

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6317670号
(P6317670)

(45) 発行日 平成30年4月25日 (2018. 4. 25)

(24) 登録日 平成30年4月6日 (2018. 4. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	39/395	(2006. 01)	A 6 1 K	39/395	Z N A R
A 6 1 P	31/04	(2006. 01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	16/12	(2006. 01)	C 0 7 K	16/12	
C 1 2 P	21/08	(2006. 01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 16 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2014-526184 (P2014-526184)
(86) (22) 出願日	平成24年8月15日 (2012. 8. 15)
(65) 公表番号	特表2014-525933 (P2014-525933A)
(43) 公表日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/050991
(87) 国際公開番号	W02013/025834
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)
審査請求日	平成27年7月21日 (2015. 7. 21)
(31) 優先権主張番号	61/674, 135
(32) 優先日	平成24年7月20日 (2012. 7. 20)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/523, 751
(32) 優先日	平成23年8月15日 (2011. 8. 15)
(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
	H I C A G O
	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】 ブドウ球菌プロテインAに対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(Staphylococcus)感染を有する患者またはブドウ球菌感染のリスクのある患者への投与用の、ブドウ球菌感染を処置または予防するための、精製されたSpA抗体を含む薬学的組成物であって、該精製されたSpA抗体が、非特異的Ig結合活性を欠くSpA変種のSpA IgG結合ドメインA、B、C、D、およびEの少なくとも2つに特異的に結合でき、該精製されたSpA抗体が、相補性決定領域(CDR)を含み、該CDRは、5A10モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:16~18および11~13)、8E2モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:26~28および21~23)、3F6モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:56~58および51~53)、3D11モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:86~88および81~83)、または2F2モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:101~103および96~98)である抗体の軽鎖および重鎖両方のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々において、最大1つのアミノ酸置換を有するものである、薬学的組成物。

【請求項 2】

前記精製されたSpA抗体が、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpA IgG結合ドメインA_{KKAA}、B_{KKAA}、C_{KKAA}、D_{KKAA}、およびE_{KKAA}に結合する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記精製されたSpA抗体が、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpA IgG結合ドメインA_{KKAA}、B_{KKAA}、C_{KKAA}、D_{KKAA}、およびE_{KKAA}に対して $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ または $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 超の結合定数を有する、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

ブドウ球菌感染の処置が、前記患者における膿瘍形成の減少または細菌負荷量の減少を含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記非特異的Ig結合活性を欠くSpA変種がSpA_{KKAA}である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記精製されたSpA抗体が、5A10、8E2、3A6、3F6、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体とのSpA_{KKAA}ポリペプチドの結合について競合する、請求項1記載の薬学的組成物。

10

【請求項 7】

前記抗体が、ELISAによって測定した場合に約 $0.5 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $1.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $2.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の、前記SpA_{KKAA}ポリペプチドに対する結合定数を有する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

二種またはそれ以上の精製されたSpA抗体と併用される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

前記精製されたSpA抗体が組換え体である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記精製されたSpA抗体がヒト化抗体である、請求項1記載の薬学的組成物。

20

【請求項 11】

前記SpA抗体におけるCDR1、CDR2、およびCDR3が、5A10、8E2、3F6、3D11、または2F2モノクローナル抗体のVHドメインまたはVLドメインからのCDR1、CDR2、およびCDR3と同一である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

前記SpA抗体におけるCDR1、CDR2、およびCDR3が、5A10、8E2、3F6、3D11、または2F2モノクローナル抗体のVHドメインおよびVLドメインの両方からのCDR1、CDR2、およびCDR3と同一である、請求項11記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

前記組換えSpA抗体が、第二の組換え抗体セグメントに機能的に結合された組換え抗体セグメントである、請求項9記載の薬学的組成物。

30

【請求項 14】

前記抗体が、5A10、8E2、3F6、3D11、または2F2モノクローナル抗体である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

第二のブドウ球菌タンパク質に結合する第二の抗体と併用される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

相補性決定領域(CDR)を含み、該CDRは、5A10モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:16~18および11~13)、8E2モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:26~28および21~23)、3F6モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:56~58および51~53)、3D11モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:86~88および81~83)、または2F2モノクローナル抗体(それぞれSEQ ID NO:101~103および96~98)である抗体の軽鎖および重鎖両方のCDR1、CDR2、およびCDR3の各々において、最大1つのアミノ酸置換を有するものである精製された抗体であって、非特異的Ig結合活性を欠くブドウ球菌プロテインA (SpA)ポリペプチド変種に特異的に結合できる、精製された抗体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国立アレルギー感染症研究所(NIAID)からのAI52747およびAI92711ならび

50

に米国立衛生研究所による助成金交付番号1-U54-AI-057153の下での政府支援によってなされた。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、2011年8月15日付で出願された米国仮特許出願第61/523,751号、2012年3月23日付で出願された同第61/615,083号、2012年3月30日付で出願された同第61/618,417号、および2012年7月20日付で出願された同第61/674,135号に対する優先権を主張するものであり、これらは全てその内容が参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

I. 発明の分野

本発明は広くは、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誘発するために用いられる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および組成物に関する。それらのタンパク質にはブドウ球菌プロテインA(SpA)が含まれる。

【背景技術】

【0004】

II. 背景

市中感染と院内感染の両方の数は、血管内装置の使用増加とともにここ数年増えている。院内(病院内)感染は罹病率および死亡率の主な原因であり、より具体的には、米国では、院内感染は毎年2百万人超の患者に影響を与えている。最も頻度が高い病院内感染は、尿管感染(感染の33%)であり、次いで肺炎(15.5%)、外科手術部位感染(14.8%)および主要血流感染(13%)が続く(Emori and Gaynes, 1993)。

【0005】

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、血液凝固酵素陰性ブドウ球菌(ほとんどが表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*))、腸球菌(*enterococcus spp.*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、および緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は、主な病院内病原菌である。これらの病原菌はほとんど、同数の感染を引き起こすが、これらが生み出しうる障害の重症度と、抗生物質耐性分離菌の頻度を考え合わせると、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌を最も重要な病院内病原菌とする順位になる。

【0006】

ブドウ球菌(*Staphylococcus*)は、毒素産生または侵入のいずれかを通じてヒトおよび他の動物で多種多様な疾患を引き起こしうる。ブドウ球菌の毒素は、この細菌が不適切に貯蔵された食品のなかで増殖しうるので、食中毒の一般的な原因である。

【0007】

表皮ブドウ球菌は、通常の皮膚共生生物であり、これは、正常に機能しない医療機器の感染および手術部位における感染に関わる重要な日和見病原菌でもある。表皮ブドウ球菌が感染する医療機器には、心臓ペースメーカー、髄液シャント、持続携帯式腹膜透析カテーテル、整形外科用機器、および人工心臓弁が含まれる。

【0008】

黄色ブドウ球菌は、有意な罹病率および死亡率を有する病院内感染の最も一般的な原因である。これは、骨髄炎、心内膜炎、敗血性関節炎、肺炎、膿瘍、および毒素性ショック症候群のいくつかの症例の原因である。

【0009】

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、命にかかわりうる膿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。

【0010】

黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の感染は典型的には、抗生物質で処置され、ペニシリンが最適な薬物であるが、しかしメチシリン耐性分離株にはバンコマイシンが使用さ

10

20

30

40

50

れる。抗生物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。

【0011】

ブドウ球菌感染の処置において抗生物質に代わる手法は、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、ポリクローナル抗血清の投与(W000/15238、W000/12132)およびリボタイコ酸に対するモノクローナル抗体による処置(W098/57994)が含まれる。

【0012】

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大した成果がなく(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ある。

【発明の概要】

【0013】

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。

【0014】

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。特定の態様には、ブドウ球菌SpAタンパク質を結合できるポリペプチドがある。ポリペプチドという用語は、1つもしくは複数のアミノ酸またはポリペプチドの鎖を意味するものと理解される。例えば、ポリペプチドという用語は、重鎖もしくは軽鎖または結合された重鎖および軽鎖を含む単一のポリペプチド鎖をいうことができる。ポリペプチドという用語はまた、四本のポリペプチド鎖；二本の重鎖および二本の軽鎖を含む、免疫グロブリン(Ig)単量体をいうこともできる。ポリペプチドという用語はまた、二量体、三量体、四量体、または五量体Ig分子をいうこともできる。

【0015】

さらに、ある態様において、このSpA結合ポリペプチドは、抗原としてSpA野生型タンパク質ではないSpA変種を用いて作製された、抗体であることまたは抗体に由来することに基づく特性を有するので、他のSpA抗体とは区別される。SpA変種は、A、B、C、D、および/またはEドメインのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、およびまたは5つにおける1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の変化を有する。さらに、本明細書において論じられる通り、これらのSpa結合ポリペプチドは、以下で論じられる通りに全5つのドメインにおけるKKAAドメイン変化を含むがこれに限定されない、そのようなSpA変種を特異的に結合できる。

【0016】

ある態様は、ブドウ球菌SpA (SEQ ID NO:1)のアミノ酸セグメントと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一である、長さが約、少なくとも、または多くても5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25~25、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個のアミノ酸を、その間の全ての値および範囲を含めて、含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のアミノ酸セグメントを含んだ組換えペプチドを対象にする。例えば、ブドウ球菌SpA由来のアミノ酸セグメントは、非毒素産生性SpA変異体ポリペプチド(例えば、SpA_{KKAA})由来でありうる。各々が参照により本明細書に組み入れられるPCT公報番号WO 2011/005341およびPCT出願番号PCT/US11/42845は、いくつかの非毒素産生性SpA変異体ポリペプチドおよびそれを用いるための方法を提供している。さらなる局面には、これらの特定のアミノ酸セグメントの1つまたは複数の特異的に結合させる抗体がある。

【0017】

態様はまた、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

10

20

30

40

50

におけるSpA抗体の使用を提供する。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のおよび/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。

【0018】

ある局面は、ブドウ球菌SpA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ポリペプチドまたはタンパク質の有効量を、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を対象にする。このポリペプチド(またはタンパク質)は、それが、抗体の1つまたは複数のCDR領域のまたは由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはタンパク質であることによって抗体といわれうることが企図される。抗体との関連で本明細書において論じられるいずれの態様も、ポリペプチドまたはタンパク質が、特異的Ig結合活性を欠くSpA変種を特異的に結合できる抗体由来のCDRの全領域にわたって少なくとも60%の同一性または相同性を有する1つまたは複数のアミノ酸領域を有する限り、ポリペプチドまたはタンパク質に関して実施されうる。Spa結合ポリペプチドは、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ることができる。ある局面において、ポリペプチドは、ヒト化されている抗体であり、これは、抗体の非可変部分が、ヒト抗体において見られる定常領域を刺激するために改変されていることを意味する。したがって、ヒト化抗体は、非ヒト抗体のCDR配列(または少なくとも、そのような配列に由来するアミノ酸配列、すなわち、少なくとも80%同一である)を有するものであることが企図される。

【0019】

ある他の態様において、抗体はヒト抗体である。なおいっそう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、参照により本明細書に組み入れられる、下記表1~2におよび表5に記述の5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7の1つまたは複数を含む。抗体またはポリペプチドは、0.1、0.5、1、5、10、50、100 mgまたは $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~5、10、50、100、500 mgまたは $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与することができる。組換え抗体セグメントは、第二の組換え抗体セグメントを機能的に結合させることができる。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に結合す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。

【0020】

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を対象にする。ある局面において、ポリペプチドは、SpA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、SpA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。さらに、抗体または結合ポリペプチドは、SEQ ID NO: 11~13、21~23、31~33、41~43、51~53、61~63、71~73、81~83、91~93、96~98、111~113、116~118、126~128、131~133、16~18、26~28、36~38、46~48、56~58、66~68、76~78、86~88、101~103、106~108、121~123、136~138、141~143のいずれかを含む、本明細書において論じられる1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのCDR配列と、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、もしくは100%の同一性もしくは相同性(保存アミノ酸との置換)(またはその中における得られる任意の範囲)を有するか、少なくとも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、

もしくは100%の同一性もしくは相同性(保存アミノ酸との置換)(またはその中における得られる任意の範囲)を有するか、あるいは多くても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、もしくは100%の同一性もしくは相同性(保存アミノ酸との置換)(またはその中における得られる任意の範囲)を有するアミノ酸配列を含んだ結合領域を有しうる。具体的な態様において、本明細書において開示される1つまたは複数のCDRの全部または一部を有する抗体は、非CDR領域においてヒト化されている。さらなる態様において、本明細書において開示されるCDR領域は、1つのCDRあたり1、2、3、4、5、6、7または8個のアミノ酸によって変えられてもよく、それらは、ヒト化の代わりであってもまたはヒト化に加えてであってもよい。いくつかの態様において、変化は1、2または3個のアミノ酸の欠失または付加であってもよい、あるいは変化は任意のアミノ酸の置換であってもよく、これは、保存されたアミノ酸であるアミノ酸との置換であってもまたはそうでなくてもよい。

【0021】

いくつかの態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、表7～17に示されている通り、CDRについて同定されたコンセンサス配列と40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、100%の同一性を有する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは7つのCDRを有する。いくつかの態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ならびに重鎖可変領域のCDR1、CDR2、およびCDR3に対応するアミノ酸配列を有することが企図される。本明細書において論じられる通り、CDRに対応するアミノ酸配列は、本明細書において論じられるCDRと同一性パーセントまたは相同性パーセントを有しうる。ある態様において、コンセンサス配列は、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、またはSEQ ID NO:159である。特定の態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3についてモノクローナル抗体由来のコンセンサス配列を有する。代替的にまたはさらに、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、重鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3についてモノクローナル抗体由来のコンセンサス配列を有する。SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、コンセンサス配列および/または特定のCDRと同一性もしくは相同性を有する配列に基づきCDRの混在を有しうることがさらに企図される。

【0022】

いくつかの態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、3F6に関する1つまたは複数のコンセンサス配列を有する。特定の態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3について3F6由来のコンセンサス配列を有する。代替的にまたはさらに、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、重鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3について3F6由来のコンセンサス配列を有する。

【0023】

ある態様において、SpA抗体または結合ポリペプチドは、SpA結合抗体由来の1つまたは複数の抗体CDRドメインと少なくとも40%同一であるアミノ酸配列を含み、該ポリペプチドは、非特異的Ig結合活性を欠くブドウ球菌プロテインAポリペプチド変種のSpa Ig結合ドメインA、B、C、D、およびEの少なくとも2つを特異的に結合させる。この局面のさらなる態様が以下で企図される。

【0024】

さらに他の態様において、特異的Ig結合活性を欠くSpA変種ポリペプチドに特異的に結合する精製されたポリペプチドであって、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpa Ig結合ドメインA_{KKAA}、B_{KKAA}、C_{KKAA}、D_{KKAA}、およびE_{KKAA}に対して $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ または $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 超の結合定数を有する、精製されたポリペプチドが企図される。この態様のさらなる態様が以下で企図される。

【0025】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3D11可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列

10

20

30

40

50

QSGPELMKPGASVKISCKASGYSFTSYMHVWKQSHGKSLEWIGYIDPFNGGTSYNQK

FKGKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARYGYDGTIFYAMDYWGQTSVTVSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。CDRは、抗体が抗原の形状を補完する抗体内の領域である。したがって、CDRは、特異的抗原に対するタンパク質の親和性および特異性を決定する。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3D11の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、および/またはSEQ ID NO:83を含むことができる。さらなる態様において、抗体は、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0026】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3D11可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列

RIVLTQSPAITAASLGQKVITITCSASSSVSYMHVYQKSGTSPKPWIYEISKLASGVPAR

FSGSGSGTSYSLTISSEAEADAIIYYCQQWSYPFTFGSGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3D11の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、および/またはSEQ ID NO:88を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0027】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 3D11の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、MAb 3D11の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0028】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3F6可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列

EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFTNAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKSNN

YATYYADSVKDRFSISRDDSQNMLSLQMNNLKTEDTAIIYYCVTEHYDYDYVMDYW

GQGTSVXSPQ

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3F6の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、および/またはSEQ ID NO:53を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0029】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3F6可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
IVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYSGASLMQWYQHKPGQPPKLLIYAASNVES

GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMFYFCQOSRKVPSTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3F6の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、および/またはSEQ ID NO:58を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0030】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 3F6の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 3F6の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0031】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A10可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列

EVKLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFAFSNYDMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGTYP

YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQLSSLRSEDALYYCARGGFLITRDYYAMDYWG

QGTSTVTSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A10の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、および/またはSEQ ID NO:13を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列では

10

20

30

40

50

ない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0032】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A10可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
TIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A10の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、および/またはSEQ ID NO:18を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有する。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0033】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 5A10の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有する。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 5A10の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0034】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2F2可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
VKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASRFTESSYVMSWVRQTPEKRLEWVASIGSGGTTY
PDTVKGRTISRDNARNILYLQMSSLRSDDTAMYCYCTRGRGYGFAWYEDYWGAGTTVTVSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2F2の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、および/またはSEQ ID NO:98を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有する。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0035】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2F2可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
TIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2F2の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、および/またはSEQ ID NO:103を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0036】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 2F2の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 2F2の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0037】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4C5可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGASLMQWYQQKSGQPPKLLIYAASNVE
SGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQSRKVPNTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4C5の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、および/またはSEQ ID NO:138を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0038】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 4C5の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 4C5の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【 0 0 3 9 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4D5可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
 EIVLTQSPAITAASLGQKVITITCSASSSSVSYMHWHQKSGTSPKPWIYETSKLASGVPVR
 FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWSYPFTFGSGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4D8の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、および/またはSEQ ID NO:143を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

10

【 0 0 4 0 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A11可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGTY
 TYYPD_{SVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSSLK}SEDTAMYYCARDRDDYDEGPYFDYWGQGTTTLTVSS

20

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 5A11の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、および/またはSEQ ID NO:93を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 4 1 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6B2可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVVDYSGASLQWYQHKGPPRLLIYAASNVE
 SGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQOSRKVPSTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6B2の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、および/またはSEQ ID NO:123を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 4 2 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8E2可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列

50

KVQLQQSGAGLVKPGASVKLSCKASGYTFTEYSSIHWVKQSSGQGLEWIGWFYPGSGY

IKYNEKFKDKATLTADKSSSTVYMEFSRLTSEDSAVYFCARHGYGNVGYAMDYWGQGTSTVTVSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8E2の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、および/またはSEQ ID NO:23を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0043】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8E2可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASEIIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYFAKTLAEGVPS

RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGIYYCQHHYGTPYTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8E2の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、および/またはSEQ ID NO:28を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0044】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 8E2の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 8E2の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0045】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3A6可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYNFTDYSMHWVKQAPGKGLKWVGWINTETAE

STYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINSLKDEDTATFFCAHFDCWGQGTTLTVSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3A6の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、および/またはSEQ ID NO:33を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ

10

20

30

40

50

、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0046】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3A6可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
 DVVMTQISLSLPVTLGDQASISCRASQSLVHSNGNTYLNWYLQKPGQSPKLLIHKVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQITYVPWTFGGGTKLEIK

10

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 3A6の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、および/またはSEQ ID NO:38を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

20

【0047】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 3A6の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 3A6の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

30

【0048】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6D11可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
 QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGNAFTNYLIEWIKRPGQGLEWIGVINPGSGITN
 YNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLSSDDSAVYFCSGSANWFEAYWGQGTLVTVSA

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6D11の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、および/またはSEQ ID NO:73を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

40

50

【 0 0 4 9 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6D11可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
HCAHPSPASLAVSLGQRASISCRASEESVEYSGASLMQWYQHKPGQPPKLLIYAASNVES

GVPVRFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMFYFCQQRKVPSTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 6D11の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、および/またはSEQ ID NO:78を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

10

【 0 0 5 0 】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 6D11の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 6D11の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

20

【 0 0 5 1 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8D4可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
QVQLQQSGAELVRPGASVKISCKAFGSTFTNHHHINWVKQRPQGGLDWIGYLNPNYNDY

TNYNQKFKGKATLTIDKSSSTAYLELSSLTSEDSAVYYCATITFDSQXQ

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 8D4の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、および/またはSEQ ID NO:113を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

30

40

【 0 0 5 2 】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 1F10可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
KELISSKSEEEKWPGTSVKVSCKASGNAFTNYLIEWIKQRPQGGLDWIGVINPGSGITNY

NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSLSSDDSAVYFCSGSANWFAYWGQGTTLVTVSA

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 1F10の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば

50

、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、および/またはSEQ ID NO:63を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0053】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 1F10可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。

CSPSPASLAVSLGQRATISCRASEESVEYSGASLMQWYQHKPGQPPLLIYAASNVESGV

PARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQOSRKVPSTFGGGTKLEIK

アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 1F10の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、および/またはSEQ ID NO:68を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0054】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 1F10の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 1F10の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

【0055】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4C1可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。

VLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEESVEYSGASLMQWYQHKPGQPPLLIYAASNVESG

VPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQOSRKVPSTFGGGTKLEIK

アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 4C1の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、および/またはSEQ ID NO:108を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60

10

20

30

40

50

、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0056】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2B8可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
FFGVSLGQRASISCRASEESVEYSGASLIQWYQHKPGQPPKLLIYAAASNVESGVPVRFSGS

GSGETDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQOSRKVPSTFGGGTKLEIK

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2B8の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、および/またはSEQ ID NO:128を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0057】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2C3可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYDMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGTYP
YYPDSVKGRFTISRDNALNTLYLQLSSLRSEDALYYCARGGFLITTRDYYAMDYWGQGTSTVTVSS

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 2C3の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、および/またはSEQ ID NO:133を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つまたは3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0058】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 7E2可変(VDJ)重鎖アミノ酸配列
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFIDYSVHWVKQAPGKGLKWMWAWINTATGE
PTFADDFKGRFAFSLETSARTAYLQINNLKNEDETATYFCAPQLTGPFAYWGHGTLVTVSA

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。CDRは、抗体が抗原の形状を補完する抗体内の領域である。したがって、CDRは、特異的抗原に対するタンパク質の親和性および特異性を決定する。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 7E2の可変重鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、および/またはSEQ ID NO:43を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97

10

20

30

40

50

、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

【0059】

ある局面において、ポリペプチドは、MAb 7E2可変(VJ)軽鎖アミノ酸配列
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLTDGV
PSRFSGSGSGTQFSLKINSIQAGDFGSSYYCQHSWSIPYTFGGGTRLQIRR

に対応するアミノ酸配列の全部または一部を含む。CDRは太下線で示されている。アミノ末端からカルボキシ末端へ、CDRはCDR1、CDR2、およびCDR3である。ある局面において、ポリペプチドは、MAb 7E2の可変軽鎖由来の1つ、2つ、および/または3つのCDR、例えば、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、および/またはSEQ ID NO:48を含むことができる。さらなる態様において、ポリペプチドは、これらの1つ、2つ、または3つのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化(1つもしくは2つのアミノ酸の付加、1つもしくは2つのアミノ酸の欠失、または置換)を有するCDRを有しうる。さらなる態様において、抗体は、代替的にまたはさらに、CDR外の領域および/または可変領域においてヒト化されてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、さらにまたは代替的に、CDR配列ではない可変領域、すなわち、可変領域フレームワークのアミノ酸配列と少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一または相同であるアミノ酸配列を含む。

10

【0060】

他の態様において、ポリペプチドまたはタンパク質は、mAb 7E2の軽可変領域および重可変領域の一方または両方由来の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRは、これらのCDRに関して1つ、2つ、および/または3つのアミノ酸変化を有しうる。いくつかの態様において、可変領域外の抗体配列の一部または全部がヒト化されている。タンパク質は1つまたは複数のポリペプチドを含みうる。いくつかの局面において、タンパク質は、重鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドに類似した1つもしくは2つのポリペプチドを含みうる。さらなる態様において、ポリペプチドは、mAb 7E2の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRと少なくとも70%の配列同一性または相同性を有する限り、一本鎖抗体または本明細書において論じられる他の抗体であってよい。

20

【0061】

なおいっそうさらなる局面において、態様のポリペプチドは、本明細書において開示されるアミノ酸配列のいずれかの1つまたは複数のアミノ酸セグメントを含む。例えば、ポリペプチドは、本明細書において開示されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一である、長さが約、少なくとも、または多くても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、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200個のアミノ酸を、その間の全ての値および範囲を含めて、含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のアミノ酸セグメントを含むことができる。ある局面において、アミノ酸セグメントは、表5において提供されているSpA結合抗体のアミノ酸配列の1つから選択される。

30

40

【0062】

なおいっそうさらなる局面において、態様のポリペプチドは、本明細書において開示さ

50

れるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸セグメントであって、本明細書において提供されるいずれかの配列におけるアミノ酸位置番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、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、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199または200で始まり、かつその同じ提供される配列におけるアミノ酸位置番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、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、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199または200で終わる、アミノ酸セグメントを含む。ある局面において、アミノ酸セグメント、またはその部分は、表5において提供されているSpA結合抗体のアミノ酸配列の1つから選択される。

【0063】

いっそうさらなる局面において、態様のポリペプチドは、(表5において提供されている) SpA結合抗体のV、VJ、VDJ、D、DJ、JまたはCDRドメインと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中における得られる任意の範囲) 同一であるアミノ酸セグメントを含む。例えば、ポリペプチドは、表5において提供されているSpA結合抗体のCDR 1、2、および/または3と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中における得られる任意の範囲) 同一である1つ、2つまたは3つのアミノ酸セグメントを含みうる。

【0064】

さらなる局面において、態様の核酸分子は、本明細書において開示される核酸配列のいずれかの1つまたは複数の核酸セグメントを含む。例えば、核酸分子は、本明細書において開示される核酸配列のいずれかと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中における得られる任意の範囲) 同一である、長さが約、少なくとも、または多くても5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、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、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、

10

20

30

40

50

181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個、またはそれ以上のヌクレオチドを、その間の全ての値および範囲を含めて、含む1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の核酸セグメントを含むことができる。ある局面において、核酸セグメントは、表5において提供されているSpA結合抗体の部分にコードする核酸配列の1つから選択される。

【0065】

10

いっそうさらなる局面において、態様の核酸分子は、表5において提供されているSpA結合抗体のV、VJ、VDJ、D、DJ、JまたはCDRドメインをコードする配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100%（またはその中における得られる任意の範囲）同一である核酸セグメントを含む。例えば、核酸分子は、表5において提供されているSpA結合抗体のCDR 1、2、および/または3をコードする配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、もしくは100%（またはその中における得られる任意の範囲）同一である1つ、2つまたは3つの核酸セグメントを含みうる。

【0066】

なおいっそうさらなる局面において、いくつかの態様では、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。ある態様において、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、または1H7モノクローナル抗体を産生する株であり、それらの1つまたは複数が寄託されうる。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る。他の態様において、結合ポリペプチドが、少なくとも2つの異なる抗原を結合できる、二重特異性抗体が企図される。

20

【0067】

ある局面は、ブドウ球菌プロテインA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を対象にする。

30

【0068】

さらなる局面において、方法は、ブドウ球菌の感染の前にブドウ球菌プロテインAポリペプチドを結合させる抗体または結合ポリペプチドの有効量を、ブドウ球菌感染のリスクのある患者に投与する段階を含む、ブドウ球菌感染のリスクのある対象の処置を対象にする。

【0069】

これらの態様で用いるために企図される抗体または結合ポリペプチドは、細菌負荷量を減少できるもの、生存期間を延長できるもの、細菌性膿瘍を減少できるもの、防御免疫を付与できるもの、抗生物質の日数を減少できるもの、敗血症もしくは腐敗症のリスクを減少できるもの、ショックのリスクを減少できるもの、または他の何らかの防御効果を提供できるものを含む。

40

【0070】

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を対象にする。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%（またはその中における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%（またはその中における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

50

たはその中における得られる任意の範囲)同一である配列を有する。なおいっそうさらなる局面において、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は、本明細書において提供される配列のいずれかまたはそのような配列の組み合わせ由来の、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、もしくはそれ以上の連続アミノ酸を有するか、少なくとも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、もしくはそれ以上の連続アミノ酸を有するか、または多くても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、もしくはそれ以上の連続アミノ酸を有する。

10

【0071】

20

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。

【0072】

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。

【0073】

ある局面は、SpAまたは非毒素産生性SpA変種を特異的に結合させる抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域をコードする核酸分子を対象にする。

30

【0074】

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を対象にする。

【0075】

「提供する」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。

【0076】

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SpA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のような、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。有効量の判定は十分に、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。

40

50

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判定することができる。

【0077】

組成物は、SpAを結合させる抗体または細胞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、SpA抗体は、対象においてSpAを結合させる抗体の産生をもたらすSpA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。SpA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。SpA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、vWbp、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）、52 kDaのピ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）、FnbA、FnbB、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）、MRP II、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（WO 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/またはピ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）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SpA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SpA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。

【0078】

SpA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、vWbp、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）、52 kDaのピ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）、FnbA、FnbB、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（US564

8240)、MRPII、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 (WO 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/またはピ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SpA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、SpA抗体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。

10

【0079】

本明細書において用いられる場合、「調節する」または「調節」という用語は、「阻害する」という単語の意味を包含する。活性の「調節」は、活性の低下である。本明細書において用いられる場合、「調節因子」という用語は、タンパク質、核酸、遺伝子、生物などの増強、阻害、下方制御、または抑制を含む、ブドウ球菌の機能に効果を及ぼす化合物をいう。

【0080】

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SpA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、SpA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。

20

【0081】

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。

【0082】

「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技術により産生される場合)、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、換言すれば、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にない、核酸またはタンパク質断片である。

30

【0083】

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のような他の部分に、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。

40

【0084】

「SpA抗体」という用語は、ブドウ球菌由来のSpAタンパク質を結合させるポリペプチドをいう。

【0085】

なおいっそうさらなる局面において、組成物は、二回以上対象に投与されてもよく、1

50

、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20回、またはそれ以上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。

【0086】

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、および他の家畜、すなわち、哺乳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、例えば、乳腺の感染、特に乳腺炎および他の感染を予防、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か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。

10

【0087】

なおいっそうさらなる態様には、(i) SpA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SpA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。

20

【0088】

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。

【0089】

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」を意味するように用いられるが、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することも企図される。

【0090】

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。

30

【0091】

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。

【0092】

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。

40

【0093】

[本発明1001]

非特異的Ig結合活性を欠くSpa変種のSpA IgG結合ドメインA、B、C、D、およびEの少なくとも2つを特異的に結合できる精製されたSpA結合ポリペプチドの有効量を、ブドウ球菌(Staphylococcus)感染を有する患者またはブドウ球菌感染のリスクのある患者に投与する

50

段階を含む、ブドウ球菌感染を処置または予防する方法。

[本発明1002]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpA IgG結合ドメイン A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、 C_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、および E_{KKAA} に結合する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpA IgG結合ドメイン A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、 C_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、および E_{KKAA} に対して $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ または $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 超の結合定数を有する、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが、前記患者においてブドウ球菌負荷量を減少させることができる、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記抗体が、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)のオプソニン作用性の死滅を媒介することができる、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記抗体が、野生型SpAとのヒトIgGの結合をかく乱させることができる、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体由来のCDRアミノ酸配列と少なくとも40%同一である少なくとも1つのアミノ酸領域を含むヒト化抗体である、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

ブドウ球菌感染の処置が、前記患者において膿瘍形成を減少させることまたは細菌負荷量を減少させることを含む、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記非特異的Ig結合活性を欠くSpAポリペプチドが SpA_{KKAA} である、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体との SpA_{KKAA} ポリペプチドの結合について競合する、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記抗体が、ELISAによって測定した場合に約 $0.5 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $1.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $2.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の、前記 SpA_{KKAA} ポリペプチドに対する結合定数を有する、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

二種またはそれ以上の精製されたSpA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、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドが組換え体である、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記組換えポリペプチドが単ドメイン抗体である、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドがヒト化抗体である、本発明1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記精製されたSpA結合ポリペプチドがヒト抗体である、本発明1001～1015のいずれか

10

20

30

40

50

の方法。

[本発明1017]

前記精製されたポリペプチドが、SpA結合抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインを含む組換えポリペプチドである、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

前記組換えポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインを含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記組換えポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体由来の2つまたはそれ以上のCDRドメインを含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記組換えポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2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つのCDRドメインを含む、本発明1018の方法。

[本発明1021]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2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40%同一の配列を含む、本発明1001～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

前記組換えポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体のVHドメインおよびVLドメインの中からの6つのCDRドメインを含む、本発明1020の方法。

[本発明1023]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体由来のVHドメインを含む、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体由来のVLドメインを含む、本発明1001～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記組換えポリペプチドが、SpA結合抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィブロンネクチン、リボカリン、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1017の方法。

[本発明1026]

前記組換え抗体セグメントが、第二の組換え抗体セグメントに機能的に結合されている、本発明1013の方法。

[本発明1027]

前記第二の組換え抗体セグメントが第二のブドウ球菌タンパク質を結合させる、本発明1026の方法。

[本発明1028]

前記抗体が、5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、4C5、4D5、6B2、8D4、2B8、2C3、または7E2モノクローナル抗体である、本発明1001の方法。

[本発明1029]

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、本発明1001～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

10

20

30

40

50

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1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記抗体が0.1 mg/kg～500 mg/kgの用量で投与される、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

SpA結合抗体由来の1つまたは複数の抗体CDRドメインと少なくとも40%同一であるアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチドであって、非特異的Ig結合活性を欠くブドウ球菌プロテインA (SpA)ポリペプチド変種のSpa IgG結合ドメインA、B、C、D、およびEの少なくとも2つを特異的に結合できる、精製されたポリペプチド。

10

[本発明1033]

前記非特異的Ig結合活性を欠くSpAポリペプチドがSpA_{KKAA}である、本発明1032のポリペプチド。

[本発明1034]

5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体とのSpA_{KKAA}ポリペプチドの結合について競合する、本発明1032または1033のポリペプチド。

[本発明1035]

ELISAによって測定した場合に約 $0.5 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $1.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $2.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の、前記SpA_{KKAA}ポリペプチドに対する結合定数を有する、本発明1032～1034のいずれかのポリペプチド。

20

[本発明1036]

単一ドメイン抗体である、本発明1032～1035のいずれかのポリペプチド。

[本発明1037]

ヒト化モノクローナル抗体である、本発明1032～1036のいずれかのポリペプチド。

[本発明1038]

前記精製されたポリペプチドがヒト抗体である、本発明1032～1037のいずれかのポリペプチド。

[本発明1039]

組換え体である、本発明1032～1037のいずれかのポリペプチド。

30

[本発明1040]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと少なくとも40%の同一性を有するアミノ酸領域を含む、本発明1039のポリペプチド。

[本発明1041]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体由来の2つのCDRドメインと少なくとも40%同一である2つまたはそれ以上のアミノ酸領域を含む、本発明1040のポリペプチド。

40

[本発明1042]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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ドメインと少なくとも40%同一である3つのアミノ酸領域を含む、本発明1040のポリペプチド。

[本発明1043]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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40%同一の配列を含む、本発明1032～1042のいずれかのポリペプチド。

50

[本発明1044]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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ドメインと少なくとも40%同一である6つのアミノ酸領域を含む、本発明1042のポリペプチド。

[本発明1045]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体のVHドメインを含む、本発明1044のポリペプチド。

[本発明1046]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体のVLドメインを含む、本発明1044のポリペプチド。

[本発明1047]

前記組換えポリペプチドが、SpA結合抗体由来の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、リポカリン、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1032～1046のいずれかのポリペプチド。

[本発明1048]

前記精製されたポリペプチドが、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合する第二の組換えポリペプチドに機能的に結合されている、本発明1032～1047のいずれかのポリペプチド。

[本発明1049]

5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体である、本発明1032～1048のいずれかのポリペプチド。

[本発明1050]

(a) 前記VH領域と、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領域とを含む重鎖；ならびに、(b) 前記VL領域と、ヒトCLまたはヒトCLとを含む軽鎖を含む抗体である、本発明1032～1049のいずれかのポリペプチド。

[本発明1051]

本発明1032～1050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1052]

密閉容器中に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1051の薬学的組成物。

[本発明1053]

少なくとも第二の抗菌物質を含む、本発明1051の薬学的組成物。

[本発明1054]

前記第二の抗菌物質が、抗生物質、ブドウ球菌ワクチン組成物、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1053の薬学的組成物。

[本発明1055]

特異的Ig結合活性を欠くSpa変種ポリペプチドに特異的に結合する精製されたポリペプチドであって、少なくとも2つのおよび最大で5つまでのSpa Ig結合ドメイン A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、 C_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、および E_{KKAA} に対して $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ または $0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 超の結合定数を有する、精製されたポリペプチド。

[本発明1056]

5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと少なくとも40%の同一性を有するアミノ酸領域を含む、本発明1055の精製されたポ

10

20

30

40

50

リペプチド。

[本発明1057]

5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体とのSpA_{KKAA}ポリペプチドの結合について競合する、本発明1055または1056のポリペプチド。

[本発明1058]

ELISAによって測定した場合に約 $0.5 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $1.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $2.0 \sim 100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の、SpA_{KKAA}ポリペプチドに対する結合定数を有する、本発明1055～1057のいずれかのポリペプチド。

[本発明1059]

単一ドメイン抗体である、本発明1055～1058のいずれかのポリペプチド。

[本発明1060]

ヒト化モノクローナル抗体である、本発明1055～1059のいずれかのポリペプチド。

[本発明1061]

前記精製されたポリペプチドがヒト抗体である、本発明1055～1060のいずれかのポリペプチド。

[本発明1062]

組換え体である、本発明1055～1060のいずれかのポリペプチド。

[本発明1063]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと少なくとも40%の同一性を有するアミノ酸領域を含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1064]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体由来の2つのCDRドメインと少なくとも40%同一である2つまたはそれ以上のアミノ酸領域を含む、本発明1063のポリペプチド。

[本発明1065]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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ドメインと少なくとも40%同一である3つのアミノ酸領域を含む、本発明1063のポリペプチド。

[本発明1066]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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40%同一の配列を含む、本発明1055～1065のいずれかのポリペプチド。

[本発明1067]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7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ドメインと少なくとも40%同一である6つのアミノ酸領域を含む、本発明1065のポリペプチド。

[本発明1068]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体のVHドメインを含む、本発明1067のポリペプチド。

[本発明1069]

前記精製されたポリペプチドが、5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗

10

20

30

40

50

体のVLドメインを含む、本発明1067のポリペプチド。

[本発明1070]

前記組換えポリペプチドが、SpA結合抗体由来の1つまたは複数のCDRドメインと、免疫グロブリン、フィブネクチン、リポカリン、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1055～1069のいずれかのポリペプチド。

[本発明1071]

前記精製されたポリペプチドが、第二のブドウ球菌タンパク質に特異的に結合する第二の組換えポリペプチドに機能的に結合されている、本発明1055～1070のいずれかのポリペプチド。

[本発明1072]

5A10、8E2、3A6、7E2、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、4C1、2F2、8D4、7D11、2C3、4C5、6B2、4D5、2B8、または1H7モノクローナル抗体である、本発明1055～1071のいずれかのポリペプチド。

[本発明1073]

(a) 前記VH領域と、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領域とを含む重鎖；ならびに、(b) 前記VL領域と、ヒトCLまたはヒトCLとを含む軽鎖を含む抗体である、本発明1055～1072のいずれかのポリペプチド。

[本発明1074]

本発明1055～1073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1075]

密閉容器中に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1074の薬学的組成物。

[本発明1076]

少なくとも第二の抗菌物質を含む、本発明1074の薬学的組成物。

[本発明1077]

(a) 特異的Ig結合活性を欠くSpA変種を抗原として用いてモノクローナル抗体を作製する段階；

(b) 該SpA変種との特異的結合についてモノクローナル抗体をスクリーニングする段階；

(c) 該SpA変種との特異的結合についてスクリーニングされた一種または複数種のモノクローナル抗体をヒト化する段階；および

(d) SpA抗体を無力化する能力について一種または複数種のヒト化モノクローナル抗体をスクリーニングする段階

を含む、無力化用の治療的SpA抗体を作製する方法。

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になると考えられる。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】

【0094】

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】 SpA_{KKAA} 特異的モノクローナル抗体(mAb)はマウスをMRSA感染から防御する。コホートの動物(n=10)を20 mg・kg⁻¹のアイソタイプ対照(IgG_{2a})またはSpA_{KKAA}-mAb (3F6)のどちらかをを用いた腹腔内注射によって免疫した。免疫後24時間の後に、動物を5×10⁶ CFU

10

20

30

40

50

の黄色ブドウ球菌MW2に曝露した。(A) 曝露後15日の時点で、動物を安楽死させて、腎臓におけるブドウ球菌負荷量を数え上げた。(B) 15日間感染させたマウスの血清試料を、ブドウ球菌抗原マトリックス(ClfA, クランピング因子A; ClfB, クランピング因子B; FnBPA, フィブロネクチン結合タンパク質A; FnBPB, フィブロネクチン結合タンパク質B; IsdA, 鉄表面決定基A; IsdB, 鉄表面決定基B; SdrD, セリン-アスパラギン酸反復タンパク質D; SpAKKAA, 毒素非産生性ブドウ球菌プロテインA; Coa, コアグララーゼ; EsxA, Ess [ESAT-6 (初期分泌抗原標的6 kDa)]分泌系]細胞外A; EsxB, Ess [ESAT-6 (初期分泌抗原標的6 kDa)]分泌系]細胞外B; Hla, -溶血素; LukD, ロイコシジンD; vWbp, フォンウィルブランド結合タンパク質)に対する抗体について分析した。この値は、アイソタイプ対照動物血清試料と比べてmAb 3F6処置動物由来の試料の増加倍率を表す(IgG_{2a}の場合n=7、3F6の場合n=8)。データは平均であり、エラーバーは±SEMを表す。A~Bにおける結果は、2回の独立した分析の代表である。

10

【図2】プロテインA特異的モノクローナル抗体の結合力。モノクローナル抗体を漸増濃度(0~4 M)のチオシアン酸アンモニウムとともにインキュベートして、(A) IgG₁アイソタイプモノクローナル抗体、(B) IgG_{2a}アイソタイプモノクローナル抗体および(C) IgG_{2b}アイソタイプモノクローナル抗体における抗原-抗体特異的な相互作用をかく乱させた。データは平均であり、エラーバーは±SEMを表す。A~Cにおける結果は、3回の独立した分析の代表である。

【図3】SpA_{KKAA}特異的mAbは野生型プロテインAを結合させる。(A) 固定化された野生型プロテインA (SpA)と、アイソタイプ対照抗体(IgG₁、IgG_{2a}、もしくはIgG_{2b})またはSpA_{KKAA}特異的mAb (5A10、3F6、および3D11)との結合を調べるELISA。(B) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合SpA_{KKAA}特異的mAb (5A10-HRP、3F6-HRP、および3D11-HRP)と固定化SpA_{KKAA}との結合を、プレートリーダー実験において試験し、この場合にはSpA_{KKAA}をアイソタイプ対照抗体(IgG₁、IgG_{2a}、もしくはIgG_{2b})または3種の異なるSpA_{KKAA}特異的mAb (5A10、3F6、および3D11)とともに最初にインキュベートして、同じ部位または密接に関連した部位を結合させる抗体に対する競合阻害の可能性について評価した(n=3)。OD_{405nm}での値を測定し、SpA_{KKAA}とHRP結合SpA特異的mAbの相互作用に対して規準化した。データは平均であり、エラーバーは±SEMを表す。パネルAおよびBにおけるデータは、3回の独立した分析の代表である。アスタリスクは統計的有意性(P<0.05)を示す。

20

【図4】SpA_{KKAA}-mAbはブドウ球菌プロテインAと免疫グロブリンとの結合を阻止する。(A) アイソタイプ対照抗体またはSpA_{KKAA}-mAbを用いて、ELISAプレート上に固定化されたタンパク質(野生型SpA、またはFc (SpA_{KK})もしくはFab (SpA_{AA})を結合させる能力を欠く変種に対するヒトIgGの結合をかく乱させた。この値を、抗体なしでのヒトIgGとのプロテインAの相互作用(n=4)に対して規準化した。(B) ブドウ球菌を対数増殖期中期まで増殖させ、アイソタイプ対照抗体またはmAb 3F6のどちらかとインキュベートし、引き続いて野生型Sbi₁₋₄ 2 μgの添加を行った。インキュベーション時に、Sbi₁₋₄の消費を、アフィニティー精製 -SpA_{KKAA}ウサギ抗体を用いた免疫ロットによって測定した。この値を抗体なし(Abなし)でのSbi₁₋₄の沈降に対して規準化した。(C) アフィニティー精製されたSpA (200 μg)を、アイソタイプ対照抗体またはmAb 3F6のどちらか85 μg (5 mg·kg⁻¹)で予め処置されたマウスの腹腔へ注射した。動物を表示の時点で安楽死させて、アフィニティー精製された -SpA_{KKAA}ウサギ抗体を用いた免疫ロットにより循環血中のSpAの量を測定した(1つの時点あたりn=3)。この値を0分の時点で注射したSpAの総量に対して規準化した。データは平均であり、エラーバーは±SEMを表す。A~Cにおける結果は、2回の独立した分析の代表である。アスタリスクは統計的有意性(P<0.05)を示す。

30

40

【図5】SpA_{KKAA}-mAbは、マウスおよびヒトの血液中での黄色ブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を促進する。(A) レピルジン抗凝固処理マウス血液を30分間アイソタイプマウス抗体対照またはSpA_{KKAA}-mAb (2 μg·ml⁻¹)の存在下において5×10⁵ CFUの黄色ブドウ球菌Newmanとともにインキュベートし、生存について測定した(n=3)。(B) レピルジン抗凝固処理ヒト全血を120分間アイソタイプマウス抗体対照またはSpA_{KKAA}-mAb (10 μg·ml⁻¹)の存在下において5×10⁶ CFUの黄色ブドウ球菌MW2とともにインキュベートし、生存に

50

ついて測定した($n=3$)。(C~H) 抗凝固処理ヒト血液中でのブドウ球菌の60分のインキュベーションの時点で、細胞外ブドウ球菌のクラスタがマウスアイソタイプ抗体対照とともにインキュベートされた試料中で検出されたのに対し(灰色の矢印)、 SpA_{KKAA} -mAbによる試料では好中球内にブドウ球菌が見出された(黒色の矢印)。データは平均であり、エラーバーは \pm SEMを表す。A~Hにおける結果は、3回の独立した分析の代表である。アスタリスクは統計的有意性($P<0.05$)を示す。

【図6】mAb 3F6によるプロテインA特異的免疫反応の生成。プロテインA変種(SpA 、 SpA_{KK} 、 SpA_{AA} 、 SpA_{KKAA} 、およびPBS) 20 μg の混合物ならびにmAb 3F6 (IgG2a抗体)またはそのアイソタイプ対照85 μg を投与されていた動物(1群あたり $n=5$)におけるプロテインA特異的抗体の力価をELISAによって測定した。免疫力価をそのアイソタイプ対照標準物質に対して規準化した。データは平均であり、エラーバーは \pm SEMを表す。結果は、2回の独立した分析の代表である。

10

【図7】ヒト免疫グロブリン断片とプロテインA変種との相互作用。固定化されたプロテインA変種(野生型 SpA 、 SpA_{KK} 、 SpA_{AA} または SpA_{KKAA})とヒト免疫グロブリン(hIgG)、およびそのFcまたは F(ab)_2 断片との結合をELISAによって分析し、 SpA とヒトIgGの相互作用に対して規準化した。 SpA 変種の統計的有意性を各リガンド(ヒトIgG、Fcまたは F(ab)_2 断片、 $n=4$)との SpA の結合に対して比較した。データは平均であり、エラーバーは \pm SEMを表す。結果は、3回の独立した分析の代表である。アスタリスクは統計的有意性($P<0.05$)を示す。

【図8A】 SpA_{KKAA} mAb CDRアライメント。ハイブリドーマ細胞株から得たCDR (相補性決定領域)由来のアミノ酸配列。ClustalW2を用いて免疫グロブリン遺伝子を整列させた。* (アスタリスク)は、単一の完全に保存された残基を有する位置を示す。:(コロン)は、類似の強い特性 - Gonnet PAM 250行列において0.5超のスコアリングの、群間保存を示す。.(ピリオド)は類似の弱い特性 - Gonnet PAM 250行列において0.5以下のスコアリングの、群間保存を示す。マウス腎臓瘍モデルにおけるCFU減少に基づくmAbランクは、mAb識別子の前に上付き文字で表示されている。マウスIgGアイソタイプが示されている。AVFPM ILW- Small (低分子 + 疎水性 (芳香族 -Yを含む))、DE- 酸性、RK- 塩基性 - H、STYHCN GQ- ヒドロキシル(Hydroxyl) + スルフヒドリル + アミン + G。

20

【図8B】 SpA_{KKAA} mAb CDRアライメント。ハイブリドーマ細胞株から得たCDR (相補性決定領域)由来のアミノ酸配列。ClustalW2を用いて免疫グロブリン遺伝子を整列させた。* (アスタリスク)は、単一の完全に保存された残基を有する位置を示す。:(コロン)は、類似の強い特性 - Gonnet PAM 250行列において0.5超のスコアリングの、群間保存を示す。.(ピリオド)は類似の弱い特性 - Gonnet PAM 250行列において0.5以下のスコアリングの、群間保存を示す。マウス腎臓瘍モデルにおけるCFU減少に基づくmAbランクは、mAb識別子の前に上付き文字で表示されている。マウスIgGアイソタイプが示されている。AVFPM ILW- Small (低分子 + 疎水性 (芳香族 -Yを含む))、DE- 酸性、RK- 塩基性 - H、STYHCN GQ- ヒドロキシル(Hydroxyl) + スルフヒドリル + アミン + G。

30

【図9】 SpA モノクローナル抗体(Spa27)はマウスにおいて防御免疫を誘発することができない。(A) 固定化された、野生型プロテインA (SpA)ならびにFc (SpA_{KK})、Fab (SpA_{AA})またはFc およびFab (SpA_{KKAA})を介した免疫グロブリン結合を欠く変種との SpA -mAb (Spa27)および SpA_{KKAA} -mAb (3F6)の結合を調べるELISA ($n=3$)。(B) コホートの動物($n=9 \sim 15$)を、モック(PBS)、5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の Spa27 、または、5もしくは50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の3F6のいずれかを用いた腹腔内注射によって免疫した。免疫から24時間後に、動物に 5×10^6 CFUの黄色ブドウ球菌USA300を曝露した。曝露から4日後に、動物を安楽死させて、腎臓におけるブドウ球菌負荷量を数え上げた。

40

【図10】図10A~Eは、mAb 358A76.1はブドウ球菌プロテインAのエドメインを特異的に認識する。(A) mAb 358A76.1および(B) 3F6と、固定化された毒素非産生性プロテインA変種(SpA_{KKAA})、各免疫グロブリン結合ドメイン(E_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、 A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、および C_{KKAA})、ならびに E_{KKAA} 免疫グロブリン結合ドメイン(IgBD)の3つのヘリックスに由来する合成直鎖ペプチド(H1、H2、H3、H1+2、H2+3)との結合を調べるELISA。(C) プロテインAの5つのI

50

gBDのアミノ酸配列のアライメントから、残る4つのIgBDの、保存されたアミノ酸残基とは異なるEドメイン中のアミノ酸残基が明らかにされている(破線の囲み)。毒素非産生性プロテインA内の置換アミノ酸残基が、灰色の囲みで特定されている。(D) ClustalWを用いてアミノ酸配列の相同性レベルを比較しており、数値は免疫グロブリン結合ドメイン間のアミノ酸相同性の百分率を表す。(E) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合mAb (358A76.1-HRPおよび3F6-HRP)とELISAプレート中に固定化されたSpA_{KKAA}との結合を、プレートリーダー実験において評価し、この場合にはSpA_{KKAA}をアイソタイプ対照抗体(IgG_{2a})またはmAb (358A76.1および3F6)とともに最初にインキュベートして、同じ部位または密接に関係した部位を結合させる抗体の競合阻害を特定した。OD_{405nm}での値を記録し、SpA_{KKAA}とHRP結合SpA特異的mAbの相互作用に対して規準化した。

10

【図11】図11AおよびBは、SpAモノクローナル抗体358A76.1はマウスにおいて防御免疫を誘発することができない。(A) コホートの動物(n=10)に5 mg・kg⁻¹のモック(IgG_{2a}アイソタイプ対照mAb)、mAb 358A76.1またはmAb 3F6のいずれかを腹腔内注射によって免疫した。免疫から24時間後に、動物に5×10⁶ CFUの黄色ブドウ球菌USA300を静脈内接種によって曝露した。曝露から4日後に、動物を安楽死させて、腎臓におけるブドウ球菌負荷量を数え上げた。(B) 抗凝固処理マウス血液を30分間IgG2aアイソタイプ対照mAb、mAb 358A76.1またはmAb 3F6 (10 μg・ml⁻¹)の存在下において5×10⁵ CFUの黄色ブドウ球菌USA300 (LAC)とともにインキュベートした；ブドウ球菌の生存を測定した。(C) アイソタイプ対照抗体、mAb 358A76.1またはmAb 3F6を用いて、ELISAプレート上に固定化された野生型プロテインA (SpA)とのヒトIgGの結合をかく乱させた。この値を、抗体の非存在下でのヒトIgGとのプロテインAの相互作用に対して規準化した。

20

【発明を実施するための形態】

【0095】

発明の詳細な説明

黄色ブドウ球菌は、ヒト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(Klebens 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)株の広がりによって起因する(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(Klebens 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(Klebens 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。

30

【0096】

本発明者らは本明細書で、ブドウ球菌プロテインA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、毒性(Fc 相互作用)とB細胞に対する超抗原活性(Fab相互作用)の両方を欠くSpA変異体タンパク質を用いて、一連のモノクローナル抗体が産生された。抗体の多くが高い親和性および特異性でSpAと相互作用することが分かった。重要なことには、抗体はブドウ球菌プロテインAの分子機構を無力化することができる。さらに、動物に投与された場合、抗体は、病毒性の黄色ブドウ球菌による曝露後の細菌負荷量および膿瘍形成を減少させた。これらの分子はSpAの免疫抑制作用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、態様のSpA結合分子は、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を拓く。

40

【0097】

1. SPAポリペプチド

態様のある局面は、本明細書でSEQ ID NO:1として提供される野生型SpAなどのSpAポリペプチドに関する。しかしながら、ある局面において、態様は、B細胞超抗原活性および/または非特異的免疫グロブリン結合活性(すなわち、IgのCDR配列に依存しないIgの結合)を欠くポリペプチドなどの、変異体または変種のSpAポリペプチドに関する。詳細には、

50

ある態様は、B細胞超抗原活性および/または非特異的免疫グロブリン結合活性を欠くSpAポリペプチドに特異的に結合するポリペプチド(例えば、抗体CDRドメインを含むポリペプチド)に関する。

【0098】

プロテインAのN末端部分は、4つまたは5つの56~61アミノ酸残基免疫グロブリン結合ドメイン(IgBD A~E)から構成される；態様にしたがって用いるためのSpA変種は、例えば、変種A、B、C、D、および/またはEドメインを含む全長SpA変種であることができる。ある局面において、SpA変種は、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列と80、90、95、98、99、または100%同一であるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。他の態様において、SpA変種はSpAのセグメントを含む。SpAセグメントは、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上のIgG結合ドメインを含むことができる。IgGドメインは、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種A、B、C、D、またはEドメインであることができる。ある局面において、SpA変種は、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種Aドメインを含む。さらなる局面において、SpA変種は、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種Bドメインを含む。なおいっそうさらなる局面において、SpA変種は、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種Cドメインを含む。いっそうさらなる局面において、SpA変種は、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種Dドメインを含む。ある局面において、SpA変種は、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5個、またはそれ以上の変種Eドメインを含む。さらなる局面において、SpA変種は、さまざまな組み合わせおよび順序でA、B、C、D、およびEドメインの組み合わせを含む。この組み合わせはSpAシグナルペプチドセグメント、SpA領域Xセグメントおよび/またはSpA選別シグナルセグメントの全部または一部を含むことができる。他の局面において、SpA変種はSpAシグナルペプチドセグメント、SpA領域Xセグメントおよび/またはSpA選別シグナルセグメントを含まない。ある局面において、変種AドメインはSEQ ID NO:4の位置番号7、8、34、および/または35に置換を含む。別の局面において、変種BドメインはSEQ ID NO:6の位置番号7、8、34、および/または35に置換を含む。さらに別の局面において、変種CドメインはSEQ ID NO:5の位置番号7、8、34、および/または35に置換を含む。ある局面において、変種DドメインはSEQ ID NO:2の位置番号9、10、36、および/または37に置換を含む。さらなる局面において、変種EドメインはSEQ ID NO:3の位置番号6、7、33、および/または34に置換を含む。

【0099】

ある局面において、SpAドメインD変種またはその等価体は、SEQ ID NO:2の位置番号9および36；9および37；9および10；36および37；10および36；10および37；9、36および37；10、36および37、9、10および36；または9、10および37に変異を含むことができる。さらなる局面において、類似変異をドメインA、B、C、またはEの1つまたは複数において含めることができる。

【0100】

さらなる局面において、SEQ ID NO:2の位置番号9のアミノ酸グルタミン(Q) (または他のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)と置き換えることができる。いくつかの局面において、位置番号9のグルタミンをアルギニン(R)と置き換えることができる。さらなる局面において、SEQ ID NO:2、またはその等価体の位置番号9のグルタミンをリジンまたはグリシンと置き換えることができる。いずれか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の置換が明示的に除外されてもよい。

【0101】

別の局面において、SEQ ID NO:2の位置番号10のアミノ酸グルタミン(Q) (または他のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチ

10

20

30

40

50

ジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)と置き換えることができる。いくつかの局面において、位置番号10のグルタミンをアルギニン(R)と置き換えることができる。さらなる局面において、SEQ ID NO:2、またはその等価体の位置番号10のグルタミンをリジンまたはグリシンと置き換えることができる。いずれか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の置換が明示的に除外されてもよい。

【0102】

ある局面において、SEQ ID NO:2の位置番号36のアスパラギン酸(D) (または他のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、アスパラギン(N)、アルギニン(R)、システイン(C)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)と置き換えることができる。いくつかの局面において、位置番号36のアスパラギン酸をグルタミン酸(E)と置き換えることができる。ある局面において、SEQ ID NO:2、またはその等価体の位置番号36のアスパラギン酸をアラニンまたはセリンと置き換えることができる。いずれか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の置換が明示的に除外されてもよい。

【0103】

別の局面において、SEQ ID NO:2の位置番号37のアスパラギン酸(D) (または他のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、アスパラギン(N)、アルギニン(R)、システイン(C)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)と置き換えることができる。いくつかの局面において、位置番号37のアスパラギン酸をグルタミン酸(E)と置き換えることができる。ある局面において、SEQ ID NO:2、またはその等価体の位置番号37のアスパラギン酸をアラニンまたはセリンと置き換えることができる。いずれか1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の置換が明示的に除外されてもよい。

【0104】

特定の態様において、SEQ ID NO:2の位置番号9のアミノ酸(または別のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、セリン(S)、またはバリン(V)に置き換える。ある局面において、SEQ ID NO:2の位置番号9のアミノ酸をグリシンに置き換える。さらなる局面において、SEQ ID NO:2の位置番号9のアミノ酸をリジンに置き換える。

【0105】

特定の態様において、SEQ ID NO:2の位置番号10のアミノ酸(または別のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、セリン(S)、またはバリン(V)に置き換える。ある局面において、SEQ ID NO:2の位置番号10のアミノ酸をグリシンに置き換える。さらなる局面において、SEQ ID NO:2の位置番号10のアミノ酸をリジンに置き換える。

【0106】

特定の態様において、SEQ ID NO:2の位置番号36のアミノ酸(または別のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、セリン(S)、またはバリン(V)に置き換える。ある局面において、SEQ ID NO:2の位置番号36のアミノ酸をセリンに置き換える。さらなる局面において、SEQ ID NO:2の位置番号36のアミノ酸をアラニンに置き換える。

【0107】

特定の態様において、SEQ ID NO:2の位置番号37のアミノ酸(または別のSpAドメインにおけるその類似アミノ酸)を、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、セリン(S)、またはバリン(V)に置き換える。ある局面において、SEQ ID NO:2の位置番号37のアミノ酸をセリンに置き換える。さらなる局面において、SEQ ID NO:2の位置番号37のアミノ酸をアラニンに置き換える。

【0108】

ある局面において、SpA変種は、(a) IgG Fcとの結合を破壊するかまたは減少させるSpAドメインA、B、C、D、および/またはEのIgG Fc結合サブドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸置換、ならびに(b) V_H3 との結合を破壊するかまたは減少させるSpAドメインA、B、C、D、および/またはEの V_H3 Fc結合サブドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸置換の置換を含む。なおいっそうさらなる局面において、SpA変種のアミノ酸配列はSEQ ID NO:2~6のアミノ酸配列と、以下の間の全ての値および範囲を含め、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0109】

さらなる局面において、SpA変種は、(a) IgG Fcとの結合を破壊するかまたは減少させる、SpAドメインDのIgG Fc結合サブドメインにおける、または他のIgGドメイン中の対応するアミノ酸位置における、1つまたは複数のアミノ酸置換、ならびに(b) V_H3 との結合を破壊するかまたは減少させる、SpAドメインDの V_H3 結合サブドメインにおける、または他のIgGドメイン中の対応するアミノ酸位置における、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。ある局面において、ドメインDのIgG Fc結合サブドメインのアミノ酸残基F5、Q9、Q10、S11、F13、Y14、L17、N28、I31、および/またはK35

(SEQ ID NO:2, QQNNFNKDDQSAFYELNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES)

が修飾または置換される。ある局面において、ドメインDの V_H3 結合サブドメインのアミノ酸残基Q26、G29、F30、S33、D36、D37、Q40、N43、および/またはE47 (SEQ ID NO:2)は、Fcまたは V_H3 との結合が弱められるように修飾または置換される。さらなる局面において、対応する修飾または置換は、ドメインA、B、C、および/またはEの対応する位置において遺伝子操作されてもよい。対応する位置は、ドメインDアミノ酸配列と、SpAの他のIgG結合ドメイン由来のアミノ酸配列の1つまたは複数とのアライメントによって規定される。ある局面において、アミノ酸置換はその他20種のアミノ酸のいずれかであることができる。さらなる局面において、保存的アミノ酸置換を可能なアミノ酸置換から特に除外することができる。他の局面において、非保存的置換しか含まれない。いずれにしても、SpA毒性が顕著に減少するようにドメインの結合を減少させる任意の置換または置換の組み合わせが企図される。結合の減少の意義は、対象に導入され、本明細書において記述されるインビトロの方法を用いて評価されうる場合に、最低毒性から無毒性を生じる変種をいう。

【0110】

ある態様において、変種SpAは、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種、またはそれ以上の変種SpAドメインDペプチドを含む。ある局面において、ドメインDのIgG Fc結合サブドメインのアミノ酸F5、Q9、Q10、S11、F13、Y14、L17、N28、I31、および/またはK35 (SEQ ID NO:2)、ならびにドメインDの V_H3 結合サブドメインのアミノ酸残基Q26、G29、F30、S33、D36、D37、Q40、N43、および/またはE47 (SEQ ID NO:2)を含むがこれらに限定されない、変種SpAの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、もしくは19個、またはそれ以上のアミノ酸残基が置換または修飾される。1つの局面において、SEQ ID NO:2の位置番号9および/もしくは10 (または他のドメイン中の対応する位置)のグルタミン残基が突然変異導入される。別の局面において、SEQ ID NO:2のアスパラギン酸残基36および/もしくは37 (または他のドメイン中の対応する位置)が突然変異導入される。さらなる局面において、グルタミン9および10、ならびにアスパラギン酸残基36および37が突然変異導入される。本明細書において記述される精製された毒素非産生性SpAまたはSpA-D変異体/変種は、もはやFc または $F(ab)_2$ V_H3 を有意に結合させることができず(すなわち、減じたまたは破壊された結合親和性を示し)、またB細胞アポトーシスを刺激しない。

【0111】

SpAの変種は、上記のドメインDにおけるのと同じ、ドメインA、B、C、および/またはEにおける変化を含んでもよいものと企図される。いくつかの態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、ドメインA、B、C、D、およびEの各々における本明細書で記述さ

10

20

30

40

50

れるKKAA変化を有するSpA変種に結合しうる。さらなる態様において、その同じSpA結合ポリペプチドまたは抗体はまた、すべてのドメインにおけるKKAAに代えてのGGSS変化を有する変種に結合しうる。さらに、ある態様において、SpA結合ポリペプチドまたは抗体は、SpAにおけるようにドメインの1つまたは複数に関して改変されている変種Sbi抗原に結合しうる。この一例が図4に示されている。

【0112】

さらに、本明細書において記述されるSpA結合ポリペプチドまたは抗体は、免疫グロブリンのFcもしくはFab領域に対するSpAの結合と競合できうるもの、またはSpAによる免疫グロブリン機能の破壊を妨害しうるものと企図される。また、本明細書において記述されるSpA結合ポリペプチドまたは抗体は、SpAによる免疫グロブリン機能の破壊または免疫グロブリンFcもしくはFab領域とのSpAの結合をかく乱しうるかまたはかく乱できるものと企図される。ある態様において、この特性により、感染を処置するために治療的化合物を用いることが可能になる。さらに、方法は、SpAによる免疫グロブリン機能の破壊または免疫グロブリンFcもしくはFab領域とのSpAの結合を無力化できるSpA結合ポリペプチドまたは抗体を含む。

10

【0113】

毒素非産生性プロテインA変種は、サブユニットワクチンとして用いられ、体液性免疫反応を引き起こし、黄色ブドウ球菌曝露に対する防御免疫を与えうる。野生型全長プロテインAまたは野生型SpA-ドメインDと比べて、SpA-D変種による免疫はプロテインA特異的抗体の増加をもたらした。さらなるSpA変種およびそれを用いるための方法は、ともに参照により本明細書に組み入れられるPCT公報番号WO 2011/005341およびPCT出願番号PCT/US11/42845において提供されている。

20

【0114】

II. タンパク質性組成物

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。非保存的变化は、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

40

【0115】

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。

【0116】

「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種のコドンのような、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(以下の表を参照のこと)。

50

【 0 1 1 7 】

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	GUA GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU

10

【 0 1 1 8 】

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'配列のような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则认为とされる。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'または3'部分のどちらかに隣接する種々の非コード配列を含むことができる。

20

【 0 1 1 9 】

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のような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産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。

30

【 0 1 2 0 】

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、これが今度は、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は容認されている。

40

【 0 1 2 1 】

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関すると述べている。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できると理解される。

【 0 1 2 2 】

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

50

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。

【0123】

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、SpA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。

10

【0124】

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、これらの各々が参照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ヌ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。

20

30

【0125】

1つの態様では、タンパク質の産生および/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、産生されるタンパク質は、タンパク質の産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。

【0126】

ある局面において、免疫原性SpA断片は、断片配列の全長にわたって選択される配列に対し、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または少なくとも97～99%の同一性を、その間の全ての値および範囲を含めて、有するタンパク質の細胞外ドメインの実質的に全てを含む。

40

【0127】

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、SpA)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питープまたは精製タグの供与体のような異種配列、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

50

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。

【0128】

B. 抗体および抗体様分子

ある局面において、SpA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、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。

【0129】

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のような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、単ドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv(一本鎖Fv)のような抗体断片、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VH H(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体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付け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)。

【0130】

「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ピボ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産生される。例えば、Pack et al. (1992); Cumber et al. (1992)を参照されたい。

【0131】

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。

【0132】

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SpA結合分子を作製するために用いられうる。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/または産生、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。

【0133】

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

10

20

30

40

50

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」のような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ボカリン誘導体は、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。

【0134】

例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物などからの毒素のような毒素、および神経型NO合成酵素のタンパク質阻害物質(PIN)に由来する足場も、ある局面において用いられうる。

【0135】

モノクローナル抗体(MAb)にはある特定の利点、例えば、再現性および大量産生が有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。

【0136】

「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そ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。いくつかの態様の抗体を記述するために、親和性として公知の、抗体分子がエピトープを結合させる強さを測定することができる。抗体の親和性は、会合定数(K_a)または解離定数(K_d)を測定することによって判定されうる。ある態様において有用と見なされる抗体は、約、少なくとも約、または多くても約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは 10^{10} M、またはその中で得られる任意の範囲の会合定数を有しうる。同様に、いくつかの態様において、抗体は、約、少なくとも約、または多くても約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、もしくは 10^{-10} M、またはその中で得られる任意の範囲の解離定数を有しうる。これらの値は、本明細書において論じられる抗体について報告されており、同じアッセイ法を用いて、そのような抗体の結合特性を評価することができる。

【0137】

ある態様において、SpAに特異的に結合するポリペプチドは、プロテインAを無力化することができ、かつ/またはブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を促進する。さらに、いくつかの態様において、用いられるポリペプチドは、黄色ブドウ球菌疾患に対する防御免疫を提供することができる。mAb 358A76.1はこれらの態様から除外されることが企図される。

【0138】

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。手短かに言えば、ポリクローナル抗体は、態様にしたがって動物をSpAポリペプチド(例えば、非毒素産生性SpA)またはその一部分で免疫する段階、および免疫した動物から抗血清を採取する段階によって調製される。

【0139】

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

10

20

30

40

50

、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、およびそれら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。

【0140】

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。

【0141】

態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。

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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。

【0145】

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が、あるい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クロマトグラフィー、または例えばプロテインAもしくはプロテインGク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。

【0146】

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

10

20

30

40

50

る技術などの周知の技術を用いることを通し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。

【0147】

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のような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。

10

【0148】

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のような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。実施例において論じられる通り、抗原は、天然に見られる抗原配列と比べて改変されてもよい。いくつかの態様において、変種または改変されたプロテインAペプチドもしくはポリペプチドを使用して、抗体を生成する。ある態様において、SpA変種は、SpAのA、B、C、D、またはEドメインのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、または全5つにおける1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つの変化を有する。

20

【0149】

免疫後、抗体を産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、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。

【0150】

いくつかの態様において、動物のパネルを免疫して、最高の抗体力価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 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個を含有する。

30

【0151】

次に、免疫した動物からの抗体産生Bリンパ球を、不死化骨髓腫細胞、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髓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。

【0152】

当業者に公知である通りに、いくつかの骨髓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、NS0/U、MPC 11、MPC11 X45 GTG 1.7、およびS194/5XX0 Bu1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。骨髓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

【0153】

1つのマウス骨髓腫細胞は、NS-1骨髓腫細胞株(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。用いてもよいもう1つのマウス骨髓腫細胞株は、8

50

アザグアニン耐性マウス骨髓腫SP2/0非産生細胞株である。

【0154】

抗体産生脾臓またはリンパ節細胞と骨髓腫細胞とのハイブリッドを生成するための方法は通常、骨髓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、Geftter et al., (1977)による37%(v/v) PEGのような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。電氣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)。

【0155】

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産生する。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髓腫細胞)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、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンとピリミジンの両方のデノボ合成を遮断するが、アザセリンはプリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキサートを用いる場合、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。

【0156】

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。骨髓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、骨髓腫およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

【0157】

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、ブランクアッセイ法、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。

【0158】

次に、選択されたハイブリドーマを連続希釈して、個々の抗体産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髓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)のような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。血清または腹水のような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。

【0159】

さらに、産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、グルタミンシンターゼおよびDHFR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

10

20

30

40

50

界希釈クローニングおよびマイクロドロップ(Microdrop)技術のような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。

【0160】

いずれかの手段によって産生されたMAbは、必要に応じて過、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のような、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のような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産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

【0161】

同様に、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が企図される。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、コンピナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製して、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回のラウンドで産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

【0162】

別の態様は、例えば、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変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産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、抗体を産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、改変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産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変領域に変換するための改変配列とを含むlox標的化ベクターを細胞に形質移入する。この変換は、改変配列が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、インビボにおいてCreとlox部位を相互作用させることによって行われる。

30

【0163】

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。

【0164】

モノクローナル抗体は、感染症に対する処置であることに関連して、特異性、結合力、半減期、免疫原性、結合性会合、結合解離、または全体的な機能特性に関する特性についてさらにスクリーニングされてもまたは最適化されてもよいことがさらに企図される。したがって、モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、または4C1の、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRのアミノ酸配列における1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上の改変を有しうることが企図される。モノクローナル抗体5A10、8E2、3A6、3F6、1F10、6D11、3D11、5A11、1B10、または4C1の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のVJ領域またはVDJ領域のCDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、またはCDR6の位置番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10におけるアミノ酸は、挿入、欠失、または、保存アミノ酸もしくは非保存アミノ酸による置換を有しうることが企図される。置換されうるかまたは置換を構成しうるそのようなアミノ酸は、上記で開示されている。

40

【0165】

いくつかの態様において、全抗体の断片は、結合抗原の機能を行うことができる。結合

50

断片の例は、(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインで構成されたFab断片；(ii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iii) 単一抗体のVLドメインおよびVHドメインで構成されたFv断片；(iv) VHドメインまたはVLドメインで構成されている、dAb断片(Ward, 1989; McCafferty et al., 1990; Holt et al., 2003)；(v) 単離されたCDR領域；(vi) 連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(vii) VHドメインおよびVLドメインが、この2つのドメインを結合させて抗原結合部位を形成させるペプチドリinkerによって連結されている、一本鎖Fv分子(scFv) (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988)；(viii) 二重特異性一本鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)；ならびに(ix) 遺伝子融合によって構築された多価性または多重特異性断片「ダイアボディ」(WO94/13804; Holliger et al., 1993)である。Fv、scFv、またはダイアボディ分子は、VHドメインおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋の組み入れにより安定化されうる(Reiter et al., 1996)。CH3ドメインにつながれたscFvを含むミニボディも作製されうる(Hu et al. 1996)。この段落中の引用は全て、参照により組み入れられる。

【0166】

抗体はまた、二重特異性抗体を含む。二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる可変領域が同一分子中で組み合わされている第二世代のモノクローナル抗体を形成する(Holliger, P. and Winter, G. 1999 Cancer and metastasis rev. 18:411-419, 1999)。それらの使用は、新たなエフェクター機能を動員するそれらの能力または腫瘍細胞の表面上のいくつかの分子を標的にするそれらの能力から、診断分野および治療分野でともに実証されている。二重特異性抗体が用いられる場合、これらは、従来の二重特異性抗体であり、種々の方法で製造することができ(Holliger et al, PNAS USA 90:6444-6448, 1993)、例えば、化学的にもしくはハイブリッドハイブリドーマから調製することができるか、または、上述の二重特異性抗体断片のいずれかでありうる。これらの抗体は、化学的方法(Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp et al., J. Hemat. 377-382, 1995)または体細胞的方法(Staerz U. D. and Bevan M. J. PNAS 83, 1986; et al., Method Enzymol. 121:210-228, 1986)によって得ることができ、しかし同様にヘテロ二量体化を強制させ、したがって、求められる抗体の精製過程を容易にする遺伝子操作法(Merchand et al. Nature Biotech, 16:677-681, 1998)によって得ることもできる。二重特異性抗体の例としては、BiTE(商標)技術の二重特異性抗体が挙げられ、その技術では異なる特異性を有する2つの抗体の結合ドメインを用いて、短い柔軟なペプチドを介して直接連結することができる。これは、短い単一ポリペプチド鎖上で2つの抗体を組み合わせる。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを用いて、Fc領域を用いずに構築することができ、抗イディオ型反応の影響を減らす可能性がある。この段落中の引用は全て、参照により組み入れられる。

【0167】

二重特異性抗体は、完全IgGとして、二重特異性Fab'2として、Fab'PEGとして、ダイアボディとして、または二重特異性scFvとして構築することができる。さらに、当技術分野において公知の慣用の方法を用いて、2つの二重特異性抗体を連結し、四価抗体を形成することができる。

【0168】

二重特異性ダイアボディはまた、二重特異性全抗体とは対照的に、容易に構築され、大腸菌で発現されうる。特に有用でありうる。適切な結合特異性のダイアボディ(および抗体断片のような多くの他のポリペプチド)は、ファージディスプレイ(WO94/13804)を用いて、ライブラリーから容易に選択することができる。ダイアボディの片腕が一定に保たれ、例えば、SpAに対する特異性を有する場合には、他腕が変動するライブラリーを作製することができ、適切な特異性の抗体を選択することができる。参照により本明細書に組み入れられるRidgewayら(Protein Eng., 9:616-621, 1996)に記述されている、代替的な遺伝子操作方法によって二重特異性全抗体が作製されうる。

【0169】

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、SpA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、抗生物質、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。

【0170】

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。

【0171】

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、種々の免疫測定法のような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ボ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。

【0172】

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)、イットリウム(III)、ガドリニウム(III)、パナジウム(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)のような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線造影のような他の状況において有用なイオンは、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)を含むが、これらに限定されることはなく、特にビスマス(III)が好ましい。

【0173】

治療および/または診断用途のための放射活性同位元素の場合、アスタチン²¹¹、炭素¹⁴、クロム⁵¹、塩素³⁶、コバルト⁵⁷、コバルト⁵⁸、銅⁶⁷、Eu¹⁵²、ガリウム⁶⁷、水素³、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、鉄⁵⁹、リン³²、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、セレン⁷⁵、イオウ³⁵、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く、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のような化学酸化剤またはラクトペルオキシダーゼのような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、 SnCl_2 のような還元剤、フタル

酸ナトリウム-カリウム溶液のような緩衝液、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。

【0174】

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。

10

【0175】

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。好ま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。

20

【0176】

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。

【0177】

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うる。

30

【0178】

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-トルエンスルホンアミド; 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のような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、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸のような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-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)プロピオネートのようなリンカーを用いて抗体に結合させる。

40

【0179】

50

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産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産生するために報告されている。

【0180】

いくつかの態様において、抗SpA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のような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。

【0181】

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、SpAに対する抗体またはそのSpA結合部分をコードするものが含まれる。

【0182】

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、全ゲノム核酸がない状態で単離されているかのどちら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。

【0183】

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)。

【0184】

特定の態様には、SpA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産生されたポリペプチドをいう。

【0185】

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。

10

【0186】

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。

20

【0187】

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、SpAを結合させる抗体を産生するために宿主細胞において用いられてもよい。

30

【0188】

「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か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。

40

【0189】

「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のような、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

50

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な位置および/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用いられなくてもよい。

【0190】

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。

10

【0191】

特異的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。

【0192】

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、Carbone et al., 1999、Levenson et al., 1998、およびCocea, 1997を参照のこと)。

20

【0193】

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にするために、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)。

【0194】

ベクターまたは構築体は一般的に、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参与する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。インピボで、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、ポリアダ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ダニル化を促進することがより好ましい。

30

40

【0195】

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ダニル化を行わせるためにポリアダニル化シグナルを含めることが一般的と考えられる。

【0196】

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。

【0197】

50

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、使用されることができかつ使用されている。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。

10

【0198】

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。

【0199】

C. 発現システム

20

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。

【0200】

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。

30

【0201】

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、発現構築体のような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。

40

【0202】

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5,981,2

50

74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；炭化ケイ素繊維を用いた攪拌(各々が参照により本明細書に組み入れられる、Kaeppler 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。これらのような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。

【0203】

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。

【0204】

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。

【0205】

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、SpA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す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。

【0206】

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産生

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産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。

10

【0207】

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できる。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。

20

【0208】

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。

30

【0209】

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が、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。

【0210】

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。

40

【0211】

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。

【0212】

50

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での経口適用、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。

【0213】

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有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。

10

【0214】

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単離する段階、または組換え抗体を産生する段階を含む、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を対象にする。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。SpA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。

20

【0215】

ポリクローナル抗体の産生のための接種材料は、典型的には、抗原組成物(例えば、SpA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クロマトグラフィーのような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、霊長類、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。

30

【0216】

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。

40

【0217】

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産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よう。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でない場合に特に有用である。

【0218】

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

50

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。

【0219】

B. 併用療法

組成物および関連する方法、特に、SpA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もできる。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、アンピシリン、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。

10

【0220】

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、治療は数分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、有利に組み合わせた効果を対象に及ぼすことができるように、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。

20

【0221】

例えば抗生物質治療を「A」とし、SpA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

30

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

【0222】

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。

【0223】

C. 一般的な薬学的組成物

40

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伴いうる。いくつかの態様において、SpA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。

【0224】

「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

50

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の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のその使用が企図される。他の抗感染剤およびワクチンのような、補助的な活性成分も組成物に組み入れることができる。

【0225】

活性化化合物は、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。

10

【0226】

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。

20

【0227】

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のような無機酸、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のような無機塩基、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。

【0228】

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での使用によってもたらすことができる。

30

40

【0229】

無菌の注射可能な溶液は、必要な量の活性化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。

【0230】

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

50

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。

【0231】

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判定される。「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。

10

【0232】

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。用量に影響する要因には、対象の身体的および臨床的状态、投与経路、意図する処置の目的(症状の緩和対治療)、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。

【0233】

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。

20

【実施例】

【0234】

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。

30

【0235】

実施例1 黄色ブドウ球菌プロテインAに対するモノクローナル抗体

SpA_{KKAA}-mAbはマウスをブドウ球菌疾患から防御する

プライムブースト(prime-booster)レジメを用いて精製SpA_{KKAA}でBALB/cマウスを免疫し、ELISAによって抗原特異的IgG反応を定量化した。動物を安楽死させ、その脾細胞を骨髓腫細胞と融合させた。得られたハイブリドーマを抗原特異的mAbの産生についてスクリーニングした。最初に、機能的アッセイ法およびマウス感染モデルを用いてプロテインA特異的mAbをスクリーニングした(表1)。最初のスクリーニングの後、本発明者らは、さらに特徴付けるのに3つのmAb(5A10、3F6、および3D11)を選択した。というのは、これらの抗体が各アイソタイプ群において最良の免疫防御を呈したからである(表1)。BALB/cマウスを、アフィニティー精製されたmAb(5 mg・kg⁻¹体重)で免疫し、1×10⁷ CFUのメチシリン感受性臨床分離株(MSSA)・黄色ブドウ球菌Newman(Baba et al., 2007)を右眼の眼窩周囲静脈洞に注射することによって曝露した。腎組織において膿瘍をまき散らすブドウ球菌の能力を曝露から4日後に病理組織診断によって調べた(表1)。対照マウス(5 mg・kg⁻¹のアイソタイプ対照mAbで免疫した)のホモジナイズ腎組織において、5.02 log₁₀CFU・g⁻¹ (IgG₁)、4.64 log₁₀CFU・g⁻¹ (IgG_{2a})および5.24 log₁₀CFU・g⁻¹ (IgG_{2b})の平均ブドウ球菌負荷量が回収された(表1)。アイソタイプmAb処置対照と比べて、プロテインA特異的mAbを投与された動物は、ブドウ球菌負荷量の減少[2.80 log₁₀CFU・g⁻¹ (5A10)、2.28 log₁₀CFU・g⁻¹ (3F6)および2.72 log₁₀CFU・g⁻¹ (3D11)]ならびに膿瘍形成の減少を呈した(表1)

40

50

。注目すべきは、これらの抗体がその抗原にかなりの親和性で結合したとしても(例えば表3中の3A6および6D11を参照のこと)、全てのSpA_{KKAA}-mAbがブドウ球菌疾患に対する防御を生じたわけではなかった(表1)。

【 0 2 3 6 】

(表1) SpA_{KKAA}に対するモノクローナル抗体によるマウスの受動免疫

^a 抗体	腎組織におけるブドウ球菌負荷量および膿瘍形成				
	^b log ₁₀ CFU g ⁻¹	^c P値	^d 減少	^e 膿瘍の数	^c P値
IgG ₁					
モック	5.02 ± 0.66	—	—	2.00 ± 0.94	—
5A10	2.22 ± 0.22	0.0019	2.80	0.00 ± 0.00	0.0350
8E2	3.01 ± 0.37	0.0629	2.01	0.20 ± 0.20	0.1117
3A6	3.98 ± 0.47	0.3068	1.04	0.50 ± 0.50	0.1497
7E2	5.01 ± 0.64	0.9396	0.01	2.00 ± 0.99	0.7461
IgG _{2a}					
モック	4.64 ± 0.49	—	—	3.70 ± 1.40	—
3F6	2.36 ± 0.36	0.0010	2.28	0.60 ± 0.50	0.0239
1F10	3.05 ± 0.46	0.0299	1.59	0.70 ± 0.40	0.0812
6D11	3.88 ± 0.75	0.1967	0.76	0.90 ± 0.35	0.1793
IgG _{2b}					
モック	5.24 ± 0.51	—	—	3.00 ± 0.67	—
3D11	2.52 ± 0.40	0.0010	2.72	0.56 ± 0.28	0.0068
5A11	3.26 ± 0.55	0.0171	1.98	0.80 ± 0.55	0.0286
1B10	3.31 ± 0.34	0.0113	1.93	0.50 ± 0.50	0.0070
4C1	3.38 ± 0.50	0.0228	1.86	0.10 ± 0.10	0.0016
2F2	3.49 ± 0.70	0.0232	1.75	0.40 ± 0.27	0.0424
8D4	3.83 ± 0.63	0.1198	1.41	0.80 ± 0.51	0.0283
7D11	4.23 ± 0.55	0.2729	1.01	0.90 ± 0.55	0.0424
2C3	4.24 ± 0.61	0.1733	1.00	1.40 ± 0.60	0.1623
4C5	4.35 ± 0.53	0.2410	0.89	1.90 ± 0.84	0.3270
6B2	4.42 ± 0.62	0.4055	0.82	2.20 ± 1.00	0.3553
4D5	4.96 ± 0.58	0.7912	0.28	3.80 ± 1.26	0.7884
2B8	5.00 ± 0.66	0.8534	0.24	4.60 ± 2.89	0.6184
1H7	5.59 ± 0.43	0.5675	-0.35	2.89 ± 0.73	0.9008

^aアフィニティー精製された抗体を1 × 10⁷ CFUの黄色ブドウ球菌Newmanによる静脈内曝露の4時間前にBALB/cマウスの腹腔へ5 mg kg⁻¹の濃度で注射した。

^b免疫1回あたりBALB/cマウス10匹のコホートにおいて感染から4日後のホモジナイズ腎組織でlog₁₀ CFU g⁻¹として算出されたブドウ球菌負荷量の平均(±SEM)。3回の独立したかつ再現可能な動物実験の代表を示す。

^c統計的有意性を独立両側マンホイットニー検定で算出し、P値を記録した。

^dlog₁₀ CFU g⁻¹として算出された細菌負荷量の減少。

^e動物10匹からヘマトキシリン・エオシン染色して薄切片にした腎臓の組織病理診断; 1つの腎臓あたりの膿瘍数を記録して最終平均(±SEM)を目的に平均化した。

【 0 2 3 7 】

SpA_{KKAA}-mAbはマウスをMRSA曝露から防御する

BALB/cマウスのコホートにmAb 5A10、3F6、3D11(5 mg · kg⁻¹)または全3種のmAbの組み合わせ(15 mg · kg⁻¹)を免疫し、これをMW2株、つまり高病毒性の地域感染型MRSA分離株(Baba et al., 2002)に曝露した。アイソタイプmAb処置対照と比べて、3種のmAb(5A10、3F6、3D11)のいずれか1つを投与された動物は、腎組織における細菌負荷量が減少し、ブドウ球菌膿瘍が少なかった(表2)。全3種のmAbの混合物(15 mg · kg⁻¹)で免疫されていた動物はさらに大きな、ブドウ球菌負荷量の減少(2.03 log₁₀ CFU · g⁻¹の減少; P<0.0002)および膿瘍形成の減少(ワクチン対モック、P<0.0004)を呈した。防御の増強は、増加させた濃度のmAb(15 mg · kg⁻¹対5 mg · kg⁻¹)の投与による可能性が高い。3種の抗体は、類似の構造的特徴を認識するが、SpAの同一の結合部位を占有するものとは考えられないので、本発明者らはこの仮説に到達した(以下参照)。さらに、3種のmAbのうちの1つ(3F6)だけの濃度を増加させることで、同じ効果: ブドウ球菌疾患に対する防御の増大が引き起こされた(以下参照)。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 8 】

ブドウ球菌の曝露に対する即時防御を提供することに加え、SpA_{KKAA}特異的mAbはまた、SpAのB細胞超抗原活性を無力化し(Goodyear and Silverman, 2003)、それによって、感染宿主が多く異なるブドウ球菌抗原に対する抗体反応を生み出すことを可能にする(Kim et al., 2010a)。この可能性について調べるため、BALB/cマウスを、ブドウ球菌MW2による静脈内曝露の前にmAb 3F6またはそのIgG_{2a}アイソタイプ対照(20 mg・kg⁻¹)で受動免疫した。曝露から15日後に、動物を安楽死させ、器官組織におけるブドウ球菌負荷量を調べた(図1A)。mAb 3F6で免疫されていたマウスは、ブドウ球菌負荷量が減少し(4.77 log₁₀ CFU・g⁻¹の減少、P=0.0013)、膿瘍の数が減少した[10.14 (±2.08) (IgG_{2a})から3.00 (±1.00) (3F6)にまで、P=0.0065; 図1A]。曝露から15日後に採血した血液を、ワクチン開発用の防御抗原として検討中の14種のブドウ球菌抗原: Coa, ClfA, ClfB, EsxA, EsxB, FnBPA, FnBPB, Hla, IsdA, IsdB, LukD, SdrD, SpA_{KKAA}、およびvWbp(DeDent et al., 2012)に対して反応性を示す血清中IgGについて調べた。SpA_{KKAA}を能動的にワクチン接種されていた動物で以前に観察された通り、mAb 3F6で免疫されていたマウスは、いくつかの異なるブドウ球菌抗原に対していっそう高い血清中IgG力価を発現した(図1B)(Kim et al., 2010a)。詳細には、Coa, ClfA, EsxA, EsxB, FnBPB, Hla, IsdA, LukD, SdrD、およびvWbpに対するIgGレベルは、対照コホートと比べてmAb 3F6免疫動物の血清試料中で増えていた。それにもかかわらず、IsdB、つまりブドウ球菌ヘモグロビンヘモホアに対する血清中IgG(Mazmanian et al., 2003)は、増えていなかった(図1B)。SpA_{KKAA}に対するIgG力価は、mAb 3F6の受動的移入後の15日間にわたって持続した(図1B)。

【 0 2 3 9 】

ブドウ球菌感染中に、mAb 3F6による可溶性SpAの認識は、免疫細胞によって貪食される免疫複合体(IC)を形成させるものと予想される。貪食されたSpAは次いで、ファゴリソソーム中のタンパク質分解酵素によりプロセッシングされ、ペプチド断片がTおよびB細胞に提示されて、ポリクローナル抗体を産生する。確認試験として、コホートの動物に、0日目および11日目の時点でmAb 3F6またはそのアイソタイプ対照の存在下、アフィニティー精製された組換えプロテインA変種[SpA, SpA_{KK}, SpA_{AA}, SpA_{KKAA}、およびモック(PBS)]の混合物を投与した。21日目の時点で、動物を安楽死させ、異なるクラスのSpA特異的抗体を誘発するその能力をELISAによって測定した。全ての動物は、mAb処置なしにSpA特異的抗体反応を生ずることができなかった(図6)。さらに、B細胞超抗原(SpAおよびSpA_{KK}; 以下参照)を投与された動物は、mAb 3F6の存在下でさえもSpA特異的IgG₁およびIgG_{2a}抗体を生ずることができなかった(図6)。しかしながら、B細胞超抗原活性を欠くSpA変種(SpA_{AA}およびSpA_{KKAA}; 以下参照)で処置されたマウスは、かなりの量のIgG₁を生ずることができた(図6)。感染中の可溶性プロテインAの推定量(10⁷ CFUあたり5~10 ng)は、これらの実験中に動物へ注射されたアフィニティー精製プロテインAの用量をかなり下回るが、図6中のデータから、B細胞超抗原活性の無力化におけるSpA特異的T/B細胞の潜在的な役割が示唆される。まとめると、本発明者らは、SpA_{KKAA}による能動ワクチン接種(Kim et al., 2010a)によって、かなりの量のプロテインA特異的抗体を産生させられるが、無力化用mAbによる黄色ブドウ球菌感染マウスの受動免疫化(以下参照)によっては、産生させられないと推測する。

【 0 2 4 0 】

(表2) SpA_{KKAA}-mAbによる免疫はマウスをMRSA曝露から防御する

抗体	腎組織におけるブドウ球菌負荷量および膿瘍形成				
	^b log ₁₀ CFU g ⁻¹	^c P 値	^c 減少	^c 膿瘍の数	^c P 値
<i>IgG₁</i>					
モック	7.42 ± 0.20	—	—	22.3 ± 6.3	—
5A10	6.00 ± 0.21	0.0009	1.42	10.2 ± 2.5	0.0482
<i>IgG_{2a}</i>					
モック	7.15 ± 0.18	—	—	11.8 ± 2.0	—
3F6	5.80 ± 0.21	0.0009	1.35	6.4 ± 0.7	0.0323
<i>IgG_{2b}</i>					
モック	7.13 ± 0.11	—	—	14.0 ± 1.8	—
3D11	5.81 ± 0.25	0.0006	1.32	7.7 ± 1.9	0.0489
<i>IgG₁+IgG_{2a}+IgG_{2b}</i>					
モック	7.75 ± 0.06	—	—	17.4 ± 1.7	—
5A10/3F6/3D11	5.72 ± 0.12	0.0002	2.03	6.7 ± 0.6	0.0004

^a 1×10^7 CFUの黄色ブドウ球菌MW2による静脈内曝露の24時間前にBALB/cマウスの腹腔へ別個の抗体の濃度5 mg · kg⁻¹または3種のものクロール抗体の組み合わせの濃度15 mg · kg⁻¹でアフィニティー精製された抗体を注射した。

^b 検出限界を1.99 log₁₀ CFU · g⁻¹とし免疫1回あたりBALB/cマウス10匹のコホートにおいて感染から4日後のホモジナイズ腎組織でlog₁₀ CFU · g⁻¹として算出されたブドウ球菌負荷量の平均(±SEM)。2回の独立したかつ再現可能な動物実験の代表を示す。

^c 統計的有意性を両側マンホイットニー検定で算出し、P値を記録した。

^d log₁₀ CFU · g⁻¹として算出された細菌負荷量における減少。

^e 動物10匹からヘマトキシリン・エオシン染色して薄切片にした腎臓の組織病理診断；1つの腎臓あたりの膿瘍数を記録して最終平均(±SEM)を目的に平均化した。

【 0 2 4 1 】

mAb Spa27はSpA_{KKAA}を認識せずマウスにおいて防御免疫を誘発することができない

Spa27は、ブドウ球菌プロテインAの検出用に過去20年間にわたって用いられている市販のプロテインA特異的モノクローナル抗体(Sigma)である(Perry et al., 2002)。Spa27ハイブリドーマは、黄色ブドウ球菌株Cowan Iから精製された野生型ブドウ球菌プロテインAで免疫されたマウスから作製された(Sjoquist et al., 1972)。過去の研究から、野生型プロテインAがB細胞集団のクローン性増殖および崩壊をもたらす(Forsgren et al., 1976, Goodyear et al., 2003)、その結果、マウスにおいてプロテインA特異的免疫反応を取り除くこと(Goodyear et al., 2004)、ならびに野生型プロテインAがFc とFab V_H3の両方に対する結合部位を包含すること(Graille et al., 2000, Stahlenheim et al., 1970)が実証された。本発明者らはそれゆえ、Spa27が野生型プロテインAを抗原として認識するかどうか疑問を感じた。この疑問に対処するため、本発明者らは、精製された組換えプロテインA(SpA)、またはFc を特異的に結合させる能力を欠くその変種(SpA_{KK})、V_H3のFabドメインを特異的に結合する能力を欠くその変種(SpA_{AA})もしくはその両方を欠くその変種(SpA_{KKAA})によるELISAを用いた(図7)。データから、Spa27が強力に、野生型SpAおよびSpA_{KK}に結合するが、しかしSpA_{AA}またはSpA_{KKAA}に結合しないことが明らかにされた(図9B)。Spa27はマウスIgG₁アイソタイプ抗体であり、これはFc を介してプロテインAを結合させるその能力がないことを説明するものである(Kronvall et al., 1970)。Spa27とSpA_{AA}またはSpA_{KKAA}との間の弱い結合は、Spa27が抗原認識のために5つのIgBDの各々において残基D36/D37を要するという、または、本発明者らにとってもっと可能性が高そうなのは、Spa27がそのFabドメインを介してSpAを結合させるという一見ありそうにないことに起因する可能性があり、同抗体がV_H3または関連した抗体クラスに属すると仮定した。

【 0 2 4 2 】

本発明者らは、一対比較のためにmAb 3F6またはSpa27(5 mg · kg⁻¹)をBALB/cマウスの腹腔へ注射することによりSpa27の生物学的機能について調べた。これらの動物を次に、黄色ブドウ球菌USA300(LAC)、つまり米国において流行している高病毒性の地域感染型MRSA

株(Diep et al., 2006)に曝露した。曝露後4日の時点で、動物を安楽死させ、感染動物の腎臓における細菌負荷量を判定した(図9B)。モック(PBS)処置と比べて、mAb 3F6を投与された動物は、細菌負荷量を減少させた($1.38 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ の減少、 $P=0.0011$)。3F6によって誘発された防御免疫とは対照的に、mAb Spa27は、感染動物の腎臓における細菌負荷量を減少させることができなかった($0.20 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ の減少、 $P=0.2111$)。これらのデータは、mAb Spa27がブドウ球菌疾患に対する防御を提供しないことを明らかにしている。さらに、Spa27を用いた実験は、野生型プロテインAによるマウスの免疫が、抗原としてこの分子を結合させることによりプロテインAの免疫調節特性を無力化できるモノクローナル抗体を誘発しえないことを例証している。

【0243】

mAbによるSpA_{KKAA}の認識

マイクロタイターディッシュをSpA_{KKAA}でコーティングし、ELISAを用いて精製mAbの親和性定数($K_a = [\text{mAb} \cdot \text{Ag}] / [\text{mAb}] \times [\text{Ag}]$)を判定した。mAb 3F6が最も高い親和性($K_a \ 22.97 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)を示し、その後にmAb 5A10($K_a \ 8.47 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)およびmAb 3D11($K_a \ 3.93 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、表3)が続いた。5つのIgBD単独の各々(E_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、 A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、および C_{KKAA})またはIgBD E_{KKAA} ドメインのヘリックス1、2もしくは3ならびにヘリックス1+2および2+3を包含するペプチドを抗体結合について調べた(表3)。mAb 5A10および3F6は、SpA_{KKAA}と同じ親和性で全5つのIgBDを結合した。mAb 5A10はヘリックスペプチドに結合しなかったが、mAb 3F6はヘリックス1+2ペプチドに対して弱い親和性を示した。mAb 3D11は B_{KKAA} および C_{KKAA} に結合し、 A_{KKAA} に弱く結合したが、しかし E_{KKAA} および D_{KKAA} に結合しなかった。要するに、マウスにおいてブドウ球菌疾患に対する最も高いレベルの防御を与えたSpA_{KKAA}-mAbは、5つのIgBDの一部または全部を結合したが、しかしIgBDの3つのヘリックスのうちの1つのみまたは2つを包含するペプチドを結合しなかった。これらのデータから、防御mAbは、各IgBDの3本鎖ヘリックスバンドルの立体構造エピトープを認識することが示唆される。

【0244】

mAbの結合力が免疫防御において重要な役割を果たすかどうか調べるため、漸増濃度のカオトロピック試薬チオシアン酸アンモニウム存在下でELISAを行った(図2)。測定されたmAb 3F6結合力は、mAb 5A10および3D11のそれよりもかなり高かった(図2)。注目すべきは、3D11が比較的低い結合力を示したが、これは、5つのIgBDのうちの2つだけとの、その特異的相互作用によるものでありうる(図2および表3)。このことから、本発明者らは、mAbの結合力がマウスでのその免疫防御の主な決定因子ではない可能性があるものと結論付ける。

【0245】

米国特許出願公報US 2008/0118937およびUS 2010/0047252には、野生型プロテインAの免疫後のマウスから得られたマウスハイブリドーマ細胞株が記述されている。対応する抗体mAb 358A76.1.1は、野生型プロテインAと結合することが報告された；しかし、この結合の分子的性状は未だ明らかにされていない。野生型プロテインAに対するB細胞反応の性状をさらに探索するため、mAb 358A76.1.1を単離し、その機能的特性について調べた。SpA_{KKAA}-mAbとは異なり、358A76.1抗体はSpAのエドメインにのみ結合したが、その他4つのIgBD(D 、 A 、 B 、および C)のいずれにも結合しなかった。さらに、mAb 358A76.1はプロテインAを無力化することも、ブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を促進することもせず、mAb 358A76.1の受動的移入は、マウスを黄色ブドウ球菌疾患から防御しなかった。

【0246】

モノクローナル抗体358A76.1はSpAのエドメインのみに弱く結合する

プロテインAとの結合に対するmAb 358A76.1の親和性定数($K_a = [\text{mAb} \cdot \text{Ag}] / [\text{mAb}] \times [\text{Ag}]$)を判定するため、マイクロタイタープレートにSpA_{KKAA}、個々のIgBD(E_{KKAA} 、 D_{KKAA} 、 A_{KKAA} 、 B_{KKAA} 、または C_{KKAA})、ならびに E_{KKAA} 3本鎖ヘリックスバンドルの個々のヘリックス($H1$ 、 $H2$ 、および $H3$)または2つのヘリックス($H1+2$ および $H2+3$)を包含する合成ペプチドのいずれかでコーティングした。mAb 3F6は、全長SpA_{KKAA}($K_a \ 22.97 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)および5つのIg

10

20

30

40

50

BDの各々(K_a $12.41 \sim 27.46 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)に対して高い親和性を有するSpA_{KKAA}由来のマウスモノクローナル抗体である。mAb 3F6と比べて、mAb 358A76.1はSpA_{KKAA}に対してはるかに弱い親和性(K_a $1.00 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、図10A~B)を示した。注目すべきは、mAb 358A76.1はE_{KKAA}A(K_a $0.21 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)にのみ結合したが、その他4つのIgBD(D_{KKAA}、A_{KKAA}、B_{KKAA}、またはC_{KKAA}、表6)のいずれにも結合しなかった。さらに、mAb 358A76.1は、E_{KKAA} IgBDの1つまたは2つのヘリックス(H1、H2、H3、H1+2、およびH2+3)を包含する合成ペプチドのいずれも認識しなかった。対照的に、mAb 3F6はヘリックス1+2ペプチドに対して弱い親和性を示した(表6)。全5つのIgBDのアミノ酸配列のアライメントから、Eドメインが最も似ていないドメインであることが明らかにされた(Sjodahl, 1977)。それにもかかわらず、Eドメインは、その他4つのIgBDと同様に、ヒトおよび動物免疫グロブリンと結合し、その非類似性の意義は未だ理解されていない(Moks et al., 1986)(図10C~D)。mAb 358A76.1は、Eドメインのヘリックス1および3の非保存アミノ酸を伴う立体構造エピトープを特異的に結合させることが可能である(図10C~D)。

【0247】

mAb 3F6および358A76.1がSpA_{KKAA}上のエピトープ結合部位(E_{KKAA})を共有するかどうか調べるため、本発明者らは、漸増濃度のIgG_{2a}アイソタイプ対照、mAb 358A76.1またはmAb 3F6を用いて競合的ELISAを行った。30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で、アイソタイプ対照抗体(IgG_{2a})はSpA_{KKAA}とのHRP結合mAb 358A76.1またはmAb 3F6の結合を妨げなかった(図10E)。予想通り、mAb 358A76.1はSpA_{KKAA}との結合についてHRP結合mAb 358A76.1と競合したが、しかしHRP結合mAb 3F6の結合を妨げなかった(図10E)。注目すべきは、mAb 3F6はSpA_{KKAA}とのHRP結合mAb 358A76.1の結合を完全に遮断することができた(96.4%の阻害、図10E)が、mAb 358A76.1は88.0%の阻害しか生じなかった(mAb 3F6対mAb 358A76.1、 $P=0.0007$)。

【0248】

モノクローナル抗体358A76.1はマウスにおいて防御免疫を誘発しない

コホートのBALB/cマウスに5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ のmAb 358A76.1またはmAb 3F6を、その腹腔内腔へ注射した。受動的に免疫された動物に黄色ブドウ球菌USA300(LAC)、つまり米国において流行している高毒性の地域感染型MRSA株(Diep et al., 2006, Kennedy et al., 2008)に曝露した。IgG_{2a}アイソタイプmAb処置対照と比べて、mAb 3F6を投与された動物は、腎組織における細菌負荷量を減少させていた($1.26 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ の減少; $P=0.0021$ 、図11A)。興味深いことに、mAb 358A76.1を投与された動物は、細菌負荷量のほんのわずかな減少しか示さず、これは統計的有意性を達成することができなかった($0.42 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ の減少; $P=0.0948$ 、図11A)。mAb 358A76.1と比べて、mAb 3F6の受動的移入は免疫マウスにおいてCA-MRSA株USA300に対する防御の増大を生じた($0.84 \log_{10} \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ の減少; $P=0.0011$ 、図11A)。

【0249】

侵襲性微生物のオプソニン作用性の死滅は、感染宿主の重要な防衛戦略であり、多くの異なる細菌ワクチンに関する防御免疫に相互に関連あるものの1つにも当たる(Robbins et al., 1987, Robbins et al., 1990)。新鮮マウス血液におけるオプソニン作用性の死滅のアッセイ法を用いて、本発明者らは、mAb 358A76.1がMRSA株USA300のオプソニン作用性の死滅を促進しうるかどうかが問いかけた。手短に言えば、未処置6週齢BALB/cマウスから得た抗凝固処理血液を10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のmAb 358A76.1、mAb 3F6またはmAb IgG_{2a}アイソタイプ対照の存在下または非存在下において黄色ブドウ球菌USA300とともにインキュベートした。血液試料を溶解させ、寒天培地上にプレーティングし、ブドウ球菌負荷量を数え上げた。血液中のブドウ球菌負荷量を49%減少させたmAb 3F6とは対照的に、mAb 358A76.1およびIgG_{2a}対照はブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を活性化することができなかった(mAb 3F6対PBS、 $P<0.0001$; mAb 3F6対358A76.1、 $P=0.0007$; 図11B)。

【0250】

感染中に、プロテインAは免疫グロブリンでブドウ球菌の表面を捕捉および装飾する。免疫グロブリンのFcドメインと結合することにより、SpAは、補体活性化、Fc受容体の関与および食細胞によるブドウ球菌のオプソニン作用を遮断する。さらに、細菌表面から

10

20

30

40

50

放出されるSpA分子は、V_H3型B細胞受容体を架橋してリンパ球を活性化し、最終的にはそのアポトーシス死をもたらし、ブドウ球菌に対する適応免疫反応の発現を妨げる。本発明者らはELISAを用いて、mAb 358A76.1がプロテインAの免疫グロブリン結合活性を無力化しうかどうか判定した。対照として、6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ および30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ で、mAb 3F6はヒトIgG結合を結合させるプロテインAの能力を無力化したが、IgG2aアイソタイプ対照mAbはそうではなかった(図11C)。さらに、6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ または30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で、mAb 358A76.1はプロテインAとのヒトIgGの結合を遮断しなかった(図11C)。

【0251】

(表3) SpA_{KKAA}およびその断片とのmAbの結合に関する結合定数

抗体	結合定数 (nM ⁻¹)										
	SpA _{KK}	SpA IgG 結合ドメイン					SpA-Eのヘリックスモチーフ				
	AA	E	D	A	B	C	H1	H2	H3	H1+2	H-2+3
IgG ₁											
5A10	8.47	9.40	8.19	8.08	7.03	10.12	<	<	<	<	<
8E2	1.56	1.40	1.51	1.52	1.14	1.26	<	<	<	0.29	<
3A6	1.37	1.38	<	2.05	0.64	0.04	0.06	<	0.01	0.44	<
7E2	0.31	0.29	0.30	0.36	0.32	0.28	<	<	<	<	<
IgG _{2a}											
3F6	22.97	17.69	12.41	20.15	27.46	26.46	<	0.01	<	0.41	0.01
1F10	2.46	2.21	1.80	2.12	2.85	2.70	<	<	<	0.63	<
6D11	5.37	4.34	2.42	2.23	3.34	4.75	0.27	0.01	<	5.22	0.00
IgG _{2b}											
3D11	3.93	<	<	0.87	3.92	3.60	0.02	<	<	<	<
5A11	8.75	5.10	5.75	6.61	5.03	6.04	<	<	<	0.02	<
1B10	4.31	4.35	2.78	2.74	2.30	4.21	<	<	<	<	0.01
4C1	4.68	2.38	2.56	3.02	3.21	2.99	0.07	0.01	0.01	1.95	0.04
2F2	1.90	1.72	1.76	1.37	1.13	1.8	<	<	<	<	<
8D4	10.47	7.65	9.85	11.94	0.07	<	3.20	<	<	4.88	<
7D11	5.46	3.14	3.51	4.15	4.62	6.02	<	<	<	<	<
2C3	6.84	5.35	3.41	4.25	3.90	6.33	<	<	<	<	<
4C5	4.42	<	1.76	4.57	1.8	2.11	<	<	<	<	<
6B2	4.47	3.2	2.52	4.19	4.55	4.23	0.05	0.23	<	4.54	<
4D5	6.17	<	<	5.30	4.89	5.24	<	<	<	<	<
2B8	4.79	2.33	2.25	3.05	3.68	3.06	<	0.23	<	3.37	<
1H7	2.86	2.42	2.17	2.37	2.57	4.43	<	<	<	<	<

^aアフィニティー精製された抗体(1 mg ml⁻¹)を同族抗原(100 nM)でコーティングされたELISAプレート全体にわたって連続希釈して、Prism(GraphPad Software, Inc.)により結合定数を測定した。

【0252】

(表6) SpA_{KKAA}およびその断片とのmAb 358A76および3F6の結合に関する結合定数

mAb	抗原または抗原断片の結合定数 ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)										
	SpA _{KKAA}	プロテインAのIgG結合ドメイン					E _{KKAA} 3本鎖ヘリックスバンドルのセグメント				
		E _{KKAA}	D _{KKAA}	A _{KKAA}	B _{KKAA}	C _{KKAA}	H1	H2	H3	H1+2	H2+3
IgG _{2a}											
358A76	1.00	0.21	<	<	<	<	<	<	<	<	<
3F6	22.97	17.69	12.41	20.15	27.46	26.46	<	0.01	<	0.41	0.01

^aアフィニティー精製された抗体(100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)を抗原(SpA_{KKAA}の場合20 nMおよびIgG結合ドメインの場合100 nM)でコーティングされたELISAプレートの全体にわたって連続希釈して、Prism(登録商標)(GraphPad Software, Inc.)を用いて結合定数を算出した。プロテインA抗原との抗体の結合について調べるため、本発明者らは、プロテインA [E (残基番号1~56)、D (残基番号57~117)、A (残基番号118~175)、B (残基番号176~233)、およびC (残基番号234~291)]の5つの免疫グロブリン結合ドメイン(IgBD)の各々において4つのアミノ酸置換を有するSpA_{KKAA}変種(6つのN末端ヒスチジル残基を持つ成熟SpAの残基番号1~291)を用いた。各IgBDにおいて、位置番号9および10のグルタミン(IgBD-E由来のアミノ酸残基)をリジンと置き換え(Q⁹K、Q¹⁰K)、アスパラギン酸36および37をアラニンと置き換えた(D³⁶A、D³⁷A)。同じ置換を個々のIgBD: E_{KKAA}、D_{KKAA}、A_{KKAA}、B_{KKAA}、およびC_{KKAA}に及ぶタンパク質(全てN末端6ヒスチジルタグとともに発現され、N末端6ヒスチジルタグで精製された)の中に導入した。SpA_{KKAA}および個々のIgBDを大腸菌抽出物からアフィ

ニティークロマトグラフィーによって精製した。ペプチドH1、H2、H3、H1+2、およびH2+3は、ペプチド合成機において合成され、HPLCにより精製された。これらのペプチドは、E_{K_{KAA}} IgBDの3本鎖ヘリックスバンドル(SpA_{K_{KAA}}の残基番号1~56: NH₂-AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSPQPK-COOH)のヘリックス1 (H1: NH₂-AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNA-COOH)、2 (H2: NH₂-NMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQ-COOH)、3 (H3: NH₂-AAPSQSANVLGEAQKLNDSPQPK-COOH)、1+2 (H1+2: NH₂-AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQ-COOH)、または2+3 (H2+3: NH₂-NMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSPQPK-COOH)を包含する。^b記号<は、低すぎるため結合定数の判定が可能ではなかった測定値を示す。

【0253】

mAb 3F6はSbiを結合させる

黄色ブドウ球菌の分泌タンパク質Sbiは、5つの異なるドメインから構成される(Zhang et al., 1998)。2つのN末端ドメイン(1および2)は、SpAのIgBDと相同である(Zhang et al., 1999)。ドメイン3および4は補体成分C3およびH因子と結合し、C末端ドメインは、リボタイコ酸に結合することによってブドウ球菌エンベロープ中に一部の分泌Sbi分子を保持することが提唱されている(Burman et al., 2008, Smith et al., 2012)。ドメイン1および2は免疫グロブリンのFc 部分に結合する(Atkins et al., 2008); この活性は、ドメイン3および4のC3およびH因子結合特性と協調して、液中補体成分の無駄な消費を促進する(Haupt et al., 2008)。Sbiは、その2つのIgBD(ドメイン1および2)が位置番号36および37の基準となる2つのアスパラギン酸残基を欠くので、B細胞超抗原活性を発揮するとは考えられない(Graille et al., 2000, Lim et al. 2011)。IgBDと補体結合ドメインの両方を包含する組換えタンパク質His-Sbi_{1~4}は、アフィニティークロマトグラフィー実験においてヒトIgGを保持した。His-Sbi_{1~4/K_{KAA}}は、ドメイン1および2における保存されたグルタミン残基(Q^{51,52}およびQ^{103,104})、すなわちSbi IgBDの予測されるFc 結合部位のリジン(K)置換、ならびに補体結合ドメインのアルギニン(R²³¹)およびアスパラギン酸(D²³⁸)残基のアラニン(A)置換を有する変種である(Haupt et al., 2008)。His-Sbi_{1~4/K_{KAA}}はアフィニティークロマトグラフィー中にヒトIgGを保持しなかった。ELISAによって調べた場合、His-Sbi_{1~4}はマウスおよびヒトIgGに結合し、ヒトIgGのFcとFabドメインの両方に結合したが、His-Sbi_{1~4/K_{KAA}}は結合しなかった。mAb 5A10および3D11はHis-Sbi_{1~4/K_{KAA}}に結合しなかったが、3F6はそのタンパク質に結合した。したがって、mAb 3F6はSbiを無力化しうるか、または循環血中から分泌Sbiを除去し、それによってブドウ球菌による補体因子C3の消費を阻止しうる。

【0254】

SpA_{K_{KAA}}-mAbによる結合部位競合実験。ELISA試験により、3種のmAb 5A10、3F6、および3D11が野生型SpAに類似の親和性で結合することが明らかにされた(図3A)。5A10と比べて、IgG₁対照抗体はSpAに対してわずかな親和性を示した。さらに、IgG_{2b}対照抗体の親和性は、mAb 3D11のそれと比べて減少した。3F6と比べて、IgG_{2a}対照抗体はわずかに減少した親和性でSpAを結合した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合mAb(5A10-HRP、3F6-HRP、および3D11-HRP)による競合ELISAアッセイ法において、アイソタイプ対照抗体は、SpAとのHRP結合mAbの結合を妨げなかった(図3B)。等モル量の各mAbの添加によって、対応するHRP結合体の結合が減少した(図3B)。mAb 3D11はHRP-5A10またはHRP-3F6とSpAとの結合を阻止しなかったが、しかしmAb 5A10および3F6はSpAとのHRP-3D11の結合を妨げた。mAb 3F6はSpAとのHRP-5A10の結合のいくらかの減少を引き起こした(図3B)。最後に、mAb 5A10はSpAとの3F6-HRPの結合に対する弱い競合相手であった(図3B)。これらのデータから、SpAの3本鎖ヘリックスバンドルの表面上の3種のmAbに対する結合部位が互いにごく接近しているか、または部分的に重複さえしている可能性があることが示唆される(表3)。

【0255】

SpA_{K_{KAA}}-mAbは免疫グロブリンとプロテインAとの結合を阻止する

V_H3族に関連するファミリーのマウス抗体(例えば7183、J606、およびS107)は、そのFab部分を介してSpAを結合させるが、他のVHファミリーのもの(J558、Q52、Sm7、VH10、VH11、およびVH12)は結合しない(Cary et al., 1999)。SpA_{K_{KAA}}特異的mAbの相補性決定領域(CD

10

20

30

40

50

R)のアミノ酸配列は、ハイブリドーマ転写産物に由来するcDNAを配列決定することによって決定された。このデータから、mAb 5A10がV_H3族7183ファミリーに属することが示された；そのFabドメインはSpAに対する親和性を示す可能性が高い(表4)。mAb 3F6および3D11は、それぞれ、VH10およびJ558ファミリーの成員であり(表4)；これらの抗体ファミリーのFabドメインが、SpAと結合することは知られていない。

【0256】

(表4) モノクローナル抗体のCDR領域のアミノ酸配列

^a mAb	プロテインA特異的モノクローナル抗体のアミノ酸配列決定データ			
	マウスVHファミリー	CDR1	CDR2	CDR3
5A10	7183	...SSVSY...	...DTS...	...QQWSSYPPT...
3F6	V _H 10	...ESVEYSGASL...	...AAS...	...QQSRKVPST...
3D11	J558	...SSVSY...	...EIS...	...QQWSYPPT...

^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由来の増幅されたPCR産物を、IMGT Vquestを用いて配列決定および分析した。

【0257】

野生型SpAならびにその変種SpA_{KKAA}、SpA_{KK}、およびSpA_{AA}を精製し、ヒトIgGによるELISA結合試験に用いた。予想通り、SpAはIgGまたはそのFc およびF(ab)₂断片に結合したが、SpA_{KKAA}は結合しなかった(図7)。SpA_{KK}変種(全10個のグルタミン残基の位置にリジン置換を持つ)は、F(ab)₂断片ではなくFc断片を結合させるその能力が損なわれていたのに対し、SpA_{AA}変種(全10個のアスパラギン酸残基の位置にアラニン置換を持つ)はFcに結合したが、F(ab)₂に結合しなかった(図7)。SpAとのヒトIgGの結合は、アイソタイプ対照mAbの競合を上回る形で全3種のmAb(5A10、3F6、および3D11)によって遮断された(図4A)。全3種の抗体はヒトIgGの、SpA_{KK}との結合(Fab結合)またはSpA_{AA}との結合(Fab結合)を妨げた(図4A)。したがって、SpA_{KKAA}特異的mAbはSpAと免疫グロブリンとの非免疫結合を阻止する。これらのデータに基づき、本発明者らは、プロテインA特異的mAbが、IgBDのヘリックス2を伴う立体構造エピトープ、つまりSpAのFc およびFab相互作用に關与する構造要素と相互作用するものと推測する。

【0258】

mAb 3F6が野生型SpAをブドウ球菌表面の抗原として結合させるなら、そのFc ドメインは免疫細胞の表面上のFc受容体または補体による認識のために使用可能でなければならぬ。この予測を検証するため、黄色ブドウ球菌を3F6、そのアイソタイプ対照およびアフィニティー精製Sbi₁₋₄とともにインキュベートした。抗体を介した共沈降によって上清からの可溶性Sbi₁₋₄の枯渇を引き起こし、これを細菌表面のFc 部位の利用可能性の指標として分析した。非免疫的な形でSpAと結合することしかできない、対照mAbとのブドウ球菌のインキュベーションによっては、可溶性Sbi₁₋₄の比較的小さい減少が引き起こされた(図4B)。対照的に、mAb 3F6とのブドウ球菌のインキュベーションにより可溶性Sbi₁₋₄が枯渇され、mAb 3F6はSbi₁₋₄との結合のためにそのFc ドメインを提示しつつ、細菌表面のSpA抗原を結合することが示唆された(図4B)。

【0259】

SpAとのmAb 3F6の結合がインビボで本当に起きるかどうか調べるため、BALB/cマウスにmAb 3F6またはアイソタイプ対照抗体を免疫した。腹腔への精製SpAの注射の後、次の30分間にわたって血液をサンプリングすることにより、循環血中のその存在量を評価した。対照mAbで処置された動物と比べて、mAb 3F6注射により処置された動物は、血流からのSpAのクリアランスの加速を引き起こした(図4C)。mAb 3F6によるSpAの免疫認識によってそのFc ドメインが提供され、Fc受容体を介した、血流からの抗原-抗体複合体の除去が媒介されるものと推定される。

【0260】

SpA_{KKAA}-mAbはヒトおよびマウスの血液中のブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を促進する

病原菌のオプソニン作用性の死滅を促進する適応免疫反応の誘発は、ワクチン開発およ

び許認可に向けた普遍的目標である(Robbins et al., 1996)。これは黄色ブドウ球菌では達成されておらず、というのは、この病原菌は、その表面に露出されたおよび分泌されたSpA分子およびSbi分子によりオプソニン抗体に対して武装しているからである(Kim et al., 2011)。SpA_{KKAA}-mAbがオプソニン化貪食作用を促進しうかどうか調べるため、Rebecca Lancefieldにより開発された新鮮血中での細菌死滅のアッセイ法を使用した(Lancefield, 1928)。未処置6週齢BALB/cマウス由来のレピルジン抗凝固処理血液を $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のmAb 5A10、3F6、および3D11またはそのアイソタイプ対照の存在下または非存在下においてMSSA株Newmanとともにインキュベートした。血液試料を溶解させ、寒天培地上にプレーティングし、ブドウ球菌負荷量を数え上げた(図5A)。全3種のmAbともブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅をもたらし、これは接種材料(3D11, $P=0.0025$)の37%から33% (3F6, $P=0.0478$)および16% (5A10, $P=0.0280$)にまで及んだ。ヒト血液中的のブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅についての試験として、本発明者らは、健常ヒト志願者を募集し、SpA_{KKAA}に特異的な抗体についてその血清を調べた。以前に報告されている通り、志願者の誰もがプロテインAに対する血清抗体を持っていなかった(データは示されていない)(Kim et al., 2010a)。抗凝固処理された新鮮ヒト血液試料を $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のmAb 5A10、3F6、および3D11またはそのアイソタイプ対照の存在下または非存在下においてMRSA株USA400 (MW2)とともにインキュベートした(図5B)。全3種のmAbともブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅をもたらし、これは接種材料(3D11, $P=0.0002$)の52%から44% (3F6, $P=0.0001$)および34% (5A10, $P=0.0035$)にまで及んだ。血液試料をスライドガラス上に広げ、ギムザで染色し、顕微鏡検査によって分析した。mAb 5A10、3F6、および3D11の存在下においてインキュベートされた血液試料には、好中球と結び付いていたブドウ球菌があったが、すなわち、それらのブドウ球菌はこれらの白血球と結び付いているか、または細胞内に位置している可能性がある(図5C~E)。アイソタイプ対照mAbとともにインキュベートされた血液試料には、細胞外ブドウ球菌のクラスター(赤矢印)および白血球と結び付いていたブドウ球菌(青矢印、(図5F~H)があった。

【0261】

考察

モノクローナル抗体は、微生物表面産物に対するヒト適応免疫反応の生物学的特性を調べるまたとない機会を提供し、微生物免疫回避の分子的性状と防御免疫の分子的性状の両方を明らかにする(Fischetti, 1989)。例えば、A群ブドウ球菌Mタンパク質、つまり重要な病毒性因子かつヘリックスコイルドコイル表面タンパク質(Phillips et al., 1981)は、オプソニン作用性のクリアランスに対する耐性を付与するが、これは感染中の体液性適応免疫反応によって克服されうる(Lancefield, 1962; Scott et al., 1986)。Mタンパク質のヘリックスコイルドコイルに結合するmAbは、A群ブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅を誘導することができないが、これは、しかしながら、N末端のランダムコイルドメインに対して作製されたmAbによって達成される(Jones and Fischetti, 1988; Jones et al., 1986)。Mタンパク質のN末端ドメインは、臨床分離株の間でかなりばらつきがあり、これはタイプ特異的な免疫の分子基盤を表す(Hollingshead et al., 1987; Lancefield, 1962)。

【0262】

ブドウ球菌Mタンパク質と同様に、プロテインAはまた、黄色ブドウ球菌の防御抗原として機能する(Stranger-Jones et al., 2006)。黄色ブドウ球菌の実質的に全ての臨床分離株がプロテインAを発現するが、しかし、そのIgBDのアミノ酸配列は高度に保存されている(McCarthy and Lindsay, 2010)。マウスまたはヒトでのブドウ球菌感染は、プロテインA特異的な体液性免疫反応を誘発せず(Kim et al., 2010a)、これはこの分子のB細胞超抗原活性によって説明される(Silverman and Goodyear, 2006)。プロテインA変種、詳細にはSpA_{KKAA}分子による免疫は、マウスおよびウサギにおいて体液性免疫反応を誘発し、これらの抗体は野生型プロテインAと交差反応し、マウスにおいてブドウ球菌疾患に対する防御を提供する(Kim et al., 2010a)。アフィニティー精製されたポリクローナルウサギ抗体は、マウスにおいて野生型プロテインAのB細胞超抗原活性を遮断することができ、抗

凝固処理マウス血液中でインキュベートされた場合にマウス好中球のオプソニン作用能を増強することができる。さらに、プロテインAの構造遺伝子(*spa*)を欠く黄色ブドウ球菌変異体は、病毒性の大幅な欠損を示し、また、多くの異なるブドウ球菌抗原に対する体液性免疫反応の発現および防御免疫の発現を可能にする(Cheng et al., 2009; Kim et al., 2011)。したがって、SpAの免疫調節特性を無力化する抗体は、急性ブドウ球菌感染に対する防御を提供しうるだけでなく、また、他のブドウ球菌抗原に対する防御免疫反応の発現を可能にし、再発性の黄色ブドウ球菌感染を予防しうる。本発明者らは、SpA_{KKAA}に対するmAbを作製することによってこの予想を検証した。マウスにおいて防御免疫を誘発した全てのモノクローナル抗体が、プロテインAの立体構造エピトープを認識し、そのIgBDの3本鎖ヘリックスの折り畳み構造と相互作用した。重要なことには、SpA_{KKAA}の複数のまたは全てのIgBDに対して強い親和性および交差反応性を有するこれらのモノクローナル抗体は、同様に野生型プロテインAを認識した。インビトロにおいて試験された場合、mAb、詳細には5A10、3F6、および3D11は、免疫グロブリンのFc およびFabドメインとのプロテインAの結合を阻止し、マウスおよびヒト血液中での食細胞による黄色ブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅をもたらした。マウスの腹腔へ注射された場合、mAbはMSSAとMRSAの両方の黄色ブドウ球菌分離株に対する顕著な免疫防御を誘発した。さらに、インビボでのSpA_{KKAA}-mAbを介したSpAの無力化は、いくつかの異なる黄色ブドウ球菌抗原に対する体液性免疫反応を刺激し、SpA_{KKAA}抗体がブドウ球菌のB細胞超抗原活性を阻害するという仮説を支持するものであった。

【0263】

注目すべきは、受動的に免疫されたマウスでのブドウ球菌抗原に対する抗体反応の大きさは、SpA_{KKAA}で能動的に免疫されたマウスにおいて誘発された免疫反応よりもはるかに低かった。能動免疫戦略と受動免疫戦略との間の主な差異は、宿主免疫反応を支配する抗原特異的T/B細胞集団の発現にあり、それは能動免疫戦略の結果である。将来の研究では、T_H1/17を介した黄色ブドウ球菌に対する機能的食細胞の動員などの適切な全身免疫反応を引き起こす際にプロテインA特異的T/B細胞が極めて重要であるかどうかを判定することが正当化される(Spellberg et al., 2012)。

【0264】

過去の研究により、マウスにおいてV_H3型B細胞受容体に対するプロテインAの超抗原活性が実証されている(Goodyear et al., 2003)。注目すべきは、マウスB細胞の5~10%だけがV_H3クローン性であり、プロテインA超抗原に感受性が高い(Silverman et al., 2006)。それにもかかわらず、プロテインA変異体ブドウ球菌は、この疾患のマウスモデルでの膿瘍形成の発病において著しい欠陥を示す(Cheng et al., 2009, Kim et al., 2011)。マウスとは対照的に、ヒトV_H3クローン性B細胞は全B細胞集団の最大50%までを構成し(Berberian et al., 1993, Huang et al 1992)、ブドウ球菌感染中のプロテインA超抗原活性の影響はヒトB細胞集団の場合にさらに大きい可能性が高いことを示唆している(Silverman et al., 2006)。そうなら、プロテインAを介したB細胞活性化は、V_H3 B細胞クローンの使用の偏りおよび非生理学的B細胞集団の発現をもたらす。最終的に、ブドウ球菌プロテインAは、V_H3型抗体およびV_H3陽性B細胞のヒト宿主に対して予想される。類似のシナリオはHIVエンベロープ糖タンパク質gp120で直面するものであり、それもV_H3クローン性B細胞と相互作用し、AIDS患者においてV_H3 B細胞(抗体遺伝子)のクローン欠損をもたらす(Berberian et al., 1993, Berberian et al 1991)。これらの事象は、HIVおよび黄色ブドウ球菌感染中の無力化用抗体の反応の阻止において重要な要因である可能性が高い(Kim et al., 2012b)。

【0265】

他者らによる研究では、プロテインAに対するモノクローナル抗体を単離しようとしていた。そのような抗体の1つ、SPA27(Sigma, St. Louis, MO)は、マウスIgG1、つまりFcドメインがプロテインAと相互作用しない抗体クラスと分類された(Kronvall et al., 1970)。それにもかかわらず、これらの抗体がVH3型Fabドメインを持つと仮定すれば、IgG1サブタイプ抗体でさえ、偽免疫結合を介してプロテインAにより結合されうる(Cary et al.,

1999, Sasso et al., 1989)。本発明者らは最近、これらの可能性を識別できる試薬を開発した。例えば、野生型プロテインA(SpA)は、Fc およびVH3型Fabドメインを介して免疫グロブリンを結合させる(Silverman et al., 2006)。SpA_{KK}はVH3型のFabドメインとだけ結合するのに対し、SpA_{AA}はVH3型免疫グロブリンのFabドメインにではなく、IgGのFc ドメインにだけ結合する(Kim et al., 2012a)。これらの試薬を用いて、本発明者らは、SPA27が野生型SpAおよびSpA_{KK}に結合するが、しかしSpA_{AA}またはSpA_{KKAA}に結合しないことを認めた(Kim et al., 2012a)。したがって、黄色ブドウ球菌Cowan1由来の野生型プロテインAでマウスを免疫した後のハイブリドーマから単離されたSPA27は、プロテインAを特異的に認識しない(Kim et al., 2012a)。むしろ、SPA27がプロテインAによって結合される(Kim et al., 2012a)。これらの知見から予想されうる通り、SPA27は、プロテインAのIgG またはIgM結合活性を無力化することができず、後に、黄色ブドウ球菌感染に曝露されるマウスにおいて防御を与えない(Kim et al., 2012a)。

【 0 2 6 6 】

本発明者らは、黄色ブドウ球菌感染中にまたは野生型プロテインAによる免疫後に無力化用抗体を宿主免疫系が産生できないことが一般的な現象にあたるのかどうか疑問を感じた(Kim et al., 2012a, Kim et al 2012b)。このモデルを検証するため、本発明者らはmAb 358A76.1、つまり黄色ブドウ球菌Cowan1由来の野生型プロテインAでマウスを免疫した後に単離された抗体(Sjoquist et al., 1972)を精製した(米国特許US2008/0118937 A1およびUS2010/0047252 A1)。mAb SPA27と異なり、mAb 358A76.1はSpA、SpA_{KK}、SpA_{AA}、およびSpA_{KKAA}と免疫反応性を示した(Kim et al., 2012a)。本発明者らは、mAb 358A76.1の特異的結合部位がE_{KKAA}ドメインに制限されること、ならびに同抗体がD_{KKAA}、A_{KKAA}、B_{KKAA}、およびC_{KKAA}ドメインを認識しないことを認めた。E_{KKAA}とその他4つのIgBDとの間のアミノ酸非類似性に基づき、本発明者らは、mAb 358A76.1がE-IgBDドメインの表面上の立体構造エピトープを認識するものと推測する。mAb 358A76.1とプロテインAのEドメインとの間の結合は、その他4つのIgBD(D、A、B、およびC)を無力化することができない。驚くことではないが、未処置マウスへのmAb 358A76.1の受動的移入は、黄色ブドウ球菌曝露に対する防御を付与せず、血液中でのブドウ球菌のオプソニン作用性の死滅をもたらさない。これらの知見に基づき、本発明者らは、毒素非産生性プロテインA、例えばSpA_{KKAA}による免疫だけが、プロテインAの全てのIgBDを無力化し、かつ黄色ブドウ球菌疾患に対する防御を付与する抗体の発現を誘発できるものと提唱する。

【 0 2 6 7 】

本明細書において提示されるデータは、SpAのFc およびFab結合活性の無力化が、黄色ブドウ球菌に対する防御免疫に相互に関連あるものの1つに相当するという一般仮説の裏付けとなる証拠を提供し、そのような抗体は、血液中での病原菌のオプソニン作用性の死滅をもたらすこと、およびブドウ球菌の分泌病毒性因子を無力化する抗体を誘発することが予想される(Mazmanian et al., 1999)。

【 0 2 6 8 】

配列分析

野生型黄色ブドウ球菌プロテインAは、2つの非抗原性結合部位を通じてヒトIgGと相互作用する。第一はFc定常領域とであり、第二はヒトVH3族のFab重鎖とである(Fab結合はIgAおよびIgMとも起こる)。したがって、ヒトVH3に対応するマウス族に属するmAbは、野生型抗原と3種の可能性のある、およびおそらく、競合性の結合親和性を有する可能性が高く、1つはFcに対するもの、1つはFabに対するもの、および3つ目はCDRを介して媒介される抗原特異的結合である。SpAKKAA特異的モノクローナル抗体を生ずるハイブリドーマ細胞株を、CDR配列決定分析に供した。各個々の抗体は、各Fab部分が軽鎖中の3つのCDRおよび重鎖中の3つのCDRから構成された、2つの抗原認識部位(Fab断片)を含んでいた。黄色ブドウ球菌感染に対する防御を付与すると特定されたmAbには、5A10、3F6、3D11、5A11、1B10、および4C1が含まれる。

【 0 2 6 9 】

顕著な防御を提供した3F6は、SpA_{KKAA} mAbのパネルのなかで最も特徴的な配列を提示し

た。1F10および6D11と同じ軽鎖CDR配列を共有するにもかかわらず、3F6は、これを1F10および6D11と区別する重鎖中の独特のCDR配列を有する。最後に、1F10および6D11は共通の重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列を共有し、それらが同胞種mAbであることを示唆していた。1F10抗体も6D11抗体もともに、マウスにおいて顕著な免疫防御を生ずることができなかった。最も有望な防御効果を生み出し、かつさらに特徴付けられた3種のmAb (5A10、3F6、および2F2) が太字で示されている。

【0270】

3つの主群の軽鎖配列が特定され、類似配列によって結び付けられた。第一の群は3F6、1F10、6D11、4C1、6B2、2B8、および4C5から構成され、これらの全てが、6B2における1個のアミノ酸の相違および4C5における2個のアミノ酸の相違を除いて共通の軽鎖CDR配列を共有していた。軽鎖配列を共有するにもかかわらず、これらのmAbは種々の防御効果を生み出し、重鎖配列における特定の相違がこれらのmAbの機能的効果に著しく影響しうること示唆していた。第二の群は、一連の軽鎖CDR配列を共有し(重鎖CDR配列は相違していた)、主な防御抗体の1つ5A10を含む、5A10および2F2から構成された。

【0271】

全抗体の対応CDRの同一性をパーセントを算出し、行列の形式で表7~15に提示してある。3F6、5A10、または3D11の個々のCDRに対して40%超の個々のCDR配列同一性を有した抗体を、表16にまとめてある。3F6の対応CDRと40%超同一であった各CDRセットのコンセンサス配列を、表17に提示してある。

【0272】

(表5) 抗体配列

aAb	bV _H clan	c重鎖配列			d軽鎖配列			eCFU 減少/ 膿瘍形成 P値
		CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	
		アミノ酸配列			アミノ酸配列			
		ヌクレオチド配列			ヌクレオチド配列			
IgG1								
5A10	V _{H3}	GFAFSNYD (SEQ ID NO:11)	ISSGGTYP (SEQ ID NO:12)	ARGGFLITTRDYA MDY (SEQ ID NO:13)	SSVS (SEQ ID NO:16)	DTS (SEQ ID NO:17)	QQWSSYPPT (SEQ ID NO:18)	0.0019 / 0.035
		EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS GFAFSNYD MSVVRQTPPKR LEWVAT ISSGGTYP PPDSVKGRFTISRDNKNTLYQLSSLSR EDTALYYC ARGGFLITTRDYAMDY WQGTSVTSS (SEQ ID NO:14)			TIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSA SSVS MYWYQQKPG SSPRLIIY DTS NLASGVPVRFSGSGSTSYSLTISRMEAE DAATYYC QQWSSYPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:19)			
		Gaaagtgaagctgggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctgg agggccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcgtttca gtaactatgacatgctctgggttcgcagactccggagaagagg ctggagtggtgcgaaccattagtagtggtgtaacttaccctta ctatccagacagtgtagaaggccgtttcaccatctccagagaca atgccaagaacaccctgtacctgcaattgagcagctctgaggtct gaggacacggccttgattactgtgcaagaggggatttttgat tacgacacgggattactatgctatggactactggggtcaaggaa cctcagtcaccgtctcctcag (SEQ ID NO:15)			Acaattgtttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcat ctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgccagctc aagtgttaagtacatgtactggtaccagcagaagccaggga tcctccccagactcctgatttatgacacatccaacctgg cttctggagtcctgttcgcttcagtgccagtggtctgtg gacctcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaa gatgctgccacttattactgccagcagtgagtagttacc caccacglttcggaggggggaccaagctggaaataaaac (SEQ ID NO:20)			
8E2	V _{H1}	GYTFTEYS (SEQ ID NO:21)	FYPGSGYI (SEQ ID NO:22)	ARHGYGNYVGYAM DY (SEQ ID NO:23)	EIIYSY (SEQ ID NO:26)	FAK (SEQ ID NO:27)	QHHYGTPT (SEQ ID NO:28)	0.0620 / 0.1117
		KVQLQSSGAGLVKPGASVKLSCKAS GYTFTEYS LIHWVKSSGQG LEWIGW FYPGSGYI KYNEKFKDKATLTADKSSSTVYMEFSLR EDSAVYFC ARHGYGNYVGYAMDY WQGTSVTSS (SEQ ID NO:24)			DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE EIIYSY LAWYQQKQ GKSPQLLVY FAK TLAEGVPSRFSGSGSTQFSLKINSIQP EDFGIYYC QHHYGTPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:29)			
		Aaggtccagctgcagcagctctggagctgggtgaaacccgg ggcatcagtgaaagctgtcctgcaaggctcttggtacaccttca ctgaatatagttatcactgggtgaaacagagctctggacaggct			Aaggtccagctgcaacagctctggagctgggtgaaac ccggggcatcagtgaaagctgtcctgcaaggctcttggtta caccttcaactgaatatagttatcactgggtgaaacagagc			

		cttgagtggattgggtggtttaccctggaagtgggtatataaa gtacaatgagaattcaaggacaaggccacattgactgcggaca aatccctccagcagctctataggttttagtagattgacatct gaagactctgcgggtctactctgtgcaagacacggatatggtaa ctacgtggggtagctatggactactggggtcaaggaaacctcag tcacgtctcctcag (SEQ ID NO:25)			ctcggacagggctctgagtggaattgggtggtttaccctg gaagtgggttatataaagtacaatganaaattcaaggacaa ggccacattgactgcggacaaatcctccanccagctctat atggagtttagtagattgacatctgaagactctgcgggtct actctgtgcaagacacggatatggttaactacgtggggta tgctatggactactgggtgcaaggaaacctcaatcaccgtc tctc (SEQ ID NO:30)			
3A6	V _{H1}	GYNFTDYS (SEQ ID NO:31)	INTETAES (SEQ ID NO:32)	AHFDC (SEQ ID NO:33)	QSLVHSNG NTY (SEQ ID NO:36)	KVS (SEQ ID NO:37)	SQITYVPWT (SEQ ID NO:38)	0.3068 / 0.1497
		QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYNFTDYSMHVVKQAPGKG LKWVGVINTETAESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINSLKD EDTATFFCAHFDCWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:34)			DVVMTQISLSLPVTLGDQASISCRASQSLVHSNGNTYLNW YLQKPGQSPKLLIHKVSNRFGSPVDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSSQITYVPWTFGGGKTLEIK (SEQ ID NO:39)			
		Cagatccagttgggtcagctctggacctgagctgaagaagcctgg agagacagtcagatctcctgcaaggcttctggttataatttca cagactattcaatgcactgggtgaagcaggtccaggaaagggt ttaaagtggtgggtgggtgataaaactgagactgctgagtcac atatgcagatgacttcaagggaagggttgccttctcttggaaa cctctgccaagcactgctatttgcagatcaacagcctcaagat gaggacacggctacattttctgtgccacatttgaactgttgggg ccaaggcaccactctcacagtctctca (SEQ ID NO:35)			Gatgttgatgacccaaatttcaactctcctgctcctgctca ctcttgagatcaagcctcctctctgcaagagctagtc gagccttgtagacagtaattggaacacctatttaaattgg tacctgcagaagccaggccagctctcaaaactcctgatcc acaaagtctccaacccgatttctggggtccagacaggtt cagtgccagtggaatcagggaacagatttcaactcaagatc agcagagtggaaggtgaggtatctgggagtttatttctgct ctcaaatacatattgttccgtggacgttcggtggaggcac caagctggaatcaaac (SEQ ID NO:40)			
7E2	V _{H1}	GYTFTDYS (SEQ ID NO:41)	INTATGEP (SEQ ID NO:42)	APQLTGPFAY (SEQ ID NO:43)	ENIHNY (SEQ ID NO:46)	NAK (SEQ ID NO:47)	QHSWSIPYT (SEQ ID NO:48)	0.9396 / 0.7461
		QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSVHVVKQAPGKG LKWMAWINTATGEPFFADDFKGRFAFSLETSARTAYLQINLNK EDTATYFCAPQLTGPFAYWGHGTLTVTSA (SEQ ID NO:44)			DIQMTQSPASLSASVGETVITICRASENHNILAWYQQKQ GKSPQLLVYNAKTLTDGVPDRFSGSGSGTQFSLKINSLOA GDFGSSYYCQHSWSIPYTFGGGTRLQIR (SEQ ID NO:49)			
		Cagatccagttgggtacagctctggacctgagttgaagaagcctgg agagacagtcagatctcctgcaaggcttctggttataacctca cagactattcagtgactgggtgaagcaggtccaggaaagggt ttaaagtggtgggtgggtgataaaactgagactgctgagccaac atttgcagatgacttcaagggaagggttgccttctcttggaaa cctctgccagaactgctatttgcagatcaacacactcaaaaat gaggacacggctacatatttctgtgctcccagtttaactggccc ttttgcttactggggccacgggactctggtcactgtctctgca (SEQ ID NO:45)			Gacatccagatgactcagctctccagcctcctatctgcat ctgtgggagaaactgtccaccatcacatgtcgagcaagtga gaatatccacaattatttagcatggtatcagcagaaacag ggaaaatcctcctcagctcctggtctataatgcaaaaact taacagatgggtgtgccatcaagggtcagtgccagtggtc aggaacacaaatttctctcaaatcaacagcctgcaggct ggagattttgggagttattactgtcaacattcttggagta taccgtacacgtttggagggggaccaggctacaaataag ac			
					(SEQ ID NO:50)			
IgG_{2a}								
3F6	V _{H1}	GFTFNTNA (SEQ ID NO:51)	IRSKSNYYAT (SEQ ID NO:52)	VTEHYDYDY YVMDY (SEQ ID NO:53)	ESVEYSGASL (SEQ ID NO:56)	AAS (SEQ ID NO:57)	QQRKVPST (SEQ ID NO:58)	0.0010/ 0.0239
		EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNANMNVVRQ APGKGLLEWVARIRSKSNYYATYYADSVKDRFISRDSDQ NMLSLQNMNLTEDTAIYYCVTEHYDYDYVMDYWGQGT SVXSPQ (SEQ ID NO:54)			IVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYSGASLMQW YQHKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSL NIHPVEEDDIAMYFCQQRKVPSTFGGGKTLEIK (SEQ ID NO:59)			
		Gaggtgcagcttgggtgagactgggtgaggattgggtgcag cctaaagggtcattgaaactctcatgtgcagcctctgga ttcaccctcaataccaatgccatgaactgggtccgccaag gctccaggaaagggtttggaatgggttgcctgcataaga agtaaaagtaataattatgcaacatattatgccgattca gtgaaagacaggttctccatctccaggatgattcacaa aacatgctctctctgcacaatgaacaaactgaaaactgag gacacagcctcattactgtgtgacagaaactatgat tacgattactatgttatggaactactgggtcaaggaaac tcagtcannctcctcagc (SEQ ID NO:55)			Attgtgctcaccatctccagcttcttgggtctgtgc tcttgggcagagagccaccatctcctgcagagccagtg aaagtgttgaatattctggcgaagtttaatgcaagg taccacacaaaccaggacagccacccaaactcctcat ctatgctgcacccaagtagaattctggggtccttgcca gggttagtgccagtggtctgggacagacttcagcctc aacatccatcctgtggaggagtagatttgaatgta ttctgtcagcaaatgaggaaggttccctccacgttgc gaggggggaccaagctggaataaaaa (SEQ ID NO:60)			
1F10	V _{H1}	GNAFTNYL (SEQ ID NO:61)	INPGSGIT (SEQ ID NO:62)	SGSANWFAY (SEQ ID NO:63)	ESVEYSGASL (SEQ ID NO:66)	AAS (SEQ ID NO:67)	QQRKVPST (SEQ ID NO:68)	0.0299/ 0.0812
		KELISSKSEEEKWPGTSVKVSKASGNAFTNYLIEWIKQ RPGQGLEWIGVINPGSGITNYNEKFKGKATLTADKSSNT AYMQLSLSLSDSDSAVYFCSSGSANWFAYWGQGTTLTVTSA (SEQ ID NO:64)			DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYSGASLMQ WYQHKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSL LNHPVEEDDIAMYFCQQRKVPSTFGGGKTLEIK (SEQ ID NO:69)			
		Aaggaactcatcagttccaatctgaagaagagaaatgg cctgggacttcagtgaaaggtgctcctgcaaggcttctgga aacgcttctcactaattatttaatagagtgataaaacag aggcctggacagggccttgagtgagttggagtgattaat cctggaagtgaattactaactacaatgagaagttcaag ggcaaggcaacactgactgcagacaaactcctccaacact gcctacatgcagctcagcagcctgctcatctgatgactct gcggtctatttctgttcaggatcgcccaactggttgc tactggggccaggggactctggtcaccgtctctgca (SEQ ID NO:65)			Gacattgtgctcaccatctccagcttcttgggtgt gtctcttgggcagagccaccatctcctgcagagcca gtgaaagtgttgaatattctggcgaagtttaatgcaag tggtaccaacacaaaccaggacagccacccaaactcct catctatgctgcacccaagctagaattctgggtcctg ccaggtttagtgccagtggtctgggacagacttcagc ctcaacatccatcctgtggaggagtagatttgaatgta gtatttctgtcagcaaatgaggaaggttccctccacgt tcggaggggggaccaagctggaataaaaa (SEQ ID NO:70)			
6D11	V _{H1}	GNAFTNYL (SEQ ID NO:71)	INPGSGIT (SEQ ID NO:72)	SGSANWFAY (SEQ ID NO:73)	ESVEYSGASL (SEQ ID NO:76)	AAS (SEQ ID NO:77)	QQRKVPST (SEQ ID NO:78)	0.1967/ 0.1793

		QVQLQSGAELVRFPGTSVKVSCSKASGNAFTNYLIEWIKQ RPPGQGLEWIGIVINPGSGGITYNYNEKFKGKATLTADKSSNT AYMQLSSLSSDDSAVYFCSGSANWFAYWGQGLTLTVSA (SEQ ID NO:74)			DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYSGASLMQ WYQHKPGQPPKLLIYAASNVESGVPVRFSGSGSGTDFSLN IHPVEEDDIAMFYFCQSRKVPSTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:79)			
		Caggtccagctgcagcagctctggagctgaactggtaagc cctgggaacttcagtggaaggtgtcctgcaaggtctctcgga aacgccttcactaattatttaataagatgggataaaaacag aggcctggacagggccttgagtggttgagtgatttaaat cctggaaagtggaaattactaactacaatgagaagttcaag ggcaaggcaacactgactgcagacaaatcctccaacact gcctacatgcagctcagcagcctgtcatctgatgactct cggtctattttctgttcaggatcgcccaactggtttgct tactggggccaagggaactctggtcactgtctctgca (SEQ ID NO:75)			Gacattgtgtctcaccacatctccagcttctttggctgt gtctcttgggcagagagccagcatctcctgcagagcca gtgaaagtgttgaattatcaggcgcaagtttaatgcag tggtaaccaacacaaaccaggacagccacccaaactcct catctatgtcgcacccaacgtagaattctggggtcctgt tcaggtttagtggcagtggtctctgggacagacttcagc ctcaacatccatcctgtggaggaggatgatattgcaat gtatttctgtcagcaaaagtaggaaggttccctctaagt tcggaggggggaccaagctggaaataaaac (SEQ ID NO:80)			
IgG2 _b								
3D11	V _{H1}	GYSFTSY (SEQ ID NO:81)	IDPFGGT (SEQ ID NO:82)	ARYGYDGT YAMDY (SEQ ID NO:83)	SSVS (SEQ ID NO:86)	EIS (SEQ ID NO:87)	QQWSYPFT (SEQ ID NO:88)	0.0010/ 0.0068
		QSGPELMKPGASVKISCKASGYSFTSYMHVVKQSHGKS LEWIGYIDPFGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHL SSLTSEDSAVYYCARARYGYDGTIFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:84)			RIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVSYMHVYQK SGTSPKPIWYEISKLAGVVPARFSGSGSTSYSLTISS MEAEDAIIYYCQQWSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:89)			
		Cagttgtgacctgagctgatgaagcctggggttcagtg aagatattcctgcaaggtctctggttactcattcaactagc tactacatgcactgggtgaagcagagccatggaaagagc cttgagtggttggtgatattgaccccttcaatgggtggt actagctacaaacagaaattcaaggcgcaaggccacattg actgtagacaaatctccagcacagcctacatgcactctc agcagcctgacatctgaggac (SEQ ID NO:85)			Agaattgtgtcactcagctctccagccatcacagctgc atctctggggcaaaaggtcaccatcacctgcagtgcca gctcaagtgtgaattacatgcactggtaaccaacagaag tcaggcacctcccccaaacatggatttatgaaatc caaactggctctctggagtcacagctcgttctcagtgga gtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagc atggaggtggaagatgctgccaatttattactgccagca gtggagttatccattcagcttcgggtcggggacaaagt tggaaataaaac (SEQ ID NO:90)			
5A11	V _{H3}	GFTFSDYY (SEQ ID NO:91)	ISDGGTYT (SEQ ID NO:92)	ARDRDDYDE GPYFDY (SEQ ID NO:93)				0.0171/ 0.0286
		EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYMWVRQ TPEKRLIEWVATISDGGTYTYPDSVKGRFTISRDNKNN LYLQMSLKS EDTAMYYCARDRDDYDEGPYFDYWGQGT						
		LTVSS (SEQ ID NO:94) Gaagtgcagctggtgagctctgggggaggttagtgaag cctggaggggtccctgaaactctcctgtgcagcctctgga ttcacttctcagtgactattacatgtattgggttcgccag acacccgaaaagaggtctggagtggttcgcaaccattagt gatgggtggtacttacactactatccagacagtggtgaag gggcgattccaccatctccagagacaatgccagaacaac ctgtacctgc aaatgagcagctctgaagctgaggacaca gccatgtattactgtgcaagagatcggtgattacgac gaggggcccactacttgcactactggggccaaggcaccact ctccagctctcctcag (SEQ ID NO:95)						
2F2	V _{H3}	RFTFSSYV (SEQ ID NO:96)	IGSGGTTY (SEQ ID NO:97)	RGRGYGFAW YFDV (SEQ ID NO:98)	SSVS (SEQ ID NO:101)	DTS (SEQ ID NO:102)	QQWSSYPPT (SEQ ID NO:103)	0.0002/ 0.018
		VKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASRFTFSSYVMSWVRQ PEKRLIEWVASIGSGGTTYPTVTKGRFTISRDNARNILY LQMSLRSDDTAMYYCTRGRGYGFAWYFDVWGAGTTVT SS (SEQ ID NO:99)			TIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQK PGSSPRLLIYDTSNLASGVVPVRFSGSGSTSYSLTISS MEAEDAIIYYCQQWSSYPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:104)			
		Agtgaagctggtgagctctgggggagacttagtgaagcc tggaggggtccctgaaactctcctgtgcagcctctcgatt cacttctcagtagctatgtcatgtcttgggttcgccagac tccagagaagaggtctggagtggttcgcatccattggtag tgggtgtaccacctactatccagacacgtgaagggccc attcaccatctccagagataatgccagaacatcctgta cctgcaaatgagcagctctgaggtctgatgacacggccat gtattactgtacaagagggcaggttatggtttcgccctg gtacttcgatgtctggggcgagggaccacggtcaccgt ctcctcag (SEQ ID NO:100)			Acaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgc atctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgcca gctcaagtgtgaattacatgactggtaccagcagaag ccaggatcctccccagactcctgatttatgacacatc caacctggctctctggagtcctgttcgcttcagtgga gtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagccga atggaggtggaagatgctgccaatttattactgccagca gtggagtagttacccacccacgttcggaggggggacca agctggaaataaaac (SEQ ID NO:105)			
4C1					ESVEYSGASL (SEQ ID NO:106)	AAS (SEQ ID NO:107)	QSRKVPST (SEQ ID NO:108)	0.0228/ 0.0016
					VLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYSGASLMQWY QHKPGQPPKLLIYAASNVESGVPVRFSGSGSTDFSLN IHPVEEDDIAMFYCQSRKVPSTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:109)			
					Tgtgtcaccacatctccagcttctttggctgtgtctc ttgggcagagagccacatctcctgcagagccagtgaa agtggttgaatattctggcgcaagtttaatgcagtggt ccaacacaaaccaggacacagccacccaaactcctcatct			

10

20

30

40

					atgctgcacccaacgtagaatctggggctcctgccagg tttagtggcagtgggctctgggacagacttcagcctcaa catccatcctgtggaggaggatgatattgcaatgtatt tctgtcagcaaataggaaggttccttccacgttcgga gggggggaccaagctggaataaaaac (SEQ ID NO:110)			
8D4	V _{H1}	GSTFTNHH (SEQ ID NO:111)	LNPNYDYT (SEQ ID NO:112)	ATITFDS (SEQ ID NO:113)				0.0026/ 0.028
		QVQLQSQGAELVRPGASVKISCKAFGSTFTNHHINWVKQ RPGQGLDWIGYLNPNYDYTNYNQKFKGKATLTIDKSSST AYLELSSLTSEDSAVYYCATITFDSQXQ (SEQ ID NO:114)						
		Caggtccagctgcagcagctctggggctgagctggtagg cctggggcctcagtgagatttctgcaaggcttttggc tccaccttcacaaaccatcatataaaattgggtgaagcag aggcctggacagggcctggactggattggatattttaat ccttataatgattataactaactacaaccagaagttcaag ggcaaggccacattgactatagacaaatcctccagcaca gcctatctggagcttagcagcctgacatctgaggactct gcagtgattactgtgcaaccataacttttgacagccag gnncaagg (SEQ ID NO:115)						
1B10	V _{H3}	GFTFSNYD (SEQ ID NO:116)	ISSGGTYP (SEQ ID NO:117)	ARGGFLITTR DYAMDY (SEQ ID NO:118)				0.0113/ 0.0070
		EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYDMSWVRQ TPEKRLERVATISSGGTYPYYPDSVKGRFTISRDNENT LYLQLSSLRSEDALYYCARGGFLITTRDYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO:119)						
		GAAGTGAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTCAGTAACTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAG ACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGCGGGTTCGCAACCATTAGT AGTGGTGGTACTTACCCCTACTATCCAGACAGTGTGAAG GGCCGTTTACCATCTCCAGAGACAATGCCGAGAACACC CTGTACCTGCAATTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACG GCCCTGTATTACTGTGCAAGAGGGGGATTTTGATTACG ACACGGGACTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:120)						
6B2					ESVDYSGASL (SEQ ID NO:121)	AAS (SEQ ID NO:122)	QQRKVPST (SEQ ID NO:123)	0.062/ 0.4119
					DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDYSGASLMQ WYQHKPGQPPRLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFS LNHPVEEDDIAMFYFCQQRKVPSTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:124)			
					Gacattgtgctcaccacatctccagcttctttggctgt gtctcttgggcagagagccaccatctcctgcagagcca gtgaaagtgttgaattattctggcgcaagtttaatgcag tggtaccaacacaaaccaggacagccaccagactcct catctatgctgcacccaacgtagaatctggggctcctg ccaggtttagtggcagtggtctgggacagacttcagc ctcaacatccatcctgtggaggaggatgatattgcaat gtatttctgtcagcaaataggaaggttccttccacgt tcggaggggggaccaagctggaataaaaac (SEQ ID NO:125)			
7D11								0.111/ 0.0684
2B8					ESVEYSGASL (SEQ ID NO:126)	AAS (SEQ ID NO:127)	QQRKVPST (SEQ ID NO:128)	0.122/ 0.869
					FFGVSLGQRASISCRASESVEYSGASLIQWYQHKPGQF PKLLIYAASNVESGVPVRFSGSGSGTDFSLNHPVEED DIAMFYFCQQRKVPSTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:129)			
					Cttctttgggtgtgtctcttgggcagagagccagcatct cctgcagagccagtgaaagtgttgaatattcaggcgca agtttaatacagtggtaccaacacaaaccaggacagcc acccaaactcctcatctatgctgcacccaacgtagaat ctggggctcctgtcaggtttagtggcagtggtctggg acagacttcagcctcaacatccatcctgtggaggagga tgatattgcaatgtatttctgtcagca (SEQ ID NO:130)			
2C3	V _{H3}	GFTFSNYD	ISSGGTYP	ARGGFLITTR				0.1318/ 0.204

		(SEQ ID NO:131)	(SEQ ID NO:132)	DYYAMDY (SEQ ID NO:133)				
		EVKLIVESGGGLVKPGGSLKLSAASGTFSSNYDMSWVRQ TPEKRLEWVATISSGGTYPYPDSVKGRFTISRDNANT LYLQLSSLRSEDTALYVCARGGFLITTRDYYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO:134) Gaagtgaactggtggagctctgggggagggcttagtgaag cctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctgga ttoactttcagtaactatgacatgtcttgggttcgcca actccggagaagaggtggtggtgcgaaccattagt agtgggtgacttaccctactatccagacagtgtgaag ggcctgttccacctctccagagacaatgocgagaacacc ctgtacctgcaattgagcagctctgaggtctgaggacacg ggcctgtattactgtgcaagagggggtattttgattacg acacgggactactatgctatggaactctgggttcaagga acctcagtcacccgtctcctcag (SEQ ID NO:135)						
1117								0.1116/0.4007
4C5					ESVEYYGASL (SEQ ID NO:136)	AAS (SEQ ID NO:137)	QQRKVPNT (SEQ ID NO:138)	0.114/0.2489
		DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVEYYGASLMQ WYQKSGCPFKLLIYAASNVESGVPAFSGSGSGTDFG LNIHPVEEDDIAMFYFCQQRKVPNTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:139) Gacattgtgtccacccaatctccagctctcttggctgt gtctctaggggcagagagccaccatctcctgcagagcca gtgaaagtgttgaaattattatggcgcaagtttaatgcag tggtaaccaacagaaatcaggacagccacccaaactcct catctatgctgcacccaacgtagaatctgggggtccctg ccaggttttagtggcagtggtctgggacagacttcagc ctcaacatccacctgtggaggaggatgatattgcaat gtatttctgtcagcaagtaggaaggttccgaacacgt tcggaggggggacccaagctggaataaaac (SEQ ID NO:140)						20
4D5					SSVS (SEQ ID NO:141)	ETS (SEQ ID NO:142)	QQWSYPFT (SEQ ID NO:143)	0.126/0.069
		EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVSYMHWYHQK SGTSPKFWIYETSKLASGVPRFSGSGSGTYSYSLTISS MEAEAAIYYCQQWSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:144)						

^a マウスモノクローナル識別子。MAb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 ヌクレオチド類似性に基づく免疫グロブリン可変重(IGHV)鎖遺伝子亜群分類。マウス遺伝子(ハツカネズミ(*Mus musculus*)) V_H 族をホモ・サピエンス(*Homo sapiens*)と比較し、それにしたがって表した。黄色ブドウ球菌プロテインAは、遺伝 V_H 遺伝子および他の哺乳動物種におけるその相同体のほぼ半分に相当するFab重鎖 V_H3 ファミリーのヒト可変領域との結合に対して特異性を有する。

^c および^d MAbハイブリドーマ細胞由来の全RNAを標準的なプロトコールによって単離した。cDNAを、 V_H および V_L の超可変相補性決定領域(CDR)に隣接するIg保存領域からの増幅のために設計されたIgプライマーセットを用いたRT-PCRによって合成および増幅した。陽性産物をIMGT vquest (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest)を用いて配列決定および分析した。アミノ酸、ヌクレオチド、および特異的CDR配列を指定し、全アミノ酸配列内でCDRを太字および下線にしてある。

^e マウスにおける黄色ブドウ球菌腎膿瘍曝露後のCFUの有意な減少($P<0.05$)を示すP値。

^f 病理組織学的分析によって判定した場合の、腎臓における膿瘍の有意な減少($P<0.05$)を示すP値。

【0273】

実施例2

材料および方法

細菌株および増殖条件

黄色ブドウ球菌株NewmanおよびMW2はトリプトソイブロス(TSB)において37℃で増殖させた。大腸菌株DH5⁺ およびBL21(DE3)は、100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のアンピシリンを有するルリア・ベルターニ(LB)ブロスにおいて37℃で増殖させた。

【0274】

モノクローナル抗体

マウスモノクローナル抗体は従来の方法(Kohler, G., and C. Milstein. 1975)によって作製された。手短かに言えば、BALB/cマウス(8週齢、雌性、Jackson Laboratory)を、完全フロイントアジュバント(CFA, DIFCO)と1:1で乳化された精製SpA_{KKAA} 100 µgを用いた腹腔内注射により免疫した。21日目および42日目に、不完全フロイントアジュバント(IFA, DIFCO)と1:1で乳化された同一抗原100 µgを用いた腹腔内注射によりマウスを追加免疫した。31日目および52日目に、マウスから採血し、血清試料をELISAにより特異的抗体についてスクリーニングした。初回免疫から79日後に、ELISAによって強力な抗原免疫反応性を示したマウスに同一抗原25 µgを追加免疫した。3日後、脾細胞を収集し、マウス骨髓腫細胞株SP2/mIL-6、つまりSP2/0骨髓腫細胞株のインターロイキン6分泌派生株と融合した。得られたハイブリドーマ由来の上清をELISAによってスクリーニングし、抗原特異的クローンを限界希釈法によってさらに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得た。細胞株の使用済みの培養上清から抗体を精製した。Spa27モノクローナル抗体はSigmaから購入した。ハイブリドーマ細胞株358A76.1.1はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCCアクセッション番号PTA-7938)から購入し、Fitchモノクローナル抗体施設(シカゴ大学)で増殖させた。

10

【0275】

組換えタンパク質の精製

SpA-E_{KKAA}ドメインのアミノ酸配列に由来するポリペプチドは、CPC Scientific Inc (Sunnyvale, USA)によって合成された。凍結乾燥されたペプチド試料を、蒸留水またはジメチルスルホキシド(DMSO)のどちらかを用いて可溶化し、次に分注し、-80 °Cで凍結した。野生型SpAおよびSpA_{KKAA}のプラスミドの使用が、これまでに記述されている(Kim et al., 2010a)。SpA_{KK} (5つのIgBDの各々におけるQ⁹K、Q¹⁰K置換)、SpA_{AA} (5つのIgBDの各々におけるD³⁶A、D³⁷A置換)、SpA_{KKAA}の個々のIgBD (E、D、A、BおよびC)の合成用のオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies, Inc (USA)によって合成された。SpA_{KKAA}変種のPCR産物を、N末端His₆タグ付きの組換えタンパク質を生ずるpET15bベクターにクローニングした。Sbi₁₋₄のコード配列を、組換えN末端Strepタグ(WSHPQFEK (SEQ ID NO:10))を有する黄色ブドウ球菌Newman染色体DNAから2つのプライマー

20

5'-AAAAAAGCTAGCTGGTCTCATCTCAATTTGAGAAGACGCAACAACTTCAACTAA

30

G-3' (SEQ ID NO:8) および 5'-AAAAAACTCGAGTTTCCAGAATGATAATAAATTAC-3'

(SEQ ID NO:9)

でPCR増幅させた。Sbi₁₋₄のPCR産物を、組換えN末端Strepタグ(WSHPQFEK (SEQ ID NO:10))を有するC末端His₆タグ付きの組換えタンパク質を生ずるpET24bベクターにクローニングした。全てのプラスミドをアフィニティー精製のためにBL21(DE3)に形質転換した。組換え大腸菌株の終夜培養物を新鮮培地中に1:100で希釈し、A₆₀₀ 0.5まで37 °Cで増殖させ、この時点で培養物を1 mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)で誘導し、さらに3時間増殖させた。細菌細胞を遠心分離により沈降させ、カラム用緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl)中に懸濁し、フレンチプレス細胞破碎機(French pressure cell)により14,000 psiで破碎した。40,000 × gでの超遠心分離によって溶解物から膜および不溶性成分を除去した。除去済みの溶解物中のタンパク質をニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)アフィニティークロマトグラフィーに供した。連続的に高濃度のイミダゾール(100 ~ 500 mM)を含有するカラム用緩衝液中にタンパク質を溶出させた。ピシンコニン酸(BCA)アッセイ法(Thermo Scientific)によってタンパク質濃度を判定した。

40

【0276】

酵素免疫測定法

SpA特異的血清IgGを判定するため、アフィニティー精製されたSpA_{KKAA}を0.1 M炭酸緩衝液(4 °CにおいてpH 9.5)中1 µg · ml⁻¹で用いて、ELISAプレート(NUNC Maxisorp)を終夜コーティングした。翌日、プレートをブロッキングし、過免疫血清の希釈物とともにインキュベートし、OptEIA試薬(BD Biosciences)を用いて発色させた。SpA特異的mAbの結合親和

50

性の判定の場合、ELISAプレートを、アフィニティー精製された個々の免疫グロブリン結合ドメイン、または配列がSpA-E_{KKAA}の配列に由来した合成ペプチド(H1、H2、H3、H1+3、およびH2+3)でコーティングした。ペプチドを終夜4、0.1 M炭酸緩衝液、pH 9.5中100 nMの濃度でのプレートコーティングに用いた。翌日、プレートをPBS-T中1%のBSA溶液でブロッキングし、さまざまな濃度のSpA特異的mAbとともにインキュベートした。特異的mAbの結合力を判定するため、抗体と抗原との間の相互作用を漸増濃度(0~4 M)のチオシアン酸アンモニウムでかく乱させた。SpAおよびSbi結合アッセイ法の場合、アフィニティー精製されたSpAおよびSbiを0.1 M炭酸緩衝液(4においてpH 9.5)中1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ でELISAプレート上に終夜コーティングした。翌日、プレートをブロッキングし、ペルオキシダーゼ結合ヒトIgG、FcおよびF(ab)₂ (The Jackson Laboratory)の希釈物またはアイソタイプ対照抗体およびSpA_{KKAA}特異的mAbの希釈物とともにインキュベートした; OptEIA試薬を用いてアッセイ法を進めた。ヒトIgGとSpAとの間の免疫結合の阻害を測定するため、プレートをリガンド結合の前に、20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のアイソタイプ対照抗体またはSpA_{KKAA}特異的mAbのどちらかとともにインキュベートした。競合アッセイ法の場合、プレートを終夜4において0.1 M炭酸緩衝液(pH 9.5)中10 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ でコーティングした。翌日、プレートをブロッキングし、100~200 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ の終濃度でのHRP結合SpA特異的mAb (Innova Biosciences)またはヒトIgGとのインキュベーションの前に30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のアイソタイプ対照抗体またはSpA_{KKAA}特異的mAbとともにインキュベートした。

【0277】

マウス腎膿瘍モデル

黄色ブドウ球菌による曝露の4~24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、15、20または50 mgの濃度で注射した。黄色ブドウ球菌株の終夜培養物を新鮮TSB中に1:100で希釈し、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。試料アリコットをTSA上に広げ、インキュベーションにより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定量化した。BALB/cマウスを体重1キログラムあたり100 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のケタミンおよび20 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のキシラジンの腹腔内注射によって麻酔した。右眼の眼窩周囲静脈洞への 1×10^7 CFUの黄色ブドウ球菌Newmanまたは 5×10^6 CFUの黄色ブドウ球菌USA300 (LAC)もしくはUSA400 (MW2)の注射によってマウスを感染させた。曝露後4日目または15日目に、マウスをCO₂の吸入によって殺処理した。両方の腎臓を切除し、一方の器官におけるブドウ球菌負荷量を、PBS、0.1% Triton X-100で腎組織をホモジナイズすることによって分析した。ホモジネートの連続希釈液をTSA上に広げ、コロニー形成のためにインキュベートした。残りの器官は組織病理診断によって調べた。手短に言えば、腎臓を室温において24時間10%ホルマリン中で固定した。組織をパラフィン包埋し、薄片にし、ヘマトキシリン・エオシンで染色し、光学顕微鏡検査により検査して膿瘍病変部を数え上げた。感染後15日の時点で回収された免疫血清試料を、2 μg でニトロセルロース膜上に固定化された14種のアフィニティー精製ブドウ球菌抗原に対する免疫プロットングにより調べた。既述(Kim et al., 2010b)の通りにシグナル強度を定量化した。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。

【0278】

血液中でのブドウ球菌生存

全血を心穿刺によってBALB/cマウスから回収し、凝固を10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のレピルジンで阻害した。 5×10^5 CFU $\cdot \text{ml}^{-1}$ の黄色ブドウ球菌Newman 50 μl を2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のmAbの存在下においてマウス血液950 μl と混合した。試料を30分間低速回転で37においてインキュベートし、その後、1%サポニン/PBSとともに氷上でインキュベートした。ヒト血液検査の場合、 5×10^6 CFU $\cdot \text{ml}^{-1}$ の黄色ブドウ球菌MW2 50 μl を10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のmAbの存在下において新鮮採取ヒト血液950 μl と混合した。この管を120分間低速回転で37においてインキュベートした。アリコットを1%サポニン/PBSとともに氷上でインキュベートして、血液細

胞を溶解させた。ブドウ球菌の希釈物をコロニー形成のため寒天上にプレーティングした。ヒト志願者由来の血液を用いた実験は、シカゴ大学の施設内治験審査委員会(IRB)により審査され、承認され、かつ監督されたプロトコールで行われた。

【0279】

SpA特異的血清IgG

BALB/cマウスの腹膜に、0日目および11日目の時点でmAb 3F6またはそのアイソタイプ対照85 μg の存在下、アフィニティー精製SpA変種20 μg を注射した。21日目の時点で、全血をBALB/cマウスから回収して、過免疫血清を得た。

【0280】

循環血中のSpAの存在量の測定

10

受動的に免疫されたBALB/cマウスの腹膜に、アフィニティー精製された野生型SpA 200 μg を注射した。表示した時間間隔で、全血を10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ のレビルジン抗凝固物質によってBALB/cマウスから回収した。全ての試料を10分間1%サポニン/PBSとともに氷上に保持した。溶解した試料を次に、1:10 PBSに希釈し、SDS-PAGE試料用緩衝液と1:1で混合した。SDS-PAGEゲル電気泳動の前に、試料を90 $^{\circ}\text{C}$ で5分間煮沸した。試料をPDVFに転写し、アフィニティー精製されたウサギ γ -SpA_{KKAA}抗体を用いた免疫プロットティングによって分析した。

【0281】

Sbi消費アッセイ法

黄色ブドウ球菌Newmanの終夜培養物を新鮮TSB中に1:100で希釈し、2時間増殖させ、A600を予冷TSBで0.4 (1×10^8 CFU $\cdot \text{ml}^{-1}$)に調整した。細胞を洗浄し、4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の終濃度でアイソタイプ対照またはmAb 3F6 100 μl のいずれかとともにインキュベートした。インキュベーション後、ブドウ球菌を予冷TSBで洗浄し、アフィニティー精製された野生型Sbi 2 μg とともに4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。ブドウ球菌を1分間13,000 $\times g$ での遠心分離により沈降させ、上清を取り出し、試料用緩衝液と(1:1)混合した。SDS-PAGEゲル電気泳動の前に、試料を90 $^{\circ}\text{C}$ で5分間煮沸した。試料をPDVF膜に電氣的に転写し、アフィニティー精製されたウサギ γ -SpA_{KKAA}抗体を用いた免疫プロットティングによって分析した。

20

【0282】

モノクローナル抗体の配列決定

30

ハイブリドーマ細胞由来の全RNA試料を、標準化されたプロトコールを用いて単離した。手短に言えば、10% FBSを有するDMEM-10培地中で培養されたハイブリドーマ細胞 1.4×10^7 をPBSで洗浄し、遠心分離により沈降させ、TRIzol中で溶解した(Invitrogen)。試料を20%クロロホルムと混合し、3分間室温でインキュベートし、4 $^{\circ}\text{C}$ で15分間10,000 $\times g$ で遠心分離した。水層中のRNAを取り出し、70%イソプロパノールで洗浄した。RNAを遠心分離により沈降させ、75%ジエチルピロカーボネート(DEPC)-エタノールで洗浄した。ペレットを乾燥させ、RNAをDEPCに溶解した。cDNAをcDNA合成キット(Novagen)で合成し、PCR Reagent System (Stratagene)、独自のプライマー(各5 pmol)ならびにマウス可変重鎖特異的および軽鎖特異的プライマーセット(Novagen)を用いPCR増幅した。PCR産物をIMGT Vquest (imgt.cines.fr/IMGT_vquestで使用可能)によって配列決定および分析した。

40

【0283】

統計解析

黄色ブドウ球菌感染の実験動物モデルにおける細菌負荷量および膿瘍数を両側マンホイットニー検定で解析して、統計的有意性を測定した。独立両側スチューデントのt検定を行って、ELISAデータ、免疫プロットティングシグナルおよびエクスビボ血中生存データの統計的有意性を解析した。全てのデータをPrism (GraphPad Software, Inc.)によって解析し、0.05未満のP値を有意と見なした。

【0284】

(表7)(可変軽鎖CDR同一性パーセント行列)

1: 5A10	<u>100</u>	29	29	29	41	41	41	69	100	41	41	41	35
2: 8E2	29	<u>100</u>	17	56	28	28	28	25	29	28	28	28	28
3: 3A6	29	17	<u>100</u>	22	32	32	32	31	29	32	32	32	32
4: 7E2	29	56	22	<u>100</u>	28	28	28	19	29	28	28	28	28
5: 3F6	41	28	32	28	<u>100</u>	100	100	38	41	100	95	100	91
6: 1F10	41	28	32	28	100	<u>100</u>	100	38	41	100	95	100	91
7: 6D11	41	28	32	28	100	100	<u>100</u>	38	41	100	95	100	91
8: 3D11	69	25	31	19	38	38	38	<u>100</u>	69	38	38	38	31
9: 2F2	100	29	29	29	41	41	41	69	<u>100</u>	41	41	41	35
10: 4C1	41	28	32	28	100	100	100	38	41	<u>100</u>	95	100	91
11: 6B2	41	28	32	28	95	95	95	38	41	95	<u>100</u>	95	86
12: 2B8	41	28	32	28	100	100	100	38	41	100	95	<u>100</u>	91
13: 4C5	35	28	32	28	91	91	91	31	35	91	86	91	<u>100</u>

【 0 2 8 5 】

(表 8) (可変重鎖CDR同一性パーセント行列)

	5A10	1B10	2C3	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	5A11	2F2	8D4
1: 5A10	<u>100</u>	97	97	42	24	27	38	32	32	40	45	38	26
2: 1B10	97	<u>100</u>	100	45	24	31	41	28	28	40	48	41	30
3: 2C3	97	100	<u>100</u>	45	24	31	41	28	28	40	48	41	30
4: 8E2	42	45	45	<u>100</u>	33	38	33	40	40	53	28	25	30
5: 3A6	24	24	24	33	<u>100</u>	62	19	30	30	33	29	14	24
6: 7E2	27	31	31	38	62	<u>100</u>	24	32	32	32	31	24	26
7: 3F6	38	41	41	33	19	24	<u>100</u>	17	17	28	30	24	27
8: 1F10	32	28	28	40	30	32	17	<u>100</u>	100	36	32	25	33
9: 6D11	32	28	28	40	30	32	17	100	<u>100</u>	36	32	25	33
10: 3D11	40	40	40	53	33	32	28	36	36	<u>100</u>	32	22	35
11: 5A11	45	48	48	28	29	31	30	32	32	32	<u>100</u>	41	30
12: 2F2	38	41	41	25	14	24	24	25	25	22	41	<u>100</u>	9
13: 8D4	26	30	30	30	24	26	27	33	33	35	30	9	<u>100</u>

【 0 2 8 6 】

(表 9) (可変軽鎖CDRおよび可変重鎖CDRの同一性パーセント)

10

20

30

40

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2
1: 5A10	<u>100</u>	38	26	28	39	33	33	54	61
2: 8E2	38	<u>100</u>	26	45	31	33	33	46	27
3: 3A6	26	26	<u>100</u>	44	26	30	30	32	21
4: 7E2	28	45	44	<u>100</u>	25	29	29	29	26
5: 3F6	39	31	26	25	<u>100</u>	57	57	33	30
6: 1F10	33	33	30	29	57	<u>100</u>	100	38	34
7: 6D11	33	33	30	29	57	100	<u>100</u>	38	34
8: 3D11	54	46	32	29	33	38	38	<u>100</u>	44
9: 2F2	61	27	21	26	30	34	34	44	<u>100</u>

【 0 2 8 7 】

(表 1 0) (可変軽鎖CDR1同一性パーセント行列)

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	4C1	6B2	2B8	4C5
1: 5A10	<u>100</u>	0	40	0	60	60	60	100	100	60	60	60	60
2: 8E2	0	<u>100</u>	17	50	17	17	17	0	0	17	17	17	33
3: 3A6	40	17	<u>100</u>	17	20	20	20	40	40	20	20	20	20
4: 7E2	0	50	17	<u>100</u>	17	17	17	0	0	17	17	17	33
5: 3F6	60	17	20	17	<u>100</u>	100	100	60	60	100	90	100	90
6: 1F10	60	17	20	17	100	<u>100</u>	100	60	60	100	90	100	90
7: 6D11	60	17	20	17	100	100	<u>100</u>	60	60	100	90	100	90
8: 3D11	100	0	40	0	60	60	60	<u>100</u>	100	60	60	60	60
9: 2F2	100	0	40	0	60	60	60	100	<u>100</u>	60	60	60	60
10: 4C1	60	17	20	17	100	100	100	60	60	<u>100</u>	90	100	90
11: 6B2	60	17	20	17	90	90	90	60	60	90	<u>100</u>	90	80
12: 2B8	60	17	20	17	100	100	100	60	60	100	90	<u>100</u>	90
13: 4C5	60	33	20	33	90	90	90	60	60	90	80	90	<u>100</u>

【 0 2 8 8 】

(表 1 1) (可変軽鎖CDR2同一性パーセント行列)

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	4C1	6B2	2B8	4C5
1: 5A10	<u>100</u>	0	33	0	33	33	33	33	100	33	33	33	33
2: 8E2	0	<u>100</u>	0	67	33	33	33	0	0	33	33	33	33
3: 3A6	33	0	<u>100</u>	0	33	33	33	33	33	33	33	33	33
4: 7E2	0	67	0	<u>100</u>	33	33	33	0	0	33	33	33	33
5: 3F6	33	33	33	33	<u>100</u>	100	100	33	33	100	100	100	100
6: 1F10	33	33	33	33	100	<u>100</u>	100	33	33	100	100	100	100
7: 6D11	33	33	33	33	100	100	<u>100</u>	33	33	100	100	100	100
8: 3D11	33	0	33	0	33	33	33	<u>100</u>	33	33	33	33	33
9: 2F2	100	0	33	0	33	33	33	33	<u>100</u>	33	33	33	33
10: 4C1	33	33	33	33	100	100	100	33	33	<u>100</u>	100	100	100
11: 6B2	33	33	33	33	100	100	100	33	33	100	<u>100</u>	100	100
12: 2B8	33	33	33	33	100	100	100	33	33	100	100	<u>100</u>	100
13: 4C5	33	33	33	33	100	100	100	33	33	100	100	100	<u>100</u>

【 0 2 8 9 】

(表 1 2) (可変軽鎖CDR3同一性パーセント行列)

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	4C1	6B2	2B8	4C5
1: 5A10	<u>100</u>	25	33	50	44	44	44	88	100	44	44	44	44
2: 8E2	25	<u>100</u>	25	56	25	25	25	25	25	25	25	25	25
3: 3A6	33	25	<u>100</u>	25	44	44	44	38	33	44	44	44	44
4: 7E2	50	56	25	<u>100</u>	25	25	25	50	50	25	25	25	25
5: 3F6	44	25	44	25	<u>100</u>	100	100	50	44	100	100	100	89
6: 1F10	44	25	44	25	100	<u>100</u>	100	50	44	100	100	100	89
7: 6D11	44	25	44	25	100	100	<u>100</u>	50	44	100	100	100	89
8: 3D11	88	25	38	50	50	50	50	<u>100</u>	88	50	50	50	50
9: 2F2	100	25	33	50	44	44	44	88	<u>100</u>	44	44	44	44
10: 4C1	44	25	44	25	100	100	100	50	44	<u>100</u>	100	100	89
11: 6B2	44	25	44	25	100	100	100	50	44	100	<u>100</u>	100	89
12: 2B8	44	25	44	25	100	100	100	50	44	100	100	<u>100</u>	89
13: 4C5	44	25	44	25	89	89	89	50	44	89	89	89	<u>100</u>

【 0 2 9 0 】

(表 1 3) (可変重鎖CDR1同一性パーセント行列)

10

20

30

40

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	1B10	2C3	5A11	8D4
1: 5A10	<u>100</u>	38	38	38	38	62	62	38	50	88	88	62	38
2: 8E2	38	<u>100</u>	75	88	38	50	50	62	38	50	50	50	50
3: 3A6	38	75	<u>100</u>	88	25	50	50	62	25	38	38	50	38
4: 7E2	38	88	88	<u>100</u>	38	50	50	62	38	50	50	62	50
5: 3F6	38	38	25	38	<u>100</u>	25	25	25	38	50	50	50	38
6: 1F10	62	50	50	50	25	<u>100</u>	100	50	25	50	50	38	50
7: 6D11	62	50	50	50	25	100	<u>100</u>	50	25	50	50	38	50
8: 3D11	38	62	62	62	25	50	50	<u>100</u>	38	38	38	50	38
9: 2F2	50	38	25	38	38	25	25	38	<u>100</u>	62	62	62	25
10: 1B10	88	50	38	50	50	50	50	38	62	<u>100</u>	100	75	50
11: 2C3	88	50	38	50	50	50	50	38	62	100	<u>100</u>	75	50
12: 5A11	62	50	50	62	50	38	38	50	62	75	75	<u>100</u>	38
13: 8D4	38	50	38	50	38	50	50	38	25	50	50	38	<u>100</u>

10

【 0 2 9 1 】

20

(表 1 4) (可変重鎖CDR2同一性パーセント行列)

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	1B10	2C3	5A11	8D4
1: 5A10	<u>100</u>	25	12	25	25	25	25	20	62	100	100	75	20
2: 8E2	25	<u>100</u>	0	12	22	50	50	40	12	25	25	25	20
3: 3A6	12	0	<u>100</u>	62	12	25	25	40	12	12	12	12	20
4: 7E2	25	12	62	<u>100</u>	12	38	38	40	12	25	25	12	20
5: 3F6	25	22	12	12	<u>100</u>	25	25	0	38	25	25	12	0
6: 1F10	25	50	25	38	25	<u>100</u>	100	40	25	25	25	38	40
7: 6D11	25	50	25	38	25	100	<u>100</u>	40	25	25	25	38	40
8: 3D11	20	40	40	40	0	40	40	<u>100</u>	20	20	20	20	33
9: 2F2	62	12	12	12	38	25	25	20	<u>100</u>	62	62	50	0
10: 1B10	100	25	12	25	25	25	25	20	62	<u>100</u>	100	75	20
11: 2C3	100	25	12	25	25	25	25	20	62	100	<u>100</u>	75	20
12: 5A11	75	25	12	12	12	38	38	20	50	75	75	<u>100</u>	60
13: 8D4	20	20	20	20	0	40	40	33	0	20	20	60	<u>100</u>

30

40

【 0 2 9 2 】

(表 1 5) (可変重鎖CDR3同一性パーセント行列)

	5A10	8E2	3A6	7E2	3F6	1F10	6D11	3D11	2F2	1B10	2C3	5A11	8D4
1: 5A10	<u>100</u>	42	0	12	43	0	0	36	15	100	100	12	0
2: 8E2	42	<u>100</u>	0	10	44	33	33	67	25	42	42	30	0
3: 3A6	0	0	<u>100</u>	0	40	0	0	20	20	0	0	0	50
4: 7E2	12	10	0	<u>100</u>	20	33	33	20	0	12	12	20	0
5: 3F6	43	44	40	20	<u>100</u>	20	20	43	9	43	43	20	29
6: 1F10	0	33	0	33	20	<u>100</u>	100	20	0	0	0	22	0
7: 6D11	0	33	0	33	20	100	<u>100</u>	20	0	0	0	22	0
8: 3D11	36	67	20	20	43	20	20	<u>100</u>	27	36	36	20	29
9: 2F2	15	25	20	0	9	0	0	27	<u>100</u>	15	15	14	14
10: 1B10	100	42	0	12	43	0	0	36	15	<u>100</u>	100	12	0
11: 2C3	100	42	0	12	43	0	0	36	15	100	<u>100</u>	12	0
12: 5A11	12	30	0	20	20	22	22	20	14	12	12	<u>100</u>	0
13: 8D4	0	0	50	0	29	0	0	29	14	0	0	0	<u>100</u>

【 0 2 9 3 】

(表 16) 表示したCDRが表示した参照抗体と40%または40%超の配列同一性を有する抗体の一覧表

5A10 5A10に対して40%または40%超の同一性:

L CDR1 3A6, 3F6, 1F10, 6D11, 3D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 L CDR2 2F2
 L CDR3 7E2, 3F6, 1F10, 6D11, 3D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 H CDR1 1F10, 6D11, 2F2, 1B10, 2C3, 5A11
 H CDR2 2F2, 1B10, 2C3, 5A11
 H CDR3 8E2, 3F6, 1B10, 2C3

3F6 3F6に対して40%または40%超の同一性:

L CDR1 5A10, 1F10, 6D11, 3D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 L CDR2 1F10, 6D11, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 L CDR3 5A10, 3A6, 1F10, 6D11, 3D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 H CDR1 1B10, 2C3, 5A11
 H CDR2 ---
 H CDR3 5A10, 8E2, 3A6, 3D11, 1B10, 2C3

3D11 3D11に対して40%または40%超の同一性:

L CDR1 5A10, 3A6, 3F6, 1F10, 6D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 L CDR2 ---
 L CDR3 5A10, 7E2, 3F6, 1F10, 6D11, 2F2, 4C1, 6B2, 2B8, 4C5
 H CDR1 8E2, 3A6, 7E2, 1F10, 6D11, 5A11
 H CDR2 8E2, 3A6, 7E2, 1F10, 6D11
 H CDR3 8E2, 3F6

【 0 2 9 4 】

(表 17) (3F6に対して40%またはそれ以上の同一性を有する抗体のCDRのコンセンサス配列)

10

20

30

40

軽鎖 CDR1	100%	ESVEYSGASL (SEQ ID NO:145)
	90%	ESV[E,D]YSGASL (SEQ ID NO:146)
	60%	[E,-][S,-][V,-][Y,-][E,-][Y,-][S][G,S][A,V][S][L,Y] (SEQ ID NO:147)
	全体の コンセンサス	[E,S]SV[E,D,S]Y[S,Y]GASL (SEQ ID NO:148)
軽鎖 CDR2	100%	AAS (SEQ ID NO:149)
軽鎖 CDR3	100%	QQRKVPST (SEQ ID NO:150)
	89%	QQRKVP[S,N]T (SEQ ID NO:151)
	50%	QQ[S,W][R,S][K,Y][V,P][P,-][S,F]T (SEQ ID NO:152)
	44%	[Q,S]Q[S,W,I][R,S,I][K,Y,S][V,Y]P[SS,P,W]T (SEQ ID NO:153)
	全体の コンセンサス	[Q,S]Q[S,W,I][R,S,I][K,S,Y][V,Y]P[S,P,W,F,N]T (SEQ ID NO:154)
重鎖 CDR1	100%	GFTFNTNA (SEQ ID NO:155)
	50%	GFTF[N,S][T,N,D][N,Y][A,D,Y] (SEQ ID NO:156)
	全体の コンセンサス	GFTF[S,N][T,N,D][N,Y][A,D,Y] (SEQ ID NO:157)
重鎖 CDR2	100%	IRSKSNYYAT (SEQ ID NO:158)
重鎖 CDR3	全体の コンセンサス	RH[A,G][R,Y]G[V,G,N,A][T,F,R][E,L,A,Y][H,I,G][Y,T,F][D,T][Y,R,C,G][D,V,T][Y,G,F][Y,V,A]MDY (SEQ ID NO:159)

【 0 2 9 5 】

参照文献

以下の参照文献は、本明細書に記載のものを補完する例示的な手順のまたはその他の詳細を提供する程度に、参照により本明細書に特に組み入れられる。

10

20

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	
米国特許第 4,472,509 号	10
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	
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	20
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	
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	30

米国特許第 5,538,880 号	
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	
米国特許第 5,648,240 号	
米国特許第 5,656,610 号	10
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	20
米国特許第 5,827,690 号	
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	
米国特許第 6,091,001 号	30
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
 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
 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

10

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.
 Berberian, *et al.*, *Blood* 78:175-179, 1991.
 Berberian, *et al Science* 261:1588-1591, 1993.
 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.), Elsevier, 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.
 Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.

20

30

- 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.
- Diep, *et al.*, *Lancet* 367:731-739, 2006.
- Emorl and Gaynes, *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:428-442, 1993.
- Epitope Mapping Protocols In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Morris (Ed.), 1996,
- European Patent 0 216 846
- European Patent 0 256 055
- European Patent 0 323 997 10
- European Patent Appln. 89303964.4
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fischetti, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2:285-314, 1989.
- Forsgren, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:207-213, 1976.
- 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. 20
- Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197:1125-1139, 2003.
- Goodyear and Silverman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11392-11397, 2004.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graille, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:5399-5404, 2000.
- 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.
- Haupt *et al.*, *PLoS Pathog.*, 4:e1000250, 2008. 30
- Hollingshead *et al.*, *Infect. Immun.*, 55:3237-3239, 1987.
- Huang, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 89:1331-1343, 1992.
- Jones and Fischetti, *J. Exp. Med.*, 167:1114-1123, 1988.
- Jones *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164:1226-1238, 1986.
- Kaepler *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990.

- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- 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.
- Kim, *et al.*, *Curr. Opin. Microbiol.* 15:92-99, 2012b.
- Kim, *et al.*, *Infect. Immun.* 80:EPub ahead of press. 2012a
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- 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.
- Kronvall, *et al.*, *J. Immunol.* 105:1115-1123. 1970
- 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.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.
- Mazmanian, *et al.*, *Science*. 285:760-763, 1999.
- McCarthy and Lindsay, *BMC Microbiology*, 10:173, 2010.
- Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, 1986.
- Moks, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 156:3577-3588, 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.
- Perry, *et al.*, *J Biol Chem.* 277:16241-16248, 2002.
- PCT出願 PCT/US11/42845

10

20

30

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

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

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.*, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:791-794, 1987.

Robbins, *et al.*, *J. Infect. Dis.* 161:821-832, 1990.

Robbins *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 397:169-182, 1996.

Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

Sasso, *et al.*, *J. Immunol.* 142:2778-2783, 1989.

Scott *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164:1641-1651, 1986.

Silverman and Goodyear, *Nat. Rev. Immunol.*, 6:465-475, 2006.

Sjödahl, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 73:343-351, 1977. Sjöquist, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 29:572-578, 1972.

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.

Spellberg, *et al.*, *Semin Immunopathol.* 34:335-348, 2012.

Stahlenheim, *et al.*, *J. Immunol.* 103:467-473, 1970.

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.

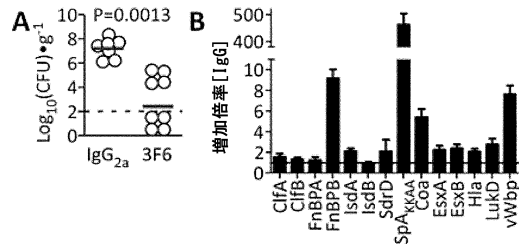
10

20

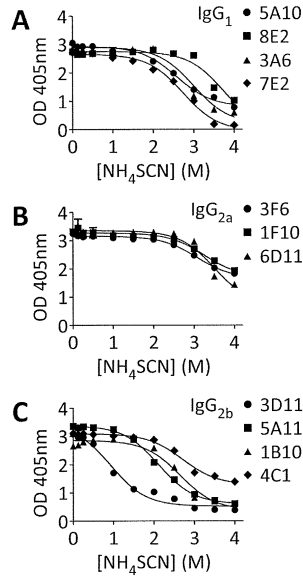
30

40

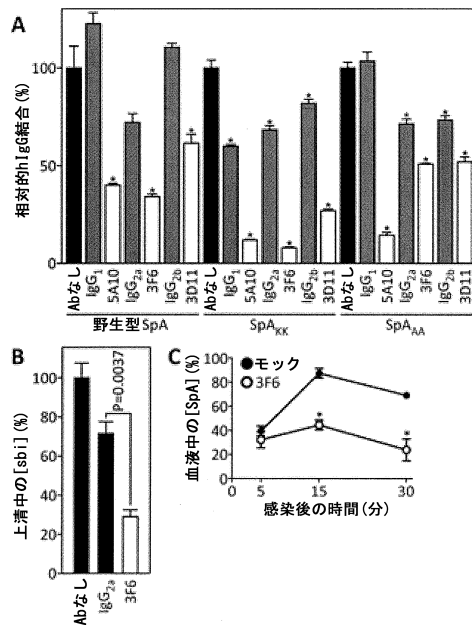
【図 1】



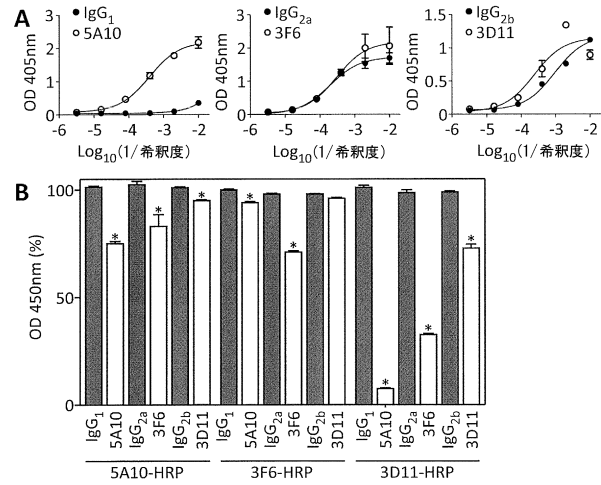
【図 2】



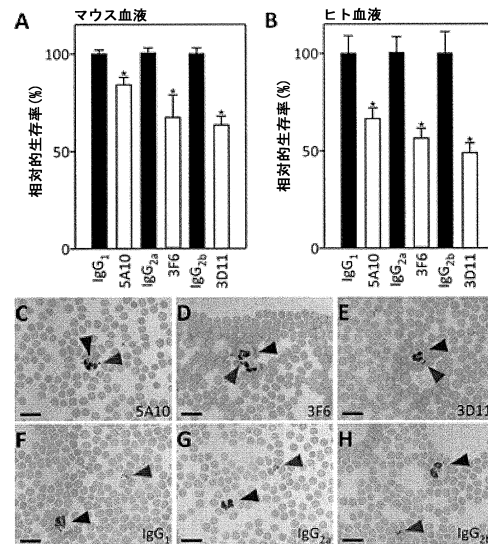
【図 4】



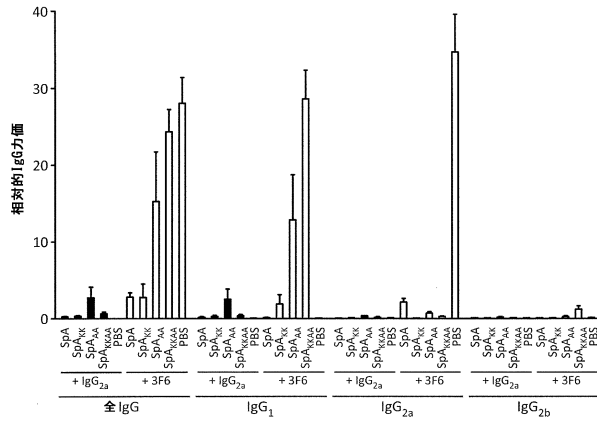
【図 3】



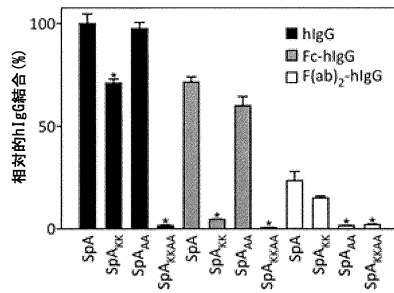
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8 A】

重鎖

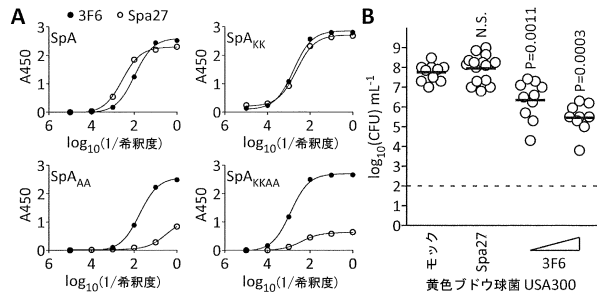
	CDR1	CDR2	CDR3
1B10	GFTFSNYD	ISSGGTYP	ARGGFLITTRDYAMDY
2C3	GFTFSNYD	ISSGGTYP	ARGGFLITTRDYAMDY
5A10	GFAFSNYD	ISSGGTYP	ARGGFLITTRDYAMDY
8E2	GYTFTEYS	FYPGSGYIA	RHGYG-NYV--GYAMDY
3A6	GYNFTDYS	INTETAES	AHFDC-----
7E2	GYTFDYS	INTATGEP	APQLTG--PFAY----
3F6	GFTFNTNA	IRSKSNNYAT	VTEHYD-YDYVMDY
1F10	GNAFTNYL	INPGSGIT	SGSA---N--WFAY-
6D11	GNAFTNYL	INPGSGIT	SGSA---N--WFAY-
3D11	GYSFTSYY	IDPFNGGT	ARYGYD--GT-FYAMDY
5A11	GFTFSDYY	ISDGGTYT	ARDRDYDEGPYFDY-
2F2	RFTFSSYV	IGSGGTTY	RGRGYG--AWYFDV-
8D4	GSTFTNHH	LNPNYDNT	ATITFD--S-----
5A10	GFAFSNYD	ISSGGTYP	ARGGFLITTRDYAMDY
3F6	GFTFNTNA	IRSKSNNYAT	VTEHYD-YDYVMDY
3D11	GYSFTSYY	IDPFNGGT	ARYGYD--GT-FYAMDY

【図 8 B】

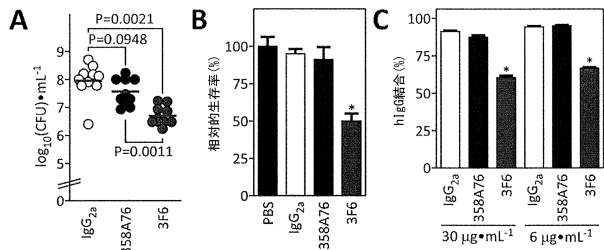
軽鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
5A10	-----SSVS	DTS	QQWSSYPPT
8E2	-----EIIYSY	FAK	QHGYGTPT
3A6	QSLVHSGNTY	KVS	SQITVVPMT
7E2	-----ENIHNY	NAK	QHSWSIPT
3F6	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
1F10	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
6D11	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
3D11	-----SSVS	EIS	QQWSSYP-FT
2F2	-----SSVS	DTS	QQWSSYPPT
4C1	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
6B2	-ESVDYSGASL	AAS	QQRKVPST
2B8	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
4C5	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
5A10	-----SSVS	DTS	QQWSSYPPT
3F6	-ESVEYSGASL	AAS	QQRKVPST
3D11	-----SSVS	EIS	QQWSSYP-FT

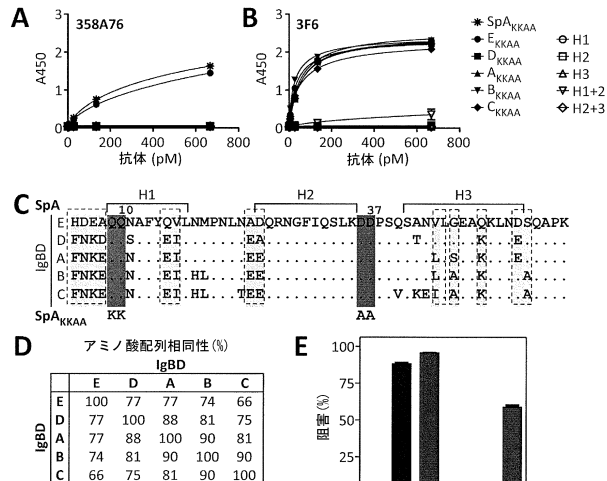
【図 9】



【図 11】



【図 10】



【配列表】

0006317670000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/615,083

(32)優先日 平成24年3月23日(2012.3.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/618,417

(32)優先日 平成24年3月30日(2012.3.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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 シュニーウィンド オラフ

アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス ブラックストーン アベニュー 5 6 2 8

(72)発明者 ミシアカス ドミニク エム.

アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス ブラックストーン アベニュー 5 6 2 8

(72)発明者 キム ファン グン

アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ イースト 第53 906 アpartment #1

(72)発明者 エモロ 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 ザ ユニバーシティ オブ
シカゴ内

(72)発明者 デデント アンドレア

アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ サウス エリス 5801 ザ ユニバーシティ オブ
シカゴ内

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第2011/005341(WO, A1)

J.Exp.Med., 2010年, Vol.207, p.1863-1870

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395 - 39/44

C07K 16/00 - 16/46