

(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2014-534169

(P2014-534169A)

(43) 公表日 平成26年12月18日 (2014.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/16 (2006.01)	A 6 1 K 35/16	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-531256 (P2014-531256)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月21日 (2012.9.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月19日 (2014.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/068703
 (87) 国際公開番号 W02013/041707
 (87) 国際公開日 平成25年3月28日 (2013.3.28)
 (31) 優先権主張番号 11182598.0
 (32) 優先日 平成23年9月23日 (2011.9.23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/545,763
 (32) 優先日 平成23年10月11日 (2011.10.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510232393
 ユリウス・マクシミリアンスーユニヴェル
 ジテート・ヴェルツブルク
 Julius Maximilians-
 Universitaet Wuerzb
 urg
 ドイツ97070ヴェルツブルク、ザンダ
 ーリング2番
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 オールセン, クヌート
 ドイツ連邦共和国 97078 ヴェルツ
 ブルク、アム ゾンネンベルク 45

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Staphylococcus aureus* エピトープ結合部位を形成するペプチドまたはペプチドの配置

(57) 【要約】

本発明は、第一のアミノ酸配列が配列番号1の配列に少なくとも88%相同であり、かつ、第二のアミノ酸配列が配列番号2の配列に少なくとも88%相同である、第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列を含む *Staphylococcus aureus* エピトープ結合部位を形成するペプチドまたはペプチドの配置に関する。

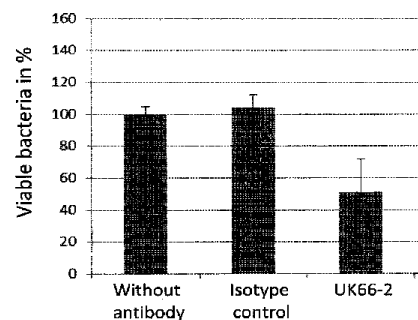


Fig. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列を含む *Staphylococcus aureus* エピトープ結合部位を形成するペプチドまたはペプチドの配置であって、第一のアミノ酸配列は配列番号 1 に少なくとも 88% 相同であり、第二のアミノ酸配列は配列番号 2 に少なくとも 88% 相同である、前記ペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 2】

第一のアミノ酸配列が、配列番号 1 の配列に、少なくとも 90% 相同、特に少なくとも 92.5% 相同、特に少なくとも 95% 相同、特に少なくとも 97.5% 相同、特に 100% 相同である、および/または、第二のアミノ酸配列が、配列番号 2 の配列に、少なくとも 90% 相同、特に少なくとも 92.5% 相同、特に少なくとも 95% 相同、特に少なくとも 97.5% 相同、特に 100% 相同である、請求項 1 に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

10

【請求項 3】

第一のアミノ酸配列が重鎖の一部である、および/または、第二のアミノ酸配列が抗体または抗体フラグメントの軽鎖の一部である、または、第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列が単一鎖の可変フラグメント (scFv)、もしくは、抗体の Fc フラグメントを含む単一鎖の可変フラグメント (scFvFc) を含む、請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

20

【請求項 4】

抗体が、モノクローナル抗体、特に IgG 型、特に IgG1 型、IgG2 型、または IgG4 型の抗体である、請求項 3 に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 5】

フラグメントが、Fab フラグメント、Fab/c フラグメント、Fv フラグメント、Fab' フラグメントまたは F(ab')₂ フラグメントである、請求項 3 または 4 に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 6】

抗体が、細胞株、特に昆虫の細胞株または哺乳動物の細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) の細胞株またはハイブリドーマの細胞株の細胞において生産される組み換え抗体である、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

30

【請求項 7】

第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列によって形成されない抗体の一部が、ヒト抗体の対応する一部に、少なくとも 85% 相同、特に少なくとも 90% 相同、特に少なくとも 92.5% 相同、特に少なくとも 95% 相同、特に少なくとも 97.5% 相同、特に 100% 相同である、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 8】

軽鎖が配列番号 6 の配列、特に配列番号 7 の配列を含み、重鎖が配列番号 4 の配列、特に配列番号 5 の配列、配列番号 9 の配列、特に配列番号 10 の配列、または配列番号 11 の配列、特に配列番号 12 の配列を含む、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

40

【請求項 9】

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 10】

医薬が、ヒトまたは動物の処置のための医薬であり、該ヒトまたは動物は、*Staphylococcus aureus*、とりわけメチシリン耐性またはメチシリン感受性の *Staphylococcus aureus* に感染しているか、またはそのような感染にかかるリスクがある、請求項 9 に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

50

【請求項 1 1】

ヒトまたは動物が、乳腺炎、*S. aureus*菌血症、血流感染、人工装具感染、移植片感染、軟部組織感染、外科関連感染、小児または新生児感染、透析関連感染、肺炎、骨感染、または感染によって引き起こされる敗血症を持つ、請求項 1 0 に記載のペプチドまたはペプチドの配置

【請求項 1 2】

ペプチドまたはペプチドの配置が、*Staphylococcus aureus*の少なくとも 1 つのさらなるエピトープに対する、少なくとも 1 つの他のペプチドまたはペプチドの配置を有する混合物において存在する、前記ペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 1 3】

ペプチドまたはペプチドの配置が、少なくとも 1 つの抗生物質を有する混合物において存在する、請求項 9 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 1 4】

ペプチドまたはペプチドの配置が、哺乳動物、とりわけヒトの血漿または血液において存在する、請求項 9 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 1 5】

医薬が、全身のおよび / または局所的な利用のための医薬である、請求項 9 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置。

【請求項 1 6】

*Staphylococcus aureus*の検出のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置を包含するキット。

【請求項 1 7】

*Staphylococcus aureus*の検出のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置の使用。

【請求項 1 8】

請求項 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、抗体フラグメント、ScFv、またはScFvFcを生産する細胞株。

【請求項 1 9】

ヒトまたは動物の処置方法であって、該ヒトまたは動物は、*Staphylococcus aureus*、とりわけメチシリン耐性またはメチシリン感受性の*Staphylococcus aureus*に感染しているか、またはそのような感染にかかるリスクがあり、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のペプチドまたはペプチドの配置がヒトまたは動物に投与される、前記処置方法。

【請求項 2 0】

ヒトまたは動物が、乳腺炎、*S. aureus*菌血症、血流感染、人工装具感染、移植片感染、軟部組織感染、外科関連感染、小児または新生児感染、透析関連感染、肺炎、骨感染、または感染によって引き起こされる敗血症を持つ、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ペプチドまたはペプチドの配置が、*Staphylococcus aureus*の少なくとも 1 つのさらなるエピトープに対する、少なくとも 1 つの他のペプチドまたはペプチドの配置を有する混合物において存在する、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

ペプチドまたはペプチドの配置を、投与前に、哺乳動物、とりわけヒトの血漿または血液と混ぜる、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

ペプチドまたはペプチドの配置を、局所的または全身的に、特に、静脈、肺内、腹腔内、鼻、または舌下に投与する、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

ペプチドまたはペプチドの配置を、少なくとも 1 つの抗生物質とあわせて投与する、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、Staphylococcus aureus (= S. aureus) エピトープ結合部位を形成するペプチドまたはペプチドの配置 (arrangement)、本ペプチドまたはペプチドの配置を包含するキット、本ペプチドまたはペプチドの配置の使用、本ペプチドまたはペプチドの配置を含む抗体を生産する細胞株、および処置方法に関する。

【0002】

WO 2010/133600 A1より、IsaAのS. aureusエピトープに対する抗体またはそのフラグメントは知られている。これらの抗体は、第一可変領域を有する重鎖および第二可変領域を有する軽鎖から形成される結合部位を持ち、ここで、第一可変領域の配列は配列番号13であってもよく、第二可変領域の配列は配列番号14であってもよい。哺乳動物におけるS. aureusに対する抗体の有効性は、食血球による食作用によるS. aureusの死滅 (killing) に依存する。WO 2010/133600 A1より知られる抗体によって食作用過程は加速された。30分のインキュベーション後、IsaAのエピトープに特異的な抗体の存在下におけるヒト好中球によるS. aureusの死滅によって、非特異的な対照抗体と比較して、約25%から30%高まった。

【0003】

本発明の目的は、食血球によるS. aureusの死滅に関する抗体または抗体のフラグメントに極めて有効であり、したがって、Staphylococcus aureusによって引き起こされる感染症の処置によく適したS. aureusエピトープ結合部位を提供することである。さらに、結合部位はS. aureusの検出によく適しているべきである。本発明のさらなる目的は、結合部位を包含するキット、結合部位の使用、結合部位を含む、抗体、抗体フラグメント、ScFvsまたはScFvFcを分泌する細胞株、および処置方法を提供することである。

【0004】

本目的は、請求項1、9、16、17、18および19の主題によって解決される。本発明の態様は請求項2から8、10から15、および20から24において開示される。

【0005】

本発明により、第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列を含むStaphylococcus aureusエピトープ結合部位を形成するペプチドまたはペプチドの配置が提供される。第一のアミノ酸配列は、配列番号1の配列に少なくとも88%相同であり、第二のアミノ酸配列は、配列番号2に少なくとも88%相同である。

【0006】

態様において、第一のアミノ酸配列は、配列番号1の配列に、少なくとも90%相同、特に少なくとも92.5%相同、特に少なくとも95%相同、特に少なくとも97.5%相同、特に100%相同である。第二のアミノ酸配列は、配列番号2の配列に、少なくとも90%相同、特に少なくとも92.5%相同、特に少なくとも95%相同、特に少なくとも97.5%相同、特に100%相同である。

【0007】

第一のアミノ酸配列は、重鎖の一部であってもよく、および/または第二のアミノ酸配列は、抗体または抗体フラグメントの軽鎖の一部であってもよい。この場合、第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列は、抗体または抗体フラグメントの可変領域を形成する。結合部位は単一鎖の可変フラグメントによって形成されることもできる。この場合、第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列は、単一鎖の可変フラグメント (scFv)、または抗体のFcフラグメントを含む単一鎖の可変フラグメント (scFvFc) に含まれる。FcフラグメントはscFvFcが結合したS. aureusの食作用を高める。

【0008】

本発明者らは、WO 2010/133600 A1から知られる抗体の1つの結合領域を改変し、それによって、ヘパリン化されたヒト全血における食血球による食作用によるS. aureusの死滅の支援において、知られた抗体よりも、より効果的な結合部位を開発した。以下のアラインメント配列から見られるように、配列番号1は、対応する配列番号13の配列とは、

1 1 8 アミノ酸の 1 7 箇所であり、および、配列番号 2 は、WO 2010/133600 A1 から知られる配列番号 1 4 とは 1 1 3 アミノ酸の 8 箇所異なる：

【表 1】

配列番号	:1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSDINGNGGSTYY	60
		V L ESGGGLV GGS L SC ASGFTFSNYYMSWVRQ P K LE V DINGNGGSTYY	
配列番号	:13	MADVKLVESGGGLVKLGSLKLSASGFTFSNYYMSWVRQTPEKRLELVADINGNGGSTYY	62
配列番号	:1	PDTVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRGGYYALDYWGQGT TVTVSS	118
		PDTVKGRTISRDN KNTLYLQM SL EDTA YYCVRGGYYALDYWGQGT TVTVSS	
配列番号	:13	PDTVKGRTISRDN AKNTLYLQMSS LKSEDTALYYCVRGGYYALDYWGQGT TVTVSS	120
配列番号	:2	DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRF	60
		DVVMQTPLSL V G ASISCRSSQSLVHNGNTYLHWYLQKPGQSP LLIYRVSNRF	
配列番号	:14	DVVMQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRF	60
配列番号	:2	SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKLELKR	113
		SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED G VY CSQSTHVPWTFGGGTKLELKR	
配列番号	:14	SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLELKR	113

相同なアミノ酸は配列間の空間において表示されている。

【0009】

第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列を含む可変領域を包含する抗体は、メチシリン耐性およびメチシリン感受性の *S. aureus* において、免疫優性構造の *IsaA* に対しては高い親和性、および本構造への結合に関しては高い特異性を示す。

【0010】

抗体は、モノクローナル抗体、特に IgG 型、特に IgG1 型、IgG2 型または IgG4 型の抗体であってもよい。フラグメントは Fab フラグメント、Fab/c フラグメント、Fv フラグメント、Fab' フラグメントまたは F(ab')₂ フラグメントであってもよい。*S. aureus* の細胞壁は、その Fc 部分を介して免疫グロブリンに非特異的に結合するタンパク質 A を包含するので、これらのフラグメントは *S. aureus* の検出に特に有用である。

【0011】

本発明の態様において、抗体は、細胞株、特に昆虫の細胞株または哺乳動物の細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) の細胞株、またはハイブリドーマの細胞株の細胞において生産される組み換え抗体である。第一のアミノ酸配列および第二のアミノ酸配列で形成されない抗体の一部は、ヒト抗体の対応する一部に、少なくとも 85% 相同、特に少なくとも 90% 相同、特に少なくとも 92.5% 相同、特に少なくとも 95% 相同、特に少なくとも 97.5% 相同、特に 100% 相同である。抗体の軽鎖は、配列番号 6 の配列、特に配列番号 7 の配列を含むことができ、重鎖は配列番号 4 の配列、特に配列番号 5、配列番号 9 の配列、特に配列番号 10 の配列、または配列番号 11 の配列、特に配列番号 12 を含むことができる。配列番号 7、配列番号 5、配列番号 10 および配列番号 12 の配列は、KV3A9-mous の MOPC 63、Ig kappa chain V-III からの配列番号 8 のリーダー配列を含む。本リーダー配列は哺乳動物の細胞においてよい発現を可能にする。配列番号 4 の配列は、配列番号 1 の配列および IgG1 の重鎖、ヒト 1 アロタイプ Gm 1、17 を含む。配列番号 6 の配列は、配列番号 2 の配列および IgG 軽鎖 K を含む。配列番号 9 の配列は配列番号 1 の配列および IgG2 の重鎖、アロタイプ G2m(23) を含む。配列番号 11 の配列は配列番号 1 および IgG4 の重鎖を含む。

【0012】

ペプチドまたはペプチドの配置は、本発明により、医薬として用いられてもよい。とりわけ、それらはヒトまたは動物の処置のための医薬として用いられてもよく、該ヒトまたは動物は、*S. aureus*、とりわけメチシリン耐性またはメチシリン感受性の *S. aureus* に感染しているか、またはそのような感染にかかるリスクがある。本発明の意味での処置は予防を含む。動物は哺乳動物であってもよい。ヒトまたは動物は、乳腺炎、*S. aureus* 菌血症、特に、原発性または二次的菌血症、血流感染、特に、原発性または二次的血流感染、

10

20

30

40

50

人工装具感染 (prosthetic infection)、移植片感染、軟部組織感染、外科関連感染、小児または新生児感染、透析関連感染、肺炎、骨感染、または感染によって引き起こされる敗血症であり得る。乳腺炎はウシ乳腺炎であってもよい。乳牛がウシ乳腺炎にかかった場合、乳牛から使用可能な牛乳が生産されることはなく、乳牛が、この場合では通例のとおり、抗生物質で処置された場合、この乳牛によって生産される牛乳は、この乳牛の牛乳に抗生物質が包含されなくなるまで捨てなければならない。この通例の処置の不利益は、本発明により、ウシ乳腺炎の処置のための医薬としてのペプチドまたはペプチドの配置の使用によって回避し得る。

【0013】

ペプチドまたはペプチドの配置は、*S. aureus*の少なくとも1つのさらなるエピトープに対する、少なくとも1つの他のペプチドまたはペプチドの配置を有する混合物において存在し得る。このさらなるエピトープは、エピトープが位置する抗原、すなわちIsaA、または、さらなる抗原に位置してもよい。かかる混合物の医薬としての使用は、単に、本発明によるペプチドまたはペプチドの配置を包含する医薬の使用よりも、より効果的であり得る。これは、種々の菌株 (strains) における、異なる程度の抗原の発現を引き起こし、抗体またはフラグメント単独よりも、より多くの細菌が抗体またはフラグメントの混合物によって識別される、*S. aureus*の高い変異性 (variability) によるものであり得る。

【0014】

ペプチドまたはペプチドの配置は、少なくとも1つの抗生物質と混合物において存在し得る。医薬で処置されるべきヒトまたは動物において、変異した*S. aureus*は一般的な*S. aureus*に加えて存在してもよい。変異した*S. aureus*は、本発明により、ペプチドまたはペプチドの配置によって認識されることができない、変異したIsaAを持ち得る。この場合において、抗生物質は変異した*S. aureus*に対して有効であり得る。

【0015】

本発明によるペプチドまたはペプチドの配置は、哺乳動物、特にヒトの血漿または血液を有する混合物において存在してもよい。本発明者らは、血漿で混合した本発明によるペプチドまたはペプチドの配置が、生理食塩水に包含される本発明によるペプチドまたはペプチドの配置よりもはるかに有効であり得ることを見出した。

【0016】

医薬は全身のおよび/または局所的な利用のために調製される医薬であってもよい。本発明者らは、本発明によるペプチドまたはペプチドの配置による重篤な*S. aureus*感染の処置は、著しい死亡率の減少、および処置されたヒトまたは動物の臓器における*S. aureus*の数の減少になることを認めた。

【0017】

本発明は、*S. aureus*の検出、特に非常に特異的な検出のための、本発明によるペプチドまたはペプチドの配置を包含するキットにも関する。

【0018】

本発明は、さらに、*S. aureus*の検出、特に非常に特異的な検出のための、本発明によるペプチドまたはペプチドの配置の使用に関する。

【0019】

さらに、本発明は、上述のとおり、抗体、抗体フラグメント、ScFvまたはScFvFcを生産する、細胞株、特に昆虫の細胞株または哺乳動物の細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) の細胞株またはハイブリドーマの細胞株に関する。

【0020】

本発明は、さらに、ヒトまたは動物の処置方法に関するものであり、該ヒトまたは動物が、*Staphylococcus aureus*、とりわけメチシリン耐性またはメチシリン感受性*Staphylococcus aureus*に感染する、またはそのような感染にかかるリスクがあり、ここで、本発明によるペプチドまたはペプチドの配置が、ヒトまたは動物に投与される。ペプチドまたはペプチドの配置は、ヒトまたは動物における*S. aureus*の量を減少させるために、または*S. aureus*を排除するために十分な投薬量において投与される。ペプチドまたはペプチドの

10

20

30

40

50

配置は適した担体と混合してもよい。

【 0 0 2 1 】

ヒトまたは動物は、乳腺炎、*S. aureus*菌血症、特に、原発性または二次的菌血症、血流感染、特に、原発性または二次的血流感染、人工装具感染、移植片感染、軟組織感染、外科関連感染、小児または新生児感染、透析関連感染、肺炎、骨感染、または感染によって引き起こされる敗血症になり得る。

【 0 0 2 2 】

ペプチドまたはペプチドの配置は、*S. aureus*の少なくとも1つのさらなるエピトープに対する、少なくとも1つの他のペプチドまたはペプチドの配置を有する混合物において存在し得る。ペプチドまたはペプチドの配置は、投与前に、哺乳動物、とりわけヒトの血漿または血液と混ぜてもよい。ペプチドまたはペプチドの配置は、局所的または全身的に、特に、静脈、肺内、腹腔内、鼻、または舌下に投与してもよい。これらは少なくとも1つの抗生物質とあわせて投与してもよい。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

発明の態様

【図1】図1は、IsaA抗原への種々の抗IsaA抗体の結合を決定する競合ELISAの結果を示している。

【 0 0 2 4 】

【図2】図2は、種々の*S. aureus*株への種々の抗IsaA抗体の結合を決定する細菌細胞ELISAを示している。

【 0 0 2 5 】

【図3】図3は、ヘパリン化したヒト全血において、食血球による食作用による*S. aureus*のNewman株の死滅の定量を示している。

【 0 0 2 6 】

【図4】図4は、健康な血液提供者 (n = 15) からのヘパリン化したヒト全血において、食血球による食作用による*S. aureus*のNewman株の死滅の定量を示している。

【 0 0 2 7 】

【図5】図5は、透析患者からのヘパリン化したヒト全血において、食血球による食作用による*S. aureus*のNewman株の死滅の定量を示している。

【 0 0 2 8 】

【図6】図6は、HL-60細胞における対照アイソタイプと対比して、抗IsaA抗体UK66-2の2つの濃度の存在下において、生物発光の*S. aureus*のNewman (Newlux) 株のオプソニン食作用障害作用を示している。

【 0 0 2 9 】

配列番号1および2、配列番号1および3、および他の配列を包含するScFv分子は、*E. coli*において発現され、ELISAと競合ELISAにおいて、結合および親和性の試験を行った。結果は、配列番号1および2の配列を包含するScFv分子の親和性は、配列番号1および3の配列を包含するScFv分子の親和性と比べて約10倍高いことを示した。

【 0 0 3 0 】

完全な抗体の発現のためのベクターコンストラクトは、CHO細胞に導入された。Igkリーダー配列である配列番号8の配列を有する配列番号4の配列 (配列番号1の配列を含む) (配列番号5の配列になる) によるIgG1の重鎖、ヒト1アロタイプGm1、17、および、Igkリーダー配列である配列番号8の配列を有する配列番号6の配列 (配列番号2の配列を含む) (配列番号7の配列になる) によるIgGの軽鎖Kを発現し、抗体UK66-2を形成した。機能的活動へのアイソタイプの影響を調べるために、IgG2およびIgG4アイソタイプを合成した。このために、IgG1の重鎖は、Igkリーダー配列である配列番号8の配列を有する配列番号9の配列 (配列番号10の配列になる) によるIgG2の重鎖、アロタイプG2m (23)、または、Igkリーダー配列である配列番号8の配列を有する配列番号11の配列 (配列番号12の配列になる) によるIgG4の重鎖と置き換えた。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

発現後、IgG1抗体はタンパク質AカラムによってCHO細胞の上清から精製された。精製された抗体は、結合のカイネティクス、ELISA、競合ELISA、ウェスタンブロット、および免疫蛍光における結合、およびヒト食血球を用いた食作用アッセイにおける機能のために試験された。機能アッセイにおいて、配列番号1および2の配列を含む抗体(UK66-2)は、知られた抗体UK66よりも、酸化バーストおよび*S. aureus*の死滅を著しく高めた。

【 0 0 3 2 】

IsaAの固定された抗体UK66-2への結合のカイネティクスは、BIAcore (登録商標) 2000 system (GE Healthcare Europe GmbH, Munzinger Strasse 5, 79111 Freiburg, Germany) を用いて、ラベルフリーな表面プラズモン共鳴によって決定された。抗体UK66-2の可逆的な固定は、抗Fab抗体によって行われた。相互作用の解析は、HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005 % Tween 20) を用いて行われた。センサグラムは25 で30 $\mu\text{l} / \text{min}$ の流速で記録された。

10

【 0 0 3 3 】

結合 (k_{on}) および解離 (k_{off}) の親和性および速度定数は、得られたセンサグラムを1:1ラングミュア結合モデルにフィッティングするBIAevaluation software 4.0.1によって算出された。本方法において、4.8 nMの解離定数 K_D は、独立した2つの測定において決定された。UK66-2とIsaA間の相互作用の結合および解離の速度定数は、それぞれ $3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (k_{on}) および $1.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (k_{off}) と決定した。

20

【 0 0 3 4 】

図1は、可溶性組み換え型IsaA抗原への種々の抗IsaA抗体の結合を決定する競合ELISAの結果を示している。450 nmでの光学密度は、IsaAへの抗体の結合を示している。可溶性IsaAは種々の濃度において加えた。3本の線は、以下の抗IsaA抗体を用いて得られた結果を示している：

0.01 μM の可溶性IsaAでの上部の線：UK66 (WO 2010/133600 A1から知られる参照抗体)

0.01 μM の可溶性IsaAでの中央の線：UK66-2 (配列番号1および2の配列を含む結合部位を有する抗体)

0.01 μM の可溶性IsaAでの下部の線：UK66-3 (配列番号1および3の配列を含む結合部位を有する抗体)

30

【 0 0 3 5 】

方法の記述：

Nunc-Maxisorp 96 ウェルプレート、50 μl / ウェル (1 x PBSにおいて0.5 μg / ウェル) のIsaAでコートし、4 でオーバーナイトでインキュベートした。翌日、プレートを0.05 % Tween 20 (PBST) を包含するPBS pH 7.4で3回洗浄した。洗浄の後、200 μl の5 % スキムミルクパウダー / PBSの添加によってブロッキングを行い、室温で1時間インキュベートした。ウェルはPBST (0.05 %) で2回洗浄し、プライマリーな抗IsaA抗体を0.4 μM から0.01 μM におよぶ一連の濃度において加えた。プライマリーな抗IsaA-IgG1抗体は、2.5 % スキムミルクパウダー / PBSにおいて希釈され、37 で1時間インキュベートした。次に、ウェルをPBST (0.05 %) で3回洗浄し、2.5 % のスキムミルクパウダー / PBSにおいて1:5000希釈した50 μl のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体を加え、37 で1時間インキュベートした。ウェルはPBST (0.05 %) で4回洗浄し、50 μl のTMB (Thermo Scientific Pierce ELISA substrate) を加え、37 で15分間インキュベートした。反応は100 μl の1N H_2SO_4 で停止させ、基質反応の光学密度はOD 450 nmでELISAプレートリーダーを用いて解析した。

40

【 0 0 3 6 】

図2は、*S. aureus*株、USA300、SH1000、RN4220、E, MA12およびMA12isaA-への種々の抗IsaA抗体の結合を決定する細菌ELISAを示している。MA12isaA-において、免疫優性構造

50

のIsaAを削除した。450nmでの光学密度は、細菌細胞への抗体の結合を示している。三つのカラムは以下の抗IsaA抗体を用いて得られた結果を示している：

左カラム：抗体UK66（参照抗体）

中央カラム：抗体UK66-2

右カラム：抗体UK66-3

【0037】

方法の記述：

S. aureusの株は、B培地において37℃でオーバーナイトで培養した。細菌は1分間で13000rpmで遠心分離によってペレット化させ、PBS (phosphate buffered saline) で洗浄した。遠心分離の過程の後、ペレットを1ml PBSにおいて再懸濁した。5 × 10⁷ 細菌 / 50 μl を包含する細菌懸濁液を調製した。Nunc-Maxisorp 96 ウェルプレートは、50 μl / ウェルの細菌懸濁液でコートし、4℃でオーバーナイトでインキュベートした。翌日、プレートは0.05%のTween 20 (PBST) を包含するPBS pH 7.4で3回洗浄した。洗浄の後、200 μl の5%のスkimミルクパウダー / PBSの添加によってブロッキングを行い、室温で1時間インキュベートした。ウェルはPBST (0.05%) で2回洗浄し、プライマリーな抗IsaA抗体を加えた。プライマリーな抗IsaA-IgG1抗体を、2.5%スkimミルクパウダー / PBSにおいて1:2000希釈し、50 μl / ウェルを加え、37℃で1時間インキュベートした。次に、ウェルをPBST (0.05%) で3回洗浄し、2.5%スkimミルクパウダー / PBSにおいて1:5000希釈した50 μl ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体を加え、37℃で1時間インキュベートした。ウェルはPBST (0.05%) で4回洗浄し、50 μl のTMB (Thermo Scientific Pierce ELISA substrate) を加え、37℃で15分間インキュベートした。反応は100 μl の1N H₂SO₄で停止させ、基質反応の光学密度はOD 450nmでELISAプレートリーダーを用いて解析された。

【0038】

図3は、ヘパリン化したヒト全血における食血球による食作用によるS. aureusのNewman株の死滅の定量を示している。細菌はヘパリン化したヒト全血で30分間インキュベートした。抗体溶液なしでインキュベーション後の生存細菌の数を100%とした（左カラム）。死滅は、アイソタイプ対照抗体（中央カラム）と比べて、UK66-2（右カラム）の存在下において著しく増加した。

【0039】

方法の記述：

S. aureusのNewman株はB培地において37℃でオーバーナイトで培養した。細菌は13000rpmで1分間の遠心分離によってペレット化し、PBSで洗浄した。遠心分離の過程を繰り返し行い、細菌は1ml PBSにおいて再懸濁した。5 × 10⁷ 細菌 / 20 μl の細菌溶液を調製した。100 μl のヘパリン化した血液を1.5mlチューブに加え、氷上で保存した。20 μl の細菌懸濁液および抗体溶液を加え、抗体を包含しないが細菌を包含する陰性対照試料を除いた。試料は、ハイブリダイゼーションオープンにおける高架 (overhead) で、一定の動きで37℃で30分間インキュベートした。食作用は、試料を氷上に置くことによって停止させた。血球は、調製された0.1%の新鮮なサポニンで溶解させた（氷上で20分間）。試料の二つの段階希釈系列を調製した。20 μl の10⁻²、10⁻³、および10⁻⁴希釈をそれぞれLBプレートにおいて2連で播種し、37℃で24時間インキュベートした。コロニーを数え、死滅は抗体溶液のない血液における生存細菌の数を100%として計算した。

【0040】

図4は、健康な血液提供者 (n = 15) からのヘパリン化したヒト全血における食血球による食作用によるS. aureusのNewman株の死滅の定量を示している。図5は、透析患者 (n = 7) からのヘパリン化したヒト全血における食血球による食作用によるS. aureusのNewman株の死滅の定量を示している。両方の場合において、細菌はヘパリン化された血液で60分間インキュベートした。抗体溶液なしでインキュベーション後の生存細菌の数

を100%とした(左散布図“プラセボ”)。死滅は、アイソタイプ対照抗体(第二の散布図“アイソタイプ対照[900 µg/ml]”)と比べて、UK66-2(第三および第四の散布図“UK66-2[75 µg/ml]”および“UK66-2[900 µg/ml]”)の存在下において著しく増加した。

【0041】

方法の記述:

*S. aureus*のNewman株はLB培地において37℃でオーバーナイトで培養した。細菌は13000 rpmで1分間の遠心分離によってペレット化し、PBSで洗浄した。遠心分離の過程は繰り返し行い、細菌は1 ml PBSにおいて再懸濁した。5 × 10⁷ 細菌/20 µlの細菌溶液を調製した。100 µlのヘパリン化した血液を1.5 mlチューブに加え、氷上で保存した。20 µlのバクテリア懸濁液および抗体溶液を加え、抗体を含まないが細菌を包含する陰性対照試料を除いた。試料は、ハイブリダイゼーションオープンにおいて、一定の頭上の動きで37℃で60分間インキュベートした。食作用は、試料を氷上に置くことによって停止させた。血球は、調製された0.1%の新鮮なサポニンで溶解させた(氷上で20分間)。試料の二つの段階希釈系列を調製した。20 µlの10⁻²、10⁻³、および10⁻⁴希釈をそれぞれLBプレートにおいて2連で播種し、37℃で24時間インキュベートした。コロニーを数え、死滅を計算した。抗体溶液のない血液における生存細菌の数を100%とした。

【0042】

図6は、HL-60細胞における、アイソタイプ対照(200 µg/ml)に対する、抗IsaA抗体UK66-2の二つの濃度存在下(20 µg/mlおよび200 µg/ml)における、生物発光の*S. aureus* (*S. a.*)のNewman株(Newlux)の死滅を示している。生き残った細菌の相対数の決定は、生物発光の測定によって行った。生き残った細菌は光の放射(RLU = 相対発光単位(relative light units))として与えられる。細菌の死滅はUK66-2に依存した濃度であり、アイソタイプにマッチしたヒトIgG1対照抗体では観察されない。

【0043】

方法の記述:

luxABCEドペロンを有する*S. aureus*のNewman株の単一コロニーは、5 mlのLB培地に植菌するために用いた。luxABCEドペロンは死んだ細菌ではなく生きている細菌において発光を生じることから、発光は生きている細菌の数に相関する。細菌はオーバーナイトで培養し、50 µlの本培養液は、30 µg/mlのカナマイシンで補われた5 mlのLB培地に植菌するために用いた。培養液は、37℃で4~6時間で200 rpmでロータリーシェーカー上で培養した。細菌の生物発光はLumat LB 9501 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)を用いて決定した。培養液は、100 µlの培養液が16000~24000相対発光単位(RLU)の間の範囲で生物発光シグナルを発生させたときにアッセイを行う用意ができた。培養に続いて、phosphate buffered saline (PBS)において細菌を二度洗浄し、Opti-MEM(登録商標) medium (Life Technologies, Darmstadt, Germany)において再懸濁し、終濃度を1 × 10⁹/mlとした。食作用を持つHL-60細胞は0.8%DMFで5日間分化させ、Opti-MEM(登録商標)において再懸濁して1 × 10⁸細胞/mlとし、1ウェルあたり50 µlを96ウェル組織培養プレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に植菌した。抗体溶液(50 µl)、続いて100 µlの*S. aureus* (1 × 10⁹/ml)を加えた。HL-60細胞、抗体および細菌は、37℃でインキュベートし、生物発光を15分の間隔で240分間連続的に測定し、最適なシグナル/ノイズ比を決定した。全てのアッセイは3連で行い、少なくとも3回繰り返した。生物発光はmulti-mode reader Infinite 200 Pro (TECAN, Maennedorf, Switzerland)を用いて決定した。

【図 1】

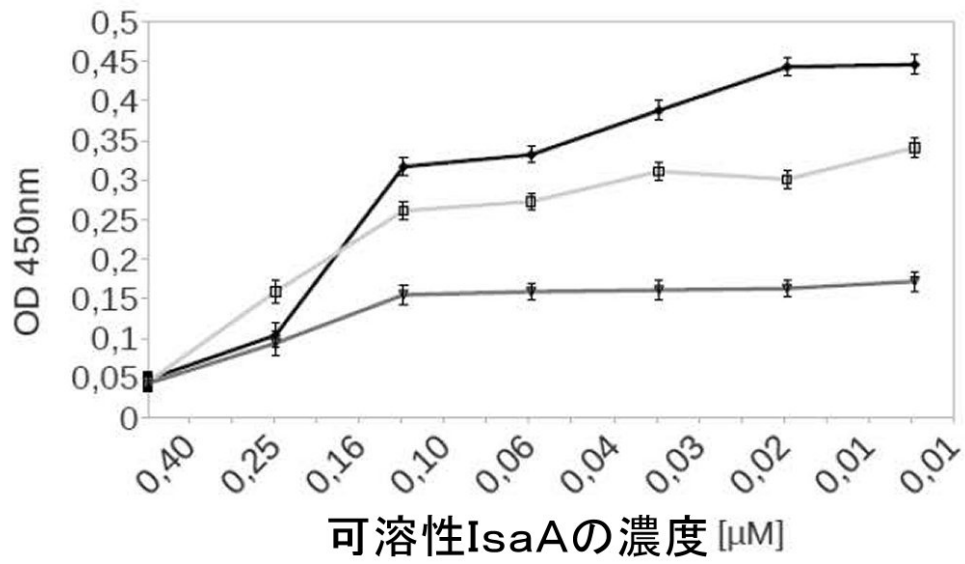


図 1

【図 2】

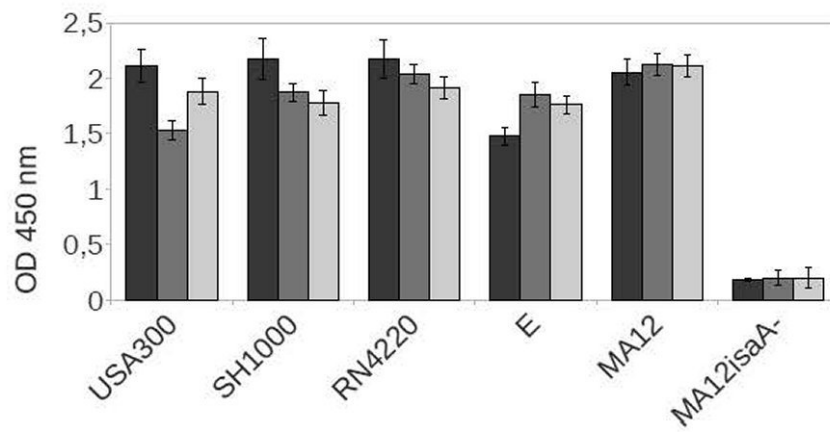


図 2

【 図 3 】

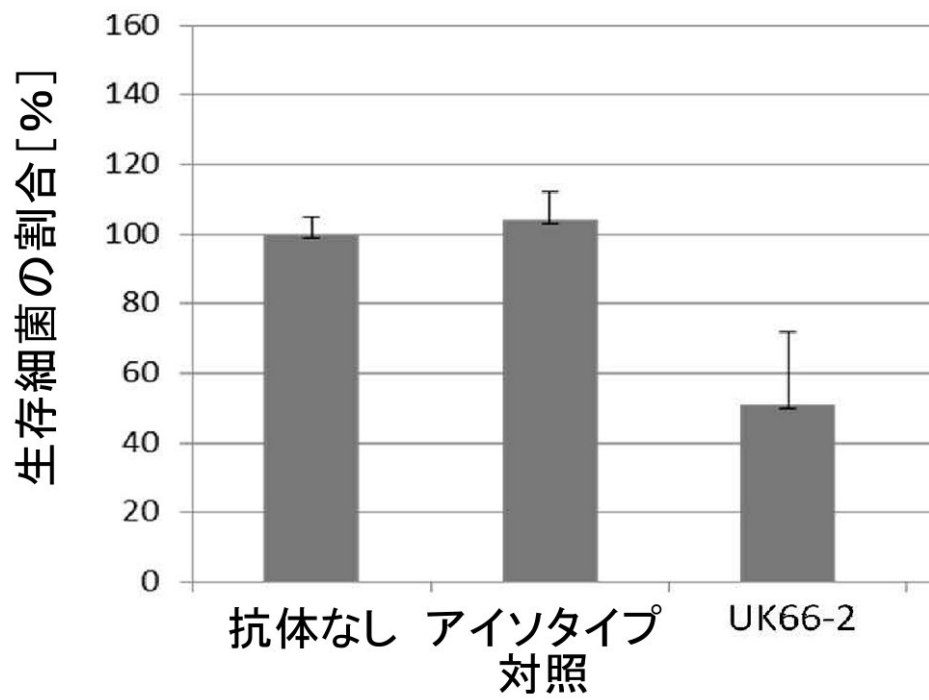


図3

生存*S. aureus*の割合 [%]

* プラセボ
 ● アイソタイプ対照 [900µg/ ml]
 ■ UK66-2 [75 µg/ ml]
 ▼ UK66-2 [900 µg/ ml]

図 4

生存*S. aureus*の割合 [%]

Legend:

- * プラセボ
- アイソタイプ対照 [900 μg/ml]
- UK66-2 [75 μg/ml]
- ▼ UK66-2 [900 μg/ml]

Treatment Group	Survival Percentage (%)
プラセボ	~100
アイソタイプ対照 [900 μg/ml]	~100
UK66-2 [75 μg/ml]	~100
UK66-2 [900 μg/ml]	~80

図5

【 図 6 】

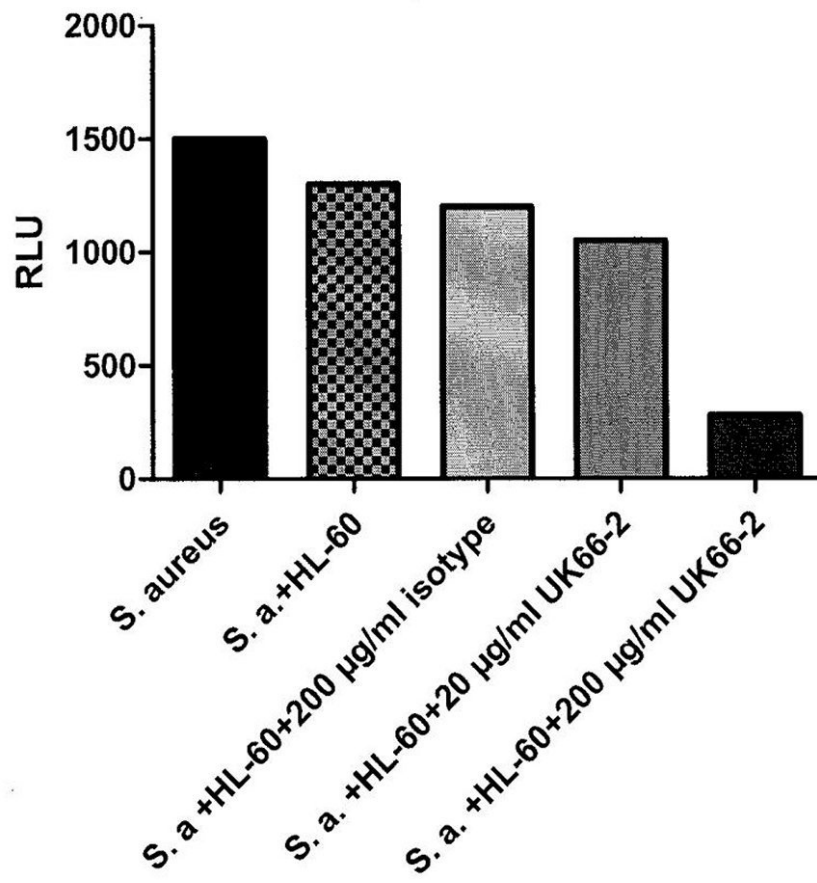


図6

【 配列表 】

2014534169000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/12 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

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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/133600 A1 (UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE]; OHLSEN KNUT [DE]; LORENZ UDO [DE]) 25 November 2010 (2010-11-25) pages 14-17	1-24
Y	----- LORENZ UDO ET AL: "Functional Antibodies Targeting IsaA of Staphylococcus aureus Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 55, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 165-173, XP002687630, ISSN: 0066-4804 pages 167-170 ----- -/--	1-24

☒ 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

21 November 2012

Date of mailing of the international search report

06/12/2012

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

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>OHLSSEN K ET AL: "Development of antibody-based therapy targeting immunodominant antigens of Staphylococcus aureus", INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY; 59TH ANNUAL MEETING OF THE DEUTSCHEN-GESELLSCHAFT-FUR-HYGIENE-UND-MIKROBIOLOGIE; GOTTINGEN, GERMANY; SEPTEMBER 30 -OCTOBER 04, 2007, URBAN UND FISCHER, DE, vol. 297, no. Suppl.1, 1 September 2007 (2007-09-01), page 128, XP008124403, ISSN: 1438-4221 the whole document</p> <p>-----</p>	1-24
Y	<p>WO 02/072600 A2 (INHIBITEX INC [US]) 19 September 2002 (2002-09-19) examples 7-9</p> <p>-----</p>	1-24
Y	<p>PATTI JOSEPH M: "A humanized monoclonal antibody targeting Staphylococcus aureus", VACCINE 6 DEC 2004, vol. 22 Suppl 1, 6 December 2004 (2004-12-06), pages S39-S43, XP002687631, ISSN: 0264-410X the whole document</p> <p>-----</p>	1-24
A	<p>OHLSSEN KNUT ET AL: "Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections", INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY : IJMM AUG 2010, vol. 300, no. 6, August 2010 (2010-08), pages 402-410, XP002687632, ISSN: 1618-0607 the whole document</p> <p>-----</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/068703

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2010133600	A1	25-11-2010	AU	2010251156	A1	24-11-2011
			CA	2761886	A1	25-11-2010
			CN	102695724	A	26-09-2012
			EP	2432804	A1	28-03-2012
			US	2012100151	A1	26-04-2012
			WO	2010133600	A1	25-11-2010

WO 02072600	A2	19-09-2002	AT	524195	T	15-09-2011
			BR	0207068	A	21-12-2004
			CA	2434762	A1	19-09-2002
			CN	1489474	A	14-04-2004
			CN	101928343	A	29-12-2010
			DK	1377314	T3	12-12-2011
			EP	1377314	A2	07-01-2004
			ES	2372686	T3	25-01-2012
			IL	157041	A	31-05-2010
			JP	4171816	B2	29-10-2008
			JP	2004534000	A	11-11-2004
			KR	20090039851	A	22-04-2009
			MX	PA03006651	A	12-11-2004
			PT	1377314	E	02-01-2012
			US	2003099656	A1	29-05-2003
			US	2005287164	A1	29-12-2005
			WO	02072600	A2	19-09-2002

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	35/14	(2006.01)	A 6 1 K	35/14	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	15/14	(2006.01)	A 6 1 P	15/14		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		

(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 ロレンツ, ウド

ドイツ連邦共和国 9 7 2 6 1 ギュンタースレーベン、グルントヴェーク 1 2

(72) 発明者 コンターマン, ローランド イー.

ドイツ連邦共和国 7 0 5 6 9 シュトゥットガルト、アルマントリンク 3 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA50 CA02 DA02 EA04 HA15
 4B063 QA01 QQ06 QR48 QS33 QX01
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13 DA15
 4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA20 BA21 MA56 MA57 MA59 MA66
 NA14 ZA59 ZA81 ZB35
 4C087 AA01 AA02 BB34 BB35 MA02 MA56 MA57 MA59 MA66 NA14
 ZA59 ZA81 ZB35
 4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA29 EA54 FA74