

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4944799号
(P4944799)

(45) 発行日 平成24年6月6日(2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月9日(2012.3.9)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 C
C O 7 K	16/12 (2006.01)	C O 7 K	16/12
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 16 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-554515 (P2007-554515)
 (86) (22) 出願日 平成18年2月13日 (2006.2.13)
 (65) 公表番号 特表2008-530988 (P2008-530988A)
 (43) 公表日 平成20年8月14日 (2008.8.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/001289
 (87) 国際公開番号 W02006/084758
 (87) 国際公開日 平成18年8月17日 (2006.8.17)
 審査請求日 平成19年11月2日 (2007.11.2)
 (31) 優先権主張番号 05003095.6
 (32) 優先日 平成17年2月14日 (2005.2.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 507272979
 ケンタ バイオテック アーゲー
 スイス国 ベルン レハグストラッセ 7
 9
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ラング アロイス ベー.
 スイス国 ヘルンベルグ アムセルウエグ
 7
 (72) 発明者 ホルン ミヒャエル ベー.
 スイス国 トウン タラッケルストラッセ
 45エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 緑膿菌 (*Pseudomonasaeruginosa*) IATSO11血清型のリポ多糖類 (LPS) に対して特異的なヒトモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の軽鎖の可変領域がCDR1領域における配列番号：1、CDR2領域における配列番号：2、およびCDR3領域における配列番号：3を含み、かつ重鎖の可変領域がCDR1領域における配列番号：4、CDR2領域における配列番号：5、およびCDR3領域における配列番号：6を含む、軽鎖および重鎖を含む緑膿菌 (*P. aeruginosa*) LPS血清型IATS 011のリポ多糖 (LPS) に特異的なヒトモノクローナル抗体、または FabもしくはF(ab')₂断片またはその混合物。

【請求項2】

軽鎖が 型である、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体。

10

【請求項3】

軽鎖が 型である、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項4】

重鎖がIgM型、IgA型またはIgG型である、請求項1~3いずれか一項記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項5】

重鎖がIgM型である、請求項4記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項6】

すべてヒトアミノ酸配列からなる、請求項1~4いずれか一項記載のヒトモノクローナル抗体。

20

【請求項7】

N末端で、内部および、またはC末端で修飾されており、該修飾が、二量体化、オリゴマー化、重合、側鎖修飾、翻訳後修飾、ならびに薬剤および/または標識への結合の少なくとも1つから選択される、請求項1~6いずれか一項記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項8】

修飾がオリゴマー化、ならびに薬剤および、または標識への結合の少なくとも1つから選択される、請求項7記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項9】

請求項1~6いずれか一項記載のヒトモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖をコードする、核酸。

10

【請求項10】

請求項9記載の少なくとも1つの核酸を含む、ベクター。

【請求項11】

発現を容易にするよう核酸に機能的に連結されるプロモーターも含む、請求項10記載のベクター。

【請求項12】

請求項10記載のベクターおよび、または請求項9記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項13】

請求項1~8いずれか一項記載の少なくとも1つのヒトモノクローナル抗体、および、または請求項9記載の少なくとも1つの核酸、ならびに任意で薬学的に許容される成分を含む、薬学的組成物。

20

【請求項14】

ヒト患者における緑膿菌感染の予防および、または治療のための、請求項13記載の薬学的組成物。

【請求項15】

緑膿菌感染が院内感染である、請求項14記載の薬学的組成物。

【請求項16】

請求項1~8いずれか一項記載の少なくとも1つのヒトモノクローナル抗体および、または請求項9の少なくとも1つの核酸を含む、試料中の緑膿菌感染の診断のための試験キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) の血清型 IATS 011 に対して特異的なヒトモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマ、それをコードする核酸、およびそれで形質移入された宿主細胞に関する。さらに本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するための方法に関する。加えて本発明は、少なくとも1つの抗体または該抗体をコードする少なくとも1つの核酸を含む薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

40

緑膿菌は、淡水および土の中に見出される、広範に分布するグラム陰性環境細菌である。緑膿菌は、オプソニン化する抗体および食作用により緑膿菌を取り除く免疫応答性の宿主に通常脅威を与えない古典的日和見病原性菌である。しかしながら嚢胞性線維症患者、ならびに熱傷犠牲者、ICUにおいて挿管された患者、癌およびAIDS患者、ならびに臓器移植を受けた患者を含む免疫無防備状態の個人は、院内感染にかかる危険性が特に高い。メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) およびバンコマイシン耐性腸球菌 (*vancomycin-resistant enterococci*) (VRE) とともに、緑膿菌は、1975年の7.2/1000患者入院日数から1995年には9.8/1000患者入院日数に増加している全ての院内感染の最大で34%を占める。院内感染の最も頻繁に観察される形態の中には、血流感染および肺炎がある。

【0003】

50

嚢胞性線維症患者における慢性緑膿菌感染の予防のために、緑膿菌の無毒化された毒素Aと結合した緑膿菌の8つの最適なLPS血清型からなる8価結合型ワクチンが、能動免疫に対して確立されている。このワクチンを用いた長期試験は、慢性的に感染した患者の比率が、18歳の時に約72%から約32%に低下したことを示している。しかしながら、能動的なワクチン接種はただ単に、免疫が保たれてる患者、ならびに予測可能な状況においてのみ可能である。したがって多くの緑膿菌犠牲者は、8価ワクチンで能動的に免疫され得ない。このために、および多くの緑膿菌株が多剤耐性であるという事実のために、緑膿菌感染患者を治療するための代替の治療手段が必要である。1つの試みは、古典的なハイブリドーマ技術またはファージディスプレイレパートリークローニング(phage display repertoire cloning)によりヒトモノクローナル抗体を作製することである。

10

【0004】

両方の方法およびそれにより作製された抗体は、深刻な欠点を示す。

【0005】

古典的なハイブリドーマ技術(「KohlerおよびMilstein」の手法)は、選択抗原を用いた能動免疫による所望の特異性かつミエローマパートナーとの融合による不死化マウスB細胞を誘発することに基づく。その後、抗体産生クローンの遺伝情報を遺伝子操作によりヒト化し、抗体を適切な発現システム中で産生する必要がある。同様にファージディスプレイレパートリークローニングも、抗体の洗練された遺伝子操作および適切な発現システムの確立を必要とする。

20

【0006】

細菌のLPSに対するマウスモノクローナル抗体が、ヒト抗体とは別のエピトープを認識することが知られている。したがって、マウスにおけるモノクローナル抗体の発生そして続いてのヒト化は、ヒトにおける使用のために適した特異性を有する抗体の単離を必ずしももたらさない。

【0007】

さらにIgMアイソタイプの抗体は、抗菌免疫に対して最適であるIgMと関連しているエフェクター機構のために、最も効果的である。しかしながら、この分子の複雑な五量体の形態のために、今までIgM抗体の組換え発現は成し遂げられていない。その結果として、ファージディスプレイ技術により単離された抗体の発現は、IgM以外のアイソタイプに限られる。

30

【0008】

または、緑膿菌のLPS部分に対するヒトモノクローナル抗体を生ずる異なる試みが存在している。しかしながら、(リンパ芽球様細胞の不安定さのために)前記抗体を産生するために用いられるいずれの方法も不都合であった、または抗体は非ヒトグリコシル化パターンを示した、または非常に大量の抗体を必要とした。さらに先行技術に記載されている多くの抗体は、エフェクター機能を欠き、その結果防御しなかった。

【0009】

したがって本発明の基礎をなす1つの技術的課題は、特にインビボで高い防御能を示す、緑膿菌の特定の血清型のLPSに対して特異的なヒトモノクローナル抗体を提供することにある。

40

【0010】

技術的課題は、以下に明らかにされるようなヒトモノクローナル抗体により解決される。

【0011】

本発明にしたがって、緑膿菌血清型IATS 011のLPSに対して特異的な、1B011と名付けられたヒトモノクローナル抗体が提供される。ここで抗体の軽鎖の可変領域は、CDR1領域における配列番号:1、CDR2領域における配列番号:2、およびCDR3領域における配列番号:3の少なくとも1つを含み、抗体の重鎖の可変領域は、CDR1領域における配列番号:4、CDR2領域における配列番号:5およびCDR3領域における配列番号:6の少なくとも1つ、または該LPSに結合可能なそれらの断片もしくは誘導体を含む。

50

【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、モノクローナル抗体を産生可能なハイブリドーマおよび抗体の軽鎖および重鎖をそれぞれコードする核酸を提供する。さらに本発明は、核酸を含むベクターおよび宿主細胞を提供する。加えて、モノクローナル抗体を産生するための方法が提供される。加えて、少なくとも1つの抗体および、または少なくとも1つの核酸を含む薬学的組成物、およびその第2医薬用途が提供される。

【 0 0 1 3 】

驚いたことに、本発明によるヒトモノクローナル抗体は高い防御能を示すことが見出されている。特にヒトモノクローナル抗体は、インビトロでオプソニン化して食作用を行う (opsonophagocytic) ことが判明した。さらに重要なことに、本発明によるモノクローナル抗体は、実施例に示されているようにマウス熱傷創モデルにおける血流感染からの防御ならびにマウスでの急性肺感染モデルにおける気道感染からの防御により決定されるインビボ防御能を見せる。

10

【 0 0 1 4 】

本発明によるヒトモノクローナル抗体を用いて、Collinsら (Collins MS et al., 1990. FEMSIM 64:263-268) (非特許文献1) により記載されたヒトモノクローナル抗体と比べて、はるかに少ない用量でのオプソニン化による食作用 (opsonophagocytosis) ならびにより高い防御が成し遂げられる。

【 0 0 1 5 】

最先端の技術 (Harrison FJJ et al. 1997. Hybridoma 16(5):413-420; Zweerink HJ et al. 1988. Infection and Immunity 56(8): 1873-1879) (非特許文献2) に記載されたモノクローナル抗体と対照的に、本発明によるヒトモノクローナル抗体はさらに、結合型ワクチンで能動的に免疫された健常人の血液から生ずる。T細胞ヘルプの欠如のため、多糖類に対する抗体は質が低い (すなわち、ほとんどエフェクター潜在性を伴わない低親和性) ことが、一般的に公知である。結合型ワクチンの使用を通じてのみ、多糖類標的に対する強いエフェクター潜在性を伴う高親和性を有する価値ある抗体を生じ得る。そのうえ、本発明によるヒトモノクローナル抗体の産生率は、最先端の技術 (Zweerink HJ et al. 1988. Infection and Immunity 56(8): 1873-1879) (非特許文献3) に記載されたモノクローナル抗体の産生率と比べてより高かった。

20

【 0 0 1 6 】

緑膿菌に起因する肺感染からの防御を示す最先端の技術において、いかなるヒトモノクローナル抗体も記載されていない。

30

【 0 0 1 7 】

本発明により、抗体は、緑膿菌血清型 IATS 011 の LPS に対して特異的であり、かつ蛍光結合細菌を用いて決定される場合、0.1 ng/ml という低い濃度でオプソニン化による食作用活性を示す。いかなる先行技術抗体も、このような低投与量でオプソニン化による食作用活性を示すことは報告されていない。

【 0 0 1 8 】

本発明によるモノクローナル抗体は、高い特異性で臨床分離株を認識する。IATS 011 血清型の緑膿菌に感染した患者の20試料のうち18試料は、この抗体を用いて同定された。理論による制約にとらわれずに、モノクローナル抗体は、先行技術において公知の IATS 011 の全緑膿菌株を認識する能力を有すると考えらる。この特性は、抗体を特に診断および治療に有用なものとする。したがって、本発明による抗体は、克服できない信頼度を示す。

40

【 0 0 1 9 】

【非特許文献1】Collins MS et al., 1990. FEMSIM 64:263-268

【非特許文献2】Harrison FJJ et al. 1997. Hybridoma 16(5):413-420; Zweerink HJ et al. 1988. Infection and Immunity 56(8): 1873-1879

【非特許文献3】Zweerink HJ et al. 1988. Infection and Immunity 56(8): 1873-1879

【発明の開示】

【 0 0 2 0 】

50

本明細書において用いられるような「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、モノクローナル抗体が得られる源とは無関係に任意の部分的なまたは完全なヒトモノクローナル抗体を包含する。ハイブリドーマによるヒトモノクローナル抗体の産生が好ましい。モノクローナル抗体はまた、遺伝子操作、および特に特許請求の範囲において定義されているような特定のCDRセグメントでバックグラウンド抗体のCDR領域を置換することにより入手可能なモノクローナル抗体に対して特許請求の範囲において定義されているようなCDRセグメントのCDR挿入 (grfting) により得られてもよい。

【 0 0 2 1 】

「CDR領域」という用語は、抗体の相補性決定領域、すなわち特定の抗原に対する抗体の特異性を決定する領域を意味する。軽鎖および重鎖、両鎖の上の3つのCDR領域(CDR1からCDR3)は、抗原結合を担う。

10

【 0 0 2 2 】

重鎖内のCDR領域の位置は、以下の通りである：

【 0 0 2 3 】

CDR1領域 V_H エクソン内のアミノ酸番号31から35、

CDR2領域 V_H エクソン内のアミノ酸番号50から65、

CDR3領域 V_H エクソン内のアミノ酸番号95およびそれに続くアミノ酸。

【 0 0 2 4 】

CDR領域の位置は、抗体のクラス、すなわちIgM、IgAまたはIgGとは無関係である。

【 0 0 2 5 】

軽鎖のCDR領域の位置は、以下の通りである：

20

【 0 0 2 6 】

CDR1領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号24から34、

CDR2領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号50から56、

CDR3領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号89およびそれに続くアミノ酸。

【 0 0 2 7 】

型軽鎖内ののCDR領域の位置は、以下の通りである：

【 0 0 2 8 】

CDR1領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号24から34、

CDR2領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号50から56、

CDR3領域 V_L エクソン内のアミノ酸番号89およびそれに続くアミノ酸。

30

【 0 0 2 9 】

V_H 、 V_L および V_L エクソンのアミノ酸配列は、V baseインデックスより入手し得る。(http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901)

【 0 0 3 0 】

「血清型」という用語は、緑膿菌の任意の公知の血清型を意味する。異なる緑膿菌血清型に対して現在用いられている異なる命名法の一致表を、明細書中の表1に示す。

【 0 0 3 1 】

「断片」という用語は、LPS血清型に結合する能力を有する抗体の任意の断片を意味する。断片は、少なくとも10アミノ酸、好ましくは20アミノ酸、より好ましくは50アミノ酸の長さを持つ。断片は抗体の結合領域を含むことが好ましい。断片はFabもしくは $F(ab')_2$ 断片またはその混合物であることが好ましい。

40

【 0 0 3 2 】

「誘導体」という用語は、少なくとも1アミノ酸の付加、欠失および、または置換により異なるヒトモノクローナル抗体の任意の変異タンパク質を包含する。好ましくは、誘導体は、特許請求の範囲において示されているような重鎖および、または軽鎖中の任意のCDR中に少なくとも1つの同類置換を保有する、ヒトモノクローナル抗体の変異タンパク質である。より好ましくは、変異タンパク質は、5以下の同類置換を有し、特に好ましくは2以下の同類置換を有する。抗体の断片または誘導体の特定のLPS血清型に結合する能力は、材料および方法の節に記載されているような以下の直接ELISAにより決定される：特定のL

50

PSをELISAプレートの固相上に固定化する。抗体断片または抗体の誘導体を固定化したLPSと一緒にインキュベートし、結合した抗体またはその誘導体を適切な酵素結合二次抗体により可視化する。

【0033】

本発明において、「同類置換」という用語は、特定の物理化学的グループに属する1アミノ酸の同じ物理化学的グループに属するアミノ酸での置換を意味する。物理化学的グループは以下のように定義される：

【0034】

非極性アミノ酸のグループは以下を含む：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、およびトリプトファン。非荷電極性側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギン、グルタミン、チロシン、システイン、およびシスチンを含む。正に荷電した極性側鎖を有するアミノ酸の物理化学的グループは、リジン、アルギニン、およびヒスチジンを有する。負に荷電した極性側鎖を有するアミノ酸の物理化学的グループは、アルパラギン酸およびグルタミン酸を含み、アルパルタートおよびグルタマートとも言われる。

【0035】

本発明により緑膿菌血清型 IATS 011 の LPS に対して特異的な抗体が、上記に概略を説明したように提供される。

【0036】

さらなる態様により、本発明は、抗体の軽鎖の可変領域が配列番号:7のアミノ酸配列を有しかつ重鎖の可変領域が配列番号:8のアミノ酸配列を有する、LPSもしくは緑膿菌 LPS 血清型 IATS 011 に対して特異的なヒトモノクローナル抗体、または抗体の軽鎖のアミノ酸配列の可変領域が配列番号:7と少なくとも85%相同でありかつ抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列が配列番号:8と少なくとも85%相同である、前記LPSに結合する能力を有する前記抗体の変異体を提供する。

【0037】

当業者に公知の「相同性」という用語は、配列間の一致により決定される、2以上のポリペプチド分子間の関連性の程度を意味する。「相同性」率は、ギャップまたは他の配列特徴を考慮する、2以上の配列における相同領域の百分率から見出される。

【0038】

相互に関連するポリペプチドの相同性は、公知の手法で決定され得る。概して、特別な要件を考慮するアルゴリズムを伴う特別なコンピュータプログラムが用いられる。相同性の決定のための好ましい手法は第一に、試験される配列間の最大の一致を発生させる。2配列間の相同性の決定のためのコンピュータプログラムは、GAP (Devereux J et al., *Nucleic Acids Research* 12 (12): 387 (1984)); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI); BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Altschul S et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990))を含む、GCGプログラムパッケージを含むが、これに限定されるわけではない。BLAST Xプログラムは、National Centre for Biotechnology Information (NCBI)および他の出所(BLAST Handbook, Altschul S et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S et al., *J. Mol.* 215: 403-410 (1990))から入手され得る。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、相同性の決定のために用いられ得る。

【0039】

配列比較のための好ましいパラメータは以下を含む：

【0040】

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, *J. Mol. Biol.* 48 (1970), 443-453

比較マトリクス：BLOSUM62 from Henikoff & Henikoff, *PNAS USA* 89 (1992), 10915-10919

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：2

【0041】

10

20

30

40

50

GAPプログラムもまた、上記パラメータでの使用に適している。上記パラメータは、末端のギャップが相同性の値を低下させない、アミノ酸配列比較のための標準的なパラメータ(初期設定のパラメータ)である。参照配列と比較して極めて小さな配列では、さらに予測値を最大100,000まで増大させ、いくつかの場合に語の長さ(語の大きさ)を2まで縮小する必要がある可能性がある。

【0042】

さらなるモデルアルゴリズム、ギャップ開始ペナルティ、ギャップ伸長ペナルティおよびProgram Handbook, Wisconsin Package, Version 9, September 1997で指定されたものを含む比較マトリクスが用いられ得る。選択は、実施すべき比較に依り、さらには比較がGAPもしくはBest Fitが好ましい、配列対の間で行われるか、またはFASTAもしくはBLAST

10

【0043】

前記のアルゴリズムを用いて決定される85%の一致は、85%相同性として記載される。同じことが、より高度の相同性に適用される。

【0044】

好ましい態様において、本発明による変異タンパク質は、85%またはそれより高い、例えば90%または95%より高い相同性を有する。

【0045】

本発明によるヒトモノクローナル抗体の軽鎖は 型または 型であることが、さらに好ましい。軽鎖が 型のものが特に好ましい。軽鎖は、自然に再配列されたものを含む自然に発生する鎖、遺伝子改変体、または軽鎖の合成型のいずれであってもよい。IATS 011に特異的である本発明による抗体が 型である場合、軽鎖は生殖系列DPK18由来であることが好ましい(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php?menu=901#VKEX>)。

20

【0046】

さらに好ましい態様によって、本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖は、全てのヒトアイソタイプ、すなわちIgM、IgAまたはIgGから選択される。好ましくは、抗体はIgM型である。抗体がIgM型の場合、抗体は緑膿菌 LPSに対する高い結合力の有利な特性を示し、効果的に補体に結合し、その結果細菌の直接の殺傷を媒介するか、および、または食作用のために細菌を効率的にオプソニン化する。さらに、IgGまたはIgAなどの他のアイソタイプは分解され得るのに対し、IgMは、緑膿菌エラストラーゼによるタンパク質分解に抵抗性

30

【0047】

可変重鎖は生殖系列DP-53由来であることが好ましい(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php?menu=901#VKEX>)。軽鎖および重鎖は、一本鎖抗体(例えば、二価のscFv、二機能性scFvおよび二重特異性scFV)として共有結合的に、または互いに非共有結合的に、いずれで結合してもよい。

【0048】

本発明の好ましい態様にしたがって、ヒトモノクローナル抗体は、すべてヒトアミノ酸配列からなる。

40

【0049】

「すべてヒトアミノ酸配列からなる」は、ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列がヒト生殖系列由来であることを意味する。これは、異なる方法で得られてもよい。例えば、ヒトアミノ酸配列からなるヒトモノクローナル抗体は、B細胞がヒトB細胞であるハイブリドーマから得られ得る。または、ヒトモノクローナル抗体は、入手可能なヒトモノクローナル抗体に対し特許請求の範囲において示されているようなCDR領域のCDR挿入によって得られてもよく、その結果本発明による緑膿菌 LPS血清型に対して特異的なヒトモノクローナル抗体を産生する。

【0050】

ヒトモノクローナル抗体のすべてのヒトアミノ酸配列は、拒絶反応またはアナフィラキ

50

シーショックなどの望ましくない有害な作用の発生を妨げる。

【0051】

ヒトモノクローナル抗体が本質的にヒト抗原認識を示すことは、さらに好ましい。「本質的にヒト抗原認識」とは、本発明によるヒトモノクローナル抗体による抗原認識が健常人による抗原の認識と本質的に同一であることを意味する。特に、ヒト免疫システムとの相互作用を確実にし、いわゆるHAMA(ヒト抗マウス抗体)の発生の危険性を減らすために、ヒトモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖のFc部分がヒト型であることが必要とされる。

【0052】

さらに好ましい態様によって、本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒトB細胞、またはミエローム細胞またはヘテロミエローム細胞と該ヒトB細胞の融合により得られるハイブリドーマから入手可能である。

10

【0053】

ヒトB細胞は、健常人または患者の免疫化、およびそれに続く公知の方法(Current Protocols in Immunology, Chapter 7.1. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Published by Wiley & sons, Eds: JC Coligan et al.)でヒトB細胞を単離し得る血液試料の除去により得られる可能性がある。ヒトB細胞は、古典的なKohlerおよび Milsteinの方法による公知の技術によって、ハイブリドーマを産生するようミエロームまたはヘテロミエロームと融合させてもよい。適切なミエローム細胞は、P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580)またはSP2/0 (ATCC CRL-1646)などのP3X63の派生細胞である。適切なヘテロミエローム細胞は例えば、F3B6 (ATCC HB-8785)である。その結果生じるハイブリドーマは、公知の手法によって選択されてもよい。ハイブリドーマは適切な培養培地中で培養され、産生した抗体は上清から回収される。

20

【0054】

さらに、本発明は、本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をそれぞれコードする核酸を提供する。核酸は、生殖系列からまたはB細胞中で生じる再構成からいずれか由来の自然に生じる核酸でもよく、または核酸は合成であってもよい。合成核酸はまた、分解からの核酸の抵抗性を高めるためのホスホチオエステルを含む修飾ヌクレオチド間結合を持つ核酸も含む。核酸は、遺伝子操作されてもよく、またはヌクレオチド合成によりすべて合成で産生されてもよい。

【0055】

本発明はさらに、本発明のヒトモノクローナル抗体の軽鎖をコードする少なくとも1つの核酸、および、または本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖をコードする少なくとも1つの核酸を含むベクターを提供する。核酸は、同じベクター中、または二成分のベクターの形態中いずれかで存在する可能性がある。ベクターは好ましくは、軽鎖および、または重鎖をコードする核酸の発現を容易にするために、核酸に機能的に連結されるプロモータを含む。好ましくは、ベクターはまた、宿主細胞中に複製および維持のための開始点も含む。ベクターはまた、軽鎖または重鎖をコードする核酸の5'に位置するシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。シグナル配列は、コードした鎖の培地中への分泌を容易にする可能性がある。

30

【0056】

好ましくは、ベクターは、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、SV40ウイルス、レトロウイルス、植物ウイルス、または 由来物もしくはM13などのバクテリオファージ由来である。特に好ましいベクターは、Persicら(Persic et al. 1997. Gene. 187(1): 9-18)により記載された免疫グロブリンの真核細胞発現のための統合されたベクターシステムなどの、ヒトIg重鎖およびヒト軽鎖の定常領域を含むベクターである。

40

【0057】

ベクターはさらに、キレート形成によりニッケルカラムでのタンパク質の精製を容易にする、ヒトモノクローナル抗体の軽鎖および、または重鎖のN末端にHisタグを伴う融合産物を産生するための構築物の発現をもたらす、Hisタグコードヌクレオチド配列を含む。

【0058】

50

さらに、本発明は、ベクターおよび、または核酸を含む、ベクターの発現に適した宿主細胞を提供する。当技術分野において、多数の原核細胞のまたは真核細胞の発現システムが公知であり、例えばHEK293細胞、PerC6細胞、CHO細胞、COS細胞またはHELA細胞およびそれらの誘導体のような、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞および哺乳類細胞などの真核生物宿主細胞が好ましい。ヒト産生細胞株が特に好ましい。形質移入された宿主細胞が培養培地の中に産生抗体を分泌することが好ましい。細胞内発現を成し遂げる場合、再生を例えばBenetti PH et al., Protein Expr Purif Aug; 13:283-290, (1998)などの標準的な手法によって実施する。

【0059】

本発明はまた、ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法も提供する。1つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は上記のハイブリドーマを培養することにより産生される。産生されたモノクローナル抗体は上清の中に分泌され、通常のクロマトグラフィ技術を適用することにより精製され得る。

【0060】

または、ヒトモノクローナル抗体は、本発明によるベクターを含む宿主細胞およびコードされた抗体鎖の組換え発現に適した条件下で宿主細胞を培養することにより産生される。好ましくは、宿主細胞は、少なくとも1つの軽鎖をコードする核酸および少なくとも1つの重鎖をコードする核酸を含み、ヒトB細胞により産生されたヒトモノクローナル抗体の3次元構造と同等である3次元構造を生じるようにヒトモノクローナル抗体を構築する能力を有する。軽鎖が重鎖と別に産生される場合、両鎖を精製し、その後ヒトB細胞により産生されるようなヒトモノクローナル抗体の3次元構造を本質的に有するヒトモノクローナル抗体を産生するように構築してもよい。

【0061】

ヒトモノクローナル抗体はまた、コードした軽鎖および、または重鎖の組換え発現により得られてもよく、ここで核酸は、公知の方法でヒトモノクローナル抗体をコードする核酸を単離し、単離された核酸に対し特許請求の範囲において定義されたようなCDRをコードする核酸配列を挿入することにより産生される。

【0062】

さらなる好ましい態様によって、本発明によるヒトモノクローナル抗体は修飾される。修飾は、例えばジクロヘキシルカルボジイミドを用いる架橋結合による単量体型の二量体化、オリゴマー化、重合を含む。その結果産生された二量体、オリゴマー、または重合体は、ゲルろ過によりお互いに分離され得る。さらなる修飾は、側鎖修飾、例えば -アミノリシン残基、またはアミノ末端およびカルボキシ末端修飾それぞれを含む。さらなる修飾は、翻訳後修飾、例えばタンパク質のグリコシル化および、または部分的もしくは完全な脱グリコシル化、ならびにジスルフィド結合形成を含む。抗体はまた、酵素的な、蛍光のまたは放射性的の標識などの標識に結合する可能性がある。

【0063】

本発明はさらに、少なくとも1つヒトモノクローナル抗体および、または少なくとも1つのヒトモノクローナル抗体の軽鎖および、または重鎖をコードする核酸を含む薬学的組成物を提供する。

【0064】

薬学的組成物はさらに、当技術分野において公知の薬学的に許容される成分を含んでもよい。

【0065】

好ましくは、薬学的組成物は、主に免疫無防備状態の患者および、または呼吸機能障害を有する患者における血流感染、肺炎、慢性気管支炎、創傷感染を含む局所感染および関節の侵襲的感染などの感染症において、緑膿菌により引き起こされる疾患の治療のために利用される。薬学的組成物はさらに、病院で獲得した(院内)感染の予防および、または治療を対象とするが、それに限定されるわけではない。緑膿菌感染の主な犠牲者は、嚢胞性線維症患者、熱傷犠牲者、挿管された患者、外科的および、または医学的集中治療室中の

10

20

30

40

50

患者、癌およびAIDS患者、免疫無防備状態の患者、免疫抑制患者、糖尿病患者、ならびに静脈内薬物乱用者であることから、薬学的組成物は特に、該患者グループにおいて緑膿菌により引き起こされる疾患の予防および、または治療を対象とする。

【0066】

薬学的組成物はさらに、抗生物質を、好ましくは新規モノクローナル抗体に連結している抗生物質を含む可能性がある。

【0067】

薬学的組成物は、0.1~30 mg/kg体重の濃度範囲で新規モノクローナル抗体を含む。

【0068】

薬学的組成物は、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、腹腔内、局所的、鼻腔内投与、または吸入スプレーなどの任意の公知の方法で投与される可能性がある。

【0069】

本発明はまた、少なくとも1つの本発明のヒトモノクローナル抗体および任意でさらに診断試験を行うのに適した成分を含む緑膿菌感染の診断のための試験キットも提供する。

【0070】

試験キットは、緑膿菌感染の特異的で信頼性の高い診断に適している。試験アッセイは、液体または膜結合形態における通常のELISA試験に基づいてもよい。検出は、当技術分野において公知であるように直接的または間接的であってもよく、ここで抗体は酵素的な、蛍光のまたは放射性的の標識に機能的に結合している。

【0071】

以下の実施例は、発明を例示するが、本発明の範囲を限定することを意図しない。さらなる態様は、明細書を検討しかつ通常の一般的な知識を考慮すれば、当業者にとって明らかであると考えられる。

【0072】

材料および方法

以下の材料および方法が実施例で使用されている：

【0073】

細胞上清中のIgMのLPS特異性の決定および定量化

細胞培養上清中の抗体のスクリーニングおよび分析のために、ELISAをいくつかの変更を伴い別に記載された(Cryz, S.J. et al., 1987. J. Clin. Invest. 80(1):51-56)ように実施した。簡単にいえば、(社内で産生した)緑膿菌リポ多糖LPS保存溶液を36 mMトリエチルアミンで2 mg/mlの濃度に調製した。コーティングのために、溶液を0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS(PBS-Az)で10 µg/mlに希釈した。この溶液を等量の10 µg/mlメチル化ヒト血清アルブミン(HSA; 以下のように社内で産生した：2 gの凍結乾燥したHSAを200 ml無水メタノール中で溶解した。1.68 mlの37% HCl添加後、溶液を暗闇で室温で少なくとも3日間、時々振とうしながら貯蔵する。沈殿物を10分の遠心分離(4500rpm、GS1ローター)により収集し、無水メタノールで2回および無水エーテルで2回、溶媒でペレットを懸濁することにより洗浄する。沈殿物をデシケーター中で2時間乾燥し、乾燥ペレットをH₂Oで懸濁し、一定分量を-20 °Cで貯蔵する。タンパク質濃度は8.05 mg/mlであった。)を含むPBS-Azを室温で5分間穏やかに攪拌することにより混合した。NUNC(登録商標)ELISAプレートを100 µl/ウェルLPS-HSA溶液で一晩室温でコーティングした。プレートを0.05% Tween20 (#93773; Fluka Chemie AG, Switzerland)を含む PBS pH7.4 300 µl(社内で製造された)(PBS-T)で3回洗浄した後、細胞培養上清をPBSで1:2希釈し37 °Cで2時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで3回洗浄した後、結合抗体を5% (v/v) FCSを含むPBSで1:2000に希釈された西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgM抗体(#074-1003; KPL; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, MD)で検出した。プレートを37 °Cで1時間インキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。抗体結合を100 µl/ウェルOPD(0.4 mg/ml オルトフェニルジアミンを含む、0.0012% (V/V) H₂O₂を含む24 mMクエン酸および52 mMリン酸水素二ナトリウム)基質溶液を添加することにより視覚化した。呈色反応を50 µl/ウェル1 M HClの添加により2~3分後に停止した。吸光度をSoftmaxPro(登録商標)ソフトウェアを

10

20

30

40

50

用い490 nmでELISAリーダー上で読み取った。

【0074】

細胞培養上清中のIgMの定量化のために、ELISAプレートを4 で一晩1 µg/ml非結合ヤギ抗ヒトIgM抗体を含むPBSでコーティングした。プレートをPBS-Tで3回洗浄し、細胞上清および標準物質を2倍希釈中でインキュベートした。標準物質としてヒト標準血清(Behring)を使用し、0.5 µg/mlの濃度で始めた。全ての希釈をPBS-T中で行った。プレートをロッキングテーブル(rocking table)上で室温で2時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで3回洗浄した後、結合抗体を5% (v/v)FCSを含むPBSで1:2000に希釈された西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgM抗体(KPL)で検出した。プレートをロッキングテーブル上で室温で1時間インキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。抗体結合を150 µl/ウェルOPD基質溶液を添加することにより視覚化した。呈色反応を50 µl/ウェル1 M HClの添加により1分後に停止した。吸光度をSoftmaxPro(登録商標)ソフトウェアを使用し490 nmでELISAリーダー上で読み取った。

10

【0075】

配列解析

ハイブリドーマ細胞のRNAをQiagenからのRNeasy-Kitを使用することにより単離した。cDNAをSMART Technology (Becton Dickenson)で合成した。第2ストランドPCRのために、以下のプライマーを用いた(表3)：(1)逆方向定常IgM(con µ)

5'-GCC ACG CTG CTC GTA TCC GAC G-3' (SEQ ID NO:11)

20

(2)逆方向定常 (con)

5'-AGC AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CC-3' (SEQ ID NO:12)

順方向プライマーはSMART-Kit中に含まれる。配列決定のために、以下のプライマーが用いられている：(3)IgM配列(µ seq)：

5'-GCT GCT CGT ATC CGA CGG-3' (SEQ ID NO:13)

および(4) 配列(seq)：

5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3' (SEQ ID NO:14)

30

配列決定をMicrosynth AG (Balgach, Switzerland)で実施し、配列をV-Base DNAプロットソフトウェア(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901>)を用いて既存の生殖系列配列と比較した。

【0076】

(表1) 緑膿菌参考菌株のIATS血清型

IATS 血清型	内訳	
O1	PA53 (IT4)	
O2	E576 (IT3)	
O3	6510 (Habs3)	
O4	6511 (Habs4)	
O6	PA220 (IT1)	10
O7	Fisher 6 (IT6)	
O10	Fisher 5 (IT5)	
O11	Fisher 2 (IT2)	
O16	Fisher 7 (IT7)	

【 0 0 7 7 】

(表2) 緑膿菌血清型 IATS 011 の臨床分離株

20

# 分離株	分離源	
2309.36	尿	
2309.38	耳	
2309.58	血液	
2309.60	尿	
2309.61	尿	
2309.65	気管分泌物	10
2310.49	尿	
2310.55	血液	
2311.58	気管分泌物	
2312.25	気管分泌物	
V02 610	胆嚢	
VA 1014	耳	
VA 26939	肺 (BAL)	
VA 28/1	創傷	
VA 2813	創傷	20
VA 3348	肺 (BAL)	
VA 3805	眼	
VA 4156/1	創傷	
VA 695	創傷	
VA 843	気管分泌物	
FT-2	参考菌株	

30

【 0 0 7 8 】

全細胞ELISA

40

異なる臨床分離株からの細菌(表2参照)を37℃でLB培地中で600nmで吸光度1まで増殖させ、37℃で一晩37%ホルマリン(ホルマリンの最終濃度:0.5%)で固定した。固定した細菌をPBSで1:50に希釈し、ELISAプレート上で固定化した。プレートを5%(v/v)ウシ胎児血清を含むPBSでブロッキングした後、モノクローナル抗体1B011を固定した細菌と37℃で2時間インキュベートした。または、他の血清型の単離株を上記に記載したように増殖させ、モノクローナル抗体1B011と、または陽性対照として、各血清型に対して特異的なモノクローナル抗体(図3b、まとめて「陽性対照」と呼ばれる血清型特異的陽性対照モノクローナル抗体)とインキュベートした。プレートをPBS-Tで3回洗浄した後に、結合抗体を5%(v/v)FSCを含むPBSで1:2000に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgM抗体(# 074-1003; KPL; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, MD)で検

50

出した。プレート 37°C で1時間インキュベートし、PBS-Tで3回洗浄した。抗体結合を100 μl /ウェルOPD(0.4 mg/mlオルトフェニルジアミンを含む、0.0012% (V/V) H_2O_2 を含む24 mMクエン酸および52 mMリン酸水素二ナトリウム)基質溶液を添加することにより視覚化した。呈色反応を50 μl /ウェル1 M HClの添加により2~3分後に停止した。吸光度をSoftmaxPro(登録商標)ソフトウェアを用い490 nmでELISAリーダー上で読み取った。

【0079】

オプソニン化による食作用アッセイ

生物活性を決定するために、モノクローナル抗体1B011をそのオプソニン化による食作用活性について試験した。この目的のために、表1による、血清型IATS 011の緑膿菌細菌をTSBG(1% (w/v)グルコースを含む30 g/lトリプシンソイ培地)中で一晚増殖させた。冷たいPBSで細菌を2回洗浄した後、細菌ペレットを5 mlの0.1M重炭酸緩衝剤、pH8.0で再懸濁した。50 μl の5-(and -6)-カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル(5(6)-FAM, SE; Molecular Probes, Eugene, OR; ジメチルスルホキシド中に10 mg/ml)を添加し、1時間 37°C でインキュベートした。細菌を100 μl 37%ホルムアルデヒドの添加および 37°C で一晩のインキュベーションにより固定した。非結合色素を取り除くために、細菌を20 ml冷たい滅菌PBSでの遠心分離再懸濁により6回洗浄した。標識された細菌を使用まで4 $^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。アッセイのために、細菌の一定分量を550 nmでの吸光度が1まで希釈し、その後1:50希釈HBSS-BSA (0.1% BSAを含むHanks平衡塩溶液)が続いた。20 μl の細菌を10 μl のモノクローナル抗体1B011 または非特異的モノクローナル対照抗体それぞれを含むハイブリドーマ細胞培養上清の異なる希釈溶液と混合した(データを示さず)。 37°C で30分間の培養後、10 μl の仔ウサギ血清(Charles River Laboratories, Germany)を補体源として添加し、プローブを 37°C でさらに30分間インキュベートした。40 μl の分化したHL-60細胞(前骨髄球性細胞株HL-60を10% (v/v)ウシ胎児血清および100 mMジメチルホルムアミドが追加されたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM;Sigma)中で3日間細胞をインキュベートすることにより顆粒球細胞に分化させた。)をオプソニン化した細菌に 1.25×10^6 細胞/ml最終濃度をなるように添加した。振とう機上で 37°C 90分間インキュベートした後、細胞を2 mlの細胞洗浄緩衝剤(0.02%アジ化物を含むPBS;Becton Dickenson)に移すことにより回収した。250 x gで5分間の遠心分離の後、細胞ペレットを150 μl 細胞洗浄緩衝剤で再懸濁し、フローサイトメトリにより解析した。陽性のオプソニン化による食作用活性を背景染色と比較してHL-60細胞の緑色蛍光を解析することにより決定した。背景染色をHL-60細胞を伴う補体の存在下で蛍光結合細菌をインキュベートすることにより決定した。

【0080】

緑膿菌感染マウスのインピボ防御

マウス熱傷創モデル

1B011のインピボ防御能をマウス熱傷創敗血症モデルにおいて決定した。NMRIマウス(18~20 g; Charles River Laboratories)は、曝露(challenge)の4時間前に、0.1 mlの容量中に0.16~10 μg (約0.4から0.006 mg/kg体重に相当する)のモノクローナル抗体1B011の静脈内投与を受けた。対照として、0.1 mlの非特異的抗体上清を注入した。曝露のために、10匹のメスのマウス群に3-クロロ-1,1,2-トリフルオロエチル-ジフルオロメチル-エーテル(Ethane, Abbott Lab., Chicago, IL)雰囲気中で麻酔をかけた。マウスを背中 2 cm^2 範囲にわたって10秒エタノール熱傷に供した。0.5 ml PBSに懸濁した 2×10^7 cfu/マウスの曝露生物体(緑膿菌 IATS 011; 臨床分離株2310.55、表2を参照のこと)を熱傷範囲の中へ直ちに皮下に注入した。動物を7日間観察した。防御の測定として、曝露後3日の生存率を示す。

【0081】

急性肺感染モデル

緑膿菌の肺感染に対する1B011の防御能を評価するために、急性肺感染モデルを用いた。10 μg (0.4 mg/kg)1B011をBALB/cマウスにi.v.で注入した。その後、40 μl の2310.55株(表2)の 4.0×10^7 /ml溶液(マウス1匹当たり 1.6×10^6 に相当する)を深い麻酔の下で曲線状のビーズが先についた針を用いて左下気管支の中に気管内投与した。この用量は限定し

た死亡率のみをもたらずとして選ばれた。6、12、24および48時間後、マウスを犠牲にし、無菌的に肺および脾臓を取り除いた。器官を3 ml PBS中に浮遊させ、氷上でブレンダーを用いて45秒間ホモジナイズした。連続的に希釈した器官ホモジネート(0.1 ml)をCFU/肺またはCFU/脾臓を決定するために改変Conradi Drigalski's寒天上に蒔いた。

【 0 0 8 2 】

モノクローナル抗体による古典補体経路の活性化の決定

下流プロセッシングの間に形成されるIgM凝集物により結果として生ずる古典補体経路の自然発生的な誘発を決定するために、定義された濃度の1B011抗体を37 °Cで30分間健常人からの血清中でインキュベートした。その後、反応を10 mM EDTAで停止し、補体活性断片C4dを市販のELISA(Quidel Corp, San Diego)により検出した。陽性対照として、1B011抗体およびその同種のLPS抗原からなるIgM-抗原複合体を用いた。

10

【 0 0 8 3 】

実施例

実施例1：1B011のDNA配列およびアミノ酸配列

抗体特異性をDNA配列およびアミノ酸配列によりそれぞれ決定する。重鎖および軽鎖の可変断片のDNA配列を決定した。簡単に言えば、ハイブリドーマ細胞の総RNAを単離し、SMART Technology(Becton Dickinson)を用いて完全なcDNAに逆転写した。この手法により、ユニバーサルプライマーをcDNAの5'末端に付加した。このプライマーならびに、表3に描かれたC_H1およびC_H2特異的なプライマーを用いて、IgMならびに可変領域および定常領域の一部をPCRにより増幅した。その後、PCR断片をアガロースゲルから切除により精製し、表3に描かれたプライマーを用いるシーケンスのための鋳型として用いた。

20

【 0 0 8 4 】

(表3) 1B011のIgM重鎖および軽鎖の可変領域のPCR増幅およびシーケンスのために用いられるプライマー

プライマー	配列	用途
Con μ	5'-GCC ACG CTG CTC GTA TCC GAC G-3' (SEQ ID NO: 11)	PCR
Con κ	5'-AGC AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CC-3' (SEQ ID NO: 12)	PCR
μ seq.	5'-GCT GCT CGT ATC CGA CGG-3' (SEQ ID NO:13)	シーケンス
κ seq.	5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3' (SEQ ID NO:14)	シーケンス

30

【 0 0 8 5 】

可変領域の配列を引き続きVbaseインデックスと比較した。生殖細胞系列の配列との比較の結果を、表4に示されるような、「置換およびサイレント(replacement and silent)変異(R:S)の数として表す。DNA配列およびアミノ酸配列を図1および2に示す。

【 0 0 8 6 】

(表4) 生殖細胞系列からの置換変異対サイレント変異の比

		重鎖		軽鎖	
		生殖細胞系列	R : S	生殖細胞系列	R : S
1B011	DP-53		17 : 3	DPK-18	0 : 2

40

【 0 0 8 7 】

実施例2：モノクローナル抗体1B011による緑膿菌血清型IATS 011の臨床分離株の認識

1B011は健常人を8価OPS-毒素Aワクチンで免疫することにより発生させられている。ワクチンは、IATS 011参考菌株FT-2を含む。この株のLPSに対して産生される1B011がIATS 011血清型の他の分離株も認識するかどうか調べるために、異なる病院から広範囲の臨床分

50

分離株を収集した(表2参照のこと)。全ての臨床分離株の血清型を市販されている血清型凝集キットを用いて決定した。全ての単離株の血清型を市販されている血清型凝集キットを用いて決定した。血清型をPCRにより確定した。その後、血清型IATS 011の異なる臨床分離株(図3a)ならびに他の血清型(図3b)を全細胞ELISAにより1B011への結合について試験した。

【0088】

1B011は、これらの分離株の表面上の低いLPS発現のためである2つの弱い反応を除いて、全ての試験したIATS 011分離株と強力に反応した。さらに、結合はIATS 011血清型の臨床分離株で独占的に観察され、血清型01、02、03、06または010の種々の分離株では結合は起こらなかった。これら分離株の完全性を陽性対照として各血清型に対する他のモノクローナル抗体を用いて保証した。

10

【0089】

実施例3: 1B011のインビトロ活性: オプソニン化による食作用活性

1B011のインビトロ生物活性をフローサイトメトリーに基づくオプソニン化による食作用アッセイを用いて評価した。血清型IATS 011のFITC結合緑膿菌を、補体源として正常なウサギ血清の存在下で、連続的に1B011とインキュベートした。オプソニン化された細菌を分化したHL-60細胞(前骨髄球性細胞株、ATCC: CCL-240; 単球への分化を0.1 Mジメチルホルムアミドの添加により3日間で成し遂げた)と共にインキュベートした。オプソニン化による食作用をFACSにより解析した。陽性のオプソニン化による食作用活性を、背景染色(血清の非存在、補体の存在下で、HL-60細胞を伴うFITC結合細菌)と比較してHL-60細胞の緑色蛍光を解析することにより決定した。結果を図4に示す。

20

【0090】

1B011は、用量依存的な様式でIATS 011血清型の緑膿菌の食作用を媒介した(黒丸)。加熱不活性化補体を使用した場合、食作用は観察されなかった(白丸)。FITC陽性HL-60細胞の最大半量率をもたらす濃度として定義される、1B011のオプソニン化による食作用活性(OA_{50})は、0.1 ng/mlであった。このような低用量での活性は、1B011の高いエフェクターの可能性を示す。

【0091】

実施例4: モノクローナル抗体1B011のインビボ防御能

1B011のインビボ防御能をマウス熱傷創敗血症モデルで評価した。1B011の異なる用量をNMRIマウスにi.p.またはi.v.で投与した。3時間後、 2×2 cm熱傷創を与え、 2×10^7 CFU 緑膿菌株231D.55(011)を熱傷した皮膚部位下にs.c.で注入した。マウスは、全実験期間中、鎮痛剤を投与された。生存を一日3回モニターした。曝露後3日の生存率を図5に示す。(A~Dと名付けられた)個別の4実験からプールされたデータを含む。

30

【0092】

0.2 mg/kg体重以上の用量は、全身の緑膿菌曝露から70~100%防御を与えた。減少用量の投与は、より低い生存率をもたらした。熱傷創を伴うが緑膿菌感染がないマウスは100%生存率であったので、死は、緑膿菌感染が直接の結果であった。これらのデータは、緑膿菌の全身感染に対する1B011のインビボ効果を明らかにする。

【0093】

実施例5: 急性呼吸器の曝露後の肺および脾臓からの増加細菌の排除

1B011が肺緑膿菌感染を取り除く能力を有する可能性があるかどうか評価するために、マウスにおける急性肺感染のモデルを用いた。この目的のために、1B011(0.4 mg/kg体重)を、緑膿菌株2310.55を用いる気管支内肺曝露前にi.v.で投与した。曝露用量を最小の死亡率のみをもたらすように選択した。したがって、肺からの細菌の排除を評価パラメータとして選択した。

40

【0094】

1B011の使用は肺から緑膿菌の急速な排除をもたらした(図6)。通常IgM抗体は、肺組織の中に浸透しないので、この知見は驚くべきものである。48時間後、この時点で未処置動物における感染は未だ進行中であったのに対し、細菌はすべて取り除かれている。ヒトに

50

おける緑膿菌肺炎の過程と同様に、細菌感染は全身性となる可能性があり、脾臓における緑膿菌の出現により本実験に反映されている。全身感染の完全な消散が1B011によって媒介されたのに対し、細菌はまだ未処置マウスにおいて存在した(図6)。これらの知見は、院内肺炎などの呼吸器緑膿菌感染の治療に対する1B011の可能性を示す。

【0095】

実施例6: ヒト組織に対するモノクローナル抗体1B011の交差反応性

ヒト組織に対する1B011の求められていない非特異的結合を除くために、1B011を「FDA Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (1997)」および「The Rules Governing Medicinal Products in the European Community Vol. 3a (1994)」によって交差反応性を試験した。用いられる組織を以下の表に列挙する。組織はそれぞれ、抗体結合に影響を与えるドナー特異的因子の機会が最小になるように3人の無関係なドナーから得られた。

10

【0096】

(表5) 1B011交差反応性の可能性を試験するために使用されるヒト組織

副腎	膀胱	血液細胞	血管(内皮)
骨髓	胸	小脳	大脳皮質
結腸	眼	卵管	心臓
回腸 (胃腸管)	腎臓(糸球体、 尿細管)	肝臓	肺
リンパ節	卵巣	膵臓	副甲状腺
耳下腺	末梢神経	下垂体	胎盤
前立腺	皮膚	脊髄	脾臓
胃	横紋筋	精巣	胸腺*
甲状腺	扁桃腺	尿管	子宮(子宮頸部、 子宮内膜)

20

*ただ1人のドナーから使用に供される組織

【0097】

任意のこれらの組織に対する交差反応性は観察されなかった(データは示さず)。これらの結果に基づいて、組織に対する非特異的結合がインビボで起こらず、よって限定された炎症性副作用がもたらされると考えられる。

30

【0098】

実施例7: モノクローナル抗体1B011による補体活性化

インビボで投与されるヒト抗体は、補体の自発的活性化により有害反応を引き起こす可能性がある。このような古典補体経路の活性化は、1B011をヒトの正常な血清と混合し、C4dを市販のELISA(Quidel Corp., San Diego)により検出することにより、補体成分C4dの発生を測定するインビトロアッセイにより試験され得る。GMP条件下で産生された2バッチの1B011(「バッチ1」および「バッチ2」と名付けられる)を血清中に2つの異なる濃度、100 µg/mlおよび10 µg/mlで試験した。血清単独対照を0 µg/mlとして示す。結果を図7に示す。

【0099】

40

高レベルのC4dを10 µg/ml 緑膿菌血清型 IATS 011のLPSの存在下で生じた(黒バー)のに対し、血清中1B011により誘発されたC4dの自発的発生はなかった(白バー)。これらの結果は、1B011はヒトで用いられる場合、最低限量の自発的炎症性副作用であろうことを示す。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】 1B011重鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列に関する。

【図2】 1B011 軽鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列に関する。

【図3】 aは、モノクローナル抗体1B011による血清型 IATS 011の緑膿菌臨床分離株の認識パターンに関する。 bは、他の血清型に対して特異的なモノクローナル抗体と比較した

50

モノクローナル抗体1B011による他の血清型の緑膿菌臨床分離株の認識パターンに関する。1B011への結合を全細胞ELISAにより決定した。

【図4】緑膿菌血清型IATS 011に対するモノクローナル抗体1B011のオプソニン化による食作用活性に関する。

【図5】マウスにおけるモノクローナル抗体1B011の薬力学に関する。1B011のインピボ防御能をマウス熱傷創敗血症モデルにおいて評価した。1B011の異なる用量をNMRIマウスにi.p.またはi.v.で投与した。曝露後3日生存率を示す。

【図6】マウスにおけるモノクローナル抗体1B011の薬力学に関する。1B011の肺感染後に肺および脾臓からの緑膿菌排除媒介能力を、マウスにおける急性肺感染モデルで評価した。1B011を緑膿菌の肺感染の前にi.v.で投与した。肺および脾臓における細菌負荷を感染後6、12、24および48時間で評価した。

【図7】モノクローナル抗体1B011の補体活性化に関する。1B011をヒトの通常血清と混合することによる補体成分C4dの発生を測定するインビトロアッセイの結果を示す。生じたC4dをELISAにより検出した。2バッチの1B011を血清中に2つの異なる濃度、100 μg/mlおよび10 μg/mlで試験した。血清単独対照を0 μg/mlとして示す。

10

【図1】

```

5'GAGGAGCAGGTCGAGTCCGCGGAGGCTTTGTTCCAGCCCGGGGGTCCCTGAGACTC 60
E E Q V V E S G G G F V Q P G G S L R L L 20

TCCTGTGCGCCCTCGGATTCACCTTTAGTCCATACCTGGATGCACCTGGGTCGCGCAGCT 120
S C A A S G F T F S P _ _ Y _ W _ H _ W V R Q A 40
                                CDR1

CCAGGGAAGGGCTGGTGTGGTCTCACGTATTATAGTGTGGAGCACATACCTACGCG 180
P G K G L V W V S R I N S D G S T Y Y A 60
                                CDR2

GACTCCGTAAGGGCCGATTCACATCTCCAGAGACAACCCAGGAACACACTGTATCTG 240
D _ S _ V _ K _ G _ R _ F _ T _ I _ S _ R _ D _ N _ A _ R _ N _ T _ L _ Y _ L 80

CAAATGAACAGCTCTGAGAGCCGAGACACCGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATGATAC 300
Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D _ R _ Y 100
                                CDR3

```

【図2】

```

1'GATGTTGATGACTGAGTCTCCGCTCTCCCTGCGCCGTCACCTTGGACAGCCGCGCTCC 60
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S 20

ATCTCCTGCGGCTAGTCAAGCCTCGTATATAGTGTGGAAACACTACTTGAATGG 120
I S C R _ S _ S _ Q _ S _ L _ V _ Y _ S _ D _ G _ N _ T _ Y _ L _ N _ W 40
                                CDR1

TTTCAGCAGAGCCCGCCATCTCCAGGCGCCTAATTATTAAGGTTTCTAACCGGAC 180
F Q Q R P P G Q S P R R L I Y K V S N R D _ 60
                                CDR2

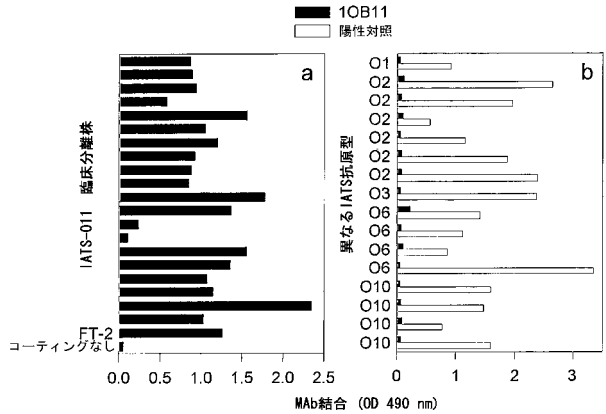
TCTGGGTCGCCAGAGNITCAGCGCAGTGGGTTCAGGCACIGATTTCACACTGAAATC 240
S _ G _ V _ P _ D _ R _ F _ S _ G _ S _ G _ S _ G _ T _ D _ F _ T _ L _ K _ I 80

AGCAGGGTGGAGCTGAGGATTTGGCGTTTATTACTGCTGCAAGGTACACACTGGCCCT 300
S R V E A E D V G V Y Y C M _ Q _ G _ T _ H _ W _ P _ 100
                                CDR3

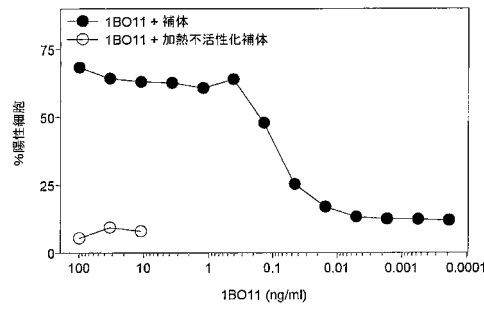
CTCACTTTCCGCGGAGGACCAAGGTCGAGATCAA 336
L _ T _ F _ G _ G _ G _ T _ K _ V _ E _ I _ K 112

```

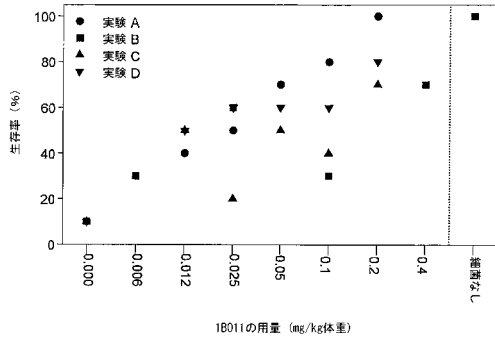
【図3】



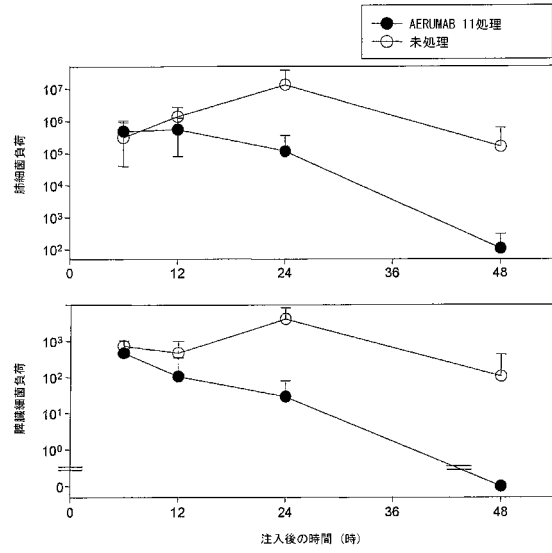
【図4】



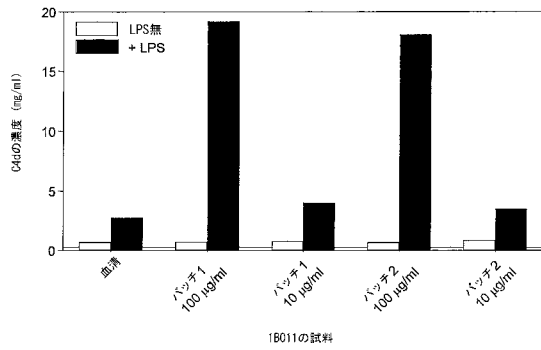
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0004944799000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569 D
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04

- (72)発明者 インボデン マルティン アー .
 スイス国 ムンシンゲン シュロッスマツテ 4
- (72)発明者 ツエルヒャー アドリアン
 スイス国 ベルン ディエスバッハストラッセ 6

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 米国特許第 0 5 6 2 7 0 6 7 (U S , A)
 国際公開第 0 2 / 0 2 0 6 1 9 (W O , A 1)
 FEMS Microbiol. Lett. , 2 0 0 0 年 , Vol. 187 , pp.59-63
 Res. Immunol. , 1 9 9 3 年 , Vol. 144 , No. 9 , pp.659-665
 Vaccine , 2 0 0 4 年 , Vol. 22S , pp.S44-S48
 HYBRIDOMA , 1 9 9 7 年 1 0 月 , Vol. 16 , No. 5 , pp.413-420
 Infect. Immun. , 1 9 8 8 年 , Vol. 56 , No. 8 , pp.1873-1879

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N 15/00-15/90
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
 PubMed
 CApius/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 UniProt/GeneSeq