

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6403667号  
(P6403667)

(45) 発行日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(24) 登録日 平成30年9月21日(2018.9.21)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>A61K 39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 39/00	H
<b>A61K 39/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 39/02	
<b>A61K 39/385</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 39/00	K
<b>A61K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 39/385	
<b>A61P 31/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K 39/395	C

請求項の数 27 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-515176 (P2015-515176)  
 (86) (22) 出願日 平成25年5月30日 (2013.5.30)  
 (65) 公表番号 特表2015-521202 (P2015-521202A)  
 (43) 公表日 平成27年7月27日 (2015.7.27)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/043283  
 (87) 國際公開番号 WO2013/181348  
 (87) 國際公開日 平成25年12月5日 (2013.12.5)  
 審査請求日 平成28年5月27日 (2016.5.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/827,661  
 (32) 優先日 平成25年5月26日 (2013.5.26)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/653,389  
 (32) 優先日 平成24年5月30日 (2012.5.30)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503146324  
 ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド  
 The Brigham and Women's Hospital, Inc.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州  
 2115 ボストン フランシス ストリート 75  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

前置審査

最終頁に続く

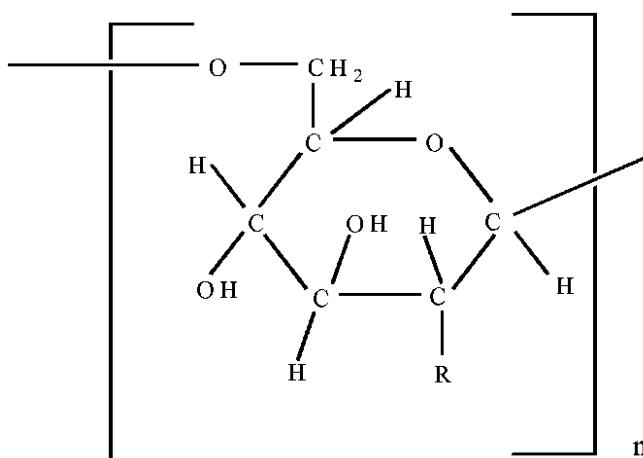
(54) 【発明の名称】多糖組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対する免疫応答を誘導する際に使用するための医薬組成物であって、前記医薬組成物は有効な量の、式

## 【化 8】



10

を有する単離された多糖を含み、式中、nは少なくとも5であり、Rは-NH-CO-C 20

$\text{H}_3$  および  $-\text{NH}_2$  からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  であり、ここで、

(a) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陽性球菌であり、

前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumonia*、A 群 *Streptococcus*、B 群 *Streptococcus* または *Enterococcus* である、

(b) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis* または *M. smegmatis* である、

(c) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

(d) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌または *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

(f) 前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / pga* の PNAG 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 *i ca / pga* の PNAG 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

医薬組成物。

#### 【請求項 2】

前記単離された多糖が、担体とコンジュゲートしており、

必要に応じて、前記単離された多糖がリンカーを介して前記担体とコンジュゲートしており、

さらに必要に応じて、前記担体がペプチド担体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

#### 【請求項 3】

(a) R基の30%未満、20%未満、10%未満または5%未満が  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  である、および / あるいは

(b) 前記 R基のいずれも  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  ではない、および / あるいは

(c) n が少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 200、少なくとも 300、少なくとも 400 または少なくとも 500 である、および / あるいは

(d) 前記単離された多糖が 100 ~ 500 kDa の分子量を有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

#### 【請求項 4】

10

20

30

40

50

前記単離された多糖がアジュバントと一緒に使用され、  
必要に応じて、

- ( a ) 全身投与のために、または
- ( b ) 局所投与のために

製剤化されるものであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対する免疫応答を誘導する際に使用するための医薬組成物であって P N A G 特異的抗体の有効量を含み、ここで、

( a ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumonia*、A 群 *Streptococcus*、B 群 *Streptococcus* または *Enterococcus* である、

( b ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis* または *M. smegmatis* である、

( c ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

( d ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌または *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌である、

( e ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

( f ) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

医薬組成物。

【請求項 6】

前記抗体が

- ( a ) 全身投与のために、または
- ( b ) 局所投与のために

製剤化され、

必要に応じて前記抗体が

- ( a ) F 5 9 8 ( A T C C P T A - 5 9 3 1 ) 抗体、

10

20

30

40

50

(b) F 6 2 8 (ATCC PTA-5932) 抗体、あるいは  
 (c) F 6 3 0 (ATCC PTA-5933) 抗体  
 であり、

さらに必要に応じて、前記抗体が薬剤とコンジュゲートしており、  
 必要に応じて、前記薬剤が細胞毒性剤である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

(a) 前記非icα/pgαのPNAG陽性病原体が、S. pneumoniaeである  
 、  
 (b) 前記非icα/pgαのPNAG陽性病原体が、M. tuberculosis  
 である、あるいは  
 (c) 前記非icα/pgαのPNAG陽性病原体が、Neisseria meningitidis、またはNeisseria gonorrhoeaeである、  
 請求項1~6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記対象が

(a) ヒト、あるいは  
 (b) 精長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである、請求項1~7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記対象が

(a) 非icα/pgαのPNAG陽性病原体による感染症を有する、または  
 (b) 非icα/pgαのPNAG陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、  
 請求項1~8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

感染症を処置または予防する際に使用するための、請求項1~9のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

濃縮した微生物細胞体調製物から粗製多糖調製物をエタノール沈殿させることと；

前記粗製多糖をリゾチームおよびリソスタフィンで同時に消化し、続いてヌクレアーゼおよびプロテイナーゼKで逐次的に消化して、消化された多糖調製物を形成することと；

前記消化された多糖調製物をサイズ分画することと；

アセチル化多糖画分を単離することと；

前記アセチル化多糖画分を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有するPNAG多糖を生成することと

を含み、前記微生物細胞体調製物が非icα/pgαのPNAG陽性微生物から誘導される方法であって、ここで、

(a) 前記非icα/pgαのPNAG陽性微生物が、非icα/pgαのPNAG陽性グラム陽性球菌であり、

前記非icα/pgαのPNAG陽性グラム陽性球菌が、S. pneumoniae、A群Streptococcus、B群StreptococcusまたはEnterococcusである、

(b) 前記非icα/pgαのPNAG陽性微生物が、非icα/pgαのPNAG陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非icα/pgαのPNAG陽性グラム陽性桿菌が、Listeria、Clostridium difficile、B. subtilis、M. tuberculosisまたはM. smegmatisである、

(c) 前記非icα/pgαのPNAG陽性微生物が、非icα/pgαのPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非icα/pgαのPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、Neisseria meningitidis、Neisseria gonorrhoeae、型別

10

20

30

40

50

不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

(d) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotamycin*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌または *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性真菌であり、10

必要に応じて、前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

(f) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

方法。

【請求項 12】20

微生物培養物から不純な多糖を調製することであって、前記微生物培養物が非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物培養物である、ことと；

前記不純な多糖を酸または塩基とともにインキュベートして半純粋な多糖調製物を生成することと；

前記調製物を中和することと；

中和された前記調製物をフッ化水素酸中でインキュベートすることと；

(a) 前記調製物からアセチル化多糖を単離し、そして前記アセチル化多糖を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有する PNAG 多糖を生成すること、または

(b) 前記調製物から 50%未満のアセテート置換を有する PNAG 多糖を単離することのいずれかと30

を含む、方法であって、ここで、

(a) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陽性球菌であり、

前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumonia*、A 群 *Streptococcus*、B 群 *Streptococcus* または *Enterococcus* である、

(b) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis* または *M. smegmatis* である、40

(c) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

(d) 前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性微生物が、非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 *ica / pga* の PNAG 陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides f* 50

*ragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌または*Salmonella enterica*血清型ネズミチフス菌である。

(e) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性微生物が、*icα/pga*のPNAG陽性真菌であり、

必要に応じて、前記*non-icα/pga*のPNAG陽性真菌が、*Candida albicans*（酵母）、*Candida albicans*（菌糸）、*Aspergillus*、*Fusarium*または*Cryptococcus*である、あるいは

(f) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性微生物が、*icα/pga*のPNAG陽性寄生虫であり、10

必要に応じて、前記*non-icα/pga*のPNAG陽性寄生虫が、*P. berghei*または*P. falciparum*である、

方法。

【請求項13】

担体を前記単離された多糖とコンジュゲートさせることをさらに含み、

必要に応じて、前記担体がペプチド担体であり、

さらに必要に応じて、前記アセチル化多糖が

(a) 化学的に脱アセチル化されており、必要に応じて、前記アセチル化多糖が塩基性溶液とのインキュベーションによって脱アセチル化されている、あるいは20

(b) 酵素によって脱アセチル化されている、請求項11および12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

非ヒト対象に、抗体生成のために有効な量の、*icα/pga*のPNAG陽性病原体から単離されたPNAG多糖、およびアジュvantを投与することと、

前記対象から抗体を単離することと

を含み、必要に応じて、前記抗体がポリクローナル抗体である、抗体の生成方法であって、ここで、

(a) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性病原体が、*icα/pga*のPNAG陽性グラム陽性球菌であり、30

前記*non-icα/pga*のPNAG陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumonia*、A群*Streptococcus*、B群*Streptococcus*または*Enterococcus*である、

(b) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性病原体が、*icα/pga*のPNAG陽性グラム陽性桿菌であり、

前記*non-icα/pga*のPNAG陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis*または*M. smegmatis*である、

(c) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性病原体が、*icα/pga*のPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、40

前記*non-icα/pga*のPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の*H. influenzae*、*Helicobacter*または*Campylobacter*である、

(d) 前記*non-icα/pga*のPNAG陽性病原体が、*icα/pga*のPNAG陽性グラム陰性桿菌であり、

前記*non-icα/pga*のPNAG陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌または*Salmonella enteri*50

c a 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium*または*Cryptococcus*である、あるいは

(f) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

方法。

【請求項 15】

非ヒト対象に、抗体生成のために有効な量の、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体から単離された P N A G 多糖、およびアジュバントを投与することと、

前記対象から脾細胞を収集することと、

前記対象からの脾細胞を骨髄腫細胞と融合させることと、

融合サブクローニングから生成された抗体を収集することと  
を含む、モノクローナル抗体の生成方法であって、ここで、

(a) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumoniae*、A 群 *Streptococcus*、B 群 *Streptococcus* または *Enterococcus* である、

(b) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis* または *M. smegmatis* である、

(c) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

(d) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌または *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

(f) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 16】

- (a) 前記 P N A G 多糖が 50% 未満アセチル化されている、および / または
- (b) 抗体を単離することをさらに含む、および / または
- (c) 前記対象がウサギである、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を検出するための方法であって、  
非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を含有することが疑われる試料を、 P N A G 特異的抗体と接触させることと、  
前記抗体と前記試料との結合を検出することと  
を含み、前記抗体の結合が、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が前記試料中に  
存在することを示し、  
必要に応じて、

(a) 前記試料が *Staphylococcus* 陰性である、および / あるいは  
(b) 前記試料が対象からの生体試料であり、必要に応じて、前記生体試料が尿、血液  
、膿、皮膚、痰、関節液、リンパまたは乳汁である、および / あるいは  
(c) 前記抗体が検出可能な標識とコンジュゲートしており、ここで、  
(a) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性グラム陽性球菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌が、 *S. pneumoniae*、A  
群 *Streptococcus*、B 群 *Streptococcus* または *Enterococcus*  
である、

(b) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性グラム陽性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌が、 *Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis* または *M. smegmatis* である、

(c) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、 *Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別  
不能の *H. influenzae*、*Helicobacter* または *Campylobacter* である、

(d) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性グラム陰性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌が、 *Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌または *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性真菌であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌が、 *Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

(f) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽  
性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫が、 *P. berghei* または *P. falciparum* である、

方法。

10

20

30

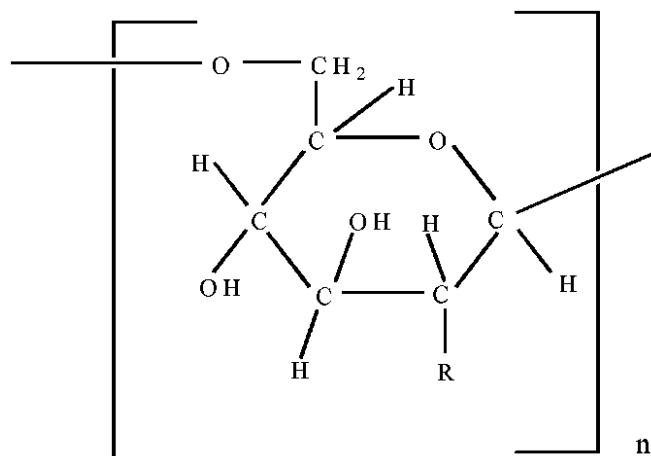
40

50

## 【請求項 18】

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造における、式

## 【化 8】



10

を有する単離された多糖の使用であって、式中、nは少なくとも5であり、Rは-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>であり、ここで、

20

(a) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性球菌が、S. pneumonia、A群 S. streptococcus、B群 S. streptococcus または Enterococcus である、

(b) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陽性桿菌が、Listeria、Clostridium difficile、B. subtilis、M. tuberculosis または M. smegmatis である、

30

(c) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、Neisseria meningitidis、Neisseria gonorrhoeae、型別不能の H. influenzae、Helicobacter または Campylobacter である、

(d) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性グラム陰性桿菌が、Bacteroides fragilis、B. thetaiotaomicron、B. vulgaris、Citrobacter rodentium、Vibrio cholera、Salmonella enterica 血清型チフス菌または Salmonella enterica 血清型ネズミチフス菌である、

40

(e) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌が、Candida albicans (酵母)、Candida albicans (菌糸)、Aspergillus、Fusarium または Cryptococcus である、あるいは

(f) 前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体が、非 i c a / p g a の P N A G 陽

50

性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非i c a / p g aのP N A G陽性寄生虫が、P . b e r g e iまたはP . f a l c i p a r u mである、  
使用。

【請求項 19】

前記単離された多糖が、担体とコンジュゲートしており、  
必要に応じて、前記単離された多糖がリンカーを介して前記担体とコンジュゲートしており、  
さらに必要に応じて、前記担体がペプチド担体である、請求項 1 8 に記載の使用。

【請求項 20】

( a ) R 基の 3 0 % 未満、 2 0 % 未満、 1 0 % 未満または 5 % 未満が - N H - C O - C H <sub>3</sub> である、および / あるいは  
( b ) 前記 R 基のいずれも - N H - C O - C H <sub>3</sub> ではない、および / あるいは  
( c ) n が少なくとも 1 5 、少なくとも 2 0 、少なくとも 5 0 、少なくとも 1 0 0 、少なくとも 2 0 0 、少なくとも 3 0 0 、少なくとも 4 0 0 または少なくとも 5 0 0 である、  
および / あるいは  
( d ) 前記単離された多糖が 1 0 0 ~ 5 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 1 8 または請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 21】

前記単離された多糖がアジュバントと一緒に使用され、  
必要に応じて、前記医薬が、  
( a ) 全身投与のために、または  
( b ) 局所投与のために  
製剤化されるものであることを特徴とする、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 22】

非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造における、P N A G特異的抗体の使用であって、ここで、

( a ) 前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌であり、

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌が、S . p n e u m o n i a 、A 群S t r e p t o c o c c u s 、B 群S t r e p t o c o c c u s またはE n t e r o c o c c u s である、

( b ) 前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌であり、

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌が、L i s t e r i a 、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e 、B . s u b t i l i s 、M . t u b e r c u l o s i s またはM . s m e g m a t i s である、

( c ) 前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌であり、

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s 、N e i s s e r i a g o n o r r h o e a e 、型別不能のH . i n f l u e n z a e 、H e l i c o b a c t e r またはC a m p y l o b a c t e r である、

( d ) 前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌であり、

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌が、B a c t e r o i d e s f r a g i l i s 、B . t h e t a i o t a m i c r o n 、B . v u l g a t i s 、C i t r o b a c t e r r o d e n t i u m 、V i b r i o c h o l e r a 、S a l m o n

10

20

30

40

50

ella enterica 血清型チフス菌または Salmonella enterica 血清型ネズミチフス菌である、

(e) 前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性真菌であり、

必要に応じて、前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium* または *Cryptococcus* である、あるいは

(f) 前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体が、非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性寄生虫であり、

必要に応じて、前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性寄生虫が、*P. berghei* または *P. falciparum* である、

使用。

【請求項 23】

前記医薬が

(a) 全身投与のために、または

(b) 局所投与のために

製剤化されるものであり、

必要に応じて前記抗体が

(a) F598 (ATCC PTA-5931) 抗体、

(b) F628 (ATCC PTA-5932) 抗体、あるいは

(c) F630 (ATCC PTA-5933) 抗体

であり、

さらに必要に応じて、前記抗体が薬剤とコンジュゲートしており、

必要に応じて、前記薬剤が細胞毒性剤である、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

(a) 前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体が、*S. pneumoniae* である、

(b) 前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体が、*M. tuberculosis* である、あるいは

(c) 前記非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体が、*Neisseria meningitidis*、または *Neisseria gonorrhoeae* である、

請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 25】

前記対象が

(a) ヒト、あるいは

(b) 灵長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコ

である、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 26】

前記対象が

(a) 非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体による感染症を有する、または

(b) 非 *i ca / p g a* の PNAG 陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、

請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 27】

前記医薬が感染症を処置または予防するために製剤化されるものであることを特徴とする、請求項 18 ~ 26 のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2012年5月30日に出願した米国仮出願第 61/653389 号および 2

10

20

30

40

50

013年5月26日に出願した米国仮出願第61/827661号の利益を主張する。請求項以外のこれらの仮出願の内容は、本明細書に参考として援用される。

#### 【0002】

##### 政府援助

本発明は、NIH (NIAID) からの補助金番号R01 AI046706によって一部援助された。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

#### 【0003】

##### 発明の分野

本発明は、特定の病原体による感染症の検出、予防および/または処置における、特定の多糖抗原および抗体組成物の使用に関する。

10

#### 【背景技術】

#### 【0004】

##### 発明の背景

性質が細菌であれ、ウイルスであれ、真菌であれ、寄生虫であるにせよ、様々な感染症のために免疫療法を開発することは優先順位が高い。現在の多くの免疫療法は、種特異抗原を通して特定の微生物種を標的にする。広い範囲の微生物を標的にし、それらに有効である免疫療法は、一般性がより低い。

#### 【0005】

*Staphylococcus aureus* および *S. epidermidis* は、それらの表面にポリN-アセチルグルコサミン (PNAG) 多糖抗原を発現する。PNAGは、これらの細菌では *ica* 遺伝子座の遺伝子生成物によって *in vivo* で合成される。同様に、*Escherichia coli* および他のグラム陰性菌は、PNAGを合成するために使用することができるタンパク質の合成を同じくコードする、*pga* 遺伝子座と呼ばれる相同的遺伝子座を含有する。したがって、無傷の *ica* または *pga* 遺伝子座を有する細菌は、PNAGを生成することができる。オプソニン抗体の誘導によって一部特徴付けられる抗原特異的免疫応答を刺激することにおいて、この抗原の脱アセチル化形が特に有効であることが以前に見出された。

20

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

30

本発明は、多糖ポリN-アセチルグルコサミン (PNAG) が、この多糖を発現することが以前に公知でなかったか示唆されなかった、いくつかの様々な病原体によって発現されるという予想外で意外な知見に一部基づく。したがって本発明は、これらの特定の病原体による感染症の予防および/または処置で使用するための、ならびに任意選択で、そのような感染症から生じるかもしれない疾患または障害の処置および/または予防で使用するための、この多糖に特異的なこの多糖または抗体を含む組成物を提供する。

#### 【0007】

驚くべきことに、本発明により、PNAGを発現することが見出された病原体は、いくつかのクラスおよびタイプにわたる。これらのクラスおよび具体的な病原体は、以下の通りである：(a) グラム陽性球菌：*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*などのA群*Streptococcus*属、*Streptococcus agalactiae*などのB群*Streptococcus*属、および*Streptococcus dysagalactiae*などのC群*Streptococcus*属、および*Enterococcus faecalis*のワクチンおよび非ワクチン株；(b) グラム陽性桿菌：*Listeria monocytogenes*、*Clostridium difficile*、*Bacillus subtilis*、*Mycobacterium tuberculosis*および*M. smegmatis*；(c) グラム陰性球菌および球桿菌：*Neisseria meningitidis*、*N. gonorrhoeae*、型別不能の*Hemophilus influenzae*、*Hemophilus ducreyi*、*Helicobac*

40

50

ter pylori および *Campylobacter jejuni* ; (d) グラム陰性桿菌: *Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella enterica* 血清型チフス菌および *Salmonella enterica* 血清型ネズミチフス菌 ; (e) 真菌類: *Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus flavus*、*Fusarium* 属の種、例えば *Fusarium solani*、および *Cryptococcus neoformans* ; ならびに (f) 寄生虫: *Plasmodium berghei* および *P. falciparum* (スボロゾイトを含む) ; および *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*)。それらのいずれも、特定の細菌で P N A G および関連する多糖の合成に関与するタンパク質をコードする、*Staphylococci* の *ica* 遺伝子座または *E. coli* の *pgal* 遺伝子座に関連する識別可能な遺伝子座を有しないので、これらの病原体による P N A G 発現は特に意外である。したがってこれらの病原体は、それらが識別可能な *ica* または *pgal* 遺伝子座を有しないことを示すために、非 *ica* / *pgal* 病原体と本明細書において呼ばれる。

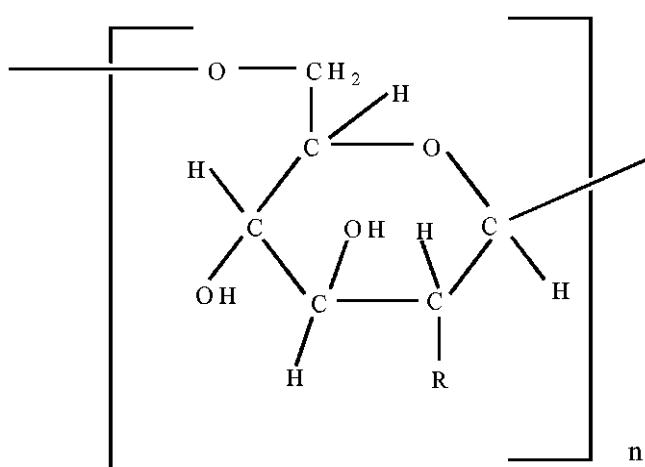
〔 0 0 0 8 〕

本発明は、例えばP N A Gに特異的な抗体を使用して前述の病原体のいずれかを検出する方法も提供する。

[ 0 0 0 9 ]

したがって、一態様で本発明は、非 i c a / p g a であるが P N A G 陽性である病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、病原体に対して免疫応答を誘導するのに有効な量の、式

### 【化 1】

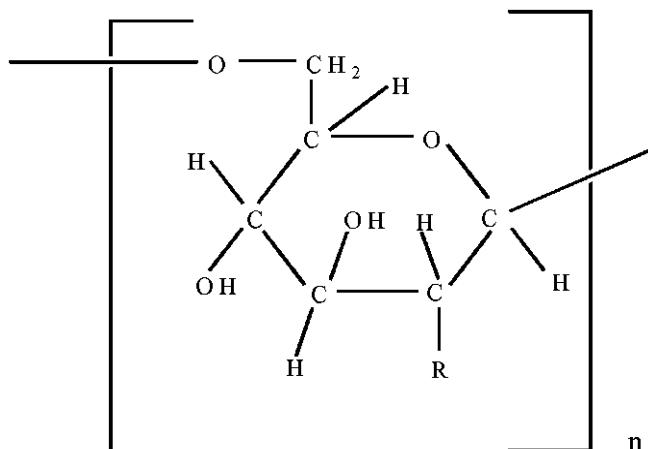


を有する単離された多糖を投与することを含み、式中、nは少なくとも5であり、Rは、-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>である方法を提供する。

[ 0 0 1 0 ]

別の態様では、本発明は、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、病原体に対して免疫応答を誘導するのに有効な量の、担体とコンジュゲートしている単離された多糖を投与することを含み、多糖が式

## 【化2】



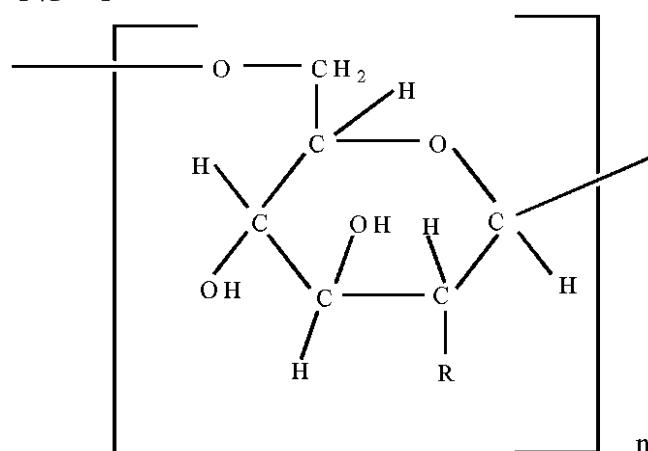
10

を有し、式中、nは5以上であり、Rは- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ および- $\text{NH}_2$ からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ である方法を提供する。

## 【0011】

別の態様では、本発明は、対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための医薬組成物であって、式

## 【化3】



20

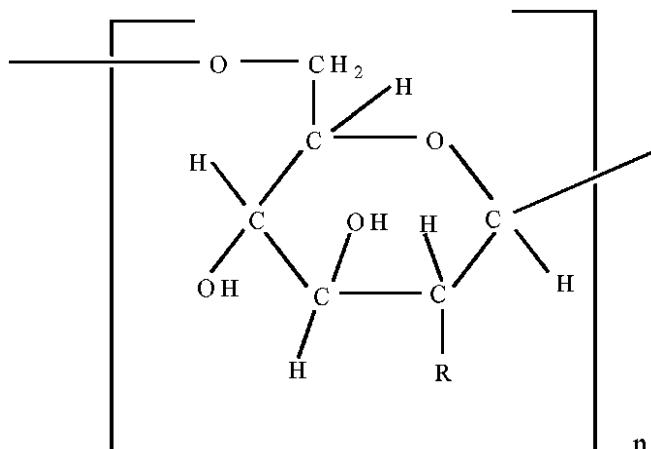
30

を有する単離された多糖を含み、式中、nは少なくとも5であり、Rは- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ および- $\text{NH}_2$ からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ である、医薬組成物を提供する。

## 【0012】

別の態様では、本発明は、対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための医薬組成物であって、担体とコンジュゲートしている単離された多糖を含み、多糖が式

## 【化4】



10

を有し、式中、nは5以上であり、Rは- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ および- $\text{NH}_2$ からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ である、医薬組成物を提供する。

## 【0013】

一部の実施形態では、単離された多糖は、リンカーを介して担体とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、担体はペプチド担体である。各多糖は、1つまたは複数の担体とコンジュゲートしていくてもよい。担体は、多糖であってもよい。一部の実施形態では、担体多糖は、N-アセチルベータ(1-6)グルコサミンではない。

20

## 【0014】

一部の実施形態では、R基の45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下は- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ である。一部の実施形態では、R基のいずれも- $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ ではない。

## 【0015】

一部の実施形態では、nは少なくとも9、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500である。

## 【0016】

30

一部の実施形態では、単離された多糖は、100~500kDaの分子量を有する。一部の実施形態では、単離された多糖は、少なくとも900ダルトン、少なくとも2000ダルトン、少なくとも2500ダルトン、少なくとも5000ダルトン、少なくとも7500ダルトン、少なくとも10,000ダルトン、少なくとも25,000ダルトン、少なくとも50,000ダルトン、少なくとも75,000ダルトン、少なくとも100,000ダルトン、少なくとも125,000ダルトン、少なくとも150,000ダルトン、少なくとも200,000ダルトン、少なくとも250,000ダルトン、少なくとも300,000ダルトン、少なくとも350,000ダルトン、少なくとも400,000ダルトン、少なくとも450,000ダルトンまたは少なくとも500,000ダルトンの分子量を有する。

40

## 【0017】

一部の実施形態では、単離された多糖はアジュバントと一緒に投与されるか製剤化され、またはアジュバントと併用される。

## 【0018】

一部の実施形態では、単離された多糖は全身に投与されるか、全身投与のために製剤化される。一部の実施形態では、単離された多糖は局所に投与されるか、局所投与のために製剤化される。

## 【0019】

一部の実施形態では、単離された多糖は、薬学的に許容される担体をさらに含む組成物で提供される。

50

**【0020】**

別の態様では、本発明は、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、有効量のP N A G特異的抗体またはP N A G特異的抗体断片を投与することを含む方法を提供する。

**【0021】**

別の態様では、本発明は、対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための、P N A G特異的抗体またはP N A G特異的抗体断片を含む医薬組成物を提供する。

**【0022】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌は、*S. pneumonia*、A群*Streptococcus*、B群*Streptococcus*、C群*Streptococcus*または*Enterococcus*である。  
10

**【0023】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌は、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis*または*M. smegmatis*である。  
20

**【0024】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌は、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の*H. influenzae*、*Helicobacter*属の種または*Campylobacter*属の種である。

**【0025】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌は、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌および*Salmonella enterica*血清型ネズミチフス菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性真菌である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性真菌は、*Candida albicans*（酵母）、*Candida albicans*（菌糸）、*Aspergillus*、*Fusarium*または*Cryptococcus*である。  
30

**【0026】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、非i c a / p g aのP N A G陽性寄生虫である。一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性寄生虫は、*P. berghei*または*P. falciparum*である。  
40

**【0027】**

一部の実施形態では、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、*T. vaginalis*である。

**【0028】**

一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、対象は靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである。

**【0029】**

50

20

30

40

50

一部の実施形態では、対象は非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を有する。一部の実施形態では、対象は非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を発症するリスクがある。

#### 【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、抗体または抗体断片は全身に投与されるか、全身投与のために製剤化される。一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、局所に投与されるか、局所投与のために製剤化される。

#### 【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は、濃縮した微生物細胞体調製物から粗製多糖調製物をエタノール沈殿させることと；粗製多糖をリゾチームおよびリソスタフィンで同時に消化し、続いてヌクレアーゼおよびプロテイナーゼ K で逐次的に消化して、消化された多糖調製物を形成することと；消化された多糖調製物をサイズ分画することと；アセチル化多糖画分を単離することと；アセチル化多糖画分を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を生成することとを含み、微生物細胞体調製物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物から誘導される方法を提供する。一部の実施形態では、多糖調製物は、カラムを用いてサイズ分画される。一部の実施形態では、この方法は、40%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を生成する。

10

#### 【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、微生物培養物から不純な多糖を調製することと；不純な多糖を酸または塩基とともにインキュベートして半純粋な多糖調製物を生成することと；調製物を中和することと；中和された調製物をフッ化水素酸中でインキュベートすることと；調製物からアセチル化多糖を単離することと；アセチル化多糖を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を生成することとを含み、微生物培養物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物培養物である方法を提供する。一部の実施形態では、この方法は、40%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を生成する。

20

#### 【 0 0 3 3 】

別の態様では、本発明は、微生物培養物から不純な多糖を調製することと；不純な多糖を酸または塩基とともにインキュベートして半純粋な多糖調製物を生成することと；調製物を中和することと；中和された調製物をフッ化水素酸中でインキュベートすることと；調製物から 50%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を単離することとを含み、微生物培養物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物培養物である方法を提供する。一部の実施形態では、40%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖が単離される。

30

#### 【 0 0 3 4 】

一部の実施形態では、方法は、担体を単離された多糖とコンジュゲートさせることをさらに含む。一部の実施形態では、担体はペプチド担体である。

#### 【 0 0 3 5 】

一部の実施形態では、アセチル化多糖は化学的に脱アセチル化されている。

#### 【 0 0 3 6 】

一部の実施形態では、アセチル化多糖は塩基性溶液とのインキュベーションによって脱アセチル化されている。一部の実施形態では、アセチル化多糖は酵素によって脱アセチル化されている。

40

#### 【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明は、対象に、抗体生成のために有効な量の、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体から単離された P N A G 多糖、およびアジュvantを投与することと、対象から抗体を単離することとを含む、抗体の生成方法を提供する。一部の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体である。

#### 【 0 0 3 8 】

別の態様では、本発明は、対象に、抗体生成のために有効な量の、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体から単離された P N A G 多糖、およびアジュvantを投与することと、対象から脾細胞を収集することと、対象からの脾細胞を骨髄腫細胞と融合させることと

50

、融合サブクローンから生成された抗体を収集することとを含む、モノクローナル抗体の生成方法を提供する。

【0039】

一部の実施形態では、方法は抗体を単離することをさらに含む。

【0040】

一部の実施形態では、P N A G多糖は50%未満アセチル化されている。

【0041】

一部の実施形態では、対象はウサギである。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0042】

別の態様では、本発明は、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体を検出するための方法であって、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体を含有することが疑われる試料を、P N A G特異的抗体または抗体断片と接触させることと、抗体または抗体断片と試料との結合を検出することとを含み、抗体または抗体断片の結合が、非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が試料中に存在することを示す、方法を提供する。 10

【0043】

一部の実施形態では、試料はS t a p h y l o c o c c u s陰性である。

【0044】

一部の実施形態では、試料は対象からの生体試料である。一部の実施形態では、生体試料は尿、血液、膿、皮膚、痰、関節液、リンパまたは乳汁である。一部の実施形態では、試料は、植込み型であるか植え込まれた医療器具、または1種の医療機器、または患者ケア施設内の表面のスワブに由来する。 20

【0045】

一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、またはその断片である。一部の実施形態では、抗体はヒト抗体である。一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、F 5 9 8 ( A T C C P T A - 5 9 3 1 )抗体またはその断片である。一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、F 6 2 8 ( A T C C P T A - 5 9 3 2 )抗体またはその断片である。一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、F 6 3 0 ( A T C C P T A - 5 9 3 3 )抗体またはその断片である。一部の場合には、P N A Gに対するポリクローナル抗血清を使用することもできる。 30

【0046】

一部の実施形態では、抗体または抗体断片は、薬剤とコンジュゲートしている。

【0047】

一部の実施形態では、薬剤は、抗生物質または放射性同位体などの細胞毒性剤である。一部の実施形態では、薬剤は検出可能な標識である。一部の実施形態では、検出可能な標識は、放射性標識、酵素、ビオチン分子、アビジン分子または蛍光色素である。

【0048】

本発明の限定の各々は、本発明の様々な実施形態を包含することができる。したがって、任意の1つの要素または要素の組合せが関与する本発明の限定の各々が、本発明の各々の態様に含まれる可能性があることが予期される。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対して免疫応答を誘導するのに有効な量の、式

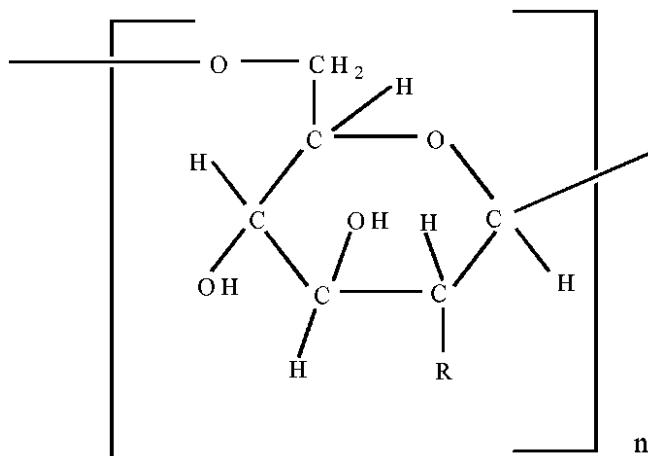
10

20

30

40

## 【化8】



10

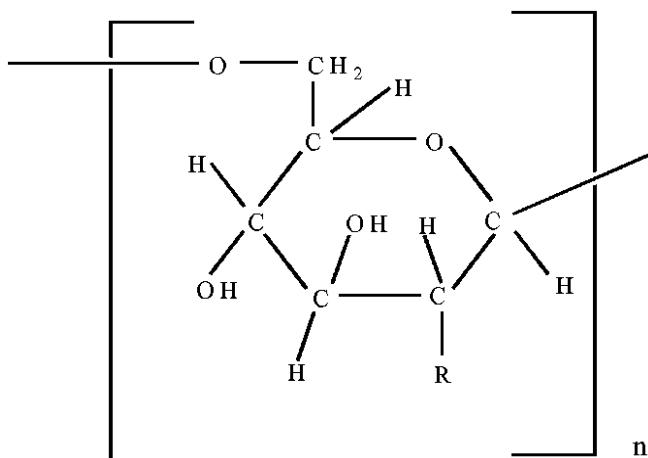
を有する単離された多糖を投与することを含み、式中、nは少なくとも5であり、Rは-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>である方法。

(項目2)

非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象に、前記病原体に対して免疫応答を誘導するのに有効な量の、担体とコンジュゲートしている単離された多糖を投与することを含み、前記多糖が式

20

## 【化9】



30

を有し、式中、nは5以上であり、Rは-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>である方法。

(項目3)

前記単離された多糖がリンカーを介して前記担体とコンジュゲートしている、項目2に記載の方法。

40

(項目4)

前記担体がペプチド担体である、項目2または3に記載の方法。

(項目5)

R基の30%未満、20%未満、10%未満または5%未満が-NH-CO-CH<sub>3</sub>である、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

前記R基のいずれも-NH-CO-CH<sub>3</sub>ではない、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

nが少なくとも15、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくと

50

も200、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500である、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記単離された多糖が100～500kDaの分子量を有する、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陽性球菌である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陽性球菌が、*S. pneumonia*、A群*Streptococcus*、B群*Streptococcus*または*Enterococcus*である、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陽性桿菌である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陽性桿菌が、*Listeria*、*Clostridium difficile*、*B. subtilis*、*M. tuberculosis*または*M. smegmatis*である、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の*H. influenzae*、*Helicobacter*または*Campylobacter*である、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陰性桿菌である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌または*Salmonella enterica*血清型ネズミチフス菌である、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性真菌である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性真菌が、*Candida albicans*(酵母)、*Candida albicans*(菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium*または*Cryptococcus*である、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性病原体が、*非i c a / p g a*のPNAG陽性寄生虫である、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記*非i c a / p g a*のPNAG陽性寄生虫が、*P. berghei*または*P. falci parum*である、項目19に記載の方法。

(項目21)

10

20

30

40

50

前記対象がヒトである、前記項目のいずれか一項に記載の方法。  
 (項目22)

前記対象が靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有する、項目1～22のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、項目1～22のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記単離された多糖がアジュバントと一緒に投与される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記単離された多糖が全身に投与される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

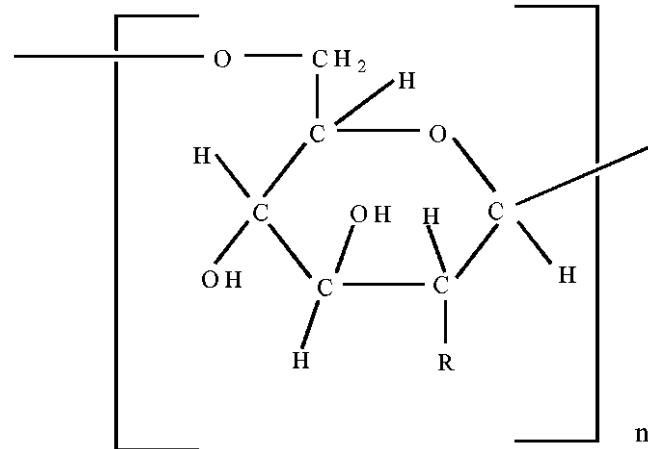
(項目27)

前記単離された多糖が局所に投与される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための医薬組成物であって、式

【化10】



を有する単離された多糖を含み、式中、nは少なくとも5であり、Rは-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>である、医薬組成物。

(項目29)

対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための医薬組成物であって、担体とコンジュゲートしている単離された多糖を含み、前記多糖が式

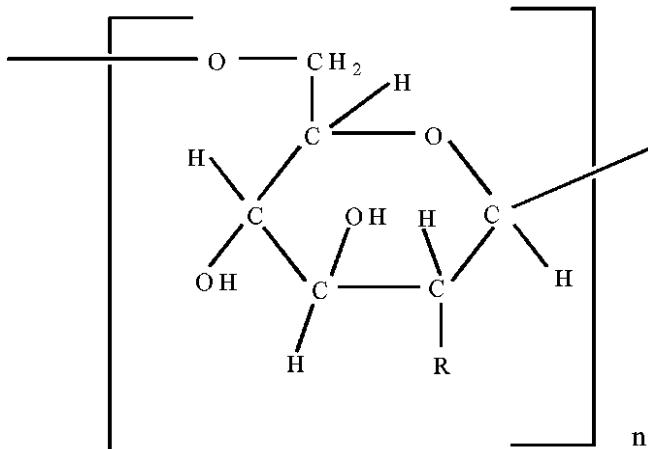
10

20

30

40

## 【化11】



10

を有し、式中、nは5以上であり、Rは-NH-CO-CH<sub>3</sub>および-NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、ただし、R基の50%未満は-NH-CO-CH<sub>3</sub>である、医薬組成物。

(項目30)

前記単離された多糖がリンカーを介して前記担体とコンジュゲートしている、項目29に記載の医薬組成物。

(項目31)

20

前記担体がペプチド担体である、項目29または30に記載の医薬組成物。

(項目32)

R基の30%未満、20%未満、10%未満または5%未満が-NH-CO-CH<sub>3</sub>である、項目28～31のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目33)

前記R基のいずれも-NH-CO-CH<sub>3</sub>ではない、項目28～32のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目34)

nが少なくとも15、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400または少なくとも500である、項目28～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

(項目35)

前記単離された多糖が100～500kDaの分子量を有する、項目28～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目36)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目37)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌が、S. pneumonia、A群S t r e p t o c o c c u s、B群S t r e p t o c o c c u sまたはE n t e r o c o c c u sである、項目36に記載の医薬組成物。

40

(項目38)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目39)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌が、L i s t e r i a、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e、B. s u b t i l i s、M. t u b e r c u l o s i sまたはM. s m e g m a t i sである、項目38に記載の医薬組成物。

(項目40)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラ

50

ム陰性球菌または球桿菌である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目41)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の*H. Influenzae*、*Helicobacter*または*Campylobacter*である、項目40に記載の医薬組成物。

(項目42)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目43)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌が、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholera*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌または*Salmonella enterica*血清型ネズミチフス菌である、項目42に記載の医薬組成物。

(項目44)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性真菌である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目45)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性真菌が、*Candida albicans* (酵母)、*Candida albicans* (菌糸)、*Aspergillus*、*Fusarium*または*Cryptococcus*である、項目44に記載の医薬組成物。

(項目46)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性寄生虫である、項目28～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目47)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性寄生虫が、*P. berghei*または*P. falci parum*である、項目46に記載の医薬組成物。

(項目48)

前記対象がヒトである、項目28～47のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目49)

前記対象が靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである、前記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目50)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有する、項目28～49のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目51)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、項目28～49のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目52)

前記単離された多糖がアジュバントと一緒に使用される、項目28～51のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目53)

前記単離された多糖が全身投与のために製剤化される、項目28～52のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目54)

前記単離された多糖が局所投与のために製剤化される、項目28～52のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目55)

非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有するか、またはその発症のリ

10

20

30

40

50

スクがある対象に、P N A G 特異的抗体またはP N A G 特異的抗体断片の有効量を投与すること  
を含む方法。

(項目 5 6 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陽性球菌である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陽性球菌が、S . p n e u m o n i a 、A 群S t r e p t o c o c c u s 、B 群S t r e p t o c o c c u s またはE n t e r o c o c c u s である、項目 5 6 に記載の方法。

10

(項目 5 8 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陽性桿菌である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 9 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陽性桿菌が、L i s t e r i a 、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e 、B . s u b t i l i s 、M . t u b e r c u l o s i s またはM . s m e g m a t i s である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌である、項目 5 5 に記載の方法。

20

(項目 6 1 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s 、N e i s s e r i a g o n o r r h o e a e 、型別不能のH . I n f l u e n z a e 、H e l i c o b a c t e r またはC a m p y l o b a c t e r である、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陰性桿菌である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 3 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性グラム陰性桿菌が、B a c t e r o i d e s f r a g i l i s 、B . t h e t a i o t a m i c r o n 、B . v u l g a t i s 、C i t r o b a c t e r r o d e n t i u m 、V i b r i o c h o l e r a 、S a l m o n e l l a e n t e r i c a 血清型チフス菌またはS a l m o n e l l a e n t e r i c a 血清型ネズミチフス菌である、項目 6 2 に記載の方法。

30

(項目 6 4 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性真菌である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 5 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性真菌が、C a n d i d a a l b i c a n s (酵母)、C a n d i d a a l b i c a n s (菌糸)、A s p e r g i l l u s 、F u s a r i u m またはC r y p t o c o c c u s である、項目 6 4 に記載の方法。

40

(項目 6 6 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性病原体が、非i c a / p g a のP N A G 陽性寄生虫である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 7 )

前記非i c a / p g a のP N A G 陽性寄生虫が、P . b e r g e i またはP . f a l c i p a r u m である、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8 )

前記対象がヒトである、項目 5 5 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9 )

50

前記対象が靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである、項目55～67のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を有する、項目55～69のいずれか一項に記載の方法。

(項目71)

前記対象が非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、項目55～69のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

前記抗体または抗体断片が全身に投与される、項目55～71のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目73)

前記抗体または抗体断片が局所に投与される、項目55～71のいずれか一項に記載の方法。

(項目74)

前記抗体または抗体断片がF598 (ATCC PTA-5931)抗体またはその断片である、項目55～73のいずれか一項に記載の方法。

(項目75)

前記抗体または抗体断片がF628 (ATCC PTA-5932)抗体またはその断片である、項目55～73のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目76)

前記抗体または抗体断片がF630 (ATCC PTA-5933)抗体またはその断片である、項目55～73のいずれか一項に記載の方法。

(項目77)

前記抗体または抗体断片が薬剤とコンジュゲートしている、項目55～74のいずれか一項に記載の方法。

(項目78)

前記薬剤が細胞毒性剤である、項目77に記載の方法。

(項目79)

対象における非i c a / p g aのP N A G陽性病原体による感染症の予防または処置で使用するための、P N A G特異的抗体またはP N A G特異的抗体断片を含む医薬組成物。

30

(項目80)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌である、項目79に記載の医薬組成物。

(項目81)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌が、S. pneumonia、A群S treptococcus、B群S treptococcusまたはE n t e r o coccusである、項目80に記載の医薬組成物。

(項目82)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌である、項目79に記載の医薬組成物。

40

(項目83)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌が、L i s t e r i a、C l o s tridium difficile、B. subtilis、M. tuberculosisまたはM. smegmatisである、項目82に記載の医薬組成物。

(項目84)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性病原体が、非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌である、項目79に記載の医薬組成物。

(項目85)

前記非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌が、N e i s s e r

50

ia meningitidis、Neisseria gonorrhoeae、型別不能のH. Influenzae、HelicobacterまたはCampylobacterである、項目84に記載の医薬組成物。

(項目86)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性病原体が、非i c a / p g aのPNAG陽性グラム陰性桿菌である、項目79に記載の医薬組成物。

(項目87)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性グラム陰性桿菌が、Bacteroides fragilis、B. thetaiotaomicron、B. vulgaris、Citrobacter rodentium、Vibrio cholerae、Salmonella enterica血清型チフス菌またはSalmonella enterica血清型ネズミチフス菌である、項目86に記載の医薬組成物。

10

(項目88)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性病原体が、非i c a / p g aのPNAG陽性真菌である、項目79に記載の医薬組成物。

(項目89)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性真菌が、Candida albicans (酵母)、Candida albicans (菌糸)、Aspergillus、FusariumまたはCryptococcusである、項目88に記載の医薬組成物。

20

(項目90)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性病原体が、非i c a / p g aのPNAG陽性寄生虫である、項目79に記載の医薬組成物。

(項目91)

前記非i c a / p g aのPNAG陽性寄生虫が、P. bergheiまたはP. falci parumである、項目90に記載の医薬組成物。

(項目92)

前記対象がヒトである、項目79～91のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目93)

前記対象が靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌまたはネコである、項目79～91のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

(項目94)

前記対象が非i c a / p g aのPNAG陽性病原体による感染症を有する、項目79～93のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目95)

前記対象が非i c a / p g aのPNAG陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、項目79～93のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目96)

前記抗体または抗体断片が全身投与のために製剤化される、項目79～95のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

(項目97)

前記抗体または抗体断片が局所投与のために製剤化される、項目79～95のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目98)

前記抗体または抗体断片がF598 (ATCC PTA-5931)抗体またはその断片である、項目79～97のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目99)

前記抗体または抗体断片がF628 (ATCC PTA-5932)抗体またはその断片である、項目79～97のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目100)

前記抗体または抗体断片がF630 (ATCC PTA-5933)抗体またはその断

50

片である、項目 79～97 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 101)

前記抗体または抗体断片が薬剤とコンジュゲートしている、項目 79～98 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 102)

前記薬剤が細胞毒性剤である、項目 101 に記載の医薬組成物。

(項目 103)

濃縮した微生物細胞体調製物から粗製多糖調製物をエタノール沈殿させることと；

前記粗製多糖をリゾチームおよびリソスタフィンで同時に消化し、続いてヌクレアーゼおよびプロテイナーゼ K で逐次的に消化して、消化された多糖調製物を形成することと；

消化された前記多糖調製物をサイズ分画することと；

アセチル化多糖画分を単離することと；

前記アセチル化多糖画分を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有する PNA G 多糖を生成することと

を含み、前記微生物細胞体調製物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物から誘導される方法。

(項目 104)

微生物培養物から不純な多糖を調製することと；

前記不純な多糖を酸または塩基とともにインキュベートして半純粋な多糖調製物を生成することと；

前記調製物を中和することと；

中和された前記調製物をフッ化水素酸中でインキュベートすることと；

前記調製物からアセチル化多糖を単離することと；

前記アセチル化多糖を脱アセチル化して、50%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を生成することと

を含み、前記微生物培養物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物培養物である方法。

(項目 105)

微生物培養物から不純な多糖を調製することと；

前記不純な多糖を酸または塩基とともにインキュベートして半純粋な多糖調製物を生成することと；

前記調製物を中和することと；

中和された前記調製物をフッ化水素酸中でインキュベートすることと；

前記調製物から 50%未満のアセテート置換を有する P N A G 多糖を単離することとを含み、前記微生物培養物が非 i c a / p g a の P N A G 陽性微生物培養物である方法。

(項目 106)

担体を前記単離された多糖とコンジュゲートさせることをさらに含む、項目 103～105 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 107)

前記担体がペプチド担体である、項目 106 に記載の方法。

(項目 108)

前記アセチル化多糖が化学的に脱アセチル化されている、項目 103 または 104 に記載の方法。

(項目 109)

前記アセチル化多糖が塩基性溶液とのインキュベーションによって脱アセチル化されている、項目 108 に記載の方法。

(項目 110)

前記アセチル化多糖が酵素によって脱アセチル化されている、項目 103 または 104 に記載の方法。

(項目 111)

対象に、抗体生成のために有効な量の、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体から単

10

20

30

40

50

離された P N A G 多糖、およびアジュバントを投与することと、  
前記対象から抗体を単離することと  
を含む、抗体の生成方法。

(項目 112)

前記抗体がポリクローナル抗体である、項目 111 に記載の方法。

(項目 113)

対象に、抗体生成のために有効な量の、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体から単離された P N A G 多糖、およびアジュバントを投与することと、

前記対象から脾細胞を収集することと、

前記対象からの脾細胞を骨髄腫細胞と融合させることと、

融合サブクローンから生成された抗体を収集することと  
を含む、モノクローナル抗体の生成方法。

(項目 114)

前記 P N A G 多糖が 50 % 未満アセチル化されている、項目 111 ~ 113 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 115)

抗体を単離することをさらに含む、項目 111 ~ 114 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 116)

前記対象がウサギである、項目 111 ~ 115 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 117)

前記対象がヒトである、項目 111 ~ 116 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 118)

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を検出するための方法であって、

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を含有することが疑われる試料を、 P N A G 特異的抗体または抗体断片と接触させることと、

前記抗体または抗体断片と前記試料との結合を検出することと  
を含み、前記抗体または抗体断片の結合が、前記非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体  
が前記試料中に存在することを示す、方法。

(項目 119)

前記試料が S t a p h y l o c o c c u s 陰性である、項目 118 に記載の方法。

(項目 120)

前記試料が対象からの生体試料である、項目 118 または 119 に記載の方法。

(項目 121)

前記生体試料が尿、血液、膿、皮膚、痰、関節液、リンパまたは乳汁である、項目 120 に記載の方法。

(項目 122)

前記抗体または抗体断片が検出可能な標識とコンジュゲートしている、項目 118 ~ 121 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図 1】感染から 4 時間後に開始されて、腹腔内 ( i p ) および局所に投与された抗 P N A G の M A b F 598 の影響。この図は、48 時間の実験の最も低い接種原からのデータを示す。実験の詳細：接種原は、 $1 \times 10^5$  / 目であった；感染から 4 および 24 時間後に  $200 \mu g$  の M A b を i p 注射した；感染から 24 および 32 時間後に  $20 \mu g$  の M A b を局所に塗布した。データポイントは、個々のマウスの値を表す；バーは、群の平均スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0050】

【図 2】感染から 4 時間後に開始されて、I P および局所に投与された抗 P N A G の M A b F 598 の影響。この図は、48 時間の実験の低い接種原からのデータを示す。実験の詳細：接種原は、 $2 \times 10^5$  / 目であった；感染から 4 時間後に  $500 \mu g$  の M A b を

10

20

30

40

50

I P 注射した；感染から 24 および 32 時間後に 50  $\mu$ g の MAb を局所に塗布した。データポイントは、個々のマウスの値を表す；バーは、群の平均スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0051】

【図3】感染から 4 時間後に開始されて、局所に投与された抗 P N A G の MAb F598 の影響。この図は、32 時間の実験の中間の接種原からのデータを示す。実験の詳細：接種原は、 $5.1 \times 10^6$  / 目であった；感染から 4、8、24 時間後に MAb を局所に塗布した。データポイントは、個々のマウスの値を表す；バーは、群の平均スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0052】

【図4】感染から 4 時間後に開始されて、局所に投与された抗 P N A G の MAb F598 の影響。この図は、32 時間の実験の高い接種原からのデータを示す。実験の詳細：接種原： $5 \times 10^7$  / 目；感染から 4、8、24 時間後に MAb を局所に塗布した。32 時間後に実験を終了した。データポイントは、個々のマウスの値を表す；バーは、群の平均スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0053】

【図5】S. pneumoniae D39 を抗原投与した CBA / N マウスの生存率 (N = 12 / 群)。

【0054】

【図6】S. pyogenes (A 群 S. streptococcus) が原因の致死性の皮膚感染症に対する抗 9G1cNH2 - TT コンジュゲートワクチン抗体の保護効力。

【0055】

【図7】B 群 N. meningitidis B16B6 株を抗原投与した 2 ~ 3 日齢の子マウスの髄膜炎 (脳の細菌) に対する、ウサギで作製された抗 9G1cNH2 - TT コンジュゲートワクチン抗体の保護効力。データポイントは、個々のマウスの 10<sup>0</sup> CFU / 脳を表す；バーは、群の中間スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0056】

【図8】PBS (実験 1) または抗 H I V ヒト IgG1 MAb (MAb F105、実験 2) のいずれかと比較した、抗 P N A G ヒト IgG1 MAb を投与したマウスにおける大腸炎スコアの低減。データポイントは、個々のマウスのスコアを表す；バーは、群の中間スコアを表す。P 値：マンホイットニー U 検定。

【0057】

【図9】抗 P N A G の MAb F598 または対照の抗 H I V ヒト IgG1 MAb (F105) のいずれかで処置した T R U C マウスで総組織学的スコアを見出すために使用した 4 つのパラメータの個々のスコアの比較。

【0058】

【図10】L. monocytogenes に対する、ウサギで作製した抗 9G1cNH<sub>2</sub> - TT コンジュゲートワクチン抗体の保護効力。

【0059】

【図11】抗 d P N A G - TT ウサギ抗体によって媒介された、S. pneumoniae の 4 株のオプソニン性殺傷。殺傷は、正常なウサギ血清により対照で得られたものと比較した。

【0060】

【図12】抗 P N A G 20 ヒト IgG1 MAb F598 によって媒介された、S. pneumoniae の 4 株のオプソニン性殺傷。殺傷は、P. aeruginosa アルギネートに特異的な対照の MAb F429 と比較した。

【0061】

【図13】抗 9G1cNH<sub>2</sub> - TT ウサギ抗体によって媒介された、E. faecalis の 3 株のオプソニン性殺傷。殺傷は、正常なウサギ血清により対照で得られたものと比較した。

10

20

30

40

50

## 【0062】

【図14】抗PNA GのMAb F598によるA群*Streptococcus*のオプソニン性殺傷。殺傷は、*P. aeruginosa*アルギネートに特異的な対照のMAb F429と比較した。

## 【0063】

【図15】抗PNA GのMAb F598による*Candida albicans*のオプソニン性殺傷。殺傷は、*P. aeruginosa*アルギネートに特異的な対照のMAb F429と比較した。

## 【0064】

【図16】*N. meningitidis*のB血清群株の殺細菌性殺傷。

10

## 【0065】

【図17】*N. gonorrhoeae*の殺細菌性殺傷。

## 【0066】

【図18】*N. meningitidis*の殺細菌性殺傷の阻害。

## 【0067】

【図19】*N. gonorrhoeae*の殺細菌性殺傷の阻害。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0068】

## 発明の詳細な説明

本発明は、細菌および細菌以外のいくつかの病原体でのPNA G発現に関する予想外の知見に一部関する。この知見は、少なくとも2つの理由のために予想外であった。最初に、本発明に従ってPNA Gを発現することが見出された病原体のいずれも、*ica*または*pga*遺伝子座を有しない。*ica*および*pga*遺伝子座は、PNA G合成を含む多糖合成に関する4つのタンパク質を各々コードする。本発明の前までは、病原体がPNA Gを合成するために*ica*または*pga*遺伝子座を有しなければならないと考えられていた。*ica*遺伝子座は、本発明の前にPNA Gを発現することが公知であった*S. aureus*および*S. epidermidis*に存在し、*pga*遺伝子座は一部のグラム陰性生物で同定されている。新たに発見されたPNA G陽性病原体が、これらの遺伝子座が見かけ上存在しない中でどのようにPNA Gを実際に合成するかは明らかでない。本発明の知見は、そのような遺伝子座およびそれらがコードするタンパク質が存在しなくても、PNA Gが合成される可能性を示唆する。第2には、PNA Gを発現することが見出された、細菌および細菌以外の病原体を含む病原体に、大きな変動がある。本発明の前までは、識別可能な*ica* / *pga*遺伝子座を発現しない病原体がPNA Gを作製することができることは考えられていなかった。細菌以外の病原体がPNA Gを発現するかもしれないことも考えられていなかった。

20

## 【0069】

これらの様々な細菌および細菌以外の病原体がPNA Gを発現するとの知見は、そのような病原体によって引き起こされる感染症の予防、処置および/または診断のための新しいアプローチを提供する。したがって本発明は、とりわけ、新たに記載されたPNA G陽性病原体からのPNA GおよびdPNA Gの単離および/または誘導、ならびに免疫応答(PNA Gに特異的な抗体を生成するのに必要な免疫応答を含む)の刺激、PNA GおよびPNA G発現病原体の検出、およびPNA G発現病原体の感染症の予防および処置におけるそれらの使用を企図する。そのようなPNA G発現病原体には、限定されずに、本明細書に記載される非*ica* / *pga*のPNA G発現病原体が含まれる。

30

## 【0070】

非*ica* / *pga*のPNA G陽性病原体

PNA Gを発現することが新たに発見された病原体は、本明細書において非*ica* / *pga*のPNA G陽性病原体と呼ばれ、それらが*S. aureus*、*S. epidermidis*または*E. coli*などの公知のPNA G発現病原体の4遺伝子*ica* / *pga*遺伝子座に何らかの有意な類似性を有するDNAベースの遺伝子座を含有しないことを示す

40

50

。i c aまたはp g a遺伝子座は、4つのタンパク質（2つのグリコシルトランスフェラーゼ、N-脱アセチル化酵素および合成された多糖の搬出のためのタンパク質）をコードする。一部の非i c a / p g aのP N A G病原体は、これらの4つのタンパク質をコードする遺伝子を単一の遺伝子座に含まない。

【0071】

例示的なi c a遺伝子座（すなわち、*S. aureus*からのもの）のヌクレオチド配列は、受託番号A F 0 8 6 7 8 3の下でGenBankに寄託されている。本発明により、「非i c a」病原体とみなされる病原体は、識別可能なi c a遺伝子座を有しない。例として、そのような病原体は、染色体DNAの同じ連続ストレッチに存在し、A F 0 8 6 7 8 3の下で寄託されたi c a遺伝子座の全体の4遺伝子ヌクレオチド配列と少なくとも25%の相同性を有するヌクレオチド配列を有することができない。非i c a P N A G陽性病原体は、*S t a p h y l o c o c c i*を除外する。

【0072】

例示的なp g a遺伝子座（すなわち、*E. coli* K12 substr. MG1655からのもの）のヌクレオチド配列は、遺伝子座の中の4つの遺伝子の各々について、AAC74106.1、AAC74107.1、AAC74108.1およびAAC74109.1の受託番号の下でGenBankに寄託されている。本発明により、「非p g a」病原体とみなされる病原体は、識別可能なp g a遺伝子座を有しない。例として、そのような病原体は、染色体DNAの同じ連続ストレッチに存在し、AAC74106.1、AAC74107.1、AAC74108.1およびAAC74109.1の下で寄託されたヌクレオチド配列の4つ全てと少なくとも25%の相同性を有するヌクレオチド配列を有することができない。非p g a P N A G陽性病原体は、*E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Bordetella pertussis*、*B. parapertussis*、*B. bronchiseptica*、*Burkholderia cenocepacia*、*B. dolosa*、*Actinobacillus pleuropneumoniae*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Acinetobacter baumannii*および*Shigella*属の一部の株を除外する。

【0073】

非i c a / p g aのP N A G陽性病原体は、グラム陰性菌およびグラム陽性菌、真菌類および寄生虫を含む。より具体的には、非i c a / p g aのP N A G陽性細菌は、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性球菌または球桿菌、およびグラム陰性桿菌を含む。非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性球菌は、*S. pneumoniae*、A群*Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*)、B群*Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*)、C群*Streptococcus* (*Streptococcus dysagalactiae*)および*Enterococcus* (*E. faecalis*および*E. faecium*)を含む。非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陽性桿菌は、*Listeria monocytogenes*、*Clostridium difficile*、*Bacillus subtilis*、*Mycobacterium tuberculosis*および*M. smegmatis*を含む。非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性球菌または球桿菌は、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、型別不能の*H. influenzae*、*Hemophilus ducreyi*、*Helicobacter pylori*および*Campylobacter jejuni*を含む。非i c a / p g aのP N A G陽性グラム陰性桿菌は、*Bacteroides fragilis*、*B. thetaiotaomicron*、*B. vulgaris*、*Citrobacter rodentium*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella enterica*血清型チフス菌および*Salmonella enterica*血清型ネズミチフス菌を含む。

【0074】

10

20

30

40

50

非 i c a / p g a の P N A G 陽性真菌は、 C a n d i d a a l b i c a n s ( 酵母 ) 、 C a n d i d a a l b i c a n s ( 菌糸 ) 、 A s p e r g i l l u s 、 F u s a r i u m および C r y p t o c o c c u s 属の種を含む。非 i c a / p g a の P N A G 陽性寄生虫は、 P l a s m o d i u m b e r g e i および P . f a l c i p a r u m を含む。

【 0 0 7 5 】

非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体は、 T . v a g i n a l i s であってもよい。

【 0 0 7 6 】

本発明は、対象の P N A G 多糖に特異的である免疫応答を誘導する抗原として、 P N A G 多糖の使用を企図する。そのような免疫は、本明細書において能動免疫と呼ばれる。対象は、前述の非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体のいずれか 1 つによって引き起こされる感染症を有するか、またはその発症のリスクがある者であってもよい。感染症は、 P N A G 多糖の使用によって予防または処置することができる。

10

【 0 0 7 7 】

本発明は、対象の P N A G 多糖に特異的である免疫応答を誘導する、 P N A G 特異的抗体（または抗体断片）の使用も企図する。そのような免疫は、本明細書において受動免疫と呼ばれる。対象は、前述の非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体のいずれか 1 つによって引き起こされる感染症を有するか、またはその発症のリスクがある者であってもよい。感染症は、 P N A G 特異的抗体（または抗体断片）の使用によって予防または処置することができる。

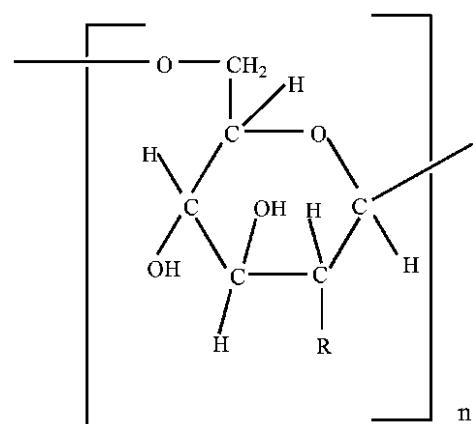
【 0 0 7 8 】

20

P N A G および d P N A G 多糖

P N A G 多糖は、ポリ N - アセチルベータ ( ) 1 - 6 グルコサミンである（すなわち、それはベータ ( ) 1 - 6 連結によって連結されるグルコサミン単量体単位で構成される）。存在する場合、アセチル基はグルコサミン単量体に N 連結される（O 連結に対して）。P N A G は、以下の式の構造を有し、

【 化 5 】



30

式中、 n は整数であり、 R は、 - N H - C O - C H <sub>3</sub> および - N H <sub>2</sub> からなる群から選択される。「 n 」は、限定されずに、 2 ~ 5 0 0 の範囲であってもよい。

【 0 0 7 9 】

40

P N A G は i n v i t r o で合成することができるか、天然に存在する供給源、例えば新たに記載された P N A G 陽性病原体から単離することができる。その生来の形では、 P N A G は、アセチル化（すなわち、 R が - N H - C O - C H <sub>3</sub> である）が 1 ~ 1 0 0 % の範囲である形の混合物として存在し、より高度にアセチル化された形（すなわち、 > 5 0 % のアセチル化を有するもの）がより優占した形である。

【 0 0 8 0 】

十分にアセチル化されない形は高度に免疫原性であり、 i n v i v o での免疫刺激アッセイにおいては、より高度にアセチル化された形と比較してオプソニン性防御抗体をより良好に導き出すことができるが以前に発見された。 d P N A G 投与の後に導き出される抗体は、 d P N A G 、および一部の場合には P N A G の高度にアセチル化された形も

50

認識する。これらの知見は、P N A G の十分にアセチル化されない形を、*in vivo* で防御免疫応答を刺激するのに適するワクチン候補にした。その結果、本発明は、対象で能動免疫を刺激するための、P N A G の十分にアセチル化されない形の使用も企図する。P N A G のそのような十分にアセチル化されない形は、本明細書において脱アセチル化 P N A G (または d P N A G ) と呼ばれる。R 基の 50 % 未満が - N H - C O - C H<sub>3</sub> である以外、d P N A G は上に示すものと同じ構造を有する (すなわち、アミノ基の 50 % 未満がアセテートで置換される)。アセチル化の範囲が 0 から 50 % 未満である限り、d P N A G は全体または部分的に脱アセチル化されていてもよい。全体が脱アセチル化された d P N A G (すなわち、R が N H<sub>2</sub> だけ) は、本明細書においてホモ重合体と呼ぶことができる。部分的に脱アセチル化された d P N A G (すなわち、R の 50 % 未満が - N H - C O - C H<sub>3</sub> である限り、R は - N H<sub>2</sub> または - N H - C O - C H<sub>3</sub> であってもよい) は、本明細書においてヘテロ重合体と呼ぶことができる。例えば、R 基の 49 % 未満、45 % 未満、40 % 未満、35 % 未満、30 % 未満、25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、または 1 % 未満は、- N H - C O - C H<sub>3</sub> であってもよい。ある場合には、アセチル化のレベルは、40 % 以下、35 % 以下、20 % 以下または 15 % 以下である。

## 【0081】

本発明は、様々な適用における、P N A G の高度にアセチル化された形および十分にアセチル化されない形の使用を企図する。非限定例として、高度にアセチル化された P N A G は、診断薬として、または別の非治療目的のために使用する抗体を作製するために使用することができる。

## 【0082】

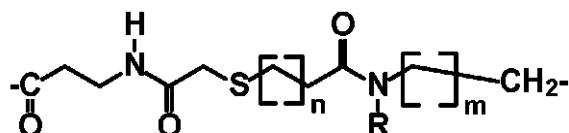
本発明は、高度にアセチル化されたか十分にアセチル化されない、P N A G の天然に存在する形、ならびに P N A G の合成形 (すなわち、完全に新規に作製したもの) の使用を企図する。理解されるように、そのような合成形は、互いに - 1 - 6 連結される既知の数および配列のグルコサミンおよび N - アセチルグルコサミンの単位で合成することができる。合成形は、一部の場合には 4 単量体と小さくてもよい。

## 【0083】

公開米国特許出願番号 U S - 2 0 1 1 - 0 1 5 0 8 8 0 は、合成オリゴ糖、それらの合成および担体とのそれらのコンジュゲーションを記載する。この参照の具体的な全体の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、合成オリゴ糖は担体とコンジュゲートさせて使用されてもよい。

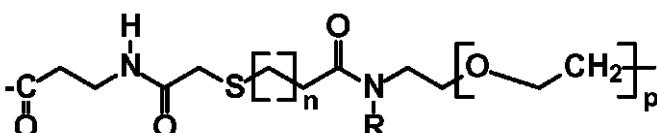
例は、

## 【化 6】



式 I

または



式 II

であるリンカーを介して担体とコンジュゲートしているオリゴ糖を含む、オリゴ糖 - 担体コンジュゲートであり、式中、n は > 1 であり、m は 1 から 10 までから選択される数であり、p は 1 から 20 までから選択される数であり、R は H またはアルキル基であり、リ

10

20

30

40

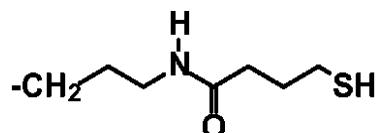
50

ンカーはオリゴ糖にO連結し、担体にN連結する。「n」は2~10、2~5、または一部の実施形態では2、3または4であってもよい。

【0084】

別の例は、O連結リンカーを有するオリゴ糖であり、リンカーは、

【化7】



10

式III

を含み、オリゴ糖はポリグルコサミンである。ポリグルコサミンは、長さが2~20単量体、例えば長さが5~11単量体である、-1-6連結されたグルコサミンであってもよい。

【0085】

P N A G および d P N A G のサイズは変動することができ、特定の適用によって決定されてもよい。一般的に、P N A G および d P N A G の分子量は、約900ダルトン (D a) から750キロダルトン (k D a) の範囲内であってよい。一部の態様では、P N A G または d P N A G は、2 k D a 未満の分子量を有する。一部の実施形態では、P N A G または d P N A G の分子量は、少なくとも約2200ダルトン、または少なくとも約2500ダルトン、または少なくとも約3000ダルトンであってもよい。一部の実施形態では、P N A G または d P N A G は、長さが少なくとも9、少なくとも10単量体単位、または長さが少なくとも12単量体単位、または長さが少なくとも15単量体単位であってもよい。他の態様では、P N A G または d P N A G は、少なくとも100 k D a、任意選択で100~500 k D a の範囲内の分子量を有する。

20

【0086】

本明細書においてより詳細に論じられるように、P N A G および d P N A G のより低分子量のバージョンを含むP N A G および d P N A G は、担体タンパク質などの担体とコンジュゲートさせることができる。担体とコンジュゲートさせる場合、P N A G および d P N A G は2~3単量体単位と小さくてもよいが、好ましくは長さが少なくとも4~6単量体単位である。800 D a から1,000 k D a の間の多糖が、一般的であろう。本明細書に記載されるように、このサイズのP N A G または d P N A G の形は、新規に合成することができる。担体化合物なしで使用するとき、P N A G または d P N A G は約100 k D a 以上であってもよい。

30

【0087】

P N A G の調製

本発明は、本明細書に記載される非i c a / p g a のP N A G 発現病原体から単離または誘導されたd P N A G およびP N A G を含む、d P N A G およびP N A G の天然に存在する形および合成形の使用を企図する。本明細書で用いるように、天然に存在するP N A G または d P N A G は、天然に存在する供給源中に存在し、任意選択でそれから単離または誘導することができるものである。

40

【0088】

P N A G および d P N A G 抗原は、単離された形で提供および/または使用することができる。単離された多糖、例えば単離されたd P N A G は、それが通常存在するかそれが合成された環境から取り出され、したがって少なくとも一部分離されたものである。ある場合には、単離された多糖は、構造的または機能的に特徴付けられるように、他の化合物から十分に分離される。例えば、単離された多糖は、その化学的組成を決定するために「配列決定をする」ことができる。

【0089】

50

dPNAGは生来のPNAGから単離することができるか、または本明細書に記載される脱アセチル化方法を用いて、より高度にアセチル化された天然に存在するPNAGから誘導することができる。in vitroで合成されるdPNAGは、その合成反応混合物から単離し、それによってそれを反応基質、酵素、補因子、触媒または偽の反応生成物から分離することもできる。

【0090】

PNAGおよびdPNAGは、ica遺伝子座を載せている任意の微生物（細菌を含む）株から調製することができる。icaを載せているこれらの株には、それらに限定されないが例えばS.epidermidisおよびS.aureusなどの、ica遺伝子座を天然に発現するものが含まれる。具体的な株には、S.epidermidis RP62A (ATCC番号35984)、S.epidermidis RP12 (ATCC番号35983)、S.epidermidis M187、S.aureus RN4220 (pCN27) およびS.aureus MN8 mucoidが含まれる。icaを載せている株には、ica遺伝子座の遺伝子で形質転換されたものも含まれる（例えば、S.carnosus TM300 (pCN27)）。

10

【0091】

生来のPNAGは、細胞および細胞遊離培養上清を含む微生物培養物から生来の粗製PNAG調製物を抽出し、粗製PNAG調製物からの高分子量の生来のPNAGに富む物質の単離をもたらし、高分子量PNAGに富む物質を含有する不純なPNAGを、溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトン、または水溶液からの多糖の沈殿を引き起こすことが可能であることが当業技術者に公知である任意の他の有機溶媒で沈殿させることによって先ず得ることを含む、様々な方法によって調製することができる。生来の粗製PNAG調製物を抽出し、不純な生来のPNAGの調製物を単離して沈殿させるステップは、当技術分野で公知であり、公開米国特許出願番号US-2005-0118198-A1に記載されている方法を用いて実施することができる。

20

【0092】

この不純なPNAG物質を次に精製し、脱アセチル化して、dPNAGを生成することができる。脱アセチル化は、化学的にまたは酵素によって実行することができる。化学的脱アセチル化は、一部の場合には、不純なPNAG調製物を塩基または酸とともにインキュベートして半純粋なPNAG調製物を生成し、調製物を中和し、中和された調製物をさらに処理してdPNAGを生成することを含むことができる。

30

【0093】

酵素による脱アセチル化は、不純なPNAGを、細胞壁破壊剤、例えばリゾチーム、リソスタフィンおよびプロテイナーゼK、ならびにDNAおよびRNAを消化するヌクレアーゼ酵素、例えばDNアーゼおよびRNアーゼを含む、生体物質を消化する細菌酵素などの酵素とともにインキュベートすることを一般的に含む。これに続いて、溶液からPNAGを沈殿させる溶媒の添加、沈殿物の収集、およびNaOHなどの塩基、またはHClなどの酸へのPNAGの再溶解、その後中和が続く。インキュベーションステップが酸で実施されるならば塩基を用いて、インキュベーションステップが塩基で実施されるならば酸で、中和を達成することができる。中性物質からの不溶性画分は、例えば、フッ化水素酸でインキュベーションして純粋な生来のPNAG抗原を生成することによって、またはpH<4.0の緩衝剤に再溶解し、続いて分子篩および/もしくはイオン交換クロマトグラフィーによって次に処理される。

40

【0094】

別の単離方法は、培養物を強い塩基または酸とともにインキュベートすることによって、粗製PNAG懸濁液を微生物（細菌を含む）培養物から抽出するステップを含む。好ましくは、培養物は少なくとも2時間、より好ましくは少なくとも5、10、15、18または24時間、強い塩基または酸の中で攪拌される。強い塩基または酸は、任意のタイプの強い塩基または酸であってもよいが、好ましくは少なくとも1MのNaOHまたはHClの強度を有する。一部の実施形態では、強い塩基または酸は、5M NaOHまたは5

50

M H C 1 である。次に、酸または塩基溶液を遠心分離にかけて、細胞体を収集する。一部の実施形態では、抽出手順を数回繰り返す。生じた酸または塩基溶液をおよそ pH 7 に中和し、次に透析して不溶性の不純な P N A G を生成する。

【 0 0 9 5 】

d P N A G は、新規に合成することもできる。d P N A G の新規合成のための方法は、公開米国特許出願番号 U S - 2 0 0 5 - 0 1 1 8 1 9 8 - A 1 および U S - 2 0 1 1 - 0 1 5 0 8 8 0 - A 1 に記載されている。

【 0 0 9 6 】

一部の方法は、出発物質、例えば限定されずに、ポリグルコース（すなわち、デキストラン）、ポリグルコサミン、例えばキチンまたはキトサン、ポリグルコサミノウロン酸から d P N A G を誘導することができ、本発明の d P N A G 抗原を生成するために、ポリガラクトサミノウロン酸を使用することもできる。

【 0 0 9 7 】

P N A G および d P N A G 調製物は、様々な純度のものであってもよい。本明細書で用いるように、純粋な P N A G または d P N A G 調製物は、汚染物質が 9 2 % を超えて含まれない P N A G または d P N A G 調製物である。これらの汚染物質には、ガラクトース、リン酸塩、テイコ酸等が含まれる。一部の実施形態では、P N A G および d P N A G 組成物は、汚染物質が少なくとも 9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 含まれないか、汚染物質が 1 0 0 % 含まれない。一部の実施形態では、d P N A G 組成物は、高度にアセチル化された P N A G を含まない。

【 0 0 9 8 】

P N A G または d P N A G 組成物の純度は、当技術分野で公知である任意の手段によって評価することができる。例えば、純度は、化学分析アッセイならびにガスクロマトグラフィー、および物質の構造態様を検証する核磁気共鳴によって評価することができる。

【 0 0 9 9 】

担体

新規に合成されるか、天然に存在する供給源に由来するかにかかわらず、P N A G および d P N A G は、コンジュゲート形または非コンジュゲート形で使用することができる。コンジュゲート形では、P N A G または d P N A G は、直接に、またはリンカーを介して担体（または担体化合物、これらの用語は本明細書において互換的に使用される）にコンジュゲートさせることができる。コンジュゲーションは、その末端の片方が両方を含む、多糖の任意の位置に存在してもよい。

【 0 1 0 0 】

本明細書で用いられる「担体」は、直接に、またはリンカーの使用により多糖にコンジュゲートさせることができる化合物である。担体は、免疫学的に活性（すなわち、免疫原性）であるか、不活性であってもよい。in vivo で使用するとき、担体は対象に投与しても安全であることを理解すべきである。

【 0 1 0 1 】

担体には、限定されずに、タンパク質、またはペプチド、多糖、核酸または他の重合体、脂質および小分子が含まれる。担体タンパク質には、例えば、血漿タンパク質、例えば血清アルブミン、免疫グロブリン、アポリポタンパク質およびトランスフェリン；細菌のポリペプチド、例えば T R P L E 、 - ガラクトシダーゼ、ポリペプチド、例えばヘルペス g D タンパク質、アレルゲン、ジフェリアおよび破傷風トキソイド、サルモネラ菌フラゲリン、ヘモフィルスピリン、ヘモフィルスの 1 5 k D a 、 2 8 ~ 3 0 k D a および 4 0 k D a 膜タンパク質、Escherichia coli 、熱不安定性腸管毒素 l t b 、コレラ毒素、およびウイルスタンパク質、例えばロタウイルス V P および R S ウイルス f および g タンパク質が含まれる。

【 0 1 0 2 】

免疫化のために特に有益であろう担体タンパク質には、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシのチログロブリンまたはダイズのトリプシンインヒビターが

10

20

30

40

50

含まれる。免疫化される対象で免疫原性である任意の他の化合物は、担体として使用することができる。

#### 【0103】

多糖をタンパク質にコンジュゲートさせる多くの方法が、当技術分野で公知である。一般に、多糖は活性化されるべきであるか、さもなければコンジュゲーションに適合するようにするべきである（すなわち、少なくとも1つの部分を、タンパク質または他の分子に共有結合することを可能にしなければならない）。多くのそのような方法が当技術分野で公知である。公開米国特許出願番号U.S.-2005-0118198-A1およびU.S.-2011-0150880-A1、および米国特許第4356170号、第4663160号、第4619828号、第4808700号、第4711779号を参照することができる。10

#### 【0104】

担体は、リンカーまたはスペーサーを介してPNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>にコンジュゲートさせることができる。多糖は、当技術分野公知である任意の手段によって、例えばスペーサーまたはリンカーと共有結合を生成する多糖の遊離の還元性末端を使用して、リンカーまたはスペーサーに結合することができる。共有結合は、PNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>の遊離の還元性末端を、その後にアシル化によってスペーサーに共有結合することができる遊離の1-アミノグリコシドに変換することによって生成することができる。（Lundquistら、J. Carbohydrate Chem.、10巻：377頁（1991年））。あるいは、スペーサーの上の活性基としてN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを使用して、PNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>をスペーサーに共有結合することができる。（Kochetkov、Carbohydrate Research、146巻：C1頁（1986年））。ヨウ素および水酸化カリウムを使用して、PNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>の遊離の還元性末端をラクトンに変換することもできる。（Isebellら、Methods of Carbohydrate Chemistry、Academic Press、New York（1962年））。スペーサーまたはリンカーの一級アミノ基によって、ラクトンをスペーサーに共有結合することができる。還元アミノ化を使用して、PNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>の遊離の還元性末端をリンカーまたはスペーサーに共有結合することもできる。20

#### 【0105】

##### 抗体

本発明は、PNA<sub>G</sub>および/またはdPNA<sub>G</sub>に結合する抗体を包含する。抗体は、モノクローナル抗体であるか、またはポリクローナル抗体であってもよい。dPNA<sub>G</sub>に結合する抗体は、PNA<sub>G</sub>の高度にアセチル化された形に結合することもできる。抗体は、任意選択で担体にコンジュゲートし、および/またはアジュバントと併用される、dPNA<sub>G</sub>またはPNA<sub>G</sub>、または3つを超える単糖単位のグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンで構成される合成オリゴ糖を使用して作製することができる。抗体は、非i<sub>c</sub>a/p<sub>g</sub>aのPNA<sub>G</sub>陽性病原体またはi<sub>c</sub>aを載せているもしくはp<sub>g</sub>aを載せている病原体に由来するPNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>を用いて生成することができる。30

#### 【0106】

ポリクローナル抗体は、抗原およびアジュバントの複数回の皮下または腹腔内注射によって動物で一般に作製される。PNA<sub>G</sub>またはdPNA<sub>G</sub>またはコンジュゲート型合成オリゴ糖に対するポリクローナル抗体は、コンジュゲート形もしくは非コンジュゲート形のPNA<sub>G</sub>もしくはdPNA<sub>G</sub>、またはコンジュゲート形の合成オリゴ糖を単独で、またはアジュバントと一緒に注射することによって生成することができる。そのようなポリクローナルの作製方法は、公開米国特許出願番号U.S.-2005-0118198-A1に記載される。40

#### 【0107】

簡潔には、コンジュゲート形もしくは非コンジュゲート形のdPNA<sub>G</sub>もしくはdPNA<sub>G</sub>、またはコンジュゲート形のオリゴ糖を、フロイント不完全アジュバントなどのアジュバントと合わせ（例えば、フロイントの1~3容量にウサギまたはマウスの100μgのコンジュゲート）、複数部位に皮内注射する。およそ1カ月後に、複数部位での皮下注50

射によってアジュバント中の抗原または抗原コンジュゲートの元の量の1/5~1/10で動物を追加免疫する。1~2週後に、動物を放血させ、血清を抗体の存在について検定する。抗体価プラトーまで、動物を繰り返し追加免疫することができる。動物は、単独のPNA GまたはdPNA Gまたは合成オリゴ糖コンジュゲート、PNA GもしくはdPNA Gコンジュゲートまたは合成オリゴ糖コンジュゲート、または異なる担体化合物にコンジュゲートしているPNA GもしくはdPNA G、または合成オリゴ糖コンジュゲートをアジュバントの有り無しで追加免疫することができる。一部の実施形態では、追加免疫はdPNA GよりもむしろPNA Gを含むことができ、またはそれらはdPNA GとPNA Gの混合物を含有することができる。

## 【0108】

10

ポリクローナル抗体の供給源を供給することに加えて、免疫化された動物はPNA G特異的およびdPNA G特異的モノクローナル抗体を生成するために使用することができる。本明細書で用いるように、用語「モノクローナル抗体」は、抗原の同じエピトープに結合する免疫グロブリンの均一な（すなわち、単一クローンの）集団を指す。モノクローナル抗体は同じIg遺伝子の再配列を有し、したがって同一の結合特異性を示す。抗体を生成するためにdPNA Gまたは合成オリゴ糖コンジュゲートが使用される場合には、エピトープは高度にアセチル化されたPNA GならびにdPNA Gに存在することができ、したがって、dPNA Gに対して作製された抗体はPNA Gに結合することもできる。

## 【0109】

20

モノクローナル抗体の調製方法は、当技術分野で公知である。モノクローナル抗体は、様々な方法によって調製することができる。そのような一方法では、免疫化動物から単離された脾細胞は、骨髄腫細胞との融合またはエプスタインバーウイルスの形質転換によって不死化され、所望の抗体を発現するクローンがスクリーニングされ、同定される。他の方法は、再配置されたIg遺伝子配列の単離および不死化された細胞系へのクローニングを含む。そのような方法は、公開米国特許出願番号U.S.-2005-0118198-A1およびU.S.-2011-0150880-A1により詳細に記載され、そのような教示は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0110】

PNA Gに特異的な抗体は、限定されずに、マウス、ヒト、またはキメラ抗体、例えばヒト化抗体であってもよいが、それに限定されない。

30

## 【0111】

ヒトモノクローナル抗体は、米国特許第5567610号、米国特許第5565354号、米国特許第5571893号、Kozber、J. Immunol. 133巻：3001頁（1984年）、Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁（Marcel Dekker, Inc. New York, 1987年）およびBoernerら、J. Immunol. 147巻：86~95頁（1991年）に開示されるものを含む、当技術分野で公知の方法のいずれかで作製することができる。ヒト抗体は、対象の抗原（例えば、dPNA GまたはPNA G）に対して抗体を生成する、ヒトの血液または他の組織からの抗体産生性リンパ球を回収することによって得ることができる。これらのリンパ球は、適当な培養条件下において研究所で自己増殖する細胞を生成するように処理することができる。細胞培養物は、対象の抗原に対する抗体の生成についてスクリーニングし、次にクローニングすることができる。dPNA GまたはPNA Gに対するヒトモノクローナル抗体を生成するために、クローン培養を使用することができ、または異なるタイプの抗体生成のために、抗体の重鎖および軽鎖の可変部分をコードする遺伝子エレメントを核酸ベクターにクローニングして挿入することができる。ヒトモノクローナル抗体を調製する従来の方法に加えて、そのような抗体は、ヒト抗体を生成することができるトランスジェニック動物を免疫化することによって調製することもできる（例えば、Jakobovitsら、PNAS USA、90巻：2551頁（1993年）；Jakobovitsら、Nature、362巻：255~258頁（1993年）；Brugermannら、Year in Immunol.、7巻：33頁（1993年）；およびLonbergに発行された米国特許第5569825号。）

40

50

## 【0112】

本明細書で用いるように、「ヒト化モノクローナル抗体」は、少なくともヒト定常領域およびヒト以外の種からの抗原結合領域、例えば1つ、2つまたは3つのCDRを有する、モノクローナル抗体またはその機能的活性断片である。ヒト化抗体は、それらが対象の抗原を特異的に認識するが、抗体自身に対してヒトで免疫応答を引き起こさない点で、特定の臨床有用性を有する。例として、ヒト化抗体を調製するために、マウスCDRをヒト抗体のフレームワーク領域に移植することができる。例えば、L. Riechmannら、Nature 332巻、323頁(1988年); M. S. Neubergerら、Nature 314巻、268頁(1985年)およびEPA0239400を参照。あるいは、元の抗体のエピトープ特異性を保持しながら、ヒト抗体の類似した領域でヒト以外の抗体の非CDR領域を置き換えることによって、ヒト化モノクローナル抗体を構築することができる。例えば、ヒト以外のCDR、および任意選択でフレームワーク領域の一部を、ヒトFRおよび/またはFc'/pFc'領域に共有結合して、機能性抗体を生成することができる。Protein Design Labs(Mountain View California)、Abgenix、およびMedarexなどの、特異的マウス抗体領域からヒト化抗体を合成する商業実体が米国にある。欧州特許出願第0239400号を参照することもできる。

## 【0113】

抗原結合性抗体断片も、本発明に包含される。当技術分野で公知であるように、抗体分子の小さな部分であるパラトープだけが、そのエピトープへの抗体の結合に関与する(一般に、Clark, W.R. (1986年) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991年) *Essential Immunology*、7版、Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照)。抗体のpFc'およびFc領域は、例えば、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。pFc'領域が酵素によって開裂された抗体、またはF(ab')<sub>2</sub>断片と称される、pFc'領域なしで生成された抗体は、無傷の抗体の抗原結合部位の両方とも保持する。単離されたF(ab')<sub>2</sub>断片は、その2つの抗原結合部位のために二価モノクローナル断片と呼ばれる。同様に、Fc領域が酵素によって開裂された抗体、またはFab断片と称される、Fc領域なしで生成された抗体は、無傷の抗体分子の抗原結合部位の1つを保持する。さらに進めて、Fab断片は、共有結合した抗体軽鎖およびFd(重鎖可変領域)で表される抗体重鎖の部分からなる。Fd断片は抗体特異性の主要な決定因子であり(单一のFd断片は、抗体特異性を変化させることなく最高10個の異なる軽鎖と会合することができる)、Fd断片は単離状態でエピトープ結合能力を保持する。

## 【0114】

用語Fab、Fc、pFc'、F(ab')<sub>2</sub>およびFvは、いずれも標準的な免疫学的意味で用いられる[Klein、Immunology(John Wiley, New York, NY, 1982年); Clark, W.R. (1986年) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* (Wiley & Sons, Inc., New York); Roitt, I. (1991年) *Essential Immunology*、7版、(Blackwell Scientific Publications, Oxford)]。周知の機能的に活性な抗体断片には、限定されずに抗体のF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvおよびFd断片が含まれる。無傷の抗体のFc断片を欠くこれらの断片は、循環からより速やかに消失し、無傷の抗体より非特異的でない組織結合を有することができる(Wahlら、J. Nucl. Med. 24巻:316~325頁(1983年))。例えば、Ladnerらへの米国特許第4,946,778号に記載される方法に従って、単鎖抗体を構築することができる。そのような単鎖抗体は、フレキシブルリンカー部分によって連結される軽鎖および重鎖の可変領域を含む。単離された可変重鎖単一ドメインを含む単一ドメイン抗体(「Fd」)を得る方法も報告されている(例えば、単離された形でそれに結合するためにその標的エピトープへの十分な親和性を有する、抗体重鎖可変領域(V<sub>H</sub>単一ドメイン抗体)を同定するためのスクリーニング方法を開示する、Wardら、Nature 341巻:644~646頁(1989年)を参照)。公知の抗体重鎖および軽鎖可変領域配列に基づいて組換えFv断片を作

製する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Mooreら、米国特許第4,462,334号に記載されている。抗体断片の使用および生成を記載する他の参考文献には、例えば、Fab断片(Tijssen、Practice and Theory of Enzyme Immunoassays(Elsevier、Amsterdam、1985年))、Fv断片(Hochmanら、Biochemistry 12巻：1130頁(1973年)；Sharonら、Biochemistry 15巻：1591頁(1976年)；Ehrlichら、米国特許第4,355,023号)および抗体分子の部分(Audilore-Hargreaves、米国特許第4,470,925号)が含まれる。したがって、当業者は、dPNA Gエピトープへの抗体特異性を破壊することなく、無傷の抗体の様々な部分から抗体断片を構築することができる。抗dPNA G抗体によって認識されるエピトープが、高度にアセチル化されたPNA Gの上に存在することもできることを理解すべきである。

10

#### 【0115】

##### 用途

本発明の多糖、合成オリゴ糖および抗体は、in vitro、in situおよびin vivoでの適用を含む様々な異なる適用で有益である。非ica/pg aのPNA G陽性病原体による感染症を予防または処置するためにin vivoで対象を免疫化するために、これらの多糖および合成オリゴ糖を使用することができる。多糖および合成オリゴ糖は、PNA GまたはdPNA Gに特異的な抗体を開発するために使用することもでき、それらは、次に、非ica/pg aのPNA G陽性病原体による感染症を予防または処置するためにin vivoで対象を免疫化するために使用することができる。

20

#### 【0116】

抗体などの結合パートナーについてスクリーニングするために、非ica/pg aのPNA G陽性病原体から誘導されるPNA Gおよび/またはdPNA Gを使用することができる。対象で感染症を検出する(すなわち、診断する)ことを含む、PNA G発現病原体を検出するために、抗体を使用することもできる。したがって、本発明は、PNA GおよびdPNA Gに結合する抗体を生成する方法も提供する。

#### 【0117】

非ica/pg aのPNA G陽性病原体から誘導されるPNA Gおよび/またはdPNA Gは、ica遺伝子座を載せているものおよび載せていないものを含む、任意のPNA G発現病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象で免疫応答を誘導するために使用することができる。「非ica/pg aのPNA G陽性病原体から誘導されるPNA Gおよび/またはdPNA G」は、本明細書に記載される方法を使用して非ica/pg aのPNA G陽性病原体から生成される多糖を意味することを理解すべきである。免疫応答の誘導は、感染症を予防するか、部分的もしくは完全に処置することができる。感染症の部分的な処置には、症状の重症度もしくは頻度の低減および/または対象での病原体付加の部分的低減が含まれてもよい。部分的な処置は、1つまたは複数の他の治療薬剤が対象に投与されているか投与される場合に有益であろう。免疫応答の誘導は、対象に、PNA GまたはdPNA G(またはPNA Gを発現する病原体)に対する抗体応答などの免疫応答を誘導するのに有効な量のPNA GまたはdPNA Gまたはその組成物のいずれかを投与することによって達成される。

30

#### 【0118】

本明細書で用いるように、対象は温血の哺乳動物であり、例えばヒト、靈長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌおよびネコが含まれる。一部の実施形態では、対象はげっ歯動物以外の対象である。げっ歯動物以外の対象は、上で定義した任意の対象であるが、特にマウス、ラットおよびウサギなどのげっ歯動物が除かれる。一部の実施形態では、好みの対象はヒトである。

40

#### 【0119】

対象は、そのような病原体がica遺伝子座を載せているかどうかにかかわらず、PNA G発現病原体による感染症を有するか、またはその発症のリスクがある対象であってもよい。PNA G発現病原体による感染症を発症するリスクがある対象は、そのような病原体に曝露されるリスクがある対象であってもよい。本明細書に記載されるように、いくつ

50

かの非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体は、1つまたは複数の抗生物質クラスに耐性である。したがって、そのような病原体は抗生物質の使用によって前の対象で根絶されていないので、そのような病原体への曝露が起こる可能性がある。感染症を発症するリスクがある集団には、例えば、新生児対象、免疫不全の対象（化学療法下の対象など）、免疫抑制薬を使用中の対象（移植レシピエントを含む）、透析中の対象、ハイリスクな手術を受ける対象、および静脈内ライン（例えば、中心ライン）または人工器官（例えば、腰または膝の置換人工器官）などの留置医療器具がある対象が含まれる。

#### 【 0 1 2 0 】

タンパク質担体にコンジュゲートしている P N A G または d P N A G または合成オリゴ糖は、免疫応答を誘導するのに有効な量で対象に投与することができる。そのような有効量は、例えば、P N A G および / または d P N A G に特異的な抗体の生成を誘導すること、記憶細胞、およびおそらく細胞傷害性リンパ球反応の生成を誘導することなどによって、それ自身の免疫防御の生成において対象を支援するのに十分な量であってもよい。免疫応答は、P N A G 発現病原体による感染症が、そのような病原体に曝露される対象で起こることを次に予防することができる。P N A G または d P N A G または合成オリゴ糖のコンジュゲートワクチンの量が能動免疫を誘導するのに十分かどうか、当業者は当技術分野で公知の方法によって評価することができる。例えば、哺乳動物で P N A G 特異的抗体を生成する P N A G または d P N A G または合成オリゴ糖コンジュゲートワクチンの能力は、P N A G 抗原を使用してマウスまたは他の対象で生成された抗体をスクリーニングすることによって評価することができる。免疫応答を誘導するための P N A G または d P N A G の量は、約 1 から 1 0 0  $\mu$  g の範囲内であってもよいが、それらはあまり限定的でない。

#### 【 0 1 2 1 】

P N A G および / または d P N A G に特異的な抗体または抗体断片は、例えば、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を含む P N A G 発現病原体への曝露のリスクがある対象で全身感染症の発症を予防することによって、対象で受動免疫化を誘導するのに有益である。感染症への受動免疫を誘導する方法は、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体を含む P N A G または P N A G 発現病原体に対する免疫応答を誘導するのに有効な量の P N A G および / または d P N A G または合成オリゴ糖に特異的な抗体を対象に投与することを含む。

#### 【 0 1 2 2 】

抗体または抗体断片は、非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体による感染症を発症するリスクがある、任意の対象に投与することができ、一部の実施形態では、P N A G および / または d P N A G への能動免疫を誘導することができない対象のためにそれらは特に適しているであろう。P N A G または d P N A G または合成オリゴ糖コンジュゲートワクチンは、特定の対象で感染症を予防するか除去することにおいて完全に有効であるとは限らず、したがって、そのような対象には P N A G および / または d P N A G に特異的な抗体による処置が有益であろう。免疫応答を誘導することができない対象には、免疫不全の対象（例えば、化学療法下の対象、A I D S を有する対象など）、または免疫系がまだ発達していない対象（例えば早産新生子）が含まれる。

#### 【 0 1 2 3 】

抗体または抗体断片は、P N A G または非 i c a / p g a の P N A G 陽性病原体などの P N A G 発現病原体への免疫応答を誘導するのに有効な量で対象に投与される。本明細書で用いるように、免疫応答を誘導するのに有効な抗体または抗体断片の量は、( i ) 病原体に曝露される対象で感染症が起こることを予防すること；( i i ) 感染症の発症を阻害すること、すなわちその発症を阻止するか遅らせること；および / または ( i i i ) 感染症を軽減すること、すなわち感染した対象で微生物を根絶することにおいて十分である抗体または抗体断片の量である。微生物には、細菌、ウイルス、真菌類、寄生虫等が含まれる。

#### 【 0 1 2 4 】

10

20

30

40

50

当業者に公知である手順を使用して、抗体のオプソニン化の程度を予測する *in vivo* オプソニン化アッセイにおいて、抗体または抗体断片の量が有効量であるかどうかについて決定することができる。細菌などの微生物をオプソニン化する抗体は、微生物試料に加えられると微生物の食作用を引き起こすものである。オプソニン化アッセイは、比色アッセイ、化学発光アッセイ、蛍光もしくは放射標識取り込みアッセイ、細胞媒介細胞毒性アッセイ、または物質のオプソニン化能力を測定する他のアッセイであってもよい。

【0125】

医薬組成物および製剤

一般に、*in vivo* 投与されるとき、本発明の多糖、抗体および抗体断片は、薬学的に許容される組成物で適用される。そのような組成物は、薬学的に許容される担体、塩、緩衝剤、保存剤、アジュバント、および任意選択で他の予防的または治療的な成分を含むことができる。薬学的に許容される担体は、ヒトまたは他の動物への投与に適する1つまたは複数の適合する固体か液体の充填剤、希釈剤または封入物質を意味する。薬学的に許容される担体の文脈で、用語「担体」は、投与を含む使用を促進するために多糖、抗体または抗体断片と一緒に合わされる、天然であるか合成された有機または無機の成分を表す。医薬組成物の構成成分は、所望の医薬有効性を実質的に損なうであろう相互作用がないような方法で、多糖、抗体または抗体断片と、および互いに混ぜ合わせることも可能であるべきである。

【0126】

薬学的に許容される塩には、以下の酸から調製されるものが含まれるが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸およびベンゼンスルホン酸。さらに、薬学的に許容される塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類塩、例えばカルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩として調製することができる。

【0127】

適する緩衝剤には、酢酸および塩(1~2W/V%)；クエン酸および塩(1~3W/V%)；ホウ酸および塩(0.5~2.5W/V%)；ならびにリン酸および塩(0.8~2W/V%)が含まれる。適する保存剤には、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03W/V%)；クロロブタノール(0.3~0.9W/V%)；パラベン(0.01~0.25W/V%)およびチメロサール(0.004~0.02W/V%)が含まれる。

【0128】

非経口投与に適する組成物は、多糖、抗体または抗体断片の無菌の水性調製物を一般的に含み、それはレシピエント対象の血液と等張性であってもよい。採用されてよい許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、リンガー液、および等張性の塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の不揮発性油が、溶媒または懸濁媒として従来採用されている。この目的のために、合成されたモノ-またはジグリセリドを含む、任意の刺激の少ない不揮発性油を採用することができる。さらに、注射剤の調製でオレイン酸などの脂肪酸を使用することができる。皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内などの投与に適する担体製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、PAに見出すことができる。

【0129】

多糖、オリゴ糖、抗体および抗体断片は、有効な量で投与される。投与様式に従い、1~100μgの範囲内の多糖またはオリゴ糖の用量が有効であろう。投与様式に従い、0.1~100mg/kgおよび0.1~20mg/kgの範囲内の抗体または抗体断片の用量が有効であろう。絶対量は、投与が微生物にまだ感染していないハイリスク対象か、または既に感染症を有する対象において実施されるかどうか、並行処置、用量の数、ならびに年齢、身体の状態、サイズおよび体重を含む個々の患者のパラメータを含む様々な因子に依存する。これらは当業者に周知の因子であり、ルーチン以下の実験で対処すること

10

20

30

40

50

ができる。最大用量、すなわち、健全な医学判断による最高安全用量が使用されるのが一般に好ましい。

【0130】

多糖、抗体および／または抗体断片の複数用量が企図される。一般に、免疫化スキームは、高用量の抗原の投与と、数週間の待機期間の後の以降の低用量の抗原の投与を含む。さらなる用量も同様に投与することができる。受動免疫化のための投薬スケジュールは、必要に応じて投与がより頻繁でかなり異なるであろう。微生物感染症に対する強化された免疫応答および／または感染症からの以降の保護をもたらす、任意のレジメンを使用することができる。特定の抗原の複数用量の送達のための所望の時間間隔は、当業者がルーチン以下の実験を用いて決定することができる。ワクチンの用量は、任意選択で用量間に等しい時間間隔をあけて、1から6ヶ月にわたって投与することができる。抗体および抗体断片のために、投与間隔は一般に14～180日の範囲内である。

10

【0131】

様々な投与経路が利用できる。選択される特定の様式は、例えば、処置される特定の状態、および治療効力に必要とされる投薬量に依存する。本発明の方法は、一般に、医学的に許容される任意の投与様式、すなわち臨床的に許容されない有害作用を引き起こすことなく免疫応答の有効レベルをもたらす任意の様式を用いて実施することができる。好ましい投与様式は、非経口経路である。用語「非経口」には、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内および胸骨内の注射または注入技術が含まれる。他の経路には、限定されずに、経口、経鼻、経皮、舌下および局所が含まれる。

20

【0132】

他の送達系には、徐放性、遅延放出または持続放出の送達系が含まれてもよい。そのような系は、本発明の多糖の反復投与を避けることができ、対象および医師への利便性を増加させる。多くの種類の放出送達系が当業者に利用でき、公知である。それらには、重合体をベースにした系、例えばポリ乳酸およびポリグリコール酸、ポリ無水物およびポリカプロラクトン；ステロール、例えばコレステロール、コレステロールエステル、ならびに脂肪酸または中性脂肪、例えばモノ-、ジ-およびトリグリセリドを含む脂質である非重合体の系；ヒドロゲル放出系；サイラスティック系；ペプチドをベースとした系；ワックスコーティング、従来の結合剤および賦形剤を使用した圧縮錠剤、部分的に融合した植込剤等が含まれる。具体的な例には、限定されずに以下のものが含まれる：(a)米国特許第4,452,775号(Kent)；第4,667,014号(Nestorら)；第4,748,034号および第5,239,660号(Leonard)で見出される、多糖がマトリックス内の形で含有されるエロージョン系、ならびに(b)米国特許第3,832,253号(Higuchiら)および第3,854,480号(Zaffaroni)で見出される、活性成分が制御された速度で重合体を透過する拡散系。さらに、ポンプ式装置送達系を使用することができ、その一部は植込みに適している。

30

【0133】

二次薬剤

dPNA Gおよび／またはPNA Gに特異的な抗体は、他の薬剤と一緒に送達することができる。他の薬剤の性質は、dPNA GがPNA Gに特異的な抗体が投与されるかによって決めることができる。

40

【0134】

例えば、能動免疫を誘導するために、および／または抗体を生成するために投与されるとき、dPNA Gはアジュバントと併用することができる。本明細書で用いるように、用語アジュバントは、抗原特異的免疫応答を強化するために抗原(dPNA Gなど)と併用投与される(例えば同時に、同じ製剤で、など)物質を指す。アジュバントには、限定されずに、アルミニウム化合物、例えばゲル、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム、ならびにフロイントの完全または不完全アジュバント(例えば、dPNA G抗原が、パラフィン油乳濁液中で安定した水の水相に組み込まれる)が含まれる。パラフィン油は、異なるタイプの油、例えばスクアレンまたは落花生油と置き換えることができる。アジ

50

ュバント特性を有する他の材料には、BCG (弱毒化 *Mycobacterium tuberculosis* )、リン酸カルシウム、レバミゾール、イソプリノシン、ポリアニオン (例えば、ポリA:U)、レンチナン、百日咳毒素、リピドA、サポニン、QS-21 およびペプチド、例えばムラミルジペプチドが含まれる。希土類塩、例えばランタンおよびセリウムをアジュバントとして使用することもできる。アジュバントの量は、対象および使用する特定の dPNA G 抗原 (例えば、アセテート置換のレベル) に依存し、当業技術者が不相応な実験なしで容易に決定することができる。

〔 0 1 3 5 〕

薬剤は、抗細菌薬、抗ウイルス薬、抗寄生虫薬、抗真菌薬等の抗微生物薬であってよい。

10

【 0 1 3 6 】

薬剤は、抗細菌薬（例えば、抗生物質）、別の細菌抗原、または別の抗細菌性抗体、またはその混合物もしくは組合せであってもよい。細菌感染症の処置における抗生物質の使用は、ルーチンである。能動免疫化を誘導するための抗原および受動免疫化を誘導するための抗体の使用も、ルーチンである。この実施形態では、一般的な投与ビヒクル（例えば、錠剤、植込み、注射可能な溶液など）は、本発明の活性薬剤と抗生物質および／または他の抗原および／または他の抗体の両方を含有することができた。あるいは、抗生物質および／または他の抗原および／または他の抗体は、別々に投与されてもよい。抗生物質は、d P N A G、または抗 d P N A G 抗体にコンジュゲートしていくてもよい。

20

〔 0 1 3 7 〕

抗細菌性抗生物質薬は周知であり、限定されずに、ペニシリンG、ペニシリンV、アンピシリン、アモキシシリン、バカンピシリン、シクラシリン、エピシリン、ヘタシリン、ピバンピシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、カルベニシリン、チカルシリン、アプロシリン、メズロシリン、ピペラシリン、アムジノシリン、セファレキシン、セフラジン、セファドキシリ、セファクロル、セファゾリン、セフロキシムアキセチル、セファマンドール、セホニシド、セホキシチン、セホタキシム、セフチゾキシム、セフメノキシン、セフトリアキソン、モキサラクタム、セホテタン、セホペラゾン、セフタジズム、イミペネム、クラブランネト、チメンチン、スルバクタム、ネオマイシン、エリスロマイシン、メトロニダゾール、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、バンコマイシン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール、アミノグリコシド、キノロン、テトラサイクリンおよびリファンピンが含まれる。(Goodman and Gilman's, Pharmacological Basics of Therapeutics, 8版, 1993年, McGraw Hill Inc.を参照)

30

[ 0 1 3 8 ]

多糖抗原 (P N A G および d P N A G 以外の) および多糖特異的抗体 (P N A G 特異的抗体以外の) は、当技術分野で公知である。例には、*Salmonella typhi* 荚膜 Vi 抗原 (Szu, S.C.、X. Li、A.L. Stone および J.B. Robbins、Relation between structure and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide、Infection and Immunity。59巻: 4555~4561頁 (1991年)) ; E. coli K5 荚膜 (Vann, W.、M.A. Schmidt、B. Jann および K. Jann、The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary tract infective *Escherichia coli*, 010:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin、European Journal of Biochemistry。116巻: 359~364頁、(1981年)) ; *Staphylococcus aureus* 5型莢膜 (Fournier, J.-M.、K. Hannon、M. Moreau、W.W. Karakawa および W.F. Vann、Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*、Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris)。138巻: 561~567頁 (1987年)) ; *Rhizobium meliloti* エキソポリサッカライド (exopolysaccharide) II (Glazebrook, J. および G.C. Walker、a novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium*

40

50

ium meliloti、Cell. 65巻：661～672頁(1989年)；B群 *Streptococcus* II型(Wessels, M.R.、V. Pozsgay、D.L. KasperおよびH. J. Jennings、Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III Group B *Streptococcus*、Journal of Biological Chemistry. 262巻：8262～8267頁(1987年)；*Pseudomonas aeruginosa* Fisher 7 O特異的側鎖(Knirel, Y.A.、N.A. Paramonov、E.V. Vinogradov、A.S. Shashkow、B.A. N.K. Kochetkov、E.S. StanislavskyおよびE.V. Kholodkova、Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa* The structure of O-specific polysaccharide chains of lipopolysaccharides of *P. aeruginosa* O3 (Lanyi), 025 (Wokatsch) and Fisher immunotypes 3 and 7、European Journal of Biochemistry. 167巻：549頁(1987年)；*Shigella sonnei* O特異的側鎖(Kenne, L.、B. LindbergおよびK. Petersson、Structural studies of the O-specific side-chains of the *Shigella sonnei* phase I lipopolysaccharide、Carbohydrate Research. 78巻：119～126頁(1980年)；*S. pneumoniae* I型莢膜(Lindberg, B.、Lindqvist, B.、Lonngren, J.、Powell, D.A.、Structural studies of the capsular polysaccharide from *S. pneumoniae* type 1、Carbohydrate Research. 78巻：111～117頁(1980年)；および*S. pneumoniae*群の抗原(Jennings, H.J.、C. LugowskiおよびN. M. Young、Structure of the complex polysaccharide C-substance from *S. pneumoniae* type 1、Biochemistry. 19巻：4712～4719頁(1980年))が含まれる。他の非ポリペプチド抗原および非多糖特異的抗体は当業者に公知であり、本発明の組成物と併用することができる。  
10  
20

## 【0139】

## 検出および診断アッセイ

dPNAGおよび合成オリゴ糖抗原およびそれらへの抗体は、対象または試料の免疫状態を決定する診断アッセイでも有益であるか、イムノアッセイで試薬として使用することもできる。例えば、試料中の、表面にPNAGを有する細菌などの微生物の存在を検出するために、抗体を使用することができる。微生物が試料中に存在するならば、感染した対象を処置するために抗体を使用することができる。PNAG抗原の存在について微生物をスクリーニングするために、ならびに複合混合物からdPNAGまたはPNAG抗原およびdPNAGまたはPNAG抗原を含有する微生物を単離するために、抗体を使用することもできる。  
30

## 【0140】

上記のアッセイおよび当技術分野で公知である任意の他のアッセイは、dPNAGまたは抗体を標識し、および/または不溶性マトリックスの上にdPNAGまたは抗体を固定化することによって達成することができる。dPNAGおよび/またはその抗体を使用するための分析および診断方法は、以下の試薬の少なくとも1つを使用する：標識された分析物類似体、固定化された分析物類似体、標識された結合パートナー、固定化された結合パートナーおよび立体コンジュゲート。使用する標識は、分析物とその結合パートナーの結合に干渉しない任意の検出可能な官能性であってもよい。イムノアッセイでのそのような使用のために、多数の標識が公知である。例えば、蛍光色素、化学発光および放射性標識などの直接に検出することができる化合物、ならびに酵素などの反応または誘導体化を通して検出することができる化合物。この種の標識の例には、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>Hおよび<sup>131</sup>I放射性同位体、蛍光団、例えば希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラビンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリ性ホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガ  
40  
50

ラクトースオキシダーゼおよびグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼが含まれる。H R P、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼなどの、色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素に結合した、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼ、ビオチンアビシン、スピノ標識、バクテリオファージ標識および安定した遊離基。

【0141】

標識は、当業者に公知である方法によって、d P N A G または抗 d P N A G 抗体にコンジュゲートさせることができる。例えば、米国特許第3,940,475号および第3,645,090号は、蛍光団および酵素の抗体へのコンジュゲーションを示す。報告によると抗原および抗体で一般的に使用され、本発明により使用することができる他のアッセイには、競合アッセイおよびサンドイッチアッセイが含まれる。

10

【0142】

以下の実施例は例示のために含まれ、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0143】

(実施例1) 様々な微生物種による細菌性表面多糖ポリ - N - アセチルグルコサミン ( P N A G ) の発現。

【0144】

抗体の直接結合：P N A G 生成を促進するために、大気酸素条件 (21% O<sub>2</sub>)、5% C O<sub>2</sub> または嫌気性条件下で、20 から 37 の範囲内の温度で生物体を様々な培地で 24 ~ 72 時間成長させる。プレートからの細胞は P B S (リン酸緩衝食塩水) に直接に懸濁し、プロス中のそれらは洗浄して P B S に再懸濁させる。

20

【0145】

試料をスライドの上に置き、その後 1 分間メタノールで固定する。試料を、A l e x a f l u o r 488 (A F 488) (1.63 mg / ml 原液の 1 : 313 希釀溶液、最終濃度 5.2 μg / ml) に直接にコンジュゲートさせた M A b F 429 (陰性対照、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a アルギネート抗原に特異的なヒト I g G 1)、または A F 488 (4.35 mg / ml の原液の 1 : 833 希釀溶液、最終濃度 5.2 μg / ml) に直接にコンジュゲートさせた M A b F 598 (P N A G に特異的なヒト I g G 1) と一緒に、0.5% B S A 含有 P B S 中で、4 および 4 μM の S y t o 83 において一晩さらにインキュベートする。試料を P B S で洗浄し、共焦点分析のために 1.5 カバーガラスでマウントする。

30

【0146】

P N A G への M A b F 598 結合の特異性：P N A G 生成を促進するために、大気酸素条件 (21% O<sub>2</sub>)、5% C O<sub>2</sub> または嫌気性条件下で、20 から 37 の範囲内の温度で生物体を様々な培地で 24 ~ 72 時間成長させる。プレートからの細菌細胞は T B S (トリス緩衝食塩水、p H 6.5) に直接に懸濁し、プロス中のそれらは洗浄して T B S に再懸濁させる。

【0147】

一般に、試料はキチナーゼ、D i s p e r s i n B または過ヨウ素酸塩で処理し、次に M A b F 598 に曝露する。T B S p H 6.5 中の試料は、(a) 50 μg / ml キチナーゼ (陰性対照) と、(b) D i s p e r s i n B (P N A G を消化する) と 37 で 24 時間、または (c) 0.4 M 過ヨウ素酸塩と 37 で 2 時間インキュベートする。P N A G は過ヨウ素酸塩によって開裂し、D i s p e r s i n B によって消化され、キチナーゼの影響を受けない。細胞は、P N A G に対するヒト I g G モノクローナル抗体 (M A b)、または無関係な抗原 - P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a アルギネートに対する I g G 1 M A b (M A b F 429、陰性対照、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a アルギネート抗原に特異的なヒト I g G 1) と次に反応させた。無関係な抗原に対する抗体は、P N A G に結合しないはずである。

40

【0148】

50

具体的には、試料を洗浄し、10  $\mu$  lの一定分量をガラススライドの上で風乾し、続いて1分間、メタノールで固定する。4で一晩、4  $\mu$  MのSyt o 83 (DNAを赤く染色する)と一緒に、0.5%BSA含有PBS中で、Mab F429 (陰性対照)をAF488 (1.63 mg/ml原液の1:313希釈溶液、最終濃度5.2  $\mu$  g/ml)に直接にコンジュゲートさせ、Mab F598 (抗PNA G、ロット2)をAF488 (4.35 mg/mlの原液の1:833希釈溶液、最終濃度5.2  $\mu$  g/ml)に直接にコンジュゲートさせた。試料をPBSで洗浄し、共焦点分析のために1.5カバーガラスでガラススライドの上にマウントした。

【0149】

【表 1 - 1】

表 1

微生物	MAb F598	MAb F598 +キチナーゼ	MAb F598 +Dispersin	MAb F598 +過ヨウ素酸 塩	陰性対照	
<i>S. aureus</i> (陽性対照)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Streptococcus pneumonia</i> (D39 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	10
<i>Streptococcus pneumonia</i> (ATCC8 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (950771 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (M781 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (V583 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	ND	陰性 (暗色)	20
<i>Listeria monocytogenes</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Clostridium difficile</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Bacteroides fragilis</i> (9343 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	ND	陰性 (暗色)	30
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37RV 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	
<i>Neisseria meningitidis</i> (B16B6 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	40
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (179008 株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	

【表1-2】

<i>Hemophilus influenzae</i> (型別不能) (140株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Hemophilus ducreyi</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Helicobacter pylori</i> (88-3857株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Campylobacter jejuni</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Citrobacter rodentium</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	ND	陰性 (暗色)
<i>Candida albicans</i> (酵母)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Candida albicans</i> (菌糸)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Aspergillus flavis</i>	陽性 (緑色)	ND	ND	ND	陰性 (暗色)
<i>Fusarium</i>	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	陽性 (緑色)	ND	ND	ND	陰性 (暗色)
<i>Plasmodium berghei</i> (ANKA株) -感染マウス血液中	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Plasmodium falciparum</i> (Senegal 2株) -感染血液中	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Salmonella enterica</i> 血清型チフス菌 (TY2株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)
<i>Salmonella enterica</i> 血清型 ネズミチフス菌 (LT2株)	陽性 (緑色)	陽性 (緑色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)	陰性 (暗色)

ND = 実施されない。

【0150】

さらに、*S. pneumoniae* 中耳炎の子供からの中耳浸出液 (M E F) の試料、  
および型別不能の *H. influenzae* 中耳炎の子供からの 2 つの M E F 試料におい

10

20

30

40

50

て、感染細菌でキチナーゼ抵抗性の *dispersin B* 感受性の PNA G が検出された。同じ感染細菌は、*S. pneumoniae* か *H. influenzae* のいずれかに特異的な抗体でも染色された。PNA G は、*M. tuberculosis* 感染患者からの肺組織でも検出された。*S. pneumoniae* 血清群 19 A に実験的に感染させたチンチラからの鼻咽頭液では、キチナーゼ抵抗性の *dispersin B* 感受性 PNA G 抗原と血清群 19 A 荚膜の共存が容易に見られた。*C. rodentium* に実験的に感染させたマウスの胃腸管では、上皮細胞と関連している微生物周囲に PNA G が検出された。*C. albicans* 角膜炎のマウスからの眼組織では、真菌細胞の DNA 陽性部分で PNA G が検出された。

## 【0151】

10

さらに、共焦点顕微鏡分析で MAb F598 と反応するが MAb F429 と反応しない細菌株には、*Vibrio cholerae* 2R1 および *Vibrio cholerae* O395 が含まれる。

## 【0152】

PNA G に対するポリクローナルウサギ抗体と反応するが正常なウサギ血清と反応しない細菌株には、*Bacteroides thetaiotaomicron* および *Bacteroides vulgaris* が含まれる。

## 【0153】

(実施例 2) GI 管中の *C. rodentium*。

## 【0154】

20

試料を、AF488 (1.63 mg / ml 原液の 1 : 313 希釀溶液、最終濃度 5.2 μg / ml) に直接にコンジュゲートさせた MAb F429 (陰性対照、*P. aeruginosa* アルギネート抗原に特異的なヒト IgG1)、または AF488 (4.35 mg / ml の原液の 1 : 833 希釀溶液、最終濃度 5.2 μg / ml) に直接にコンジュゲートさせた MAb F598 (PNA G に特異的なヒト IgG1) と、0.5% BSA 含有 PBS 中で、4 および 4 μM の Syto 83 (核の染色のため) において一晩反応させた。試料を PBS で洗浄し、共焦点分析のために 1.5 カバーガラスでマウントする。

## 【0155】

30

結果は、F598 抗体を使用して、感染マウスの GI 管で *C. rodentium* コロニーに PNA G が存在することを示した。MAb F429 はコロニーを染色せず、F598 MAb による染色の特異性を確認した (データ示さず)。

## 【0156】

(実施例 3) 耳および鼻洗浄液中の *S. pneumoniae*。

## 【0157】

この実施例は、中耳炎のチンチラの耳および鼻洗浄液における莢膜 19 A 型と PNA G 抗原の *S. pneumoniae* の上での同時発現を実証する。

## 【0158】

40

試料を、50 μg / ml の *dispersin B* またはキチナーゼと TBS 中で一晩インキュベートし、次に 4 で一晩、BSA / PBS 中の 1 : 50 の F598 (1 mg / ml) または F429 (1 mg / ml) およびウサギ抗 *S. pneumoniae* 19 A 莢膜多糖 (1 : 100) で標識し、続いて室温で 1 時間、AF488 にコンジュゲートさせたヤギ抗ヒト IgG およびヤギ抗ウサギ AF568 により 1 : 200 で標識した。

## 【0159】

結果は、中耳炎のチンチラの鼻咽頭洗浄液における *S. pneumoniae* 細菌細胞を囲む PNA G の存在を示した。キチナーゼおよび *dispersin B* で処理し、次に対照の MAb F429 に曝露した試料は、陰性であった。*dispersin B* で処理し、次に MAb F598 に曝露した試料は、陰性であったが、キチナーゼで処理し、次に MAb F598 に曝露した試料は陽性であって、中耳炎のチンチラの鼻咽頭洗浄液における PNA G の存在を実証した。染色パターンは、ウサギ抗 *S. pneumoniae* 19 A 染色と

50

重複した(データ示さず)。

【0160】

同様に、キチナーゼ処理後のPNA G特異的M Ab F598による染色で決定されたが対照のM Ab F429では決定されなかった通り、S. pneumonia 19Aに感染して中耳炎を有するチンチラの内耳液(洗浄液)および鼻管でPNA Gが検出された。染色パターンは、ウサギ抗SPn 19A染色と重複した(データ示さず)。

【0161】

(実施例4) 中耳炎の子供からのヒト内耳液中のS. pneumoniaまたは型別不能のH. influenza。

【0162】

内耳液試料を、37で一晩、100μg/mlのDNアーゼIとともにインキュベートし、次に、37で24時間、TBS中の50μg/mlのキチナーゼまたはDispersin Bで処理した。試料を洗浄し、10μlの一定分量をガラススライドの上で風乾し、熱固定し、50μg/mlのF598(AP01)またはF429(1mg/ml)、およびマウス抗S. pneumoniaeホスファチジルコリン(1:100)またはモルモット抗H. influenzae(熱殺傷全細胞；1:100)により、4で一晩、0.5%BSA含有PBS(PBS/BSA)中で標識した。試料をPBSで洗浄し、AF488にコンジュゲートさせた1:250の抗ヒトIgG、およびAF568にコンジュゲートさせた1:200のヤギ抗マウスIgGまたはヤギ抗モルモットIgGと室温で1時間、PBS/BSA中でインキュベートした。スライドを洗浄し、マウントした。

【0163】

結果は、S. pneumoniae耳感染症(中耳炎)を有するヒト対象の内耳液でのPNA Gの存在を実証する。キチナーゼ、続いてM Ab F429またはDispersin B、続いてM Ab F598に曝露した試料は陰性であったが、キチナーゼ、続いてM Ab F598に曝露した試料は陽性であった。S. pneumoniaeホスファチジルコリンに対するマウス抗体染色で観察されたものと、染色パターンは重複した(データ示さず)。

【0164】

(実施例5) 血液中のP. bergheiおよびP. falciparum。

【0165】

マラリア感染マウス(P. berghei NK-65に感染したBALB/CJ、感染後18日目)から作製された、未染色の新鮮な血液スミアの共焦点鏡検。キチナーゼ、Dispersin Bおよび過ヨウ素酸塩処理のために、スミアを3つのウェルにpappenで分割した。スライドを熱で固定し、TBS中の50μg/mlのキチナーゼもしくはDispersin Bにより37で24時間、または0.4M過ヨウ素酸塩により37で2時間処理した。スライドをPBSで洗浄し、AF488に直接にコンジュゲートさせたM Ab F598(1.3mg/ml原液；1:250の希釈液を使用、600μl中に2.4μlに同等；最終濃度は600μl中に5.2μg/mlまたは3.12μg；1ウェルにつき200μlを添加)とともにインキュベートした(緑色)。0.5%BSA含有PBS( BSA/PBS)中の4μMのSYTO83(DNA色素-赤色)も加えた；両方とも室温で4時間インキュベートした。スライドをPBSで洗浄し、共焦点鏡検によって観察するために1.5μmカバーガラスをかぶせた。

【0166】

結果は、大脳マラリアから死に至ったマウスの血液中の、PNA Gの存在を示した。Dispersin Bまたは過ヨウ素酸塩で処理し、続いてM Ab F598で染色した試料は陰性であったが、キチナーゼで処理し、続いてM Ab F598で染色した試料は陽性であった(データ示さず)。

【0167】

類似したアプローチを使用して、P. falciparumに感染したヒトからの血液

10

20

30

40

50

でP N A Gの発現を分析した。対照のM A b F 4 2 9で染色した試料、およびD i s p e r s i n Bまたは過ヨウ素酸塩で処理し、続いてM A b F 5 9 8で染色した試料は陰性であった（データ示さず）。キチナーゼで処理したか処理せず、次にF 5 9 8で染色した試料は陽性であった（データ示さず）。F 5 9 8の染色パターンは、赤血球中のD N Aの同定と重複し、そのことは、ヒト赤血球は核またはD N Aを含有しないのでマラリア原虫の存在を示す（データ示さず）。

## 【0168】

（実施例6）肺のB. dolosae。

## 【0169】

前の実施例に記載のものに類似したアプローチを使用して、B. dolosae肺炎および敗血症から死に至った囊胞性線維症患者からの肺組織から切片を作製し、P N A G発現について分析した。肺細胞核を染色するために、T O - P R O - 3を使用した。抗B. dolosaeマウス血清、続いてA F 5 6 8 口バ抗マウスI g Gを使用して、B. dolosae細胞を可視化した。9 G 1 c N H 2 - T T P N A Gグリコフォームに対するウサギ抗血清、続いてA F 4 8 8 ヤギ抗ウサギI g Gを使用して、P N A Gを可視化した。陰性対照は、T O - P R O - 3核染色を有する正常なウサギ血清であった。P N A G発現は、B. dolosae細胞染色と重複した（データ示さず）。

10

## 【0170】

（実施例7）目のC. albicans。

## 【0171】

製造業者の指示通りにE z D e w a xを使用して、C. albicans感染マウスの目のパラフィン包埋組織切片を脱パラフィンした。スライドを室温で2時間水中で再水和し、続いて室温で2時間、0.5% B S A / P B S 中でブロックした。試料を、4および4 μ MのS y t o 8 3において一晩、0.5% B S A含有P B S 中で、A F 4 8 8 ( 1 . 6 3 m g / m l 原液の1 : 3 1 3 希釀溶液、最終濃度5.2 μ g / m l ) に直接にコンジュゲートさせたM A b F 4 2 9（陰性対照）、またはA F 4 8 8 ( 4 . 3 5 m g / m l の原液の1 : 8 3 3 希釀溶液、最終濃度5.2 μ g / m l ) に直接にコンジュゲートさせた抗P N A GのM A b F 5 9 8と一緒にさらにインキュベートした。試料をP B Sで洗浄し、共焦点分析のために1.5カバーガラスでマウントした。

20

## 【0172】

結果は、M A b F 5 9 8による核の共焦染色を示したがM A b F 4 2 9では示さず、i n v i v oでのC. albicansによるP N A Gの発現を実証した（データ示さず）。

30

## 【0173】

（実施例8）C. albicans角膜炎のマウスモデルにおける抗微生物P N A G M A b F 5 9 8の効力。

## 【0174】

麻酔下雄C 5 7 B 1 / 6マウスの角膜を傷つけ（3 × 1 m m）、5 μ l 容量のC a n d i d a a l b i c a n s S C 5 3 1 4の約10<sup>5</sup> ~ 10<sup>7</sup> C F U / 目によって接種することによって、角膜炎を誘導した。感染から4時間後に、I P注射および/または局所塗布によってP N A G特異的M A b ( F 5 9 8 )または対照ヒトI g G 1 M A b ( F 4 2 9 )を送達し、感染から24および32時間後に追加の抗体を局所に塗布した。感染から24および32時間後に、マウスをチェックし、対照がこの時点で回復不能の角膜傷害を示したならば、動物を安楽死させ、C F U / 目を決定した。36時間後の対照が損傷を受けた目に3+以下の傷害を有していたならば、感染を48時間まで進行させ、その後、マウスを安楽死させ、マウス処置について盲検化された観察者がC F U / 目および0から4の角膜病理スコアを決定した。角膜病理スコアは以下の通りであった：

40

スコア4：角膜の穿孔

スコア3：前上葉区を覆う濃い不透明度

スコア2：瞳孔を覆う濃い不透明度

50

スコア1：瞳孔を部分的に覆うかすかな不透明度

スコア0：感染していない反対側の目に同一。

【0175】

M A b F 5 9 8 の I P 注射および/または局所塗布によって治療的に処置した C . a l b i c a n s 感染マウスは、対照 M A b F 4 2 9 で処置したマウスと比較して、目の著しく低減された細菌レベルおよび低減された角膜病理を有した。これらのデータは、図 1 ~ 4 に提示される。

【0176】

抗 P N A G 抗体は、C . a l b i c a n s 角膜炎モデルにおいて治療効力を実証し、P N A G の in vivo 発現、ならびに P N A G に対するワクチンおよび免疫療法薬による真菌感染症の予防または処置の可能性を示した。

10

【0177】

(実施例9) S . p n e u m o n i a が原因の致死性の肺炎に対する抗 9 G 1 c N H 2 - T T コンジュゲートワクチンポリクローナル抗体の保護効力。

【0178】

5 % C O <sub>2</sub> の 3 7 において、S . p n e u m o n i a e D 3 9 株をトリプチカーゼダイズプロス ( T S B ) で一晩成長させた。6 5 0 n m の O D が 0 . 1 まで培養をトッド - ヒューウィットプロス + 1 % グルコースに希釈し、O D = 0 . 4 5 まで ( およそ 2 . 5 時間 ) 3 7 で成長させた。イソフルラン麻酔下において、C B A / N マウスを、3 7 . 5 μ l の熱不活性化正常ヤギ血清、または P B S に 5 0 μ L に希釈した抗 9 G 1 c N H 2 - T T コンジュゲートワクチンに対して作製したヤギ抗血清で眼窩後部 ( R O ) に注射した。マウスに注射した。2 4 時間後に、細菌調製物を 6 5 0 n m の O D が 0 . 4 5 まで希釈した ( すなわち、この実験のために、P B S で 8 3 μ L を 9 1 7 μ L に希釈して、3 × 1 0 7 C F U / m L を与えた。ケタミン / キシラジン ( 1 マウスにつき 2 5 0 μ L ) でマウスを麻酔にかけ、2 × 1 0 μ L 用量の細菌を鼻腔内に注いだ。7 日の間、マウスの生存を監視した。結果を図 5 に示す。

20

【0179】

さらに、F V B マウスで抗原型 9 V D S M 1 1 8 6 5 株による鼻腔内感染の 4 時間前に与えられた m A b F 5 9 8 は、マウス肺での細菌負荷の低減において抗生物質セホタキシム ( 感染から 1 および 4 時間後に投与される ) と同じくらい強力であることが見出された。

30

【0180】

(実施例10)

S . p y o g e n e s ( A 群 S t r e p t o c o c c u s ) が原因の致死性の皮膚感染症に対する抗 9 G 1 c N H 2 - T T コンジュゲートワクチンポリクローナル抗体の保護効力。

【0181】

マウスは、C D 1 ( I C R ) 6 週齢雌マウスであった。第 1 群 ( 8 匹のマウス ) は、正常なウサギ血清 ( N R S ) を注射したマウスに対応した。第 2 群 ( 8 匹のマウス ) は、9 G 1 c N H 2 - T T を注射したマウスに対応した。細菌は、対数期の 1 0 <sup>7</sup> C F U / m l で使用された A 群 S t r e p t o c o c c u s ( G A S ) 9 5 0 7 7 1 株であった。抗体は、2 0 0 μ l / マウス / 用量で使用されたポリクローナルウサギ抗 9 G 1 c N H 2 - T T および 2 0 0 μ l / マウス / 用量で使用された N R S であった。

40

【0182】

0 日目に、G A S 細菌細胞の保存株を血液寒天プレート ( B A P ) に画線培養し、3 7 で一晩インキュベートし、次に、3 7 での静止培養のために 1 % グルコースを含むトッド - ヒューウィット酵母エキスプロス ( T H Y + G ) の管を接種するために使用した。マウスは、感染の 2 4 時間前に I P 注射された。1 日目に、マウスは感染の 4 時間前に I P により 2 回目の免疫化を受けた。感染のための接種原を調製するために、1 0 m l の T H Y + G を使用して O D <sub>6 0 0</sub> n m = 0 . 0 5 の細菌懸濁液を作製し、O D <sub>6 0 0</sub> n m =

50

0.15が達成されるまで37に置いた。以下の通り、BAPでのCFU決定のためにこれを希釈して、播種した： $10^{-5}$ および $10^{-6}$ の希釈溶液の $10\mu l$ をBAPに播種した（希釈溶液につき2枚のプレート）。感染用接種原を調製するために、THY+G培養の $10\text{ml}$ を $15\text{ml}$ 円錐管に移し、20分の間 $2000\text{rpm}$ で管を遠心分離して、細菌細胞をペレットにした。上清を廃棄し、 $1\text{ml}$ のTHY+Gプロスにペレットを懸濁し、それをミクロチューブに移して2分の間 $8000\text{rpm}$ で遠心した。上清を廃棄し、細菌細胞のペレットを $500\mu l$ の注射用水に懸濁し、次に $1\text{ml}$ の27ゲージシリジに移して氷中に保った。注射用水による $50\text{mg}/\text{ml}$ のネンブタールの $1:4$ 希釈溶液を作製し[最終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ]、IP注射した（1マウスにつき $0.3\text{ml}$ の麻酔薬溶液）。右側腹部を剃り、エタノールで拭き、次に1マウスにつき $0.1\text{ml}$ の細菌懸濁液（すなわち、 $5 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{マウス}$ ）を皮下に注射した。実際の接種原を確認するために、計数のために細菌懸濁液を希釈して、播種した。注射した細菌懸濁液は $1.7 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{ml}$ の濃度を有し、 $1.7 \times 10^5 \text{ CFU}$ が各マウスに注射されたことを意味した。マウスを観察し、瀕死のマウスは安楽死させた。結果を図6に示す。

#### 【0183】

（実施例11）B群*N. meningitidis*を抗原投与した2～3日齢の子マウスの髄膜炎（脳の細菌）に対する、ウサギで作製された抗*9G1cNH2*-TTコンジュゲートワクチン抗体の保護効力。

#### 【0184】

マウスは、生後2日から3日のCD-1新生児マウスであった。*N. meningitidis*を一晩血液寒天プレートで成長させ、細菌細胞をPBSに削り取り、記した様々な抗原投与用量を与えるように $600\text{nm}$ のODを調整した。感染の24時間前に、NRS（ $50\mu\text{l}$  IP（AccurateからのNRS））または*9G1cNH2*-TTコンジュゲートワクチンに対して作製されたウサギ血清（ $50\mu\text{l}$  IP（ウサギ4.2、Bleed 4-3/4-4））によりマウスを1度注射した。24時間の後、 $50\mu\text{l}$ の血清群Bの*N. meningitidis* B16B6株で、マウスを以下の希釈によりIPで抗原投与した： $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$ または $5 \times 10^8$ 。マウスを24時間後に屠殺し、細菌計数のために脳を取り出し、ホモジナイズして、チョコレート寒天プレートに播種した。結果を図7に示す。

#### 【0185】

（実施例12）感染性大腸炎に感受性のマウスに投与されるときの完全ヒトIgG1 MAb F598の保護効力。

#### 【0186】

TRUCマウスは、獲得および先天性の免疫系を欠く（GarrettらCell、2007年、131巻（1号）：33～45頁；Garrettら、Cell Host Microbe、2010年、8巻（3号）：292～300頁）。これらのマウスは、8週齢までに感染性大腸炎を自然発症する。新生児TRUCマウスに、生後1週目から始めて、MAb F598もしくはPBS、またはMAb F598もしくは対照ヒトIgG1 MAbの $50\mu\text{g}$ を、週に3回、8週後の屠殺までip注射した。記載される通りに、大腸炎の評価のためにマウスの腸管を取り出して処理した（Garrettら、Cell、2007年、131巻（1号）：33～45頁；Garrettら、Cell Host Microbe、2010年、8巻（3号）：292～300頁）。MAb F598または対照IgG1 MAbのいずれかを与えられたマウス群の間で、全体的な大腸炎病理スコアを比較した。結果は、図8および9に示す。

#### 【0187】

他の実験では、生後7日目から開始されたMAb F598の毎週の投与は、8週齢で決定された総組織病理学的傷害を有意に低減した（病理学者による盲検化された方法で）。

#### 【0188】

WT新生子がTRUC雌によって交差養育されるとき、それらは8週後に大腸炎を自然発症するが、TRUC子孫におけるより重度でない。攪乱されない免疫系機能の状況下で

10

20

30

40

50

、大腸炎に対するmAb F598の治療能力を評価するために、TRUC雌によって養育されたWTマウスの、mAb F598または対照ヒトIgG1 mAb F105の隔週注射による処置を4週齢で開始し、8週齢の結腸病理のレベルを決定した。mAb F598は、対照と比較してレシピエントマウスでの総病理スコアを有意に低減し、単球浸潤および反応性過形成が有意に低減されたが、対照のほとんどがゼロの損傷スコアであったので損傷は低減されなかった（データ示さず）。

【0189】

（実施例13）*L. monocytogenes* 10403S株に対する、ウサギで作製した抗9G1cNH2-TTコンジュゲートワクチン抗体の保護効力。

【0190】

NRS (n = 15) または 9G1cNH2-TTコンジュゲートワクチンに対して作製したウサギ免疫血清 (n = 15) の 50 μl による抗原投与の 24 時間前に、2日齢から 3 日齢の CD1 子マウスを IP 免疫化した。マウスを *L. monocytogenes* (% × 10^8 CFU / 50 μl) で IP 抗原投与した。24 時間の間、生存を監視した。全生存は、Yates 補正によるカイ二乗によって分析した、P = 0.01。結果は、図 10 に示す。

【0191】

マラリアの有効なワクチンは、複数の寄生虫抗原をたぶん必要とするが、PNAG が多価ワクチンのためのワクチン抗原構成成分の候補であるかどうかについての決定での初期ステップとして、PNAG 陽性 *P. berghei* ANKA に感染した C57BL/6 マウスを、感染の前日から開始して感染から 20 日後まで 3 日おきに i.p. 注射された、200 μL の抗 PNAG ポリクローナル抗体または対照の正常血清で処置した。PNAG に対する抗体は、処置されたマウスの生存を有意に延長させ、大脳マラリアの発症を予防した。正常な血清で処置した 8 匹のマウスのうちの 5 匹は低レベルの寄生虫血症で 9 日目までに死亡し、残りの 3 匹は高レベルの寄生虫血症で 30 日目までに死亡した。PNAG に対する抗体で 3 週間処置したマウスについては、7 日目までに大脳マラリアで 1 匹だけが死亡し、4 匹はレベルが上昇する寄生虫血症を発症して、33 日目までに死亡し、それは抗体の最後の注射から 13 日後であり、1 匹は 22 日目まで検出可能な寄生虫血症を有さず、40 日目（抗体の最後の注射から 20 日後）に死亡し、2 匹のマウスは検出可能な寄生虫血症をほとんど有さず、45 日間の実験期間を生き延びた。当初のプロトコール条件に従って、抗体処置は 20 日目に中止した。抗体処置の期間を増加させることによって、長期生存が観察される可能性がある。

【0192】

（実施例14）PNAGに対する抗体は、多様なPNAG発現病原体のオプソニン性または殺細菌性の殺傷を媒介する。

【0193】

新鮮なヒト PMN の代わりに HL60 細胞が食細胞の供給源として使用されたこと以外は、*S. pneumoniae* および *E. faecalis* オプソニン性殺傷プロトコールは、Skurnik ら (J Clin Invest. 2010 年、120 卷 (9 号) : 3220 ~ 33 頁) によって *S. aureus* について公表されているものに類似している。0.8% DM F で HL60 細胞を 6 日の間分化させ、1.3 × 10^6 / ml に調整した。37℃ で一晩（振盪なし）、細菌を成長させた。*S. pneumoniae* を、5% CO2 の THY + 1% グルコース (THY + G) に置いた。*E. faecalis* は、大気条件で成長させた。アッセイの最後に、TSB + 血液寒天の上で細菌株を播種した。振盪により CSB で一晩成長させた標的の *S. aureus* MN8 細菌で、補体を吸着させた。C' : *S. aureus* MN8 細胞で吸収させた、Invitrogen カタログ番号 31203 / S ロット番号 510908698270 からの補体血清。ウサギ抗体を 2 つの抗原の 1 つに対して作製した：

1. 破傷風トキソイドにコンジュゲートさせた脱アセチル化 PNAG (dPNAG) (dPNAG-TT) : Maira-Litran ら、Infect Immun. 2005 年、73 卷 (10 号) :

10

20

30

40

50

6752～62頁。正誤表：*Infect Immun.* 2005年、73巻(11号)：7789頁；および

2.TTにコンジュゲートさせた合成9G1cNH<sub>2</sub>オリゴ糖：Geningら、*Infect Immun.* 2010年、78巻(2号)：764～72頁。

PNAGに対するヒトMAb、MAb F598も試験した(Kelly-Quintosら、*Infect Immun.* 2006年、74巻(5号)：2742～50頁)。

#### 【0194】

結果を、図11～13に示す。

#### 【0195】

A群*Streptococcus*オプソニン性殺傷プロトコールは、以下の通りである  
：A群*Streptococcus*(GAS)771、188株を使用した。使用したMAbロット：[19mg/ml]のF598 AP1-01、新たに解凍×1。MAb F598の対照：*P. aeruginosa*アルギネートに対するMAb F429[1.0mg/ml]。冷凍保存株から*S. aureus* MN8株を成長させ、ふたをゆるめて振盪させながら37度50ml円錐中の10mlのTHB+Gに接種した。GAS 771および188をONプレートからTHY+Gで成長させ、37度の静置培養によりOD650=0.05で接種した。冷凍保存株から*S. aureus* MN8 Dicaを成長させ、ふたをゆるめて振盪させながら37度50ml円錐中の10ml CSB中のTHB+Gに接種した。アッセイの最後に、血液を含むTSAにGAS株を播種した。振盪によるTHB+G、または静置THY+Gでそれぞれ一晩成長させた標的の*S. aureus* MN8 DicaまたはGAS771細菌で、補体を吸着させた。緩衝剤：H BSS+0.1%ゼラチン。C'：*S. aureus* MN8 DicaまたはGAS771もしくは188の細胞で吸収させた、*Invitrogen*カタログ番号31203/Sロット番号510908698270からの補体血清。

#### 【0196】

結果を図14に示す。

#### 【0197】

*C. albicans*オプソニン性殺傷プロトコールは、以下の通りである：*C. albicans*をOD1.0までYPD(酵母エキス/ペプトン/ブドウ糖)プロスで成長させ、次に遠心し、MEM+1%BSAに再懸濁し、ODを650nmで0.4に調整し、その後懸濁液を1:10に希釈した。プロテインAによってMAb F429をハイブリドーマ上清から精製し、pH6.5のPBSに透析させ、-20度で保存した。緩衝剤：MEM+1%BSA。C'：*ウサギ*からの補体血清、Sigmaロット106K6029、カタログ番号S7764。補体は、*C. albicans*細胞で吸収させた。食細胞は、TRIMAカラードナーから得た。

#### 【0198】

結果を図15に示す。

#### 【0199】

*N. meningitidis*および*N. gonorrhoeae*殺細菌性殺傷プロトコールは、以下の通りである：正常なウサギ血清(-20度保存液からのNRS、Accurate Chemical、ロット2008)および9G1cNH<sub>2</sub>-TTコンジュゲートワクチンに対して作製されたウサギ抗体、-20度で保存、ウサギ4.3および4.4からの血清を使用した。血清を4度平衡させ、アッセイまで4度に保った。*N. meningitidis*または*N. gonorrhoeae*細菌を、5%CO<sub>2</sub>においてチョコレート寒天培地で24～48時間成長させた。0.5%グルコース、9mMのCaCl<sub>2</sub>および4.9mMのMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oおよび1%(重量/容量)ウシ血清アルブミンを含有するPBS(Lifeblood Medical, Freehold, NJ)=PBS++、pH7.4、に細菌を懸濁させた。細菌懸濁液は、チョコレート寒天培地懸濁液から作製されたOD<sub>650nm</sub>の懸濁液から、PBS++中の約1.5～2×10<sup>4</sup>CFU/mlまで希釈した。アッセイは、80μlの血清希釈液と20μlのナイ

セリア細胞を混合し、次に混合物を 37℃ で 1 時間インキュベートすることを含んだ。管は、軽く振盪させて（可能な場合軌道式）、37℃ に置いた。Mueller-Hinton プロスで 10 μl の 1:2 および 10<sup>-1</sup> の希釈液を作製し、次にチョコレート寒天培地に播種した。培養物は、5% CO<sub>2</sub> 中の 37℃ で一晩インキュベートした。翌日に、コロニーを計数した。結果を、図 16 および 17 に示す。

#### 【0200】

特異的抗原の阻害のあるなしで 9G1cNH<sub>2</sub>-TT に対するウサギ血清の存在下での *N. meningitidis* および *N. gonorrhoeae* 株の殺細菌性殺傷を、以下の通りに実行した：

#### 【0201】

緩衝剤：0.5% グルコース、9 mM の CaCl<sub>2</sub> および 4.9 mM の MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O および 1%（重量 / 容量）ウシ血清アルブミンを含有する緩衝 PBS（Lifeblood Medical、Freehold, NJ）= PBS++、pH 7.4。

#### 【0202】

使用した細菌株および調製物：0.5% グルコース、9 mM の CaCl<sub>2</sub> および 4.9 mM の MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O および 1%（重量 / 容量）ウシ血清アルブミンを含有する PBS（Lifeblood Medical、Freehold, NJ）= PBS++、pH 7.4、に細菌を再懸濁させる。細菌懸濁液を、OD のチョコレート寒天培地懸濁液からの OD 650 nm の懸濁液から、PBS++ 中の約 1.5 ~ 2 × 10<sup>4</sup> CFU / ml まで希釈する。

#### 【0203】

抗原阻害：PBS++ 中の 200 μg / ml の最終濃度に溶解する  
使用した PNAG 抗原：ロット 27。使用したアルギネート抗原は 2192 株から、PK 3（実行 1）

#### 【0204】

使用した抗血清：正常なウサギ血清（-20℃ 保存液からの NRS、Accurate Chemical）。9G1cNH<sub>2</sub>-TT コンジュゲートワクチンに対して作製されたウサギ抗体、-20℃ で保存、ウサギ 4.3 および 4.4 からの血清を使用した。

#### 【0205】

アッセイ：40 μl の血清供給源（希釈は、>80 ~ 90% の殺傷を達成するのに必要な、直接殺細菌アッセイで最も高い希釈に基づくが、1:2 の血清希釈での最大殺傷がより低くない場合に限り、その場合には、1:2 の最終希釈の血清を使用する）、40 μl の抗原および 20 μl のナイセリア細胞を混合する（抗原のない管は、80 μl の適切に希釈された抗血清を加える）。管は、軽く振盪させて（可能な場合軌道式）、37℃ に置く。チョコレート寒天培地に播種し、5% CO<sub>2</sub> の 37℃ で一晩インキュベートし、翌日にコロニーを計数する。

#### 【0206】

結果を図 18 および 19 に示す。

#### 【0207】

均等物

上記の明細書は、当業技術者が本発明を実施することを可能にするのに十分であるとみなされる。実施例は本発明の 1 つの態様の单一の例示であるものとされ、他の機能的に均等な実施形態は本発明の範囲内にあるので、本発明は提供される実施例によって範囲が限定されるものではない。本明細書に示され、記載されるものに加えて、本発明の様々な改変形が前述の記載から当業者に明らかになり、添付の請求項の範囲内である。本発明の利点および目的は、本発明の各実施形態に必ずしも包含されるとは限らない。

#### 【0208】

本出願で列挙される全ての参考文献、特許および特許公報は、特に明記しない限り、参考により完全に本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

【 义 1 】

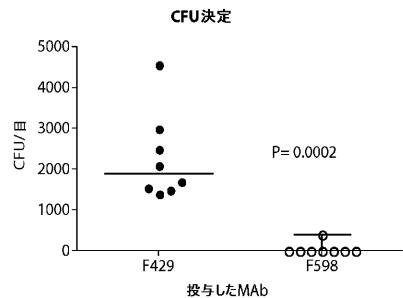


Fig. 1

【 四 2 】

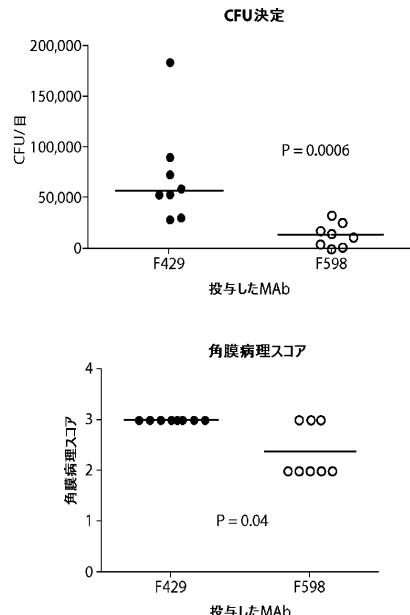


Fig. 2

【 义 3 】

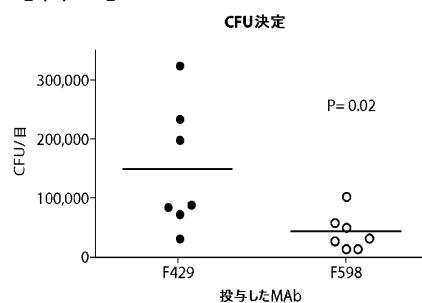


Fig. 3

【図4】

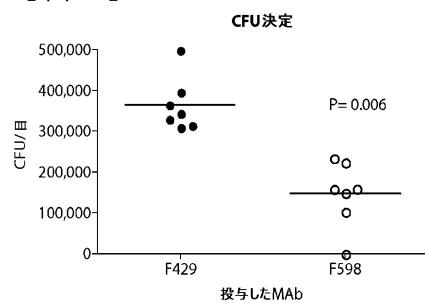


Fig. 4

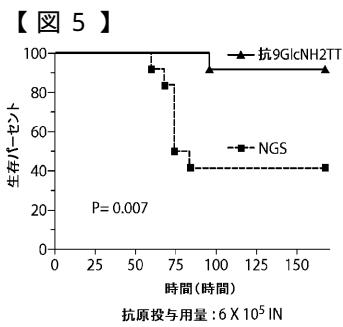


Fig. 5

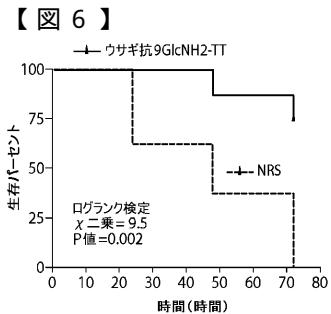


Fig. 6

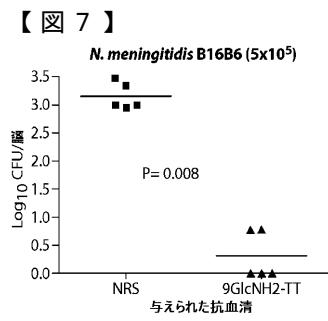


Fig. 7

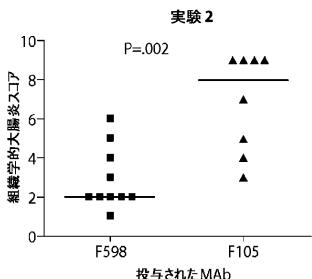
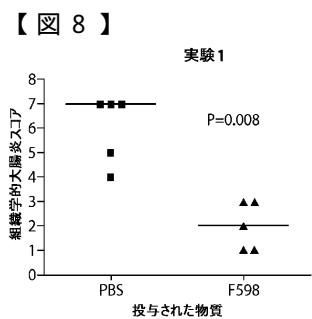


Fig. 8

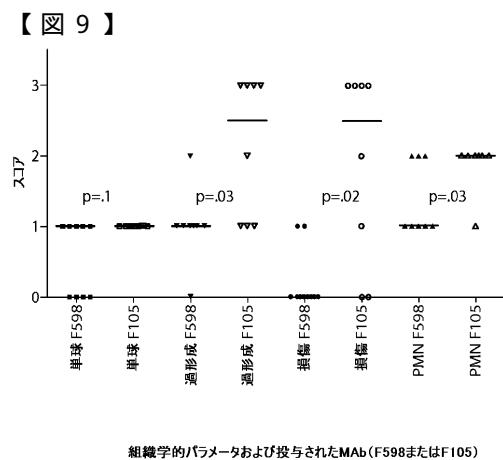


Fig. 9

【図10】

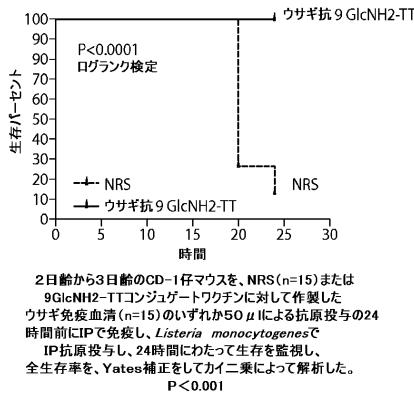


Fig. 10

【図11】

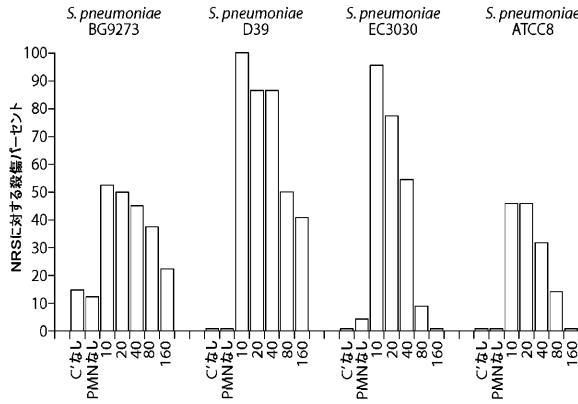


Fig. 11

【図12】

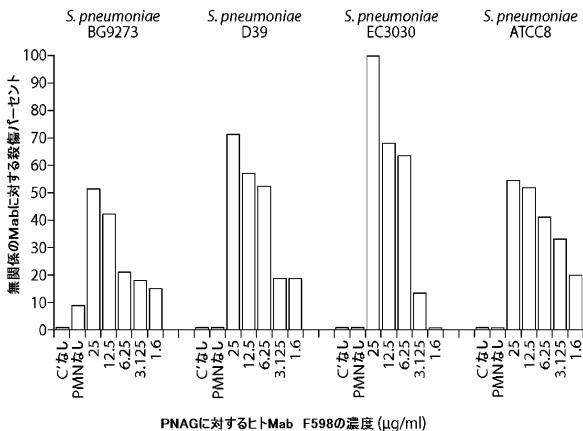


Fig. 12

【図13】

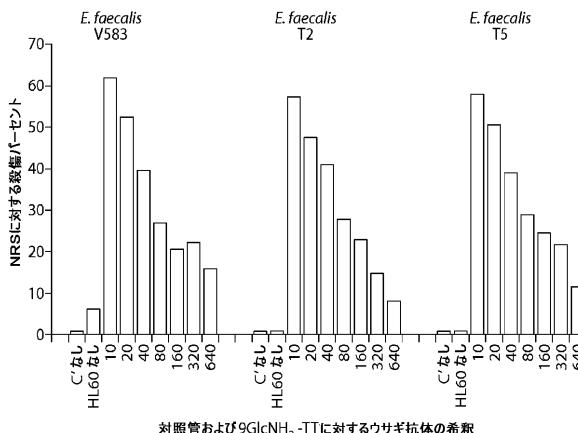


Fig. 13

【図 14】

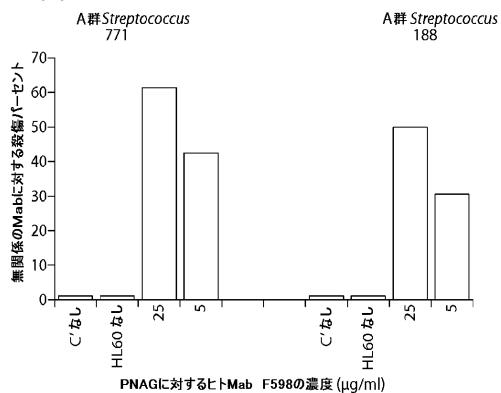


Fig. 14

【図 15】

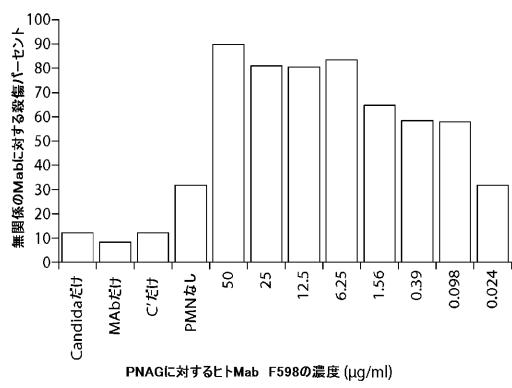


Fig. 15

【図 16】

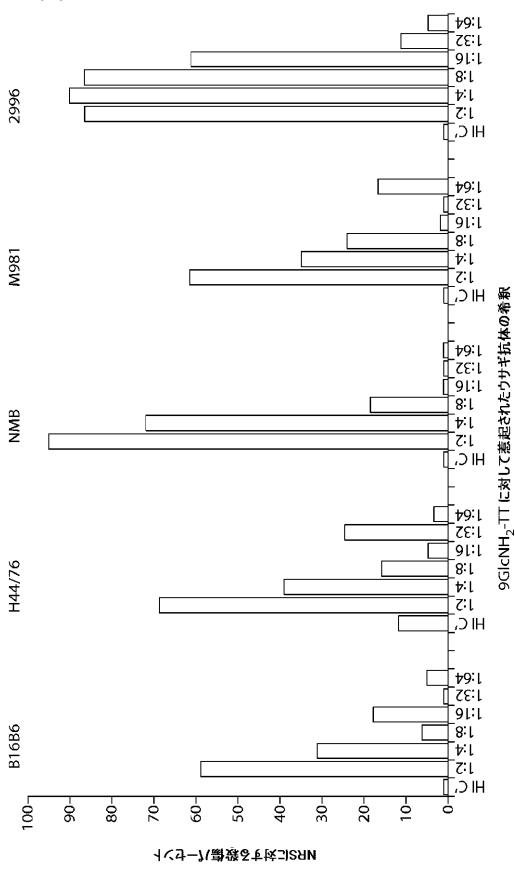


Fig. 16

【図 17】

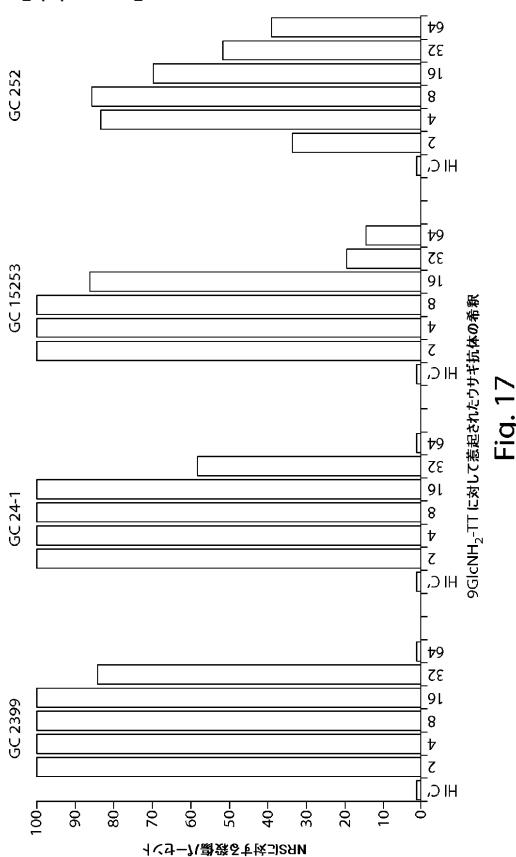


Fig. 17

【図 18】

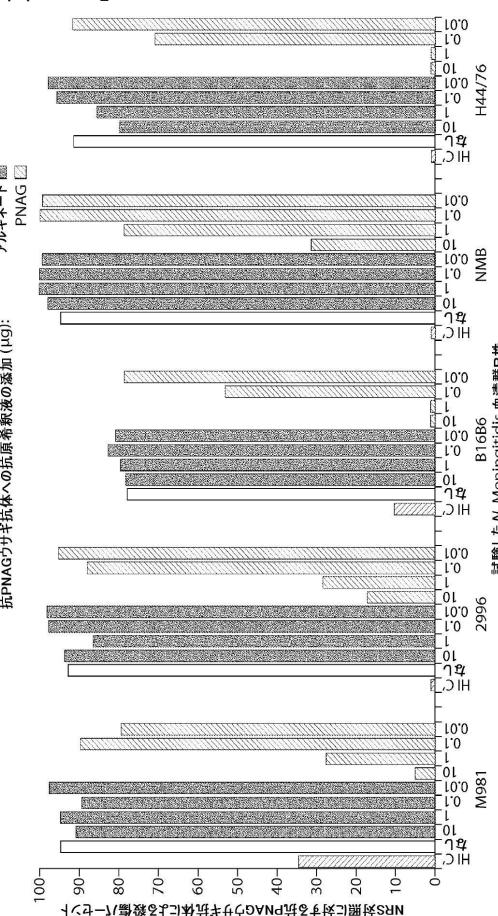


Fig. 18

【図19】

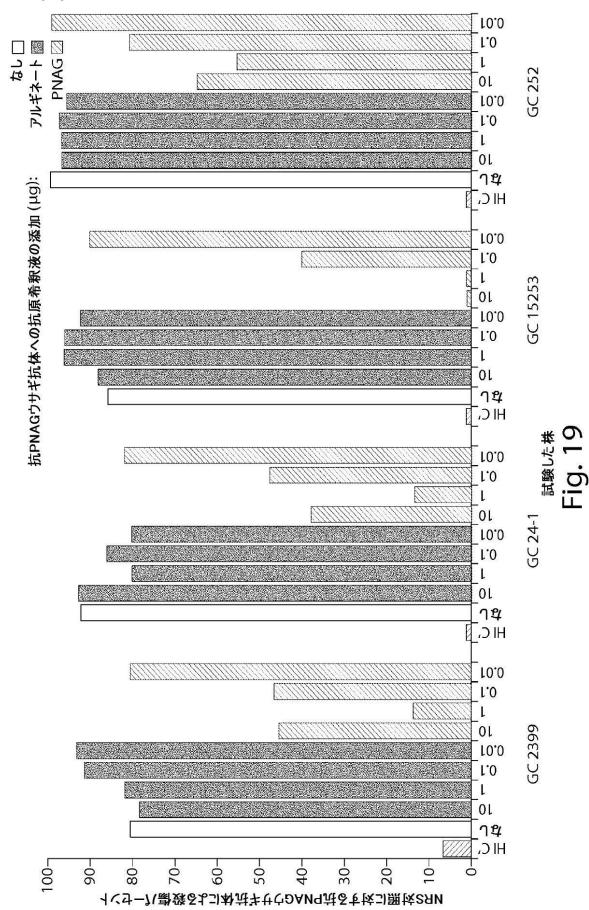


Fig. 19

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/395
			A 6 1 P	31/04
			A 6 1 P	31/10
			A 6 1 P	33/00
			A 6 1 K	47/68

(72)発明者 ピアー , ジェラルド ピー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446 , ブルックライン , ソーンダイク ストリート 21

(72)発明者 シーウェス - ベントリー , コレット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140 , ケンブリッジ , アガシーズ ストリート 33

(72)発明者 スカーニック , デイビッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446 , ブルックライン , プレザント ストリート 122

審査官 新熊 忠信

(56)参考文献 特表2006-513166 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 39/00 - 39/44  
 A 6 1 K 47/00 - 47/69  
 A 6 1 P 31/00  
 A 6 1 P 33/00  
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)  
 Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)