されている、調節配列を含む。ポリヌクレオチドは、一本鎖(コーディングもしくはアンチセンス)または二本鎖であってよく、RNA、DNA(ゲノム、cDNAもしくは合成)、その類似体、またはその組み合わせであってよい。ポリヌクレオチドのなかにさらなるコーディングまたは非コーディング配列が存在してもよいが、存在しなくてもよい。

【0135】

この点において、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、または「核酸」という用語は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸(適切な転写、翻訳後修飾または局在化に必要とされる任意の配列を含む)をいうように用いられる。当業者に理解される通り、この用語はゲノム配列、発現カセット、cDNA配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および変異体を発現するかまたは発現するように適合されうる、遺伝子操作されたもっと小さな核酸セグメントを包含する。ポリペプチドの全部または一部をコードする核酸は、そのようなポリペプチドの全部または一部をコードする連続核酸配列を含むことができる。また、特定のポリペプチドは、わずかに異なる核酸配列を有するがそれでも同じまたは実質的に類似のタンパク質をコードする、変種を含む核酸によってコードされうることも考えられる(上記を参照のこと)。

【0136】

特定の態様には、Coaに結合するポリペプチド(例えば、抗体またはその断片)をコードする核酸配列を組み入れた、単離された核酸セグメントおよび組換えベクターがある。「組換え」という用語は、ポリペプチドまたは特異的ポリペプチドの名称と関連して用いることができ、これは一般に、インビトロにおいて操作されている核酸分子またはこのような分子の複製産物である核酸分子から產生されたポリペプチドをいう。

【0137】

核酸セグメントは、コード配列それ自体の長さにかかわらず、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、付加的な制限酵素部位、マルチクローニング部位、他のコードセグメントなどのような、他の核酸配列と組み合わせてもよく、したがってその全長はかなり変化することがある。それゆえ、ほぼすべての長さの核酸断片を使用することができ、その全長は精製の容易さによっておよび意図した組換え核酸プロトコールにおける用途によって制限されることが好ましいものと考えられる。場合によっては、核酸配列は、例えば、ポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後修飾を可能にするための、または標的化もしくは有効性などの治療的有用性を可能にするための、さらなる異種コード配列を有するポリペプチド配列をコードすることができる。先に論じられる通り、タグまたは他の異種ポリペプチドを、修飾されたポリペプチドをコードする配列に付加することができ、「異種」と

10

20

30

40

50

は、修飾されたポリペプチドと同じものではないポリペプチドをいう。

【0138】

ある態様には、本明細書において開示される配列と実質的同一性を有するポリヌクレオチド変種；本明細書において記述される方法(例えば、標準パラメータによるBLAST解析)を用い本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列と比べて、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、またはそれ以上の配列同一性を、その間の全ての値および範囲を含めて、含むものがある。ある局面において、単離されたポリヌクレオチドは、配列の全長にわたり、本明細書において記述されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、好ましくは95%およびそれ以上の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または該単離されたポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む。
10

【0139】

A. ベクター

ポリペプチドは、核酸分子によってコードされてもよい。核酸分子は核酸ベクターの形態であってよい。「ベクター」という用語は、異種核酸配列を、複製され発現されうる細胞へ導入するために、挿入できる担体核酸分子をいうように用いられる。核酸配列は「異種」であってよく、これは文脈中で、ベクターが導入されている細胞にとって、または核酸配列が組み入れられる核酸にとって核酸配列が異質であることを意味し、これには、細胞中または核酸中の配列と同種であるが、しかし、通常は見出されない、宿主細胞内または核酸内のある位置における配列が含まれる。ベクターにはDNA、RNA、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルスおよび植物ウイルス)、ならびに人工染色体(例えば、YAC)が含まれる。当業者は、標準的な組換え技術(例えば、ともに参照により本明細書に組み入れられるSambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996)を通じてベクターを構築するのに必要なものを十分に持っていると考えられる。ベクターは、Coaを結合させる抗体を產生するために宿主細胞において用いられてもよい。
20

【0140】

「発現ベクター」という用語は、転写されうる遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターをいう。場合によっては、次にRNA分子をタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳する。発現ベクターは、特定の宿主生物において機能的に連結されたコード配列の転写およびおそらく翻訳にとって必要な核酸配列をいう種々の「制御配列」を含みうる。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、その上他の機能も果たしあつ本明細書において記述される、核酸配列を含んでもよい。
30

【0141】

「プロモーター」は制御配列である。プロモーターは、典型的には、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である。これには、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの、調節タンパク質および分子が結合しうる遺伝要素を含めてもよい。「機能的に配置された」、「機能的に連結された」、「制御下」、および「転写制御下」という語句は、プロモーターが核酸配列との関連で、その配列の転写開始および発現を制御するのに正しい機能的位置および/または方向にあることを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関わるシス作用調節配列をいう「エンハンサー」とともに用いられてもまたは用いられなくてもよい。
40

【0142】

ペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現を制御するために使用される特定のプロモーターは、標的細胞、好ましくは細菌細胞においてポリヌクレオチドを発現できる限り、決定的に重要であるものとは考えられない。ヒト細胞が標的化される場合、ポリヌクレオチドコード領域を、ヒト細胞において発現されうるプロモーターの近傍かつ制御下に位置付けることが好ましい。一般的に言えば、そのようなプロモーターは細菌プロモーター、ヒトプロモーター、またはウイルスプロモーターのいずれかを含みうる。
50

【0143】

特異的な開始シグナルもコード配列の効率的な翻訳に必要とされうる。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを提供する必要がありうる。当業者は容易にこれを決定して、必要なシグナルを提供することができると考えられる。

【0144】

ベクターは、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であるマルチクローニング部位(MCS)を含むことができ、そのうちのいずれかを標準的な組換え技術とともに用いて、ベクターを消化することができる(参照により本明細書に組み入れられる、Carbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998、およびCocea, 1997を参照のこと)。

10

【0145】

大部分の転写された真核生物RNA分子は、RNAスプライシングを受けて、一次転写産物からイントロンを除去する。タンパク質発現に向けた転写産物の適切なプロセッシングを確実とするために、ゲノム真核生物配列を含有するベクターはドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要としうる(参照により本明細書に組み入れられる、Chandler et al., 1997を参照のこと)。

【0146】

ベクターまたは構築物は一般的に、少なくとも1つの終結シグナルを含む。「終結シグナル」または「終結因子」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写の特異的な終結に関するDNA配列から構成される。したがって、ある態様において、RNA転写産物の産生を終わらせる終結シグナルが企図される。インビオで、望ましいメッセージレベルを達成するには、終結因子が必要でありうる。真核生物システムにおいて、終結因子領域はまた、ポリアデニル化部位を露出させるように、新たな転写産物の部位特異的切断を可能にする特定のDNA配列も含んでもよい。これは、約200個のA残基(ポリA)のストレッチを転写産物の3'末端に付加するように、特殊な内因性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリA尾部で修飾されたRNA分子は、より安定的であると考えられ、より効率的に翻訳される。したがって、真核生物を伴う他の態様において、終結因子はRNA切断のためのシグナルを含むことが好ましく、終結因子シグナルはメッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。

20

【0147】

30

発現において、特に真核生物の発現において、転写産物の適切なポリアデニル化を行わせるためにポリアデニル化シグナルを含めることが一般的と考えられる。

【0148】

宿主細胞においてベクターを増殖させるために、ベクターは、1つまたは複数の複製起点部位('ori' と呼ばれることが多い)を含有してもよい。あるいは、宿主細胞が酵母である場合には、自律複製配列(ARS)を使用することもできる。

【0149】

B. 宿主細胞

本明細書において用いられる場合、「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」という用語は互換的に用いることができる。これらの用語の全てが、任意のおよび全ての次世代のその子孫も含む。故意または偶然の変異により全ての子孫が同一ではないことがあると理解されると考えられる。異種核酸配列を発現するという文脈において、「宿主細胞」とは、原核細胞または真核細胞をいい、これには、ベクターを複製できるかまたはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現できる、任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞はベクターまたはウイルスのレシピエントとして、使用されることがかつて使用されている。宿主細胞は「形質移入」または「形質転換」されてもよく、それらは組換えタンパク質をコードする配列などの、外因性の核酸が宿主細胞に移入または導入される過程をいう。形質転換細胞には、初代被験細胞およびその子孫が含まれる。

40

【0150】

いくつかのベクターは、原核細胞と真核細胞の両方において複製および/または発現さ

50

せる制御配列を使用してもよい。当業者はさらに、それらを維持してベクターの複製を許容するために上記の宿主細胞の全てをインキュベートする条件を理解すると考えられる。同様に、ベクターの大規模産生とともに、ベクターによってコードされる核酸、およびその同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にすると考えられる技術および条件が理解され、公知である。

【0151】

C. 発現システム

先に論じた組成物の少なくとも一部または全部を含む多数の発現システムが存在する。原核生物および/または真核生物に基づくシステムを態様で用いるために使用して、核酸配列、またはその同源のポリペプチド、タンパク質およびペプチドを産生することができる。そのような多くのシステムが市販されており、広く使用可能である。10

【0152】

昆虫細胞/バキュロウイルスシステムは、ともに参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,871,986号、同第4,879,236号に記述されているように、異種核酸セグメントの高レベルのタンパク質発現をもたらすことができ、例えば、INVITROGEN(登録商標)からMAXBAC(登録商標) 2.0の名称で、およびCLONTECH(登録商標)からBACPACK(商標) BACULO VIRUS EXPRESSION SYSTEMの名称で購入することができる。

【0153】

開示の発現システムに加え、発現システムの他の例としては、合成エクダイソン誘導性受容体またはそのpET発現システム、つまり大腸菌発現システムを含む、STRATAGENE(登録商標)のCOMPLETE CONTROL(商標) Inducible Mammalian Expression Systemが挙げられる。誘導性発現システムの別例はINVITROGEN(登録商標)から入手可能で、T-REX(商標) (テトラサイクリン調節発現)システム、つまり全長CMVプロモーターを用いた誘導性の哺乳動物発現システムを有するものである。INVITROGEN(登録商標)は、メチロトローフ酵母ピチアメタノリカ(*Pichia methanolica*)における組換えタンパク質の高レベル産生のために設計された、*Pichia methanolica* Expression Systemと呼ばれる酵母発現システムも提供している。当業者なら、発現構築物などのベクターを発現させる方法、核酸配列、またはその同源のポリペプチド、タンパク質、もしくはペプチドを産生する方法を承知していると考えられる。20

【0154】

D. 遺伝子移入の方法

組成物の発現をもたらすための核酸送達に適した方法は、本明細書において記述する通りまたは当業者に公知である通り、核酸(例えば、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含め、DNA)を細胞、組織または生物に導入できる事実上いかなる方法も含むものと考えられる。そのような方法には、マイクロインジェクション(参照により本明細書に組み入れられる、Harland and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号)を含む、注入(その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号、および同第5,580,859号)による; 電気穿孔(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,384,253号)による; リン酸カルシウム沈殿(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990)による; DEAEデキストランの後にポリエチレングリコールを用いること(Gopal., 1985)による; 直接音波負荷(Fechheimer et al., 1987)による; リポソームを介した形質移入(Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991)による; 微粒子銃(PCT出願番号WO 94/09699および95/06128; 米国特許第5,610,042号; 同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号、および同第5,538,880号、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる)による; 炭化ケイ素纖維を用いた攪拌(各々が参照により本明細書に組み入れられる、Kaepler et al., 1990; 米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号)による; アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)を介した形質転換(各々が参照により本明細書に組み入4050

れられる、米国特許第5,591,616号および同第5,563,055号)による; またはプロトプラストのPEGを介した形質転換(各々が参照により本明細書に組み入れられる、Omirulleh et al., 1993; 米国特許第4,684,611号および同第4,952,500号)による; 乾燥/阻害を介したDNAの取り込み(Potrykus et al., 1985)によるような、DNAの直接送達が含まれるが、これらに限定されることはない。これらなどの技術の適用によって、細胞小器官、細胞、組織、または生物を安定的にまたは一過的に形質転換することができる。

【0155】

IV. 処置の方法

先に論じられる通り、組成物およびこれらの組成物を用いる方法により、感染または関連疾患、特にブドウ球菌に関連するものを有する対象、それらを有すると疑われる対象、またはそれらを発症するリスクのある対象を処置すること(例えば、細菌負荷量または膿瘍の形成もしくは持続を制限すること)ができる。組成物の使い方の1つは、入院処置の前に対象を予防接種することによって、病院内感染を予防することである。10

【0156】

本明細書において用いられる場合、「免疫反応」またはその等価語「免疫学的反応」という語句は、レシピエント患者における本発明のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドに対する体液性(抗体を介した)反応、細胞性(抗原特異的T細胞もしくはその分泌産物によって媒介される)反応、または体液性反応と細胞性反応の両方をいう。処置または治療は、免疫原の投与によって誘導された能動免疫反応、または抗体、抗体を含有する材料もしくはプライミングを受けたT細胞の投与によって達成された受動的治療でありうる。20

【0157】

本明細書において用いられる場合、「受動免疫」とは、細胞メディエーターまたはタンパク質メディエーター(例えば、Coaタンパク質に結合するポリペプチド)を含めた免疫エフェクターの投与によって対象に付与される任意の免疫をいう。抗体組成物は、抗体によって認識される抗原を持った生物による感染の予防または処置のための受動免疫化に用いることができる。抗体組成物は、さまざまな生物と関連しうる種々の抗原に結合する抗体CDRドメインを含む抗体またはポリペプチドを含むことができる。抗体成分はポリクローナル抗血清であることができる。ある局面において、抗体は動物または抗原を接種された第二の対象からアフィニティー精製される。あるいは、ブドウ球菌を含むがこれに限定されない、グラム陽性菌、グラム陰性菌などの、同一の、関連の、または別の微生物または生物に存在する抗原に対するモノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体の混合物である、抗体混合物を用いることもできる。30

【0158】

受動免疫は、ドナーまたは既知の免疫反応性を有する他の非患者供給源から得られる免疫グロブリン(Ig)もしくはその断片および/または他の免疫因子を患者に投与することによって、患者または対象に与えることができる。他の局面において、抗原組成物は、ブドウ球菌または他の生物に対して作製された抗体を含む、組成物からの曝露に反応して產生されるグロブリン(「過免疫グロブリン」)の供給源もしくはドナーとしての役割を果たす対象に投与することができる。このように処置された対象は、過免疫グロブリンを、従来の血漿分画法により得て、ブドウ球菌感染に対する耐性を与えるためにまたはブドウ球菌感染を処置するために別の対象に投与できる、血漿を提供することができる。過免疫グロブリンは、免疫不全の個体に、侵襲的処置を受けている個体に、または個体がワクチン接種に反応して自身の抗体を產生できる時間のない個体にとりわけ有用である。受動免疫に関連した例示的な方法および組成物は、米国特許第6,936,258号、同第6,770,278号、同第6,756,361号、同第5,548,066号、同第5,512,282号、同第4,338,298号、および同第4,748,018号を参照されたく、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。40

【0159】

本明細書および添付の特許請求の範囲のために「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、Bおよび/またはT細胞が反応または認識する抗原上の部位をいうように互換50

的に用いられる。B細胞エピトープは、タンパク質の三次元の折り畳みが並置した隣接アミノ酸からも非隣接アミノ酸からも形成されることがある。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、通常、変性溶媒に曝されても保持されるのに対し、三次元の折り畳みによって形成されたエピトープは、通常、変性溶媒を用いた処理によって失われる。エピトープは、通常、固有の空間的構造の中に少なくとも3個、より通常には、少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的構造を決定する方法は、Epitope Mapping Protocols (1996)に記述されている方法を含む。T細胞はCD8細胞の場合およそ9アミノ酸の、またはCD4細胞の場合およそ13~15アミノ酸の連続エピトープを認識する。エピトープを認識するT細胞は、エピトープに反応して、プライミングを受けたT細胞による³H-チミジンの取り込み(Burke et al., 1994)により、抗原依存的な死滅(細胞傷害性Tリンパ球アッセイ法, Tigges et al., 1996)により、またはサイトカイン分泌により決定される通り、抗原依存的な増殖を測定するインビトロでのアッセイ法により特定することができる。

【0160】

細胞を介した免疫学的反応の存在は、増殖アッセイ法(CD4 (+) T細胞)またはCTL(細胞傷害性Tリンパ球)アッセイ法により判定することができる。免疫原の防御効果または治療効果に対する体液性および細胞性反応の相対的寄与は、免疫した同系動物からIgGおよびT細胞を個別に単離し、第二の対象において防御効果または治療効果を測定することにより、識別することができる。本明細書においておよび特許請求の範囲において用いられる場合、「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は、互換的に用いられる。

【0161】

任意で、抗体または好ましくは抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質との融合タンパク質に化学的に結合されてもよいか、またはその融合タンパク質として発現されてもよい。本明細書および添付の特許請求の範囲のために、そのような全ての融合タンパク質は、抗体または抗体の免疫学的部分の定義のなかに含まれる。

【0162】

1つの態様において、方法は、ブドウ球菌病原菌によって引き起こされる疾患または状態の処置を含む。ある局面において、態様は、院内の病院内感染などのブドウ球菌感染の処置の方法を含む。いくつかの態様において、処置は、ブドウ球菌抗原の存在下で投与される。さらに、いくつかの例において、処置は、1つまたは複数の抗生物質などの、細菌感染に対してよく使われる他の剤の投与を含む。

【0163】

治療的組成物は、投与製剤に適合する様式で、および治療的に有効であるような量で投与される。投与される量は、処置される対象に依る。投与されるのに必要な活性成分の的確な量は、医師の判断に依る。初回投与および追加免疫に適したレジメも同様に多様であるが、初回投与後にその後の投与を行うことが典型的である。

【0164】

適用の様式は広く異なってもよい。ポリペプチド治療物質の投与のための従来の方法のいずれも適用可能である。これらには、固体の生理学的に許容される基剤上でのまたは生理学的に許容される分散液中の経口適用、非経口的適用、注射による適用などが含まれると考えられる。組成物の投与量は、投与経路に依ると考えられ、かつ、対象のサイズおよび健康状態によって異なると考えられる。

【0165】

場合によっては、組成物の複数回の投与、例えば、2回、3回、4回、5回、6回、またはそれ以上の投与があることが望ましいと考えられる。投与は、以下の間の全ての範囲を含めて、1、2、3、4、5、6、7、8~5、6、7、8、9、10、11、12十二週間の間隔でありうる。

【0166】

A. 抗体および受動免疫化

ある局面は、レシピエントをワクチンで免疫する段階およびレシピエントから抗体を單

10

20

30

40

50

離する段階、または組換え抗体を產生する段階を含む、ブドウ球菌感染の予防または処置で用いる抗体を調製する方法に指向している。これらの方法によって調製され、ブドウ球菌感染を処置または予防するために用いられる抗体は、さらなる局面である。Coaを特異的に結合させる抗体および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物は、ブドウ球菌疾患の処置または予防のための薬物の製造において用いられうるさらなる局面である。薬学的調製物の有効量を患者に投与する段階を含むブドウ球菌感染の処置または予防のための方法は、さらなる局面である。

【 0 1 6 7 】

ポリクローナル抗体の產生のための接種材料は、典型的には、抗原組成物(例えば、Coaのペプチドもしくは抗原もしくはエピトープまたはそのコンセンサス)を、生理食塩水またはヒトへの使用に適した他のアジュバントなどの、生理学的に許容される希釈剤に分散させて、水性組成物を形成することにより調製される。免疫刺激量の接種材料を哺乳動物に投与し、接種を受けた哺乳動物をその後、抗原組成物が防御抗体を誘導するのに十分な時間維持する。この抗体をアフィニティーコロマトグラフィーなどの周知の技術によって所望とされる程度まで単離することができる(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual 1988)。抗体には、種々の一般に用いられる動物、例えば、ヤギ、靈長類、ロバ、ブタ、ウマ、モルモット、ラット、またはヒト由来の抗血清調製物を含めることができる。動物から採血し、血清を回収する。

【 0 1 6 8 】

抗体は、全抗体、抗体断片または抗体小断片を含むことができる。抗体は、いずれかのクラス(例えば、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE)の全免疫グロブリン、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、または二種もしくはそれ以上の抗原に対して二重特異性を有するハイブリッド抗体であることができる。それらは断片(例えば、ハイブリッド断片を含むF(ab')²、Fab'、Fab、Fvなど)であってもよい。抗体はまた、十分な親和性で特異的な抗原に結合することにより抗体のように作用する、天然タンパク質、合成タンパク質または遺伝子操作されたタンパク質も含む。

【 0 1 6 9 】

ワクチンをレシピエントに投与することができ、このレシピエントが、特定のワクチンからの曝露に応じて產生される抗体の供給源として働く。このようにして処置された対象は、従来の血漿分画法によって抗体が得られうる血漿を提供すると考えられる。単離された抗体は、ブドウ球菌感染に対する耐性を与えるためにまたはブドウ球菌感染を処置するために、同じまたは異なる対象に投与されうる。抗体は、幼児、免疫不全個体におけるブドウ球菌疾患の処置もしくは予防に特に有用であり、または処置が必要とされ、かつワクチン接種に対する反応を起こす時間が個体にない場合に特に有用である。

【 0 1 7 0 】

さらなる局面は、グラム陽性細菌、好ましくはブドウ球菌、より好ましくは黄色ブドウ球菌または表皮ブドウ球菌による感染を処置または予防するために用いられうる、免疫原性組成物の構成要素の少なくとも2つに対して反応性の二種またはそれ以上の抗体またはモノクローナル抗体(またはその断片；好ましくはヒトのものまたはヒト化されたもの)を含む薬学的組成物である。

【 0 1 7 1 】

B. 併用療法

組成物および関連する方法、特に、Coaまたはそのペプチドもしくはコンセンサスペプチドを結合させる抗体の患者/対象への投与を従来の治療の施行と併せて用いることができる。これらには、ストレプトマイシン、シプロフロキサシン、ドキシサイクリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、トリメトプリム、スルファメトキサゾール、アンビシリソ、テトラサイクリン、または抗生物質の各種組み合わせなどの抗生物質の投与が含まれるが、これらに限定されることはない。

【 0 1 7 2 】

1つの局面において、治療を、抗細菌処置とともに用いることが企図される。あるいは

10

20

30

40

50

、治療は数分間から数週間に及ぶ間隔だけ、他の剤による処置に先行するかまたは続くこともできる。他の剤および/またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドが別々に投与される態様において、治療的組成物が依然として、有利に組み合わさった効果を対象に及ぼすことができるよう、一般に、各送達時間の間にかなりの時間が経ってしまわないことを確実にする。そのような場合、双方の様式を互いに約12~24時間以内におよび、好ましくは、互いに約6~12時間以内に施すことができると企図される。しかしながら、場合によっては、投与の期間をかなり延ばすことが望ましい場合もあり、その場合には各投与の間隔は数日(2、3、4、5、6または7日)から数週間(1、2、3、4、5、6、7または8週間)である。

【0173】

10

例えは抗生物質治療を「A」とし、Coaまたはそのペプチドもしくはコンセンサスペプチドを結合させる抗体を含む抗体治療を「B」とし、治療のさまざまな組み合わせを使用することができる。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0174】

20

患者/対象への抗体組成物の投与は、組成物のもしあれば毒性を考慮に入れながらも、そのような化合物の投与に関する一般的なプロトコールに従う。処置周期は必要に応じて繰り返されるものと期待される。同様に、水和などの、種々の標準的な治療を記述の治療と併せて適用できるものと企図される。

【0175】

C. 一般的な薬学的組成物

いくつかの態様において、薬学的組成物が対象に投与される。種々の局面では、対象に組成物の有効量を投与することを含みうる。いくつかの態様において、Coaまたはそのペプチドもしくはコンセンサスペプチドを結合させる抗体を患者に投与して、一種または複数種のブドウ球菌属由来細菌による感染を防御または処置することができる。あるいは、1つまたは複数のそのような抗体またはポリペプチドもしくはペプチドをコードする発現ベクターを、予防的処置として患者に与えることもできる。さらに、そのような組成物を抗生物質と併せて投与することもできる。そのような組成物は一般に、薬学的に許容される担体または水媒体中に溶解または分散される。

30

【0176】

「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与される場合に有害反応、アレルギー反応または他の不都合な反応を生じることのない分子的実体および組成物をいう。本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される担体」とは、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌物質、および抗真菌物質、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性成分と不適合であるような場合を除き、免疫原性組成物および治療的組成物でのその使用が企図される。他の抗感染剤およびワクチンなどの、補助的な活性成分も組成物に組み入れることができる。

40

【0177】

活性化合物は、非経口投与のために製剤化することができ、例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、またはさらに腹腔内経路による注射のために製剤化することができる。典型的には、そのような組成物は、液体溶液または液体懸濁液のいずれかとして調製することができ：注射前に液体を加えることで溶液または懸濁液を調製するために用いるのに適した固体剤形を調製することもでき；かつ調製物を乳化することもできる。

50

【0178】

注射可能な用途に適した薬学的形態は、無菌の水溶液または分散液；ごま油、落花生油または水性プロピレングリコールを含む製剤；および無菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製用の無菌の粉末を含む。いかなる場合でも、この形態は無菌でなければならず、容易に注射可能となる程度に流動性でなければならない。それは製造および保存の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。

【0179】

タンパク質性組成物は、中性形態または塩形態に製剤化されてもよい。薬学的に許容される塩は、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基を伴って形成される)、および、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸を伴って形成されるものを含む。また、遊離カルボキシル基を伴って形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来することができる。

10

【0180】

薬学的組成物は、例えば、水、エタノール、多価アルコール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、適したそれらの混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒を含むことができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によりおよび界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の予防はさまざまな抗菌物質および抗真菌物質、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいと考えられる。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中の使用によってもたらすことができる。

20

【0181】

無菌の注射可能な溶液は、必要な量の活性化合物を適切な溶媒の中に、必要に応じて、上に列挙した種々の他の成分とともに組み入れ、その後、ろ過滅菌または同等の手順を行うことによって調製される。一般に、分散媒はさまざまな滅菌活性成分を、基本分散媒および上に列挙したものより必要とされるその他の成分を含む無菌の媒体の中に組み入れることによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分に加え任意の付加的な望ましい成分の粉末を、予めろ過滅菌されたその溶液から得る真空乾燥および凍結乾燥技術である。

30

【0182】

組成物の投与は典型的には、任意の共通の経路によると考えられる。これには、経口投与、鼻腔投与、または口腔投与が含まれるが、これらに限定されることはない。あるいは、投与は同所性の、皮内の、皮下の、筋肉内の、腹腔内の、鼻腔内の、または静脈内の注射によるものであってもよい。ある態様において、ワクチン組成物は吸入することができる(例えば、参照により具体的に組み入れられる米国特許第6,651,655号)。そのような組成物は、通常、薬理学的に許容される担体、緩衝液、または他の賦形剤を含む薬学的に許容される組成物として投与される。

40

【0183】

治療的または予防的組成物の有効量は、意図する目的に基づいて決定される。「単位用量」または「投与量」という用語は、対象での使用に適した物理的に異なる単位をいうが、各単位はその投与、すなわち、適切な経路および投与計画に関連する上記の所望の反応を生じるように算出された所定の量の組成物を含有する。処置回数と単位用量の両方によって投与される量は、望まれる防御に依る。

【0184】

また、組成物の的確な量は医師の判断に依り、各個体に特有のものである。用量に影響

50

する要因には、対象の身体的および臨床的状態、投与経路、意図する処置の目的(症状の緩和対治癒)、ならびに特定の組成物の有効性、安定性、および毒性が含まれる。

【0185】

製剤化されると、溶液は、投薬製剤と適合する様式で、および治療的にまたは予防的に有効であるような量で投与される。製剤は上記の注射可能な溶液のタイプなどの種々の投与量形態で容易に投与される。

【実施例】

【0186】

V. 実施例

以下の実施例は、さまざまな態様を例証する目的で与えられており、いかなる形においても本発明を限定することを意図するものではない。本発明は本明細書の中にある目標、目的および利点のほかに、言及されている、目標を達成するために、かつ目的および利点を得るために十分に適していることを当業者は容易に理解すると考えられる。本実施例は、本明細書において記述される方法とともに、目下、好ましい態様を代表するものであり、例示するものであり、本発明の範囲に対する限定と意図するものではない。その変更および特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨のなかに包含されるその他の用途が、当業者には想到されると考えられる。10

【0187】

実施例1

黄色ブドウ球菌疾患の間にコアグラーーゼ活性を中和するモノクローナル抗体20

Coa Mabの特異性および親和性。MabをCoa_{NM}に対して作製し、Coaに対するその親和性を測定した(表1)。モノクローナル抗体を無関係のタンパク質(IgA)との結合についても試験し、特異的な相互作用を示さなかったものをさらなる研究から除外した。vWbpはそのN末端のD1およびD2ドメインにおいてCoaといくらかの相同意を有する(Bjerketorp et al 2004, Watanabe et al 2005)ので、vWbpとのCoaモノクローナルの結合についても試験した。MabのどれもvWbpとの特異的結合を示さなかった。

【0188】

Coa上の各Mabの結合部位を決定するために、D1 (D1_{Coa})、D2 (D2_{Coa})、全D1D2ドメインおよびリンクードメインの一部を含む最初の329残基(D12_{Coa})、リンクー(L_{Coa})、反復領域(CT_{Coa})、ならびに最初の18アミノ酸を欠いている切断型のD1 (D1_{1~18})に相当するサブドメインをクローニングし、大腸菌において発現させた(図1)。11種のMabがD12_{Coa}を結合させ、これらの全てがD1_{Coa}を特異的に認識した(表1)。2種のMabがL_{Coa}を結合させ、MabのどれもD2_{Coa}を結合させなかった。2種のMabがCT_{Coa}を結合させた。30

【0189】

(表1) Coaに対して作製されたMabの生化学的性質および生物価

Mab	アイソタイプ	親和性 ^a						
		Coa _{NM}	D12 _{Coa}	D1 _{Coa}	D1 _{1~18}	D2 _{Coa}	L _{Coa}	CT _{Coa}
4H9.20	IgG1	0.04	0.01	0.01	<	<	<	<
5D5.4	IgG1	4.06	2.55	3.94	1.03	<	<	<
6C10.19	IgG1	3.82	4.39	0.01	<	<	6.58	<
4B10.44	IgG1	0.03	0.01	0.02	<	<	<	<
3B3.14	IgG1	3.2	<	<	<	<	<	5.25
7H4.25	IgG1	1.64	1.42	1.02	0.28	<	0.01	<
4F1.7	IgG1	0.68	0.05	1.01	0.1	<	<	<
8C2.9	IgG2a	3.4	3.2	0.78	0.57	<	<	<
2A3.1	IgG2a	0.17	0.24	0.12	0	<	<	<
5C3.2	IgG2b	0.4	0.3	0.35	0.02	<	<	<
2H10.12	IgG2b	2.39	2.87	2.13	0.03	<	<	<
6D1.22	IgG2b	2.79	3.28	2.13	0.03	<	<	<
6C4.15	IgG2b	5.97	<	<	<	<	<	6.70

^a × 10⁻⁹ M単位の結合定数(K_a)としてELISAにより決定された。

【0190】

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体による血液凝固の阻害。Coa特異的Mabを、野生型よりもゆっくり血液を凝固させる、黄色ブドウ球菌の同質遺伝子変異体vwb (Cheng et al)によるカルシウムキレートマウス血液の凝固を阻害するその能力についてスクリーニングした。単離された黄色ブドウ球菌Newman vwb変異体(1×10^6 CFU)をMab (3 μ M)と混合し、マウス血液に加えた。試料を凝固について一定間隔でモニターした。アイソタイプ対照とインキュベートされた血液と比べて、いくつかのMabが凝固時間を引き延ばした。凝固までの時間の最大の遅延をもたらした抗体は、5D5.4、7H4.25、および8C.9であった(表2)。これらの抗体は3つ全て、D1_{Coa}を認識するポリクローナルウサギ血清がマウス全血の凝固を遅延させるが、しかしCT_{Coa}を認識するものはそうでないという本発明者らの以前の所見と一致して、D1_{Coa}を認識する(表1) [215]。CT_{Coa}を認識した抗体(6C4.15、3B3.14)およびL_{Coa}を認識した抗体(6C10.27)は、ブドウ球菌凝固の遅延を引き起こさなかった(表2)。

【 0 1 9 1 】

(表2) Coaに対して作製されたモノクローナル抗体の存在下における黄色ブドウ球菌変異株vwbによる全血の凝固の阻害

アイソタイプ	抗体	凝固時間における遅延倍率(SEM) ^a
IgG1	IgG1 対照	1.0
	4H9.20	0.65 (0.18)
	5D5.4	2.07 (0.58)
	6C10.19	1.00 (0.14)
	4B10.44	1.19 (0.15)
	3B3.14	1.22 (0.18)
	7H4.25	1.63 (0.16)
	4F1.7	1.23 (0.14)
IgG2a	IgG2a 対照	1.0
	8C2.9	1.30 (0.15)
	2A3.11	0.83 (0.12)
IgG2b	IgG2b 対照	1.0
	5C3.2	1.12 (0.22)
	2H10.12	1.43 (0.18)
	6D1.22	1.08 (0.19)
	6C4.15	1.19 (0.15)

^aSEM、アイソタイプ対照と比べた場合の平均の標準誤差。

【 0 1 9 2 】

Mab 5D5.4はCoa・プロトロンビン複合体の形成を阻止する。試験した全てのMabのうち凝固の最も顕著な遅延を引き起こしたMab 5D5.4を、Coa・プロトロンビン活性を乱すその能力について調べた。精製ヒトプロトロンビンおよびS-2238発色性基質の添加の前に組換えCoaと5D5.4との混合物は、酵素活性の減少を引き起こした(IgG1対5D5.4, P < 0.05) (図2A)。興味深いことに、全血の凝固の遅延を引き起こした、7H4.25および8C2.9による処理は、このアッセイ法において酵素活性を有意に減少させなかつた(IgG1対7H4.25, P > 0.05; IgG2a対8C2.9, P > 0.05) (データは示されていない)。

【 0 1 9 3 】

5D5.4がプロトロンビンとのCoaの結合を阻止するかどうか試験するために、Maxisorb E LISAプレート(Nunc)を組換えCoaでコーティングし、ヒトプロトロンビンとのインキュベーションの前に抗体とともにインキュベートした。プロトロンビンの結合をHRP結合二次抗体によって検出した。5D5.4は200 nMの濃度で3.3倍、Coaとのプロトロンビンの結合を減少させた(IgG1対5D5.4, P < 0.01) (図2B)。これらの結果から、5D5.4がCoa・プロトロンビン複合体の形成を阻止し、酵素活性の減少を引き起こすことが示唆される。

【 0 1 9 4 】

CoaのN末端の4つのアミノ酸は、プロトロンビンを活性化する[66]。いずれかのモノクローナル抗体がN末端に依存的な形でD1を結合させるかどうか調べるために、D1_{Coa}ドメインからなるが、しかし最初の18アミノ酸を欠いている組換え構築物(D1_{1 ~ 18})を大腸菌

10

20

30

40

50

において発現させ、精製した(図1)。D1_{Coa}を認識する各Mabの結合定数を、切断型タンパク質との結合について測定した。8C2.9を除いて、Mabの全てがD1_{1~18}に対する結合定数の少なくとも1 logの減少を有していた(表1)。注目すべきは、5D5.4は3.94 nM⁻¹の親和性でD1_{Coa}を認識したが、しかし1.03 nM⁻¹の親和性でD1_{1~18}と相互作用した。この所見は、Coaの酵素活性に対するその直接的な阻害と組み合わせて、5D5.4が、黄色ブドウ球菌の異なる菌株のさまざまなCoa血清型の間で保存されうるN末端近傍のエピトープを認識するという考えを支持している。

【 0 1 9 5 】

Coa Mabによるブドウ球菌性敗血症の減少。以前の結果から、タイプ特異的な免疫が、D12_{Coa}を認識し、かつCoa活性を中和する抗体に起因することが示唆された[215]。インビトロで凝固を遅延させるCoa Mabがインビトロで黄色ブドウ球菌に対する防御免疫を付与するかどうか試験するために、マウスにモノクローナル抗体またはアイソタイプ対照調製物の腹腔内注射を与えた。6時間後、黄色ブドウ球菌株vwb (2×10^8 CFU)の後眼窩注射によってマウスを感染させた。マウスを10日の観察期間にわたり生存についてモニターし、防御をログランク検定によって評価した(図3)。2種の抗体Mab 5D5.4および7H4.25は、IgG1対照と比べて死までの時間の顕著な遅延を付与した(IgG1対5D5.4, P < 0.05; IgG1対7H4.25, P < 0.001) (図3A)。インビトロで凝固を遅延させたモノクローナル抗体8C2.9は、致死量の黄色ブドウ球菌株vwbからマウスを防御しなかった(IgG2a対8C2.9, P = 0.06) (図3B)。これらのデータは、D1ドメインに対する防御免疫が凝固活性の中和と相關しているという仮説と一致している。しかしながら、インビトロでの凝固のかく乱は、防御効果を獲得するには十分ではない。

【 0 1 9 6 】

Coa Mabによる交差反応性。Coaに対するタイプ特異的な免疫は、D1_{Coa}を認識する中和抗体に由来する[215]。しかしながら、CoaのN末端の7個のアミノ酸は、Coa種の間で保存されている[68]。菌株Newmanの組換えCoaに対して作製されたMabが他の血清型由来のCoaと交差反応するかどうか調べるために、Maxisorb ELISAプレート(Nunc)を流行株USA300 (CoaタイプIII)、85/2082 (CoaタイプIV)、N315 (CoaタイプII)、MRSA252 (CoaタイプIV)、MW2 (CoaタイプVII)、およびWIS (CoaタイプVII)由来のCoaでコーティングした。これらの対立遺伝子とのMabの結合を測定した(表3)。Coaの他の対立遺伝子に対する大部分の抗体の親和性は、Coa_{NM}に対する親和性よりも低い。2H10.12、5D5.4、8C2.9、4F1.7、および7H4.25は、Coa_{NM}よりも低い親和性であるが、Coa_{NM}と同じ血清型であるCoa_{USA300}を認識する(表3)。いくつかの抗体も、他の黄色ブドウ球菌臨床分離株の組換えCoaを認識する。5D5.4はCoa_{N315}、Coa_{WIS}およびCoa_{MW2}と相互作用し(表3)、7H4.25は低い親和性であるが、Coaの全ての血清型と相互作用した(表3)。

【 0 1 9 7 】

(表3)異なる菌株のCoaに対するMabの親和性

Mab ^a	ドメイン ^b	親和性 ^c							40
		Coa _{NM}	Coa _{USA300}	Coa _{85/2082}	Coa _{N315}	Coa _{MRSA}	Coa _{MW2}	Coa _{WIS}	
3B3.14	R	3.20	2.11	2.40	4.86	4.60	2.61	3.62	
2H10.12	D1	2.39	3.20	<	<	<	<	<	
5D5.4	D1	4.06	4.20	<	0.21	<	5.89	6.16	
8C2.9	D1	3.4	0.7	<	0.05	0.04	<	<	
4F1.7	D1	0.68	0.1	<	0	<	<	<	
6C10.19	L	3.82	6.66	<	7.13	<	<	<	
6G4.15	R	5.97	2.96	4.71	4.79	4.94	4.99	5.78	
7H4.25	D1	1.64	0.35	0.20	0.11	0.13	0.06	0.10	

^aマウスモノクローナル抗体は、単離されたハイブリドーマクローンから精製された。

^b各Mabによって認識されたCoaドメイン(表1)。

^c親和性は各タンパク質に対して 10^9 M⁻¹単位の結合定数(K_a)としてELISAにより決定され

10

20

30

40

50

た。

【0198】

mAb 5D5.4が他のコアグラーゼ血清型の菌株による凝固を遅延させるうえで交差防御効果を有するかどうか調べるために、黄色ブドウ球菌株Newman、N315、MW2、CowanI、およびWISの調製物(1×10^6 CFU)をmAb (最終 $3 \mu\text{M}$)と混合し、シトレイト処理されたウサギ血漿に加えた。血漿を37°Cでインキュベートし、経時的にモニターした。mAb 5D5.4はいずれの他のコアグラーゼ血清型の菌株による凝固を遅延させることができなかった(図4)。

【0199】

候補Mabが、全てのCoa血清型によって保存されたエピトープを認識しうる可能性について調べた。例えば、5D5.4は動物において広範な防御を提供したが、しかし凝固アッセイ法においてはそうでなかった。実際には、マウスに5D5.4またはIgG1アイソタイプ対照の腹腔内注射を受けさせ、その後、致死量の黄色ブドウ球菌株Newman (CoaタイプIII)、N315 (CoaタイプII)、CowanI (CoaタイプIV)、またはMW2 (CoaタイプVII)を感染させ、マウスを10日の観察期間にわたりモニターして、その防御の役割を評価した(図5)。5D5.4処理は、菌株Newman (IgG1対5D5.4, $P < 0.01$)、N315 (IgG1対5D5.4, $P < 0.05$)、CowanI (IgG1対5D5.4, $P < 0.05$)またはMW2 (IgG1対5D5.4, $P < 0.05$)で曝露された動物に対して死までの時間の遅延をもたらした。まとめて、これらのデータから、5D5.4が、Coa D1ドメイン内の保存されたエピトープを認識することにより、北米において最も一般的な3種のCoa血清型を有する菌株による致命的な疾患に対する防御を与えることが示唆される[144]。

【0200】

免疫におけるCoa_{CT}モノクローナル抗体の役割。CoaのC末端ドメインはブドウ球菌分離株の間でいっそう低い配列異形を示す[68]。本発明者らは、CT_{Coa}、3B3.14および6C4.15を認識する2種のモノクローナル抗体を単離した(表1)。ELISAを用いて、菌株NewmanのCT_{Coa}に対して作製されたMabが他の菌株由来のCoaと交差反応するかどうか調べた(表3)。本発明者らの予想と一致して、3B3.14および6C4.15はCoa_{USA300}、Coa_{85/2082}、Coa_{N315}、Coa_{MW2}、およびCoa_{WIS}を認識する。

【0201】

CT_{Coa}を認識するポリクローナル抗血清(CT_{Coa})は、CT_{Coa}とフィブリノゲンとの間の相互作用を遮断し、致死的なブドウ球菌疾患に対する防御を付与する[68、215]。それゆえ、いずれのMabがこれらの活性を保有するかどうかは興味深い。3B3.14および6C4.15がCT_{Coa}とフィブリノゲンとの結合を阻害するかどうか試験するために、Maxisorb ELISAプレート(Nunc)をCT_{Coa}でコーティングし、ヒトフィブリノゲンとのインキュベーションの前にMabまたはアイソタイプ対照とともにインキュベートした。フィブリノゲンの結合をHRP結合二次抗体によって検出した。3B3.14は $1 \mu\text{M}$ の濃度で54%だけCT_{Coa}とのフィブリノゲンの結合を減少させた(IgG1対3B3.14, $P < 0.001$) (図6A)。6C4.15はこのアッセイ法においてフィブリノゲンとのCT_{Coa}の結合を破壊しなかった(図6B)。

【0202】

生存に対するCoa_{CT}を認識するMabの効果をブドウ球菌疾患の間に調べるために、マウスに3B3.14、6C4.15またはそのアイソタイプ対照の腹腔内注射を与え、マウスを、vwbの欠失を伴う黄色ブドウ球菌Newman変種 2×10^8 CFUで曝露した(図6C～6D)。動物を10日の観察期間にわたりモニターして、生存に及ぼす抗体処理の寄与を評価した。3B3.14または6C4.15による処置は、死までの時間の顕著な遅延をもたらさなかった($P > 0.05$) (図6C～6D)。かくして、ここで作製されたMabのいずれも、ウサギにおいて作製されたポリクローナルCT_{Coa}抗体の防御価値を保持していない。

【0203】

CT_{Coa}は黄色ブドウ球菌株の間で比較的保存されており、Coaのこの部分を中和する抗体がいくつかの黄色ブドウ球菌種によるブドウ球菌感染に対する防御を与えるかどうか調べるため、マウスに3B3.14またはIgG1アイソタイプ対照の腹腔内注射を与え、その後、致死量の黄色ブドウ球菌臨床分離株USA300 (CoaタイプIII)、N315 (CoaタイプII)、CowanI (CoaタイプIV)、またはMW2 (CoaタイプVII)を感染させ、マウスを10日の観察期間にわたり

10

20

30

40

50

モニターして、その防御の役割を評価した(図7)。3B3.14は野生型Newman (IgG1対3B3.14 p > 0.05 図7A)、N315 (IgG1対3B3.14 p.0.05 図7B)、またはMW2 (IgG1対3B3.14 p.0.05 図7D)を用いた曝露からマウスを防御しなかった。3B3.14は菌株Cowaniを用いた曝露後に死までの時間の小幅な遅延を与えた(IgG1対3B3.14 p < 0.001 図7C)。

【0204】

考察。コアグラーゼ発現は、ほぼ1世紀の間、黄色ブドウ球菌の病毒性と関連付けられてきた[212]。最近、CoaおよびvWbpに対して引き起こされた体液性免疫反応が黄色ブドウ球菌を用いた曝露に対する防御を与えることが実証された(Cheng et al 2010、McAdow et al 2011、[215])。Coa活性の中和はタイプ特異的な免疫反応をもたらすが、CT_{Coa}に対する免疫反応も、おそらく血液循環からの抗原の除去によって、防御を付与する[215]。本明細書で、本発明者らは、Coa活性を中和し、かつ他の血清型のコアグラーゼに対していくらかの交差防御を示すモノクローナル抗体を特定する。本研究において、本発明者らは、菌株Newman由来のCoaに対するモノクローナル抗体を作製し、ポリペプチドの特異的ドメインとの結合をマッピングした。
10

【0205】

3種のMab (5D5.4、8C2.9、および7H4.25)は、D1_{Coa}を結合させ、菌株Newmanによる血液凝固を遅延させる。凝固の最大の遅延をもたらすMab 5D5.4はまた、Coa・プロトロンビン複合体の形成を乱し、それによってフィブリノゲンをフィブリンに変換する酵素のアッセンブリを減少させる。Mab 5D5.4および7H4.25は黄色ブドウ球菌株vwbによる致命的な疾患に対する防御を与える。
20

【0206】

CoaのN末端アミノ酸はプロトロンビンの活性化に必要とされるので、本発明者らは、いずれのモノクローナル抗体がこのドメインを認識するかどうかと考えた。この問題に対処するため、本発明者らは、Mabが結合するのにD1_{Coa}の最初の18アミノ酸が必要とされるかどうか問い合わせた。5D5.4はD1_{1~18}に対する親和性の1 log超の減少を有し、7H4.25はこの構築物を結合させることができなかった。この所見は、これらの2種のモノクローナル抗体がプロトロンビン活性化ポケットに挿入するCoa N末端の能力を特異的に妨害することによって凝固を乱すという仮説を支持している。

【0207】

この仮説が真実であるなら、Mab 5D5.4および7H4.25は、黄色ブドウ球菌の他の菌株からクローニングされた組換えCoaを認識かつ中和するはずである。これらの抗体は、現在の流行病における他の一般的な血清型に相当する黄色ブドウ球菌株からクローニングされた組換えCoaを認識するが、しかしそれらは本発明者らの実験における他のCoa血清型の菌株による凝固を遅延させることができない。それゆえ、これらのMabがアミノ末端を特異的に認識するという可能性は低いと考えられる。それにもかかわらず、5D5.4は黄色ブドウ球菌の他の少なくとも2種の菌株に対する防御を与える。これは、抗体がCoaの最も保存された部分を特異的に認識しないが、Coaとのその相互作用には保存された残基を要することを示唆している。
30

【0208】

以前に、本発明者らは、CoaのD1D2ドメインに対する抗体がタイプ特異的な免疫を引き起こすことを実証した。異なるCoa血清型のいくつかのブドウ球菌株から動物を防御するMabの特定は、一連のブドウ球菌分離株によるCoa活性を中和する防御免疫を引き起こすことが可能でありうるという証拠を提供する。
40

【0209】

2種のモノクローナル抗体がCT_{Coa}を認識する。どちらも以前の所見と一致して、血液凝固に効果を及ぼさない[215]。これらのうちの1つ、3B3.14は、C末端反復領域とのフィブリノゲンの結合を乱した。Mab 3B3.14によって認識されるエピトープの、さらに洗練されたマッピングにより、今日まで研究されていなかった、Coa C末端がいかにしてフィブリノゲンを結合させるかを明らかにすることことができた。これらのMabの受動移入では、ブドウ球菌による致死的曝露からマウスが防御されなかった。
50

【0210】

本明細書で記述されるモノクローナル抗体は、ブドウ球菌疾患の予防のための薬理学的な手段を提供する。それらはまた、ブドウ球菌性の発病および免疫の最中のCoaの機構を理解するための手段として役立つ。

【0211】**実施例2****材料および方法**

細菌株および培養物の増殖。黄色ブドウ球菌株はトリプトソイ寒天またはプロスにて37度培養した。菌株vwbの作製は既述されていた(Cheng et al 2010)。大腸菌(*Escherichia coli*)株DH5 およびBL21 (DE3)はルリアベルターニ寒天またはプロスにて37 度培養した。アンピシリン(100 μ g/ml)をpET15bおよびpGEX6P-1の選択に用いた。10

【0212】

タンパク質精製。黄色ブドウ球菌株Newman由来のcoaおよびそのサブドメインを含む発現ベクターを担持する大腸菌BL21(DE3)を、37 度増殖させ、室温にて終夜100 mM IPTGで誘導した。Coaの精製中の分解のため、大腸菌DH5 中のpGEX6P-1発現ベクターを用い、GSTタグの付いた構築物としてUSA300、N315、MW2、MRSA252、85/2082、およびWIS由来のcoaを発現させた。誘導から3時間後に、細胞を $7,000 \times g$ で遠心分離し、1×カラム用緩衝液(0 .1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl)中に懸濁し、フレンチプレス細胞破碎機(French pressure cell)中14,000 lb/インチ²で溶解させた。溶解物を30分間40,000 × gでの超遠心分離に供した。pET15b構築物の上清をNi-NTAクロマトグラフィーに供し、10 mMイミダゾールを含有するカラム用緩衝液で洗浄し、500 mMイミダゾールで溶出させた。GSTタグの付いたタンパク質の場合、培養上清をグルタチオンセファロースクロマトグラフィーに供した。GSTタグを除去するため、カラム用緩衝液で洗浄した後に、1 mM DTTを含有するPreScissionプロテアーゼ切断緩衝液をカラムに流し、カラムを、製造業者が提供する単位定義にて終夜PreScissionプロテアーゼ(GE Healthcare)とともにインキュベートした。GSTタグを欠く遊離したタンパク質をその後、さらなるプロテアーゼ切断緩衝液で溶出させた。溶出液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に対して脱塩した。ワクチン調製物の場合、内毒素を1:100 Triton-X114の添加によって除去し、溶液を10分間冷却し、10分間37 度インキュベートし、13,000 × gで遠心分離した。これを2回繰り返した。上清をHiTrap脱塩カラムに負荷して、Triton-X114の残留物を除去した。20

【0213】

コアグラーーゼに対するモノクローナル抗体の产生。38週齢BALB/c雌性マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に完全フロイントアジュバント(DIFCO)中1:1で乳化されたPBS中の、黄色ブドウ球菌株Newmanからクローニングされた、精製Coa 100 μ gを腹腔内に免疫した。21および42日目に、マウスに腹腔内注射により、不完全フロイントアジュバント(DIFCO)中1:1で乳化された精製Coa 100 μ gを追加免疫した。31および52日目に、マウスから採血し、CoaでコーティングされたNunc MaxiSorp 96ウェル平底プレートにてELISAによりスクリーニングした。初回免疫から79日後に、抗原に対する強力な免疫反応性を示したマウスにPBS中のCoa 25 μ gを追加免疫した。3日後、脾細胞を収集し、マウス骨髄腫細胞株SP2/0MIL-6、つまりSP2/0骨髄腫細胞株のインターロイキン6分泌派生株と、標準的な方法にしたがって、融合した。ハイブリドーマをELISAによってスクリーニングし、抗原特異的クローニングを限界希釈法によってサブクローニングし、単一細胞から生じたモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマをもたらした。抗体を細胞株の培養上清から精製し、PBS中1 mg ml⁻¹の濃度で貯蔵した。40

【0214】

Coa親和性マッピング。Coa特異的Mabの結合親和性の決定のため、Nunc MaxiSorp 96ウェルプレートを0.1 M重炭酸ナトリウム中20 nMの濃度でCoa変種によりコーティングした。プレートをPBS中3%のBSAでブロッキングし、引き続いてPBS-Tween中の可変濃度のMabとのインキュベーションを行った。二次抗体-HRP結合体および化学発光検出を用いて結合抗体と遊離抗体との濃度の比率として、各Coa変種を結合させるMabの親和性を測定した。こ50

のデータを用いて、抗原に対する抗体の結合定数を算出した(表1)。さらに、Coaに対して作製されたMabの特異性を試験するために、ELISAプレート(NUNC Maxisorp)を、親和性精製されたvWbpおよびIsdAでコーティングした。

【0215】

ELISAによるタンパク質相互作用のプロッキング。MaxSorb 96ウェルELISAプレートを終夜、組換えCoa変種(1×コーティング緩衝液中20 nM)でコーティングした。プロッキング後、ウェルを次に、濃度が20 nM~1 μMに及ぶMabとともにインキュベートした。ウェルをその後、100 nMのヒトフィブリノゲンまたは20 nMのヒトプロトロンビンのいずれかとともにインキュベートした。各タンパク質に対するヒツジ抗ヒト抗体を1:1000希釈で加え、引き続き1:10,000でHRP結合ヤギ抗ヒツジ抗体を加えた。OpEIA Kit (BD Lifesciences)を用いてウェルを発色させ、450 nmでの吸光度を測定した。統計解析をGraphPad Prismで両側スチュードントのt検定を使って行った。

10

【0216】

凝固アッセイ法。ブドウ球菌株の終夜培養物を新鮮TSBへ1:100希釈し、それらがOD₆₀₀ 0.4に達するまで37℃で増殖させた。培養物1 mLを遠心分離し、ブドウ球菌を洗浄し、無菌PBS 1 mLに懸濁して、1 × 10⁸ CFU/mLの懸濁液を作製した。未処置BALB/cマウス由来の全血を回収し、クエン酸ナトリウムを終濃度1% (w/v)まで加えた。抗体の存在下での細菌の血液凝固活性を評価するため、ストック細菌培養物10 μLを滅菌プラスチック試験管(BD Falcon)中で、30 μMの抗体を含有するPBS 10 μLと混合し、15分間インキュベートした。各管に、滅菌プラスチック試験管(BD falcon)中、抗凝固マウス血液80 μL。試験管を37℃でインキュベートし、一定間隔で45°の角度に管を傾けることによって血液凝固を検証した。全ての実験を少なくとも2回の独立した実験にて繰り返した。

20

【0217】

コアグラーーゼ活性の測定。5 × 10⁻⁸ Mのプロトロンビン(Innovative Research)を室温で等モル量の機能的Coaとともに10分間プレインキュベートし、引き続いてPBS 100 μLの全反応緩衝液中1 mMの終濃度までS-2238(発色性基質)の添加を行った。吸光度の変化を分光光度計中で10分間450 nmにて測定し、時間に応じてプロットし、線形曲線に適合させた。曲線の傾き(dA/dt)はS-2238加水分解の速度であり、したがって酵素機能を反映しているものと解釈された。アッセイ法を、5 × 10⁻⁹ Mで添加されたモノクローナル抗体の存在下で繰り返し、阻害なしの平均活性に対してデータを規準化した。全ての実験を三つ組で行った。

30

【0218】

受動免疫によるマウス敗血症。黄色ブドウ球菌による曝露の6時間前に、PBS中のアフィニティー精製抗体をBALB/cマウス(6週齢、雌性、Charles River Laboratories)の腹腔へ実験動物の体重1 kgあたり5 mgの濃度で注射した。黄色ブドウ球菌株vwbの終夜培養物を新鮮TSB中に1:100希釈し、37℃で2時間増殖させた。ブドウ球菌を沈降させ、洗浄し、所望の細菌濃度になるまでPBSに懸濁した。以下の接種材料を用いた：vwb, 2 × 10⁸ CFU; N3 15, 1 × 10⁸ CFU; MW2, 2 × 10⁸ CFU。試料アリコットをTSA上に広げ、寒天プレート上に形成されたコロニーを数え上げることによって接種材料を確認した。マウスを体重1キログラムあたり100 mg mL⁻¹のケタミンおよび20 mg mL⁻¹のキシラジンの腹腔内注射によって麻酔した。ブドウ球菌懸濁液100 μLの後眼窩注射によってマウスを感染させた(上記参照)。マウスを生存についてモニターした。統計解析を、GraphPad Prismを用い両側ログラム検定を使って行った。全てのマウス実験は、シカゴ大学の施設内生物安全委員会(IBC)および動物実験委員会(IACUC)による実験プロトコールの審査および承認に従う施設内ガイドラインによって実施された。

40

【0219】

実施例3

COA MAB重鎖および軽鎖アミノ酸配列アライメントおよび分析

異なるモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖可変領域を配列決定した。抗体中のこれらの領域のCDRを下記表5に示す。IMGT vquestによるmAb配列のアライメント後、CDRを特定

50

し、Clustal Omegaを用いて重鎖および軽鎖CDR 1、2、および3のアミノ酸配列を整列させた。配列アライメントおよび分析の後に、一握りの有益なテーマが存在していた。使用可能な全配列(重鎖および軽鎖の両方)に基づき、類似の配列を有するmAbのファミリーが浮かび上がったものの、mAbは配列が同一であるとは考えられなかった。これらのうちの1つは4F1.7、2A3.1、2H10.12を含み、主な配列差異は重鎖および軽鎖の両方のCDR3に存在していた。7H4.25、4H9.20、4B10.44は軽鎖内で正確なCDR配列の適合を共有していたが、その軽鎖は異なっていた。配列類似性に基づいて浮かび上がる興味深い群は、3B3.14および6C4.15であったが、これらは、タンパク質のC末端領域を結合させ、軽鎖中、同じCDR1を共有していたが、しかしその重鎖は異なっている。それどころか、D1ドメインを結合させ、プロトロンビンとのcoaの結合を阻害し、「インビボ実験」において防御性である5D5.4は、他のものとは軽鎖および重鎖の両方が非常に異なっている。

【0220】

(表5)

^a 抗体	コアグラーゼ特異的モノクローナル抗体のアミノ酸配列決定データ						
	可変鎖	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
4H9.20	軽	QSVDYNGISY	9	AAS	10	QQSIEDPRT	11
5D5.4	軽	SSVSSSY	15	STS	16	QQYHRSPPT	17
4B10.44	軽	QSVDYNGISY	9	AAS	21	HQSIEDPRT	22
3B3.14	軽	QSIVHSNGNTY	24	KVS	25	FQGSHVPLT	26
7H4.25	軽	QSVDYNGISY	9	AAS	21	HQSIEDPRT	30
2A3.1	軽	QSLLNSRARKNY	33	WAS	34	KQSYNLWT	35
2H10.12	軽	QSLLNSRARKNY	40	WAS	34	KQSYYLWT	36
6D1.22	軽	QSLLNSRARKNY	40	WAS	34	KQSYNLWT	35
6C4.15	軽	QSLLNSRTRKIY	44	WAS	34	KQSYLYT	45
6C10.19	軽	QNIVHSNGNTY	56	KVS	25	LQGSNCSNH	57
8C2.9	軽	QSLLNSRARKNY	40	WAS	34	KQSYNLWT	35
4F1.7	軽	QSLFNSRARKNY	49	WAS	34	KQSYNLWT	35

^aハイブリドーマ細胞から抽出された全RNAより合成されたcDNAから増幅されたPCR産物を配列決定し、かつIMGT Vquestを用いて分析した。

表5の続き

10

20

30

モノクローナル抗体の可変重鎖のCDR領域のアミノ酸配列							
^a Ab	コアグラーゼ特異的モノクローナル抗体のアミノ酸配列決定データ						
	可変鎖	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
4H9.20	重	GFNKDIY	12	IDPANGNT	13	SRSGAY	14
5D5.4	重	GASITTSY	18	ISYSGNT	19	AATYYDFNYD GYLDV	20
4B10.44	重	GFNKDIY	12	IDPANGNT	13	SRSGAF	23
3B3.14	重	GYTFTSFD	27	IFPGDGSS	28	VKNHGGWSFD V	29
7H4.25	重	GFNKDIY	12	IDPADGHS	31	SRSGAI	32
2A3.1	重	YTLTDYS	37	INTETGEP	38	ARTARDY	39
2H10.12	重	GYTLTDYS	41	INTETGEP	38	GRTARADY	42
6D1.22	重	GYTLTDYS	41	INTETGDP	43	ARTARADY	38
6C4.15	重	GFSFSNYW	46	IRLKSDNY GT	47	SAYGDYEY	48
6C10.19	重	GYEFTDFE	50	FDPETGRS	51	SRFHYYGRTA Y	52
8C2.9	重	GFTFSNYY	53	IKSNGVST	54	VRHDGYYFAY	55
4F1.7	重	GFSIKDTT	58	IDPTDGHN	59	KQSYNLWT	60

^aハイブリドーマ細胞から抽出された全RNAより合成されたcDNAから増幅されたPCR産物を配列決定し、かつIMGT Vquestを用いて分析した。

【 0 2 2 1 】

参照文献

以下の参照文献は、それらが例示的な手順の詳細または本明細書において記載される手順を補足する他の詳細を提供する限り、特に参照により本明細書に組み入れられる。

1. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC, editors (2004) Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases. 4th ed. New York: McGraw-Hill. xiii, 979 p. p.
2. Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine* 339: 520-532.
3. Boucher HW, Corey GR (2008) Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 5: S344-349. 10
4. Chu VH, Crosslin DR, Friedman JY, Reed SD, Cabell CH, et al. (2005) Staphylococcus aureus bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. *The American journal of medicine* 118: 1416.
5. Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, Budge P, Arnold KE, et al. (2009) Staphylococcus aureus community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Annals of emergency medicine* 53: 358-365.
6. Kang J, Sickbert-Bennett EE, Brown VM, Weber DJ, Rutala WA (2011) Relative frequency of health care-associated pathogens by infection site at a university hospital from 1980 to 2008. *American journal of infection control*. 20
7. Gravenkemper CF, Brodie JL, Kirby WM (1965) Resistance of Coagulase-Positive Staphylococci to Methicillin and Oxacillin. *Journal of bacteriology* 89: 1005-1010.
8. Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM (1982) Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Annals of internal medicine* 97: 325-329.
9. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, et al. (1998) Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 279: 593-598. 30
10. Noble WC, Virani Z, Cree RG (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS microbiology letters* 72: 195-198.

11. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, et al. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569-1571.
12. McAleese FM, Foster TJ (2003) Analysis of mutations in the *Staphylococcus aureus* *clfB* promoter leading to increased expression. *Microbiology* 149: 99-109.
13. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, et al. (2008) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46: 668-674. 10
14. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J (2005) Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Current infectious disease reports* 7: 420-428.
15. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, et al. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96: 2149-2156.
16. Clarke SR, Foster SJ (2006) Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in microbial physiology* 51: 187-224. 20
17. Schneewind O, Fowler A, Faull KF (1995) Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268: 103-106.
18. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285: 760-763.
19. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O (2000) *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5510-5515. 30
20. McAdow M, Kim HK, Dedent AC, Hendrickx AP, Schneewind O, et al. (2011) Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS pathogens* 7: e1002307.
21. Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, et al. (2009) Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: 3393-3404. 40
22. Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, et al. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299: 906-909.

23. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, et al. (2004) Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature medicine* 10: 243-245.
24. Lee JC, Betley MJ, Hopkins CA, Perez NE, Pier GB (1987) Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *The Journal of infectious diseases* 156: 741-750.
25. Lin WS, Cunneen T, Lee CY (1994) Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 176: 7005-7016. 10
26. Baddour LM, Lowrance C, Albus A, Lowrance JH, Anderson SK, et al. (1992) *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *The Journal of infectious diseases* 165: 749-753.
27. Tuchscherer LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, et al. (2005) Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infection and immunity* 73: 7932-7937. 20
28. Na'was T, Hawwari A, Hendrix E, Hebden J, Edelman R, et al. (1998) Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *Journal of clinical microbiology* 36: 414-420.
29. Paul-Satyaseela M, van Belkum A, Shivannavar CT, Gaddad SM (2004) Carriage of capsulated strains of *Staphylococcus aureus*: a population-based study performed in Gulbarga, South India. *Epidemiology and infection* 132: 831-838.
30. Melles DC, Taylor KL, Fattom AI, van Belkum A (2008) Serotyping of Dutch *Staphylococcus aureus* strains from carriage and infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 52: 287-292.
31. Lattar SM, Tuchscherer LP, Caccuri RL, Centron D, Becker K, et al. (2009) Capsule expression and genotypic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic or acute osteomyelitis. *Infection and immunity* 77: 1968-1975.
32. Sutter DE, Summers AM, Keys CE, Taylor KL, Frasch CE, et al. (2011) Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *FEMS immunology and medical microbiology* 63: 16-24. 40
33. Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Freche B (2008) Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65: 493-507.

34. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13473-13478.
35. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, et al. (2011) A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nature medicine*.
36. Powers ME, Kim HK, Wang Y, Bubeck Wardenburg J (2012) ADAM10 Mediates Vascular Injury Induced by *Staphylococcus aureus* alpha-Hemolysin. *The Journal of infectious diseases*.
10
37. Kantyka T, Shaw LN, Potempa J (2011) Papain-like proteases of *Staphylococcus aureus*. *Advances in experimental medicine and biology* 712: 1-14.
38. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, et al. (2004) Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *The Journal of experimental medicine* 199: 687-695.
39. Rooijakkers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, et al. (2005) Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature immunology* 6: 920-927.
20
40. Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, Schneewind O (2009) *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *The Journal of experimental medicine* 206: 2417-2427.
41. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6: 188-195.
30
42. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG (1977) Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infection and immunity* 15: 760-764.
43. Goodyear CS, Silverman GJ (2004) Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11392-11397.
44. Kim HK, Cheng AG, Kim HY, Missiakas DM, Schneewind O (2010) Nontoxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *The Journal of experimental medicine* 207: 1863-1870.
40
45. Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsil P, Loof TG, Dobcs P, et al. (2010) Pathogen entrapment by transglutaminase--a conserved early innate immune mechanism. *PLoS pathogens* 6: e1000763.

46. Loof TG, Morgelin M, Johansson L, Oehmcke S, Olin AI, et al. (2011) Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*.
47. Krarup A, Wallis R, Presanis JS, Gal P, Sim RB (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS one* 2: e623.
48. Loeb L (1903) The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. *The Journal of medical research* 10: 407-419.
49. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, et al. (2010) Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS pathogens* 6. 10
50. Adams RL, Bird RJ (2009) Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 14: 462-470.
51. Gailani D, Renne T (2007) Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27: 2507-2513. 20
52. Procyk R, Blomback B (1990) Disulfide bond reduction in fibrinogen: calcium protection and effect on clotability. *Biochemistry* 29: 1501-1507.
53. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF (2009) Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 48: 3877-3886.
54. Blomback B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L (1978) A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 275: 501-505.
55. Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF (2000) A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 14156-14161. 30
56. Lorand L (2000) Sol Sherry Lecture in Thrombosis : research on clot stabilization provides clues for improving thrombolytic therapies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20: 2-9.
57. Delvaeye M, Conway EM (2009) Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood* 114: 2367-2374.
58. Walker JB, Nesheim ME (1999) The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *The Journal of biological chemistry* 274: 5201-5212. 40
59. Rijken DC, Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7: 4-13.

60. Lord ST (2011) Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 494-499.
61. Konings J, Govers-Riemslag JW, Philippou H, Mutch NJ, Borissoff JI, et al. (2011) Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* 117: 1020-1027.
62. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, et al. (2000) The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 96: 988-995.
63. Andersen MD, Kjalke M, Bang S, Lautrup-Larsen I, Becker P, et al. (2009) Coagulation factor XIII variants with altered thrombin activation rates. *Biological chemistry* 390: 1279-1283.
64. Wolberg AS (2010) Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 16 Suppl 3: 7-12.
65. Mutch NJ, Engel R, Uitte de Willige S, Philippou H, Ariens RA (2010) Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood* 115: 3980-3988.
66. Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, et al. (2003) Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* 425: 535-539.
67. Kroh HK, Panizzi P, Bock PE (2009) Von Willebrand factor-binding protein is a hysteretic conformational activator of prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7786-7791.
68. Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E, et al. (2005) Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 187: 3698-3707.
69. Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H (1985) Staphylocoagulase-binding region in human prothrombin. *Journal of biochemistry* 97: 325-331.
70. Cheung AI, Projan SJ, Edelstein RE, Fischetti VA (1995) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (fbpA) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infection and immunity* 63: 1914-1920.
71. Phonimdaeng P, O'Reilly M, O'Toole PW, Foster TJ (1988) Molecular cloning and expression of the coagulase gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of general microbiology* 134: 75-83.

72. Bjerketorp J, Jacobsson K, Frykberg L (2004) The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS microbiology letters* 234: 309-314.
73. Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh A, Flock JI, Jacobsson K, et al. (2002) A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 148: 2037-2044.
74. Chapman GH, Berens C, Peters A, Curcio L (1934) Coagulase and Hemolysin Tests as Measures of the Pathogenicity of Staphylococci. *Journal of bacteriology* 28: 343-363. 10
75. Spink WW, Vivino JJ (1942) The Coagulase Test for Staphylococci and Its Correlation with the Resistance of the Organisms to the Bactericidal Action of Human Blood. *The Journal of clinical investigation* 21: 353-356.
76. Ekstedt RD, Yotis WW (1960) Studies on staphylococci. II. Effect of coagulase on the virulence of coagulase negative strains. *Journal of bacteriology* 80: 496-500.
77. Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ (1990) The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular microbiology* 4: 393-404. 20
78. Baddour LM, Tayidi MM, Walker E, McDevitt D, Foster TJ (1994) Virulence of coagulase-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Journal of medical microbiology* 41: 259-263.
79. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, et al. (1995) Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infection and immunity* 63: 4738-4743.
80. Stutzmann Meier P, Entenza JM, Vaudaux P, Francioli P, Glauser MP, et al. (2001) Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism *Streptococcus gordonii*. *Infection and immunity* 69: 657-664. 30
81. Sawai T, Tomono K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Kaku M, et al. (1997) Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infection and immunity* 65: 466-471.
82. Haraldsson I, Jonsson P (1984) Histopathology and pathogenesis of mouse mastitis induced with *Staphylococcus aureus* mutants. *Journal of comparative pathology* 94: 183-196. 40
83. Jonsson P, Lindberg M, Haraldsson I, Wadstrom T (1985) Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infection and immunity* 49: 765-769.

84. Seki K, Ogasawara M, Sakurada J, Murai M, Masuda S (1989) Altered virulence of a pleiotropic *Staphylococcus aureus* mutant with a low producibility of coagulase and other factors in mice. *Microbiology and immunology* 33: 981-990.
85. Johnstone JM, Smith DD (1956) Coagulase activity in vivo. *Nature* 178: 982-983.
86. Lam GT, Sweeney FJ, Jr., Witmer CM, Wise RI (1963) Abscess-Forming Factor(S) Produced by *Staphylococcus Aureus*. I. Collodion Bag Implantation Technique. *Journal of bacteriology* 86: 611-615.
87. Lam GT, Sweeney FJ, Jr., Witmer CM, Wise RI (1963) Abscess-Forming Factor(S) Produced by *Staphylococcus Aureus*. II. Abscess Formation and Immunity by a *Staphylococcus* and Its Mutants. *Journal of bacteriology* 86: 87-91.
88. Cawdery M, Foster WD, Hawgood BC, Taylor C (1969) The role of coagulase in the defence of *Staphylococcus aureus* against phagocytosis. *British journal of experimental pathology* 50: 408-412.
89. Kapral FA (1966) Clumping of *Staphylococcus aureus* in the peritoneal cavity of mice. *Journal of bacteriology* 92: 1188-1195.
90. Yeaman MR, Norman DC, Bayer AS (1992) Platelet microbicidal protein enhances antibiotic-induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36: 1665-1670.
91. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D (2006) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature reviews Microbiology* 4: 445-457.
92. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, et al. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 30: 245-257.
93. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penades J, et al. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular microbiology* 44: 1033-1044.
94. Niemann S, Spehr N, Van Aken H, Morgenstern E, Peters G, et al. (2004) Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation* 110: 193-200.
95. Much H (1908) Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von Staphylokokkus aureus. *Biochem Z* 14: 143-155.
96. Birch-Hirschfeld L (1934) Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas. *Klinische Wochenschrift* 13: 331.

97. Cadness-Graves B, WR, Harper C.J., Miles A.A. (1943) Slide test for coagulase- positive staphylococci. *Lancet* 2: 736-738.
98. Berger F (1943) Clumping of pathogenic staphylococci in plasma. *Journal of Pathology and Bacteriology* 55.
99. Duthie ES (1954) Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. *Journal of general microbiology* 10: 427-436.
100. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 11: 237-248.
101. Que YA, Haefliger JA, Francioli P, Moreillon P (2000) Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. *Infection and immunity* 68: 3516-3522.
102. Umeda A, Ikebuchi T, Amako K (1980) Localization of bacteriophage receptor, clumping factor, and protein A on the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 141: 838-844.
103. Jensen K (2007) A normally occurring *Staphylococcus* antibody in human serum. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 115: 533-539; discussion 540-531.
104. Deisenhofer J, Jones TA, Huber R, Sjodahl J, Sjoquist J (1978) Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 359: 975-985.
105. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, et al. (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5399-5404.
106. O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, et al. (2006) *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *The FEBS journal* 273: 4831-4841.
107. Projan SJ, Nesin M, Dunman PM (2006) Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Current opinion in pharmacology* 6: 473-479.

108. Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, et al. (2002) Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *The New England journal of medicine* 346: 491-496.
109. Fattom A, Fuller S, Propst M, Winston S, Muenz L, et al. (2004) Safety and immunogenicity of a booster dose of Staphylococcus aureus types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients. *Vaccine* 23: 656-663. 10
110. Kuklin NA, Clark DJ, Secore S, Cook J, Cope LD, et al. (2006) A novel Staphylococcus aureus vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. *Infection and immunity* 74: 2215-2223.
111. Harro C, Betts R, Orenstein W, Kwak EJ, Greenberg HE, et al. (2010) Safety and immunogenicity of a novel Staphylococcus aureus vaccine: results from the first study of the vaccine dose range in humans. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 17: 1868-1874. 20
112. Kernodle DS (2011) Expectations regarding vaccines and immune therapies directed against Staphylococcus aureus alpha-hemolysin. *The Journal of infectious diseases* 203: 1692-1693; author reply 1693-1694.
113. DeDent A, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O (2012) Exploring Staphylococcus aureus pathways to disease for vaccine development. *Seminars in immunopathology* 34: 317-333.
114. Balaban N, Goldkorn T, Nhan RT, Dang LB, Scott S, et al. (1998) Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against Staphylococcus aureus. *Science* 280: 438-440. 30
115. Arrecubieta C, Matsunaga I, Asai T, Naka Y, Deng MC, et al. (2008) Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent Staphylococcus aureus infection of an aortic patch in mice. *The Journal of infectious diseases* 198: 571-575.
116. Bubeck Wardenburg J, Schneewind O (2008) Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia. *The Journal of experimental medicine* 205: 287-294.
117. Gong R, Hu C, Xu H, Guo A, Chen H, et al. (2010) Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 17: 1746-1752. 40
118. Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T (2001) Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *The Journal of infectious diseases* 184: 1572-1580.

119. Kim HK, DeDent A, Cheng AG, McAdow M, Bagnoli F, et al. (2010) IsdA and IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abscess formation and lethal challenge. *Vaccine* 28: 6382-6392.
120. Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hock M, Tarkowski A (1998) Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *The Journal of clinical investigation* 101: 2640-2649.
121. Kennedy AD, Bubeck Wardenburg J, Gardner DJ, Long D, Whitney AR, et al. (2010) Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *The Journal of infectious diseases* 202: 1050-1058. 10
122. Stranger-Jones YK, Bac T, Schneewind O (2006) Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16942-16947.
123. Kim HK, Kim HY, Schneewind O, Missiakas D (2011) Identifying protective antigens of *Staphylococcus aureus*, a pathogen that suppresses host immune responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25: 3605-3612. 20
124. Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, et al. (2009) Genetic diversity of staphylocoagulase genes (coa): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *PloS one* 4: e5714.
125. McCarthy AJ, Lindsay JA (2010) Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC microbiology* 10: 173. 30
126. Klevens RM, Edwards JR, Gaynes RP, System NNIS (2008) The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin Infect Dis* 47: 927-930.
127. Rogers DE, Melly MA (1965) Speculations on the immunology of staphylococcal infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* 128: 274-284.
128. Goodyear CS, Silverman GJ (2003) Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic suprACLonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *The Journal of experimental medicine* 197: 1125-1139. 40
129. Field HI, Smith, H.W. (1945) Coagulase test for staphylococci. *J Comp Pathol* 55: 63.
130. Smith W, Hale JH, Smith MM (1947) The role of coagulase in staphylococcal infections. *British journal of experimental pathology* 28: 57-67.

131. Kinoshita M, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Otokozawa S, et al. (2008) Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and immunology* 52: 334-348.
132. Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6: 95-107.
133. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, et al. (2006) Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *The Journal of biological chemistry* 281: 1179-1187. 10
134. Tager M, Drummond MC (1965) Staphylocoagulase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 128: 92-111.
135. Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K (2007) Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes. *J Bacteriol* 190: 300-310.
136. Albus A, Arbeit RD, Lee JC (1991) Virulence of *Staphylococcus aureus* mutants altered in type 5 capsule production. *Infection and immunity* 59: 1008-1014. 20
137. Rothfork JM, Dessus-Babus S, Van Wamel WJ, Cheung AL, Gresham HD (2003) Fibrinogen depletion attenuates *Staphylococcus aureus* infection by preventing density-dependent virulence gene up-regulation. *Journal of immunology* 171: 5389-5395.
138. Silberman S, Bernik MB, Potter EV, Kwaan HC (1973) Effects of Ancrod (Arvin) in mice: studies of plasma fibrinogen and fibrinolytic activity. *British journal of haematology* 24: 101-113.
139. Bae T, Schneewind O (2006) Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 55: 58-63. 30
140. Schneewind O, Mihaylova-Petkov D, Model P (1993) Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *The EMBO journal* 12: 4803-4811.
141. Schneewind O, Model P, Fischetti VA (1992) Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* 70: 267-281.
142. Harvey RP, Degryse E, Stefani L, Schamber F, Cazenave JP, et al. (1986) Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 1084-1088. 40
143. Markwardt F (1955) Untersuchungen über Hirudin: naturwiss. F.

144. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, et al. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 298: 1763-1771.
145. DeBord KL, Anderson DM, Marketon MM, Overheim KA, DePaolo RW, et al. (2006) Immunogenicity and protective immunity against bubonic and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. *Infect Immun* 74: 4910-4914. 10
146. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Kroh HK, Briggs J, et al. (2006) Novel fluorescent prothrombin analogs as probes of staphylocoagulase-prothrombin interactions. *The Journal of biological chemistry* 281: 1169-1178.
147. Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, et al. (2008) Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 1327-1332. 20
148. Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S, et al. (2010) Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *Journal of bacteriology* 192: 613-623.
149. Geoghegan JA, Ganesh VK, Smeds E, Liang X, Hook M, et al. (2010) Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 285: 6208-6216. 30
150. Josefsson E, Higgins J, Foster TJ, Tarkowski A (2008) Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PloS one* 3: e2206.
151. Palma M, Wade D, Flock M, Flock JI (1998) Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 273: 13177-13181.
152. Heilmann C, Herrmann M, Kehrel BE, Peters G (2002) Platelet-binding domains in 2 fibrinogen-binding proteins of *Staphylococcus aureus* identified by phage display. *The Journal of infectious diseases* 186: 32-39. 40
153. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, et al. (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *Journal of bacteriology* 183: 6778-6786.

154. Streitfeld MM, Sallman B, Shoelson SM (1959) Staphylocoagulase inhibition by pooled human gamma-globulin. *Nature* 184(Suppl 21): 1665-1666.
155. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* 185: 60-89.
156. Chambers HF, Deleo FR (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews Microbiology* 7: 629-641.
157. Fowler VG, Jr., Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 293: 3012-3021. 10
158. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF (2010) Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375: 1557-1568.
159. Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews Microbiology* 3: 948-958.
160. Walsh EJ, Majjovic H, Gorkun OV, Foster TJ (2008) Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the alphaC-domain of human fibrinogen. *Microbiology* 154: 550-558. 20
161. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D (2011) A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends in microbiology* 19: 225-232.
162. Doolittle RF (2003) Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood reviews* 17: 33-41.
163. Kolle W, Otto, R. (1902) Die Differenzierung der Staphylokokken mittelst der Agglutination. *Z Hygiene* 41. 30
164. Hawiger J, Timmons S, Strong DD, Cottrell BA, Riley M, et al. (1982) Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. *Biochemistry* 21: 1407-1413.
165. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1995) Identification of the ligand-binding domain of the surface-located fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 16: 895-907.
166. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, et al. (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *European journal of biochemistry / FEBS* 247: 416-424. 40
167. Strong DD, Laudano AP, Hawiger J, Doolittle RF (1982) Isolation, characterization, and synthesis of peptides from human fibrinogen that block the staphylococcal clumping reaction and construction of a synthetic clumping particle. *Biochemistry* 21: 1414-1420.

168. Ganesh VK, Rivera JJ, Smeds E, Ko YP, Bowden MG, et al. (2008) A structural model
of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design
of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS pathogens* 4: e1000226.
169. Hair PS, Echague CG, Sholl AM, Watkins JA, Geoghegan JA, et al. (2010) Clumping
factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface
of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infection and
immunity* 78: 1717-1727. 10
170. Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vernachio JH, Syribeys PJ, et al. (2003) Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus*
MSCRAMM protein clumping factor A. *Infection and immunity* 71: 6864-6870.
171. Weems JJ, Jr., Steinberg JP, Filler S, Baddley JW, Corey GR, et al. (2006) Phase II,
randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of
tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial
agents and chemotherapy* 50: 2751-2755.
172. Bac T, Banger AK, Wallace A, Glass EM, Ashlund F, et al. (2004) *Staphylococcus aureus*
virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:
12312-12317. 20
173. Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Kawabata S, Morita T, et al. (1987) Nucleotide
sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. *Journal of
biochemistry* 102: 1177-1186.
174. Palma M, Nozohoor S, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI (1996) Lack of the
extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases
virulence in experimental wound infection. *Infection and immunity* 64: 5284-5289. 30
175. Hawiger J, Hammond DK, Timmons S (1975) Human fibrinogen possesses binding site
for staphylococci on Aalpha and Bbeta polypeptide chains. *Nature* 258: 643-645.
176. Hijikata-Okunomiya A, Kataoka N (2003) Argatroban inhibits staphylothrombin.
Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 1: 2060-2061.
177. Vanassche T, Verhaegen J, Peetermans WE, Hoylaerts MF, Verhamme P (2010)
Dabigatran inhibits *Staphylococcus aureus* coagulase activity. *Journal of clinical
microbiology* 48: 4248-4250. 40
178. Hauel NH, Nar H, Priepke H, Ries U, Stassen JM, et al. (2002) Structure-based design
of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 45: 1757-
1766.

179. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, et al. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359: 1819-1827.
180. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, et al. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225-1240.
181. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, et al. (2011) Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52: 285-292. 10
182. Walsh CT (1993) Vancomycin resistance: decoding the molecular logic. *Science* 261: 308-309.
183. Fowler VG, Jr., Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, et al. (2006) Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *The New England journal of medicine* 355: 653-665. 20
184. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, et al. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367: 731-739.
185. Donahue JP, Patel H, Anderson WF, Hawiger J (1994) Three-dimensional structure of the platelet integrin recognition segment of the fibrinogen gamma chain obtained by carrier protein-driven crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12178-12182. 30
186. Ware S, Donahue JP, Hawiger J, Anderson WF (1999) Structure of the fibrinogen gamma-chain integrin binding and factor XIIIa cross-linking sites obtained through carrier protein driven crystallization. *Protein science : a publication of the Protein Society* 8: 2663-2671.
187. DeDent A, Bae T, Missiakas DM, Schniewind O (2008) Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*. *The EMBO journal* 27: 2656-2668.
188. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Bode W, Bock PE (2004) The staphylocoagulase family of zymogen activator and adhesion proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61: 2793-2798. 40
189. Hale JH, Smith W (1945) The influence of coagulase on the phagocytosis of staphylococci. *Br J Exp Pathol* 26: 209-216.
190. Smith DD, Johnstone JM (1956) Coagulase activity *in vivo*. *Nature* 178: 982-983.

191. Kanemitsu K, Yamamoto H, Takemura, Kaku M, Shimada J (2001) Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Immunol* 45: 23-27.
192. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38: 1008-1015.
193. Panizzi P, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Panizzi J, Marinelli B, et al. (2011) In vivo detection of *Staphylococcus aureus* endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation. *Nat Med* 17: 1142-1146. 10
194. Patel G, Jenkins SG, Mediavilla JR, Kreiswirth BN, Radbill B, et al. (2011) Clinical and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among Patients in an Ambulatory Hemodialysis Center. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 32: 881-888.
195. Tager M, Hales HB (1948) Properties of coagulase-reacting factor, and relation to blood clotting components. *Journal of immunology* 60: 1-9. 20
196. Lominski I, Roberts GB (1946) A substance in human serum inhibiting staphylocoagulase. *The Journal of pathology and bacteriology* 58: 187-199.
197. Lominski I (1949) Susceptibility and resistance to staphylococcal infection. *Journal of general microbiology* 3: ix.
198. Lominski I, Smith DD, Scott AC, Arbuthnott JP, Gray S, et al. (1962) Immunisation against experimental staphylococcal infection with coagulase-rich preparations. *Lancet* 1: 1315-1318. 30
199. Boake WC (1956) Antistaphylocoagulase in experimental staphylococcal infections. *Journal of immunology* 76: 89-96.
200. Rammelkamp CH, Hezebicks MM, Dingle JH (1950) Specific Coagulases of *Staphylococcus Aureus*. *The Journal of experimental medicine* 91: 295-307.
201. Duthie ES (1952) Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. *Journal of general microbiology* 7: 320-326.
202. Harrison KJ (1964) The Protection of Rabbits against Infection with Staphylococci by Immunisation with Staphylocoagulase Toxin or Toxoid. *The Journal of pathology and bacteriology* 87: 145-150. 40
203. Rammelkamp Jr CH, Lebovitz JJ (1956) Immunity, epidemiology and antimicrobial resistance. The role of coagulase in staphylococcal infections. *Ann NY Acad Sci* 65: 144-151.

204. Harrison KJ (1963) Clinical trial of coagulase and alpha-hemolysin toxoids in chronic furunculosis. Br Med J 2: 149-152.
205. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, et al. (2004) *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol 42: 792-799.
206. Lancefield RC (1928) The antigenic complex of *Streptococcus hemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus hemolyticus*. J Exp Med 47: 91-103.
207. Lancefield R (1962) Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. J Immunol 89: 307-313.
208. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, et al. (2005) Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. Proc Natl Acad Sci USA 102: 15641-15646.
209. Nuccitelli A, Cozzi R, Goutlay LJ, Donnarumma D, Necchi F, et al. (2011) A structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus* infections. Proc Natl Acad Sci USA 108: 10278-10283.
210. Schneewind O, Missiakas D (2011) Structural vaccinology to thwart antigenic variation in microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 108: 10029-10030.
211. Tenover FC, Tickler IA, Goering RV, Kreiswirth BN, Mediavilla JR, et al. (2012) Characterization of nasal and blood culture isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in the United States. Antimicrob Agents Chemother 56: 1324-1330.
212. McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O (2012) Staphylococcus aureus Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. Journal of innate immunity 4: 141-148.
213. Vanassche T, Verhaegen J, Peetersmans WE, J VANR, Cheng A, et al. (2011) Inhibition of staphylothrombin by dabigatran reduces *Staphylococcus aureus* virulence. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 9: 2436-2446.
214. Palma M, Shannon O, Quezada HC, Berg A, Flock JI (2001) Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. The Journal of biological chemistry 276: 31691-31697.
215. McAdow MD, A.C.; Emolo, C.; Cheng, A.G.; Kreiswirth, B.; Missiakas, D.M.; Schneewind, O. (2012) Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. In preparation.

216. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, et al. (2006) Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *The Journal of infectious diseases* 193: 172-179.
217. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews* 10: 505-520.
218. Camargo IL, Gilmore MS (2008) *Staphylococcus aureus*--probing for host weakness? *Journal of bacteriology* 190: 2253-2256. 10
219. Plotkin SA, Orenstein WA, editors (2004) *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, xxi, 1662 p. p.
220. Levine MM, editor (2010) *New generation vaccines*. 4th ed. New York: Informa Healthcare USA. xxvii, 1011 p. p.
221. Zajdel M, Wagrzynowicz Z, Jeljaszewicz J (1975) Action of staphylothrombin on bovine fibrinogen. *Thrombosis research* 6: 501-510.
222. Soulier JP, Prou-Wartelle O (1967) Study of thrombin-coagulase. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica* 17: 321-334. 20
223. Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H (1985) Difference in enzymatic properties between alpha-thrombin-staphylocoagulase complex and free alpha-thrombin. *Journal of biochemistry* 97: 1073-1078.
224. Kawabata S, Morita T, Iwanaga S, Igarashi H (1985) Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *Journal of biochemistry* 98: 1603-1614. 30
225. Hendrix H, Lindhout T, Mertens K, Engels W, Hemker HC (1983) Activation of human prothrombin by stoichiometric levels of staphylocoagulase. *The Journal of biological chemistry* 258: 3637-3644.
226. Kopec M, Wegrzynowicz Z, Budzynski AZ, Jeljaszewicz J, Latallo ZS, et al. (1967) Formation and properties of fibrin clots resulting from staphylocoagulase (SC) action. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica* 18: 475-486.
227. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA (2007) The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1: 95-101. 40
228. Vanassche T, Kauskot A, Verhaegen J, Peetermans WE, van Ryn J, et al. (2012) Fibrin formation by staphylothrombin facilitates *Staphylococcus aureus* -induced platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis* 107.

229. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, et al. (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine* 12: 682-687.
230. Deivanayagam CC, Wann ER, Chen W, Carson M, Rajashankar KR, et al. (2002) A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *The EMBO journal* 21: 6660-6672. 10
231. Lack CH (1948) Staphylokinase; an activator of plasma protease. *Nature* 161: 559.
232. Sakharov DV, Lijnen HR, Rijken DC (1996) Interactions between staphylokinase, plasmin(ogen), and fibrin. Staphylokinase discriminates between free plasminogen and plasminogen bound to partially degraded fibrin. *The Journal of biological chemistry* 271: 27912-27918.
233. Kwiecinski J, Josefsson E, Mitchell J, Higgins J, Magnusson M, et al. (2010) Activation of plasminogen by staphylokinase reduces the severity of *Staphylococcus aureus* systemic infection. *The Journal of infectious diseases* 202: 1041-1049. 20
234. Karesh A (2009) Pediatric Focused Safety Review:
Argatroban. Pediatric Advisory Committee Meeting.
235. Walsh S (2010) FDA approves Pradaxa to prevent stroke in people with atrial fibrillation.
236. Rammelkamp CH (1948) Serologic Test for Staphylococcal Infections. *American Journal of Medicine* 4: 782-782.
237. Etz H, Minh DB, Henies T, Dryla A, Winkler B, et al. (2002) Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6573-6578. 30

米国特許第3,817,837号
米国特許第3,850,752号
米国特許第3,939,350号
米国特許第3,996,345号
米国特許第4,196,265号
米国特許第4,275,149号
米国特許第4,277,437号
米国特許第4,338,298号
米国特許第4,366,241号

40

米国特許第4,472,509号	
米国特許第4,472,509号	
米国特許第4,554,101号	
米国特許第4,684,611号	
米国特許第4,748,018号	
米国特許第4,879,236号	
米国特許第4,938,948号	10
米国特許第4,938,948号	
米国特許第4,952,500号	
米国特許第5,021,236号	
米国特許第5,196,066号	
米国特許第5,262,357号	
米国特許第5,302,523号	
米国特許第5,310,687号	20
米国特許第5,322,783号	
米国特許第5,384,253号	
米国特許第5,464,765号	
米国特許第5,505,928号	
米国特許第5,512,282号	
米国特許第5,538,877号	
米国特許第5,538,880号	30
米国特許第5,548,066号	
米国特許第5,550,318号	
米国特許第5,563,055号	
米国特許第5,580,859号	
米国特許第5,589,466号	
米国特許第5,591,616号	
米国特許第5,610,042号	40
米国特許第5,648,240号	
米国特許第5,656,610号	
米国特許第5,690,807号	
米国特許第5,702,932号	
米国特許第5,736,524号	
米国特許第5,741,957号	

米国特許第 5,750,172 号	
米国特許第 5,756,687 号	
米国特許第 5,780,448 号	
米国特許第 5,789,215 号	
米国特許第 5,801,234 号	
米国特許第 5,827,690 号	10
米国特許第 5,840,846 号	
米国特許第 5,871,986 号	
米国特許第 5,945,100 号	
米国特許第 5,981,274 号	
米国特許第 5,990,479 号	
米国特許第 5,994,624 号	
米国特許第 6,008,341 号	
米国特許第 6,048,616 号	20
米国特許第 6,091,001 号	
米国特許第 6,274,323 号	
米国特許第 6,288,214 号	
米国特許第 6,630,307 号	
米国特許第 6,651,655 号	
米国特許第 6,756,361 号	
米国特許第 6,770,278 号	30
米国特許第 6,793,923 号	
米国特許第 6,936,258 号	
米国特許出願第 61/103,196 号	
米国特許出願第 61/166,432 号	
米国特許出願第 61/170,779 号	
米国特許出願公開第 2002/0169288 号	
米国特許出願公開第 20050106660 号	40
米国特許出願公開第 20060058510 号	
米国特許出願公開第 20060088908 号	
米国特許出願公開第 20100285564 号	

Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32:155-171, 1985.

Atkins *et al.*, *Mol. Immunol.*, 45:1600-1611, 2008.

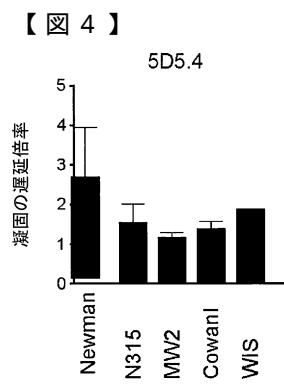
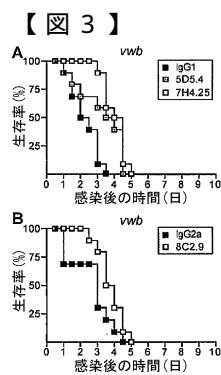
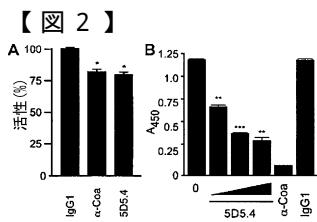
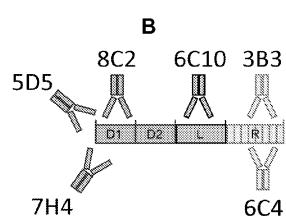
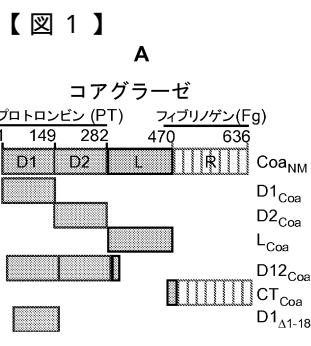
- Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1996.
- Baba *et al.*, *J. Bacteriol.*, 190:300-310, 2007.
- Baba *et al.*, *Lancet*, 359:1819-1827, 2002.
- Barany and Merrifield, In: *The Peptides*, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
- Boucher and Corey, *Clin. Infect. Dis.*, 46(5):S344-349, 2008.
- Burke *et al.*, *J. Inf. Dis.*, 170:1110-1119, 1994.
- Burman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 283:17579-17593, 2008.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elseview, Amsterdam, 13:71-74/75-83, 1984.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- Cary *et al.*, *Mol. Immunol.*, 36:769-776, 1999.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cheng *et al.*, *FASEB J.*, 23:3393-3404, 2009.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cumber *et al.*, *J. Immunology*, 149B:120-126, 1992.
- de Bono *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 342(1):131-143, 2004.
- DeDent *et al.*, *Semin. Immunopathol.*, 34:317-333, 2012.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Emori and Gaynes, *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:428-442, 1993.
- Epitope Mapping Protocols In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Morris (Ed.), 1996,
- 欧洲特許第 0 216 846 号
- 欧洲特許第 0 256 055 号
- 欧洲特許第 0 323 997 号
- 欧洲特許出願第 89303964.4 号
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fischetti, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2:285-314, 1989.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fl, pp 60-61, 71-74, 1986.

- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fl, pp 65, 66, 1986.
- Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197:1125-1139, 2003.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Chapter 8, 1988. 10
- Haupt *et al.*, *PLoS Pathog.*, 4:e1000250, 2008.
- Hollingshead *et al.*, *Infect. Immun.*, 55:3237-3239, 1987.
- Jones and Fischetti, *J. Exp. Med.*, 167:1114-1123, 1988.
- Jones *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164:1226-1238, 1986.
- Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989. 20
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kennedy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105(4):1327-1332, 2008.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- Kim *et al.*, *FASEB J.*, 25:3605-3612, 2011.
- Kim *et al.*, *J. Exp. Med.*, 207:1863-1870, 2010a.
- Kim *et al.*, *Vaccine*, 28:6382-6392, 2010b.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989. 30
- Klevens *et al.*, *JAMA*, 298:1763-1771, 2007.
- Kohl *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100(4):1700-1705, 2003.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lancefield, *J. Exp. Med.*, 47:91-103, 1928.
- Lancefield, *J. Immunol.*, 89:307-313, 1962.
- Lee, *Trends Microbiol.*, 4(4):162-166, 1996. 40
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.
- McCarthy and Lindsay, *BMC Microbiology*, 10:173, 2010.
- Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, 1986.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

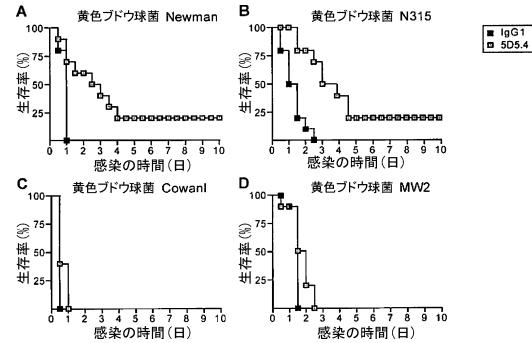
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nimmerjahn and Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.*, 8(1):34-47, 2008.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259:14843-14848, 1987.
- Pack *et al.*, *Biochem.*, 31:1579-1584, 1992.
- PCT出願 PCT/US11/42845 10
- PCT出願 WO 00/02523
- PCT出願 WO 00/12132
- PCT出願 WO 00/12689
- PCT出願 WO 00/15238
- PCT出願 WO 01/60852
- PCT出願 WO 2006/032472
- PCT出願 WO 2006/032475 20
- PCT出願 WO 2006/032500
- PCT出願 WO 2007/113222
- PCT出願 WO 2007/113223
- PCT出願 WO 2011/005341
- PCT出願 WO 94/09699
- PCT出願 WO 95/06128
- PCT出願 WO 98/57994 30
- PCT公報 WO 2006/056464
- PCT公報 WO 99/26299
- Phillips *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78:4689-4693, 1981.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter and Haley, *Methods Enzymol.*, 91:613-633, 1983.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Robbins *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 397:169-182, 1996. 40
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Scott *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164:1641-1651, 1986.
- Silverman and Goodyear, *Nat. Rev. Immunol.*, 6:465-475, 2006.
- Skerra, *J. Biotechnol.*, 74(4):257-75, 2001.
- Skerra, *J. Mol. Recogn.*, 13:167-187, 2000.

- Smith *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 83:789-804, 2012.
- Stewart and Young, In: *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stranger-Jones *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 103:16942-16947, 2006.
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Tigges *et al.*, *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
- Ton-That *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:12424-12429, 1999.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Yoo *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 261(1-2):1-20, 2002.
- Zhang *et al.*, *Microbiology*, 144:985-991, 1998.
- Zhang *et al.*, *Microbiology*, 145:177-183, 1999.

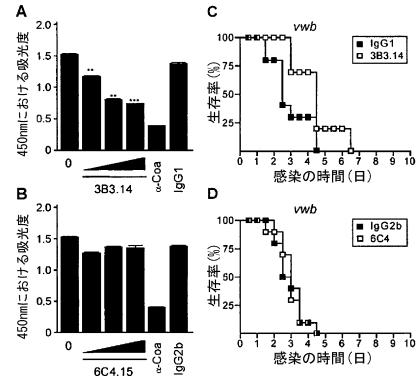
10



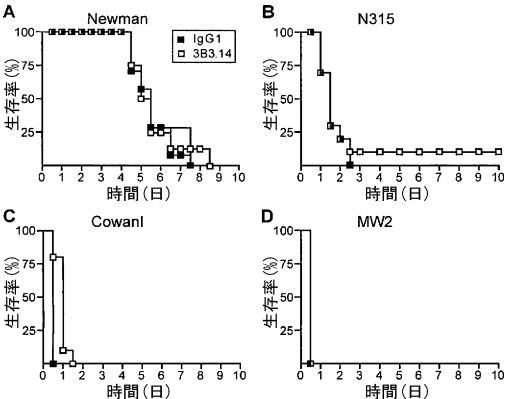
【 図 5 】



【 四 6 】



【 义 7 】



【図 8 - 1】

5種の黄色ブガウ菌素に由来するCoAのアミノイド
 US330_Coa ATGAAAGAACCAATAATTTCGCTAGGGCATTAGCAGTGTGCACTTAGCTTATTTCATGG 60
 N315_Coa ATGAAAAGAACCAATAATTTCGCTAGGGCATTAGCAGTGTGCACTTAGCTTATTTCATGG 60
 MRA252_Coa RTGAAAGAACCAATAATTTCGCTAGGGCATTAGCAGTGTGCACTTAGCTTATTTCATGG 60
 MW2_Coa ATGAAAGAACCAATAATTTCGCTAGGGCATTAGCAGTGTGCACTTAGCTTATTTCATGG 60
 MTS_Coa

USA300_Coa	GATAACAAAGCAGATGGCATGTAGTAA	CACAAAGGATTATAGTGGGAATCACAAGTTAACGTC	120
N315_Coa	GATAACAAAGCAGATGGCATGTAGTAA	CACAAAGGATTATAGTAAAGCTACAGGTCAGATGAG	120
MRS252_Coa	GATAACAAAGCAGATGGCATGTAGTAA	CACAAAGGATTATAGTAAAGCTACAGGTCAGATGAG	120
MW2_Coa	GATAACAAAGCAGATGGCATGTAGTAA	CACAAAGGATTATAGTGGGAATCACAAGTTAACGTC	120
WIS_Coa	-----	-----ATAGTAAACAAAGGATTATAGTGGGAATCACAAGTTAACGTC	42

USA300_Coa	GGGAGTAAATGGCCATT-ATTA-T---AGATAGCAGATTTAAATTCAGCTCTATATA	176
N15_Coa	AAAAGCTAAAGGGAGCTATGTC-AGATTTACTTACCTGGAAATTAAATT---GTAG	176
MRS22_Coa	AACAGTAAATAGCATC-ACCATTTCAGATTG---GTATCTGGATGTATTTAACAG	176
MW_Coa	GGGAGTAAATGGCGAA-ACAANTTCGAGATGATTATCTGGGAATTAT---GAAA	176
WIS_Coa	GGGAGTAAATGGCGAA-ACAANTTCGAGATGATTATCTGGGAATTAT---GAAA	98

```

USA300_Coa   TTTGGAGACTATATAA-TTAT---GCTATAAGGAACTATTAA-TATTAATGTCGAG 154
N315_Coa    TTTAGGAG---CACAACTTGTGGACAA-TAGACTTATGGAGAGATTATAATTCGCG 232
MRSA252_Coa ATTAGGGGCAACATATTAAC---GCTTAAAGGAACTATTAA-TATTAATGTCGCG 232
MW_2_Coa    TCTGAGAACCCA---GTTTAC-AATTATTTCTTACTTGTGACCATGATAATTCGCG 232
WIS_Coa     TCTAGAGAACCCA---GTTTAC-AATTATTTCTTACTTGTGACCATGATAATTCGCG 232
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

```

USA300_Coa    ATATATTATTTAAAGAACCTTAAGAGTGTGTTGGAAAAGGTATAAAGGGAAGTCAT 292
N315_Coa     ATCTCTCTTATTAAGAACCTTAAGAGTGTGTTGGAAAAGGTATAAAGGGAAGTCAT 292
MRSA252_Coa   AGAAAGACTATTAACCAACCGTAAAGGAAATTTAGTACTGACTAGTTTGGAGGAAGTCAT 292
M2_2_Coa      AAAAGAAATTAATGAGTCACTGAGTATAAATTTAAAATCAGTTTGGAGGAAGTCAT 292
WIS_Coa       AAAAGAAATTAATAGATGCATAGATAAATTTAAAATCAGTTTGGAGGAAGTCAT 214
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

N315_Coa	AATAAGAACACT-----	-AATTCGTTACCTTCCATAAATATAATCTTACA	397
MRS452_Coa	AAAGTCGAAAATCCTACATTCTAGTTAATAAGTAA	TTTGTGCGATTTGATTTAATTTGATTTAATTTG	412
MW2_Coa	AAAAGAGAACCTTAATCTCACTGTTAAATGTA	ATGCGATCTGGCGATCTGGCGATCTGGCG	412
WIS_Coa	AAAAGAGAACCTTAATCTCACTGTTAAATGAA	GATTTGATTTAATTCGATCTGGCGATCTGGCG	334

N315_Coa	ATTTAACATGAGTGAATAACGATTCTTTCATCTTGTGAAAGTCGAGTTTGTCTCAT	457
MRA252_Coa	GATTAACGGAAAAGAACATCAATGAGTCACTCATTAACGAGTCGTTGAGTC	472
MW2_Coa	ATTTAACATGAGAAGAACATGAGTCACTTCAAAATTATTAACAAAGCTTGGTAAC	472
WIS_Coa	ATTTAACATGAGAAGAACATGACTTCAAAATTATTAACAAAGCTTGGTAAC	394

N315_Coa	ATGGAGAACGAGGACCAATAAGAGCTTATGACTCTTGATGAACTATGATCATTAG	571
MRA252_Coa	CACTGAAATTCGAGTATTTGTGATATGATTTGTTGAGATGACCATATG	572
MW_2_Coa	GCGAAGAAAAGACAGCATATGTGAAATAGATGACTTGATCAGCATATAGTGTAT	592
WIS_Coa	GTGAAGAGAGAACAGCATATGTGAAATAGATGTTCACTTGATCAGCATATAGTGTAT	514
	*** * * * * *	***

MRSAA_Coa TTTGATGCTTATTTCTGGTTTGCTGCTATTTGGCGGAGTCCTCCAGGTTAAGG 652
MRSAA_Coa ACGCAGCATTTTAATCATGGCCTATTTGTGCTATAATGCTTAAAGAATTAAAGACCAAGC 652
MW2_Coa ATTTTGCTCTAGCTTACAGTGACAGCACACATAAAAACAGAACGATTAAATCTTCTGGCGAAAA 652

【 図 8 - 2 】

WIS_Coa	ATTTTGCCCTACGGTACAGATGCTAACATCAAACAGAAGGCATTAATCTTGGGCAAAAG 574
	* * * * * * * * * * *
USA300_Coa	TGGACTTAATCCTGGAGATCAGACGACCATCATAAAATTACAAATGAGCTTAAAAAA 712
N315_Coa	TGGACTTAATCCTGGAGATCAGACGACCATCACAATTAACAAATGAGCTTAAAAAA 697

WIS_Coa	TAGATTGATTTGGTGTGAAAGATCCTAATTAGACTGACGA/TCA/GCTACTGAA	634
USA300_Coa	AAGAAATGTTGTTGTGACTTAAATTCATTTGTGTTGTTCTTATGRRGAACTAAC-A	771
N315_Coa	AAGAAATGTCGTGACTTAAATTCATTTGTGTTGTTCTTATGRRGAACTAAC-A	756
MSB252_Coa	AGAATGTTGTTGTGACTTAAATTCATTTGTGTTGTTCTTATGRRGAACTAAC-A	721

WIS_Coa	AAGAATGATTAAAGATTTGAATCTATTTGATGATTCTTCATGGAAACAGGT-G 693 *****
USA300_Coa	
N315_Coa	AATAGACCCAAAATCTATAACGAAATTTATCCTCACACCATACTATTAACARATAGT 831 AATAGACCGGATTCTATAACCAAATTTATGCAACCAACAAACATTTAAGAGGAGATG 816
MRSA252_Coa	ATAGACCATTAACCAACTAACTAATTATTCGGATATTCTATGATCTACTAATAGGC 831

WIS_Coa	AA1AGACCTC1AHCAGATIACATAGTATGAGCACTAAACATGATACCA-----	744
USA-200_Coa	GATTTATAACCTTAATTGTAAATTAGTTGAGAAGAACGGA.....AAAGCAGTTAAAGGCCA 891	
N315_Coa	GAAAATTAACCTTAATTGTAAATTAGTTGAGAAGAACGGA.....AAAGCAGTTAAAGGCCA 876	
MRSB-52_Coa	GAAAATGAGATATCTTCGATAAATTAGTCAGAAAGAACGAGGA.....CTCCAAACGGCT 891	

USA300_Coa	GTAGTAAAAGGAGAAGGAAGGTGGAGAACCTCAAGGCACCTAAAGTGATAACCAACAA	1011										
N315_Coa	TTTTAAAAGGAGAAGGAAGGTGGAGAACCTCAAGGCACCTAAAGTGATAACCAACAA	996										
MRS252_Coa	CTTTAAAAGGAGAAGGAAGGTGGAGAACCTCAAGGCACCTAAAGTGATAACCAACAA	1011										
Mu2_Coa	CTTCTTAAAAGGAGAAGGAAGGTGGAGAACCTCAAGGCACCTAAAGTGATAACCAACAA	1002										

USA300_Coa	GTTAAATTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATTGTAAAAGGTCGGAAATCTAACG	1131
N315_Coa	GTTAAATTCCACAGGAACAACTATGTGTAAGACTGTAAAAGGTCGGAAATCTAACG	1116
MRS2252_Coa	GTTAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTAAAAGGTCGGAAATCTAACG	1131
MW_Coa	GTTAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTAAAAGGTCGGAAATCTAACG	1122

USA300_Coa	ATGGAAAATAAAACCGTACAAGGTGAACTGTCAGGTCCCATTCTAACATGGAA	1191
N315_Coa	ATGGAAAATAAAACGGTTAACAGGTGAAACTGTCAGGTCCCATTCTAACATGGAA	1176
MRS252_Coa	ATGGAAAATAAAACGGTTAACAGGTGAAACTGTCAGGTCCCATTCTAACATGGAA	1191
MW_Coa	ATGGAAAATAAAACGGTTAACAGGTGAAACTGTCAGGTCCCATTCTAACATGGAA	1182

USA300_Coa	CAAACCGGCCCCATCATTAACCAATAATTATACAAACCCA-----	1230
N315_Coa	CAAACAGACCCCTTTAACGGTAAATTTACTGAACCG-----	1215
MRS252_Coa	CAAACAGACCATCTTTAACGGTAAATTTACTGAACCG-----	1230
MW2_Coa	CAAACAGACCCATCTTTAACGGTAAATTTACTGAACCG-----	1221
NGC_Coa	CAAACAGACCCATCTTTAACGGTAAATTTACTGAACCG-----	1214

```
USA300_Coa      -----CCGTTAACGAACTTCTTTAGAAGGCTTGAAGGTAGCTCATCTAAA 1278
N315_Coa       -----ACGACACCGAACCTTATTTAGAAGGCTTGAAGGTAGCTCATCTAAA 1263
MRSA252_Coa    -----ACGACACCGAACCTTATTTAAAGGTATTGAAGGARACTCAACTAAA 1278
```

【図8-3】

```

MW2_Coa -----ACGACCCGCCATTCTTGTAGGCTTGAAAGTCATCTAAA 1269
WIS_Coa ACAGGTAAAGTACCAACGACCCATTCTTAAAGGTATTGAAGAAACTCATCTAAA 1224
*****
```

```

USA300_Coa CTTGGAAATAAACGACAGCTTGTGAACTGGTTAAAGGTGACTCAGCT 1338
N115_Coa CTTGGAAATAAACGACAGCTTGTGAACTGGTTAAAGGTGACTCAGCT 1323
MRSA252_Coa CTTGGAAATAAACGACAGCTTGTGAACTGGTTAAAGGTGACTCAGCT 1338
MW2_Coa CTTGGAAATAAACGACAGCTTGTGAACTGGTTAAAGGTGACTCAGCT 1329
WIS_Coa CTTGGAAATAAACGACAGCTTGTGAACTGGTTAAAGGTGACTCAGCT 1284
*****
```

```

USA300_Coa GATTTGGAAAGTAAACCTCAGGCACACTGAAACACAGACGTTCTAATATGGTCGAGA 1398
N115_Coa GATTTGGAAAGTAAACCTCAGGCACACTGAAACACAGACGTTCTAATATGGTCGAGA 1393
MRSA252_Coa GATTTGGAAAGTAAACCTCAGGCACACTGAAACACAGACGTTCTAATATGGTCGAGA 1398
MW2_Coa GATTTGGAAAGTAAACCTCAGGCACACTGAAACACAGACGTTCTAATATGGTCGAGA 1389
WIS_Coa GATTTGGAAAGTAAACCTCAGGCACACTGAAACACAGACGTTCTAATATGGTCGAGA 1344
*****
```

```

USA300_Coa CGCGCAATTAAACAAAACACCTTAAATAGTTAAATAGTGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1458
N115_Coa CGCGCAATTAAACAAAACACCTTAAATAGTTAAATAGTGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1453
MRSA252_Coa CGTCGAATTAAACAAAACACCTTAAATAGTTAAATAGTGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1458
MW2_Coa CGTCGAATTAAACAAAACACCTTAAATAGTTAAATAGTGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1449
WIS_Coa CGCGCAATTAAACAAAACACCTTAAATAGTGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1404
*****
```

```

USA300_Coa GATATCACACGNTGGACATTGGATATGAGCAGGACATTAAGCCA----- 1512
N115_Coa GATATCACACGNTGGACATTGGATATGAGCAGGACATTAAGCCA----- 1503
MRSA252_Coa GATATCACACGNTGGACATTGGATATGAGCAGGACATTAAGCCA----- 1514
MW2_Coa GATATCACACGNTGGACATTGGATATGAGCAGGACATTAAGCCA----- 1509
WIS_Coa GATATCACACGNTGGACATTGGATATGAGCAGGACATTAAGCCA----- 1464
*****
```

```

USA300_Coa -----TCA----- 1515
N115_Coa ACAAATGCAATCACGTAACGNCNAATCAAGATGGCCAGGTATCACGGAGCTGGCCA 1563
MRSA252_Coa -----C----- 1515
MW2_Coa ACAAATGCAATCACGTAACGNCNAATCAAGATGGCCAGGTATCACGGAGCTGGCCA 1569
WIS_Coa RCAAACGCAATCACGTAACGNCNAATCAAGATGGCCAGGTATCACGGAGCTGGCCA 1524
*****
```

```

USA300_Coa -----GAAAACAATGCAATACACGCAATGAAACCAACGATATGCAATGGCA 1557
N115_Coa ACACAAAACAGCCAAAGTGAAACCAACGCAATTAACCTGAAACACATGCAATGGCA 1623
MRSA252_Coa -----GATATCAATGGCCCTGGCCGGCA----- 1581
MW2_Coa ACACAAAACAGCCAAAGTGAAACCAACGCAATTAACCTGAAACACATGCAATGGCA 1629
WIS_Coa RCRCAAAACAGCCAAACGCAATTAACCTGAAACACGCAATTAACCTGAAACACATGCAATGGCA 1584
*****
```

```

USA300_Coa GTATCATACGGAGCTGGCCGCA----- 1581
N115_Coa GTATCATACGGAGCTGGCCGCA----- 1647
MRSA252_Coa GTATCATACGGAGCTGGCCGCA----- 1581
MW2_Coa GTATCATACGGAGCTGGCCGCA----- 1653
WIS_Coa GTATCATACGGAGCTGGCCGCA----- 1644
*****
```

```

USA300_Coa -----C----- 1596
N115_Coa -----C----- 1662
MRSA252_Coa -----C----- 1596
MW2_Coa -----C----- 1668
WIS_Coa ACGCAAAATCGAGATGGCACTATCTATGGCGCTGCCGACAGAACGCCANCC 1704
*****
```

```

USA300_Coa AAAACAAACGGATATACGTAACACACATGGAAACGCCAAAGTATCATATGGCCCTCCC 1656
N115_Coa AAAACAAACGGATACACGTAACACACATGGAAACGCCAAAGTATCATATGGCCCTCCC 1722
MRSA252_Coa GAAKAAACGGCAATATACGTAACACACATGGAAACGCCAAAGTATCATATGGCCCTCCC 1656
MW2_Coa GAAKAAACGGCAATATACGTAACACACATGGAAACGCCAAAGTATCATATGGCCCTCCC 1728
WIS_Coa GAAACCAATGGATATACGTAACACACATGGAAACGCCAAAGTATCATATGGCCCTCCC 1764
*****
```

```

USA300_Coa CCAACACAAAACAGCCAAACAAACAAATGCAATACACGTAACAAACATGCAAACAGGT 1716
N115_Coa CCGACACAAAACAGCCAAACAAACAAATGCAATACACGTAACAAACATGCAAATGGT 1782
MRSA252_Coa CCGACACAAAACAGCCAAACAAACAAATGCAATACACGTAACAAACATGCAAACAGGT 1716
MW2_Coa CCGACACAAAACAGCCAAACAAACAAATGCAATACACGTAACAAACATGCAAACAGGT 1788
WIS_Coa CCGACACAAAAGGAGCAACGCAACAAACAAATGCAATACACGTAACAAACATGCAAACAGGT 1824
*****
```

```

USA300_Coa CAAGTGTCAATACGGAGCTGGCCGCACTACAGAAAGCCAAAGTAAACAAATGCAATCAA 1776
N115_Coa CAAGTGTCAATACGGAGCTGGCCGCACTACAGAAAGCCAAAGTAAACAAATGCAATCAA 1842
*****
```

【図8-4】

```

MW2_Coa -----CAAGTGTCAATACGGAGCTGGCCGCACTACAGAAAGCCAAAGTAAACAAATGCAATCAA 1776
WIS_Coa CAAGTGTCAATACGGAGCTGGCCGCACTACAGAAAGCCAAAGTAAACAAATGCAATCAA 1848
*****
```

```

USA300_Coa GTRACACCATGTCGA----- 1791
N115_Coa GTACACCATGTCGA----- 1902
MRSA252_Coa GTACACCATGTCGA----- 1791
MW2_Coa GTACACCATGTCGA----- 1863
WIS_Coa GTACACCATGTCGA----- 1899
*****
```

```

USA300_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1815
N115_Coa AGCGAACACAAACCTTNPRACCTACRACNCATCGCAGTCGCACTGGCCCT 1962
MRSA252_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1815
MW2_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1887
WIS_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1923
*****
```

```

USA300_Coa RCGCTAACAAATAAA 1830
N115_Coa RCGCTAACAAATAAA 1877
MRSA252_Coa RCGCTAACAAATAAA 1830
MW2_Coa AGAGTAAACAAATAAA 1902
WIS_Coa AGAGTAAACAAATAAA 1938
*****
```

```

USA300_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1815
N115_Coa AGAGTAAACAAATAAA 1902
MRSA252_Coa AGAGTAAACAAATAAA 1938
MW2_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1923
WIS_Coa -----GATGGACTTCGACATATGGGCGT 1923
*****
```

【配列表】

0006251730000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 マカダウ モリー
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス 5801 ユニバーシティ オブ シカゴ内
(72)発明者 エモーロ カーラ
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス 5801 ユニバーシティ オブ シカゴ内
(72)発明者 ミッシアカス ドミニク エム.
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス 5801 ユニバーシティ オブ シカゴ内
(72)発明者 シュネーウィンド オラフ
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス 5801 ユニバーシティ オブ シカゴ内

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 國際公開第2011/005341 (WO, A1)
PLOS Pathogens, 2010, Vol.6, Issue 8, e1001036

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39 / 395
A 61 P 31 / 04
C 07 K 16 / 14
C 12 N 15 / 02
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q