(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 2 月 20 日(20.02.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/027656 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/14 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/071863

(22) 国際出願日: 2013 年 8 月 13 日(13.08.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/682,404 2012 年 8 月 13 日(13.08.2012) US

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: クリスチャン サーシャ (KRISTIAN Sascha); 92037 カリフォルニア州ラホヤ アテナサークル ９４２０ 協和発酵キリンカリフォルニアインコーポレイテッド内 California (US). 小山 真美 (KOYAMA Mami); 92037 カリフォルニア州ラホヤ アテナサークル ９４２０ 協和発酵キリンカリフォルニアインコーポレイテッド内 California (US). 神田 豊 (KANDA Yutaka); 92037 カリフォルニア州ラホヤ アテナサークル ９４２０ 協和発酵キリンカリフォルニアインコーポレイテッド内 California (US). 田原 知幸 (TAHARA Tomoyuki); 92037 カリフォルニア州ラホヤ アテナサークル ９４２０ 協和発酵キリンカリフォルニアインコーポレイテッド内 California (US).

(74) 代理人: 濱田 百合子, 外 (HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号 虎ノ門イーストビルディング１０階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

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

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

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

WO 2014/027656 A1

(54) **Title**: METHOD FOR INCREASING DEPOSITION OF COMPLEMENT C3b ON BACTERIAL CELL SURFACES AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF PHAGOCYTES, AND METHOD AND AGENT FOR TREATING BACTERIAL INFECTION

(54) 発明の名称 : 補体Ｃ３ｂによる細菌の菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法、並びに細菌感染症の治療方法および治療剤

(57) **Abstract**: The invention pertains to: a method for increasing the deposition of complement C3b on cell surfaces and increasing the phagocytic activity of phagocytes, using a modified antibody in which at least one amino acid residue has been substituted by another amino acid residue in an antibody that bonds to the cell surface molecules of bacteria and the complement-dependent cytotoxicity (CDC) has been increased over that of the antibody prior to this amino acid residue substitution; and a method and agent for treating bacterial infection.

(57) 要約: 本発明は、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりも補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）が増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法、並びに細菌感染症の治療方法および治療剤に関する。

明　細　書

発明の名称 ：

補体Ｃ３ｂによる細菌の菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法、並びに細菌感染症の治療方法および治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりも補体依存性細胞傷害活性（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ，ＣＤＣ）が増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法、並びに細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法および治療剤に関する。

背景技術

[0002] 菌感染症の治療において、血液中の補体成分による一連の活性化カスケードを介した補体媒介細胞融解（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｌｙｓｉｓ，ＣＭＬ）またはＣＤＣ、および貪食活性（ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）などの生体防御反応が重要であることが知られている。

[0003] また、補体活性化カスケードには、抗体へのＣ１ｑ結合に始まる古典的補体経路または補体Ｃ３分解に始まる第二経路およびレクチン結合に始まるレクチン経路が知られているが、特にグラム陽性細菌は強固なプロテオグリカン細胞膜を有するため、補体活性による細胞傷害を受けにくいことが知られている。更に、生体内の貪食活性に関与する貪食細胞（顆粒球、マクロファージ、樹状細胞など）は、補体カスケードの中間産物であるＣ３ｂまたは

３ｄが結合した細菌を貪食および殺菌するオプソニン化貪食活性（ｏｐｓｏｎｏｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）を有することが知られている。

[0004] 抗体は、重鎖（Ｈｅａｖｙ　ｃｈａｉｎ、以下Ｈ鎖と記す）および軽鎖（Ｌｉｇｈｔ　ｃｈａｉｎ、以下Ｌ鎖と記す）からなるヘテロテトラマーであり、抗原結合に関与するＦａｂとＦｃ受容体に結合するＦｃ領域（以下、単にＦｃと記載する場合もある）から構成される。抗体は、Ｆｃを介してＣＤＣ、抗体依存性細胞傷害活性（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下、ＡＤＣＣ）、貪食活性を引き起こすことが知られている。抗体Ｆｃのアミノ酸残基置換は、抗体のＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣの活性を制御できることが知られている。

[0005] また、抗体のＦｃ領域のＥＵインデックス（非特許文献１）２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα１－６結合するフコースの量を制御することで、抗体のＡＤＣＣ活性を制御できることが知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔｓ，５ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 細菌感染症の治療において、補体媒介細胞融解（または補体依存性細胞傷害活性）、貪食活性による細菌抑制活性を高めた治療方法が求められている。

課題を解決するための手段

[0008] 本願発明は、以下の（１）～（１１）に関する。

（１）細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりも補体依存性細胞傷害活性が増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法。

（２）前記少なくとも１つのアミノ酸残基が、抗体Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインに含まれるアミノ酸残基である（１）に記載の方法。

（３）前記改変抗体が、アミノ酸残基を置換する前のアミノ酸配列を有する抗体よりも補体Ｃ１ｑへの結合活性が増加した改変抗体である（１）または（２）に記載の方法。

（４）前記菌体表面分子に結合する前記抗体のサブクラスがヒトＩｇＧ１である、（１）～（３）のいずれか１に記載の方法。

（５）前記細菌が、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌から選ばれる少なくとも１つの細菌である（１）～（４）のいずれか１に記載の方法。

（６）前記グラム陽性細菌が、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、腸球菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）および抗酸菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）から選ばれる少なくとも１つのグラム陽性細菌である（５）に記載の方法。

（７）前記グラム陰性細菌が、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）およびアシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）から選ばれる少なくとも１つのグラム陰性細菌である（５）に記載の方法。

（８）前記細菌の菌体表面分子が、ガングリオシド、莢膜多糖［ｃａｐｓｕｌａｒ　ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＣＰ）］、表面タンパク質［ｓｕｒｆａｃｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ（ＳＰ）］およびリポ多糖［ｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＬＰＳ）］から選ばれる少なくとも１つの分子であ

る（１）～（７）のいずれか１に記載の方法。

（９）前記改変抗体が、Ｎ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である（１）～（８）のいずれか１に記載の方法。

（１０）細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療剤。

（１１）細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの菌体表面への沈着を増加させる方法、並びに細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着並びに貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法および治療剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体のＦｃγＲＩＩＩＡおよびＦｃγＲＩＩＩＢに対する結合活性を示す。

[図2]図２は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏでの貪食活性の測定方法を示す。

[図3]図３は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体依存的に黄色ブドウ球菌を取り込んだ好中球のヒストグラムを示す。

[図4]図４は、縦軸に好中球全量に対する抗ガングリオシドＧＤ３抗体依存的に黄色ブドウ球菌を取り込んだ好中球の割合（％）を示す。横軸に抗体濃度を示す。

[図5]図５は、縦軸に抗ガングリオシドＧＤ３抗体依存的に好中球に取り込まれた黄色ブドウ球菌の総量（×１０^{6}個）を示す。横軸に抗体濃度を示す。

[図6]図６は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体の補体Ｃ３ｂ沈着アッセイの方法を示す。

[図7]図７は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体の黄色ブドウ球菌ＳＡ１１３（ＡＴＣＣ３５５５６）に対する補体Ｃ３ｂの沈着効果を示す。縦軸にＣ３ｂ平均蛍光強度（ＭＦＩ）（沈着量）、横軸に使用した抗体を示す。

[図8]図８は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体の黄色ブドウ球菌Ｎｅｗｍａｎ（ＡＴＣＣ　２５９０５）に対するＣ３ｂ沈着効果を示す。縦軸にＣ３ｂ沈着量を表すＣ３ｂ平均蛍光強度（ＭＦＩ）、横軸に使用した抗体を示す。

[図9]図９は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体によるオプソニン食作用傷害活性評価の方法を示す。

[図10]図１０は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体による、黄色ブドウ球菌ＳＡ１１３に対するヒト好中球のオプソニン食作用傷害活性効果を示す。縦軸にコロニーフォーミングユニット濃度（ＣＦＵ／ｍＬ）、横軸にヒト多形核好中球（ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｏｎｕｃｌｅａｒ　ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌｓ、以下ＰＭＮと略記する）の有無を示す。

[図11]図１１は、抗ガングリオシドＧＤ３抗体による、黄色ブドウ球菌　Ｎｅｗｍａｎ対するヒト好中球のオプソニン食作用傷害活性効果を示す。縦軸にコロニーフォーミングユニット濃度（ＣＦＵ／ｍＬ）、横軸にＰＭＮの有無および抗体濃度を示す。

[図12]図１２は、抗ＣＰ５抗体の補体Ｃ３ｂ沈着アッセイの方法を示す。

[図13]図１３は、抗ＣＰ５抗体の黄色ブドウ球菌Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎに対する補体Ｃ３ｂ沈着効果を示す。縦軸にＣ３ｂ平均蛍光強度（ＭＦＩ）（沈着量）、横軸に抗体の種類を示す。

[図14]図１４は、抗ＣＰ５抗体の黄色ブドウ球菌　Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎに対するＣ１ｑ存在下または非存在下の補体Ｃ３ｂ沈着効果を示す。縦軸にＣ３ｂ平均蛍光強度（ＭＦＩ）（沈着量）、横軸に抗体の種類を示す。

[図15]図１５は、抗ＣＰ５抗体の黄色ブドウ球菌Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎに対する経時的な補体Ｃ３ｂ沈着効果を示す。縦軸にＣ３ｂ平均蛍光強度（ＭＦＩ）（沈着量）、横軸に抗体の種類および抗体を添加してからの時間（分）を示す。

[図16]図１６は、抗ＣＰ５抗体依存的な黄色ブドウ球菌Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎの好中球取り込み効果を示す。縦軸に好中球全量に対する、黄色ブドウ球菌を取り込んだ好中球の割合（％）、横軸に抗体濃度を示す。

[図17]図１７は、抗ＰｓｐＡ抗体依存的な肺炎球菌Ｄ３９の好中球取り込み効果を示す。縦軸に好中球全量に対する、肺炎球菌を取り込んだ好中球の割合（％）、横軸に抗体の種類を示す。

[図18]図１８は、抗ＰｓｐＡ抗体による補体Ｃ３ｂ沈着アッセイの方法を示す。

[図19]図１９は、抗ＰｓｐＡ抗体１４０Ｇ１および１４０Ｈ１依存的な肺炎球菌ＢＡＡ－６５８に対するＣ３ｂ沈着効果を示す。縦軸が細胞数、横軸がＣ３ｂ蛍光強度（ＭＦＩ）（沈着量）を示す。

[図20]図２０は、抗ＰｓｐＡ抗体１４０Ｈ１依存的な肺炎球菌ＰＪ－１３２４、ＷＵ２、ＢＡＡ－６５８の３株に対するＣ３ｂ沈着効果の結果を示す。

[図21]図２１は、黄色ブドウ球菌ＭＳＳＡ　Ｒｅｙｎｏｌｄｓ（ＡＴＣＣ－２５９２３）を感染させたロウェットヌード（Ｒｏｗｅｔｔ　Ｎｕｄｅ、以下ＲＮＵと記載）ラットモデルにおける抗ＣＰ５抗体の治療効果を示す。縦軸に各群におけるラットの生存率（％）を、横軸に各抗体をプレオプソナイ

ズさせた細菌を投与してからの日数を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法に関する。

[0012] また、本発明は、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法および治療剤に関する。

[0013] 本発明に用いる改変抗体としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した結果、ＣＤＣが増加した抗体であれば、いずれの改変抗体であってもよい。置換されるアミノ酸残基は、抗体定常領域のＣＨ２およびＣＨ３ドメイン（Ｆｒａｇｍｅｎｔ，ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｂｌｅ、以下Ｆｃ領域またはＦｃと記載する）中のアミノ酸残基が好ましく、より好ましくはＣＨ２ドメインに含まれる少なくとも１つのアミノ酸残基が挙げられる。

[0014] 本発明に用いる改変抗体としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、Ｆｃ領域に配列番号１または２に記載のアミノ酸配列を含む抗体が挙げられる。

[0015] 本発明に用いる改変抗体としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体と比べてＣＤＣ活性と補体Ｃ１ｑへの結合活性が増加している改変抗体が挙げられる。

[0016] また本発明において、細菌の菌体表面分子に結合する抗体の種とサブクラスは特に限定されないが、好ましくはヒトＩｇＧ、より好ましくはヒトＩｇＧ１である。

[0017] 本発明としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体であって、かつ該改変抗体がＮ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１，６－フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法が挙げられる。

[0018] また本発明としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体であって、かつ該改変抗体がＮ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１，６－フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法および治療剤が挙げられる。

[0019] 菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換され、かつアミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体であって、かつ該改変抗体がＮ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１，６－フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である改変抗体は、補体Ｃ３ｂの菌体表面への沈着を増加させかつＦｃ受容体への結合活性が増加した結果、貪食細胞による貪食活性を増加させることができる。

なお、該改変抗体がＮ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１，６－フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上であると

は、該改変抗体がＮ－グリコシド結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、Ｆｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上であることと同義である。

[0020] 本発明に用いられる抗体としては、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、好ましくは単一のエピトープに結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

[0021] モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体であってもよいし、遺伝子組換え技術によって作製された遺伝子組換え抗体であってもいずれのモノクローナル抗体でもよい。ヒトにおいて免疫原性を低下させるために、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体ともいう）、ヒト化抗体［ヒト型ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ（ＣＤＲ）移植抗体ともいう］およびヒト抗体を用いることが好ましい。

[0022] 本発明においてモノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ１つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次構造）が均一である。

[0023] エピトープとしては、例えば、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖、糖脂質、多糖脂質、アミノ基、カルボキシル基、リン酸、硫酸など修飾残基が結合したアミノ酸配列および該修飾残基が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。立体構造は、天然に存在するタンパク質が有する３次元立体構造であり、細胞内または細胞膜上に発現しているタンパク質が構成する立体構造をいう。

[0024] 本発明において抗体分子はイムノグロブリン（以下、ＩｇＧと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４およびＩｇＭのア

イソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を総称してＩｇＧともいう。

[0025] 抗体分子は重鎖（Ｈ鎖）および軽鎖（Ｌ鎖）と呼ばれるポリペプチドより構成される。

[0026] また、Ｈ鎖はＮ末端側よりＨ鎖可変領域（ＶＨとも表記される）、Ｈ鎖定常領域（ＣＨとも表記される）、Ｌ鎖はＮ末端側よりＬ鎖可変領域（ＶＬとも表記される）、Ｌ鎖定常領域（ＣＬとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。ＣＨは各サブクラスごとに、α、δ、ε、γおよびμ鎖がそれぞれ知られている。ＣＨはさらに、Ｎ末端側よりＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの各ドメインにより構成される。ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを合わせてＦｃ領域又は単にＦｃと呼ばれる。ＣＬは、Ｃλ鎖およびＣκ鎖が知られている。

[0027] 本発明におけるＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインおよびＦｃ領域は、ＥＵインデックス［Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］により、Ｎ末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。具体的には、ＣＨ１はＥＵインデックス１１８～２１５番のアミノ酸配列、ヒンジはＥＵインデックス２１６～２３０番のアミノ酸配列、ＣＨ２はＥＵインデックス２３１～３４０番のアミノ酸配列、ＣＨ３はＥＵインデックス３４１～４４７番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0028] キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ヒト抗体の重鎖定常領域（ＣＨ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）とからなる抗体である。可変領域についての動物の種類は、マウスやラット、ハムスター、ウサギなどのハイブリドーマを作製しうる動物であれば特に限定されない。

[0029] ヒト型キメラ抗体はヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬをコードする

ｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで作製できる。ヒト型キメラ抗体のＣＨは、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇと略記する）であれば特に限定されないが、ｈＩｇＧクラスのものが好ましい。ヒト型キメラ抗体のＣＬは、Ｃκ またはＣλのいずれでもよい。

[0030] ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬの相補性決定領域（以下、ＣＤＲと略記する）をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの適切な位置に移植した抗体である。ＶＨおよびＶＬのＣＤＲ以外の領域はフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）と称される。ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワークに移植したＶ領域をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで、作製されうる。ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば特に限定されない。

[0031] ヒト化抗体のＣＨは、ｈＩｇであれば特に限定されないが、ｈＩｇＧクラスのものが好ましい。ヒト化抗体のＣＬは、Ｃκ またはＣλのいずれでもよい。

[0032] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

[0033] ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス（Ｔｏｍｉｚｕｋａ Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９７，７２２－７，２０００．）に所望の抗原を免疫することにより、取得することが出来る。また、ヒト由来のＢ細胞から抗体遺伝子を増幅したｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙライブラリーを用いることにより、所望の結合

活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる（Ｗｉｎｔｅｒ　Ｇ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：４３３－５５．１９９４）。さらに、ＥＢウイルスを用いてヒトＢ細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる（Ｒｏｓｅｎ　Ａ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２６７，５２-５４．１９７７）。

[0034] ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、ＥＢウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

[0035] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりＦａｂ、ｓｃＦｖ等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0036] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

[0037] 本発明の治療方法に用いられる抗体断片としては、上記各抗体断片が含まれる。抗体断片の種類は特に限定されず、例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖ、ＣＤＲを含むペプチドなど

が挙げられる。

[0038] Ｆａｂは、ＩｇＧ抗体をパパイン（タンパク質分解酵素）で処理して得られる断片のうち、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。Ｆａｂは、抗体をパパインで処理するか、前記抗体のＦａｂをコードするＤＮＡを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0039] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧ抗体をペプシン（タンパク質分解酵素）で処理して得られる断片のうち、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。Ｆ（ａｂ’）$_2$は、抗体をペプシンで処理するか、Ｆａｂ’（後述）をチオエーテル結合またはジスルフィド結合で結合させることで、作製されうる。

[0040] Ｆ（ａｂ’）は、Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片であるＦａｂ’は、抗体のＦ（ａｂ’）$_2$をジチオスレイトールで処理するか、前記抗体のＦａｂ’をコードするＤＮＡを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0041] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを適当なペプチドリンカーを用いて連結した抗原結合活性を有する抗体断片である。ｓｃＦｖは、抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0042] ｄｉａｂｏｄｙは、抗原結合特異性の同じまたは異なるｓｃＦｖが二量体化した抗体断片で、同じ抗原に対する二価の抗原結合活性または異なる抗原に対する二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。ｄｉａｂｏｄｙは、抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｉａｂｏｄｙをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0043] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させた抗体断片である。ｄｓＦｖは、抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｓＦｖをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0044] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含むペプチドである。抗体のＣＤＲを含むペプチドは、抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、ｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によっても作製することができる。

[0045] 本発明においてエフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）、補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ活性）および顆粒球、マクロファージ並びに樹状細胞などの貪食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ，ＡＤＰ活性）などが知られている。

[0046] ＡＤＣＣ活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のＦｃ領域を介して免疫細胞のＦｃ受容体と結合することで免疫細胞（ナチュラルキラー細胞など）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

[0047] Ｆｃ受容体（以下、ＦｃＲと記すこともある）とは、抗体のＦｃ領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘導する。

[0048] ＦｃＲは抗体のサブクラスに対応しており、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＭはそれぞれＦｃγＲ、ＦｃεＲ、ＦｃαＲおよびＦｃμＲに特異的に結合する。更にＦｃγＲには、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（

ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）のサブタイプが存在し、ぞれぞれＦｃγＲＩＡ、ＦｃγＲＩＢ、ＦｃγＲＩＣ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＢ、ＦｃγＲＩＩＣ、ＦｃγＲＩＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＩＢのアイソフォームが存在する。これらの異なるＦｃγＲは異なる細胞上に存在している［Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）］。

［0049］ ヒトにおいては、ＦｃγＲＩＩＩＢは好中球に特異的に発現しており、ＦｃγＲＩＩＩＡは、単球、Ｎａｔｕｒａｌ Ｋｉｌｌｅｒ細胞（ＮＫ細胞）および一部のＴ細胞に発現している。ＦｃγＲＩＩＩＡを介した抗体の結合は、ＮＫ細胞依存的なＡＤＣＣ活性を誘導する。

［0050］ ＣＤＣ活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード（補体活性化経路）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走、活性化を誘導することができる。ＣＤＣ活性のカスケードは、抗体のＦｃ領域との結合ドメインを有するＣ１ｑが、Ｆｃ領域に結合し、２つのセリンプロテアーゼであるＣ１ｒおよびＣ１ｓと結合することでＣ１複合体を形成することで開始する。

［0051］ 本発明において貪食活性とは、抗体が細菌の菌体表面分子に結合し、補体因子Ｃ１ｑが抗体に結合して始まる補体活性化カスケードの中間反応で生じる補体Ｃ３ｂまたは Ｃ３ｄが、菌体表面上に沈着した結果引き起こされる、貪食細胞上のＣ３受容体を介した貪食活性、および抗体がＦａｂ部分で細菌の菌体表面分子に結合し、抗体のＦｃ部分で貪食細胞上のＦｃ受容体に結合した結果引き起こされる貪食活性いずれのものも含まれる。このように補体因子または抗体によってオプソニン化された細菌を貪食する活性をオプソノファゴサイトーシスという。

［0052］ 本発明において貪食細胞とは、貪食活性を有する細胞であればいずれの細胞であってもよいが、具体的には、顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞が挙げられる。顆粒球としては、好中球、好酸球および好塩基球が挙げられ

る。より好ましくは、好中球、マクロファージおよび樹状細胞が挙げられる。貪食細胞は活性化状態によって貪食活性のレベルが異なるが、貪食活性を引き起こすことができればいずれの活性化状態であってもよい。

[0053] 本発明において、貪食細胞上に発現するＣ３受容体およびＦｃ受容体としては、それぞれＭａｃ－１およびＦｃγＲＩＩＩＢなどが挙げられる。

[0054] エフェクター活性を制御する方法としては、抗体のＦｃ領域のＥＵインデックス（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔｓ，５ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９１）２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα１－６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）や、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を置換することで制御する方法などが知られている。

[0055] したがって、本発明の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が置換され、かつアミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体において、抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子（ｆｕｃｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ－８，ＦＵＴ８）が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。

[0056] フコースが結合していない抗体は高いＡＤＣＣ活性および高い貪食活性を有する。一方、抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合し

ていない抗体よりも低いＡＤＣＣ活性および低い貪食活性を有する。

[0057] したがって、本発明の抗体としては、単一または複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されている組成物ということができる。当該抗体組成物は、抗体分子のＮ末端側から２９７番目のＡｓｎにＮ－グリコシド結合複合型糖鎖が結合したＦｃ領域を有する抗体分子からなる組成物である。

本明細書において、コアフコースが無い糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれる抗体分子のＦｃに結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖数に対する、コアフコースが結合していないＮ－グリコシド結合複合型糖鎖数をいう。

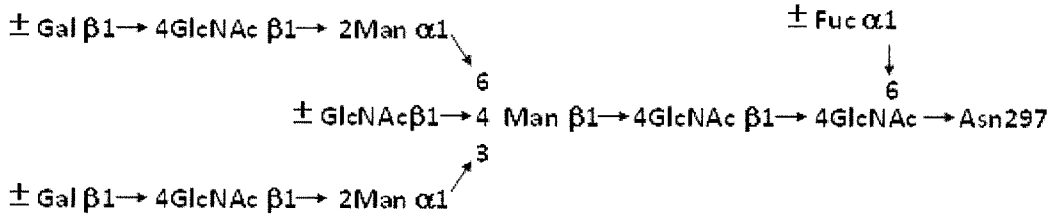
コアフコースが無い糖鎖の割合としては、抗体のＡＤＣＣ活性および貪食活性が増加すれば、いずれの割合の抗体組成物も含まれるが、好ましくは２０％以上、より好ましくは５１％－１００％、更に好ましくは８０％－１００％、特に好ましくは９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、最も好ましくは１００％の割合が挙げられる。本発明において、コアフコースが無い抗体組成物をＰｏｔｅｌｌｉｇｅｎｔ（ＰＴ）、ｎｏｎ－ｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙまたはＦｕｃ（－）ＩｇＧと定義する。

[0058] コアフコースが無い糖鎖の割合が５０％とは、抗体分子の２本のＨ鎖に結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の片方の糖鎖にフコースが結合していない分子が１００％含まれる抗体組成物、または抗体分子の２本のＨ鎖に結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合していない分子が５０％含まれかつ抗体分子の２本のＨ鎖に結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合している分子が５０％含まれる抗体組成物いずれも含まれる。

[0059] 本発明において、抗体のコアフコースの無い糖鎖の割合が２０％以上である抗体組成物は、貪食細胞上のＦｃγＲＩＩＩｂへの結合活性が増加することで、貪食細胞依存的な貪食活性を増加させることができる。

[0060]

［化1］



［0061］ 本発明において、フコースが無い糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していなければ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

［0062］ また、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を置換することでＡＤＣＣ活性やＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。Ｆｃ領域のアミノ酸残基置換を行うことで、ＦｃγＲへの結合活性を増加させるあるいは低下させることによりＡＤＣＣ活性を制御することができるし、Ｆｃ領域のアミノ酸残基置換を行うことで、補体の結合活性を増加させるあるいは低下させることによりＣＤＣ活性を制御することができる。

［0063］ 例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書および米国特許出願公開第２０１２／００１０３８７号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書、米国特許第７，３１７，０９１号明細書および国際公開第２００５／０７０９６３号に記載のアミノ酸残基置換を行うことで、ＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。

［0064］ 本発明において補体Ｃ３ｂの菌体表面への沈着が増加するとは、抗体が細菌の菌体表面分子に結合した結果引き起こされる菌体表面上へのＣ３ｂ結合量が、本発明の改変抗体において、アミノ酸残基を置換する前の抗体が引き起こすＣ３ｂ結合量よりも増加していることをいう。

［0065］ 本発明において貪食細胞による貪食活性の増加とは、抗体が細菌の菌体表

面分子に結合した結果引き起こされる貪食細胞による貪食活性が、本発明の改変抗体において、アミノ酸残基を置換する前の抗体が引き起こす貪食活性よりも増加していることをいう。

[0066] 本発明において、細菌の増殖を低下させるとは、上述の貪食活性によって貪食細胞に取り込まれた細菌の細胞増殖が、貪食細胞に取り込まれる前の細菌の細胞増殖と比べて低下または阻害されることをいい、貪食細胞に取り込まれた細菌は傷害を受け死滅（殺菌）または破壊される。

[0067] 本発明における改変抗体とは、天然の抗体分子のＦｃ領域に含まれる少なくとも１つのアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した抗体であり、改変抗体と同じＶＨ、ＶＬアミノ酸配列を含むヒトＩｇＧ１抗体およびヒトＩｇＧ３抗体が引き起こすＣＤＣよりも高いＣＤＣを有する改変抗体を含む。置換されるアミノ酸残基の位置および置換するアミノ酸残基は、改変抗体と同じＶＨ、ＶＬアミノ酸配列を含むヒトＩｇＧ１抗体およびヒトＩｇＧ３抗体が引き起こすＣＤＣよりも高いＣＤＣを得られる置換であればいずれの位置、いずれの種類のアミノ酸残基であってもよいが、好ましくはＣＨ２ドメインに含まれる少なくとも１つのアミノ酸残基を置換することが挙げられる。

[0068] 本発明における改変抗体とは、細菌の菌体表面分子に結合するヒトＩｇＧ１抗体において、Ｆｃ領域の少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ改変前のヒトＩｇＧ１抗体およびヒトＩｇＧ１抗体と同じＶＨ、ＶＬアミノ酸配列を含むヒトＩｇＧ３抗体が引き起こすＣＤＣ活性よりも高いＣＤＣ活性を有する抗体を含む。

[0069] ＣＤＣ活性を増加させる具体的なアミノ酸残基置換としては、Ｋ３２６Ａ、Ｓ２６７Ｅ、Ｈ２６８Ｆ、Ｓ３２４Ｔ、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ｋ３２６Ｗ、Ｋ３２６Ｙ、Ｅ３３３Ａ、Ｅ３３３Ｓ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｙ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換が挙げられる。

[0070] ＣＤＣ活性を増加させるアミノ酸残基置換として好ましくは、Ｎ２７６Ｋ

、Ａ３３９Ｔ、Ｔ３９４ＦおよびＴ３９４Ｙから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換、Ｎ２７６ＫおよびＡ３３９Ｔのアミノ酸残基置換、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置並びにＫ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置などが挙げられる（アミノ酸残基を１文字で表記し番号の前に置換前、番号の後に置換後のアミノ酸残基を示す。また、いずれのアミノ酸残基の番号も、ＥＵインデックスに基づく番号を示す）。

[0071] 本発明の治療方法および治療剤に用いられる改変抗体として、具体的にはＫ３２６Ａ、Ｓ２６７Ｅ、Ｈ２６８Ｆ、Ｓ３２４Ｔ、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ｋ３２６Ｗ、Ｋ３２６Ｙ、Ｅ３３３Ａ、Ｅ３３３Ｓ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｙ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換を含む改変抗体、好ましくは米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書および米国特許出願公開第２０１２／００１０３８７号明細書に記載のヒトＩｇＧ１抗体のＦｃ領域のアミノ酸配列であって、Ｎ２７６Ｋ、Ａ３３９Ｔ、Ｔ３９４ＦおよびＴ３９４Ｙから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換を含む改変抗体、Ｎ２７６ＫおよびＡ３３９Ｔのアミノ酸残基置換を含む改変抗体、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置を含む改変抗体並びにＫ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置を含む改変抗体などが挙げられる。

[0072] また、本発明の治療方法および治療剤に用いられる改変抗体としては、上述の改変抗体であってかつ抗体のコアフコースの無い糖鎖の割合が２０％以上である改変抗体および改変抗体組成物が好ましい。

[0073] 本発明において、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置換を含む改変抗体をコンプリジェント（Ｃｏｍｐｌｅｇｅｎｔ）（登録商標）、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置換を含む改変抗体であって、かつコアフコースが結合していない抗体をアクリタマブ（ＡｃｃｒｅｔａＭａｂ）（登録商標）、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置換を含む改変抗体をネオコンプリジェント（Ｎｅｏｃｏｍｐｌｅｇｅｎｔ）、並びにＫ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置換を含む改変抗体であってかつコアフコースが結合していない抗体をネオアクリタマブ（ＮｅｏＡｃｃｒｅｔａＭａｂ）と定義する場合がある。

[0074] 本発明において細菌とは、本発明の治療方法が有効であればいずれの属、種の細菌であってもよいが、具体的には、例えば、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌が挙げられる。

[0075] グラム陽性細菌としては、例えば、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、肺炎球菌（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）、マイコプラスマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、ジフテリア（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｙｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、炭そ菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、破傷風菌 （Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、ウエルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、抗酸菌（マイコバクテリア、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、結核菌およびらい菌などが挙げられる。

[0076] グラム陰性細菌としては、例えば、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、チフス菌（Ｓ． ｔｙｐｈｉ）、インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、肺炎かん菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、百日咳菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、キャンピロバクター（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、在郷軍人病菌（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｏｐｈｉｌａ）、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、スピロヘータ（Ｓｐｉｒｏｃｈｅｔｅ）：梅毒、レプトスピラ、ボレリア（ライム病）、クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ）：トラコーマ、オウム病菌、非淋菌性尿道炎およびリケッチャ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）：つつがむし病菌などが挙げられる。

[0077] 本発明の治療方法の標的として、より好ましくは、プロテオグリカンの肥厚な細胞膜を有するグラム陽性細菌である、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、肺炎連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｒａｃｉｓ）、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ），破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）および肺炎プラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）などが挙げられる。

[0078] また本発明における細菌としては、上述した細菌が１つ以上の薬剤に耐性を示す変異体も含まれる。

[0079] 具体的には、例えば、メチシリン、アモキシシリンなどのβラクタム系抗生物質またはエリスロマイシン、バンコマイシンなどのマクロライド系抗生物質に耐性を示す細菌が挙げられる。より具体的には、例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌［ｍｅｔｉｃｉｌｌｉｎ ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ｓｔａ

ｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＭＲＳＡと略記する）］、バンコマイシン軽度耐性黄色ブドウ球菌［ｖａｎｃｏｍｙｃｉｎ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＶＩＳＡと略記する）］およびバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌［ｖａｎｃｏｍｙｃｉｎ ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＶＲＳＡと略記する）］などが挙げられる。

[0080] 本発明において細菌の菌体表面分子としては、例えば、上述の細菌が発現しているタンパク質、糖タンパク質、糖脂質およびリポ多糖いずれの分子であってもよい。具体的には、例えば、莢膜多糖［ｃａｐｓｕｌａｒ ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＣＰ）］、ガングリオシド、肺炎球菌表面タンパク［ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃａｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｐｓｐ）］およびリポ多糖［ｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＬＰＳ）］が挙げられる。

[0081] より具体的には、例えば、黄色ブドウ球菌莢膜多糖５［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｃａｐｓｕｌａｒ ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ ５（ＳＡＣＰ５）］、ＳＡＣＰ８、肺炎球菌表面タンパクＡ［ｐｎｅｕｍｏｎｉａｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ（ＰｓｐＡ）］、肺炎球菌表面タンパクＣ［ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃａｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃ（ＰｓｐＣ）］、ガングリオシドＧＤ３などが挙げられる。

[0082] 本発明の治療方法には、抗体とその他の治療剤を併用して治療する併用療法も含まれる。

[0083] 本発明の併用療法としては、細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体、Ｎ結合複合型糖鎖にα１，６－フコースが結合していない割合が２０％以上であり細菌の菌体表面分子に結合する抗体並びに細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、

かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体であってかつ、Ｎ結合複合型糖鎖にα１，６－フコースが結合していない割合が２０％以上である改変抗体から選ばれる抗体と抗生物質を併用する併用療法が挙げられる。

[0084] 本発明の治療剤としては、上述の活性を有する抗体を有効成分として含む治療剤であればいかなるものでもよいが、通常は薬理学的に許容される１つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

[0085] 好ましくは水、または食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

[0086] 本発明の治療剤の投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、髄腔内および静脈内等の非経口投与をあげることができるが、髄腔内投与または静脈内投与が好ましい。

[0087] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール

、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

[0088] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤、噴霧剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0089] 本発明の治療剤の投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人１日当たり１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0090] 本発明は、少なくとも１つのアミノ酸残基置換を含み補体依存性細胞傷害活性ＣＤＣが増加した細菌の菌体表面分子に結合する改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法も含まれる。

[0091] 以下に本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されない。

また、以下実施例において、抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合しているＩｇＧ抗体をコンベンショナル（ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎａｌ、以下ｃｏｎと略記する）、コアフコースが結合していない抗体をポテリジェント（Ｐｏｔｅｌｌｉｇｅｎｔ（登録商標）、以下ＰＴと略記する）、Ｆｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体をコンプリジェント（Ｃｏｍｐｌｅｔｅｎｔ、以下ＣＭと略記する）またはネオコンプリジェント（Ｎｅｏｃｏｍｐｌｅｇｅｎｔ、以下ＮＣＭと略記する）、

および抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体であって、かつＦｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体をアクリタマブ（ＡｃｃｒｅｔａＭａｂ、以下Ａｃと略記する）またはネオアクリタマブ（ＮｅｏＡｃｃｒｅｔａＭａｂ、以下ＮＡｃ）と記載する。

実施例

[0092] ［実施例１］抗ガングリオシドＧＤ３抗体のＦｃγＲＩＩＩに対する結合活性評価

ヒトＦｃγＲＩＩＩＡおよびヒトＦｃγＲＩＩＩＢの細胞外領域のアミノ酸配列にＨｉｓタグを連結した融合タンパク質を用いて、表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ）を利用したＢｉａｃｏｒｅ３０００により、抗ガングリオシドＧＤ３抗体ＫＷ－２８７１の結合活性を測定した。ヒトＦｃγＲＩＩＩＡは、１５８ＶａｌおよびＦ１５８Ｐｈｅの遺伝子多型２種類、ヒトＦｃγＲＩＩＢは、ＮＡ１およびＮＡ２の遺伝子多型２種類を作製した。

[0093] 抗ガングリオシドＧＤ３抗体ＫＷ－２８７１は、コアフコースが結合したｆｕｏｓｙｌａｔｅｄ ＫＷ－２８７１（ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１）とコアフコースが結合していないｎｏｎ－ｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ ＫＷ－２８７１（ＰＴ－ＫＷ－２８７１）を作製してサンプルとして使用した。上記の抗体は、国際公開第２０１１／０６８１３６号の方法を用いて作製した。

[0094] その結果、図１に示すように、ＰＴ－ＫＷ－２８７１は、いずれのＦｃγＲＩＩＩにもｃｏｎ－ＫＷ－２８７１より強いアフィニティーで結合した。

[0095] ［実施例２］抗ガングリオシドＧＤ３抗体の貪食活性評価

ヒト多形核好中球（ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｏｎｕｃｌｅａｒ ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌｓ、以下ＰＭＮと略記する）と黄色ブドウ球菌株を用いて、ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１とＰＴ－ＫＷ－２８７１のオプソニン化貪食活性を比較した。図２に示すように、ヒト好中球の存在下で、蛍光色素Ａｌｅｘａ４８８で標識した黄色ブドウ球菌を、ＰＢＳ（ネガティブコントロール）または段階希釈した各抗体と反応させた。反応開始１５分後に該反応液に冷ＰＢＳを

添加して好中球の貪食を停止させた。

[0096] 次に、該反応液中の菌体と好中球を２回洗浄した後、フローサイトメーター及び蛍光顕微鏡を用いて、細胞内に細菌を取り込んだ好中球の割合を測定した。好中球に取り込まれた細菌と、取り込まれていない細菌を区別するために、サンプル中にエチジウムブロイマイドを添加した。

[0097] その結果、図３～図５に示すようにＰＴ－ＫＷ－２８７１存在下では、ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１存在下と比較して、好中球への黄色ブドウ球菌の取り込みが亢進していた。

[0098] ［実施例３］抗ガングリオシドＧＤ３抗体の細菌表面への補体Ｃ３ｂ沈着活性評価

抗ガングリオシドＧＤ３抗体ＫＷ－２８７１について、抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体であって、かつＦｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体であるＡｃ－ＫＷ－２８７１、およびＣＤＣを欠損した抗体であるＣＤＣ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ－ＫＷ－２８７１を作製し、サンプルとして使用した。Ａｃ－ＫＷ２８７１のＦｃ領域のアミノ酸配列を配列番号１と記載する。ＡＣ－ＫＷ－２８７１およびＣＤＣ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ－ＫＷ－２８７１は、国際公開第２０１１／０６８１３６号に記載の可変領域のアミノ酸配列を使用し、Ａｃ－ＫＷ－２８７１は米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載の方法で、またＣＤＣ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ－ＫＷ－２８７１は米国特許第６２４２１９５号明細書に記載の方法で作製した。

[0099] 図６に示す方法で、ヒト補体および黄色ブドウ球菌株Ｎｅｗｍａｎ（ＡＴＣＣ ２５９０５）またはＳＡ１１３（ＡＴＣＣ ３５５５６）を用いた、ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１、ＰＴ－ＫＷ－２８７１、Ａｃ－ＫＷ－２８７１およびＣＤＣ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ－ＫＷ－２８７１による細菌表面への補体Ｃ３ｂの沈着活性を測定した。図６中の、内在性の抗黄色ブドウ球菌抗体を吸着した血漿は、内在性の抗黄色ブドウ球菌イムノグロブリンを除去するために、ヒト血液由来の血漿と黄色ブドウ球菌株を氷上で１時間反応させるこ

とを３回繰り返して取得した。図６に示すように、貪食細胞は、Ｃ３ｂが沈着した細菌を、Ｍａｃ－１またはＣＲ１などのＣ３ｂ受容体を介して貪食する。また、グラム陽性菌はＣＤＣによって溶菌されない。

[0100] 実験は三連で行い、測定の結果得られた平均蛍光強度（ｍｅａｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ、以下ＭＦＩと記載）および標準偏差をグラフに記した。＊，ｐ＜０．０５；対応のない両側ｔ検定。アイソタイプコントロールとして、抗ジニトロフェニルヒドラジン（ｄｉｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌｈｙｄｒａｚｉｎｅ、以下ＤＮＰと記載）抗体を使用した。

[0101] その結果、図７および図８に示すように、使用した抗体のうち、Ａｃ－ＫＷ－２８７１のみが、ＮｅｗｍａｎおよびＳＡ１１３表面上への補体Ｃ３ｂの沈着を、抗体濃度依存的に誘導した。

[0102] ［実施例４］抗ガングリオシドＧＤ３抗体のオプソニン食作用傷害活性評価

図９に示すように、ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１、ＰＴ－ＫＷ－２８７１およびＡｃ－ＫＷ－２８７１のオプソニン食作用傷害活性を、ヒト多形核好中球を用いて測定した。寒天培養したＮｅｗｍａｎを、精製したヒト多形核好中球および各抗体と反応させた。ヒト多形核好中球は２人のドナーより採取し、ヒト多形核好中球（エフェクター細胞）と細菌（ターゲット）を２．５対１の割合で反応させた。

[0103] ネガティブコントロールとして、ヒト多形核好中球の代わりにバッファーを添加したサンプルを使用した。実験は４連で行い、細菌のコロニーフォーミングユニット濃度（ＣＦＵ／ｍＬ）の平均値および標準偏差をグラフに示した。点線は、培養０時間でのＣＦＵ濃度を示した（～３．１ｘ１０^{7}ＣＦＵ／ｍＬ）。＊，ｐ＜０．０１，対応のない両側ｔ検定。

[0104] その結果、図１０および図１１に示すように、Ａｃ－ＫＷ－２８７１は、黄色ブドウ球菌株に対して、ＰＴ－ＫＷ－２８７１よりも強いオプソニン食作用傷害活性を示した。また、ＰＴ－ＫＷ－２８７１は、ｃｏｎ－ＫＷ－２８７１よりも強いオプソニン食作用傷害活性を示す傾向にあった。

[0105] ［実施例５］抗ＣＰ５抗体による黄色ブドウ球菌株表面への補体Ｃ３ｂの沈

着評価

黄色ブドウ球菌株Ｒｅｙｎｏｌｄｓより精製した莢膜多糖５をマウスに免疫することにより、抗黄色ブドウ球菌莢膜多糖５（ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｃａｐｓｕｌａｒ ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ ５、以下ＳＡＣＰ５またはＣＰ５と記載）マウス抗体を確立した。抗ＣＰ５モノクローナル抗体１３７Ｇ１８Ａを常法によりキメラ化し、抗ＣＰ５キメラ抗体１３７Ｇ１８Ａを作製した。抗ＣＰ５モノクローナル抗体１３７Ｇ１８ＡのＶＨの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号３および４、ＶＬの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号５および６にそれぞれ示す。

[0106] 抗ＣＰ５キメラ抗体１３７Ｇ１８ＡのＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合しているＩｇＧ抗体であるｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａ、Ｆｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体であるＰＴ－１３７Ｇ１８Ａ、Ｆｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体であるＣＭ－１３７Ｇ１８Ａ、およびＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体であって、かつＦｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体であるＡｃ－１３７Ｇ１８Ａを作製し、サンプルとして使用した。

[0107] ＣＭ－１３７Ｇ１８ＡおよびＡｃ－１３７Ｇ１８Ａは米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載の方法を用いて作製し、Ｆｃ領域のアミノ酸配列を配列番号１に記載する。

[0108] ｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａ、ＰＴ－１３７Ｇ１８ＡおよびＣＭ－１３７Ｇ１８Ａの、ヒト血清存在下での細菌表面への補体沈着活性を図１２に示す方法で測定した。その結果を図１３に示す。

[0109] 実験方法として、５ｘ１０^{8}ＣＦＵ／ｍＬ（総量１０^{8}ＣＦＵ）の黄色ブドウ球菌株Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎを、２．５％ヒト補体入りのＲＰＭＩ ２００μＬ中で、２．５ｍｇ／ｍＬ（総量０．５ｍｇ）のコントロール抗体および抗ＣＰ５キメラ抗体の存在下または非存在下で、１５分間反応させた。次に、細菌上への補体沈着を示すＣ３ｂの沈着を、ＦＩＴＣ標識された抗Ｃ３ｂ

抗体を用いたＦＡＣＳ解析により測定した。実験は三連または六連で行い、平均値と標準偏差を図１３のグラフ中に示す。（＊＊＊，ｐ＜０．０００５；対応しない両側ｔ検定）。

[0110] その結果、図１３に示すように、ＰＴ－１３７Ｇ１８Ａの細菌表面へのＣ３ｂ沈着活性は、ｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａと比べて高い傾向にあった。また、ＣＭ－１３７Ｇ１８Ａは、使用した抗体の中で最も高い細菌表面へのＣ３ｂ沈着活性を示した。

[0111] さらに、図１４に、抗ＣＰ５抗体の黄色ブドウ球菌　Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎに対するＣ１ｑ存在下または非存在下の補体Ｃ３ｂ沈着効果を調べた結果を示す。実験条件としては、抗体　５００μｇ、細菌　10^8ＣＦＵを用い、血清濃度は２．５％とした。

[0112] 図１４に示すように、細菌表面へのＣ３ｂの沈着は、血清から補体Ｃ１ｑを欠失させることにより解消されるが、再度Ｃ１ｑタンパクを添加することによって回復した。つまり、抗ＣＰ５キメラ抗体による細菌表面へのＣ３ｂの沈着は、Ｃ１ｑ依存的に生じることが明らかとなった。

[0113] また、抗ＣＰ５キメラ抗体による細菌表面へのＣ３ｂ沈着量を経時的に測定した。測定方法としては、５ｘ10^8ＣＦＵ／ｍＬ（10^8ＣＦＵ　ｔｏｔａｌ）の黄色ブドウ球菌株Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎを、２．５％のヒト血清入りＲＰＭＩ中で、１．２５ｍｇ／ｍＬ（総量０．２５ｍｇ）の抗ＣＰ５抗体の存在下または非存在下で反応させた。次に、細菌上の補体沈着を示すＣ３ｂ沈着を、ＦＩＴＣ標識された抗Ｃ３ｂ抗体を用いたＦＡＣＳ解析により測定した。実験は三連で行い、得られた結果の平均値および標準偏差を図１５のグラフに示す。（＊，ｐ＜０．０５；＊＊＊，ｐ＜０．０００５；対応しない両側ｔ検定）。

[0114] その結果、図１５に示すように、抗体を添加してから６０分間以内に、細菌へのＣ３ｂ沈着量がピークを迎えることが明らかとなった。

[0115] ［実施例６］ヒト多形核好中球存在下での抗ＣＰ５抗体の貪食活性評価

実施例２に記載の方法と同様に、ヒト多形核好中球の存在下での抗ＣＰ５

キメラ抗体１３７Ｇ１８Ａによる黄色ブドウ球菌株Ｌｏｅｗｅｎｓｔｅｉｎの貪食活性を測定した。

[0116] その結果、図１６に示すように、ヒト多形核好中球存在下では、ヒト補体の有無によらず、Ａｃ－１３７Ｇ１８Ａがｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａよりも高い貪食活性を示した。以上より、Ａｃ－１３７Ｇ１８ＡはＦｃγＲＩＩＩおよび補体受容体の両方を介して、高い貪食活性を示していることが明らかとなった。

[0117] ［実施例７］抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｈ１による、肺炎球菌株の貪食活性評価

肺炎球菌株Ｄ３９とＴＩＧＲ４由来の組み換え肺炎球菌表面タンパクＡ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｌ ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ、以下ＰｓｐＡと記載）をマウスに免疫し、抗ＰｓｐＡマウス抗体を樹立した。

[0118] 抗ＰｓｐＡモノクローナル抗体１４０Ｈ１、１４０Ｇ１を常法によりキメラ化し、抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｈ１、１４０Ｇ１を作製した。抗ＰｓｐＡモノクローナル抗体１４０Ｈ１のＶＨの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号７および８、並びにＶＬの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号９および１０にそれぞれ示す。また、抗ＰｓｐＡモノクローナル抗体１４０Ｇ１のＶＨの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号１１および１２、並びにＶＬの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号１３および１４にそれぞれ示す。抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｈ１、１４０Ｇ１において、抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合しているＩｇＧ抗体であるｃｏｎ－１４０Ｈ１、ｃｏｎ－１４０Ｇ１、抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体であるＰＴ－１４０Ｈ１、ＰＴ－１４０Ｇ１、Ｆｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体であるＮＣＭ－１４０Ｈ１、ＮＣＭ－１４０Ｇ１および抗体のＦｃに結合するＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体で、かつＦｃ領域のアミノ酸残基置換によりＣＤＣが増強された抗体であるＮＡｃ－１４

０Ｈ１、ＮＡｃ－１４０Ｇ１を作製し、サンプルとして使用した。

[0119] ＮＣＭ－１４０Ｈ１、ＮＣＭ－１４０Ｇ１、ＮＡｃ－１４０Ｈ１およびＮＡｃ－１４０Ｇ１は米国特許出願公開第２０１２／００１０３８７号明細書に記載の方法で作製し、Ｆｃ領域のアミノ酸配列を配列番号２に記載する。

[0120] ９６ウェルプレートの各ウェルにおいて、２．５×１０^{6}個のフルオレセインで蛍光標識した肺炎球菌を、２００μＬ ＨＢＳＳ／ＰＢＳ中に懸濁した５×１０^{5}細胞のヒト多形核好中球および終濃度１０μｇ／ｍＬの抗ＤＮＰ抗体（アイソタイプコントロール）、ＰＴ－１４０Ｈ１またはＮＡｃ－１４０Ｈ１と３０分間反応させた。

[0121] 次に、該反応溶液を洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて、１サンプルあたり２００細胞の生存しているヒト多形核好中球における、肺炎球菌を貪食したヒト多形核好中球の割合を測定した。多形核好中球に取り込まれた細菌と、細胞外に存在している細菌を区別するために、サンプル中に終濃度０．２５ｍｇ／ｍＬのエチジウムブロマイドを添加した。実験は４連で行い、少なくとも２回実験を行ったうち、代表的な実験結果の平均値および標準偏差を図１７のグラフに示す。＊＊，ｐ＜０．００５；＊＊＊，ｐ＜０．０００５ ｃｏｎ－１４０Ｈ１に対する対応しない両側ｔ検定。

[0122] その結果、図１７に示すように、補体非存在下では、ＰＴ－１４０Ｈ１およびＮＡｃ－１４０Ｈ１添加時に、ｃｏｎ－１４０Ｈ１およびＮＣＭ－１４０Ｈ１の添加時よりも、ヒト多形核好中球による肺炎球菌株Ｄ３９の取り込みが亢進した。以上より、抗ＰｓｐＡ抗体の補体非依存性のオプソニン化貪食活性については、抗体のフコシル化の状態に大きく依存していることが明らかになった。

[0123] ［実施例８］抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｈ１および１４０Ｇ１による肺炎球菌株表面への補体沈着評価

図１８に示す方法で、３株の肺炎球菌株ＷＵ２、ＢＡＡ－６５８およびＰＪ－１３２４を用いて、ヒト血清存在下での抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｈ１および１４０Ｇ１の細菌表面へのＣ３ｂ沈着活性を測定した。ＢＡＡ－６

５８を使用した実験結果のヒストグラムを図１９に示す。また、上記３菌株での測定結果のまとめを図２０に示す。

[0124] その結果、図１９および図２０に示すように、上記の肺炎球菌３株のいずれにおいても、ＮＣＭ－１４０Ｈ１およびＮＡｃ－１４０Ｈ１のＣ３ｂ沈着活性は、ｃｏｎ－１４０Ｈ１およびＰＴ－１４０ＨのＣ３ｂ沈着活性と比較して、ヒト補体存在下で増加していた。抗ＰｓｐＡキメラ抗体１４０Ｇ１においても同様の結果が得られた。

[0125] 以上より、コンプリジェントおよびアクリタマブのようにＣＤＣ活性が増加した改変抗体は、抗ＰｓｐＡ抗体が誘導するＣ３ｂ補体受容体を介した貪食活性を亢進させうることがわかった。

[0126] ［実施例９］ＲＮＵラット敗血症モデルにおける抗ＣＰ５キメラ抗体のｉｎ ｖｉｖｏ薬効評価

抗体のＦｃ改変が、抗ＣＰ５キメラ抗体のｉｎ ｖｉｖｏ薬効を増強することできるかを評価するため、ラット全身感染症モデルを用いて、ｃｏｎ－１３７Ｇ１８ＡおよびＮＡｃ－１３７Ｇ１８Ａのｉｎ ｖｉｖｏ薬効を比較した。

[0127] ｃｏｎ－１３７Ｇ１８ＡおよびＮＡｃ－１３７Ｇ１８Ａのｉｎ ｖｉｖｏ薬効は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにて各抗体１μｇでプレオプソナイズした細菌を投与したロウェットヌード（Ｒｏｗｅｔｔ Ｎｕｄｅ、以下ＲＮＵと略記する）ラットモデルを用いて評価を行い、細菌は黄色ブドウ球菌株ＭＳＳＡ Ｒｅｙｎｏｌｄｓ（ＡＴＣＣ－２５９２３）を使用した。

[0128] 図２１に示すように、ＮＡｃ－１３７Ｇ１８Ａでプレオプソナイズした ＭＳＳＡ Ｒｅｙｎｏｌｄｓを感染させたＲＮＵラットは、アイソタイプコントロールとして用いた抗ＤＮＰ抗体またはｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａでプレオプソナイズした ＭＳＳＡ Ｒｅｙｎｏｌｄｓを感染させたＲＮＵラットに比べて、高い生存率を示した。

[0129] 以上より、ＮＡｃ－１３７Ｇ１８Ａは、ｃｏｎ－１３７Ｇ１８Ａよりも生体における感染症予防効果が高い可能性が見出された。

[0130] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、２０１２年８月１３日付けで出願された米国仮出願（６１／６８２，４０４号）に基づいており、その全体が引用により援用される。

配列表フリーテキスト

[0131] 配列番号１：ＩｇＧ１／ＩｇＧ３キメラＦｃのアミノ酸配列

配列番号２：ＩｇＧ１／ＩｇＧ３キメラＦｃ＿Ｎ３９２Ｋのアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりも補体依存性細胞傷害活性（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下、ＣＤＣと略記する）が増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性を増加させる方法。

[請求項2] 前記少なくとも１つのアミノ酸残基が、抗体Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインに含まれるアミノ酸残基である請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記改変抗体が、アミノ酸残基を置換する前のアミノ酸配列を有する抗体よりも補体Ｃ１ｑへの結合活性が増加した改変抗体である請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記菌体表面分子に結合する前記抗体のサブクラスがヒトＩｇＧ１である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記細菌が、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌から選ばれる少なくとも１つの細菌である請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 前記グラム陽性細菌が、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、腸球菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）および抗酸菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）から選ばれる少なくとも１つのグラム陽性細菌である請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記グラム陰性細菌が、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）およびアシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）から選ばれる少なくとも１つのグラム陰性細菌である請求項５に記載の方法。

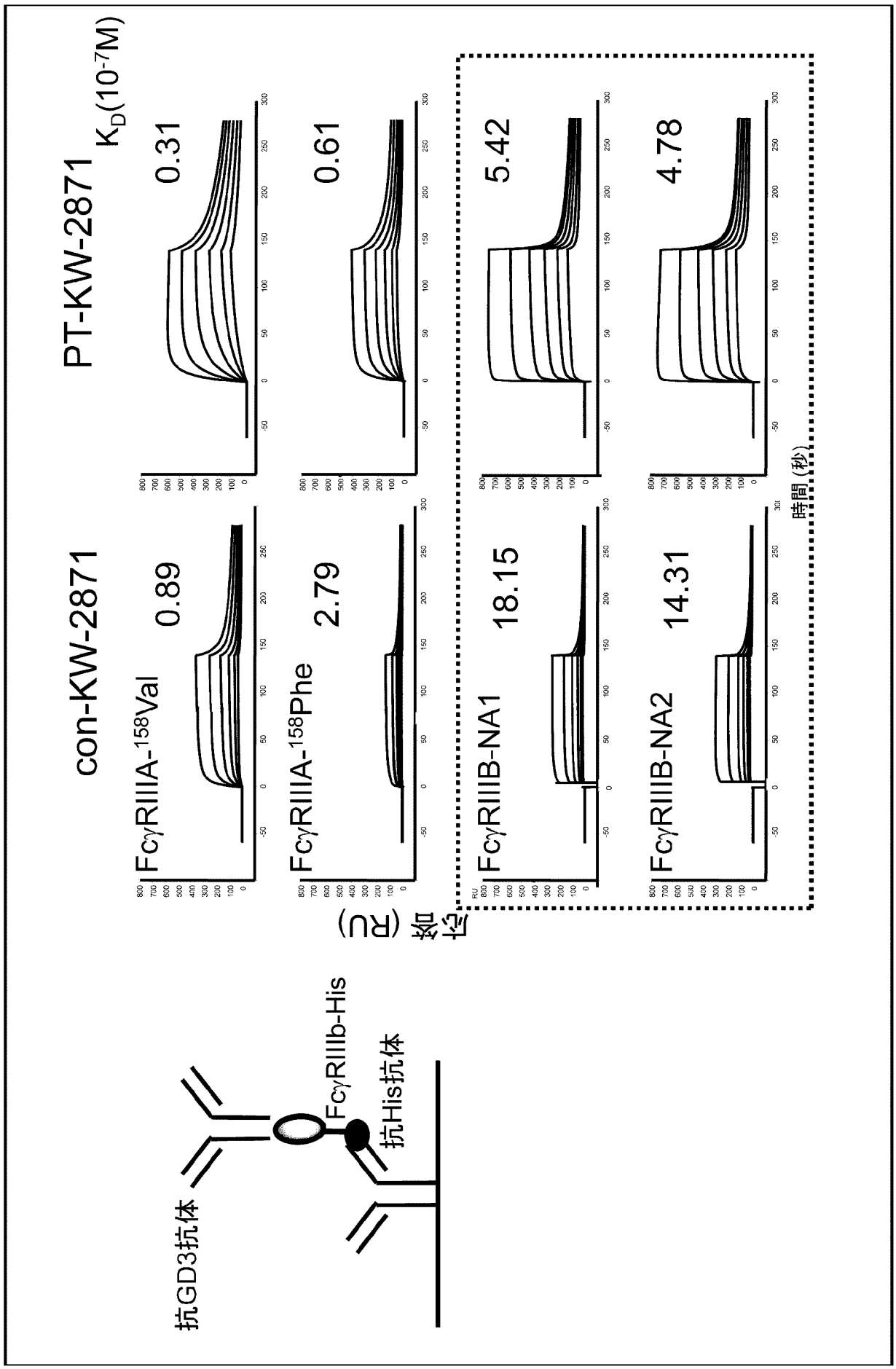
[請求項8] 前記細菌の菌体表面分子が、ガングリオシド、莢膜多糖［ｃａｐｓｕｌａｒ ｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＣＰ）］、表面タンパク質［ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｔｅｉｎ（ＳＰ）］およびリポ多糖［（ｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＬＰＳ）］から選ばれる少なくとも１つの分子である請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記改変抗体が、Ｎ結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有し、該Ｆｃ領域に結合する全Ｎ結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα１－６フコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上である請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

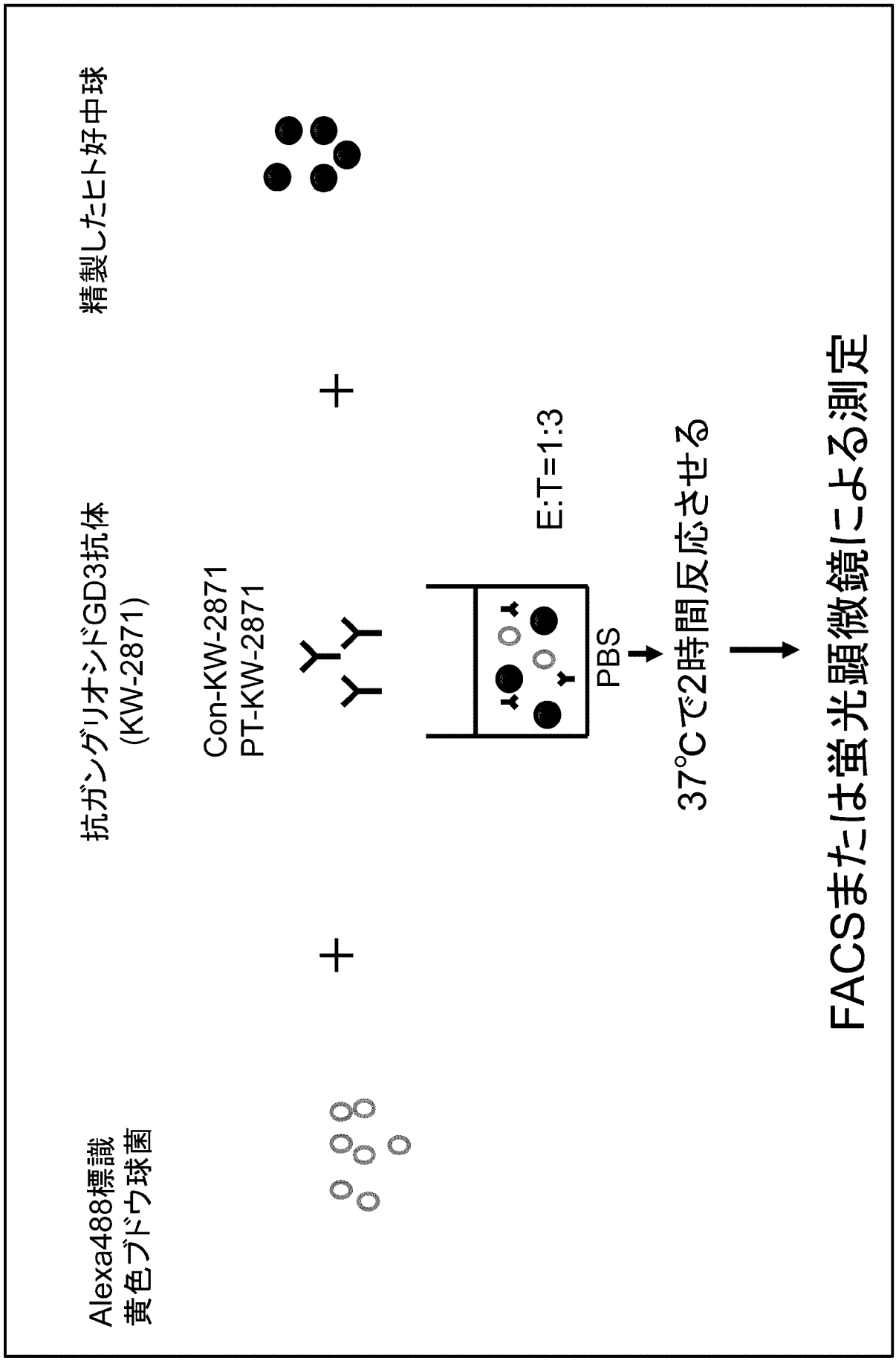
[請求項10] 細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療剤。

[請求項11] 細菌の菌体表面分子に結合する抗体において、少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ該アミノ酸残基を置換する前の抗体よりもＣＤＣが増加した改変抗体を用いて、補体Ｃ３ｂの該菌体表面への沈着および貪食細胞による貪食活性の増加により該細菌の増殖を低下させることを特徴とする細菌感染症の治療方法。

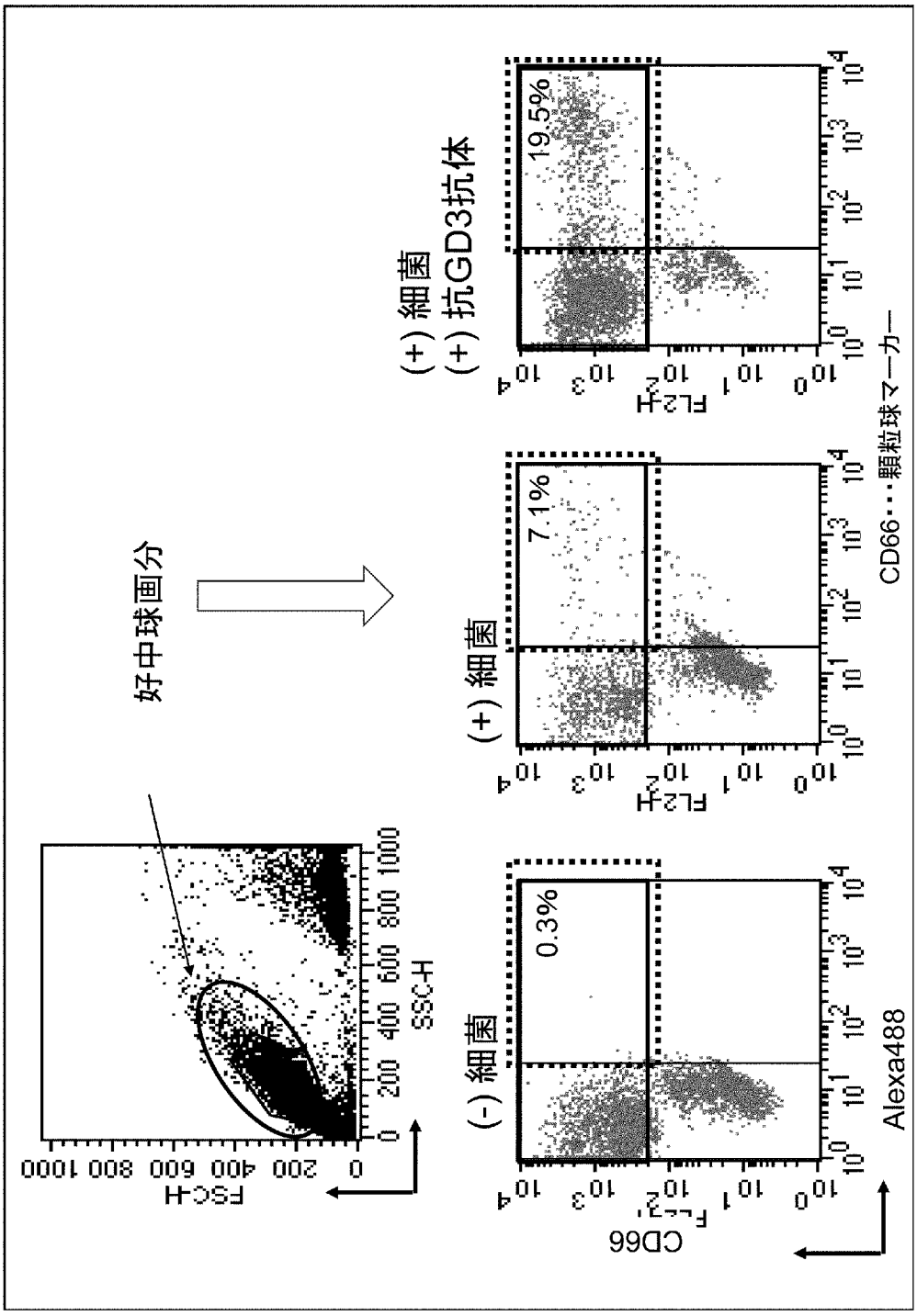
[図1]


抗GD3抗体
FcγRIIIb-His
抗His抗体
結合 (RU)
con-KW-2871
PT-KW-2871
$K_D(10^{-7}M)$
FcγRIIIA-158Val
0.89
0.31
FcγRIIIA-158Phe
2.79
0.61
FcγRIIIB-NA1
18.15
5.42
FcγRIIIB-NA2
14.31
4.78
時間 (秒)

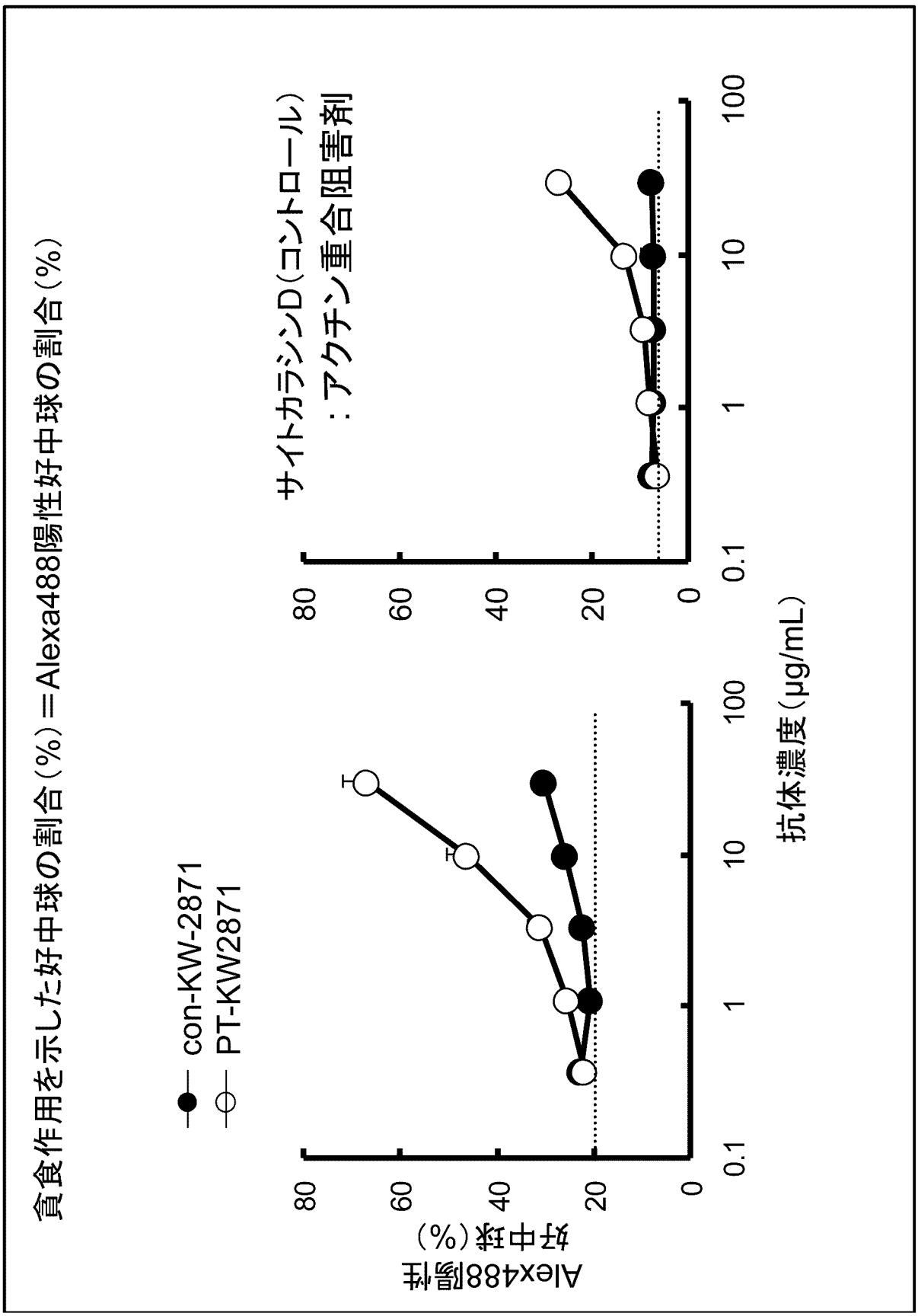
[図2]


Alexa488標識
黄色ブドウ球菌
抗ガングリオシドGD3抗体
(KW-2871)
Con-KW-2871
PT-KW-2871
精製したヒト好中球
E:T=1:3
PBS
37℃で2時間反応させる
FACSまたは蛍光顕微鏡による測定

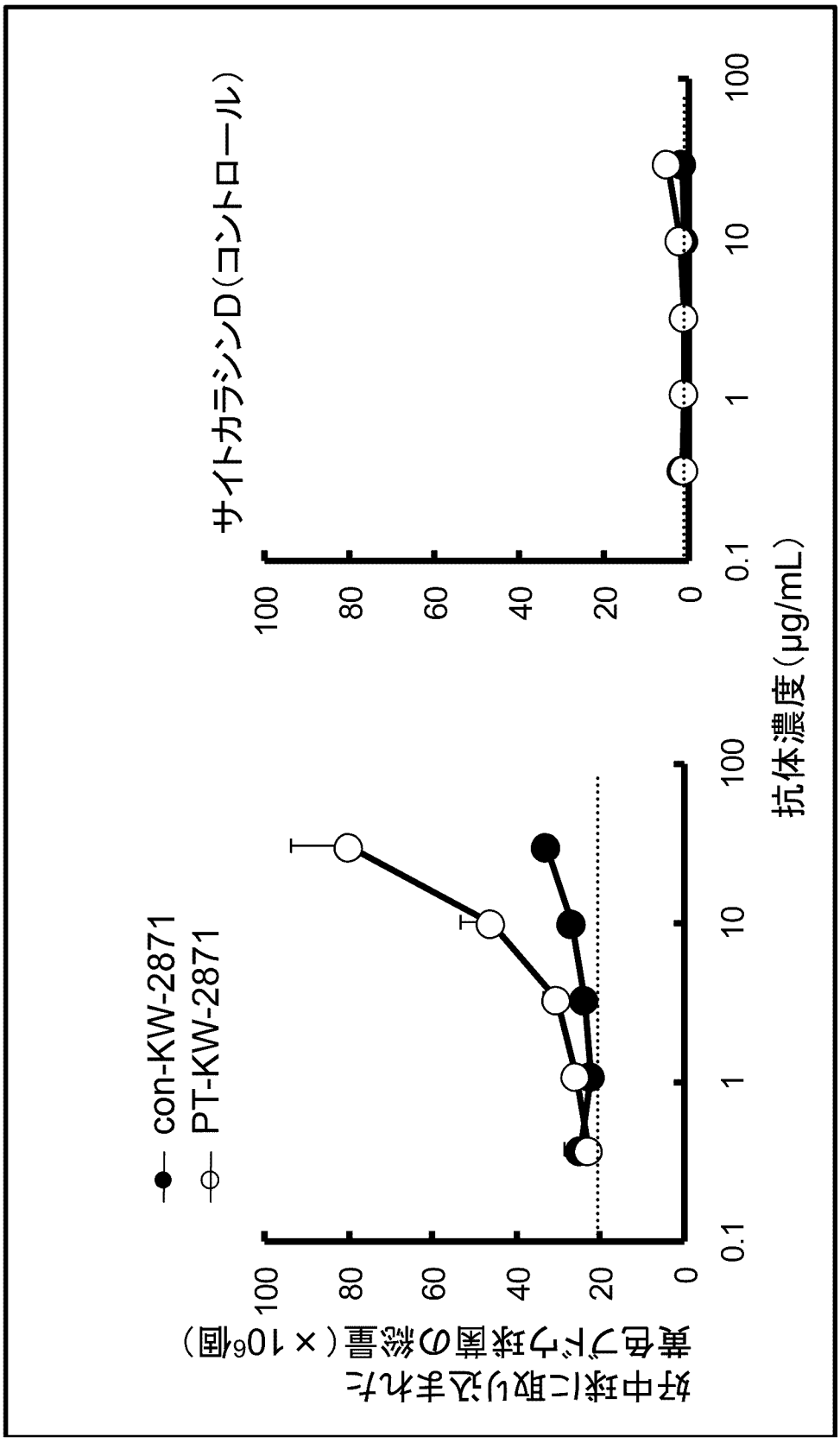
[図3]


好中球画分
FSC-H
SSC-H
(-) 細菌
(+) 細菌
(+) 細菌
(+) 抗GD3抗体
0.3%
7.1%
19.5%
CD66
Alexa488
CD66・・・顆粒球マーカー

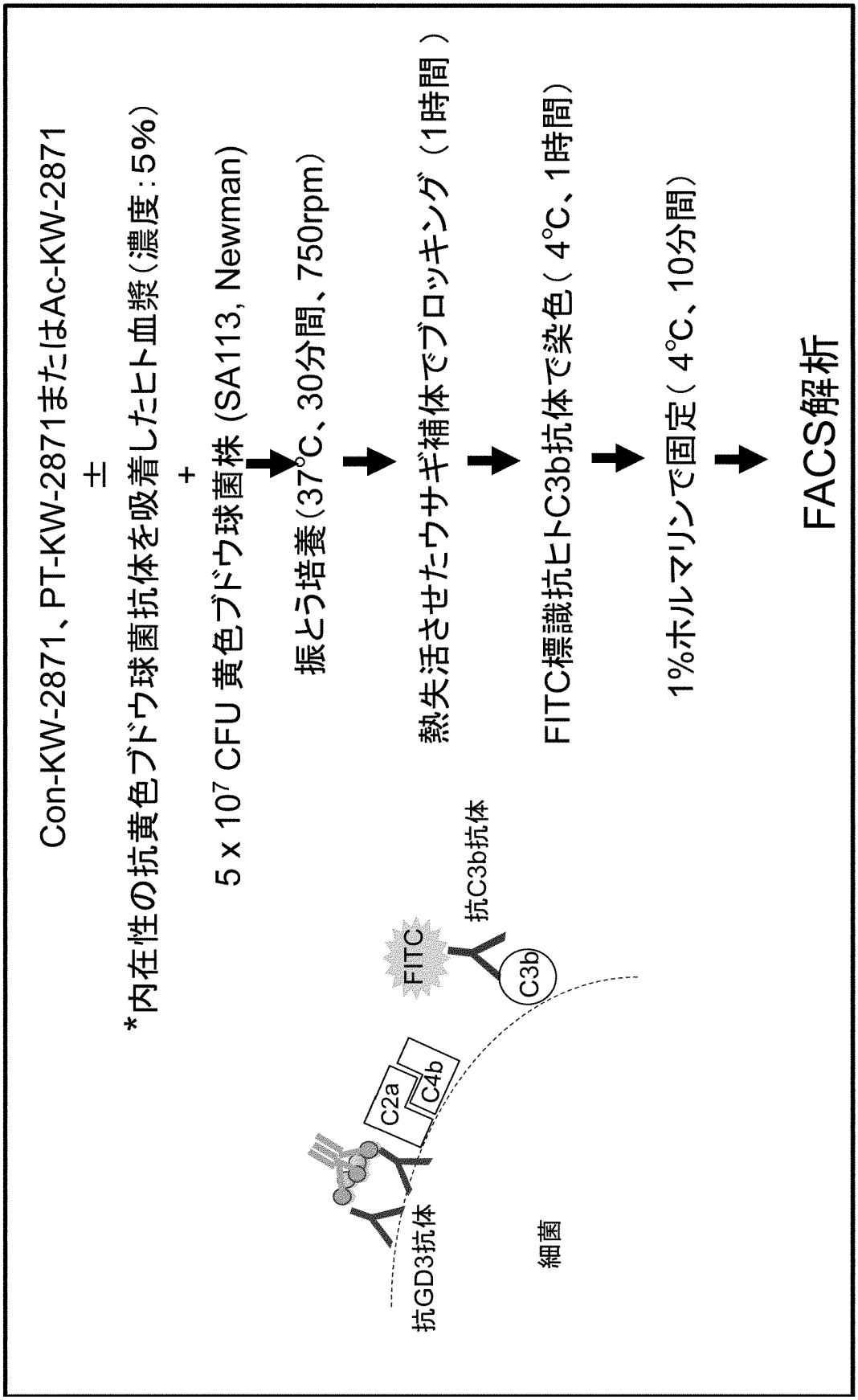
[図4]


貪食作用を示した好中球の割合（%）＝Alexa488陽性好中球の割合（%）
con-KW-2871
PT-KW2871
サイトカラシンD（コントロール）
：アクチン重合阻害剤
Alexa488陽性
好中球（%）
0
20
40
60
80
0.1
1
10
100
抗体濃度（μg/mL）

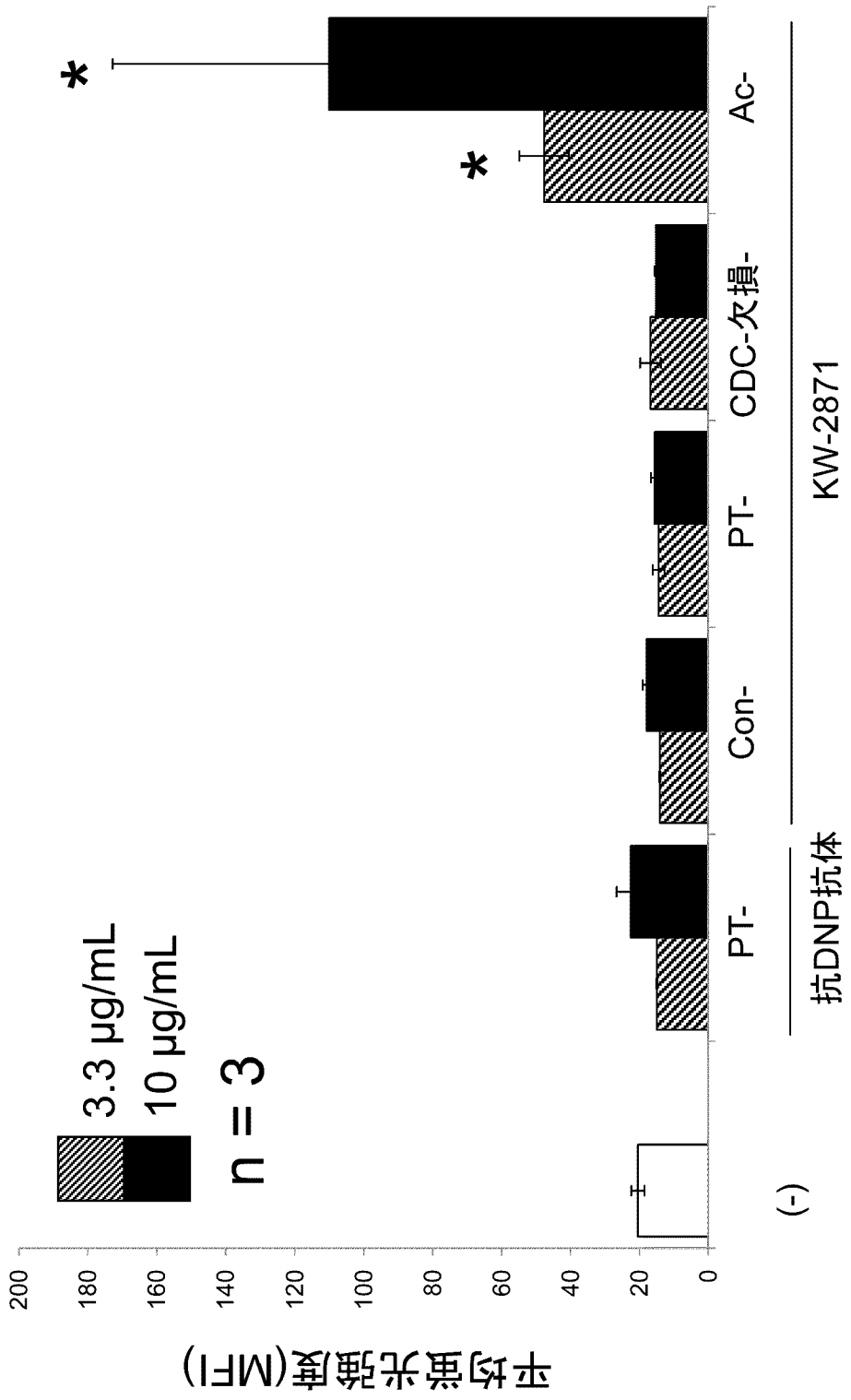
[図5]


好中球に取り込まれた
黄色ブドウ球菌の総量（×10⁶個）
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
抗体濃度（μg/mL）
con-KW-2871
PT-KW-2871
サイトカラシンD（コントロール）
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100

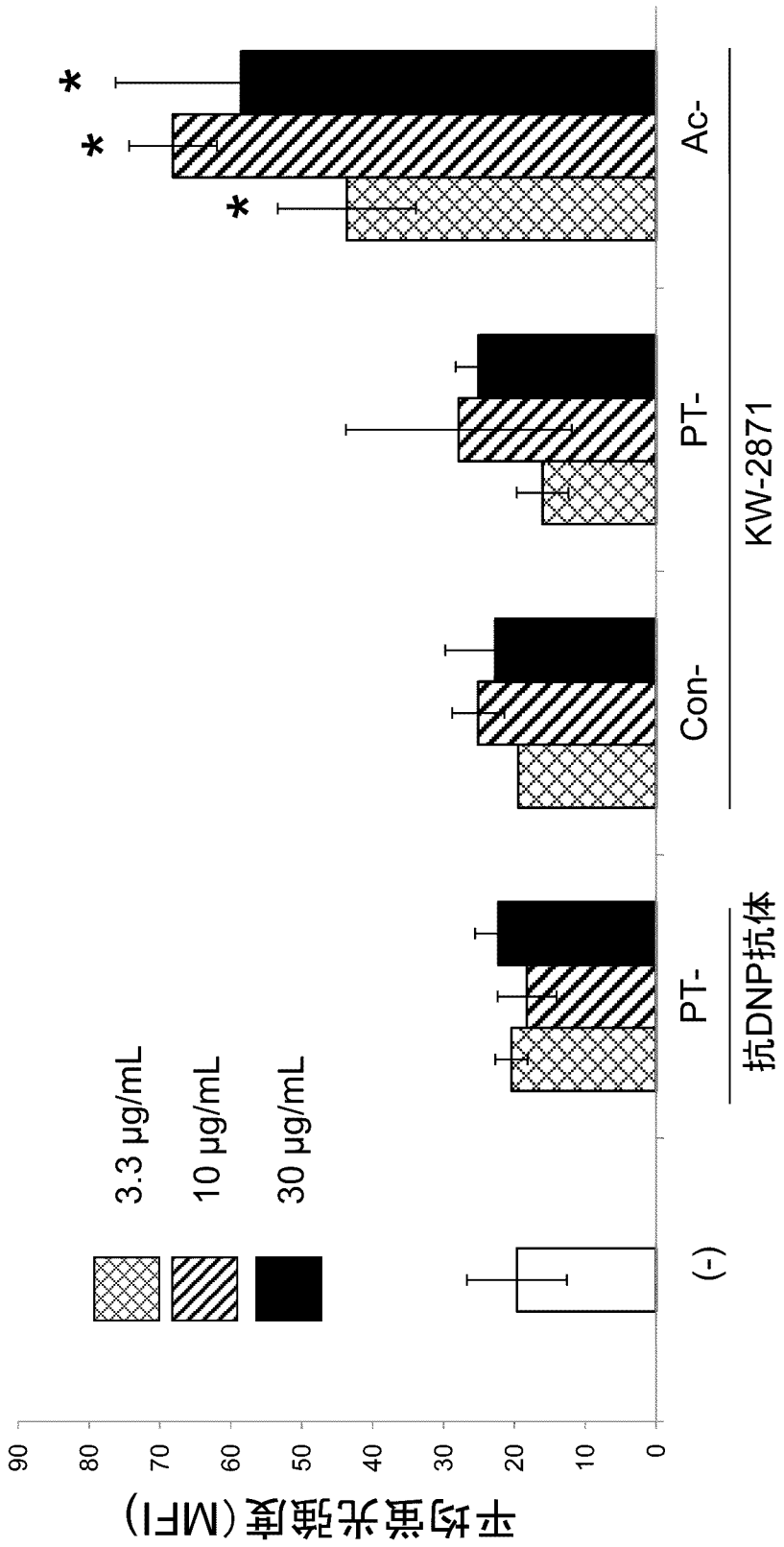
[図6]


Con-KW-2871、PT-KW-2871またはAc-KW-2871
±
*内在性の抗黄色ブドウ球菌抗体を吸着したヒト血漿（濃度：5%）
+
5 x 10^7 CFU 黄色ブドウ球菌株 (SA113, Newman)
振とう培養（37°C、30分間、750rpm）
熱失活させたウサギ補体でブロッキング（1時間）
FITC標識抗ヒトC3b抗体で染色（4°C、1時間）
1%ホルマリンで固定（4°C、10分間）
FACS解析
抗GD3抗体
細菌
C2a
C4b
FITC
抗C3b抗体
C3b

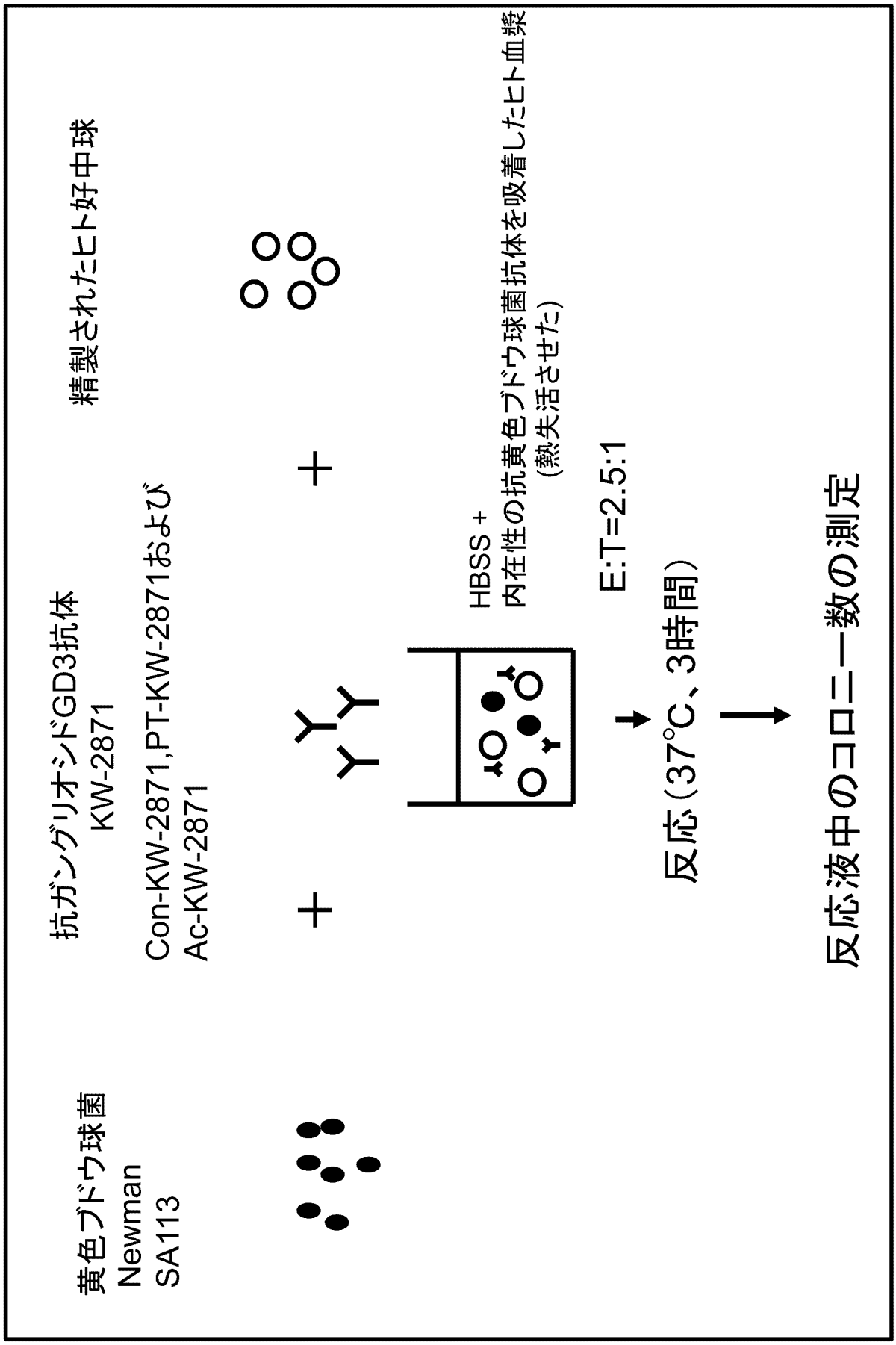
[図7]


平均蛍光強度(MFI)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
3.3 μg/mL
10 μg/mL
n = 3
*
*
(-)
PT-
Con-
PT-
CDC-欠損-
Ac-
抗DNP抗体
KW-2871

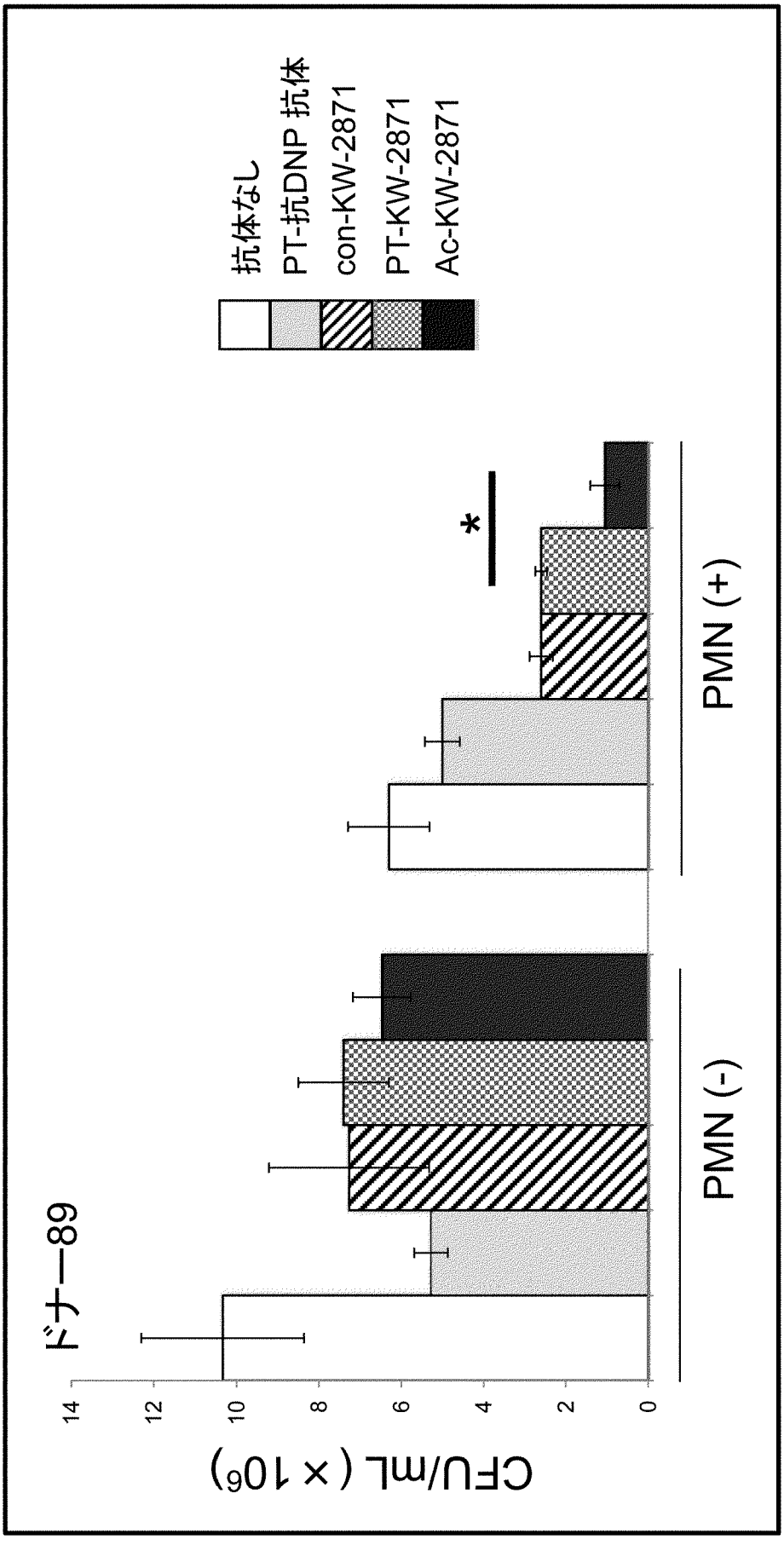
[図8]


平均蛍光強度(MFI)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
3.3 μg/mL
10 μg/mL
30 μg/mL
(-)
PT-
Con-
PT-
Ac-
抗DNP抗体
KW-2871
*
*
*

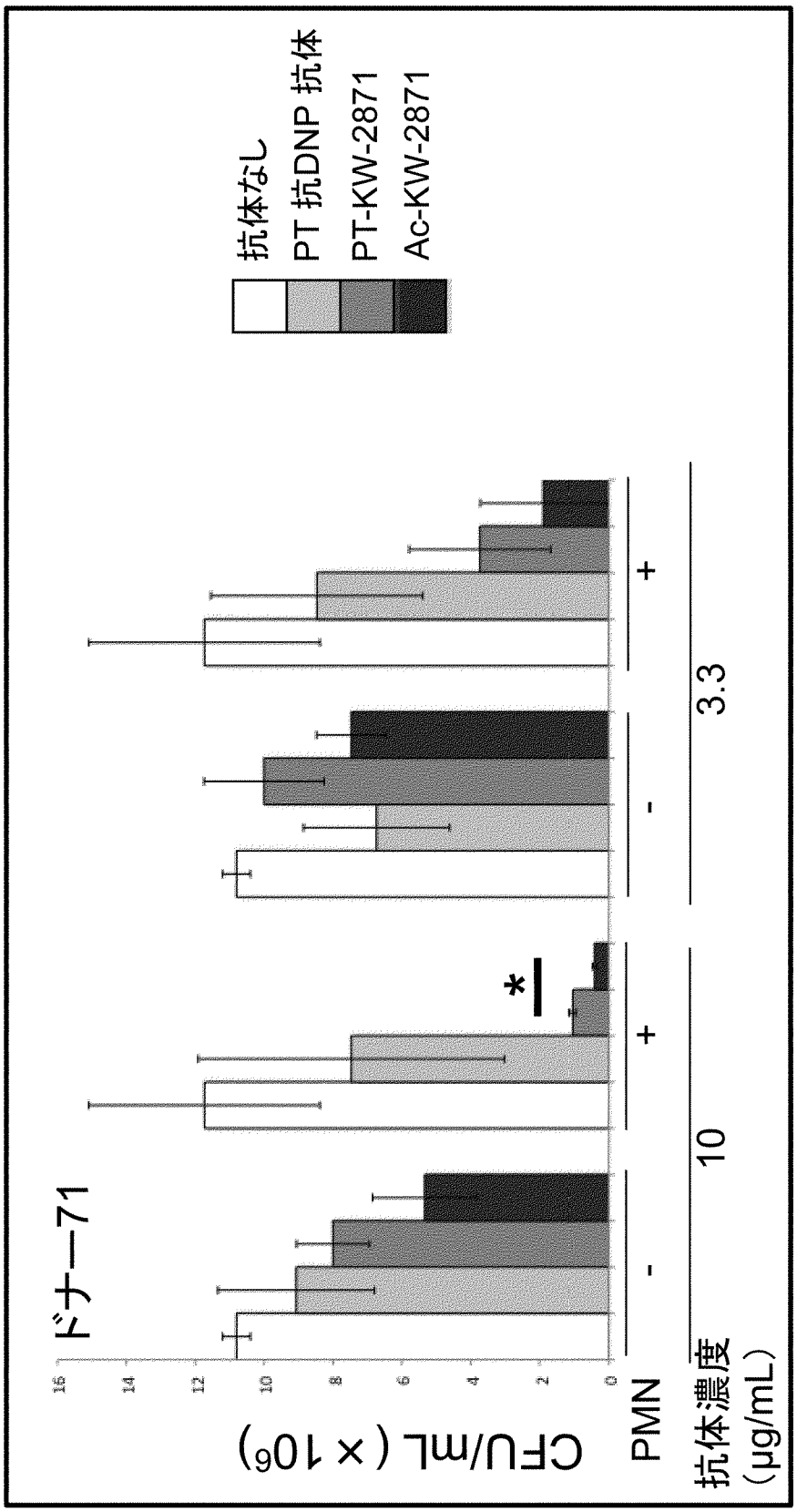
[図9]


黄色ブドウ球菌
Newman
SA113
抗ガングリオシドGD3抗体
KW-2871
Con-KW-2871,PT-KW-2871および
Ac-KW-2871
精製されたヒト好中球
HBSS +
内在性の抗黄色ブドウ球菌抗体を吸着したヒト血漿
(熱失活させた)
E:T=2.5:1
反応(37℃、3時間)
反応液中のコロニー数の測定

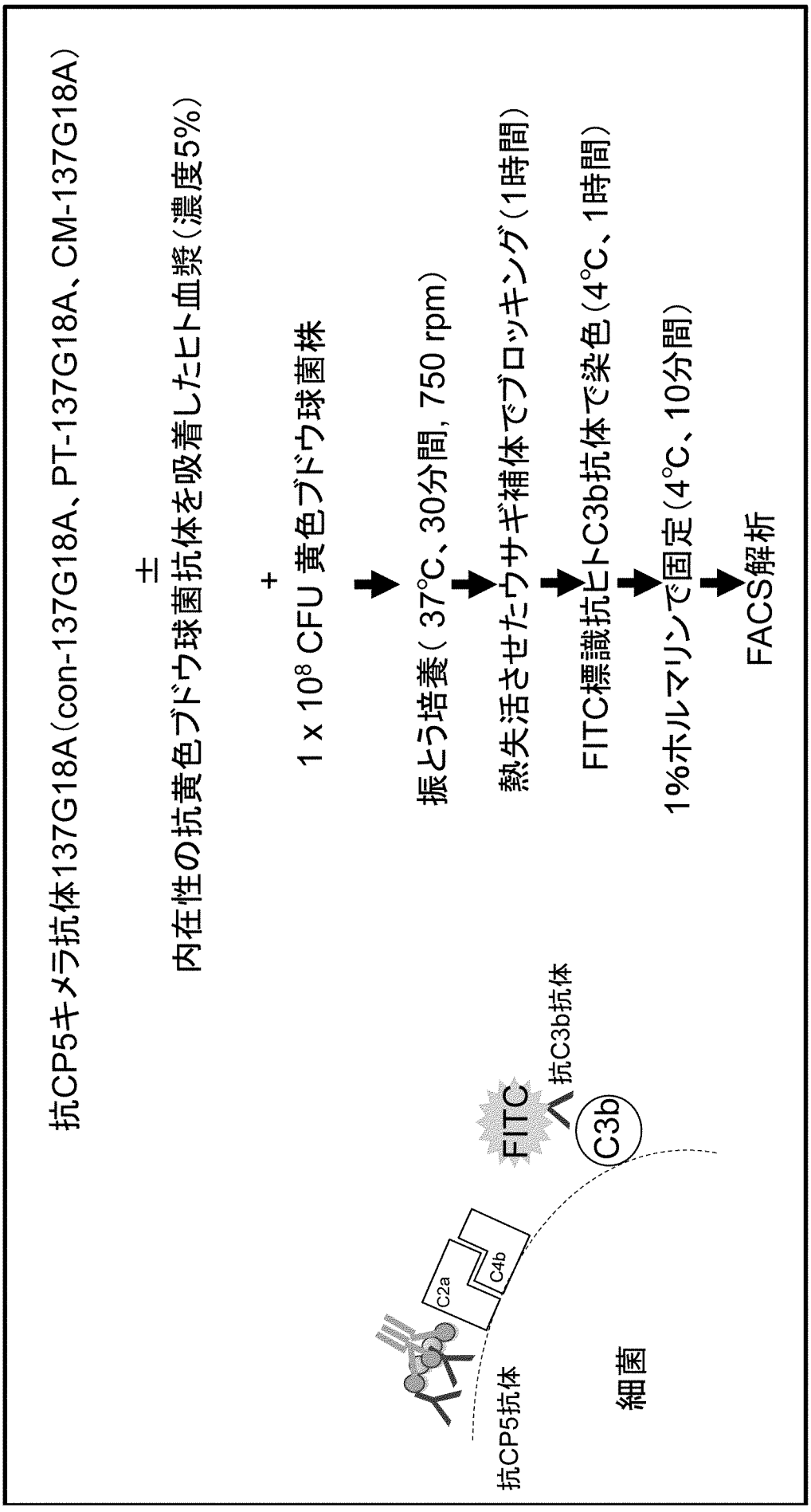
[図10]


ドナー89
CFU/mL (× 10⁶)
14
12
10
8
6
4
2
0
PMN (-)
PMN (+)
*
抗体なし
PT-抗DNP 抗体
con-KW-2871
PT-KW-2871
Ac-KW-2871

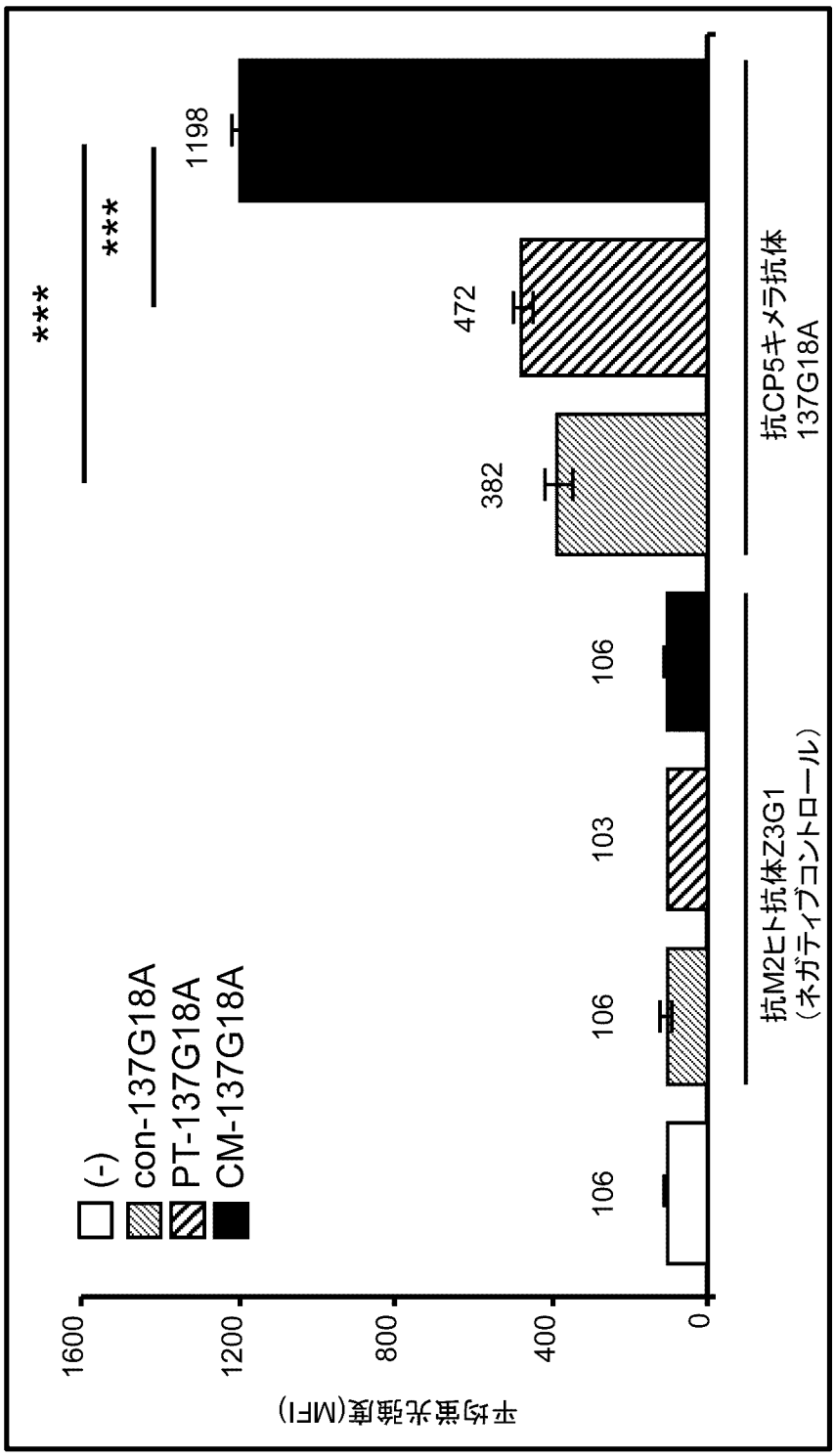
[図11]


抗体なし
PT 抗DNP 抗体
PT-KW-2871
Ac-KW-2871
ドナー71
CFU/mL (×10⁶)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
PMN
-
+
-
+
抗体濃度
(μg/mL)
10
3.3

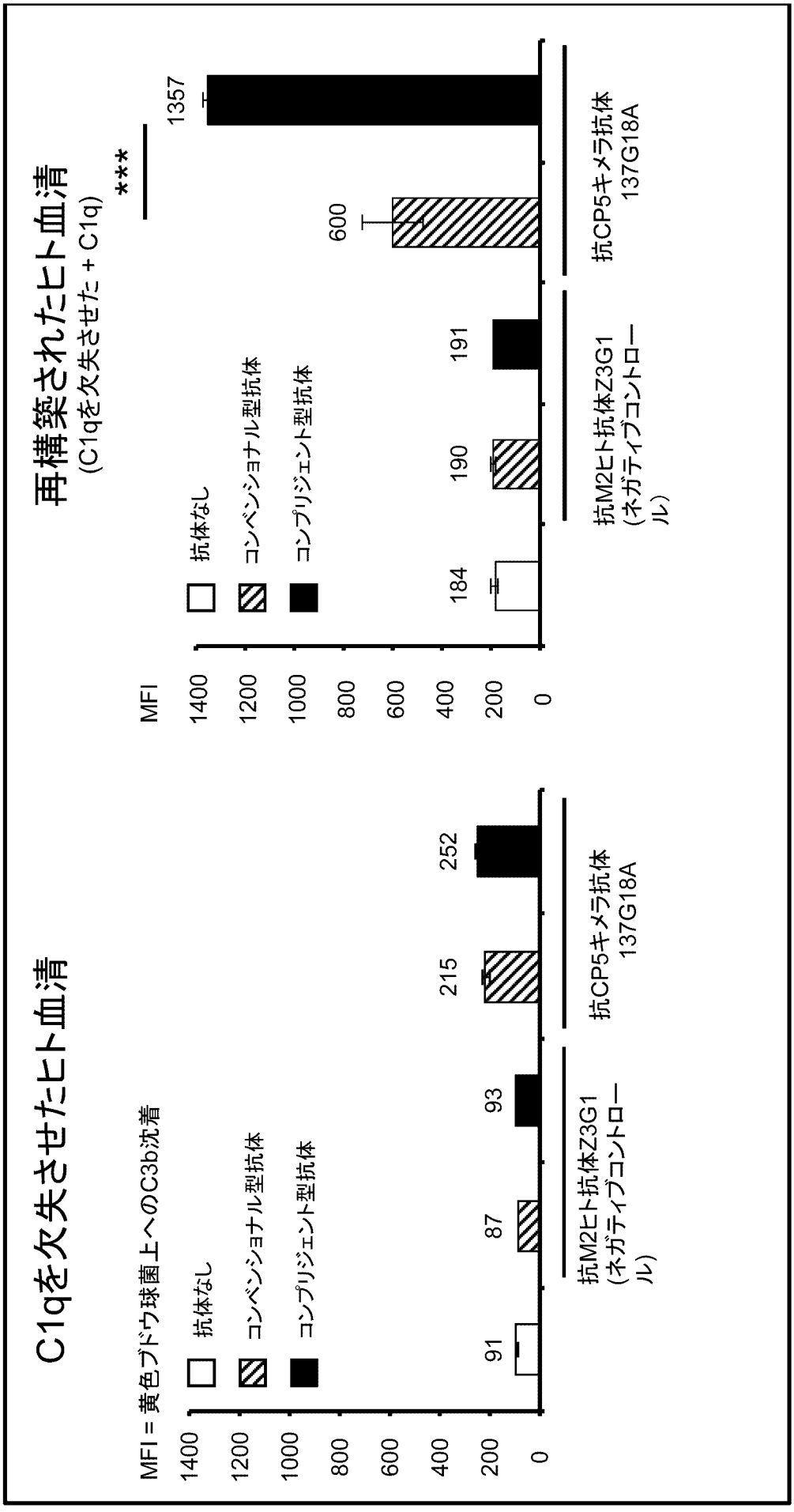
[図12]


抗CP5キメラ抗体137G18A（con-137G18A、PT-137G18A、CM-137G18A）
±
内在性の抗黄色ブドウ球菌抗体を吸着したヒト血漿（濃度5%）
+
1 x 10^8 CFU 黄色ブドウ球菌株
振とう培養（37℃、30分間, 750 rpm）
熱失活させたウサギ補体でブロッキング（1時間）
FITC標識抗ヒトC3b抗体で染色（4℃、1時間）
1%ホルマリンで固定（4℃、10分間）
FACS解析
抗CP5抗体
C2a
C4b
細菌
C3b
FITC
抗C3b抗体

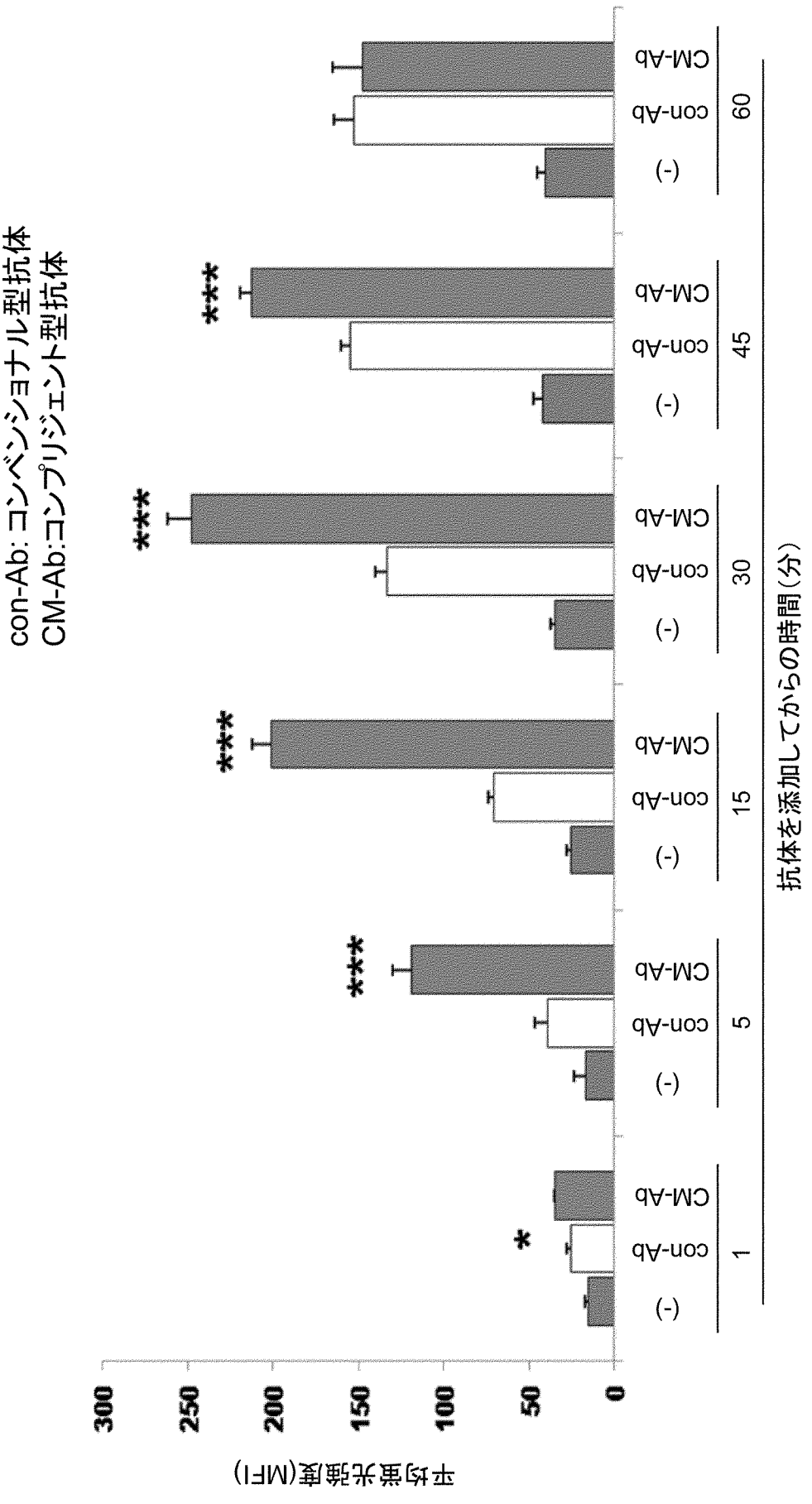
[図13]


平均蛍光強度(MFI)
1600
1200
800
400
0
(-)
con-137G18A
PT-137G18A
CM-137G18A
106
106
103
106
382
472
1198
***
***
抗M2ヒト抗体Z3G1
（ネガティブコントロール）
抗CP5キメラ抗体
137G18A

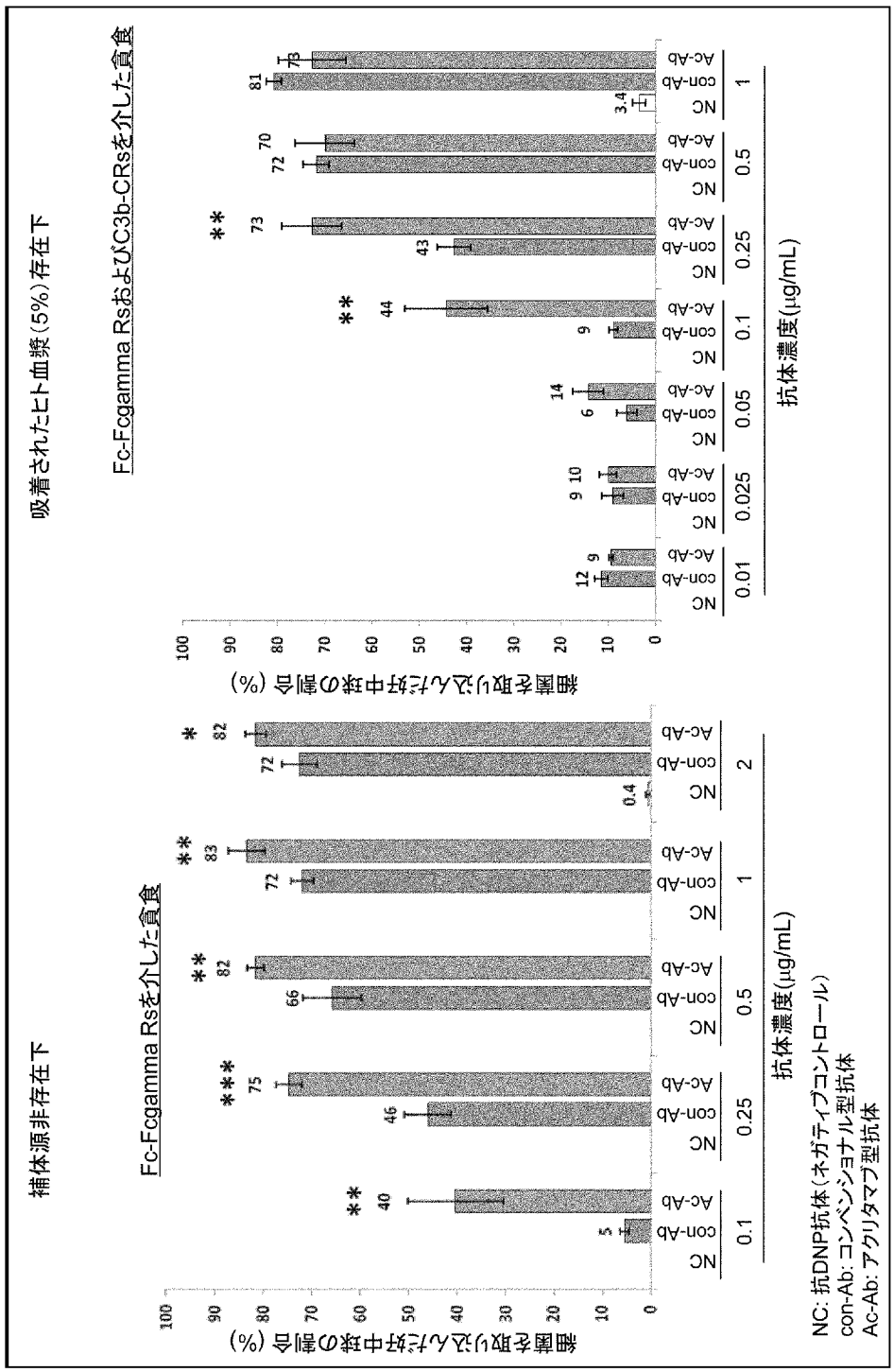
[図14]


C1qを欠失させたヒト血清
MFI = 黄色ブドウ球菌上へのC3b沈着
抗体なし
コンベンショナル型抗体
コンプリジェント型抗体
MFI
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
91
87
93
215
252
抗M2ヒト抗体Z3G1
(ネガティブコントロール)
抗CP5キメラ抗体
137G18A
再構築されたヒト血清
(C1qを欠失させた + C1q)
***
1357
600
184
190
191
抗M2ヒト抗体Z3G1
(ネガティブコントロール)
抗CP5キメラ抗体
137G18A

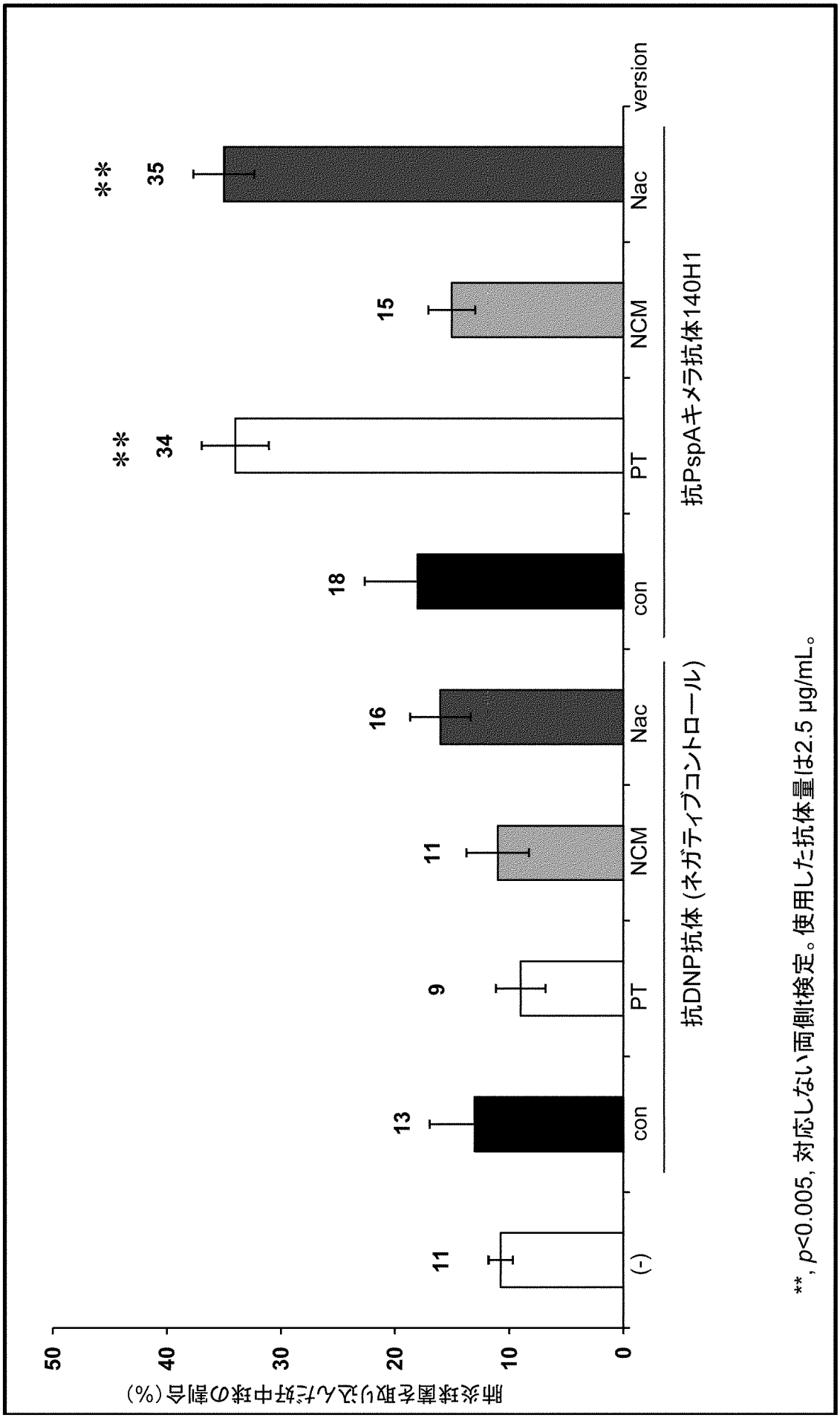
[図15]


con-Ab: コンベンショナル型抗体
CM-Ab:コンプリジェント型抗体
平均蛍光強度(MFI)
300
250
200
150
100
50
0
*
***
***
***
***
(-)
con-Ab
CM-Ab
1
5
15
30
45
60
抗体を添加してからの時間(分)

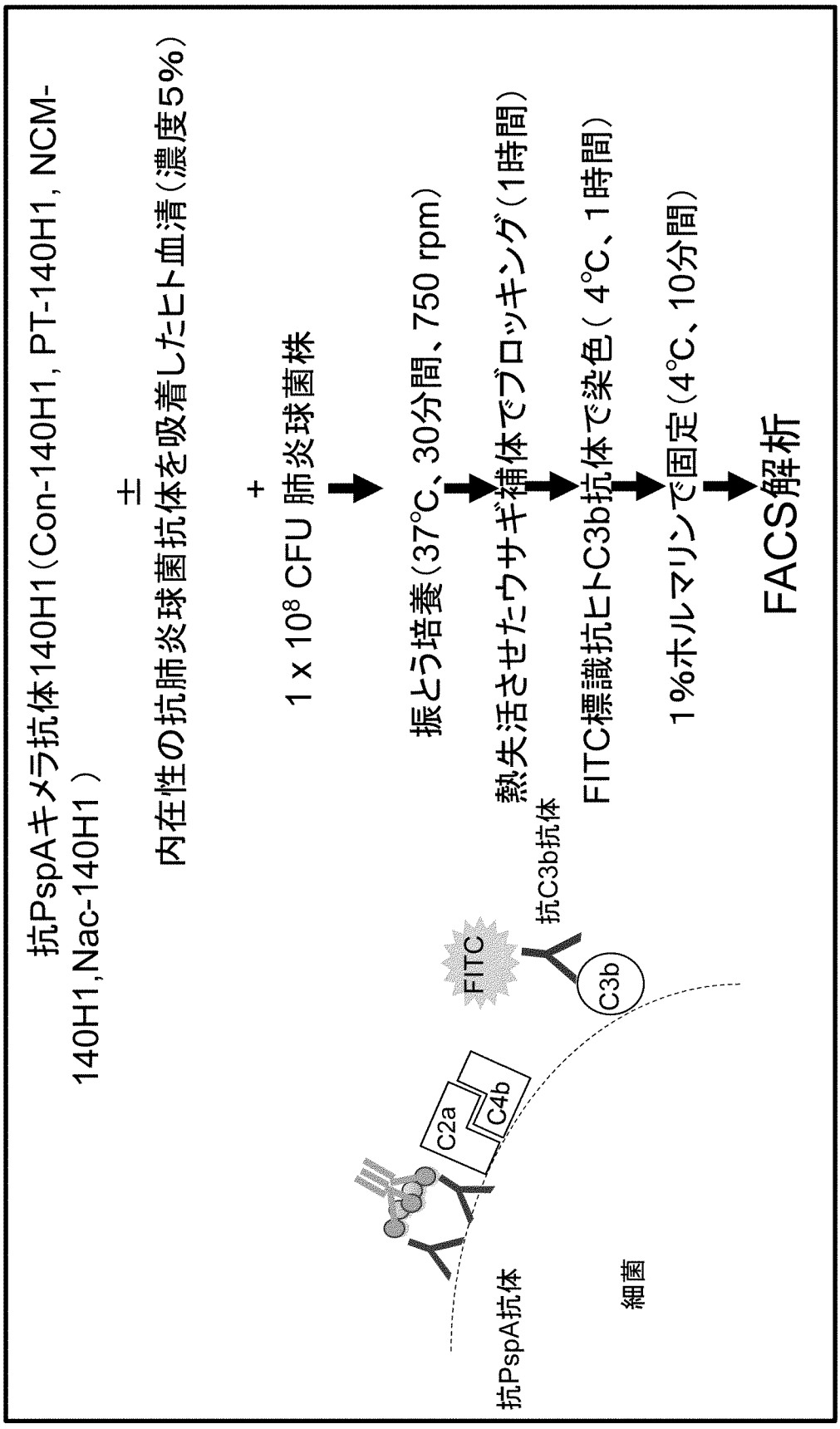
[図16]


補体源非存在下
吸着されたヒト血漿(5%)存在下
Fc-Fcgamma Rsを介した貪食
Fc-Fcgamma RsおよびC3b-CRsを介した貪食
貪食を取り込んだ好中球の割合 (%)
抗体濃度(μg/mL)
NC: 抗DNP抗体(ネガティブコントロール)
con-Ab: コンベンショナル型抗体
Ac-Ab: アクリタマブ型抗体

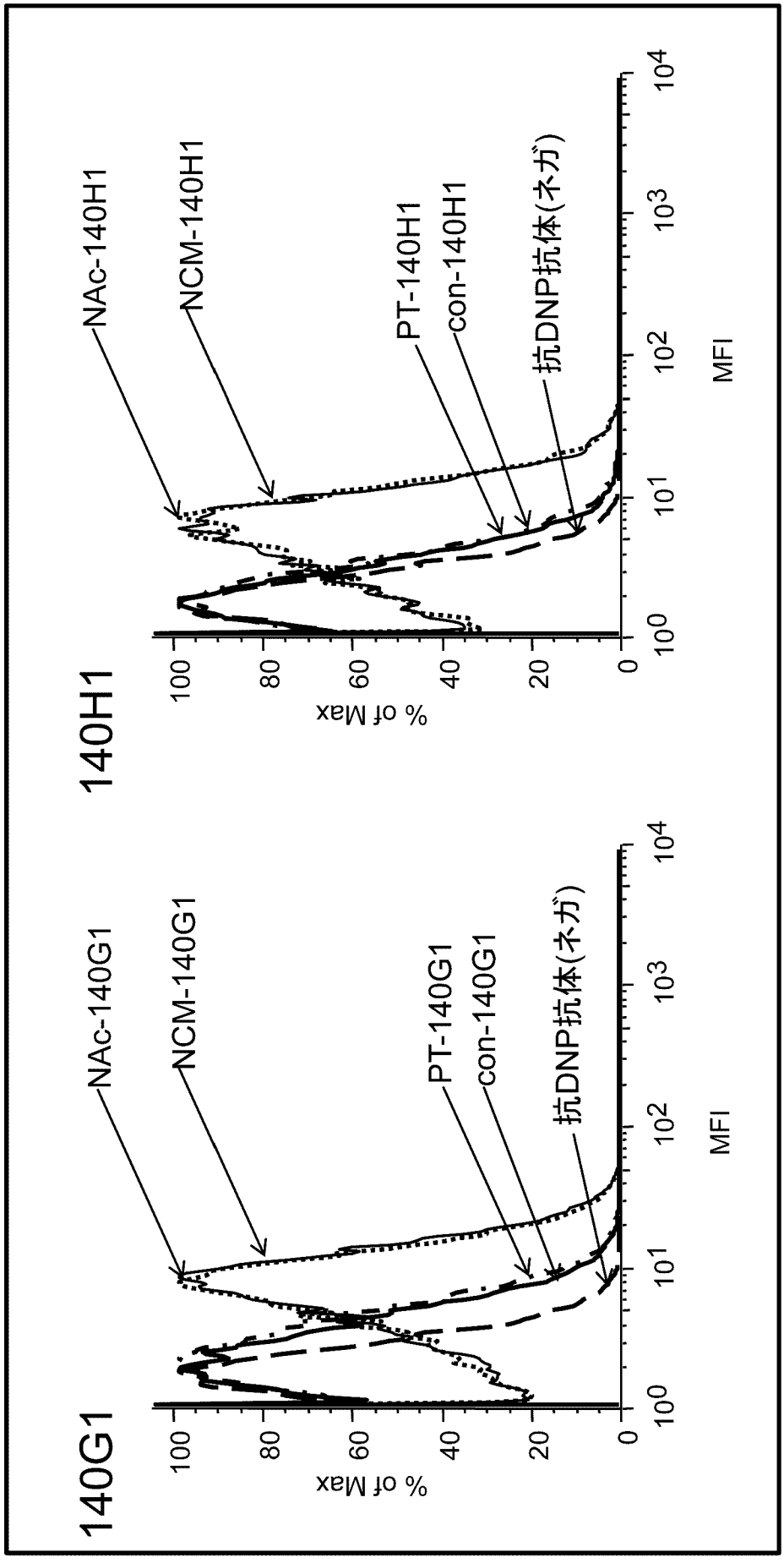
[図17]


肺炎球菌を取り込んだ好中球の割合（%）
0
10
20
30
40
50
11
13
9
11
16
18
34
15
35
**
**
(-)
con
PT
NCM
Nac
con
PT
NCM
Nac
抗DNP抗体（ネガティブコントロール）
抗PspAキメラ抗体140H1
version
**, p<0.005, 対応しない両側t検定。使用した抗体量は2.5 μg/mL。

[図18]


抗PspAキメラ抗体140H1（Con-140H1, PT-140H1, NCM-140H1,Nac-140H1）
±
内在性の抗肺炎球菌抗体を吸着したヒト血清（濃度5%）
+
1 x 10^8 CFU 肺炎球菌株
振とう培養（37℃、30分間、750 rpm）
熱失活させたウサギ補体でブロッキング（1時間）
FITC標識抗ヒトC3b抗体で染色（4℃、1時間）
1%ホルマリンで固定（4℃、10分間）
FACS解析
抗PspA抗体
細菌
C2a
C4b
C3b
FITC
抗C3b抗体

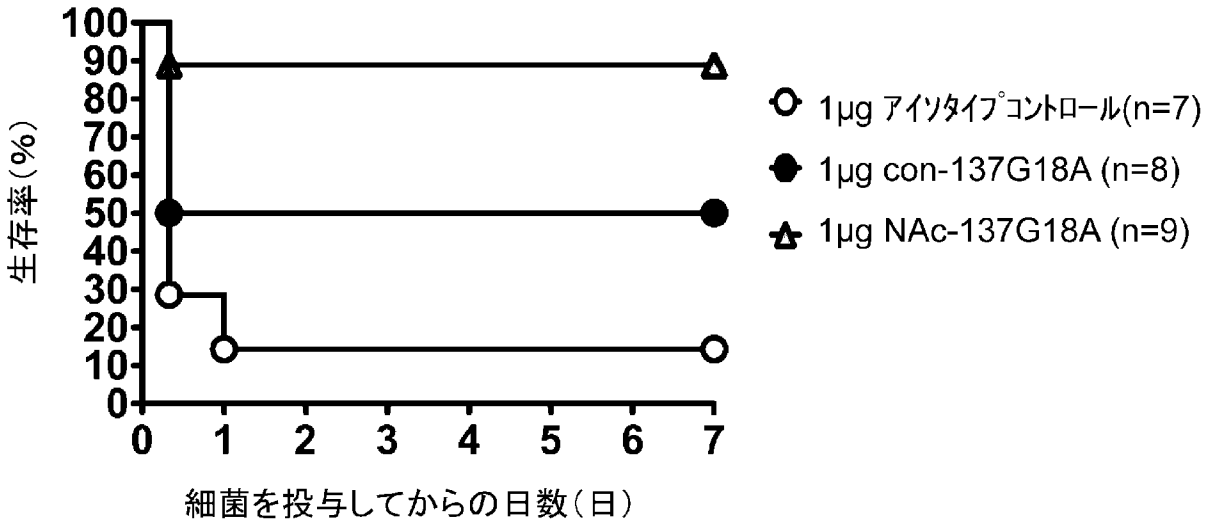
[図19]


140G1
140H1
NAc-140G1
NCM-140G1
PT-140G1
con-140G1
抗DNP抗体(ネガ)
NAc-140H1
NCM-140H1
PT-140H1
con-140H1
抗DNP抗体(ネガ)
% of Max
MFI
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

[図20]

	PJ-1324	BAA-658	WU2
抗DNP抗体	5.5	2.4	4.2
ｺﾝﾍﾞﾝｼｮﾅﾙ140H1	6.2	3.3	5.0
ﾎﾟﾃﾘｼﾞｪﾝﾄ140H1	5.8	3.3	4.8
ﾈｵｺﾝﾌﾟﾘｼﾞｪﾝﾄ 140H1	34.7(5.6x)	7.9(2.4x)	7.5(1.5x)
ﾈｵｱｸﾘﾀﾏﾌﾞ 140H1	35.5(5.7x)	7.6(2.3x)	6.7(1.3x)

[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/071863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/14(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P31/04*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/14, A61K39/395, A61P31/04, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/068136 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 09 June 2011 (09.06.2011), paragraphs [0017], [0022] (Family: none)	1-10
A	WO 2003/085118 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October 2003 (16.10.2003), & US 2004/0132140 A1 & EP 1498490 A1	1-10
A	WO 2011/108502 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 09 September 2011 (09.09.2011), & US 2012/0010387 A1 & EP 2543727 A1 & KR 10-2013-0002987 A	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 September, 2013 (04.09.13)	17 September, 2013 (17.09.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/071863

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The invention of claim 11 pertains to a therapeutic method for a human being and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of Patent Cooperation Treaty Article 17(2)(a)(i) and Patent Cooperation Treaty Rule 39.1(iv).

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７１８６３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/14(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/14, A61K39/395, A61P31/04, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１３年

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, Thomson Innovation

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2011/068136 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2011.06.09, ［００１７］、［００２２］（ファミリーなし）	1-10
A	WO 2003/085118 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003.10.16, & US 2004/0132140 A1 & EP 1498490 A1	1-10
A	WO 2011/108502 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2011.09.09, & US 2012/0010387 A1 & EP 2543727 A1 & KR 10-2013-0002987 A	1-10

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０４．０９．２０１３	１７．０９．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９５９
太田　雄三
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７１８６３

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　11　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項１１に係る発明は、人間の治療方法に該当するから、特許協力条約第１７条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則３９．１(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。