

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509962

(P2015-509962A)

(43) 公表日 平成27年4月2日(2015.4.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C084
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 R	4C085
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	4H045
A61P 39/02 (2006.01)	A61P 39/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-560093 (P2014-560093)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成25年3月1日 (2013.3.1)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成26年9月22日 (2014.9.22)		・インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/028630		REGENERON PHARMACEU
(87) 国際公開番号	W02013/130981		TICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成25年9月6日 (2013.9.6)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(31) 優先権主張番号	61/717, 404		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(32) 優先日	平成24年10月23日 (2012.10.23)		・ミル・リバー・ロード777番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/608, 255		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成24年3月8日 (2012.3.8)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/605, 914		
(32) 優先日	平成24年3月2日 (2012.3.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 Clostridium difficile 毒素に対するヒト抗体

(57) 【要約】

本発明は、Clostridium difficileの毒素Aもしくは毒素Bのいずれかまたは毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する完全ヒト抗体、前記抗体を含む組成物、ならびに使用方法を提供する。本発明の抗体は、C. difficile由来の毒素を中和するのに有用であるので、C. difficileによって引き起こされる下痢または偽膜性大腸炎の処置を含む、C. difficile感染症に関連する疾患および症候を処置する手段を提供する。前記抗体はまた、前記原発性疾患の重症度および/もしくは持続期間を予防し得るか、またはC. difficileの存在に起因する疾患の再発の回数、持続期間および/もしくは重症度、または再燃を予防し得る。本発明の抗体はまた、C. difficileによる感染症の診断に有用であり得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Clostridium difficile の毒素 A もしくは毒素 B に特異的に結合するか、または毒素 A および毒素 B の両方に結合するかもしくはこれらの両方と交差反応する単離された抗体であって、

a) *Clostridium difficile* の毒素 A に特異的に結合する前記単離された抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、98、114、130、146 および 162 から選択される重鎖可変領域 (HCV R) アミノ酸配列内に含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (HCD R 1、HCD R 2 および HCD R 3) と、配列番号 10、106、122、138、154 および 170 から選択される軽鎖可変領域 (LCV R) アミノ酸配列内に含まれる 3 つの軽鎖相補性決定領域 (LCD R 1、LCD R 2 および LCD R 3) とを含み；

b) *Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する前記単離された抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338 および 354 から選択される HCV R アミノ酸配列内に含まれる HCD R 1、HCD R 2 および HCD R 3 と、配列番号 186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346 および 362 から選択される LCV R アミノ酸配列内に含まれる LCD R 1、LCD R 2 および LCD R 3 とを含み；および

c) *Clostridium difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する前記単離された抗体または抗原結合断片が、配列番号 18、34、50、66 および 82 から選択される HCV R アミノ酸配列内に含まれる HCD R 1、HCD R 2 および HCD R 3 と、配列番号 26、42、58、74 および 90 から選択される LCV R アミノ酸配列内に含まれる LCD R 1、LCD R 2 および LCD R 3 とを含む、単離された抗体。

【請求項 2】

Clostridium difficile の毒素 A に特異的に結合する請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、(a) 配列番号 146 のアミノ酸配列を有する HCV R と、(b) 配列番号 154 のアミノ酸配列を有する LCV R とを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

Clostridium difficile の毒素 A に特異的に結合する請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 2 / 10、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154 および 162 / 170 から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列ペアを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

Clostridium difficile の毒素 A に特異的に結合する、請求項 1 または 3 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、

(a) 配列番号 4、100、116、132、148 および 164 から選択されるアミノ酸配列を有する HCD R 1 ドメイン；

(b) 配列番号 6、102、118、134、150 および 166 から選択されるアミノ酸配列を有する HCD R 2 ドメイン；

(c) 配列番号 8、104、120、136、152 および 168 から選択されるアミノ酸配列を有する HCD R 3 ドメイン；

(d) 配列番号 12、108、124、140、156 および 172 から選択されるアミノ酸配列を有する LCD R 1 ドメイン；

(e) 配列番号 14、110、126、142、158 および 174 から選択されるアミノ酸配列を有する LCD R 2 ドメイン；および

10

20

30

40

50

(f) 配列番号 16、112、128、144、160 および 176 から選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 ドメイン

を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

Clostridium difficile の毒素 A に特異的に結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、

(a) 配列番号 148 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 ドメイン；

(b) 配列番号 150 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 ドメイン；

(c) 配列番号 152 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 ドメイン；

(d) 配列番号 156 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 ドメイン；

(e) 配列番号 158 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 ドメイン；および

(f) 配列番号 160 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 ドメイン

を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

Clostridium difficile の毒素 B に特異的に結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、(a) 配列番号 274 のアミノ酸配列を有する H C V R と、(b) 配列番号 282 のアミノ酸配列を有する L C V R とを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

Clostridium difficile の毒素 B に特異的に結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 266、274 / 282、290 / 298、306 / 314、322 / 330、338 / 346 および 354 / 362 から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

Clostridium difficile の毒素 B に特異的に結合する、請求項 1 または 7 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、

(a) 配列番号 180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340 および 356 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 1 ドメイン；

(b) 配列番号 182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342 および 358 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 2 ドメイン；

(c) 配列番号 184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344 および 360 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 3 ドメイン；

(d) 配列番号 188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348 および 364 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 1 ドメイン；

(e) 配列番号 190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350 および 366 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 2 ドメイン；および

(f) 配列番号 192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352 および 368 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 ドメイン

を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

Clostridium difficile の毒素 B に特異的に結合する、請求項 1 ま

10

20

30

40

50

たは 6 ~ 8 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、

- (a) 配列番号 276 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する HCDR1 ドメイン、
- (b) 配列番号 278 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する HCDR2 ドメイン；
- (c) 配列番号 280 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する HCDR3 ドメイン；
- (d) 配列番号 284 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する LCDR1 ドメイン；
- (e) 配列番号 286 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する LCDR2 ドメイン；および
- (f) 配列番号 288 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する LCDR3 ドメイン

を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、(a) 配列番号 18 および 34 から選択されるアミノ酸配列を有する HCV R と、(b) 配列番号 26 および 42 から選択されるアミノ酸配列を有する LCV R とを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74 および 82 / 90 から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列ペアを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する、請求項 1 または 11 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 18 / 26 および 34 / 42 から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列ペアを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する、請求項 1 または 11 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、

- (a) 配列番号 20、36、52、68 および 84 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR1 ドメイン；
- (b) 配列番号 22、38、54、70 および 86 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR2 ドメイン；
- (c) 配列番号 24、40、56、72 および 88 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR3 ドメイン；
- (d) 配列番号 28、44、60、76 および 92 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR1 ドメイン；
- (e) 配列番号 30、46、62、78 および 94 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR2 ドメイン；および
- (f) 配列番号 32、48、64、80 および 96 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR3 ドメイン

を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する請求項 1、11 または 13 のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合断片であって、

- (a) 配列番号 20 および 36 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR1 ドメイン；
- (b) 配列番号 22 および 38 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR2 ドメイン；
- (c) 配列番号 24 および 40 から選択されるアミノ酸配列を有する HCDR3 ドメイン；
- (d) 配列番号 28 および 44 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR1 ドメイン；
- (e) 配列番号 30 および 46 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR2 ドメイン；および
- (f) 配列番号 32 および 48 から選択されるアミノ酸配列を有する LCDR3 ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 15】

Clostridium difficile によって産生される毒素 A のカルボキシ末端受容体結合ドメインのアミノ酸残基 468 ~ 863 内のエピトープと相互作用するか、もしくはこれに結合する請求項 2 に記載の単離された抗体、またはその抗原結合断片であって、毒素 A の前記カルボキシ末端受容体結合ドメインが、配列番号 375 のアミノ酸配列を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 16】

Clostridium difficile によって産生される毒素 A のカルボキシ末端受容体結合ドメイン内のエピトープと相互作用するか、もしくはこれに結合する請求項 2 に記載の単離された抗体、またはその抗原結合断片であって、前記エピトープが、配列番号 375 の残基 468 ~ 488、配列番号 375 の残基 510 ~ 530、配列番号 375 の残基 602 ~ 610、配列番号 375 の残基 644 ~ 703、配列番号 375 の残基 724 ~ 794、配列番号 375 の残基 799 ~ 814、および配列番号 375 の残基 858 ~ 863 からなる群より選択される、単離された抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の 1 つ以上の抗体と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 18】

Clostridium difficile の毒素 A に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片と、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片とを含む請求項 17 に記載の医薬組成物であって、

- a) 毒素 A に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、98、114、130、146 および 162 から選択される重鎖可変領域 (HCV R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (HCDR1、HCDR2 および HCDR3) と、配列番号 10、106、122、138、154 および 170 から選択される軽鎖可変領域 (LCV R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖相補性決定領域 (LCDR1、LCDR2 および LCDR3) とを含み；および
- b) 毒素 B に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338 および 354 から選択される HCV R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖 CDR (HCDR1、HCDR2 および HCDR3) と、配列番号 186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346 および 362 から選択される LCV R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖 CDR (L

40

50

C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含む、医薬組成物。

【請求項 19】

C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の毒素 A に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片が配列番号 146 / 154 の H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含み、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の毒素 B に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片が配列番号 274 / 282 の H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む、請求項 17 または 18 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 20】

a) C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の毒素 A に特異的に結合する単離された第 1 の抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 148 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 150 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 152 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、配列番号 156 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 158 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 160 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 とを含む単離された第 1 の抗体またはその抗原結合断片；

b) C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の毒素 B に特異的に結合する単離された第 2 の抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 276 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 278 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 280 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、配列番号 284 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 286 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 288 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 とを含む単離された第 2 の抗体またはその抗原結合断片；および

c) 薬学的に許容し得る担体または希釈剤

を含む、請求項 17 ~ 19 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記組成物内に含まれる前記抗体が、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の超毒性株由来の毒素 A および B を中和するのに有効である、請求項 17 ~ 20 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 22】

C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の前記超毒性株が B I / N A P 1 / 0 2 7 株である、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記 B I / N A P 1 / 0 2 7 株が、V A 5、V A 17、6336 および 6443 から選択される、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e に関連する症状もしくは疾患を患っている患者を処置するため、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも 1 つの症候もしくは合併症を処置するため、または C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e に関連する症状もしくは疾患の発症のリスクを有する患者における C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e に関連する症状もしくは疾患の発症を予防するための方法であって、有効量の請求項 17 ~ 23 のいずれかに記載の医薬組成物を前記患者に投与することを含み、前記 C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e に関連する症状もしくは疾患が予防されるかもしくは重症度および / もしくは持続期間の点で低減されるか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも 1 つの症候もしくは合併症が予防もしくは改善されるか、または C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e の頻度および / もしくは持続期間、またはその再発の重症度、または C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e による再燃が軽減される、方法。

【請求項 25】

前記 C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e に関連する症状または疾患に関連する少なくとも 1 つの症候または合併症が、食欲不振、腹痛、腹部膨満、出血有りまたは無しの下痢、脱水症、栄養失調、偽膜性大腸炎、完全なまたは部分的な結腸切除、発熱および全身感染症（敗血症）、死亡、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e 症状または

10

20

30

40

50

疾患の再燃、ならびに移植組織または器官の拒絶からなる群より選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

Clostridium difficileに関連する症状または疾患を発症するリスクを有する前記患者が、高齢患者（65歳以上）、基礎疾患によりまたは免疫抑制治療薬の投与により免疫無防備状態である患者、患者をClostridium difficile感染症に罹患しやすくし得るいくつかの基礎病状を有する患者、長期間（少なくとも1週間）の入院患者、広域抗生物質で長期間（14日間以上）処置されている患者、癌患者、移植患者、ならびに胃内酸度、胃食道逆流性疾患（GERD）、胃潰瘍および小腸潰瘍または胸やけを軽減または処置するための胃腸疾患または症状の処置に使用される薬剤、例えば限定されないが、プロトンポンプ阻害剤またはヒスタミンH2受容体阻害剤による治療中の患者からなる群より選択される、請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

Clostridium difficileに関連する症状もしくは疾患を患っている患者を処置するのに使用するため、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を処置するため、またはClostridium difficileに関連する症状もしくは疾患の発症のリスクを有する患者におけるClostridium difficileに関連する症状もしくは疾患の発症を予防するための請求項 1 7 ~ 2 3 のいずれかに記載の医薬組成物であって、前記Clostridium difficileに関連する症状もしくは疾患が予防されるかまたは重症度および/もしくは持続期間の点で低減されるか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症が予防もしくは改善されるか、またはClostridium difficileの頻度および/もしくは持続期間、またはその再発の重症度、またはClostridium difficileによる再燃が軽減される、医薬組成物。

20

【請求項 2 8】

Clostridium difficileに関連する症状もしくは疾患を患っている患者を処置するのに使用するため、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を処置するため、またはClostridium difficileに関連する症状もしくは疾患の発症のリスクを有する患者におけるClostridium difficileに関連する症状もしくは疾患の発症を予防するための薬品の製造における、請求項 1 7 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用であって、前記Clostridium difficileに関連する症状もしくは疾患が予防されるかまたは重症度および/もしくは持続期間の点で低減されるか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症が予防もしくは改善されるか、またはClostridium difficileの頻度および/もしくは持続期間、またはその再発の重症度、またはClostridium difficileによる再燃が軽減される、使用。

30

【請求項 2 9】

Clostridium difficileに関連する症状または疾患を発症するリスクを有する前記患者が、高齢患者、疾患によりまたは免疫抑制治療薬の投与により免疫無防備状態である患者、患者をClostridium difficile感染症に罹患しやすくし得るいくつかの基礎病状を有する患者、長期間の入院患者、広域抗生物質で長期間処置されている患者、胃腸疾患または症状を処置するためのプロトンポンプ阻害剤による治療中の患者、癌患者、ならびに移植患者から選択される、請求項 2 7 または 2 8 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 3 0】

前記癌患者が、抗癌薬による処置を受けているか、または癌を処置するための放射線療法を受けている、請求項 2 9 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 1】

前記移植患者が、造血幹細胞移植または固形組織もしくは器官移植を受けている患者であ

50

る、請求項 29 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 32】

前記移植患者が、免疫抑制薬もしくは任意の移植拒絶反応抑制薬で処置されているか、または移植後の組織もしくは器官移植片拒絶を予防するための投薬計画による処置を受けている者である、請求項 29 または 31 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 33】

前記医薬組成物が、第 2 の治療剤と組み合わせて前記患者に投与される、請求項 17 ~ 32 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 34】

前記第 2 の治療剤が、トキシイド、Clostridium difficile ワクチン、抗生物質、Clostridium difficile の毒素 A および / または B に対する別の異なる抗体、ならびに Clostridium difficile に関連する症状または疾患に関連する少なくとも 1 つの症候を改善するのに有用な任意の他の緩和療法から選択される、請求項 33 に記載の医薬組成物の使用。

10

【請求項 35】

前記 Clostridium difficile に関連する症状または疾患に関連する少なくとも 1 つの症候または合併症が、食欲不振、腹痛、腹部膨満、出血有りまたは無しの下痢、脱水症、栄養失調、偽膜性大腸炎、完全なまたは部分的な結腸切除、発熱および全身感染症（敗血症）、死亡、Clostridium difficile 症状または疾患の再燃、ならびに移植組織または器官の拒絶からなる群より選択される、請求項 34

20

【請求項 36】

前記請求項のいずれかに含まれる抗体をコードする、単離された核酸。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Clostridium difficile の毒素 A および / または毒素 B に特異的に結合するヒト抗体およびヒト抗体の抗原結合断片、これらの抗体を含む組成物、ならびにこれらの抗体の治療的使用方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

Clostridium difficile (C. difficile) はグラム陽性で嫌気性の孢子形成性細菌であり、軽度から重度に及ぶ下痢および大腸炎の症候をもたらすヒトにおける院内感染胃腸疾患の主要な原因である。アンピシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、フルオロキノロンおよびクリンダマイシンなどの広域抗生物質による処置により正常な腸内細菌叢が破壊され得ると、C. difficile が腸に定着することが可能になると考えられている (Kelly and Lamont, (1998), Ann. Rev. Med. 49: 375 - 90)。C. difficile 感染症の処置は、広域抗生物質の使用を停止または変更することを含む場合があり、例えば、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンなどの特定の抗クロストリジウム抗生物質による処置を開始することを必要とする。

40

【0003】

C. difficile 感染症を患っている患者で観察される下痢および炎症は、この細菌による 2 つの毒素（エンテロトキシン（毒素 A）および細胞毒素（毒素 B））の産生に起因すると考えられている。C. difficile の毒素 A および B は、GTPase の Rho ファミリーのメンバーを阻害する高分子量のグルコシルトランスフェラーゼで

50

ある。毒素 A は 308 kDa の分子量を有し、毒素 B は 270 kDa の分子量を有する。毒素 A および毒素 B は両方とも、トレオニン残基のグルコシル化によって、Rho、Rac および Cdc42 などの低分子量 GTPase を失活させる。これらの GTPase の阻害は、細胞骨格の脱重合、ある特定のストレス活性化タンパク質キナーゼの遺伝子転写、ホスファチジルイノシトールビスリン酸の合成低下、およびおそらくはさらに細胞極性の喪失につながるシグナル伝達カスケードの停止を引き起こす。細胞骨格構造の喪失は細胞円形化をもたらし、C. difficile に対する宿主反応の原因であり得る。細胞円形化アッセイでは、毒素 B は、毒素 A よりも少なくとも 1,000 倍細胞毒性である。

【0004】

C. difficile の毒素 A および B はアミノ酸含量が 63% 相同であり、類似の三次元構造を有する (Davies, AH, (2011), Biochem. J., 436: 517-526)。各毒素の C 末端側の 3 分の 1 は、クロストリジウム反復オリゴペプチド (CROP) と称される高抗原性配列から構成される。毒素 A および B の N 末端側の残り 3 分の 2 は、配列相同性に関しては互いにそれほど類似しない；しかしながら、各タンパク質のこの部分は、グルコシルトランスフェラーゼ活性を含有する。

【0005】

C. difficile による感染後の下痢および炎症の発症における毒素 A および / または毒素 B の役割は、動物モデルにおける観察結果から裏付けられている。例えば、毒素の経口投与は前記疾患を模倣する (Kelly and Lamont, (1998), Ann. Rev. Med. 49: 375-90)。毒素 A および B を欠く突然変異株は、病原性が減少または変化している (Lyra S D, O'Connor JR, Howarth PKら、Nature 458 (7242), 1176-1179 (2009) ; Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP, Nature 15, 467 (7316), 711-713 (2010))。さらに、毒素に対するポリクローナル抗体の投与は、前記疾患からハムスターを保護することが示されている (Gianascaら、(1999), Infect. Immun. 66 (2): 527-38)。臨床では、抗毒素 A または抗毒素 B 抗体の存在と、C. difficile に関連する下痢および疾患再発に対する保護との間には相関があるという研究が示されている (Warny, Mら、(1994), Inf. Immun. 62 (2): 384-389 ; Kyne, Lら、(2001), Lancet 357: 189-193 ; Leav, B. A., (2010), Vaccine 28 (4): 965-969)。抗毒素抗体の開発は、無症状保菌者を伴う (Kyne, Lら、(2000), NEJM 342 (6), 390-397)。さらに、メトロニダゾールまたはバンコマイシンと併せて C. difficile 抗毒素 A および抗毒素 B 抗体の組み合わせを使用した臨床試験では、C. difficile による再発性感染症の割合が減少した (Lowy, Iら、(2010), NEJM 362 (3): 197-205)。

【0006】

C. difficile の毒性 A に対するモノクローナル抗体が、Wilkinsらによって米国特許第 4,879,218 号明細書に記載されている。加えて、Rothmanらは、C. difficile の毒素 A および B と交差反応するマウスモノクローナル抗体について記載した。さらに、Coughlinらは、毒素 A と交差反応しなかった C. difficile の毒素 B に対して特異的なモノクローナル抗体について記載した。C. difficile の毒素に対する他の抗体が記載されている (例えば、US 7,151,159 ; US 7,625,559 ; US 8,236,311 ; US 8,257,709 ; US 公開番号 2009/0087478 ; US 2010/0233182 ; US 2010/0233181 ; US 2012/0288508 ; US 2012/012160 ; US 2011/0020356 ; US 2012/0121607 ; EP 1766093 B1 ; EP 1024826 B1 ; EP 1568378 A1 ; EP 2305303 A2 ; EP 2305293 A2 ; EP 2405940 A1 ; EP 2261253 A2 ; WO 200

10

20

30

40

50

6 / 1 2 1 4 2 2 ; W O 2 0 1 1 / 1 3 0 6 5 0 ; W O 2 0 1 0 / 0 9 4 9 7 0 ; W O 2 0 0 9 / 1 0 8 6 5 2 ; W O 2 0 1 1 / 0 6 3 3 4 6 および W O 2 0 0 5 / 0 5 8 3 5 3 を参照のこと)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】K e l l y and L a m o n t , (1 9 9 8) , A n n . R e v . M e d . 4 9 : 3 7 5 - 9 0

【非特許文献2】D a v i e s , A H , (2 0 1 1) , B i o c h e m . J . , 4 3 6 : 5 1 7 - 5 2 6

【非特許文献3】L y r a s D , O ' C o n n o r J R , H o w a r t h P K ら、N a t u r e 4 5 8 (7 2 4 2) , 1 1 7 6 - 1 1 7 9 (2 0 0 9)

【非特許文献4】K u e h n e S A , C a r t m a n S T , H e a p J T , K e l l y M L , C o c k a y n e A , M i n t o n N P , N a t u r e 1 5 , 4 6 7 (7 3 1 6) , 7 1 1 - 7 1 3 (2 0 1 0)

【非特許文献5】G i a n a s c a ら、(1 9 9 9) , I n f e c t . I m m u n . 6 6 (2) : 5 2 7 - 3 8

【非特許文献6】W a r n y , M ら、(1 9 9 4) , I n f . I m m u n . 6 2 (2) : 3 8 4 - 3 8 9

【非特許文献7】K y n e , L ら、(2 0 0 1) , L a n c e t 3 5 7 : 1 8 9 - 1 9 3

【非特許文献8】L e a v , B . A . , (2 0 1 0) , V a c c i n e 2 8 (4) : 9 6 5 - 9 6 9

【非特許文献9】K y n e , L ら、(2 0 0 0) , N E J M 3 4 2 (6) , 3 9 0 - 3 9 7

【非特許文献10】L o w y , I ら、(2 0 1 0) , N E J M 3 6 2 (3) : 1 9 7 - 2 0 5

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の簡単な概要

本発明は、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e (C . d i f f i c i l e) によって産生される毒素Aまたは毒素Bのいずれかに特異的に結合するか、またはC . d i f f i c i l e の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する(すなわち、毒素Aおよび毒素Bの両方と交差反応するヒトモノクローナル抗体)完全ヒトモノクローナル抗体(mAb)およびその抗原結合断片を提供する。このような抗体は、毒素Aもしくは毒素Bのいずれかまたは両方に関連する毒性を中和するのに有用であり得、そのようなものとして、C . d i f f i c i l e に関連する原発性症状もしくは疾患の重症度を低減するか、または疾患再発の回数、持続期間もしくは重症度を軽減するか、またはC . d i f f i c i l e に関連する症状(condition)もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候を改善するように作用し得る。このような抗体は単独で、またはC . d i f f i c i l e に関連する症状または疾患を処置するのに有用な第2の薬剤と併せて使用され得る。ある特定の実施形態では、毒素A、毒素Bまたはその両方に対して特異的な抗体は、C . d i f f i c i l e に関連する原発性症状もしくは疾患の重症度を低減するため、または疾患再発の回数、持続期間もしくは重症度を軽減するため、またはC . d i f f i c i l e に関連する症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候を改善するための第2の薬剤と併せて治療的に投与され得る。ある特定の実施形態では、抗体は、C . d i f f i c i l e に関連する症状または疾患を発症するリスクを有する患者を保護するための単独の治療法として予防的に使用され得る。例えば、高齢患者、または患者をC . d i f f i c i l e 感染症にかかりやすくし得る慢性および/もしくは随伴性基礎病状を有する患者を含むある特定

10

20

30

40

50

の患者集団は、*C. difficile* 症状または疾患を発症するリスクを有し得る。他の有リスク患者集団には、長期間の入院患者、および広域抗生物質（正常な腸内細菌叢を破壊し、患者を *C. difficile* による感染症にかかりやすくし得るもの）を服用している患者が含まれる。より最近のデータは、プロトンポンプ阻害剤（PPI）を服用している患者が、*C. difficile* に関連する下痢を発症するリスクを有することを示唆している（Yearsley, Kら、(2006), *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(4): 613 - 619; Lowe, DOら、*Clin. Infect. Dis.* (2006), 43(10): 1272 - 1276)。*C. difficile* 感染症を発症するリスクを有する他の患者集団には、任意の種類の免疫抑制療法、例えば限定されないが、抗癌薬、ある特定の癌を処置するための一般的な放射線療法、または移植後の組織もしくは器官移植片拒絶を予防するための薬物もしくは投薬計画を受けている患者が含まれる。長期の入院、広域抗生物質の服用、および化学療法に係る腸溶性粘膜関門の破壊により、造血幹細胞移植（HSCT）を受ける患者は、*C. difficile* 感染症を発症するリスクが特に高い場合がある（Thibault, Aら、((1991), *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12: 345 - 8; Anand, Aら、(1993), *Clin. Infect. Dis.* 17: 109 - 13)。固形器官移植を受ける患者もまた、*C. difficile* 感染症を発症するリスクを有し得る。自己免疫性疾患を患っている患者、または透析中の患者は、有リスク集団に含まれる。より最近の研究では、自己または同種HSCTのいずれかを受けた患者は、*C. difficile* 感染症を発症するリスクがより大きかっただけでなく、これらの患者は、移植片対宿主病における消化管病変（GI-GVHD）を発症するリスクもより高かったことが実証された（Alonso, C. Dら、(2012), *Clin. Inf. Dis.* 54: 1053 - 1063)。本研究では、*C. difficile* 感染症は、HSCT後によく見られる早期合併症であったことが明確に実証されたが、*C. difficile* 感染症（CDI）と、GI管を障害するGVHDとの間の正確な関係性または相互作用をより詳細に調査する必要がある。単独で、またはメトロニダゾール、バンコマイシンもしくはフィダキソマイシンなどの第2の薬剤と併せて投与する場合、これらの患者集団のいずれかは、本発明の抗体による処置から恩恵を受けることができる。

【0009】

本発明の抗体は、全長（例えば、IgG1またはIgG4抗体）でもよいし、または抗原結合部分（例えば、Fab、F(ab')₂またはscFv断片）のみを含んでもよい、機能性に影響を与える（例えば、残ったエフェクター機能を排除する）ように改変してもよい（Reddyら、(2000), *J. Immunol.* 164: 1925 - 1933）。

【0010】

したがって、第1の態様では、本発明は、毒素Aもしくは毒素Bのいずれかに結合するか、または*Clostridium difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合するもしくはこれらの両方と交差反応する単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

a) *Clostridium difficile*の毒素Aに特異的に結合する前記単離された抗体またはその抗原結合断片が、配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択される重鎖可変領域（HCVR）アミノ酸配列内に含まれる3つの重鎖相補性決定領域（HCDR1、HCDR2およびHCDR3）と、配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択される軽鎖可変領域（LCVR）アミノ酸配列内に含まれる3つの軽鎖相補性決定領域（LCDR1、LCDR2およびLCDR3）とを含み；

b) *Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する前記単離された抗体またはその抗原結合断片が、配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択

される H C V R アミノ酸配列内に含まれる H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 と、配列番号 1 8 6、2 0 2、2 1 8、2 3 4、2 5 0、2 6 6、2 8 2、2 9 8、3 1 4、3 3 0、3 4 6 および 3 6 2 からなる群より選択される L C V R アミノ酸配列内に含まれる L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 とを含み；および

c) *Clostridium difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合するか、またはこれらの両方と交差反応する前記単離された抗体または抗原結合断片が、配列番号 1 8、3 4、5 0、6 6 および 8 2 からなる群より選択される H C V R アミノ酸配列内に含まれる H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 と、配列番号 2 6、4 2、5 8、7 4 および 9 0 からなる群より選択される L C V R アミノ酸配列内に含まれる L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 とを含む、単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

【0011】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応するヒトモノクローナル抗体は、*C. difficile* の毒素 A (C B D - A : 配列番号 3 7 5) および毒素 B (C B D - B : 配列番号 3 7 6) の両方のカルボシキ末端受容体結合ドメイン (C B D) に特異的に結合する。

【0012】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、 10^{-7} M 以下の K_D で毒素 A および毒素 B に結合する。

20

【0013】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 8、3 4、5 0、6 6 および 8 2 からなる群より選択される重鎖可変領域 (H C V R) 配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖 C D R (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) と、配列番号 2 6、4 2、5 8、7 4 および 9 0 からなる群より選択される軽鎖可変領域 (L C V R) 配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖 C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含む。H C V R および L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するための方法および技術は当技術分野で周知であり、本明細書で開示される特定の H C V R および / または L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するのに使用され得る。C D R の境界を同定するのに使用され得る例示的な慣例には、例えば、K a b a t の定義、C h o t h i a の定義および A b M の定義が含まれる。一般的には、K a b a t の定義は配列可変性に基づくものであり、C h o t h i a の定義は構造ループ領域の位置に基づくものであり、A b M の定義は K a b a t のアプローチと C h o t h i a のアプローチとの間の折衷案である。例えば、K a b a t, " Sequences of Proteins of Immunological Interest, " National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ; A l - L a z i k a n i ら、(1997), J. Mol. Biol. 273: 927 - 948 ; および M a r t i n ら、(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268 - 9272 を参照のこと。抗体内の C D R 配列を同定するために、公的なデータベースも利用可能である。

30

40

【0014】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 8、3 4、5 0、6 6 および 8 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C V R を含む。

【0015】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 6、4 2、5 8、7 4 および 9 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C V R

50

を含む。

【0016】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、(a)配列番号18、34、50、66および82からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCVRと、(b)配列番号26、42、58、74および90からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRとを含む。

【0017】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

(a)配列番号20、36、52、68および84からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHC DR1ドメイン；

(b)配列番号22、38、54、70および86からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHC DR2ドメイン；

(c)配列番号24、40、56、72および88からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHC DR3ドメイン；

(d)配列番号28、44、60、76および92からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLC DR1ドメイン；

(f)配列番号30、46、62、78および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLC DR2ドメイン；および

(g)配列番号32、48、64、80および96からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLC DR3ドメイン

を含む。

【0018】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応するヒト抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号20、22および24のHC DR1、HC DR2およびHC DR3アミノ酸配列と、それぞれ配列番号28、30および32のLC DR1、LC DR2およびLC DR3アミノ酸配列とを含む。

【0019】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応するヒト抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号36、38および40のHC DR1、HC DR2およびHC DR3アミノ酸配列と、それぞれ配列番号44、46および48のLC DR1、LC DR2およびLC DR3アミノ酸配列とを含む。

【0020】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号18／26、34／42、50／58、66／74および82／90からなる群より選択されるHCVR／LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

【0021】

一実施形態では、*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号18／26および34／42のHCVR／LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

【0022】

一実施形態では、毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する／これらの両方と交差反応する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

*Clostridium difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方のカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号18／26および34／42からなる群より選択されるHCVR／LCVRアミノ酸配列ペア

10

20

30

40

50

を含み；または

Clostridium difficile の毒素 A および毒素 B の両方のカルボシキ末端受容体結合ドメイン外のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号 50 / 58、66 / 74 および 82 / 90 からなる群より選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む。

【0023】

一実施形態では、本発明は、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の 1 つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i) 配列番号 18、34、50、66 および 82 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C V R を含む；(ii) 配列番号 26、42、58、74 および 90 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C V R を含む；(iii) 配列番号 24、40、56、72 および 88 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 3 ドメインと、配列番号 32、48、64、80 および 96 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 3 ドメインとを含む；(iv) 配列番号 20、36、52、68 および 84 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 1 ドメインと、配列番号 22、38、54、70 および 86 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 2 ドメインと、配列番号 28、44、60、76 および 92 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 1 ドメインと、配列番号 30、46、62、78 および 94 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 2 ドメインとを含む；(v) 10^{-9} M 以下の K_D で毒素 A および毒素 B に結合する。

【0024】

一実施形態では、*C. difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (配列番号 381) (式中、 X^1 は Gly であり、 X^2 は Phe、Val または Ile であり、 X^3 は Thr、Ala または Ser であり、 X^4 は Phe または Leu であり、 X^5 は Ser、Arg または Asn であり、 X^6 は Gly、Thr、Asp または Ser であり、 X^7 は His または Tyr であり、 X^8 は Gly または Glu である) を含む H C D R 1 配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (配列番号 382) (式中、 X^1 は Ile であり、 X^2 は Leu、Ser または Asp であり、 X^3 は Tyr、Phe または Ser であり、 X^4 は Asp または Ser であり、 X^5 は Gly であり、 X^6 は Ser、Gly、Asp または Thr であり、 X^7 は Ser、His または Ile であり、 X^8 は Glu、Gln または Ile である) を含む H C D R 2 配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17}$ (配列番号 383) (式中、 X^1 は Ala または Val であり、 X^2 は Lys または Arg であり、 X^3 は Gly または Glu であり、 X^4 は Ser または Arg であり、 X^5 は Ile

、A s pまたはT y rであり、X⁶はL e u、S e rまたはA s pであり、X⁷はA s n、S e r、G l nまたはH i sであり、X⁸はA r g、T y rまたはS e rであり、X⁹はP r oまたはG l yであり、X¹⁰はP h eまたはT y rであり、X¹¹はA s p、G l yまたはT y rであり、X¹²はT y rであり、X¹³はP h e、L e uであるかまたは存在せず、X¹⁴はG l yであるかまたは存在せず、X¹⁵はM e tであるかまたは存在せず、X¹⁶はA s pであるかまたは存在せず、X¹⁷はV a lであるかまたは存在しない)を含むH C D R 3配列と、式X¹ - X² - X³ - X⁴ - X⁵ - X⁶ - X⁷ - X⁸ - X⁹ - X¹⁰ - X¹¹ - X¹² (配列番号384) (式中、X¹はG l nであり、X²はS e rまたはG l uであり、X³はI l e、V a lまたはT h rであり、X⁴はL e uまたはA s pであり、X⁵はP h e、L y sまたはA s nであり、X⁶はS e rまたはT r pであり、X⁷はS e rであるかまたは存在せず、X⁸はA s n、A s pであるかまたは存在せず、X⁹はA s nであるかまたは存在せず、X¹⁰はL y sであるかまたは存在せず、X¹¹はI l e、A s nであるかまたは存在せず、X¹²はT y rであるかまたは存在しない)を含むL C D R 1配列と、式X¹ - X² - X³ (配列番号385) (式中、X¹はT r p、L y sまたはA r gであり、X²はA l aまたはT h rであり、X³はS e rである)を含むL C D R 2配列と、式X¹ - X² - X³ - X⁴ - X⁵ - X⁶ - X⁷ - X⁸ - X⁹ (配列番号386) (式中、X¹はG l nまたはH i sであり、X²はG l nまたはG l uであり、X³はT y rであり、X⁴はT y rまたはA s nであり、X⁵はT h rまたはS e rであり、X⁶はL e u、A l aまたはT y rであり、X⁷はP r o、P h eまたはS e rであり、X⁸はL e u、P h eまたはA r gであり、X⁹はT h rまたはA l aである)を含むL C D R 3配列とを含む。

【0025】

一実施形態では、本発明は、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l eの毒素Aに特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるH C V Rアミノ酸配列のいずれか1つの中に含まれる3つの重鎖C D R (H C D R 1、H C D R 2およびH C D R 3)と、配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるL C V Rアミノ酸配列のいずれか1つの中に含まれる3つの軽鎖C D R (L C D R 1、L C D R 2およびL C D R 3)とを含む単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0026】

一実施形態では、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l eの毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するH C V Rを含む。

【0027】

一実施形態では、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l eの毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するL C V Rを含む。

【0028】

一実施形態では、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l eの毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、(a)配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するH C V Rと、(b)配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するL C V Rとを含む。

【0029】

一実施形態では、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l eの毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

(a)配列番号4、100、116、132、148および164から選択なる群よりさ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列を有するHCDR1ドメイン；

(b) 配列番号6、102、118、134、150および166から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するHCDR2ドメイン；

(c) 配列番号8、104、120、136、152および168から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するHCDR3ドメイン；

(d) 配列番号12、108、124、140、156および172から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するLCDR1ドメイン；

(e) 配列番号14、110、126、142、158および174から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するLCDR2ドメイン；および

(f) 配列番号16、112、128、144、160および176から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するLCDR3ドメインを含む。

10

【0030】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号148、150および152のHCDR1、HCDR2およびHCDR3アミノ酸配列と、それぞれ配列番号156、158および160のLCDR1、LCDR2およびLCDR3アミノ酸配列とを含む。

【0031】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号2/10、98/106、114/122、130/138、146/154および162/170からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

20

【0032】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号146/154のHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

【0033】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Aに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

30

*Clostridium difficile*の毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号2/10、98/106、130/138、146/154および162/170からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含み；または

*Clostridium difficile*の毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン外のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号114/122のHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

【0034】

一実施形態では、本発明は、*C. difficile*の毒素Aに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の1つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i) 配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCVRを含む；(ii) 配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCVRを含む；(iii) 配列番号8、104、120、136、152および168からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR3ド

40

50

メインと、配列番号 16、112、128、144、160 および 176 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 3 ドメインとを含む；(i v) 配列番号 4、100、116、132、148 および 164 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 1 ドメインと、配列番号 6、102、118、134、150 および 166 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C D R 2 ドメインと、配列番号 12、108、124、140、156 および 172 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 1 ドメインと、配列番号 14、110、126、142、158 および 174 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C D R 2 ドメインとを含む；(v) 10^{-9} M 以下の K_D を示す；(v i) 細胞生存率アッセイにおいて、約 7 p M ~ 約 65 p M の範囲の I C 50 で (32 p M の濃度で) 毒素 A の中和を示す。

【 0035 】

一実施形態では、C . d i f f i c i l e の毒素 A に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (配列番号 387) (式中、 X^1 は G l y または A r g であり、 X^2 は P h e であり、 X^3 は A s n または T h r であり、 X^4 は P h e であり、 X^5 は G l y、S e r、A s n または T h r であり、 X^6 は T h r、S e r、A s n または A s p であり、 X^7 は H i s、T y r または P h e であり、 X^8 は A s p、V a l、A l a または T y r である) を含む H C D R 1 配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (配列番号 388) (式中、 X^1 は L e u または I l e であり、 X^2 は T h r、G l y、S e r または T r p であり、 X^3 は S e r、T h r、G l y または P h e であり、 X^4 は T h r、V a l、T y r、V a l、A s p または G l y であり、 X^5 は G l y であり、 X^6 は G l y、A s p、S e r または A l a であり、 X^7 は S e r、T h r、A s n または A l a であり、 X^8 は A l a、T h r、G l u、L y s であるかまたは存在しない) を含む H C D R 2 配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19} - X^{20} - X^{21} - X^{22} - X^{23} - X^{24}$ (配列番号 389) (式中、 X^1 は A l a であり、 X^2 は L y s または A r g であり、 X^3 は T h r、A s p または S e r であり、 X^4 は P h e、A r g、H i s、A l a または L e u であり、 X^5 は A s n、G l y または L y s であり、 X^6 は T r p、G l y、A s p または I l e であり、 X^7 は A s n、A l a または P h e であり、 X^8 は S e r、A s n、T y r、G l y または A s p であり、 X^9 は T y r、I l e、A l a、T h r、G l u または L e u であり、 X^{10} は P h e、T y r、S e r、G l y であるかまたは存在せず、 X^{11} は A s p、S e r、G l y であるかまたは存在せず、 X^{12} は T y r、P h e、S e r、P r o であるかまたは存在せず、 X^{13} は T y r、L e u であるかまたは存在せず、 X^{14} は T y r、P h e であるかまたは存在せず、 X^{15} は G l y、A s n、A s p であるかまたは存在せず、 X^{16} は M e t、A r g、T y r であるかまたは存在せず、 X^{17} は A s p であるかまたは存在せず、 X^{18} は T y r、V a l であるかまたは存在せず、 X^{19} は T y r であるかまたは存在せず、 X^{20} は T y r であるかまたは存在せず、 X^{21} は G l y であるかまたは存在せず、 X^{22} は M e t であるかまたは存在せず、 X^{23} は A s p であるかまたは存在せず、 X^{24} は V a l であるかまたは存在しない) を含む H C D R 3 配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7$ (配列番号 390) (式中、 X^1 は G l n であり、 X^2 は S e r、A s p または T h r であり、 X^3 は I l e または V a l であり、 X^4 は S e r であり、 X^5 は T h r、A

snまたはSerであり、X⁶はTyr、Trp、PheまたはSerであり、X⁷はTyrであるかまたは存在しない)を含むLCDR1配列と、式X¹-X²-X³(配列番号391)(式中、X¹はGly、Ala、LysまたはThrであり、X²はAla、ThrまたはValであり、X³はSerである)を含むLCDR2配列と、式X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹-X¹⁰(配列番号392)(式中、X¹はGlnであるかまたは存在せず、X²はGln、Lysであるかまたは存在せず、X³はTyr、Asnであるかまたは存在せず、X⁴はGly、Asn、Thr、Tyr、Hisであるかまたは存在せず、X⁵はAsn、Serであるかまたは存在せず、X⁶はSer、Ala、Tyr、Asp、Trpであるかまたは存在せず、X⁷はLeu、Pro、Serであるかまたは存在せず、X⁸はTyr、Phe、Arg、Proであるかまたは存在せず、X⁹はThr、Tyrであるかまたは存在せず、X¹⁰はThrである)を含むLCDR3配列とを含む。

【0036】

一実施形態では、本発明は、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるHCVRアミノ酸配列のいずれか1つの中に含まれる3つの重鎖CDR(HCDR1、HCDR2およびHCDR3)と、配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるLCVRアミノ酸配列のいずれか1つの中に含まれる3つの軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2およびLCDR3)とを含む単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0037】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む。

【0038】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。

【0039】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、(a)配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCVRと、(b)配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRとを含む。

【0040】

一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

(a)配列番号180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340および356から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するHCDR1ドメイン；

(b)配列番号182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342および358から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するHCDR2ドメイン；

(c)配列番号184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344および360から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有するHC

10

20

30

40

50

D R 3 ドメイン；

(d) 配列番号 188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348 および 364 から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有する L C D R 1 ドメイン；

(e) 配列番号 190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350 および 366 から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有する L C D R 2 ドメイン；および

(f) 配列番号 192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352 および 368 から選択なる群よりされるアミノ酸配列を有する L C D R 3 ドメイン

10

を含む。

【0041】

一実施形態では、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 276、278 および 280 の H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 アミノ酸配列と、それぞれ配列番号 284、286 および 288 の L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 アミノ酸配列とを含む。

【0042】

一実施形態では、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 266、274 / 282、290 / 298、306 / 314、322 / 330、338 / 346 および 354 / 362 からなる群より選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む。

20

【0043】

一実施形態では、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 274 / 282 の H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む。

【0044】

一実施形態では、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合断片は、

30

Clostridium difficile の毒素 B のカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号 178 / 186 の H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含み；または

Clostridium difficile の毒素 B のカルボシキ末端受容体結合ドメイン外のエピトープに結合し、この場合、前記抗体は、配列番号 194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 266、274 / 282 および 290 / 298 からなる群より選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む。

【0045】

一実施形態では、本発明は、*C. difficile* の毒素 B に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の 1 つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i) 配列番号 178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338 および 354 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する H C V R を含む；(ii) 配列番号 186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346 および 362 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する L C V R を含む；(iii) 配列番号 184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344 および 360 からなる群より選択されるア

40

50

ミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR3ドメインと、配列番号192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352および368からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR3ドメインとを含む；(iv)配列番号180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340および356からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR1ドメインと、配列番号182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342および358からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR2ドメインと、配列番号188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348および364からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR1ドメインと、配列番号190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350および366からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR2ドメインとを含む；(v) 10^{-9} M以下の K_D を示す；(vi)細胞生存率アッセイにおいて、約25 pM～約320 pMの範囲のIC50で(0.03 pMの濃度で)毒素Bの中和を示す。

【0046】

一実施形態では、C. difficileの毒素Bに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10}$ (配列番号393)(式中、 X^1 はGlyであり、 X^2 はPhe、AspまたはTyrであり、 X^3 はThr、Asn、SerまたはValであり、 X^4 はPheまたはValであり、 X^5 はSer、Arg、Lys、GluまたはThrであり、 X^6 はSer、Ile、AspまたはArgであり、 X^7 はPhe、TyrまたはAsnであり、 X^8 はGly、Ala、SerまたはTyrであり； X^9 はAlaであるかまたは存在せず、 X^{10} はAlaであるかまたは存在しない)を含むHCDR1配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (配列番号394)(式中、 X^1 はIleまたはThrであり、 X^2 はSer、Gly、TyrまたはAsnであり、 X^3 はThr、Gly、Tyr、Trp、ProまたはSerであり、 X^4 はAsp、Ser、Asn、Arg、LysまたはAspであり、 X^5 はGly、SerまたはThrであり、 X^6 はSer、Asp、Gly、LysまたはAsnであり、 X^7 はLys、Arg、Asn、Ser、TrpまたはGlyであり、 X^8 はLys、Thr、IleまたはTyrであり、 X^9 はHisであるかまたは存在しない)を含むHCDR2配列と、式 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16}$ (配列番号395)(式中、 X^1 はAlaまたはValであり、 X^2 はArg、Lys、ThrまたはSerであり、 X^3 はVal、Gly、Asp、ArgまたはTyrであり、 X^4 はGly、Trp、Arg、LysまたはAsnであり、 X^5 はGlu、Tyr、Arg、SerまたはTrpであり、 X^6 はLeu、Tyr、Ser、ProまたはAsnであり、 X^7 はLeu、Asp、Tyr、SerまたはAspであり、 X^8 はAsn、Ser、Phe、Lys、Arg、AspまたはGlyであり、 X^9 はTyr、Gly、Phe、Asp、TrpまたはValであり、 X^{10} はSer、Tyr、Asn、Aspであるかまたは存在せず、 X^{11} はTyr、Leu、Val、Glyであるかまたは存在せず、 X^{12} はTyr、Leu、Phe、Valであるかまたは存在せず、 X^{13} はAsn、Gly、Asp、Pheであるかまたは存在せず、 X^{14}

⁴はTyr、Met、Aspであるかまたは存在せず、X¹⁵はAsp、Tyrであるかまたは存在せず、X¹⁶はValであるかまたは存在しない)を含むHCDR3配列と、式X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷(配列番号396)(式中、X¹はGln、LeuまたはArgであり、X²はGly、AspまたはSerであり、X³はIleまたはValであり、X⁴はArg、Ser、GlyまたはTyrであり、X⁵はSerまたはAsnであり、X⁶はTrp、His、Asn、Phe、SerまたはAspであり、X⁷はTyrであるかまたは存在しない)を含むLCDR1配列と、式X¹-X²-X³(配列番号397)(式中、X¹はAla、Ser、AspまたはGlyであり、X²はAlaまたはThrであり、X³はSerである)を含むLCDR2配列と、式X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹(配列番号398)(式中、X¹はGln、HisまたはLeuであり、X²はGlnであり、X³はAla、Tyr、Arg、Asp、HisまたはValであり、X⁴はTyr、Gly、Asn、Ser、IleまたはLysであり、X⁵はSer、Leu、Pro、Ile、Asn、ThrまたはGlyであり、X⁶はPhe、Tyr、TrpまたはSerであり、X⁷はProであり、X⁸はLeu、Pro、Phe、ValまたはTyrであり、X⁹はThrである)を含むLCDR3配列とを含む。

【0047】

一実施形態では、本発明は、C.difficileの毒素Aおよび/または毒素Bに対する特異的結合について、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(HCVR)の相補性決定領域(CDR)と、配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)のCDRとを含む抗体または抗原結合断片と競合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0048】

関連実施形態では、本発明は、C.difficileの毒素Aおよび/または毒素Bに対する特異的結合について、配列番号18/26、34/42、146/154および274/282からなる群より選択される重鎖および軽鎖配列ペア内に含まれる重鎖および軽鎖CDRを含む抗体または抗原結合断片と競合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0049】

一実施形態では、本発明は、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(HCVR)のCDRと、配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)のCDRとを含む抗体または抗原結合断片と同じC.difficileの毒素Aおよび/または毒素B上のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0050】

関連実施形態では、本発明は、配列番号18/26、34/42、146/154、274/282からなる群より選択される重鎖および軽鎖配列ペア内に含まれる重鎖および軽鎖CDRを含む抗体または抗原結合断片と同じC.difficileの毒素Aおよび/または毒素B上のエピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明のある特定の実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile* によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン（この配列は、配列番号375に示されている）のアミノ酸残基468～863と相互作用し得るか、またはこれに結合し得る。この領域は、配列番号378（全長毒素A）の残基2315～2710の範囲のアミノ酸残基に対応する。本発明のある特定の実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile* によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468～488、配列番号375の残基510～530、配列番号375の残基602～610、配列番号375の残基644～703、配列番号375の残基724～794、配列番号375の残基799～814、および配列番号375の残基858～863からなる群より選択されるエピトープと相互作用し得るか、またはこれらに結合し得る。これらの残基は、配列番号378を有する全長毒素A配列内に見られるアミノ酸配列に対応し、これらの特定の領域は、配列番号378の残基2315～2335、配列番号378の残基2357～2377、配列番号378の残基2449～2457、配列番号378の残基2491～2550、配列番号378の残基2571～2641、配列番号378の残基2646～2661、および配列番号378の残基2705～2710として特定される。一実施形態では、*Clostridium difficile* によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468～488、配列番号375の残基510～530、配列番号375の残基602～610、配列番号375の残基644～703、配列番号375の残基724～794、配列番号375の残基799～814、および配列番号375の残基858～863からなる群より選択されるエピトープに結合するか、またはこれらと相互作用する抗体は、配列番号146 / 154のHCVR / LCVRアミノ酸配列ペアを含む。一実施形態では、*Clostridium difficile* によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468～488、配列番号375の残基510～530、配列番号375の残基602～610、配列番号375の残基644～703、配列番号375の残基724～794、配列番号375の残基799～814、および配列番号375の残基858～863からなる群より選択されるエピトープに結合するか、またはこれらと相互作用する抗体は、*Clostridium difficile* の毒素Bに特異的に結合する第2の抗体と医薬組成物中で組み合わせられる。一実施形態では、*Clostridium difficile* の毒素Bと相互作用するか、またはこれに結合するこの第2の抗体は、配列番号274 / 282のHCVR / LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

【0052】

第2の態様では、本発明は、抗毒素Aおよび / または抗毒素B抗体またはそれらの断片をコードする核酸分子を提供する。抗体の産生を可能とする条件下で宿主細胞を培養し、産生された抗体を回収することによって抗体を生産する方法と同様、本発明の核酸を保有する組換え発現ベクター、およびこのようなベクターが導入された宿主細胞もまた、本発明に包含される。

【0053】

一実施形態では、本発明は、配列番号1、17、33、49、65、81、97、113、129、145、161、177、193、209、225、241、257、273、289、305、321、337および353からなる群より選択される核酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の相同性を有するその実質的に同一の配列によってコードされるHCVRを含む抗体またはその断片を提供する。

【0054】

一実施形態では、HCVRは、配列番号17、33、145および273からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。

【0055】

一実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号 9、25、41、57、73、89、105、121、137、153、169、185、201、217、233、249、265、281、297、313、329、345 および 361 からなる群より選択される核酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の相同性を有するその実質的に同一の配列によってコードされる L C V R をさらに含む。

【0056】

一実施形態では、L C V R は、配列番号 25、41、153 および 281 からなる群より選択される核酸配列によってコードされる。

【0057】

一実施形態では、本発明はまた、配列番号 7、23、39、55、71、87、103、119、135、151、167、183、199、215、231、247、263、279、295、311、327、343 および 359 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 3 ドメインと、配列番号 15、31、47、63、79、95、111、127、143、159、175、191、207、223、239、255、271、287、303、319、335、351 および 367 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる L C D R 3 ドメインとを含む抗体または抗体の抗原結合断片を提供する。

【0058】

一実施形態では、本発明は、配列番号 3、19、35、51、67、83、99、115、131、147、163、179、195、211、227、243、259、275、291、307、323、339 および 355 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 1 ドメインと、配列番号 5、21、37、53、69、85、101、117、133、149、165、181、197、213、229、245、261、277、293、309、325、341 および 357 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる H C D R 2 ドメインと、配列番号 11、27、43、59、75、91、107、123、139、155、171、187、203、219、235、251、267、283、299、315、331、347 および 363 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる L C D R 1 ドメインと、配列番号 13、29、45、61、77、93、109、125、141、157、173、189、205、221、237、253、269、285、301、317、333、349 および 365 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列によってコードされる L C D R 2 ドメインとをさらに含む抗体またはその断片を提供する。

【0059】

第3の態様では、本発明は、C . d i f f i c i l e の毒素 A および / または毒素 B に対して特異的なヒト抗体または抗原結合断片であって、生殖細胞系列の V_H 配列、D_H 配列、および J_H 配列由来のヌクレオチド配列セグメントによってコードされる H C V R と、生殖細胞系列の V_K 配列および J_K 配列由来のヌクレオチド配列セグメントによってコードされる L C V R とを、表 2 に示されている組み合わせで含むヒト抗体または抗原結合断片を特徴とする。

10

20

30

40

50

【0060】

本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗体を包含する。一部の適用では、望ましくないグリコシル化部位を除去する修飾、または例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）機能を増大させるフコース部分の除去が有用であり得る（Shieldら、（2002）JBC 277:26733を参照のこと）。他の適用では、補体依存性細胞傷害作用（CDC）を修飾するために、ガラクトシル化の修飾を施すことができる。

【0061】

第4の態様では、本発明は、C. difficileの毒素Aまたは毒素Bのいずれかに結合するか、またはC. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する少なくとも1つの単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、C. difficileの毒素Aのみに特異的に結合する単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、C. difficileの毒素Bのみに特異的に結合する単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、2つの完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、1つが毒素Aに特異的に結合し、1つがC. difficileの毒素Bに特異的に結合する2つの完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、1つの二重結合完全ヒトモノクローナル抗体（毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する抗体）と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、2つの二重結合完全ヒトモノクローナル抗体（毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する抗体）と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物に使用される二重抗体は、毒素Aもしくは毒素B上の同じエピトープを認識してもよいし、および/もしくはこれに結合してもよいし、または、毒素Aもしくは毒素B上の異なるエピトープを認識してもよいし、および/もしくはこれに結合してもよい。このような治療を必要とする患者集団において所望の結果を達成するために、本明細書に記載される抗体の任意の組み合わせを医薬組成物に使用してもよいことを理解すべきである。例えば、毒素Aのみを認識し、および/またはこれに結合する2つの抗体を組成物に使用してもよい。あるいは、毒素Bのみを認識し、および/またはこれに結合する2つの抗体を組成物に使用してもよい。一実施形態では、毒素Aまたは毒素Bのみを認識する/これに結合する1つの抗体を、組成物中で二重結合抗体と組み合わせてもよい。一実施形態では、毒素Aのみを認識する/これに結合する1つの抗体を、毒素Bのみを認識する/これに結合する1つの抗体と組み合わせてもよいし、この組み合わせを組成物に使用してもよい。

【0062】

一実施形態では、医薬組成物は、C. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方のカルボシキ末端受容体結合ドメインに結合する完全ヒトモノクローナル抗体であって、本明細書に記載される特徴のいずれか1つ以上を有する完全ヒトモノクローナル抗体を含む。C. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方のカルボシキ末端受容体結合ドメインに結合する抗体は、 10^{-7} M以下の K_D で、毒素Aおよび毒素Bに結合する。

【0063】

一実施形態では、組成物は、C. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する抗体であって、配列番号18/26、34/42、50/58、66/74および82/90からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを有する抗体を含む。

【0064】

一実施形態では、組成物は、C. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方に結合する抗体であって、配列番号18/26および34/42からなる群より選択されるH

C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを有する抗体を含む。

【0065】

一実施形態では、医薬組成物は、

a) *Clostridium difficile* の毒素 A に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 2、98、114、130、146 および 162 からなる群より選択される重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) と、配列番号 10、106、122、138、154 および 170 からなる群より選択される軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含む単離された抗体またはその抗原結合断片；

b) *Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338 および 354 からなる群より選択される H C V R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖 C D R (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) と、配列番号 186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346 および 362 からなる群より選択される L C V R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖 C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含む単離された抗体またはその抗原結合断片；

c) *Clostridium difficile* の毒素 A および毒素 B の両方に結合する / これらの両方と交差反応する単離された抗体または抗原結合断片であって、配列番号 18、34、50、66 および 82 からなる群より選択される H C V R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖 C D R (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) と、配列番号 26、42、58、74 および 90 からなる群より選択される L C V R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖 C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含む単離された抗体または抗原結合断片

から選択される、*Clostridium difficile* の毒素に結合する少なくとも 1 つの抗体を含む。

【0066】

一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載される *Clostridium difficile* の毒素 A に特異的に結合する単離された第 1 の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、本明細書に記載される *Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する単離された第 2 の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体または希釈剤とを含む。

【0067】

一実施形態では、組成物は、*Clostridium difficile* の毒素 A に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片と、*Clostridium difficile* の毒素 B に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片とを含み、

a) 毒素 A に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2、98、114、130、146 および 162 からなる群より選択される重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) と、配列番号 10、106、122、138、154 および 170 からなる群より選択される軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる 3 つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) とを含み；および

b) 毒素 B に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338 および 354 からなる群より選択される H C V R アミノ酸配列のいずれか 1 つの中に含まれる

3つの重鎖CDR(HCDR1、HCDR2およびHCDR3)と、配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるLCVRアミノ酸配列のいずれか1つの中に含まれる3つの軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2およびLCDR3)とを含む。

【0068】

一実施形態では、医薬組成物は、

a) Clostridium difficileの毒素Aに特異的に結合する単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDRと、配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRとを含む単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片；および

10

b) Clostridium difficileの毒素Bに特異的に結合する単離された第2の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDRと、配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRとを含む単離された第2の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0069】

20

一実施形態では、医薬組成物は、C. difficileの毒素Aに特異的に結合する単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号2/10、98/106、114/122、130/138、146/154および162/170からなる群より選択されるHCDR/LCDRアミノ酸配列ペアを含む単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、C. difficileの毒素Bに特異的に結合する単離された第2の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298、306/314、322/330、338/346および354/362からなる群より選択されるHCDR/LCDRアミノ酸配列ペアを含む単離された第2の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片とを含む。

30

【0070】

別の実施形態では、医薬組成物は、C. difficileの毒素Aに特異的に結合する単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号146/154のHCDR/LCDRアミノ酸配列ペアを含む単離された第1の完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、C. difficileの毒素Bに特異的に結合する単離された第2の完全ヒト抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号274/282のHCDR/LCDRアミノ酸配列ペアを含む単離された第2の完全ヒト抗体またはその抗原結合断片とを含む。

【0071】

40

別の関連実施形態では、医薬組成物は、

a) Clostridium difficileの毒素Aに特異的に結合する単離された第1のヒト抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号148のアミノ酸配列を有するHCDR1と、配列番号150のアミノ酸配列を有するHCDR2と、配列番号152のアミノ酸配列を有するHCDR3と、配列番号156のアミノ酸配列を有するLCDR1と、配列番号158のアミノ酸配列を有するLCDR2と、配列番号160のアミノ酸配列を有するLCDR3とを含む単離された第1のヒト抗体またはその抗原結合断片；

b) Clostridium difficileの毒素Bに特異的に結合する単離された第2のヒト抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号276のアミノ酸配列を有するHCDR1と、配列番号278のアミノ酸配列を有するHCDR2と、配列番号28

50

0のアミノ酸配列を有するHCDR3と、配列番号284のアミノ酸配列を有するLCDR1と、配列番号286のアミノ酸配列を有するLCDR2と、配列番号288のアミノ酸配列を有するLCDR3とを含む単離された第2のヒト抗体またはその抗原結合断片；および

c)薬学的に許容し得る担体または希釈剤を含む。

【0072】

一実施形態では、本発明の抗体、または1つ以上の本発明の抗体を含有する組成物は、*Clostridium difficile*の任意の株由来の毒素Aもしくは毒素Bのいずれかまたは毒素AおよびBの両方を中和するのに使用され得る。

【0073】

一実施形態では、本発明の抗体、または1つ以上の本発明の抗体を含有する組成物は、*Clostridium difficile*の超毒性株由来の毒素Aおよび/またはBを中和するのに使用され得る。

【0074】

一実施形態では、本発明の抗体、または1つ以上の本発明の抗体を含有する組成物は、BI/NAP1/027株由来の毒素Aおよび/またはBを中和するのに使用され得る。

【0075】

一実施形態では、本発明の抗体、または1つ以上の本発明の抗体を含有する組成物は、BI/NAP1/027株由来の毒素Aおよび/またはBを中和するのに使用され得、BI/NAP1/027株は、VA5、VA17、6336および6443からなる群より選択される。

【0076】

一実施形態では、毒素Aに特異的に結合する第1の抗体を含む抗体組成物を別個の組成物として単独で投与してもよいし、毒素Bに特異的に結合する第2の抗体を含む抗体組成物も別個の組成物として投与してもよい。各組成物は、別個のシリンジまたは送達デバイスまたはバイアル中で、患者への送達のために調製され得る。2つの組成物として別個に製剤化する場合、他方の抗体組成物の直前に一方の抗体組成物を投与することによって、両組成物を別個に送達してもよい。あるいは、2つの抗体組成物を投与の直前に混合して同時に投与してもよい。

【0077】

一実施形態では、本発明は、本発明の抗体または抗体の抗原結合断片と、第2の治療剤との組み合わせである組成物を特徴とする。

【0078】

第2の治療剤は、低分子薬物、タンパク質/ポリペプチド、抗体、核酸分子、例えば、アンチセンス分子またはsiRNAであり得る。第2の治療剤は、合成ものでもよいし、または天然由来のものでもよい。

【0079】

第2の治療剤は、本発明の抗体またはその断片と組み合わせることが有利な任意の薬剤、例えば、プロバイオティク、抗生物質、トキシイド、*C. difficile*に対して特異的なワクチン、または*C. difficile*の毒素Aおよび/もしくは毒素Bに対する第2の異なる抗体であり得る。

【0080】

ある特定の実施形態では、第2の治療剤は、本発明の抗体または抗体の抗原結合断片に関連する任意の可能な副作用が生じる場合に、このような副作用に対抗するかまたはこれを軽減する一助となる薬剤であり得る。

【0081】

また、本発明の抗体および薬学的に許容し得る組成物を、併用療法において用い得ること、すなわち、抗体および薬学的に許容し得る組成物を、1つ以上の他の所望の治療剤または医療手順と同時に、これらの前に、またはこれらの後で投与し得ることも認識されよう。併用レジメンにおいて用いられる療法(治療剤または手順)の特定の組み合わせでは

10

20

30

40

50

、所望の治療剤および／または手順の適合性、ならびに達成すべき所望の治療効果を考慮に入れる。また、用いられる療法により、同じ障害に対する所望の効果を達成することもでき（例えば、抗体は、同じ障害を処置するのに使用される別の薬剤と同時に投与することができる）、異なる効果（例えば、任意の有害作用のコントロール）を達成し得ることも認識されよう。本明細書で使用される場合、通常は特定の疾患または症状を処置または予防するのに投与されるさらなる治療剤が、処置される疾患または症状に適切である。

【0082】

当技術分野で認識されているように、複数の治療剤を同時投与する場合は、それに応じて投用量を調整することができる。

【0083】

第5の態様では、本発明は、*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患を患っている患者を処置するため、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を処置するため、または*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患の発症のリスクを有する患者における*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患の発症を予防するための方法であって、前記*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患が予防されるかもしくは重症度および／もしくは持続期間の点で低減されるか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症が予防もしくは改善されるか、または*Clostridium difficile*による再発もしくは再燃の頻度および／もしくは持続期間または重症度が軽減されるような、*C. difficile*の毒素Aおよび／または毒素Bに結合する有効量の抗体またはその抗原結合断片；または、*Clostridium difficile*の毒素Aおよび／または毒素Bに結合する有効量の抗体またはその抗原結合断片を含む医薬組成物を前記患者に投与することを含む方法を提供する。

【0084】

一実施形態では、本発明は、*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患を患っている患者を処置するのに使用するため、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を処置するため、または*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患の発症のリスクを有する患者における*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患の発症を予防するための薬品の製造における、1つ以上の本発明の抗体または1つ以上の本発明の抗体を含む医薬組成物の使用であって、前記*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患が予防されるかもしくは重症度および／もしくは持続期間の点で低減されるか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症が予防もしくは改善されるか、または*Clostridium difficile*による再発もしくは再燃の頻度および／もしくは持続期間または重症度が軽減される使用を提供する。*Clostridium difficile*に関連する症状または疾患に関連する少なくとも1つの症候または合併症は、食欲不振、腹痛、腹部膨満、出血有りまたは無しの下痢、脱水症、栄養失調、偽膜性大腸炎、完全なまたは部分的な結腸切除、発熱および全身感染症（敗血症）、死亡、*Clostridium difficile*症状または疾患の再燃、ならびに移植組織または器官の拒絶からなる群より選択され得る。

【0085】

一実施形態では、本明細書に記載されるように、本発明の抗体または1つ以上の本発明の抗体を含む医薬組成物で処置されるべき患者は、*Clostridium difficile*の超毒性分離菌、例えば、BI/NAP1/027群に属するものに感染しているか、または超毒性株による感染症を発症するリスクを有し得る。

【0086】

関連実施形態では、本発明の抗体または1つ以上の本発明の抗体を含有する医薬組成物は、*Clostridium difficile*の超毒性株、例えば限定されないが、

10

20

30

40

50

B I / N A P 1 / 0 2 7 株群に属するもののいずれかによって産生される毒素を中和するのに使用され得る。本明細書の実施例 10 に記載されているように、本明細書で V A 5、V A 17、6 3 3 6 および 6 4 4 3 と表記される臨床分離菌は、これらの超毒性株に含まれる。

【0087】

一実施形態では、*Clostridium difficile*に関連する症状または疾患を発症するリスクを有する患者であって、本発明の抗体または1つ以上の本発明の抗体を含む組成物による処置から恩恵を受けることができる患者は、高齢（65歳以上）患者、基礎疾患によりまたは免疫抑制治療薬の投与により免疫無防備状態である患者、患者を*Clostridium difficile*感染症に罹患しやすくし得るいくつかの基礎病状を有する患者、長期間（1週間以上）の入院患者、広域抗生物質で長期間（14日間以上）処置されている患者、癌患者、移植患者、ならびに胃内酸度、胃食道逆流性疾患（GERD）、胃潰瘍および小腸潰瘍または胸やけを軽減または処置するための胃腸疾患または症状の処置に使用される薬剤、例えば限定されないが、プロトンポンプ阻害剤またはヒスタミンH2受容体阻害剤による治療中の患者から選択され得る。

10

【0088】

一実施形態では、*Clostridium difficile*に関連する症状または疾患を発症するリスクを有する患者は、癌患者である。関連実施形態では、癌患者は、抗癌薬による処置を受けているか、または癌を処置するための放射線療法を受けている。

【0089】

一実施形態では、*Clostridium difficile*に関連する症状または疾患を発症するリスクを有する患者は、移植患者である。関連実施形態では、移植患者は、造血幹細胞移植または固形組織もしくは器官移植を受けている患者である。ある特定の実施形態では、移植患者は、免疫抑制薬もしくは任意の移植拒絶反応抑制薬で処置されているか、または移植後の組織もしくは器官移植片拒絶を予防するための投薬計画による処置を受けている患者である。

20

【0090】

一実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患を患っているか、または前記症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を患っている患者に治療的に投与される（感染症の確立後に投与され、感染症の期間全体を通して与えられる）。一実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile*に関連する症状もしくは疾患を発症するリスクを有するか、または*Clostridium difficile*症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症を発症するリスクを有する患者に予防的に投与される（感染症の発症前に投与される）。例えば、このような「*Clostridium difficile*感染症を発症するリスクを有する患者」には、高齢者（65歳以上）、または疾患によりもしくは免疫抑制治療薬の投与により免疫無防備状態であり得る患者、または患者を*Clostridium difficile*感染症に罹患しやすくし得るいくつかの基礎病状を有する患者、または長期間（一般に、1週間以上）の入院患者、または広域抗生物質で長期間（一般に、14日間以上）処置されている患者、または胃腸疾患もしくは症状を処置するためのプロトンポンプ阻害剤による治療中の患者が含まれる。*Clostridium difficile*感染症を発症するリスクを有する他の患者は、組織または器官移植を必要とする患者であって、組織または器官拒絶を予防するための免疫抑制薬による処置を受けている患者である。この患者集団には、自己または同種造血幹細胞移植のいずれかを必要とする個体が含まれる。他の種類の感染症を予防するための高用量の抗生物質治療の服用に加えて、これらの患者に必要な長期の入院は、これらの患者を*C. difficile*一次感染に罹患しやすくし得る。あるいは、このような移植を必要とする患者が*C. difficile*感染症を既に患っているか、または*C. difficile*感染症の症候を示している場合、高用量の抗生物質治療を施し、次いで移植片拒絶を予防するための免疫抑制治療を施すと、その患者は、このような感染症が再発ま

30

40

50

たは悪化する傾向を有し得る。さらに、これらの移植患者は、*C. difficile* 感染症に罹患するリスクを有し得るだけでなく、移植片対宿主病におけるGI関連病変（GI-GVHD）による移植拒絶のリスクも有し得る（これは、*C. difficile* による感染症を患っている移植患者で増強されると思われる）（Alonso, C. D. et al., (2012), Clin. Infect. Dis. 54, 1053-1063を参照のこと）。*C. difficile* 感染症と、GI管を障害するGVHDとの間の関係性は現時点では不明であるが、この患者集団は、本発明の抗毒素Aおよび/または抗毒素B抗体による治療から恩恵を受けるであろう。この患者集団を治療的に（感染の開始後に）処置し得ることが想定されるが、これらの患者は、本発明の抗体のいずれかの予防的な（感染前の）投与から恩恵を受けるであろうとも考えられる。限定されないが、
10 静脈内注射または皮下注射を含む投与に適切な任意の送達経路によって、本発明の抗体による処置の候補患者に、1つ以上の抗体を含む組成物を投与し得る。

【0091】

一実施形態では、本発明の抗体を含む医薬組成物は、*C. difficile* 感染症を処置するのに有用な1つ以上の治療剤と組み合わせて患者に投与される。

【0092】

一実施形態では、1つ以上の治療剤は、トキシイド、プロバイオティック、*C. difficile* ワクチン（例えば、不活性化された毒素AおよびB、例えば限定されないが、ACAM-CDIFF（商標））、抗生物質（例えば、メトロニダゾール、バンコマイシンまたはフィダキソマイシン）、*C. difficile* の毒素Aおよび/またはBに
20 対する別の異なる抗体、ならびに*C. difficile* 疾患の重症度を軽減するため、または*C. difficile* 疾患の再発頻度を軽減するため、または*C. difficile* に関連する症状もしくは疾患に関連する少なくとも1つの症候を改善するために有用な任意の他の緩和療法からなる群より選択され得る。

【0093】

別の実施形態では、*C. difficile* に関連する症状または疾患に関連する1つの症候または合併症は、下痢、偽膜性大腸炎、*Clostridium difficile* 症状または疾患の再燃/再発、および移植組織または器官の拒絶からなる群より選択される。

【0094】

他の実施形態は、以下の詳細な説明を精査することによって明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】図1は、*Clostridium difficile* 由来の毒素Aおよび毒素Bのドメイン構造を示す（Davies AHら、Biochem. J. (2011), 436: 517-526を参照のこと）。

【0096】

【図2】図2は、ハムスター再発アッセイの結果を、*C. difficile* 負荷後のクリンダマイシンおよびバンコマイシン処置を受けて生存しているハムスターの割合、なら
40 びに抗毒素Aおよび抗毒素B mAbによる処置の効果として示すグラフである。3~6日目において、すべての抗体を1日1回皮下投与した。陽性対照抗体は、比較用抗体の抗毒素A（対照I）および抗毒素B（対照II）である。1~3日目において、バンコマイシンをすべての動物に10mg/kgの用量で経口投与した。（点線の : PBS対照；点線の : 10mg/kgの陰性アイソタイプ対照；実線の : 各5mg/kgの対照I / 対照II（5/5）；実線の : 各5mg/kgのH1H3330P / H1H3347P（5/5））。

【0097】

【図3】図3は、ハムスター再発アッセイの結果を、*C. difficile* 負荷後のクリンダマイシンおよびバンコマイシン処置を受けて生存しているハムスターの割合、なら
50 びに抗毒素Aおよび抗毒素B mAbの効果として示すグラフである。3日目において、

すべての抗体を1回皮下投与した。陽性対照抗体は、比較用抗体の抗毒素A（対照Ⅰ）および抗毒素B（対照Ⅱ）である。1～3日目において、バンコマイシンをすべての動物に10mg/kgの用量で経口投与した。（点線の：10mg/kgの陰性アイソタイプ対照；実線の：各5mg/kgの対照Ⅰ/対照Ⅱ（5/5）；実線の：各5mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（5/5）；実線の：各2mg/kgの対照Ⅰ/対照Ⅱ（2/2）；実線の

【数1】



：各2mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（2/2））。

【0098】

【図4】図4は、C. difficile感染症の急性ハムスターモデルにおける生存結果を示すグラフである。クリンダマイシン処置（-1日目）後のC. difficile負荷（0日目）を受けて生存しているハムスターの割合として結果を示す。-3日目～0日目の各4日間において、すべての抗体を皮下投与した。各50mg/kg（50/50）、各16.6mg/kg（16.6/16.6）、各5.5mg/kg（5.5/5.5）および各1.85mg/kg（1.85/1.85）で抗体を投与した。（実線の：非感染；点線の：PBS対照；点線の：100mg/kgの陰性アイソタイプ対照；実線の：各50mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（50/50）；実線の：各16.6mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（16.6/16.6）；実線の

【数2】



：各5.5mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（5.5/5.5）；実線の

【数3】



：各1.85mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（1.85/1.85）

。

【0099】

【図5】図5は、C. difficile感染症の急性ハムスターモデルにおける生存結果を示すグラフである。クリンダマイシン処置（-1日目）後のC. difficile負荷（0日目）を受けて生存しているハムスターの割合として結果を示す。-3日目～0日目の各4日間において、すべての抗体を皮下投与した。各20mg/kg（20/20）または各5mg/kg（5/5）で抗体を投与した。（実線の：非感染；点線の：PBS対照；点線の：40mg/kgの陰性アイソタイプ対照；実線の：各20mg/kgの対照Ⅰ/対照Ⅱ（20/20）；実線の

【数4】



：各5mg/kgの対照Ⅰ/対照Ⅱ（5/5）；実線の：各20mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（20/20）；実線の：各5mg/kgのH1H3330P/H1H3347P（5/5））。

【発明を実施するための形態】

【0100】

詳細な説明

本方法について記載する前に、記載される特定の方法および実験条件は変化し得るので、本発明はこのような方法および条件に限定されるわけではないことを理解するべきである。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書

10

20

30

40

50

で使用される専門用語は単に特定の実施形態を説明することを目的とするものであり、限定的であることを意図するものではないことも理解するべきである。

【0101】

別段に定義しない限り、本明細書で使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等の任意の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、ここでは、好ましい方法および材料について記載する。

【0102】

定義

「毒素A」(「tcdA」とも称される)という用語は、*Clostridium difficile* (本明細書では「*C. difficile*」とも称される)によって産生される毒素Aタンパク質を指す。「毒素A」のアミノ酸配列は、GenBankではアクセッション番号CAA63564として提供されており、本明細書では配列番号378としても参照される。毒素Aは、本明細書では配列番号377として提供される核酸によってコードされ、GenBankではアクセッション番号AM180355としても見られる。

10

【0103】

「毒素B」(「tcdB」とも称される)という用語は、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Bタンパク質を指す。「毒素B」のアミノ酸配列は、GenBankではアクセッション番号CAJ67492として提供されており、本明細書では配列番号380としても参照される。毒素Bは、本明細書では配列番号379として提供される核酸によってコードされ、GenBankではアクセッション番号AM180355としても見られる。

20

【0104】

「*Clostridium difficile*の毒素Aおよび毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメイン」は、*C. difficile*由来の毒素Aおよび毒素Bの一部であって、標的細胞に対する結合に関与してそれに続く受容体媒介性エンドサイトーシスを可能にする一部分を指す。本明細書に記載されるように、毒素Aのカルボキシ末端受容体結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号375に示されている。毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメインのアミノ酸配列は、配列番号376に示されている。*C. difficile*由来の毒素Aおよび毒素Bの様々なドメインが図1に示されており、Daviesら(Davies, AHら、Biochem. J. (2011), 436: 517 - 526)にさらに記載されている。

30

【0105】

*Clostridium difficile*に関する「BI/NAP1/027」という名称は、欧州および北米にわたる罹患率および死亡率の増加に関連している*Clostridium difficile*の高毒性分離菌群を指す(Loo, VGら、(2005), N Engl J Med, 353: 2442 - 9; McDonald, LCら、(2006), Emerg Infect Dis, 12: 409 - 15; McDonald, LCら、(2005), N Engl J Med, 353: 2433 - 41; Reddings, MDら、(2007), Emerg Infect Dis 13: 1417 - 9)。「BI/NAP1/027」という名称はさらに、制限エンドヌクレアーゼ分析による北米パルスフィールドI型(NAP1)、リボタイプ027およびBI群を指す。それは1980年代に最初に同定されたが、最初は新たなフルオロキノロン剤に耐性であると同定されておらず、2000年以前には流行していなかった(Warny, Mら、(2005), Lancet 366: 1079 - 84; Kelly, CPら、N Engl J Med 359: 1932 - 40)。*Clostridium difficile*の「BI/NAP1/027」株はまた、毒素Aおよび毒素Bの産生増加、さらなる毒素(バイナリー毒素)の存在、ならびにフルオロキノロン耐性の増加を特徴とする(McDonald, LCら、(2005), N Engl J Med, 353

40

50

: 2 4 3 3 - 4 1 ; W a r n y , M ら、(2 0 0 5) , L a n c e t 3 6 6 : 1 0 7 9 - 8 4) 。

【 0 1 0 6 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に連結された2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖である、4つのポリペプチド鎖を含む免疫グロブリン分子(すなわち、「完全抗体分子」)のほか、それらの多量体(例えば、IgM)またはこれらの抗原結合断片を指すことを意図する。各重鎖は、重鎖可変領域(「H C V R」または「V_H」)と、重鎖定常領域(ドメインC_H1、C_H2、およびC_H3を含む)とを含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(「L C V R」または「V_L」)と、軽鎖定常領域(C_L)とを含む。V_H領域およびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存的な領域が点在した相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域へとさらに細分することができる。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配列される3つのCDRおよび4つのFRからなる。本発明のある特定の実施形態では、抗体(またはその抗原結合断片)のFRは、ヒト生殖細胞系列の配列と同一な場合もあり、天然で、または人工的に修飾される場合もある。アミノ酸のコンセンサス配列は、2つ以上のCDRについての対照比較による分析に基づき定義することができる。

10

【 0 1 0 7 】

また、1つ以上のCDR残基を置換するか、または1つ以上のCDRを脱落させることも可能である。1つまたは2つのCDRが結合には必要とされない抗体が科学文献に記載されている。P a d l a n ら、(1 9 9 5 F A S E B J . 9 : 1 3 3 - 1 3 9) は、公表された結晶構造に基づき、抗体とそれらの抗原との接触領域について分析し、CDR残基のうちで抗原に実際に接触するのは約5分の1~3分の1に過ぎないと結論付けた。P a d l a n はまた、1つまたは2つのCDRのアミノ酸が抗原と接触しない抗体も多く見出した(V a j d o s ら、2 0 0 2 J M o l B i o l 3 2 0 : 4 1 5 - 4 2 8 も参照のこと)。

20

【 0 1 0 8 】

抗原に接触しないCDR残基は、先行研究に基づき、C h o t h i a によるCDRの外部に存在するK a b a t によるCDRの領域から、分子モデル化を介して同定することもでき、および/または経験的に同定することもできる(例えば、CDRH2における残基H60~H65は必要とされないことが多い)。CDRまたはその残基を脱落させる場合、通常はそれを別のヒト抗体配列またはこのような配列のコンセンサス配列における対応する位置を占めるアミノ酸で置換する。また、CDR内の置換のための位置および置換するアミノ酸は、経験的に選択することもできる。経験的置換は、保存的置換の場合もあり、非保存的置換の場合もある。

30

【 0 1 0 9 】

本明細書で開示される完全ヒト抗毒素Aおよび/または抗毒素Bモノクローナル抗体は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域および/またはCDR領域において、対応する生殖細胞系列の配列と比較して1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、および/または欠失を含み得る。このような突然変異は、本明細書で開示されるアミノ酸配列を、例えば、公開の抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系列の配列と比較することによって、容易に確認することができる。本発明には、本明細書で開示されるアミノ酸配列のいずれか由来の抗体およびその抗原結合断片であって、1つ以上のフレームワーク領域および/またはCDR領域内の1つ以上のアミノ酸を、この抗体が由来する生殖細胞系列の配列の対応する残基、または別のヒト生殖細胞系列の配列の対応する残基、または対応する生殖細胞系列の残基の保存的アミノ酸置換へと突然変異させた(本明細書では、このような配列変化を「生殖細胞系列突然変異」と総称する)抗体または断片が含まれる。当業者は、本明細書で開示される重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列から出発して、1つ以上の個別の生殖細胞系列突然変異またはこれらの組み合わせを含む多数の抗体および抗原結合断片を容易に生産することができる。ある特定の実施形態では、V

40

50

Hドメインおよび/またはV_Lドメイン内のフレームワーク残基および/またはCDR残基のすべてを、抗体が由来する元の生殖細胞系列の配列において見出される残基へと復帰突然変異させる。他の実施形態では、特定の残基だけ、例えば、FR1の最初の8アミノ酸内もしくはFR4の最後の8アミノ酸内に見出される突然変異残基だけ、またはCDR1、CDR2、もしくはCDR3内に見出される突然変異残基だけを、元の生殖細胞系列の配列へと復帰突然変異させる。他の実施形態では、フレームワーク残基および/またはCDR残基の1つ以上を、異なる生殖細胞系列の配列の対応する残基（すなわち、抗体が元来由来した生殖細胞系列の配列とは異なる生殖細胞系列の配列）へと突然変異させる。さらに、本発明の抗体は、フレームワーク領域および/またはCDR領域内の2つ以上の生殖細胞系列突然変異の任意の組み合わせであって、例えば、個別の特定の残基を、特定の生殖細胞系列の配列の対応する残基へと突然変異させる一方で、元の生殖細胞系列の配列とは異なる特定の他の残基を維持するか、または異なる生殖細胞系列の配列の対応する残基へと突然変異させる組み合わせも含有し得る。得られたならば、1つ以上の生殖細胞系列突然変異を含有する抗体および抗原結合断片は、結合特異性の改善、結合親和性の増大、アンタゴニスト性またはアゴニスト性の生物学的特性の改善または増強（場合によって）、免疫原性の低減などの1つ以上の所望の特性について容易に調べることができる。本発明内には、この一般的な形で得られた抗体および抗原結合断片が包含される。

10

【0110】

本発明はまた、1つ以上の保存的置換を有する、本明細書で開示されるHCVR、LCVR、および/またはCDRのアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む完全ヒト抗毒素Aおよび/または抗毒素Bモノクローナル抗体も包含する。例えば、本発明は、本明細書で開示されるHCVR、LCVR、および/またはCDRのアミノ酸配列のいずれかに対して、例えば、10つ以下、8つ以下、6つ以下、4つ以下などの保存的アミノ酸置換を伴うHCVR、LCVR、および/またはCDRのアミノ酸配列を有する抗毒素Aおよび抗毒素B抗体を包含する。

20

【0111】

本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列由来の変換領域および定常領域を有する抗体を包含することを意図する。本発明のヒトmAbは、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、*in vitro*におけるランダム突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発を介して導入される突然変異、または*in vivo*における体細胞突然変異を介して導入される突然変異）を、例えば、CDRにおいて包含することが可能であり、特に、CDR3においてこれを包含し得る。しかしながら、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種（例えば、マウス）の生殖細胞系列由来のCDR配列をヒトFR配列へと移植したmAbを包含することは意図しない。

30

【0112】

「特異的に結合する」または「に特異的に結合する」などの用語は、抗体またはその抗原結合断片が、生理学的条件下で、抗原と比較的安定的な複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-6} M以下の平衡解離定数（例えば、 K_D が小さいほど、より緊密な結合が示される）を特徴とし得る。当技術分野では、2つの分子が特異的に結合するかを決定する方法が周知であり、これらには、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが含まれる。本明細書に記載されるように、C_{d i f f i c i l e}由来の毒素Aに特異的に結合するか、またはC_{d i f f i c i l e}由来の毒素Bに特異的に結合する抗体を、表面プラズモン共鳴、例えばBIAcore（商標）によって同定した一方、毒素Aおよび毒素Bの両方のカルボキシ末端受容体結合ドメインに特異的に結合する他のものを同定した。さらに、毒素Aまたは毒素Bおよび1つ以上のさらなる抗原に結合する多重特異性抗体、または毒素Aまたは毒素Bの2つの異なる領域に結合する二重特異性抗体もやはり、本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」抗体と考えられる。

40

【0113】

50

「高親和性」抗体という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E (商標)、または溶液親和性 E L I S A によって測定した場合に、 K_D として表される毒素 A または毒素 B に対する結合親和性が、少なくとも 10^{-8} M ; 好ましくは 10^{-9} M ; より好ましくは 10^{-10} M、さらにより好ましくは 10^{-11} M、さらにより好ましくは 10^{-12} M である m A b を指す。

【0114】

「緩徐な o f f 速度」、「K o f f」、または「k d」という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E (商標) によって決定した場合に、 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下の速度定数で、毒素 A もしくは毒素 B またはその両方から解離する抗体を意味する。

10

【0115】

本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」などの用語には、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然ポリペプチド、酵素的に得られるポリペプチド、合成ポリペプチド、もしくは遺伝子操作したポリペプチド、または糖タンパク質が含まれる。本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」、「抗体断片」などの用語は、毒素 A もしくは毒素 B またはその両方に結合する能力を保持する抗体の 1 つ以上の断片を指す。

【0116】

特定の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片を、抗生物質、第 2 の抗毒素 A もしくは B 抗体、または C . d i f f i c i l e ワクチン、またはトキシイド、または C . d i f f i c i l e によって引き起こされる疾患もしくは症状を処置するのに有用な任意の他の治療部分などの治療用部分にコンジュゲートすることができる(「イムノコンジュゲート」)。

20

【0117】

本明細書で使用される場合、「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体 (A b) を実質的に含まない抗体 (例えば、毒素 A または毒素 B に特異的に結合する単離された抗体またはその断片は、毒素 A または毒素 B 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない) を指すことを意図する。

【0118】

本明細書で使用される場合、「遮断抗体」または「中和抗体」(または「毒素 A および / または毒素 B 活性を中和する抗体」とは、その毒素 A および / または毒素 B への結合が、毒素 A および / または毒素 B の少なくとも 1 つの生物学的活性の阻害をもたらす抗体を指すことを意図する。例えば、本発明の抗体は、C . d i f f i c i l e によって引き起こされる原発性疾患を予防する一助となり得る。あるいは、本発明の抗体は、C . d i f f i c i l e によって引き起こされる疾患の再発もしくは再燃、または C . d i f f i c i l e 感染によって引き起こされる少なくとも 1 つの症候 (下痢または偽膜性大腸炎を含む) を予防する能力を示すことも可能である。この毒素 A および / または毒素 B の生物学的活性の阻害は、当技術分野で公知の複数の標準的な i n v i t r o アッセイ (例えば、本明細書に記載される中和アッセイ) または i n v i v o アッセイ (例えば、本明細書に記載される抗体の 1 つ以上の投与後における、C . d i f f i c i l e 負荷からの保護を調べるための動物モデル) の 1 つ以上によって、毒素 A および / または毒素 B の生物学的活性についての 1 つ以上の指標を測定することによって評価することができる。

30

40

【0119】

本明細書で使用される場合、「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、B I A C O R E (商標) システム (P h a r m a c i a B i o s e n s o r A B、U p p s a l a、S w e d e n および P i s c a t a w a y、N . J .) を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムの生物分子間相互作用についての分析を可能とする光学現象を指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、「 K_D 」という用語は、特定の抗体 - 抗原間相互作用につ

50

いての平衡解離定数を指すことを意図する。

【0121】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして公知である、抗体分子の可変領域における特異的な抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、複数のエピトープを有し得る。したがって、異なる抗体は、抗原における異なる領域に結合することが可能であり、異なる生物学的効果を及ぼし得る。「エピトープ」という用語はまた、B細胞および/またはT細胞がそれに対して応答する、抗原における部位も指す。それはまた、抗体が結合する抗原の領域も指す。エピトープは、構造的に定義することもでき、機能的に定義することもできる。機能的エピトープは一般に、構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープはまた、立体配座的でもあり得る、すなわち、非直鎖状アミノ酸群からなることが可能である。ある特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基など、化学的に活性な表面分子の群分けである決定基を包含することが可能であり、ある特定の実施形態では、特定の三次元構造的特徴および/または特定の電荷特徴を有し得る。

10

【0122】

核酸またはその断片に言及する場合の「実質的な同一性」または「実質的に同一な」という用語は、適切なヌクレオチドの挿入または欠失によって別の核酸（またはその相補鎖）に照らして最適に配列決定されれば、以下で論じられるFASTA、BLAST、またはGAPなど、配列同一性についての任意の周知のアルゴリズムを介して測定されるヌクレオチド塩基の少なくとも約90%、および、より好ましくは、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%においてヌクレオチド配列の同一性が認められることを示す。ある特定の場合において、基準核酸分子に対して実質的な同一性を有する核酸分子は、基準核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じであるかまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

20

【0123】

ポリペプチドに対して適用される場合、「実質的な類似性」または「実質的に類似の」という用語は、デフォルトによるギャップの重みを使用するGAPプログラムまたはBESTFITプログラムなどを介して最適に配列決定されれば、2つのペプチド配列が、少なくとも90%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%、98%、または99%の配列同一性を共有することを意味する。同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換で異なることが好ましい。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を伴う側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換するアミノ酸置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いと異なる場合は、類似性の百分率または程度を上方へと調整して、置換の保存的性質を補正することができる。当業者には、この調整を行うための手段が周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-331を参照のこと。類似の化学的特性を伴う側鎖を有するアミノ酸基の例には、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン；5) 塩基性側鎖：リシン、アルギニン、およびヒスチジン；6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに7) 硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニンが含まれる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、Gonnetら、(1992) Science 256:1443-45において開示されているPAM250対数尤度行列で正の値をとる任意の変化でもある。「中程度に保存的」置換とは、PAM250対数尤度行列において負でない値をとる任意の変化である。

30

40

【0124】

50

ポリペプチドの配列類似性は典型的に、配列分析ソフトウェアを使用して測定する。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含めた様々な置換、欠失、および他の修飾に割り当てられる類似性の測定値を使用して、類似の配列をマッチさせる。例えば、GCGソフトウェアは、デフォルトパラメータと共に使用して、異なる種の生物由来の相同的なポリペプチドなどの近縁のポリペプチドの間、または野生型タンパク質とその突然変異タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を決定し得る、GAPおよびBESTFITなどのプログラムを含有する。例えば、GCG Version 6.1を参照のこと。また、ポリペプチド配列は、GCG Version 6.1におけるプログラムであるFASTAをデフォルトパラメータまたは推奨されるパラメータと共に使用しても比較することができる。FASTA（例えば、FASTA2およびFASTA3）は、クエリー配列と検索配列との間の最適の重複領域についてのアライメントおよび配列同一性百分率をもたらす（Pearson（2000）、前出）。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合に好ましい別のアルゴリズムは、BLASTコンピュータプログラム、とりわけ、デフォルトによるパラメータを使用するBLASTPまたはTBLASTNである。例えば、Altschulら、（1990）J. Mol. Biol. 215: 403-410および（1997）Nucleic Acids Res. 25: 3389-402を参照のこと。

10

【0125】

特定の実施形態では、本発明の方法に使用される抗体または抗体断片は、単一特異性の場合もあり、二重特異性の場合もあり、多重特異性の場合もある。多重特異性抗体とは、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的な場合もあり、複数の標的ポリペプチドのエピトープに対して特異的な抗原結合ドメインを含有する場合もある。本発明の文脈で使用され得る例示的な二重特異性抗体のフォーマットは、第1の免疫グロブリン（Ig）CH₃ドメインおよび第2のIg CH₃ドメインであって、互いに少なくとも1つのアミノ酸だけ異なり、少なくとも1つのアミノ酸差異により、この二重特異性抗体のプロテインAへの結合が、このアミノ酸差異を欠く二重特異性抗体の場合と比較して低減される、第1および第2のIg CH₃ドメインの使用を伴う。一実施形態では、第1のIg CH₃ドメインは、プロテインAに結合し、第2のIg CH₃ドメインは、H95R修飾（IMGTのエクソン番号付けによる；EUの番号付けではH435R）など、プロテインAへの結合を低減するかまたは消失させる突然変異を含有する。第2のCH₃はさらに、Y96F修飾（IMGTによる；EUではY436F）を含み得る。第2のCH₃内に見出され得るさらなる修飾にはIgG1 mAbの場合のD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I（IMGTによる；EUではD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I）；IgG2 mAbの場合のN44S、K52N、およびV82I（IMGT；EUではN384S、K392N、およびV422I）；ならびにIgG4 mAbの場合のQ15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I（IMGTによる；EUではQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I）が含まれる。上記の二重特異性抗体のフォーマットにおける変化は、本発明の範囲内で想定される。

20

30

40

【0126】

「治療有効量」という語句は、所望の効果を生じさせるために投与される量を意味する。正確な量は処置目的に依存し、これは公知の技術を使用して当業者に確認可能である（例えば、Lloyd（1999）The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compoundingを参照のこと）。

【0127】

一般的な説明

Clostridium difficileはグラム陽性で孢子形成性の毒素産生細菌であり、ヒトにおける院内抗生物質関連下痢および大腸炎の主要な原因である（Bar

50

tl et t , J . G ら、(1 9 7 8) , N . E n g l . J . M e d . 2 9 8 : 5 3 1 - 5 3 4 ; K y n e , L ら、(2 0 0 1) , C l i n . N . A m . 3 0 : 7 5 3 - 7 7 7) 。広域抗生物質の投与に起因する結腸環境の混乱は、細菌が腸に定着するのにつながる (J o h n s o n , S . C ら、(1 9 9 0) , L a n c e t 3 3 6 : 9 7 - 1 0 0) 。C . d i f f i c i l e が定着したこの患者集団の大部分は下痢 (これは、ある特定の場合には偽膜性大腸炎につながる) を発症するが、これは、C . d i f f i c i l e による2つの外毒素 (毒素Aおよび毒素B) の産生に起因すると考えられている。処置は、原因抗生物質を中止するか、または原因抗生物質の投与を変更するか、または原因抗生物質を変更せず、続いてメトロニダゾール、バンコマイシンまたはフィダキソマイシンを投与することからなる。この処置計画は通常は成功するが、治療を中止すると多くの患者は再燃する (F e k e t y , R . , (1 9 9 7) , A m . J . G a s t r o e n t e r o l o g y , 9 2 : 7 3 9 - 7 5 0) 。さらに、多くの場合、C . d i f f i c i l e 細菌は使用した治療に耐性を持つようになるので処置が失敗し、いくつかの場合には死亡率が増加する (D w o r c z y n s k i , A ら、(1 9 9 1) , C y t o b i o s . 6 5 : 1 4 9 - 1 5 3 ; F e k e t y , R ら、(1 9 9 3) , J A M A , 2 6 9 : 7 1 - 7 5) 。したがって、この疾患と闘うための、および / または C . d i f f i c i l e が定着した患者におけるこの疾患の再発を予防するためのより有効な治療法の必要性がある。加えて、有効な薬剤の予防的投与によって、C . d i f f i c i l e 感染症を発症するリスクを有する患者を処置する必要性がある。高齢者、特に65歳以上の患者がこの有リスク患者集団に含まれるが、65歳未満の患者は、患者をC . d i f f i c i l e による感染症にかかりやすくし得る任意の基礎疾患の存在に応じて、より大きなリスクを有し得る。C . d i f f i c i l e に過去に感染した患者は、より大きな再発リスクを有し得る。リスクを有する他の患者には、基礎病状によりC . d i f f i c i l e 感染症の素因を有する患者、または長期間 (少なくとも1週間以上) の入院患者、および / または広域抗生物質による長期処置 (14日間以上) 中の患者、ならびに胃食道逆流性疾患 (GERD)、胃潰瘍および小腸潰瘍、および食道炎を処置するためのプロトンポンプ阻害剤を服用している患者が含まれる。これらの薬剤には、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、ランソプラゾール、オメプラゾール、パントプラゾールナトリウム、またはラベプラゾールナトリウムが含まれる。C . d i f f i c i l e 感染症を発症するリスクを有する患者への処方について研究中的他の薬剤には、ヒスタミンH2受容体遮断薬、例えば、シメチジン、ファモチジン、ニザチジンおよびラニチジンが含まれる。他の研究では、C . d i f f i c i l e に関連する下痢の年齢別発生率、より具体的には50歳以降の患者における増加、および60歳以降の患者における死亡率の増加が示されている (L o o , V G ら、(2 0 0 5) , N . E n g l . J . M e d . 3 5 3 : 2 4 4 2 - 9) 。実際、この研究は、C . d i f f i c i l e 毒素の陽性アッセイの発生率が加齢に伴って増加することを示した先の研究 (K a r l s t r o e m , O ら、(1 9 9 8) , C l i n I n f e c t D i s 2 6 : 1 4 1 - 5) と一致していた。

【0128】

C . d i f f i c i l e に対するより有効な治療法の必要性に対処するために、抗毒素Aおよび / またはB抗体を単独でまたは補助療法として使用した場合に、この疾患を処置する手段として、または少なくともC . d i f f i c i l e 感染症に関連する下痢もしくは大腸炎の再発を予防する手段として使用することができるかを決定するための多くの研究が行われた。(C o r t h i e r ら、(1 9 9 1) , I n f e c t . I m m u n . 5 9 (3) : 1 1 9 2 - 1 1 9 5 ; K i n k , J . A . a n d W i l l i l a m s , J . A . , (1 9 9 8) , I n f e c t . I m m u n . 6 6 (5) : 2 0 1 8 - 2 0 2 5 ; L o w y , I ら、(2 0 1 0) , N . E n g l . J . M e d . 3 6 2 (3) : 1 9 7 - 2 0 5 ; B a b c o c k , G . J ら ; (2 0 0 6) , I n f e c t i o n a n d I m m u n i t y , 7 4 (1 1) : 6 3 3 9 - 6 3 4 7) 。より具体的には、C . d i f f i c i l e による感染症の動物モデルを使用して、C . d i f f i c i l e 由来の毒素Aおよび / または毒素Bに対する抗体が一次感染および i n v i v o 再燃率に及ぼす効果が研究さ

れている (C o r t h i e r , G ら、(1 9 9 1) , I n f e c t . I m m u n . 5 9 (3) : 1 1 9 2 - 1 1 9 5 ; K i n k , J . A ら、(1 9 9 8) , I n f e c t . I m m u n . 6 6 (5) : 2 0 1 8 - 2 0 2 5 ; B a b c o c k , G . J ら、(2 0 0 6) , 7 4 (1 1) : 6 3 3 9 - 6 3 4 7) 。 C . d i f f i c i l e の動物モデルにおける結果により有意な保護が示されたので、前記疾患を有するヒト患者における抗毒素 A および抗毒素 B 抗体を使用したさらなる臨床試験が望まれる (L o w y , I . , (2 0 1 0) , N . E n g l . J . M e d . 3 6 2 (3) : 1 9 7 - 2 0 5) 。

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載される抗体は、C . d i f f i c i l e の毒素 A および / または毒素 B に対する特異的結合を示し、C . d i f f i c i l e による感染症を患っている患者を処置するのに有用であり得る。このような抗体の使用は、C . d i f f i c i l e による一次感染を患っている患者を処置する有効な手段であり得るか、またはそれらは、前記疾患の再燃および前記疾患に関連する随伴性症候を予防するのに使用され得るか、または一次感染もしくは前記感染症の再発に関連する下痢もしくは大腸炎の重症度を低減するのに使用され得る。それらは単独で、または C . d i f f i c i l e 感染症を処置するための当技術分野で公知の他の治療部分もしくは治療法、例えば限定されないが、抗生物質療法、例えば、メトロニダゾール、バンコマイシンもしくはフィダキソマイシンとの補助療法として使用され得る。それらは、C . d i f f i c i l e ワクチン、またはトキシイドの使用、または毒素 A および / もしくは B に対して特異的な第 2 もしくは第 3 の異なる抗体と併せて使用され得る。

【 0 1 3 0 】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の抗体の組み合わせは、C . d i f f i c i l e の超毒性株によって引き起こされる感染症を処置するのに使用され得る。これまでに最も著名な超毒性流行性分離菌群は、「B I / N A P 1 / 0 2 7」と称されるものである。これは、欧州および北米にわたる C . d i f f i c i l e 感染症の発生に関連している。この名称に該当する分離菌は、毒素 A および毒素 B の産生増加、さらなる毒素 (バイナリー毒素) の存在、ならびにフルオロキノロン耐性の増加を特徴とする (M c D o n a l d , L C ら、(2 0 0 5) , N . E n g l . J . M e d . 3 5 3 : 2 4 3 3 - 4 1 ; W a r n y , M E ら、(2 0 0 5) , L a n c e t 3 6 6 : 1 0 7 9 - 8 4) 。この分離菌群はまた、北米パルスフィールド 1 型 (N A P 1) 、リボタイプ 0 2 7 および B I 群株とも称され得る。この株群は、1 8 塩基対の t c d C 遺伝子欠失を含有しており、それが産生するバイナリー毒素は、c d t A および c d t B 遺伝子によってコードされる。この群は、対照株よりもそれぞれ 1 6 倍および 2 3 倍多い量の毒素 A および毒素 B を産生すると報告されている (W a r n y , M E ら、(2 0 0 5) , L a n c e t 3 6 6 : 1 0 7 9 - 8 4) 。本発明の抗体は、4 つの異なる臨床分離 C . d i f f i c i l e B I / N A P 1 / 0 2 7 株 (V A 5 、 V A 1 7 、 6 3 3 6 および 6 4 4 3) によって産生される毒素を中和することが示されたので、本発明の抗体を含む組成物を、C . d i f f i c i l e の上記超毒性株による感染症を患っている患者に治療的に投与することもできるし、または本明細書に示される超毒性株および任意の他の臨床関連超毒性株による感染症を発症するリスクを有する患者に予防的に投与することもできると想定される。これらの株を同定する手段は当業者に公知であり、これらの方法には、C . d i f f i c i l e 分離菌のパルスフィールドゲル電気泳動 (P F G E) (例えば、F a w l e y , W N ら、(2 0 0 2) , J . C l i n M i c r o b i o l 4 0 : 3 5 4 6 - 7 を参照のこと) 、バイナリー毒素遺伝子および部分的 t c d C 遺伝子欠失の P C R 分析 (例えば、G o n c a l v e s , C ら、(2 0 0 4) , J . C l i n M i c r o b i o l 4 2 : 1 9 3 3 - 9 ; および C o h e n , S H ら、(2 0 0 0) , J . I n f e c t D i s 1 8 1 : 6 5 9 - 6 3 を参照のこと) 、ならびに制限エンドヌクレアーゼ分析 (例えば、C l a b o t s , C R ら、(1 9 9 3) , J . C l i n M i c r o b i o l 3 1 : 1 8 7 0 - 5 を参照のこと) が含まれ得る。

【 0 1 3 1 】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、主な免疫原、例えば、*C. difficile* 由来の天然の不活性化毒素 A (GenBank アクセション番号 CAA63564 (配列番号 378)) を参照のこと) もしくは毒素 B (GenBank アクセション番号 CAJ67492 (配列番号 380)) を参照のこと)、または前記毒素もしくは毒素断片の組換え不活性型で免疫感作し、続いて、第 2 の免疫原または前記天然毒素の免疫原活性断片で免疫感作したマウスから得られる。不活性化毒素 A のみもしくは不活性化毒素 B のみのいずれかで動物を免疫感作してもよいし、または不活性化毒素 A および不活性化毒素 B の両方で同時に免疫感作してもよい。免疫原として使用する前に、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、過酸化物による処理または酸素処理を含む標準的なトキシイド調製手順を使用して毒素を不活性化することができる (Relyveldら、Methods in Enzymology, 93:24, 1983、Woodrow and Levine, eds. New Generation Vaccines, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990)。別の不活性化手段は、UDP-ジアルデヒド (これは、他の不活性化法と比較して毒素の天然構造を維持し、それにより、天然毒素とより反応性の抗体を誘導する可能性を高めるように作用し得る) の使用によるものである (Genthら、(2000), Infect. Immun. 68(3):1094-1101)。

10

【0132】

あるいは、標準的な組換え技術を使用して、減少した毒性を示す *C. difficile* 由来の突然変異体毒素を生産し、免疫原として使用してもよい (例えば、米国特許第 5,085,862 号明細書; 米国特許第 5,221,618 号明細書; 米国特許第 5,244,657 号明細書; 米国特許第 5,332,583 号明細書; 米国特許第 5,358,868 号明細書; および米国特許第 5,433,945 号明細書を参照のこと)。このような突然変異体は、毒素の活性部位に欠失または点突然変異を含有し得る。

20

【0133】

免疫原は、天然毒素 A もしくは毒素 B の生物学的に活性なおよび / もしくは免疫原性の断片、またはそれらの活性断片をコードする DNA であり得る。断片は、毒素 A または毒素 B のいずれかの N 末端または C 末端ドメインに由来し得る。断片は、グルコシル化酵素ドメイン (A)、自己触媒プロセシングドメイン (C)、転移ドメイン (D) または結合ドメイン (B) を含む毒素 A または毒素 B の公知のドメイン (図 1 を参照のこと) のいずれかに由来し得る。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号 378 のおよそアミノ酸残基 1832 ~ 2710 に及ぶ毒素 A のカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号 375 に示されている毒素 A のカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号 380 のおよそアミノ酸残基 1834 ~ 2366 に及ぶ毒素 B のカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号 376 に示されている毒素 B のカルボキシ末端受容体結合ドメインである。

30

【0134】

C. difficile 由来の毒素 A の全長アミノ酸配列は、配列番号 378 として示されている。

40

【0135】

C. difficile 由来の毒素 B の全長アミノ酸配列は、配列番号 380 として示されている。

【0136】

ある特定の実施形態では、*C. difficile* の毒素 A または毒素 B に特異的に結合する抗体を、上記領域の断片、または本明細書に記載される領域の N もしくは C 末端のいずれかまたは両方から前記指定領域を約 5 ~ 約 20 個のアミノ酸残基分延長したペプチドを使用して調製することができる。ある特定の実施形態では、上記領域またはその断片の任意の組み合わせが、毒素 A または毒素 B 特異的抗体の調製に使用され得る。ある特定の実施形態では、毒素 A もしくは毒素 B の上記領域またはそれらの断片のいずれか 1 つ以

50

上が、単一特異性、二重特異性または多重特異性抗体を調製するのに使用され得る。

【0137】

抗体の抗原結合断片

別段に明記さない限り、本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖（すなわち、「完全抗体分子」）ならびにその抗原結合断片を含む抗体分子を包含すると理解するものとする。本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」などの用語には、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然ポリペプチド、酵素的に得られるポリペプチド、合成ポリペプチド、もしくは遺伝子操作したポリペプチド、または糖タンパク質が含まれる。本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」、または「抗体断片」という用語は、C . d i f f i c i l e の毒素Aおよび/または毒素Bのいずれかに特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体断片には、F a b断片、F (a b ')₂断片、F v断片、d A b断片、C D Rまたは単離C D Rを含有する断片が含まれ得る。抗体の抗原結合断片は、例えば、タンパク質分解による消化または抗体の可変ドメインおよび（場合によって）定常ドメインをコードするD N Aの操作および発現を伴う組換え遺伝子操作法など、任意の適切な標準的技術を使用して完全抗体分子から派生させることができる。このようなD N Aは公知であり、および/または、例えば、市販の供給源、D N Aライブラリー（例えば、ファージ抗体ライブラリーを含めた）から容易に入手可能であり、合成可能な場合もある。D N Aは、配列決定し、化学的にまたは分子生物学法を使用して操作し、例えば、1つ以上の可変ドメインおよび/もしくは定常ドメインを適切な構成へと配置するか、またはコドンを導入するか、システイン残基を創出するか、アミノ酸を修飾するか、付加するか、もしくは欠失させることなどもできる。

10

20

【0138】

抗原結合断片の非限定的な例には、(i) F a b断片；(i i) F (a b ')₂断片；(i i i) F d断片；(i v) F v断片；(v) 単鎖F v (s c F v) 分子；(v i) d A b断片；および(v i i) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小限の認識単位（例えば、C D R 3 ペプチドなどの単離相補性決定領域（C D R））、または拘束性F R 3 - C D R 3 - F R 4 ペプチドが含まれる。また、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R移植抗体、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、ミニボディー、ナノボディー（例えば、一価ナノボディー、二価ナノボディーなど）、S m a l l M o d u l a r I m m u n o P h a r m a c e u t i c a l s (S M I P)、およびサメI g N A R可変ドメインなど、他の操作分子も、本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」という表現に包含される。

30

【0139】

抗体の抗原結合断片は、典型的に、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成であり得、一般に1つ以上のフレームワーク配列に隣接するか、またはこれらとインフレームである少なくとも1つのC D Rを含む。V_HドメインをV_Lドメインと会合させた抗原結合断片において、V_HドメインとV_Lドメインとは、互いに対して任意の適切な配置下に置くことができる。例えば、可変領域は、二量体であり得、V_H - V_H二量体、V_H - V_L二量体、またはV_L - V_L二量体を含有し得る。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体のV_HドメインまたはV_Lドメインを含有し得る。

40

【0140】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合的に連結された少なくとも1つの可変ドメインを含有し得る。本発明の抗体の抗原結合断片内に見出され得る可変ドメインおよび定常ドメインの非限定的な例示的構成には、(i) V_H - C_H 1；(i i) V_H - C_H 2；(i i i) V_H - C_H 3；(i v) V_H - C_H 1 - C_H 2；(v) V_H - C_H 1 - C_H 2 - C_H 3；(v i) V_H - C_H 2 - C_H 3；(v i i) V_H - C_L；(v i i i) V_L - C_H 1；(i x) V_L - C_H 2；(x) V_L - C_H 3；(x i) V_L - C_H 1 - C_H 2；(x i i) V_L - C_H 1 - C_H 2 - C_H

50

3 ; (x i i i) $V_L - C_H2 - C_H3$; および (x i v) $V_L - C_L$ が含まれる。上記で列挙した例示的な構成のいずれかを含めた可変ドメインおよび定常ドメインの任意の構成において、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接連結される場合もあり、完全または部分的なヒンジ領域またはリンカー領域を介して連結される場合もある。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子内で隣接する可変ドメインおよび / または定常ドメインの間に、結果として可撓性または半可撓性の連結をもたらす、少なくとも2つの (例えば、5、10、15、20、40、60以上の) アミノ酸からなることが可能である。さらに、本発明の抗体の抗原結合断片は、互いと非共有結合的に会合し、および / または1つ以上の単量体の V_H ドメインもしくは V_L ドメインと非共有結合的に会合する (例えば、ジスルフィド結合を介して)、上記で列挙した可変ドメインおよび定常ドメインの構成のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体 (または他の多量体) も含み得る。

10

【0141】

完全抗体分子の場合と同様、抗原結合断片も、単一特異性の場合もあり、多重特異性 (例えば、二重特異性) の場合もある。抗体の多重特異性抗原結合断片は典型的に、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは、個別の抗原または同じ抗原における異なるエピトープに特異的に結合することが可能である。当技術分野で利用可能な日常的な技術を使用して、本明細書で開示される例示的な二重特異性抗体のフォーマットを含めた任意の多重特異性抗体フォーマットを、本発明の抗体の抗原結合断片の文脈における使用のために適合させることができる。

20

【0142】

ヒト抗体の調製

当技術分野では、トランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を作製する方法が公知である。任意のこのような公知の方法を、本発明の文脈で使用して、*C. difficile* の毒素Aおよび / または毒素Bに特異的に結合するヒト抗体を作ることができる。

【0143】

VELOCIMMUNE (登録商標) 法 (例えば、米国特許第6,596,541号明細書を参照のこと ; *Regeneron Pharmaceuticals*、*VELOCIMMUNE* (登録商標)) またはモノクローナル抗体を作製するための他の任意の公知の方法を使用して、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する、*C. difficile* の毒素Aおよび / または毒素Bに対する高親和性のキメラ抗体をまず単離する。*VELOCIMMUNE* (登録商標) 法は、マウスが、抗原刺激に反応してヒト可変領域およびマウス定常領域を含む抗体を作製するように、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスの作製を伴う。抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするDNAを単離し、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域をコードするDNAに作動可能に連結する。次いで、DNAを、完全ヒト抗体を発現することが可能な細胞内で発現させる。

30

【0144】

一般に、*VELOCIMMUNE* (登録商標) マウスを、対象の抗原で感作し、リンパ球 (B細胞など) を、抗体を発現させるマウスから回収する。リンパ球を骨髓腫細胞系と融合させて不死化ハイブリドーマ細胞系を調製することができ、このようなハイブリドーマ細胞系をスクリーニングおよび選択して、対象の抗原に対して特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を同定する。重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、重鎖および軽鎖の所望のアイソタイプ定常領域に連結することができ、このような抗体タンパク質は、CHO細胞などの細胞において生産することができる。あるいは、抗原特異的なキメラ抗体または軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードするDNAを、抗原特異的リンパ球から直接単離することもできる。

40

【0145】

まず、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性のキメラ抗体を単離する。以下の実験についての節で論じる通り、抗体を、親和性、選択性、エピトープなどを含め

50

た所望の特徴について特徴づけて選択する。マウス定常領域を、所望のヒト定常領域で置換して、本発明の完全ヒト抗体、例えば、野生型のIgG1もしくはIgG4または改変されたIgG1もしくはIgG4を作製する。選択した定常領域は特定の使用に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合特性および標的特異性は可変領域内に残る。

【0146】

一般に、本発明の抗体は、極めて高い親和性を保有し、典型的に、固相上に固定化されているかまたは溶液相中にある抗原に対する結合によって測定した場合に約 10^{-12} ~ 約 10^{-9} Mの K_D を保有する。マウス定常領域を、所望のヒト定常領域で置換して、本発明の完全ヒト抗体を作製する。選択した定常領域は特定の使用に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合特性および標的特異性は可変領域内に残る。

10

【0147】

生物学的同等物

本発明の抗毒素Aおよび抗毒素B抗体ならびに抗体断片は、記載される抗体のアミノ酸配列とは異なるが、毒素Aまたは毒素Bに結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。このような変異体の抗体および抗体断片は、親配列と比較して1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含むが、記載される抗体と本質的に同等な生物学的活性を示す。同様に、本発明の抗体をコードするDNA配列も、開示された配列と比較した場合、1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、または置換を含むが、本発明の抗体または抗体断片と生物学的に本質的に同等な抗体または抗体断片をコードする配列を包含する。

20

【0148】

2つの抗原結合タンパク質または抗体は、例えば、単回投与であれ、複数回投与であれ、類似の実験条件下において同じモル用量で投与した場合、それらの吸収速度および吸収度が有意差を示さない薬学的同等物または薬学的代替物であれば、生物学的に同等であると考えられる。一部の抗体は、それらの吸収度は同等であるが、それらの吸収速度が同等でなくとも、このような吸収速度の差異が意図的なものであり、表示において反映され、例えば、長期使用における有効な体内薬物濃度の達成には本質的でなく、特定の被験薬生成物にとって医学的に重要ではないと考えられるために生物学的に同等であると考えられれば、同等物または薬学的代替物と考えられる。

【0149】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、それらの安全性、純度、および効力において臨床的に有意な差異が認められなければ生物学的に同等である。

30

【0150】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、患者を、基準生成物と生物学的生成物との間で1回以上にわたり切り換え、このような切換えを伴わない連続療法と比較して臨床的に重要な免疫原性の変化または有効性の減殺を含めた、有害作用の危険性の予測される増大を伴わずにおくことが可能ならば、生物学的に同等である。

【0151】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、それらの両方が、1つ以上の使用条件に対して、1つ以上の共通の作用機構を介して作用するならば、このような機構が知られている限りにおいて、生物学的に同等である。

40

【0152】

生物学的同等性は、*in vivo*および/または*in vitro*の方法によって実証することができる。生物学的同等性の測定には、例えば、(a)抗体またはその代謝物の濃度を、血液、血漿、血清、または他の体液において時間の関数として測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験；(b)*in vivo*におけるヒトのバイオアベイラビリティデータと相関し、これを妥当な程度で予測する*in vitro*試験；(c)抗体の適切な急性の薬理学的効果（またはその標的）を時間の関数として測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験；および(d)抗体の安全性、有効性、またはバイオアベイラビリティもしくは生物学的同等性を確立する、十

50

分に制御された臨床試験が含まれる。

【0153】

本発明の抗体の生物学的に同等な変異体は、例えば、残基または配列の様々な置換を施すことによって構築することでもでき、生物学的活性に必要なでない末端または内部の残基または配列を欠失させることによって構築することでもできる。例えば、生物学的活性に本質的でないシステイン残基を欠失させるかまたは他のアミノ酸で置換して、復元した際の、不必要であるかまたは不適正な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することができる。他の文脈では、生物学的に同等な抗体は、この抗体のグリコシル化特性を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を消失させるかまたは除去する突然変異を含む抗体の変異体を包含し得る。

10

【0154】

抗体の生物学的特徴

一般に、本発明の抗体は、*C. difficile*の毒素Aもしくは毒素Bのいずれかに、または*C. difficile*の毒素Aおよび毒素Bの両方に（交差反応性抗体）、またはAもしくはBのいずれかの断片に結合することによって機能し得る。

【0155】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、*C. difficile*の毒素Aおよび/または毒素BのC末端受容体結合ドメインに少なくとも位置するエピトープに結合し得る。一実施形態では、抗体は、毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメインのアミノ酸残基1832~2710に及ぶ（これは、配列番号378のアミノ酸残基1832~2710に及ぶ）C末端領域に結合し得る。本発明のある特定の実施形態では、抗体は、配列番号375に示されている毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメインに結合し得る。本発明のある特定の実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン（この配列は、配列番号375に示されている）のアミノ酸残基468~863と相互作用し得るか、またはこれに結合し得る。本発明のある特定の実施形態では、抗体は、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468~488、配列番号375の残基510~530、配列番号375の残基602~610、配列番号375の残基644~703、配列番号375の残基724~794、配列番号375の残基799~814、および配列番号375の残基858~863からなる群より選択されるエピトープと相互作用し得るか、またはこれらに結合し得る。一実施形態では、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468~488、配列番号375の残基510~530、配列番号375の残基602~610、配列番号375の残基644~703、配列番号375の残基724~794、配列番号375の残基799~814、および配列番号375の残基858~863からなる群より選択されるエピトープに結合するか、またはこれらと相互作用する抗体は、配列番号146/154のHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。一実施形態では、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープであって、配列番号375の残基468~488、配列番号375の残基510~530、配列番号375の残基602~610、配列番号375の残基644~703、配列番号375の残基724~794、配列番号375の残基799~814、および配列番号375の残基858~863からなる群より選択されるエピトープに結合するか、またはこれらと相互作用する抗体は、*Clostridium difficile*の毒素Bに特異的に結合する第2の抗体と医薬組成物中で組み合わせられる。一実施形態では、*Clostridium difficile*の毒素Bと相互作用するか、またはこれに結合するこの第2の抗体は、配列番号274/282のHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアを含む。

20

30

40

【0156】

本発明のある特定の実施形態では、抗体は、配列番号380のおよそアミノ酸残基18

50

34～2366に及び毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメインに結合し得る。本発明のある特定の実施形態では、抗体は、配列番号376に示されている毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメインに結合し得る。

【0157】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、全長天然毒素Aタンパク質（このアミノ酸配列は配列番号378に示されており、配列番号377に示されている核酸配列によってコードされる）の任意の他の領域または断片に結合することによりC. difficileの毒素Aに関連する毒性を遮断または阻害することによって機能し得る。

【0158】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、全長天然毒素Bタンパク質（このアミノ酸配列は配列番号380に示されており、配列番号379に示されている核酸配列によってコードされる）の任意の他の領域または断片に結合することによりC. difficileの毒素Bに関連する毒性を遮断または阻害することによって機能し得る。

【0159】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、二重特異性抗体であり得る。本発明の二重特異性抗体は、毒素Aにおける1つのエピトープに結合し得、毒素Bにおける1つのエピトープにも結合し得る。ある特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、毒素Aにおける2つの異なるエピトープに結合し得る。ある特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、毒素Bにおける2つの異なるエピトープに結合し得る。ある特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、毒素Aまたは毒素Bのいずれか1つにおける同じドメイン内の2つの異なる部位に結合してもよいし、または毒素Aおよび毒素Bの両方における同じドメインに結合してもよい。

【0160】

一実施形態では、本発明は、C. difficileの毒素Aおよび毒素Bの両方のカルボキシ末端受容体結合ドメインに結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の1つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i) 配列番号18、34、50、66および82からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCVRを含む；(ii) 配列番号26、42、58、74および90からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCVRを含む；(iii) 配列番号24、40、56、72および88からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHC DR3ドメインと、配列番号32、48、64、80および96からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLC DR3ドメインとを含む；(iv) 配列番号20、36、52、68および84からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHC DR1ドメインと、配列番号22、38、54、70および86からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHC DR2ドメインと、配列番号28、44、60、76および92からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLC DR1ドメインと、配列番号30、46、62、78および94からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLC DR2ドメインとを含む；(v) 1

10

20

30

40

50

$0 \sim 9$ M以下の K_D で毒素Aおよび毒素Bに結合する。

【0161】

一実施形態では、本発明は、C . d i f f i c i l eの(毒素Bではなく)毒素Aに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の1つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i)配列番号2、98、114、130、146および162からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C V Rを含む；(i i)配列番号10、106、122、138、154および170からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するL C V Rを含む；(i i i)配列番号8、104、120、136、152および168からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C D R 3ドメインと、配列番号16、112、128、144、160および176からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するL C D R 3ドメインとを含む；(i v)配列番号4、100、116、132、148および164からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C D R 1ドメインと、配列番号6、102、118、134、150および166からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C D R 2ドメインと、配列番号12、108、124、140、156および172からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するL C D R 1ドメインと、配列番号14、110、126、142、158および174からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するL C D R 2ドメインとを含む；(v) $10 \sim 9$ M以下の K_D を示す；(v i)細胞生存率アッセイにおいて、約7 p M ~ 約65 p Mの範囲のI C 50で(32 p Mの濃度で)毒素Aの中和を示す。

【0162】

一実施形態では、本発明は、C . d i f f i c i l eの(毒素Aではなく)毒素Bに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、以下の特徴の1つ以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i)配列番号178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338および354からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C V Rを含む；(i i)配列番号186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346および362からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するL C V Rを含む；(i i i)配列番号184、200、216、232、248、264、280、296、312、328、344および360からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するH C D R 3ドメインと、配列番号192、208、224、240、256、272、288、304、320、336、352および368からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも

とも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR3ドメインとを含む；(iv)配列番号180、196、212、228、244、260、276、292、308、324、340および356からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR1ドメインと、配列番号182、198、214、230、246、262、278、294、310、326、342および358からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するHCDR2ドメインと、配列番号188、204、220、236、252、268、284、300、316、332、348および364からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR1ドメインと、配列番号190、206、222、238、254、270、286、302、318、334、350および366からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有するLCDR2ドメインとを含む；(v) 10^{-9} M以下の K_D を示す；(vi)細胞生存率アッセイにおいて、約25pM～約320pMの範囲のIC50で(0.03pMの濃度で)毒素Bの中和を示す。

10

20

30

40

50

【0163】

本発明のある特定の抗毒素Aまたは抗毒素B抗体は、*in vitro*または*in vivo*アッセイによって決定した場合に、*C. difficile*の毒素Aもしくは毒素Bのいずれかまたは両方に結合してその毒性を中和することができる。本発明の抗体が毒素に結合してその活性を中和する能力は、本明細書に記載されるように、結合アッセイまたは毒性中和(細胞死からの保護)アッセイを含む当業者に公知の任意の標準的な方法を使用して測定され得る。

【0164】

結合活性を測定するための非限定的な例示的*in vitro*アッセイは、本明細書の実施例4、5および6に示されている。実施例4および5では、表面プラズモン共鳴によってヒト抗毒素Aまたは抗毒素B抗体の結合親和性および速度定数を決定し、測定をT200 *Biacore* 機器で行った。実施例6では、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、結合研究を行った。実施例7では、*Ver o*細胞で中和バイオアッセイを開発して、毒素AまたはBと、毒素Aまたは毒素Bのいずれかに対する抗体とで処置した後の細胞生存率を検出した。

【0165】

本発明はまた、以下のタンパク質またはペプチド：配列番号378(全長毒素A)、配列番号378の残基番号1832～2710(毒素AのC末端ドメイン)；配列番号380(全長毒素B)、配列番号380の残基1834～2366；配列番号375(毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン)；または配列番号376のいずれかの少なくとも1つの生物学的に活性な断片に結合する抗毒素AまたはB抗体およびその抗原結合断片を含む。本発明はまた、*Clostridium difficile*によって産生される毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメイン内のエピトープと相互作用するか、またはこれに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記エピトープが、配列番号375のおよそ残基468～およそ863に及ぶ残基内に含まれる抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態では、毒素Aに結合する抗体のエピトープは、配列番号375の残基468～488、配列番号375の残基510～530、配列番号375の残基602～610、配列番号375の残基644～703、配列番号375の残基724～794、配列番号375の残基799～814、および配列番号375の残基858～863からなる群より選択される。本明細書に記載される毒素Aもしくは毒素Bペプチドまたはそれらの断片のいずれかは、抗毒素Aまたは抗毒素B抗体を作製するのに使用され得る。

【0166】

ペプチドは、タグ付けのための特定の残基、またはK L Hなどの担体分子へのコンジュゲーションを目的とする特定の残基の付加または置換を包含するように修飾することができる。例えば、ペプチドのN末端またはC末端にシステインを付加することもでき、リンカー配列を付加して、例えば、免疫感作のためにK L Hへとコンジュゲートされるペプチドを調製することもできる。毒素Aまたは毒素Bに対して特異的な抗体は、さらなる標識または部分を含む場合もあり、N末端またはC末端の標識または部分を含む場合もある。一実施形態では、標識または部分がビオチンである。結合アッセイでは、標識（存在する場合）の配置によって、ペプチドが結合する表面に対するペプチドの方向が決定され得る。例えば、表面をアビジンでコーティングする場合は、N末端にビオチンを含むペプチドを、ペプチドのC末端部分が表面に対して遠位となるように方向付ける。

10

【0167】

エピトープマッピングおよび関連技術

抗体がポリペプチドまたはタンパク質内の「1つ以上のアミノ酸と相互作用する」かを決定するために、当業者に公知の様々な技術を使用することができる。例示的な技術には、例えば、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) によって記載されるアッセイなど、日常的な交差遮断アッセイが挙げられ、これらを実施することができる。他の方法には、アラニン走査突然変異分析、ペプチドプロット分析 (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63)、ペプチド切断分析、結晶学的研究およびNMR分析が含まれる。加えて、エピトープの抽出、エピトープの抽出、および抗原の化学修飾などの方法も用いることができる (Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496)。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するのに使用され得る別の方法は、質量分析によって検出される水素/重水素交換である。一般的には、水素/重水素交換法は、目的のタンパク質を重水素標識し、続いて抗体を重水素標識タンパク質に結合させることを含む。次に、タンパク質/抗体複合体を水に移すと、抗体複合体によって保護されたアミノ酸内の交換可能なプロトンが、インターフェイスの一部ではないアミノ酸内の交換可能なプロトンよりも遅い速度で重水素-水素逆交換を受ける。その結果、タンパク質/抗体インターフェイスの一部を形成するアミノ酸は重水素を保持し得るので、インターフェイスに含まれないアミノ酸と比較して相対的に高い質量を示す。抗体の解離の後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析に供することにより、抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識残基が明らかになる。例えば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2): 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265Aを参照のこと。

20

30

【0168】

「エピトープ」という用語は、B細胞および/またはT細胞がそれに対して応答する、抗原における部位を指す。B細胞エピトープは、隣接アミノ酸から形成される場合もあり、タンパク質の三次フォールディングによって並置される非隣接アミノ酸から形成される場合もある。隣接アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒へと曝露しても保持されるが、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒で処理すると失われる。エピトープは、典型的に、固有の空間配座にある少なくとも3つのアミノ酸、より通常には少なくとも5または8~10アミノ酸を包含する。

40

【0169】

また、抗原構造ベースの抗体プロファイリング (ASAP) としても公知の修飾支援プロファイリング (MAP) は、各抗体の、化学的または酵素的に修飾された抗原表面への結合プロファイルの類似性を介して、同じ抗原を指向する多数のモノクローナル抗体 (mAb) を分類する方法である (米国特許出願公開第2004/0101920号明細書)。各類型は、別の類型によって表されるエピトープと顕著に異なるかまたは部分的に重複

50

する固有のエピトープを反映し得る。この技術は、遺伝子的に異なる抗体に対して特性決定の焦点を当てることができるように、遺伝子的に同一な抗体の迅速なフィルタリングを可能とする。ハイブリドーマスクリーニングに適用した場合、MAPは、所望の特徴を有するmAbを産生する、まれなハイブリドーマクロンの同定を容易にし得る。MAPを使用して、本発明の抗体を、異なるエピトープに結合する抗体の群へと選別することができる。

【0170】

ある特定の実施形態では、抗毒素Aもしくは抗毒素B抗体またはそれらの抗原結合断片は、図1に例示されている領域、または配列番号378もしくは380、または毒素Aもしくは毒素Bのカルボシキ末端受容体結合ドメインの少なくとも1つのいずれか1つの中のエピトープまたはその断片に結合し、毒素Aのカルボシキ末端受容体結合ドメインは配列番号375に示されており、毒素Bのカルボシキ末端受容体結合ドメインは配列番号376に示されている。

10

【0171】

本発明は、本明細書の表1に記載される具体的な例示抗体のいずれかと同じエピトープに結合する抗毒素Aまたは抗毒素B抗体を包含する。同様に、本発明はまた、毒素Aもしくは毒素Bまたは毒素Aもしくは毒素Bの断片への結合について、本明細書の表1に記載される具体的な例示抗体のいずれかと競合する抗毒素Aまたは抗毒素B抗体も包含する。

【0172】

抗体が、基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体と同じエピトープに結合するか、または基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体と結合について競合するかは、当技術分野で公知の日常的方法を使用することによって容易に決定することができる。例えば、試験抗体が、本発明の基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体と同じエピトープに結合するかを決定するには、基準抗体を、飽和条件下で毒素AもしくはBタンパク質または毒素AもしくはBペプチドに結合させる。次に、試験抗体が毒素AまたはB分子に結合する能力を評価する。試験抗体が、基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体との飽和結合の後で、毒素AまたはBに結合することが可能であれば、この試験抗体は、基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。他方、試験抗体が、基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体との飽和結合の後で、毒素AまたはB分子に結合することが可能でなければ、この試験抗体は、本発明の基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体が結合したエピトープと同じエピトープに結合し得る。

20

30

【0173】

抗体が、基準抗毒素Aまたは抗毒素B抗体と結合について競合するかを決定するには、上記の結合法を以下の2つの方向で実施する：第1の方向では、基準抗体を飽和条件下で毒素AまたはB分子に結合させた後で、試験抗体の毒素AまたはB分子への結合について評価する。第2の方向では、試験抗体を飽和条件下で毒素AまたはB分子に結合させた後で、基準抗体の毒素AまたはB分子への結合について評価する。両方の方向において、第1の（飽和）抗体だけが毒素AまたはB分子に結合することが可能な場合は、試験抗体と基準抗体とが毒素またはBへの結合について競合すると結論される。当業者によって認識される通り、基準抗体と結合について競合する抗体は、必ずしも基準抗体と同一なエピトープに結合し得るわけではなく、重複または隣接するエピトープに結合することによって、基準抗体の結合を立体的に遮断する場合もある。

40

【0174】

2つの抗体の各々が他方の抗体の抗原への結合を競合的に阻害（遮断）する場合、これらの抗体は同じエピトープまたは重複エピトープに結合する。すなわち、他方の抗体に対して1、5、10、20、または100倍過剰な一方の抗体は、競合的結合アッセイにおいて測定した場合に、少なくとも50%であるが、好ましくは75%、90%、さらにまたは99%結合を阻害する（例えば、Jung et al., Cancer Res. 1990; 50:1495-1502を参照のこと）。あるいは、一方の抗体の結合を低減するかまたは消失させる、抗原における本質的にすべてのアミノ酸突然変異が、他方の抗体

50

の結合も低減するかまたは消失させる場合、2つの抗体は、同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を低減するかまたは消失させる一部のアミノ酸突然変異が、他方の抗体の結合も低減するかまたは消失させる場合、2つの抗体は、重複エピトープを有する。

【0175】

次いで、さらなる日常的な実験（例えば、ペプチドの突然変異分析および結合分析）を実施して、観察される試験抗体の結合の欠如が、実のところ、基準抗体と同じエピトープへの結合に起因しているのか、または立体的遮断（または別の現象）が、観察される結合の欠如の一因であるのかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野で利用可能な他の任意の定量的もしくは定性的な抗体結合アッセイを使用して実施することができる。

10

【0176】

イムノコンジュゲート

本発明は、*C. difficile*による一次感染の重症度を軽減することができるか、または*C. difficile*感染症に関連する少なくとも1つの症候（下痢もしくは大腸炎またはそれらの重症度を含む）を改善することができる薬剤などの治療部分にコンジュゲートされたヒト抗毒素Aまたは抗毒素Bモノクローナル抗体（「イムノコンジュゲート」）を包含する。このような薬剤は、*C. difficile*の毒素Aもしくは毒素Bのいずれかまたは両方に対する第2の異なる抗体、またはトキシド、または*C. difficile*ワクチンであり得る。抗毒素Aまたは抗毒素B抗体にコンジュゲートされ得る治療部分の種類は、処置すべき症状および達成すべき所望の治療効果を考慮する。あるいは、所望の治療効果が、*C. difficile* infection感染症または限定されないが偽膜性大腸炎などの任意の感染症から生じる他の任意の症状に関連する続発症または症候を処置することである場合は、その症状の続発症または症候を処置するのに適切な薬剤をコンジュゲートすること、または本発明の抗体の任意の副作用を緩和することも有利であり得る。当技術分野では、イムノコンジュゲートを形成するのに適する薬剤の例が公知であり、例えば、国際公開第05/103081号を参照のこと。

20

【0177】

多重特異性抗体

本発明の抗体は、単一特異性の場合もあり、二重特異性の場合もあり、多重特異性の場合もある。多重特異性抗体とは、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的な場合もあり、複数の標的ポリペプチドに対して特異的な抗原結合ドメインを含有する場合もある。例えば、Tuttlら、1991, *J. Immunol.* 147: 60-69; Kuferrら、2004, *Trends Biotechnol.* 22: 238-244を参照のこと。本発明の抗体は、別の機能的分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結することもでき、これと共発現させることもできる。例えば、抗体またはその断片は、別の抗体または抗体断片などの1つ以上の他の分子の実体に機能的に連結して（例えば、化学的連結、遺伝子融合、非共有結合的会合を介して、または別の形で）、第2の結合特異性を伴う二重特異性抗体または多重特異性抗体を作製することができる。例えば、本発明は、免疫グロブリンの一方のアームが、*C. difficile*の毒素Aまたはその断片に対して特異的であり、免疫グロブリンの他方のアームが、*C. difficile*の毒素Bまたは第2の治療標的に対して特異的であるかまたは治療用部分にコンジュゲートされた二重特異性抗体を包含する。本発明のある特定の実施形態では、免疫グロブリンの一方のアームが、毒素AのC末端ドメインにおけるエピトープまたはその断片に対して特異的であり、免疫グロブリンの他方のアームが、毒素BのC末端ドメインにおけるエピトープまたはその断片に対して特異的である。

30

40

【0178】

本発明の文脈で使用され得る例示的な二重特異性抗体のフォーマットは、第1の免疫グロブリン(Ig) C_H3ドメインおよび第2のIg C_H3ドメインであって、この第1および第2のIg C_H3ドメインは互いに少なくとも1つのアミノ酸が異なり、少なくとも1つのアミノ酸差異により、この二重特異性抗体のプロテインAへの結合が、このア

50

ミノ酸差異を欠く二重特異性抗体の場合と比較して低減される、第1および第2のIg C_{H3}ドメインの使用を伴う。一実施形態では、第1のIg C_{H3}ドメインは、プロテインAに結合し、第2のIg C_{H3}ドメインは、H95R修飾(IMG Tのエクソン番号付けによる; EUの番号付けではH435R)など、プロテインAへの結合を低減するかまたは消失させる突然変異を含有する。第2のC_{H3}はさらに、Y96F修飾(IMG Tによる; EUではY436F)を含み得る。第2のC_{H3}内に見出され得るさらなる修飾にはIg G1抗体の場合のD16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I(IMG Tによる; EUではD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I); Ig G2抗体の場合のN44S、K52N、およびV82I(IMG T; EUではN384S、K392N、およびV422I); ならびにIg G4抗体の場合のQ15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I(IMG Tによる; EUではQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I)が含まれる。上記の二重特異性抗体のフォーマットにおける変化は、本発明の範囲内で想定される。

10

20

30

40

50

【0179】

治療的投与および製剤

本発明は、本発明の抗毒素Aまたは抗毒素B抗体またはそれらの抗原結合断片を含む治療用組成物を提供する。本発明に従う治療用組成物の投与は、導入、送達、忍容性などの改善をもたらすために製剤に組み込まれる、適切な担体、賦形剤、および他の薬剤と共に施される。適切な製剤の大半は、すべての製薬化学者に公知の処方集である、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAにおいて見出すことができる。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、蠟、油、脂質、脂質(カチオン性脂質またはアニオン性脂質)を含有する小胞(LIPOFECTIN(商標)など)、DNAコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油エマルジョンおよび油中水エマルジョン、カーボワックスエマルジョン(様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、およびカーボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Powellら、"Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311も参照のこと。

【0180】

本発明の各抗体の用量は、投与される対象の年齢および大きさ、標的疾患、標的状态、投与経路などに応じて変化させることができる。患者におけるC. difficile感染症を処置するため、または患者におけるC. difficile感染症に関連する1つ以上の症候、例えば、C. difficile感染症に関連する下痢または大腸炎を処置するため、または前記疾患の再燃を予防するため、または前記疾患の重症度を低減するために本発明の抗体を使用する場合、本発明の各抗体を、通常は、約0.01~約30mg/kg体重、より好ましくは約0.1~約20mg/kg体重、または約0.1~約15mg/kg体重、または約0.02~約7mg/kg体重、または約0.03~約5mg/kg体重、または約0.05~約3mg/kg体重、または約1mg/kg体重、または約3.0mg/kg体重、または約10mg/kg体重、または約20mg/kg体重の単回投与で静脈内投与または皮下投与することが有利である。必要に応じて、複数回投与が行われ得る。症状の重症度に応じて、処置の頻度および持続期間を調整することができる。ある特定の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも約0.1mg~約800mg、約1~約600mg、約5~約300mg、または約10~約150mg、約10~約100mg、もしくは約10~約50mgの初回投与として投与することができる。ある特定の実施形態では、初回投与の後、初回投与の量とほぼ同じかこれ未満であり得る量で、抗体またはその抗原結合断片の2回目の投与または後続の複数回の投与を行うことができるが、後続の投与は、少なくとも1日間~3日間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間

、少なくとも6週間、少なくとも7週間、少なくとも8週間、少なくとも9週間、少なくとも10週間、少なくとも12週間、または少なくとも14週間隔てる。

【0181】

例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、突然変異体ウイルスを発現させることが可能な組換え細胞、受容体を介するエンドサイトーシスなどの様々な送達系が公知であり、これらを使用して、本発明の医薬組成物を投与することができる（例えば、Wuら、(1987) J. Biol. Chem. 262: 4429 - 4432を参照のこと）。導入法には、皮内経路、経皮経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、硬膜外経路、および経口経路が含まれるがこれらに限定されない。組成物は、任意の好都合な経路を介して、例えば、注入またはボーラス注入を介して、上皮または皮膚粘膜の内壁（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、および腸粘膜など）を介する吸収によって投与することができ、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与することができる。投与は、全身投与の場合もあり、局所投与の場合もある。

10

【0182】

医薬組成物はまた、小胞、特に、リポソームによって送達することもできる（例えば、Langer (1990) Science 249: 1527 - 1533を参照のこと）。

【0183】

ある特定の状況下では、医薬組成物を、制御放出系によって送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる。さらに別の実施形態では、制御放出系を組成物の標的に近接して設置するため、全身投与用量の一部しか必要としない。

20

【0184】

注射用調製物は、静脈内注射用、皮下注射用、皮内注射用、および筋肉内注射用、滴下注入用などの剤形を包含し得る。これらの注射用調製物は、公知の方法を介して調製することができる。例えば、注射用調製物は、例えば、上記で記載した抗体またはその塩を、注射に通常使用される滅菌の水性媒体または油性媒体中に溶解、懸濁、または乳化させることによって調製することができる。注射用の水性媒体としては、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤 [例えば、ポリソルベート80、HCO-50（水素化したヒマシ油のポリオキシエチレン（50モル）付加物）] などの適切な可溶化剤と組み合わせ使用し得る、生理食塩液、グルコースおよび他の補助剤などを含有する等張性溶液が存在する。油性媒体としては、例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどの可溶化剤と組み合わせ使用し得るゴマ油、ダイズ油などが用いられる。こうして調製された注射液は、好ましくは適切なアンプル内に充填する。

30

【0185】

本発明の医薬組成物は、標準的な注射針およびシリンジによって、皮下送達することもでき、静脈内送達することもできる。加えて、皮下送達に関しては、本発明の医薬組成物を送達するのに、ペン型送達デバイスの適用が容易である。このようなペン型送達デバイスは、反復使用式の場合もあり、使い捨て式の場合もある。反復使用式のペン型送達デバイスは一般に、医薬組成物を含有する交換式カートリッジを用いる。カートリッジ内のすべての医薬組成物を投与して、カートリッジが空になったら、空のカートリッジは、容易に廃棄し、医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換することができる。こうして、ペン型送達デバイスを反復使用することができる。使い捨て式のペン型送達デバイスには、交換式カートリッジがない。代わりに、使い捨て式のペン型送達デバイスには、デバイス内の容器に保持された医薬組成物があらかじめ充填されている。医薬組成物の容器が空になったら、デバイス全体を廃棄する。

40

【0186】

本発明の医薬組成物の皮下送達では、多数の反復使用式ペン型送達デバイスおよび自己注射式送達デバイスが適用される。ごく少数を挙げれば、例には、AUTOPEN（商標

50

) (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC (商標) ペン (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25 (商標) ペン、HUMALOG (商標) ペン、HUMALIN 70/30 (商標) ペン (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEIN (商標) I, II および III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEIN JUNIOR (商標) (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD (商標) ペン (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN (商標)、OPTIPEN PRO (商標)、OPTIPEN STARLET (商標)、および OPTICLIK (商標) (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany) が含まれるが必ずしもこれらに限定されない。ごく少数を挙げれば、本発明の医薬組成物の皮下送達で適用される使い捨て式ペン型送達デバイスの例には、SOLOSTAR (商標) ペン (sanofi-aventis)、FLEXPEN (商標) (Novo Nordisk)、および KWIKPEN (商標) (Eli Lilly)、SURECLICK (商標) Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET (商標) (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) および HUMIRA (商標) ペン (Abbott Labs, Abbott Park, IL) が含まれるが必ずしもこれらに限定されない。

10

20

【0187】

上記の経口用医薬組成物または非経口用医薬組成物は、有効成分の用量を近似するのに適する単位用量剤形へと調製すると有利である。このような単位用量剤形には、例えば、錠剤、丸薬、カプセル、注射剤 (アンプル)、坐剤などが含まれる。含有される前述の抗体の量は一般に、1 単位用量剤形当たり約 5 ~ 約 500 mg であり、とりわけ注射形態では、前述の抗体を約 5 ~ 約 100 mg 含有し、他の剤形では約 10 ~ 約 250 mg 含有することが好ましい。

【0188】

投与計画

本発明のある特定の実施形態によれば、複数用量の Clostridium difficile の毒素 A および / または B に対する抗体が、規定の時間経過にわたって被験体に投与され得る。本発明のこの態様の方法は、複数用量の毒素 A および / または B に対する抗体を被験体に連続投与することを含む。本明細書で使用される場合、「連続投与」は、各用量の毒素 A および / または B に対する抗体を、異なる時点 (例えば、所定の間隔 (例えば、数時間、数日間、数週間または数カ月間) で区切られた異なる日) に被験体に投与することを意味する。本発明は、単一の初回用量の毒素 A および / または B に対する抗体、続いて 1 つ以上の第 2 回用量の毒素 A および / または B に対する抗体、そして場合により続いて 1 つ以上の第 3 回用量の毒素 A および / または B に対する抗体を患者に連続投与することを含む方法を含む。

30

【0189】

「初回用量」、「第 2 回用量」および「第 3 回用量」という用語は、毒性 A および / または B に対する抗体の投与の時系列をいう。したがって、「初回用量」は、処置計画の開始時に投与される用量 (「ベースライン用量」とも称される) であり; 「第 2 回用量」は、初回用量の後に投与される用量であり; そして「第 3 回用量」は、第 2 回用量の後に投与される用量である。初回、第 2 回、および第 3 回用量はすべて、同じ量の毒性 A および / または B に対する抗体を含有していてもよいが、投与頻度の観点から一般的に互いに異なるものであり得る。しかしながら、ある特定の実施形態では、初回、第 2 回および / または第 3 回用量に含まれる毒性 A および / または B に対する抗体の量は、処置過程の間互に変動するものとなる (例えば、必要に応じて増減調整される)。ある特定の実施形態では、2 回以上 (例えば、2 回、3 回、4 回または 5 回) の用量を「ローディング用量」

40

50

として処置計画の開始時に投与し、続いて、その後の用量をより少ない頻度で投与する（「維持用量」）。

【0190】

本発明の例示的な実施形態では、各第2回および/または第3回用量は、直前の用量の1～26（例えば、1、 $1^1/2$ 、2、 $2^1/2$ 、3、 $3^1/2$ 、4、 $4^1/2$ 、5、 $5^1/2$ 、6、 $6^1/2$ 、7、 $7^1/2$ 、8、 $8^1/2$ 、9、 $9^1/2$ 、10、 $10^1/2$ 、11、 $11^1/2$ 、12、 $12^1/2$ 、13、 $13^1/2$ 、14、 $14^1/2$ 、15、 $15^1/2$ 、16、 $16^1/2$ 、17、 $17^1/2$ 、18、 $18^1/2$ 、19、 $19^1/2$ 、20、 $20^1/2$ 、21、 $21^1/2$ 、22、 $22^1/2$ 、23、 $23^1/2$ 、24、 $24^1/2$ 、25、 $25^1/2$ 、26、 $26^1/2$ またはそれ以上）週間後に投与される。本明細書で使用される場合、「直前の用量」という語句は、複数回投与の過程において、その過程における直近の用量の投与前に、用量を間に入れずに患者に投与される毒性Aおよび/またはBに対する抗体の用量を意味する。

10

【0191】

本発明のこの態様の方法は、任意の数の第2回および/または第3回用量の毒性Aおよび/またはBに対する抗体を患者に投与する工程を含み得る。例えば、ある特定の実施形態では、単一の第2回用量のみが患者に投与される。他の実施形態では、2つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上）の第2回用量が患者に投与される。同様に、ある特定の実施形態では、単一の第3回用量のみが患者に投与される。他の実施形態では、2つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上）の第3回用量が患者に投与される。

20

【0192】

複数の第2回用量を含む実施形態では、各第2回用量は、他の第2回用量と同じ頻度で投与され得る。例えば、各第2回用量は、直前の用量の1～2週間後患者に投与され得る。同様に、複数の第3回用量を含む実施形態では、各第3回用量は、他の第3回用量と同じ頻度で投与され得る。例えば、各第3回用量は、直前の用量の2～4週間後患者に投与され得る。あるいは、第2回および/または第3回用量が患者に投与される頻度は、処置計画の過程にわたって変動し得る。また、投与頻度は、臨床検査の後、個々の患者の必要性に応じて、処置の過程の間医師によって調整され得る。

【0193】

30

抗体の治療的使用

C . d i f f i c i l e の毒素Aおよび/または毒素Bとの相互作用により、本抗体は、C . d i f f i c i l e 原発性疾患もしくは症状、または前記疾患もしくは症状に関連する少なくとも1つの症候（例えば、下痢または大腸炎）を処置するため、または疾患再燃を予防するため、または疾患再発の重症度、持続期間および/もしくは頻度を低減するために有用である。本発明の抗体はまた、C . d i f f i c i l e 感染症を発症または罹患するリスクを有する患者における予防的使用について企図される。これらの患者には、高齢者（例えば、65歳以上の者）、または疾患によりまたは免疫抑制治療薬の処置により免疫無防備状態である患者、または患者をC . d i f f i c i l e 感染症にかかりやすくする基礎病状（例えば、癌、炎症性腸疾患、腹水貯留を有する肝移植前患者）を有し得る患者、または長期間（例えば、いくつかの場合では、この期間は、2日間または3日間ほど変化し得るが、一般には1週間から2週間またはそれ以上であり得る）の入院（これは、患者を院内感染に罹患しやすくする）患者、または広域抗生物質で長期間（14日以上）処置されている患者（いくつかの場合では、患者は、整腸されなければ24時間以内に感染症に罹患し得るが、他の場合では、これはより長い、例えば1週間以上であり得る）、または胃腸障害を処置するためのプロトンポンプ阻害剤による治療中の患者が含まれる。本発明の抗体は単独で、またはC . d i f f i c i l e 感染症を処置するための、もしくはC . d i f f i c i l e 感染症に関連する少なくとも1つの症候もしくは合併症（例えば、このような感染症に関連するかまたはこれに起因する下痢または大腸炎）を緩和するための第2の薬剤もしくは第3の薬剤と併せて使用され得ると企図される。第2ま

40

50

たは第3の薬剤を本発明の抗体と同時に送達してもよいし、またはそれらを本発明の抗体の前後いずれかに別個に投与してもよい。

【0194】

本発明のまたさらなる実施形態では、本抗体は、*Clostridium difficile*の臨床関連超毒性株によって引き起こされる感染症、または*C. difficile*感染症に関連する下痢および大腸炎を含む*C. difficile*感染症を患っている患者を処置するための医薬組成物を調製するのに使用される。本発明のさらに別の実施形態では、本抗体は、*C. difficile*による一次感染の重症度を軽減するための、または*C. difficile*による再発の重症度、持続期間および/もしくは回数を軽減するための医薬組成物を調製するのに使用される。本発明のさらなる実施形態では、本抗体は、プロバイオティク、抗生物質、トキシイド、ワクチン、または当業者に公知の任意の他の緩和療法を含む*C. difficile*感染症を処置するのに有用な任意の他の薬剤との補助療法として使用される。

10

【0195】

併用療法

ある特定の実施形態によれば、本発明の方法は、*Clostridium difficile*の毒素Aおよび/または毒素Bに対する抗体と組み合わせて1つ以上のさらなる治療剤を被験体に投与することを含む。本明細書で使用される場合、「組み合わせて」という表現は、さらなる治療剤が、抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の前、その後またはそれと同時に投与されることを意味する。「組み合わせて」という用語はまた、抗毒素Aおよび/またはB抗体ならびに第2の治療剤の連続または同時投与を含む。

20

【0196】

例えば、抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の「前」に投与される場合、さらなる治療剤は、抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の投与の約72時間、約60時間、約48時間、約36時間、約24時間、約12時間、約10時間、約8時間、約6時間、約4時間、約2時間、約1時間、約30分、約15分または約10分前に投与され得る。抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の「後」に投与される場合、さらなる治療剤は、抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の投与の約10分、約15分、約30分、約1時間、約2時間、約4時間、約6時間、約8時間、約10時間、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間または約72時間後に投与され得る。抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物との「同時」投与は、さらなる治療剤が、抗毒素Aおよび/またはB抗体を含む医薬組成物の投与（前、後、または同時）の5分未満以内に別個の剤形で被験体に投与されるか、またはさらなる治療剤ならびに抗毒素Aおよび/またはB抗体の両方を含む単一複合投与製剤として被験体に投与されることを意味する。

30

【0197】

併用療法は、本発明の抗毒素Aまたは抗毒素B抗体と、本発明の抗体または本発明の抗体の生物学的に活性な断片と有利に組み合わせられ得るさらなる治療剤とを含み得る。

【0198】

例えば、*C. difficile*に関して静菌性または殺菌性の抗生物質などの第2または第3の治療剤は、腸内の細菌負荷を減少させるのを助けるために用いられ得る。例示的な抗生物質には、バンコマイシン、メトロニダゾールまたはフィダキソマイシンが含まれる。抗体はまた、他の治療法、例えば、トキシイド、*C. difficile*に対して特異的なワクチンまたはプロバイオティック剤、例えば*Saccharomyces boulardii*と併せて使用され得る。

40

【0199】

抗体の診断的使用

本発明の抗毒素Aまたは抗毒素B抗体はまた、例えば、診断目的で、試料中の毒素AまたはBを検出および/または測定するのに使用することができる。*C. difficile*によって引き起こされると考えられる感染症の確認は、本発明の抗体の1つ以上を使

50

用して、毒素 A または毒素 B のいずれかの存在を測定することによって行うことができる
と予測される。毒素 A または毒素 B についての例示的な診断アッセイは、例えば、患者か
ら得た試料を本発明の抗毒素 A または抗毒素 B 抗体と接触させる工程を含むことが可能で
あり、抗毒素 A または抗毒素 B 抗体を、検出可能な標識もしくはレポーター分子で標識す
るか、または毒素 A または毒素 B タンパク質を患者試料から選択的に単離するための捕捉
リガンドとして使用する。あるいは、診断適用では、標識されていない抗毒素 A または抗
毒素 B 抗体を、それ自体検出可能に標識された二次抗体と組み合わせて使用することもで
きる。検出可能な標識またはレポーター分子は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または
 ^{125}I などの放射性同位体の場合もあり、イソチオシアン酸フルオレセインまたはロダ
ミンなどの蛍光部分または化学発光部分の場合もあり、アルカリホスファターゼ、 β -ガラ
クトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、またはルシフェラーゼなどの酵素の場合
もある。試料中の毒素 A または毒素 B を検出または測定するのに使用され得る特定の例示
的アッセイには、酵素免疫測定アッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A
)、および蛍光活性化細胞分取 (F A C S) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0200】

本発明による *C. difficile* 診断アッセイにおいて使用され得る試料には、正
常状態下または病理学的状態下において、検出可能量の *C. difficile* の毒素 A
もしくは毒素 B タンパク質またはその断片を含有する、患者から得られた任意の組織試料
または体液試料が含まれる。一般に、健常な患者 (例えば、*C. difficile* の存在に
関連する疾患または症状に罹患していない患者) から得られた特定の試料における毒
素 A または毒素 B レベルを測定して、まず *C. difficile* 由来の毒素 A または毒
素 B のベースラインレベルまたは基準レベルを確立する。次いで、毒素 A または毒素 B の
このベースラインのレベルを、*C. difficile* に関連する疾患もしくは症状、ま
たはこのような疾患もしくは症状に関連する症候を有することが疑われる個体から得られ
た試料中で測定された毒素 A または毒素 B レベルに対して比較することができる。

【実施例】

【0201】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物の作製および使用法についての完全な開示
および説明を当業者に提供するために示すものであり、本発明者らが自らの発明とみなす
ものの範囲を限定することを意図するものではない。使用される数字 (例えば、量、温度
など) に関する精度を確保しようと努めはするが、実験的な誤差および偏差を考慮すべき
である。別段に示さない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂
氏温度であり、圧力は大気圧またはその近傍である。

【0202】

実施例 1. *Clostridium difficile* の毒素 A および / または毒素 B
に対するヒト抗体の作製

C. difficile の毒素 A および / または毒素 B に対する抗体の作製するために
、以下のいずれか 1 つを含む免疫原を使用することができる。ある特定の実施形態では、
本発明の抗体は、主な免疫原、例えば、*C. difficile* 由来の天然の全長不活性化
毒素 A (GenBank アクセッション番号 C A A 6 3 5 6 4 (配列番号 3 7 8) を参
照のこと) および / もしくは毒素 B (GenBank アクセッション番号 C A J 6 7 4 9
2 (配列番号 3 8 0) を参照のこと)、または前記毒素もしくは毒素断片もしくはトキシ
ノイドの組換え不活性型で免疫感作し、続いて、第 2 の免疫原または前記天然毒素の免疫原
活性断片で免疫感作したマウスから得られる。不活性化毒素 A のみもしくは不活性化毒素
B のみのいずれかで動物を免疫感作してもよいし、または不活性化毒素 A および不活性化
毒素 B の両方で同時に免疫感作してもよい。免疫原として使用する前に、ホルムアルデヒ
ド、グルタルアルデヒド、過酸化物による処理または酸素処理を含む標準的なトキシノイド
調製手順を使用して毒素を不活性化することができる (Relyveldら、Methods in Enzymology, 93: 24, 1983、Woodrow and
Levine, eds. New Generation Vaccines, Marce

l Dekker, Inc., New York, 1990)。別の不活性化手段は、UDP-ジアルデヒド（これは、他の不活性化法と比較して毒素の天然構造を維持し、それにより、天然毒素とより反応性の抗体を誘導する可能性を高めるように作用し得る）の使用によるものである（Genthら、（2000）、Infect. Immun. 68（3）：1094-1101）。あるいは、標準的な組換え技術を使用して、減少した毒性を示すC. difficile由来の突然変異体毒素を生産し、免疫原として使用してもよい（例えば、米国特許第5,085,862号明細書；米国特許第5,221,618号明細書；米国特許第5,244,657号明細書；米国特許第5,332,583号明細書；米国特許第5,358,868号明細書；および米国特許第5,433,945号明細書を参照のこと）。このような突然変異体は、毒素の活性部位に欠失または点突然変異を含有し得る。

10

【0203】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、天然毒素Aもしくは毒素Bの生物学的に活性なおよび／もしくは免疫原性の断片、またはそれらの活性断片をコードするDNAなどの主な免疫原で免疫感作したマウスから得られる。ある特定の実施形態では、免疫原は、毒素Aおよび／もしくは毒素BのN末端もしくはC末端由来のペプチド、または毒素Aおよび／もしくは毒素BのNもしくはC末端ペプチド由来の断片であり得る。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号378のおよそアミノ酸残基1832～2710に及ぶ毒素Aのカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号375に示されている毒素Aのカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号380のおよそアミノ酸残基1834～2366に及ぶ毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメインである。本発明のある特定の実施形態では、免疫原は、配列番号376に示されている毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメインである。

20

【0204】

したがって、一実施形態では、本発明の抗体は、不活化全長毒素A（トキシイド）もしくは不活化全長毒素B（トキシイド）のいずれかまたは両方のトキシイドで免疫感作したマウスから得られた。さらに、一実施形態では、抗体は、C. difficileの毒素Aのカルボキシ末端受容体結合ドメイン由来のアミノ酸配列を含むポリペプチドで、もしくはC. difficileの毒素Bのカルボキシ末端受容体結合ドメイン由来のアミノ酸配列を含むポリペプチドで、またはその両方で同時に免疫感作したマウスから得られた。

30

【0205】

ある特定の実施形態では、C. difficileの毒素Aまたは毒素Bに特異的に結合する抗体は、上記領域の断片、または本明細書に記載される領域のNもしくはC末端のいずれかまたは両方から前記指定領域を約5～約20個のアミノ酸残基分延長したペプチドを使用して調製され得る。ある特定の実施形態では、上記領域またはその断片の任意の組み合わせが、毒素Aまたは毒素B特異的抗体の調製に使用され得る。ある特定の実施形態では、毒素Aもしくは毒素Bの上記領域またはそれらの断片のいずれか1つ以上が、単一特異性、二重特異性または多重特異性抗体を調製するのに使用され得る。

40

【0206】

上記のように、免疫原として使用した全長タンパク質またはそのカルボキシ末端断片を、免疫反応を刺激するアジュバントと共に、ヒト免疫グロブリンの重鎖可変領域およびカッパ軽鎖可変領域をコードするDNAを含むVELOCIMMUNE（登録商標）マウスに直接投与した。C. difficile毒素Aおよび／または毒素B特異的イムノアッセイによって、抗体免疫反応をモニタリングした。所望の免疫反応を達成したら、脾臓細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合させてそれらの生存能を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。C. difficile毒素Aおよび／または毒素B特異的抗体を産生する細胞株を同定するために、ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングおよび選択した。この技術および上記の様々な免疫原を使用して、複数の抗C. difficile毒素A

50

および毒素 B、ならびに交差反応性キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを保有する抗体）を得、このようにして作製したある特定の例示的な抗体を、H1H3067N、H1H3134N、H1H3117N、H1M3123N、H1M3121NおよびH1M3124Nと命名した。

【0207】

また、米国特許出願公開第2007/0280945号明細書に記載されているように、骨髓腫細胞との融合を用いずに、抗原陽性B細胞から抗C.d i f f i c i l e毒素Aおよび毒素B抗体を直接単離した。この方法を使用して、いくつかの完全ヒト抗C.d i f f i c i l e毒素Aおよび毒素B抗体（すなわち、ヒト可変ドメインおよびヒト定常ドメインを有する抗体）を得た；このようにして作製した例示的な抗体を以下のように命名した：H1H3328P、H1H3324P、H1H3325P、H1H3330P、H1H3350P、H1H3347P、H1H3335P、H1H3344P、H1H3339P、H1H3337P、H1H3343P、H1H3411P、H1H3354P、H1H3317P、H1H3355P、H1H3394PおよびH1H3401P。

10

【0208】

本実施例の方法にしたがって作製した例示的な抗体の生物学的特性を以下に記載の実施例で詳細に説明する。

【0209】

実施例2．重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列

表1には、C.d i f f i c i l e由来の毒素Aおよび/または毒素Bに対して特異的な選択抗体の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列ペア、ならびにそれらの対応する抗体識別子が記載されている。抗体は、典型的には、本明細書では以下の命名法にしたがって称される：Fcの接頭辞（例えば、「H4H」、「H1M」、「H2M」）、続いて番号識別子（例えば、表1に示されている「3117」）、続いて「P」または「N」の接尾辞。したがって、この命名法によれば、抗体は、例えば、「H1H3117」と称され得る。本明細書で使用される抗体名称のH4H、H1MおよびH2Mという接頭辞は、抗体の特定のFc領域を示す。例えば、「H2M」抗体はマウスIgG2 Fcを有するのに対して、「H4H」抗体はヒトIgG4 Fcを有する。当業者によって認識されるように、H1MまたはH2M抗体をH4H抗体に変換することもできるし、その逆もまた同様であるが、いずれにしても、表1に示されている番号識別子によって示される可変ドメイン（CDRを含む）は依然として同じである。抗体名称の番号は同じであるが、接尾辞N、B、またはPが異なる抗体は、CDR配列は同一であるが、CDR配列以外の領域（すなわち、フレームワーク領域）において配列の変化を伴う重鎖および軽鎖を有する抗体を指す。したがって、特定の抗体のN、BおよびP変異体は、それらの重鎖および軽鎖可変領域内に同一のCDR配列を有するが、それらのフレームワーク領域内では互いに異なる。

20

30

【0210】

抗体比較物

比較目的のために、抗毒素Aおよび抗毒素B対照を以下の実施例に含めた。実施例では、アイソタイプマッチ陰性対照も使用した。ある抗毒素A対照抗体を本明細書では対照Iと命名し、これは、米国特許第7625559号明細書および米国特許出願公開第2005/0287150号明細書に記載されている「3D8」抗体の重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を有する抗毒素A抗体である。ある抗毒素B抗体を本明細書では対照IIと命名し、これは、米国特許第7625559号明細書および米国特許出願公開第2005/0287150号明細書に記載されている「124-152」抗体の重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を有する抗毒素B抗体である。別の抗毒素A抗体を本明細書では対照IIIと命名し、これは、米国特許出願公開第2009/0087478号明細書に記載されている「3358」抗体の重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を有する抗毒素A抗体である。

40

【0211】

【表 1】

表 1

抗体名称	配列番号							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H3117N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H3134N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H3067N	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H3121N	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H3123N	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H3124N	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H3324P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H3325P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H3328P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H3330P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H3350P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H3317P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H3335P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H3337P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H3339P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H3343P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H3344P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H3347P	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H3354P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H3355P	306	308	310	312	314	316	318	320
H1H3394P	322	324	326	328	330	332	334	336
H1H3401P	338	340	342	344	346	348	350	352
H1H3411P	354	356	358	360	362	364	366	368

【 0 2 1 2 】

実施例 3 . 可変遺伝子の利用分析

生産した抗体の構造を分析するために、抗体の可変領域をコードする核酸をクローニングし、配列決定した。抗体の核酸配列および抗体の予測アミノ酸配列から、各重鎖可変領域（HCVR）および軽鎖可変領域（LCVR）について、遺伝子使用を同定した。表 2 は、本発明による選択抗体の遺伝子使用を示す。

【 0 2 1 3 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

抗体	抗体識別子	HCVR			LCVR	
		V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H1H3067N	34/42	3-30	6-6	4	4-1	4
H1H3134N	18/26	3-33	3-10	4	4-1	3
H1H3117N	2/10	3-23	1-7	4	3-20	2
H1H3123N	66/74	3-48	4-11	6	1-5	1
H1H3121N	50/58	3-48	5-18	6	1-5	1
H1H3124N	82/90	3-48	3-22	6	1-5	1
H1H3328P	130/138	3-13	3-10	6	1-27	3
H1H3324P	98/106	3-13	3-10	6	1-27	3
H1H3325P	114/122	3-23	3-10	6	1-5	1
H1H3330P	146/154	3-33	1-7	4	1-39	5
H1H3350P	162/170	3-11	7-27	4	3-15	2
H1H3347P	274/282	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3335P	194/202	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3344P	258/266	3-23	2-15	4	1-16	3
H1H3339P	226/234	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3337P	210/218	3-23	1-26	5	1-16	3
H1H3343P	242/250	3-23	1-26	4	1-16	3
H1H3411P	354/362	3-23	1-1	6	1D-12	2
H1H3354P	290/298	6-1	2-8	4	3-11	2
H1H3317P	178/186	3-30	3-10	4	1D-12	4
H1H3355P	306/314	3-9	1-26	6	1-6	3
H1H3394P	322/330	1-2	2-2	4	3-20	4
H1H3401P	338/346	3-30	1-1	4	1D-12	2

10

20

30

【0214】

実施例 4．表面プラズモン共鳴によって決定した場合の、*C. difficile* 由来の毒素 A および / または毒素 B に対する抗体の結合

ヒトモノクローナル抗 *Clostridium difficile* 毒素 A および / または B 抗体の結合親和性および速度定数を、37 の表面プラズモン共鳴によって決定した (表 3 ~ 5)。T200 Biacore 機器で測定を行った。

【0215】

抗体 (ヒト IgG1 Fc (AbPID 接頭辞 H1H) またはハイブリドーマ (AbPID 接頭辞 HxM) と表す) を、それぞれ抗ヒトまたは抗マウス - Fc のセンサー表面上に捕捉した (Mab 捕捉フォーマット)。5 ~ 10 nM の範囲の可溶性全長毒素 A または B (TechLab) を、抗体捕捉表面全体に注入した。抗体 - 抗原の会合を 150 秒間モニタリングし、緩衝液中での解離を 480 秒間モニタリングした。Biacore T200 評価ソフトウェア 1.0 を使用して、抗原 / 抗体複合体の解離の K_D および半減期を計算するために、動態分析を実施した。

40

【0216】

表 3 ~ 5 に見られるように、3 種類の抗体を単離した：毒素 A および毒素 B の両方に結合した抗体 (二重結合物、表 3 を参照のこと)、毒素 A のみに結合した抗体 (表 4)、および毒素 B のみに結合した抗体 (表 5)。毒素 A および毒素 B の両方に結合したいくつかの抗体 (H2M3121N、H2M3123N、H2M3124N、H1H3067N お

50

よび H 1 H 3 1 3 4 N と命名したものを含む) が同定されたので、二重結合物として分類した。単離した抗毒素 A 抗体は、アイソタイプマッチ比較用 M a b (対照 I ; クローン 3 D 8 (A 毒素 A b) およびクローン 1 2 4 - 1 5 2 (B 毒素 A b) の比較配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 9 号明細書を参照のこと) と同様に、ナノモル濃度 (n M) 範囲以下で毒素に結合したが、対照 I I アイソタイプマッチ比較用 M a b (クローン 1 2 4 - 1 5 2) の範囲内の親和性 (約 2 0 0 ~ 3 0 0 p M) を示した抗毒素 B 結合物はわずかな数個であった。 $K_D = k_d / k_a$; $T_{1/2} (min) = (ln 2 / k_d) / 60$ のように、運動速度定数から結合解離平衡定数および解離半減期を計算した。

【 0 2 1 7 】

【 表 3 】

表3:37°Cにおける抗*C. difficile*二重結合 mAbのBiacore親和性

37°Cにおける結合 / Mab捕捉フォーマット					
AbPID	分析物(毒素)	$k_a (Ms^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (モル)$	$T_{1/2} (分)$
H2M3121N	毒素 A	9.69E+05	1.66E-04	1.72E-10	69
	毒素 B	6.11E+04	7.58E-05	1.24E-09	152
H2M3123N	毒素 A	1.23E+06	5.93E-04	4.81E-10	19
	毒素 B	3.97E+04	6.54E-05	1.65E-09	176
H2M3124N	毒素 A	1.14E+06	1.98E-04	1.74E-10	58
	毒素 B	3.31E+05	1.00E-06	3.02E-12	11550
H1H3067N	毒素 A	1.44E+05	3.45E-05	2.40E-10	335
	毒素 B	2.54E+03	6.43E-04	2.53E-07	18
H1H3134N	毒素 A	1.02E+05	2.82E-06	2.78E-11	4096
	毒素 B	2.99E+03	9.73E-04	3.25E-07	12

【 0 2 1 8 】

【 表 4 】

表4:37°Cにおける抗*C. difficile* 毒素 A mAbのBiacore親和性

37°Cにおける結合 / Mab捕捉フォーマット					
AbPID	分析物	$k_a (Ms^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (モル) r$	$T_{1/2} (分)$
H1H3117N	毒素 A	4.38E+05	3.84E-05	7.93E-11	332
H1H3324P	毒素 A	2.51E+05	3.50E-06	1.39E-11	3297
H1H3325P	毒素 A	5.27E+05	5.51E-05	1.05E-10	209
H1H3328P	毒素 A	3.82E+05	3.66E-05	9.57E-11	316
H1H3330P	毒素 A	2.50E+05	1.37E-04	5.47E-10	85
H1H3350P	毒素 A	4.02E+05	4.05E-06	1.01E-11	2854
対照 I	毒素 A	3.77E+05	3.24E-05	8.59E-11	58

【 0 2 1 9 】

10

20

30

【表 5】

表 5: 37°Cにおける抗*C. difficile* 毒素 B mAbのBiacore親和性

AbPID	分析物	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (モル)	T _{1/2} (分)
H1H3317P	毒素 B	6.50E+05	7.78E-05	1.20E-10	149
H1H3335P	毒素 B	1.77E+05	4.14E-04	2.34E-09	28
H1H3337P	毒素 B	2.41E+05	9.45E-04	3.93E-09	12
H1H3339P	毒素 B	2.76E+05	5.37E-04	1.95E-09	22
H1H3343P	毒素 B	2.84E+05	4.48E-04	1.58E-09	26
H1H3344P	毒素 B	2.04E+05	8.65E-04	4.24E-09	13
H1H3347P	毒素 B	3.39E+05	8.13E-04	2.40E-09	14
H1H3354P	毒素 B	NB	NB	NB	
H1H3355P	毒素 B	NB	NB	NB	
H1H3394P	毒素 B	4.86E+05	1.62E-04	3.33E-10	72
H1H3401P	毒素 B	4.20E+05	2.41E-04	5.74E-10	48
H1H3411P	毒素 B	2.35E+05	1.59E-04	6.77E-10	73
対照 II	毒素 B	2.11E+06	4.59E-04	2.18E-10	25

NB = 試験条件下では結合せず

【 0 2 2 0 】

実施例 5 . 表面プラズモン共鳴を使用した、抗*Clostridium difficile* 毒素 A および B 抗体の結合ドメインの決定

抗*Clostridium difficile* 毒素 A および / または B 抗体が、各毒素の C 末端受容体結合ドメイン (CBD) に結合したかを決定するために、研究を行った。これらの研究では、2つの実験 Biacore フォーマットを用いた。捕捉抗*C. difficile* 抗体表面を用いた第 1 のものでは、100 nM の CBD - 毒素 A - Fc (配列番号 375) または CBD - 毒素 B - Fc (配列番号 376) を流して、反応 (RU) を記録した。ハイブリドーマおよびヒト Fc フォーマット抗体分析の両方を可能にするために、ヒトおよびマウス Fc の両方で CBD - 毒素試薬をフォーマットした。抗原 (CBD - Fc) 捕捉表面を用いた第 2 フォーマットでは、500 nM の抗*C. difficile* mAb を流した。このフォーマットでは、ハイブリドーマまたはヒト Fc フォーマット抗体を、それぞれヒトおよびマウス Fc 捕捉抗原に流した。両方のフォーマットにおいて、バックグラウンドを有意に超えた反応 (> 50 RU) を、毒素 A または B の CBD に対する結合と考えた (表 6 を参照のこと)。抗毒素 A および抗毒素 B 抗体の両方について、CBD 内側および外側のエピトープが得られた。過去の報告にしたがって、対照 I (米国特許第 7625559 号明細書および米国特許出願公開第 2005/0287150 号明細書の 3D8 抗体) および対照 II (米国特許第 7625559 号明細書および米国特許出願公開第 2005/0287150 号明細書の 124-152 抗体) の両方をこれらの各毒素の CBD に対してマッピングした (データは示さず; 米国特許出願公開第 2005/0287150 号明細書および米国特許第 7625559 号明細書を参照のこと)。

【 0 2 2 1 】

【表 6】

表6: *C. difficile* 抗体の結合ドメインの決定

mAb	C末端毒素Aの結合		C末端毒素Bの結合		ドメインの結合#
	mAb 捕捉 100nM CBD-A の結合 (RU)	CBD-A 捕捉 500nM mAb の結合 (RU)	mAb 捕捉 100nM CBD-B の結合 (RU)	CBD-B 捕捉 500nM mAb の結合 (RU)	
H2aM3067	-2	237	25	369	C末端
H1M3117	-3	350	-1	21	C末端 A
H2aM3121	0	23	2	10	Non CBD
H2aM3123	1	23	1	14	Non CBD
H2aM3124	0	29	0	19	Non CBD
H1M3134	-1	195	23	394	C末端
H1H3324P	269	224	19	-8	C末端 A
H1H3325P	17	3	7	-8	Non CBD
H1H3328P	354	227	35	-6	C末端 A
H1H3330P	441	515	40	-4	C末端 A
H1H3335P	13	5	13	-6	Non CBD
H1H3337P	-17	8	-24	-2	Non CBD
H1H3339P	19	2	14	-2	Non CBD
H1H3343P	11	3	9	-4	Non CBD
H1H3344P	5	5	4	-2	Non CBD
H1H3347P	42	-13	44	7	Non CBD
H1H3354P	-19	-2	-24	-4	Non CBD

Non CBDは、毒素AまたはBのC末端受容体結合ドメインに結合しないことを示す。

【0222】

実施例 6 . サイズ排除クロマトグラフィーを使用した、抗 *Clostridium difficile* 毒素 A および B 抗体に対する結合ドメインの決定

【0223】

抗 *Clostridium difficile* 毒素 A および / または B 抗体が、C末端受容体結合ドメイン (CBD) に結合したかを決定するための優れた方法として、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いた。簡潔に言えば、5% グリセロールを含有するリン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 (PBS/G) 中で、約 500 nM の毒素 A の CBD (配列番号 375) または毒素 B の CBD (配列番号 376) を過剰な抗体と特定モル比 (1:5 および 1:20; CBD:Mab) で混合し、室温で 1 時間インキュベートした。

【0224】

1 時間後における目に見えるあらゆる沈殿を、+++ (多い)、++ (中程度)、+ (わずか) または - (観察されず) として記録した。遠心分離 (16,000 × g で 5 分間) 後、抗体および CBD の混合物を、移動相として PBS/G を用いる Superose 6 カラム (GE Healthcare) を使用した SEC 分析に供した。抗体または CBD 単独よりも大きい複合体に対応するタンパク質のピークを、C末端ドメインに対する結合と解釈した。

【0225】

これらの結果により、CBD の結合は、SPR (Biacore) および CBD 研究から推測される結合のドメインから予測されるものによく対応することが実証された (実施例 5 を参照のこと)。1 つの明らかな例外は H1H3134N であり、CBD-A に対する結合が SEC によって観察されなかったが、 K_D 値は抗体の二重結合特性を示していた。

。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 6 】

【 表 7 】

表7:抗*Clostridium difficile* 毒素AおよびB抗体に対する結合ドメイン

mAb	CBD-A との沈殿	SEC による CBD-A の結合の 観察	CBD-B との沈殿	SEC による CBD-B の結合の 観察	Biacore によるドメイン の結合
H2M3067N	+++	あり	NT	NT	C末端 A/B
H1M3117N	+++	あり	NT	NT	C末端 A
H2M3121N	-	なし	NT	NT	Non CBD
H2M3123N	-	なし	NT	NT	Non CBD
H2M3124N	-	なし	NT	NT	Non CBD
H1M3134N	-	なし	NT	NT	C末端 A/B
H1H3317P	NT	NT	-	あり	NT
H1H3324P	+	あり	NT	NT	C末端 A
H1H3325P	-	なし	NT	NT	Non CBD
H1H3328P	-	あり	NT	NT	C末端 A
H1H3330P	-	あり	N.D.	N.D.	C末端 A
H1H3335P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3337P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3339P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3343P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3344P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3347P	NT	NT	-	なし	Non CBD
H1H3350P	-	あり	NT	NT	NT
H1H3354P	NT	NT	-	なし	Non CBD

NT= 試験せず。 TBD= 実施予定

Non CBDは、毒素AまたはBのC末端受容体結合ドメインに結合しないことを示す。

【 0 2 2 7 】

実施例 7 . 抗 *Clostridium difficile* 毒素 A および / または毒素 B 抗体の中和効力の決定

*in vitro*における抗 *C. difficile* 抗体の中和効力 (IC_{50}) を決定するために、細胞生存率アッセイを行った。簡潔に言えば、10% FBS を補充した MEM 培地で培養した Vero 細胞 (1.25×10^3 個) を 96 ウェルマイクロプレートに播種し、5% CO_2 、37℃ で 16 ~ 18 時間インキュベートした。様々な濃度 (0 ~ 66 nM) の抗 *C. difficile* 毒素抗体を細胞に追加し、続いて *C. difficile* の毒素 A (32 または 25 pM) または毒素 B (0.03 pM または 0.01 pM) と共に 48 時間インキュベートした。毒素を含有しない対照 (生存率 100%) と、毒素を含有するが抗体を含有しない対照 (相対死亡率 100%) とを用いた。抗体の希釈はすべてトリプリケートで行った。2 日間インキュベートした後、テトラゾリウム塩 (WST-1; Roche Biochemicals) を追加し、発色させるために 4 時間待機し、次いで 450 nm の吸光度を記録することによって、細胞生存率を測定した。11 点反応曲線 (GraphPad Prism) の 4 パラメータロジスティック方程式によって、吸光度の値を分析した。

【 0 2 2 8 】

これら結果により、25 ~ 32 pM の一定の毒素 A において、10 個の抗体が 7 pM ~ 65 pM の範囲の IC_{50} 値で毒素 A に対する中和を示したことが示された (表 8 A) 。注目すべきことに、H1H3330P は、対照 III (アイソタイプマッチ比較用抗体、米国特許出願公開第 2009/0087478 号明細書に記載されているクローン 3358) と同等の中和効力および対照 I (クローン 3D8 については、米国特許出願公開第 2

10

20

30

40

50

005/0287150号明細書を参照のこと)よりも約20倍大きい効力を示した。0.03pMの一定の毒素Bにおいて、いくつかの毒素B中和抗体は、25~120pMの範囲の IC_{50} で、対照II(アイソタイプマッチ比較用抗体、米国特許出願公開第2005/0287150号明細書のクローン124-152を参照のこと)よりも有意に大きい効力を示した(表8B)。抗体H1M3067NおよびH1M3134Nは、毒素AおよびBの両方に結合することができるが、毒素Aに対してのみ中和活性を示した。この理由はいまだに不明であるが、この発見について考えられる1つの説明は、抗体は毒素のC末端部分の反復領域内の多くの部位に結合することができるが、同じ毒素ドメインの他の部分は哺乳動物の膜と依然として相互作用して、毒素が細胞に進入するのを可能にし得るというものであり得る。

10

【0229】

【表8A】

表8A: 毒素Aに対する選択mAbの中和効力(IC_{50})

mAb	試験1 (IC_{50}) 32pM 毒素A	試験2 (IC_{50}) 32pM 毒素A	試験3 (IC_{50}) 32pM 毒素A	試験4 (IC_{50}) 32pM 毒素A	試験5 (IC_{50}) 25pM 毒素A
H1M3067N	64pM	44pM	NT	NT	NT
H1M3117N	29pM	11pM	NT	NT	NT
H2aM3121N	65pM	35pM	NT	NT	NT
H2aM3123N	65pM	24pM	NT	NT	NT
H2aM3124N	41pM	21pM	NT	NT	NT
H1M3134N	NT	NT	NT	38pM	NT
H1H3324P	NT	NT	NT	33pM	NT
H1H3325P	NT	NT	NT	33pM	NT
H1H3328P	NT	NT	112pM	NT	NT
H1H3330P	NT	NT	7pM	NT	7pM
対照 I	NT	NT	NT	NT	199pM
対照 III	18pM	6pM	10pM	11pM	9pM

20

30

NT: 試験せず

【0230】

【表 8 B】

表8B: 毒素Bに対する選択Mabの中和効力 (IC₅₀)

mAb	試験 1 (IC ₅₀) 0.1pM 毒素 B	試験 2 (IC ₅₀) 0.1pM 毒素 B	試験3 (IC ₅₀) 0.03pM 毒素 B
H1M3067N	中和せず		
H1M3134N	中和せず		
H1H3317P	中和せず	NT	NT
H1H3335P	730pM	380pM	120pM
H1H3337P	1730pM	980pM	320pM
H1H3339P	480pM	270pM	90pM
H1H3343P	280pM	200pM	50pM
H1H3344P	580pM	400pM	40pM
H1H3347P	130pM	90pM	25pM
H1H3350P	中和せず	NT	NT
H1H3340P	NT	中和せず	NT
H1H3411P	NT	8pM [#]	NT
対照 II	1800pM	1500pM	290pM

抗体は最高濃度で部分的にのみ保護する(40~50%)

NT: 試験せず

【0231】

実施例 8 . 二重特異性抗体の作製

本発明の方法を実施するのに使用するために、様々な二重特異性抗体を作製する。例えば、毒素 A および / または B の異なるドメインに結合する可変領域を共に連結して、単一の結合分子内に二重ドメインおよび / または二重毒素特異性を付与する、二重特異性フォーマットで、C . d i f f i c i l e 毒素 A または毒素 B 特異的抗体を作製する(「二重特異性物」)。適切に設計された二重特異性物は、特異性および結合アビディティの両方を増加させることによって、全体的な毒素中和効果を増強し得る。図 1 に示されているように、個々のドメイン(例えば、グルコシル化酵素ドメインである N 末端ドメイン(ドメイン「A」と表示)、または自己触媒プロセシングドメイン(ドメイン「C」と表示)、または転移ドメイン(ドメイン「D」と表示)、またはカルボキシ末端受容体結合ドメイン(ドメイン「B」と表示)のセグメント)に対する特異性を有するかまたは 1 つのドメイン内の異なる領域に結合し得る可変領域を、各領域が別個のエピトープまたは 1 つのドメイン内の異なる領域に同時に結合することを可能とする構造的な足場において対合させる。二重特異性物の一例では、元の V_H に対する元の特異性を破壊せずにその V_H と対合し得る非同種 V_L パートナーを同定するために、第 1 のドメインに対する特異性を有する結合物由来の重鎖可変領域(V_H)を、第 2 のドメインに対する特異性を有する一連の結合物由来の軽鎖可変領域(V_L)と再結合させる。このようにして、単一の V_L セグメント(例えば、V_L 1)を、2 つの異なる V_H ドメイン(例えば、V_H 1 および V_H 2)と組み合わせて、2 つの結合「アーム」(V_H 1 - V_L 1 および V_H 2 - V_L 1)を含む二重特異性物を作製することができる。単一の V_L セグメントを使用することによって、系の複雑性が低減され、これによって、二重特異性物(例えば、U S S N 1 3 / 0 2 2 7 5 9 および米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 3 3 1 5 2 7 号明細書を参照のこと)を作製するのに使用されるクローニング、発現および精製工程の効率が単純化および増大する。

【0232】

あるいは、毒素 A および / または毒素 B ならびに第 2 の標的(例えば、限定されないが、第 2 の異なる抗毒素 A もしくは抗毒素 B 抗体、またはトキシイド、またはワクチンなど)の両方に結合する抗体が、本明細書に記載される技術または当業者に公知の他の技術を

使用して、二重特異性フォーマットで調製することができる。単一の結合分子内に二重抗原特異性を付与するために、異なる毒素 A 領域に結合する抗体可変領域を、例えば、毒素 B 上の関連部位に結合する可変領域と連結することができる。この性質を有する適切に設計された二重特異性物は、二重機能性物として役立つ。例えば、毒素 A および毒素 B の両方に結合する二重特異性抗体の場合、2 つの別個の抗体を含有する組成物の投与を必要とせずに、毒素 A および毒素 B の両方を同時により良く中和することができる。毒素 A に対する特異性を有する可変領域を、毒素 B に対する特異性を有する可変領域と組み合わせ、各可変領域が別個の抗原に結合することを可能とする構造的な足場において対合させる。

【0233】

抗体についての上記アッセイのいずれかにおいて、二重特異性結合物を、標的抗原、例えば、毒素 A および毒素 B に対する結合およびこれらの機能的遮断について試験する。例えば、B i a c o r e、E L I S A、サイズ除外クロマトグラフィー、複数角度レーザー光散乱、直接走査熱量測定、および他の方法などの、可溶性タンパク質の結合を測定する標準的な方法を使用して、二重特異性相互作用を評価する。異なる毒素を表す合成ペプチドをマイクロタイタープレートのウェル上にコーティングする E L I S A 結合アッセイを使用して毒素 A および毒素 B の両方に対する二重特異性抗体の結合を決定し、二次検出抗体を使用して二重特異物の結合を決定する。また、それぞれ二重特異性物またはペプチドが捕捉されているセンサー表面にペプチドまたは二重特異性物を流すことによって、抗体に対するペプチドのリアルタイム結合相互作用を測定する表面プラズモン共鳴実験を使用して結合実験を行うことができる。二重特異性物による毒素 A および毒素 B の両方の *i n v i t r o* 機能的遮断は、本明細書に記載される中和アッセイなどの任意のバイオアッセイを使用して、または本明細書に記載されるものなどの適切な動物モデルにおける *i n v i v o* 保護研究によって決定する。

【0234】

実施例 9 . ハムスター再発モデル (A) および急性ハムスターモデル (B) における、C . d i f f i c i l e 感染症 (C D I) に対する抗毒素 A および / または抗毒素 B 抗体の *i n v i v o* 有効性の評価

下記のように、2 つの異なるハムスターモデルにおいて、C . d i f f i c i l e 由来の毒素 A および / または毒素 B に対して特異的な抗体の C . d i f f i c i l e による感染症に対する有効性を評価した。ハムスターは、クリンダマイシンの存在下では C . d i f f i c i l e 感染症に感受性であり、通常は感染後 2 ~ 4 日以内に死亡する。

【0235】

(A) 再発モデル : - 1 日目において、雄性シリアゴールデンハムスターに、C . d i f f i c i l e 孢子および栄養細胞 (合計 10^6 個) の混合物を含有する経口懸濁液を投与した。感染の 24 時間後 (0 日目)、クリンダマイシン ($10 \text{ mg} / \text{kg}$) の単回皮下注射を動物に行った。1 ~ 3 日目において、感染症を改善するために、バンコマイシン ($10 \text{ mg} / \text{kg}$) をハムスターに 1 日 1 回経口投与した。抗生物質バンコマイシンは、C . d i f f i c i l e 感染症を処置するのに臨床的に使用されている。最後のバンコマイシン投与の後、抗体を、その処置および投与群にしたがって 4 日間 (3 ~ 6 日目) または 1 日間 (3 日目) にわたって 1 日 1 回皮下投与した (以下の表 9 A および 9 B を参照のこと) 。

【0236】

臨床有効性の代わりとして再発モデルを使用した 2 つの異なる試験 (図 2 および 3 を参照のこと) を行った。両試験では、2 つの抗体の組み合わせを比較した :

- 1 . H 1 H 3 3 3 0 P および H 1 H 3 3 4 7 P と命名した抗体
- 2 . 比較用抗毒素 A (対照 I ; クローン 3 D 8 の配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 5 9 号明細書を参照のこと) および比較用抗毒素 B 抗体 (対照 I I ; クローン 1 2 4 - 1 5 2 の配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 5 9 号明細書を参照のこと)

【0237】

試験 1 では、4 つの用量の抗体を各抗体 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ (合計 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 用量) で投

与した。試験 2 では、1 つの用量の抗体を各抗体 5 m g / k g または 2 m g / k g のいずれかで投与した（合計 1 0 m g / k g または 4 m g / k g のいずれか）。

【 0 2 3 8 】

【 表 9 A 】

表9A 試験1の設計:再発モデル:H1H3330P + H1H3347P または比較用抗毒素A + 比較用抗毒素Bとの併用処置

群	処置*	用量 (mg/kg x 投与回数)	n
1	陰性対照(無関係な)抗体	10 x 4	14
2	比較用抗毒素Aおよび比較用抗毒素B	[5/5] x 4	23
3	(H1H3330P + H1H3347P の組み合わせ)	[5/5] x 4	23
4	抗体なし		15

* 上記のように、バンコマイシンをすべての動物に投与した。

【 0 2 3 9 】

【 表 9 B 】

表9B 試験2の設計:再発モデル:H1H3330P + H1H3347Pまたは比較用抗毒素A + 比較用抗毒素Bとの併用処置

群	処置*	用量 (mg/kg x 投与回数)	n
1	陰性対照(無関係な)抗体	10 x 1	14
2	比較用抗毒素Aおよび比較用抗毒素B	[5/5] x 1	16
3	(H1H3330P + H1H3347P の組み合わせ)	[5/5] x 1	16
4	比較用抗毒素Aおよび比較用抗毒素B	[2/2] x 1	16
5	(H1H3330P + H1H3347P の組み合わせ)	[2/2] x 1	16

* 上記のように、バンコマイシンをすべての動物に投与した。

【 0 2 4 0 】

実験期間中は、動物を 1 日 2 回観察した。一般的な観察には、死亡および疾病の徴候、下痢（「ウェットテイル」）の存在、ならびに全体の外観（活動、取り扱い、接触に対する一般的な反応、被毛の逆立ち）が含まれていた。瀕死状態であると判断した動物を安楽死させた。瀕死状態を決定するのに使用した基準は、長期間（5 日間）の体重減少、衰弱状態への進行、長期の倦怠感（3 日以上）、麻痺の徴候、皮膚の腐食または外傷、猫背の

姿勢、および腹部の膨張であった。観察を継続し、再発モデルについては感染後最大18日間にわたって死亡または安楽死を記録した。

【0241】

(B) 急性モデル：-1日目において、雄性シリアゴールデンハムスターを10mg/kgの用量のクリンダマイシンで腹腔内処置した。0日目において、C. difficile 孢子を滅菌PBSで希釈して孢子100個/300μlとし、経口強制飼養によって投与した。皮下経路を使用して、抗体を-3日目から0日目まで4日間毎日投与した。抗体の用量は、図の説明に示されている。研究の概要については、以下の表9Cも参照のこと。

【0242】

【表9C】

表9C 試験3:急性モデル:様々な用量でのH1H3330P + H1H3347Pとの併用処置

群	処置	用量 (mg/kg x 投与回数)	動物数
1	非感染対照	-	5
2	感染対照	PBS x 4	10
3	陰性対照 (無関係な)抗体	[100] x 4	14
4	(H1H3330P + H1H3347P の組み合わせ)	[50/50] x 4	14
5		[16/16] x 4	14
6		[5.5/5.5] x 4	14
7		1.85/1.85 x 4	14

【0243】

10

20

30

【表 9 D】

表9D 試験4:急性モデル:様々な用量でのH1H3330P + H1H3347P との併用処置

群	処置	用量 (mg/kg x 投与回数)	動物数
1	非感染対照	-	5
2	感染対照	PBS x 4	10
3	陰性対照 (無関係な)抗体	[100] x 4	14
4	(H1H3330P + H1H3347P の組み合わせ)	[20/20] x 4	14
5		[5/5] x 4	14
6	比較用抗毒素Aおよび 比較用抗毒素B	[20/20] x 4	14
7		[5/5] x 4	14

【 0 2 4 4 】

実験期間中は、動物を1日2回観察した。一般的な観察には、死亡および疾病の徴候、下痢(「ウェットテイル」)の存在、ならびに全体の外観(活動、取り扱い、接触に対する一般的な反応、被毛の逆立ち)が含まれていた。瀕死状態であると判断した動物を安楽死させた。瀕死状態を決定するのに使用した基準は、長期間(5日間)の体重減少、衰弱状態への進行、長期の倦怠感(3日以上)、麻痺の徴候、皮膚の腐食または外傷、猫背の姿勢、および腹部の膨張であった。観察を継続し、急性モデルについては最大10日間にわたって死亡または安楽死を記録した。

【 0 2 4 5 】

結果

ログランク(マンテルコックス)検定を使用して、ハムスターモデルからのデータの統計分析を行った。一対比較のために、ボンフェローニ補正を臨界P値に適用した。

【 0 2 4 6 】

ハムスター再発モデルを使用した複数回投与研究であった第1の試験では(図2を参照のこと)、H1H3330P + H1H3347Pとの併用処置または比較用抗体との併用処置は、アイソタイプ対照またはバンコマイシン単独に対して全生存率の増加を示した(74~78%;抗毒素Aおよび抗毒素B抗体の組み合わせ対27~43%;対照治療群)。具体的には、19日目までに、PBSのみを投与したハムスターの27%が生存し、アイソタイプ対照を投与した43%が生存し、抗毒素A + 抗毒素B比較用抗体の組み合わせを投与した74%が生存し、H1H3330P(抗A抗体) + H1H3347P(抗B抗体)の組み合わせを投与した78%が生存した。

【 0 2 4 7 】

ハムスター再発モデルを使用した単回投与研究であった第2の試験では(図3を参照のこと)、H1H3330P + H1H3347Pまたは比較用抗体のいずれかとの併用処置

は、アイソタイプ対照（陰性対照抗体）と比較して生存率を増加させたが、2 mg / kg 用量と5 mg / kg 用量との間には違いがなかった。

【0248】

第1の急性ハムスターモデル研究では（図4を参照のこと）、H1H3330P + H1H3347Pの組み合わせとの処置は、陰性対照と比較して、漸増可能な形で、死亡からのハムスターの有意な保護を示した（すべての群対アイソタイプ対照について、 $p < 0.0001$ ）。50 mg / kg ~ 1.85 mg / kg（の組み合わせとして投与した各抗体）で用量を漸増したところ、高用量は、最低用量の1日目と比較して、7日目までにすべての動物について保護を提供した。

【0249】

急性ハムスターモデルを使用したさらなる研究では（図5を参照のこと）、H1H3330P + H1H3347Pまたは比較用抗体の組み合わせのいずれかとの併用処置は、アイソタイプ対照と比較して生存率を有意に増加させた（図5；40 mg / kgのアイソタイプ対照対各20 mg / kgの対照I / 対照II、 $p < 0.0001$ ；40 mg / kgのアイソタイプ対照対各5 mg / kgの対照I / 対照II、 $p = 0.0003$ ；40 mg / kgのアイソタイプ対照対各20 mg / kgのH1H3330P / H1H3347P、 $p < 0.0001$ ；40 mg / kgのアイソタイプ対照対各5 mg / kgのH1H3330P / H1H3347P、 $p < 0.0001$ ）。しかしながら、低用量5 mg / kgの各抗体で試験した場合には、H1H3330P + H1H3347Pの組み合わせとの併用処置は、比較用抗体対照よりも良く、死亡からハムスターを保護したのに対して（ $p < 0.0001$ ）、高用量20 mg / kgの各抗体では、H1H3330P + H1H3347Pの組み合わせ対比較用抗体の組み合わせの間には有意差がなかった（ $p = 0.73$ ）。この結果は、急性ハムスターモデルにおける低用量の優位性を明らかに実証しており、より低濃度の臨床では、H1H3330P + H1H3347P抗体の投与が比較用抗体と比較して有効であり得ることを示唆している。

【0250】

実施例10．いくつかの群のBI超毒性C. difficile株由来の培養上清によって誘導される細胞毒性の遮断に対する抗毒素Aおよび抗毒素B抗体の効果：比較用mAbとの比較

フィダキソマイシンまたはバンコマイシンで処置する場合、臨床超毒性BI / NAP1 / 027株に感染した患者は、非BI株に感染した患者よりも治癒率が低い（Petrella, LAら、(2012), Clinical Infectious Diseases, 55(3): 351 - 357）。さらに、BI / NAP1 / 027株は、原型株と比較して高いCDI再発率および高い予想死亡率に関連している（Loo, VGら、(2005), N Engl J Med, 353: 23; Petrella, LAら、(2012), Clinical Infectious Diseases, 55(3): 351 - 357。これらの超毒性株は、毒素AおよびBの産生増加、バイナリー毒素の存在、ならびにフルオロキノロン耐性の増加を特徴とする。毒素AおよびBの産生増加は、tcdAおよびtcdB発現の推定上の負の調節因子であるtcdCにおける機能喪失型突然変異（これは、生活環を通して持続的な毒素産生をもたらす）によって引き起こされる可能性が最も高い。

【0251】

モル比1:1のH1H3330PおよびH1H3347P混合物が、4種の臨床分離C. difficile BI / NAP1 / 027株由来の毒素を中和する能力を細胞ベースの中和アッセイで試験した。Case Western Reserve University, Cleveland, OHから、臨床分離超毒性株VA5およびVA17を入手した。Dept. of Veterans Affairs, Edward Hines, Jr. Hospital, Hines, ILから、臨床分離超毒性株6336および6443を入手した。中和アッセイでは、両方のC. difficile毒素に対する感受性により、サル腎臓上皮細胞株であるVero細胞を用いた。細胞を、様々な量の抗

10

20

30

40

50

体カクテルおよびいくつかの C . d i f f i c i l e 株から単離した一定量の培養上清と共に 48 時間インキュベートした。W S T - 1 試薬（これは、還元されると比色変化をもたらす酸化還元指示薬である）の追加によって、細胞毒性を決定した；細胞成長中の代謝活性は W S T - 1 を還元し、450 nm の吸光度の増加をもたらす。

【0252】

いくつかの臨床分離 B I 株由来の培養上清は、3700 倍希釈（V A 5 株の場合）～ 88200 倍希釈（6443 株の場合）の範囲の細胞毒性を誘導する E C₅₀ 値で、V e r o 細胞に対して広範囲の細胞毒性活性を示した。モル比 1 : 1 の H 1 H 3 3 3 0 P および H 1 H 3 3 4 7 P 混合物は、すべての群の試験 B I 株由来の培養上清によって誘導された細胞毒性を、モル比 1 : 1 の比較用抗毒素 A（対照 I；クローン 3 D 8 の配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 5 9 号明細書を参照のこと）および比較用抗毒素 B（対照 I I；クローン 1 2 4 - 1 5 2 の配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 5 9 号明細書を参照のこと）混合物と比較して 34 倍超高い中和効力で遮断した。これらのデータは、H 1 H 3 3 3 0 P / H 1 H 3 3 4 7 P 抗体ペアが、比較用 m A b カクテル（I C₅₀ 範囲：1200 ~ 1700 p M；表 10 を参照のこと）と比較して、試験超毒性 B I 株についてピコモル範囲（31 ~ 45 p M）の I C₅₀ 値で、培養物の細胞毒性を中和することができたことを実証している。

【表 10】

表 10

株	E C ₅₀ (希釈倍率)	中和アッセイ			
		【上清】 (希釈倍率)	H1H3330P/ H1H3347P I C ₅₀ (pM)	比較用 mAb 1/2 I C ₅₀ (pM)	倍率 ペア/対照
VA5	6900	4700	36	1400	39
VA17	3700	3000	31	1400	45
6336	15200	12100	45	1700	38
6443	88200	57500	35	1200	34

【0253】

実施例 11．抗毒素 A 抗体 H 1 H 3 3 3 0 P のエピトープマッピング

H 1 H 3 3 3 0 P が結合した毒素 A の C 末端受容体結合ドメイン（C B D）（配列番号 375）のエピトープを、質量分析ベースのプロテオミクスを使用して決定した。簡潔に言えば、毒素 A の C B D を 12 時間トリプシン消化し、10 ~ 14 % 勾配 S D S - P A G E で試料を泳動し、続いてニトロセルロース膜に転写し、一次抗体として H 1 H 3 3 3 0 P 抗体または対照 I 抗体（3 D 8 抗体の配列については、米国特許第 7 6 2 5 5 5 9 号明細書を参照のこと）のいずれかを使用したウエスタンブロット分析を行った。2 D 電気泳動、続いて M A L D I - T O F M S 分析を使用して、H 1 H 3 3 3 0 P 抗体に結合したペプチド配列のさらなる分析を行った。手順を以下により詳細に記載する。

【0254】

毒素 A の限定的トリプシン消化

毒素 A の組換え C 末端受容体結合ドメイン（C B D）（P B S 中、0.4 μ g / μ l）を s e q u e n c e g r a d e m o d i f i e d t r y p s i n（P r o m e g a, C a t # V 5 1 1 C）と共に 1 : 80 の質量比で追加し、37 ° で 0 ~ 12 時間インキュベートした。2 容量の 1 x L a e m m l i s a m p l e b u f f e r を追加することによって酵素を不活化し、95 ° で 5 分間加熱した。試料を分析まで - 20 ° で保存した。

【0255】

ウエスタンブロット分析

最初に、10～14%勾配SDS-PAGEによってタンパク質分解の程度を調べた。ロードした各試料の量は毒素AのCBDの初期量1μgと同等であり、ゲル中の分離したタンパク質をSimply Blue coomassie stain (Invitrogen, Cat# LC6065)で可視化した。

【0256】

次いで、0時間および12時間消化した試料を10～14%勾配SDS-PAGE分離のために選択し、各試料について毒素AのCBDの初期量50ngと同等量をロードした。分離したタンパク質をニトロセルロース膜(nitrocellulose membrane)に転写し、TBST(0.05%Tween-20を含有するTris緩衝生理食塩水溶液)中で、濃度1μg/mlの一次抗体H1H3330Pまたは対照抗体Iを用いて4℃で一晩ブローブし、続いて抗ヒトIgG-HRPコンジュゲート二次抗体(Pierce, Cat# 31412; TBST中、1:15, 000希釈)でブローブした。H1H3330Pおよび対照1抗体は両方とも、ヒトIgG1定常ドメインを有していた。膜を化学発光基質(Perkin Elmer, Cat# NEL103E001EA)と共にインキュベートし、画像をX線フィルムに取り込んだ。

【0257】

2Dゲル電気泳動

どのアミノ酸が、H1H3330P抗体を使用して実施したウエスタンブロットに固有のタンパク質バンドに相当するのかを決定するために、毒素AのCBDの12時間トリプシン消化を使用して、二次元(2D)ゲルを実施した。

【0258】

ゲル内トリプシン消化およびMALDI-TOF MSによるペプチドマッピング

2D-ゲル分析により、4個のタンパク質スポットがそのpH(約9のpI値)域で密接にクラスタ化されており、H1H3330Pを使用したウエスタンブロットによって可視化された50kDaのバンドを構成していたことが明らかになった。12時間トリプシン消化を使用した2Dゲルから、約50kDaの対応する分子量を有する4個のタンパク質スポットを切り出し、50%アセトニトリルによって脱染し、65mM DTTによって還元し、135mMヨードアセトアミドによってアルキル化した。アセトニトリルによって脱水した後、20μlの2.5ng/μl sequence grade trypsin(Promega, Cat# V5111)を追加してゲルバンドを遮蔽し、37℃で一晩インキュベートすることによってゲル内消化を行った。

【0259】

得られたペプチドをZipTip C18(Millipore, Cat# ZTC18S096)によって脱塩し、Bruker Ultraflex Xtreme MALDI-TOF-TOF MSによって分析した。FlexAnalysisソフトウェアによってスペクトルを処理し、自己分解トリプシン断片のピークで内部校正した。質量精度10ppmで毒素AのCBDの配列を含有する社内データベースに対して、校正したピークリストを検索した。

【0260】

結果

H1H3330Pによるプロットングでは、トリプシン消化の12時間後において約50kDaの主なタンパク質バンドが示されたが、対照1抗体を用いてプロットングを行った場合には、トリプシン消化の12時間後において約50kDaの分子量を有するタンパク質バンドは観察されなかったことが、これらの結果によって示された。

【0261】

どのアミノ酸が、H1H3330Pを使用して実施したウエスタンブロットに固有の50kDaのタンパク質バンドに相当するのかを決定するために、上記のように、12時間トリプシン消化を使用して、二次元(2D)ゲルを実施した。前述のように、2Dゲル分析により、4個のタンパク質スポットがそのpH(約9のpI値)域で密接にクラスタ化

10

20

30

40

50

されており、H 1 H 3 3 3 0 Pを使用したウエスタンブロットによって可視化された50 kDaのバンドを構成していたことが明らかになった。これらの4個のタンパク質スポットの質量分析により、毒素AのCBD（配列番号375）のアミノ酸残基468～863に及ぶ17個のマッチングペプチドが同定された。毒素Aのこの断片（残基468～863に及ぶアミノ酸）は、45 kDaの予測分子量および2Dゲル分析から得られた値によく対応する9.01の予測等電点を有する。

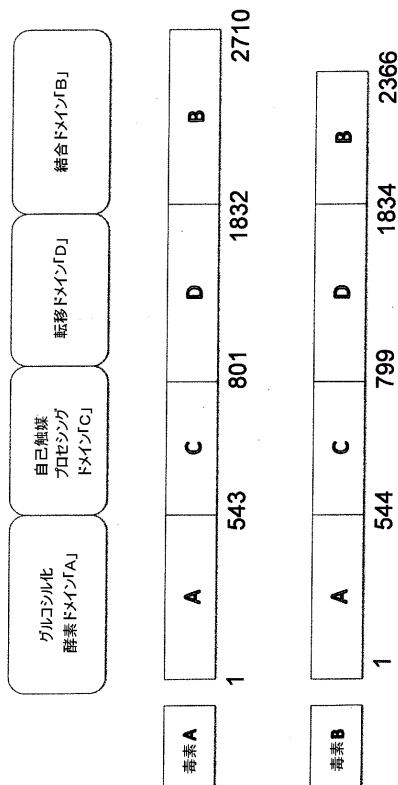
【0262】

本実施例では、抗毒素A抗体H 1 H 3 3 3 0 Pは、対照1（米国特許第7625559号明細書では3D8）のものとは異なるエピトープを有し、アミノ酸468～863内において毒素AのCBDに結合することが例証されている。H 1 H 3 3 3 0 P抗体と相互作用したこの領域内において、特定のアミノ酸配列を同定したところ、これらのアミノ酸配列は、配列番号375の残基468～488、配列番号375の残基510～530、配列番号375の残基602～610、配列番号375の配列番号724～794の残基644～703、配列番号375の残基799～814、および配列番号375の残基858～863であった。

10

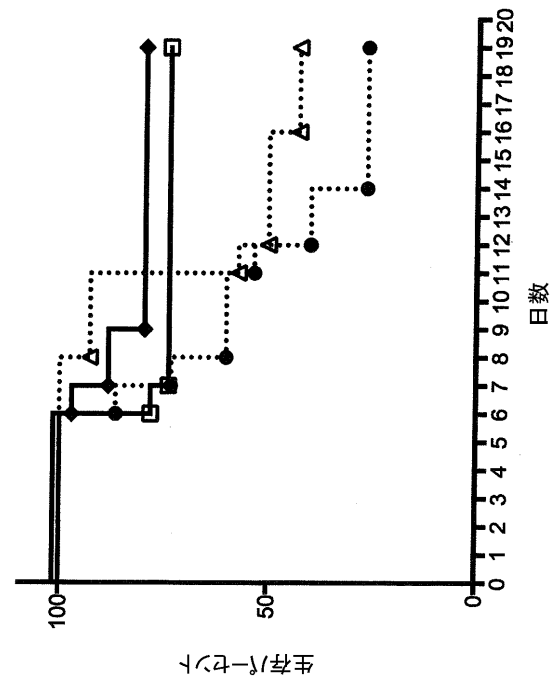
【図1】

Figure 1



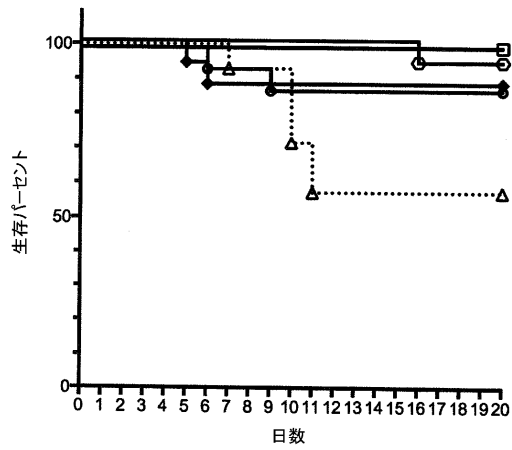
【図2】

Figure 2



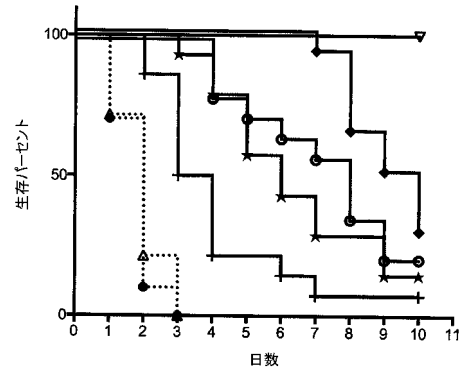
【 図 3 】

Figure 3



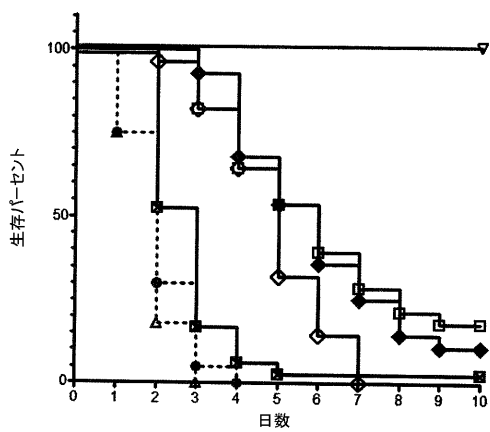
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



【配列表】

2015509962000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/028630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/12 A61K39/40 A61P31/04
ADD.

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)

C07K A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 270 045 A1 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; MEDAREX INC [US]) 5 January 2011 (2011-01-05) the whole document	1-9, 15-38
Y	----- BABCOCK GREGORY J ET AL: "Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent Clostridium difficile-induced mortality in hamsters", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, USA, vol. 74, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 6339-6347, XP009109025, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00982-06 the whole document ----- -/-	1-9, 15-38

☒ 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

10 July 2013

Date of mailing of the international search report

02/08/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/028630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/087478 A1 (HANSEN GENEVIEVE [US] ET AL) 2 April 2009 (2009-04-02) the whole document	1-9, 15-38
Y	----- ROTHMAN S W ET AL: "Immunochemical and structural similarities in toxin A and toxin B of Clostridium difficile shown by binding to monoclonal antibodies", TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 26, no. 6, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 583-597, XP025811153, ISSN: 0041-0101, DOI: 10.1016/0041-0101(88)90239-5 [retrieved on 1988-01-01] the whole document	1-5, 15-38
Y	----- WO 2011/130650 A2 (PROGENICS PHARM INC [US]; MA DANGSHE [US]; NAGASHIMA KIRSTEN [US]; KEN) 20 October 2011 (2011-10-20) the whole document	1-9, 15-38
Y	----- DEMAREST STEPHEN J ET AL: "Neutralization of Clostridium difficile toxin A using antibody combinations.", MABS 2010 MAR-APR, vol. 2, no. 2, March 2010 (2010-03), pages 190-198, XP002695487, ISSN: 1942-0870 the whole document	1-5, 15-38
Y	----- HUSSACK GREG ET AL: "Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, BETHESDA, MD, USA, vol. 286, no. 11, 18 March 2011 (2011-03-18), pages 8961-8976, XP002692187, ISSN: 1083-351X the whole document	1-5, 15-38
Y	----- US 2004/137601 A1 (VON EICHEL-STREIBER CHRISTOPH [DE] ET AL) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document	1-9, 15-38
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/028630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ISRAEL LOWY ET AL: "Treatment with Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxins", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 362, no. 3, 21 January 2010 (2010-01-21), pages 197-205, XP055043322, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa0907635 the whole document	1-9, 15-38
A	US 6 596 541 B2 (MURPHY ANDREW J [US] ET AL) 22 July 2003 (2003-07-22) the whole document	1-9, 15-38
A	THOMAS TILLER: "Single B cell antibody technologies", NEW BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 5, September 2011 (2011-09), pages 453-457, XP028290739, ISSN: 1871-6784, DOI: 10.1016/J.NBT.2011.03.014 [retrieved on 2011-04-05] the whole document	1-9, 15-38
Y	MAROZSAN A ET AL: "Mechanistic Studies of Novel Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxins", ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 50, 2010, XP002700708, & 50TH INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (ICAAC); BOSTON, MA, USA; SEPTEMBER 12-15, 2010 ISSN: 0733-6373 abstract	1,6-9, 17-38
Y	MAROZSAN A ET AL: "Humanized mAbs Against Clostridium difficile Toxins A and B Demonstrate Potent Neutralizing Activity In Vitro and Durable Protection from Lethal Disease In Vivo", ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 51, 2011, pages B-1188, XP002700709, & 51ST INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (ICAAC); CHICAGO, IL, USA; SEPTEMBER 17-20, 2011 ISSN: 0733-6373 abstract	1,6-9, 17-38
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/028630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/063346 A1 (NORTHSHORE UNIVERSITY HEALTH SYSTEM RES INST [US]; JIN JIAN-PING [US];) 26 May 2011 (2011-05-26) the whole document -----	1,6-9, 17-38
Y	WO 91/18293 A1 (CAMBRIDGE BIOTECH CORP [US]) 28 November 1991 (1991-11-28) the whole document -----	1,6-9, 17-38
Y	COUGHLIN R T ET AL: "Characterization of six murine monoclonal antibodies specific for toxin B of Clostridium difficile", HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 13, no. 2, 1 February 1994 (1994-02-01), pages 147-152, XP009129907, ISSN: 0272-457X the whole document -----	1,6-9, 17-38
Y,P	MAROZSAN ANDRE J ET AL: "Protection against Clostridium difficile infection with broadly neutralizing antitoxin monoclonal antibodies.", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 1 SEP 2012, vol. 206, no. 5, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 706-713, XP9168808, ISSN: 1537-6613 the whole document -----	1-9, 15-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/028630**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-9, 15-38

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.

International Application No. PCT/ US2013/ 028630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3, 4, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:2 and 10, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

2. claims: 1, 3, 4, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:98 and 106, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

3. claims: 1, 3, 4, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:114 and 122, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

4. claims: 1, 3, 4, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:130 and 138, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

5. claims: 2, 5, 15, 16(completely); 1, 3, 4, 17-38(partially)

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:146 and 154, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

6. claims: 1, 3, 4, 17, 18, 21-38(all partially)

International Application No. PCT/ US2013/ 028630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

directed to antibodies recognizing toxin A of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:162 and 170, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

7. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:178 and 186, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

8. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:194 and 202, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

9. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:210 and 218, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

10. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:226 and 234, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

11. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:242 and 250, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids,

International Application No. PCT/ US2013/ 028630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

vectors and host cells expressing these antibodies.

12. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:258 and 266, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

13. claims: 6, 9(completely); 1, 7, 8, 17-38(partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:274 and 282, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

14. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:290 and 298, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

15. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:306 and 314, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

16. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:322 and 330, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

17. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

International Application No. PCT/ US2013/ 028630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

directed to antibodies recognizing toxin B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:338 and 346, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

18. claims: 1, 7, 8, 17, 18, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxin B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:354 and 362, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

19. claims: 1, 10-14, 17, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxins A and B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:18 and 26, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

20. claims: 1, 10-14, 17, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxins A and B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:34 and 42, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

21. claims: 1, 11, 13, 17, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxins A and B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:50 and 58, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids, vectors and host cells expressing these antibodies.

22. claims: 1, 11, 13, 17, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxins A and B of *Clostridium difficile* and having heavy and light chain CDRs contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID NO:66 and 74, respectively, to pharmaceutical compositions and medical uses of these antibodies and to nucleic acids,

International Application No. PCT/ US2013/ 028630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

vectors and host cells expressing these antibodies.

23. claims: 1, 11, 13, 17, 21-38(all partially)

directed to antibodies recognizing toxins A and B of
Clostridium difficile and having heavy and light chain CDRs
contained within heavy and chain variable regions of SEQ ID
NO:82 and 90, respectively, to pharmaceutical compositions
and medical uses of these antibodies and to nucleic acids,
vectors and host cells expressing these antibodies.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/028630

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2270045	A1	05-01-2011	AT 512986 T 15-07-2011
		AU 2005320349 A1 24-08-2006	
		BR P10507433 A 03-07-2007	
		CA 2553946 A1 06-08-2005	
		DK 1766093 T3 03-10-2011	
		EP 1766093 A2 28-03-2007	
		EP 2270045 A1 05-01-2011	
		HK 1102287 A1 04-11-2011	
		HR P20110599 T1 31-10-2011	
		JP 4588763 B2 01-12-2010	
		JP 2007533330 A 22-11-2007	
		JP 2011019516 A 03-02-2011	
		KR 20070050863 A 16-05-2007	
		KR 20120003017 A 09-01-2012	
		KR 20120083534 A 25-07-2012	
		NZ 548821 A 24-12-2009	
		PT 1766093 E 24-08-2011	
		RS 51908 B 29-02-2012	
		US 2005287150 A1 29-12-2005	
		US 2010233181 A1 16-09-2010	
		US 2010233182 A1 16-09-2010	
		US 2012288508 A1 15-11-2012	
		WO 2006121422 A2 16-11-2006	
US 2009087478	A1	02-04-2009	AU 2005321974 A1 06-07-2006
		CA 2592015 A1 06-07-2006	
		EP 1833510 A2 19-09-2007	
		US 2009087478 A1 02-04-2009	
		WO 2006071877 A2 06-07-2006	
WO 2011130650	A2	20-10-2011	AU 2011239470 A1 01-11-2012
		CA 2795953 A1 20-10-2011	
		CN 102947334 A 27-02-2013	
		EP 2558493 A2 20-02-2013	
		WO 2011130650 A2 20-10-2011	
US 2004137601	A1	15-07-2004	AT 254139 T 15-11-2003
		AU 9742698 A 29-03-1999	
		BR 9815367 A 06-11-2001	
		CA 2303202 A1 18-03-1999	
		CN 1273588 A 15-11-2000	
		DE 19739685 A1 11-03-1999	
		DE 59810172 D1 18-12-2003	
		EP 0994904 A2 26-04-2000	
		ES 2210832 T3 01-07-2004	
		JP 4318398 B2 19-08-2009	
		JP 2001515920 A 25-09-2001	
		US 6667035 B1 23-12-2003	
		US 2004137601 A1 15-07-2004	
		WO 9912971 A2 18-03-1999	
US 6596541	B2	22-07-2003	CA 2438390 A1 29-08-2002
		CZ 20032192 A3 17-03-2004	
		DK 1360287 T3 08-10-2012	
		EP 1360287 A1 12-11-2003	
		EP 2264163 A2 22-12-2010	
		ES 2391391 T3 23-11-2012	
		HK 1057058 A1 18-01-2013	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/028630

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		HU 0303187 A2	29-12-2003	
		JP 4412900 B2	10-02-2010	
		JP 2004524841 A	19-08-2004	
		JP 2009240331 A	22-10-2009	
		JP 2012095670 A	24-05-2012	
		JP 2013090631 A	16-05-2013	
		MX PA03007325 A	04-12-2003	
		NZ 527629 A	24-03-2005	
		PL 364281 A1	13-12-2004	
		PT 1360287 E	06-12-2012	
		US 2002106629 A1	08-08-2002	
		US 2004018626 A1	29-01-2004	
		US 2007061900 A1	15-03-2007	
		US 2011258710 A1	20-10-2011	
		US 2011283376 A1	17-11-2011	
		US 2013130388 A1	23-05-2013	
		WO 02066630 A1	29-08-2002	
		ZA 200306275 A	13-08-2004	

WO 2011063346	A1	26-05-2011	US 2012282274 A1	08-11-2012
			WO 2011063346 A1	26-05-2011

WO 9118293	A1	28-11-1991	AT 160575 T	15-12-1997
			AU 655586 B2	05-01-1995
			CA 2063709 A1	12-11-1991
			DE 69128273 D1	08-01-1998
			DE 69128273 T2	25-06-1998
			DK 0482176 T3	18-05-1998
			EP 0482176 A1	29-04-1992
			ES 2110993 T3	01-03-1998
			IE 911617 A1	20-11-1991
			JP H05500011 A	14-01-1993
			US 5231003 A	27-07-1993
			WO 9118293 A1	28-11-1991

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/14 (2006.01)		A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 1/12 (2006.01)		A 6 1 P 1/12	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ガーネット - バンダー , アン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 1 2 , カーメル , ハビランド ロード 7 6
 (72) 発明者 アレクビエタ , カルロス
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 4 0 , ニューヨーク , ナグル アベニュー 5 5 ,
 アpartment 6 ビー
 (72) 発明者 ローウィ , イスラエル
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 2 2 , ドブス フェリー , アップルトン プレイス
 4 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 HA08
 4C084 AA19 MA16 MA66 NA05 ZA661 ZA662 ZA731 ZA732 ZB081 ZB082
 ZB351 ZB352 ZC371 ZC372
 4C085 AA14 BB31 BB36 BB41 BB43 BB44 CC02 CC23 DD62 EE01
 EE03 GG01 GG02 GG04
 4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 FA72 FA74