

(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2010-519901

(P2010-519901A)

(43) 公表日 平成22年6月10日(2010.6.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 3
<b>C O 7 K 16/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/12	
<b>G O 1 N 33/569 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-551655 (P2009-551655)	(71) 出願人	509245762
(86) (22) 出願日	平成20年3月3日 (2008.3.3)		ヘリキュア アクチボラゲット
(85) 翻訳文提出日	平成21年10月26日 (2009.10.26)		スウェーデン国 エスイー - 907
(86) 国際出願番号	PCT/SE2008/050236		19 ウメオ、ボックス 7997
(87) 国際公開番号	W02008/105740	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成20年9月4日 (2008.9.4)		特許業務法人浅村特許事務所
(31) 優先権主張番号	60/904, 241	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成19年3月1日 (2007.3.1)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	12/072, 429		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成20年2月26日 (2008.2.26)	(74) 代理人	100163485
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 義敬
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピロリ菌に対する新規免疫グロブリン

(57) 【要約】

本発明は、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*、*H. pylori*) によって引き起こされる感染の予防、治療及び診断のための物質及び方法に関する。より詳細には、本発明は、新規の特異的な可変抗体領域、その誘導体及び完全ヒト免疫グロブリン A b b a 3 に関する。A b b a 3 は、ピロリ菌によって発現される B a b A 抗原に特異的な活性を示し、B a b A とフコシル化された A B O / ルイス b 血液型抗原 (L e b) の結合に関して競合する。本発明はさらに、前記免疫グロブリンの産生、それらの単離、及び例えば疾患を引き起こすピロリ菌の検出における使用の方法に関する。本発明は、免疫感作療法、すなわち、ピロリ菌株によって引き起こされる病的感染を治療及び予防するための受動ワクチン接種にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

B a b A タンパク質への特異性を有するヒト s c F v 抗体断片、とりわけルイス b 抗原 ( L e b ) との結合に関して競合する s c F v クローンを同定及び選択する方法であって、

a ) B a b A によって媒介されたルイス b 抗原と細菌の結合と競合する結合活性をその血清が示すピロリ菌 ( H . p y l o r i ) 感染患者を選択するステップと、

b ) 阻害陽性血清を有する患者の末梢血リンパ球から単離された R N A を単離して、抗体 V 領域をコードする遺伝子の増幅用に対応する c D N A を生成することによりファージディスプレイ s c F v ライブラリーを構築するステップと、

c ) ピロリ菌由来の精製された天然 B a b A アドヘシンで前記ライブラリーをプロービングするステップと、

d ) ピロリ菌の B a b A に特異的に結合するクローンを同定するステップと、

e ) 前記クローンを完成させて、B a b A との結合によってピロリ菌を中和する完全ヒト I g G 1 抗体を形成するステップとを含む方法。

## 【請求項 2】

粘膜部位を通して伝染するヒト感染症を予防する方法であって、

a ) ピロリ菌によって発現された B a b A 抗原に特異的な活性を示す抗体断片又はその誘導体を発現する微生物を用意するステップと、

b ) 経口投与を介して前記微生物を胃領域に送達して、粘膜上でのピロリ菌のコロニー形成を予防するステップとを含む方法。

## 【請求項 3】

ピロリ菌によって発現された B a b A 抗原に特異的な活性を示す精製及び単離された特異的な可変抗体結合領域又はその誘導体であって、前記誘導体が完全ヒト免疫グロブリンである可変抗体結合領域又はその誘導体。

## 【請求項 4】

アミノ酸配列 ( 配列番号 1 8 ) を有する A b b a 3 重鎖可変領域と、アミノ酸配列 ( 配列番号 1 9 ) を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 3 に記載の、ピロリ菌によって発現された B a b A 抗原に特異的な活性を示す精製及び単離された特異的な可変抗体結合領域又はその誘導体。

## 【請求項 5】

D S M 1 9 1 0 1 として寄託されている精製及び単離された抗体 A b b a 3 。

## 【請求項 6】

糞便試料中のピロリ菌を検出するための検出キットであって、A b b a 3 を含む抗体と結合した標識と組み合わせたイムノアッセイ技法を含むキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ピロリ菌 ( H e l i c o b a c t e r p y l o r i , H . p y l o r i ) によって引き起こされる感染の予防、治療及び診断のための物質及び方法に関する。より詳細には、本発明は、ピロリ菌によって発現される B a b A 抗原に特異的な活性を示す新規の特異的な可変抗体領域、その誘導体及び完全ヒト免疫グロブリン A b b a 3 、並びに前記免疫グロブリンの産生、それらの単離、及び例えば疾患を引き起こすピロリ菌の検出における使用の方法に関する。本発明は、免疫感作療法、すなわち、ピロリ菌株によって引き起こされる病的感染を治療及び予防するための受動ワクチン接種にも関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

20

30

40

50

ピロリ菌は、消化性潰瘍及び胃癌に進行しうる慢性胃炎を引き起こすヒト胃粘膜コロニーを形成するグラム陰性細菌である(6)。ピロリ菌は、胃粘膜への密接な接着性を与えるアドヘシンをその表面に発現し、それによって、これらの栄養要求性生物が宿主組織から栄養物を獲得するのを可能にする。B a b Aアドヘシンは、外膜タンパク質のパラロガスファミリーのメンバーであり(2)、上皮細胞表面に発現されるフコシル化されたA B O / ルイスb血液型抗原に結合する(7、22)。

#### 【0003】

高い割合の臨床分離株がB a b Aを発現することが示されているので、B a b Aは潜在的なワクチン候補である(22、26、33)。胃腸管では免疫活性が低いため、ピロリ菌に対する能動ワクチン接種は困難である。他の問題のひとつは、ピロリ菌の組換え率が高いことである。反対に、受動免疫感作は、A b b a 3抗体が抗原に結合して、ピロリ菌が粘膜に接着するのを困難にするため、より有利である。

10

#### 【0004】

最近の研究は、B a b Aの発現と、消化性潰瘍及び胃癌の発症との間における有意な関連性も実証している(16、36)。現在、高度にA B O / ルイスbフコシル化された糖化合物の送達による受動免疫療法の実現可能性が調査されている(18、43)。別法では、ピロリ菌に対するI g Gの経口投与によって(11、25)、又はストレプトコッカス(*Streptococcus*)変異体に対する一本鎖可変断片(s c F v)を発現するラクトバシラス(*Lactobacillus*)の投与によって(30)示されている通り、粘膜への接着性を妨害する抗体誘導体を経口投与するか、i n s i t uでG R A S(一般に安全と認められる)微生物によって産生させることができよう。s c F vは、柔軟なペプチドリンカーによって連結された免疫グロブリンの可変重鎖(V H)及び可変軽鎖(V L)から成る遺伝子操作された抗体である。

20

#### 【0005】

胃の中の細菌は、それらに宿主特異的な環境条件が立ちはだかっているだけでなく、疾患進行中における粘膜のグリコシル化パターンの変化にも直面している。慢性かつ持続的な感染を確立する、ピロリ菌の驚くべき能力は、その異常に高い組換え率に起因する可能性が高い(15)。

#### 【0006】

緊密な接着性と非接着性とを切り換えるピロリ菌の能力は、炎症組織から漏出する栄養物へのアクセスをこの細菌に与えるのみでなく、この細菌を炎症性の宿主反応に暴露するものでもある(37)。

30

#### 【0007】

B a b Aは、C Tリッチリーダー配列におけるフレームシフトベースの変動、遺伝子水平伝播、並びにb a b B及びb a b Cとの遺伝子転換によって、結合の柔軟性に寄与する(4、5、40)。b a b B及びb a b Cは、N末端領域及びC末端領域がB a b Aに密接に関連しているが、異なった遺伝子座に位置している外膜タンパク質(OMP)である。B a b Aは主としてb a b A遺伝子座で見出されるが、b a b B遺伝子座に位置しているB a b Bとの遺伝子転換は、より弱いB a b Bプロモーターの制御下にある完全長B a b Aか、B a b BとB a b Aとを区別する独自領域の上流に組換え部位を有するキメラB a b A / B a b B遺伝子の形成をもたらす(12)。組換えによって、b a b A遺伝子座におけるB a b Bの存在がもたらされ、その後、感染したマカク及び患者におけるルイスb結合が減失することもある(12、20、40)。第3の遺伝子座であるB a b Cは、以前には株26695で記載されていたのみであったが、最近では、他の株でもB a b Aとの組換え交換に関与していることが示されている(12、20)。

40

#### 【0008】

B a c k s t r o mら(5)は、ルイスbへのそれらの結合能を失った臨床ピロリ菌単離株のなかで、わずかな割合の微生物集団がB a b B / B a b Aキメラを保持しており、ルイスbコーティングされた磁性ビーズをi n v i t r oで用いたパニングによって、ルイスb結合を再構成できたことを示している。これにより、炎症性の宿主反応の際に、

50

細菌がグリコシル化パターンの変化に应答することが可能となる。遺伝子転換は、モザイクパターンの B a b A の形成をもたらすが、C B D (糖結合ドメイン)の変異は機能の減失をもたらし、それによって、感染の急性期におけるピロリ菌の生存の減失をもたらす。感染の急性期では、血液型抗原が上皮細胞で依然として高レベルで発現されている。

【0009】

アカゲザルの実験的感染の終わりに、分析された株の b a b A 遺伝子座に b a b B が独占的に存在していたことによって、抗原性の変動が宿主免疫応答を回避するのに用いられているという仮説がもたらされた(40)。患者血清中のピロリ菌抗原の抗原性は、2つの報告で試験されているが、タンパク質は2D分離の前に尿素で変性されたので、高次構造に依存した膜タンパク質を検出する可能性はかなり限定されていた(19、27)。

【0010】

ポリクローナル抗 B a b A 血清は、封入体から単離された組換え B a b A を用いたウサギの免疫感作によって産生され(44)、大部分の株の B a b A を認識することが示されている。これまでに、2種の B a b A 特異的モノクローナル s c F v が記載されており、それらは、アミノ酸128から310までの B a b A - J 9 9 ドメインをカバーする B a b A - G S T 融合タンパク質を用いた、齧歯類の免疫感作によって産生されたものである(21)。分析された株の約半分しか、ウエスタンブロット分析によって陽性とならなかったが、これはおそらく、モノクローナル抗体のエピトープが、ポリクローナル血清と比較して、より限定されていたためである。加えて、B a b A における、いかなる特定された機能的な高次構造も有しない一部分のみを含有している組換えタンパク質で、記載の s c F v のファージ選択が行われた。

【0011】

粘膜部位を通して伝染する感染症を予防する新規のアプローチは、乳酸桿菌又は他の G R A S 微生物による抗体断片の i n s i t u 送達から成る(30)。

【0012】

B a b A アドヘシンは、以前に同定されており、ピロリ菌(S E 9 6 0 2 2 8 7 - 6)の細菌表面に局在していることが示されている。血液型結合活性はpH依存性であることが示された。また、本発明者らは、ルイスb受容体への結合親和性が高い平衡定数を示すという証拠を提示する。

【0013】

ピロリ菌によって誘発される感染の免疫学的治療及び予防に、集中的な研究が向けられている。欧州特許第0484148号(A n d o 及び N a k a m u r a)は、哺乳動物の上部消化管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、抗ピロリ菌ポリクローナル免疫グロブリン及び薬学的に許容される担体を含む、有効量の医薬組成物を、それを必要とする患者に経口投与するステップを含む方法を記載している。この記載は、抗生物質の投与と併用した前記治療の組合せについて詳述している。前述のポリクローナル抗体を産生する方法として、欧州特許第0484148号は、哺乳動物の血清及び乳からの抗ピロリ菌免疫グロブリンの単離及び精製について記載している。欧州特許第0484148号によれば、ピロリ菌自体は、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ又はウマの胃の中に見出されなかったが、これらの動物種は、それらがヒトで見出されるピロリ菌株と交差反応する免疫グロブリンを有するので、ピロリ菌のものに類似した抗原決定基を備えたコロニー形成微生物を有すると考えられた。欧州特許第0484148号によれば、大型哺乳動物(例えば妊娠中の雌ウシ)をピロリ菌の全細胞で免疫感作し、その後、乳又は初乳から免疫グロブリンを抽出することが好ましい。これらの免疫感作実験では、免疫グロブリンの産生を誘発するのに、N C T C 株 1 1 3 6 2 及び臨床分離株ピロリ菌 1 5 3 番が使用された。その一方、N C T C 株 1 1 6 3 7 は分析目的に使用された。免疫感作によって、日用量 0 . 0 1 ~ 0 . 1 g / 日の免疫グロブリン組成物が治療の成功に十分であるような規模の抗ピロリ菌力価が乳中に産生されると主張されている。しかし、主張されている 0 . 0 1 ~ 0 . 1 g / 日という間隔は、A n d o 及び N a k a m u r a が提示した実験によって支持されておらず、そのような低用量で効果があるとは、これまでに臨床試験で証明されていない。実

10

20

30

40

50

施例 5 及び 7 で実際に用いられた用量は、1 g / 日の桁、すなわち、示された間隔の上限の 10 倍である。さらに、同様な用量は他の胃腸病原体に対して有効ではないので、Ando 及び Nakamura によって製造されたもののような、未特定の免疫グロブリン混合物が、主張されている用量で効果的である可能性は極めて低い。開示されている免疫グロブリンが不十分であることを、上記の記載で詳細に論じられている、抗生物質の同時投与が示している。

【0014】

欧州特許第 0469359 号 (Cordle 及び Schaller) も、同様に、ホルマリン殺菌されたピロリ細菌 (ATCC 株 26695) を用いた哺乳動物、好ましくは妊娠中の雌ウシの免疫感作について記載している。抗ピロリ菌ポリクローナル抗体を乳から単離及び精製し、最後に免疫グロブリン約 0.5 g の量で、毎日 3 回、子ブタにエサとして与えた。結果は、試験後にグラム陰性細菌に関して陽性であった生検材料の数を測定することによって評価した。グラム陰性細菌は、非免疫性の栄養物をエサとして与えられた子ブタの 78% で見出されたが、いわゆる特異的抗ピロリ菌抗体を含有する栄養物をエサとして与えられた子ブタでは 35% のみ (原文通り) 見出された。

10

【0015】

本明細書の発明と同じ発明者らによる特許出願である米国特許出願公開第 20040234529 号は、BabA タンパク質を開示するものである。前記アドヘシン及び / 又は DNA は、ピロリ菌によって誘発された感染、例えば胃炎及び酸消化性疾患に対して行われる診断並びに治療及び / 又は予防に有用であり、すなわち能動ワクチン接種に有用である。彼らは、ピロリ菌によって引き起こされる消化管疾患を治療及び / 又は予防するための免疫グロブリン組成物であって、ピロリ菌アドヘシンに結合するルイス b 抗原に対する特異的な活性を示す受動ワクチン接種用の免疫グロブリン組成物も開示している。本明細書の発明とは異なり、上記抗体は、特異的な選択されたヒト抗体ではなく、動物抗体である。さらに、米国特許出願公開第 20040234529 号の出願者は糞便試料での検出に言及していない。

20

【0016】

BabA の中心部は最も不均一であり、かつ受容体結合の特異性を決定するが (4、22)、いまだにマッピングされていない糖結合ドメイン (CBD) は、機能減失なしに高率の変異を導入することができない。それにもかかわらず、南米大陸で支配的な血液型抗原である O - ルイス b に選択的に結合する、南米の先住民から単離されたピロリ菌株 (「スペシャリスト (Specialists)」株と呼ばれる) の BabA の適応は、進化の過程における微調整を示した。反対に、A / B ルイス b 血液型抗原が、より均等に宿主集団で現れる大陸から単離された株は、A / B ルイス b (O - ルイス b が含まれる) に対して、より普遍的な結合能を示し、それゆえ「ジェネラリスト (Generalist)」結合体と命名された (4)。BabA 配列のアラインメントを行ったが、ジェネラリスト対スペシャリストに対応するいかなる特異的な babA ドメインもマッピングできなかった。したがって、本発明者らは、受容体結合部位への特異性を有する抗体の開発を目標とし、ファージディスプレイ技法を用いて、その血清がルイス b への競合的な BabA 結合特性を表した患者から抗体を濃縮した。

30

40

【0017】

様々なペプチドに対する、末梢血リンパ球由来のヒト scFv ライブラリーをどのようにして産生するかは、当技術分野で既に知られている。ピロリ菌の変性された直鎖状の非天然ペプチドをどのようにして選択するかも知られている。しかし、以前のいかなる文献も、天然の変性されていない三次元の BabA ポリペプチドの選択する選択法は記載していない。

【0018】

ここに、本発明者らは、ピロリ菌感染患者の末梢血リンパ球から得られたヒト scFv ライブラリーを提示する。同定及び選択された BabA 特異的ヒト単一鎖のひとつをヒト IgG1 抗体に変換し、Abba3 と命名した。Abba3 scFv は、可変結合領域

50

を指し、これには、その誘導体が含まれる。驚いたことに、この抗体は、ピロリ菌臨床分離株の大部分に結合し、A - ルイス b 又は B - ルイス b 血液型糖抗原、すなわち、世界中に最も一般的に分布している「ジェネラリスト」タイプの B a b A が優先的に認識する糖抗原に類似した結合特性を示した。A b b a 3 抗体は、B a b A に結合することによってピロリ菌を中和し、この細菌が粘膜に接着するのを困難にする。その結果、細菌 / 抗体複合体は、胃腸系から自然に消失する。胃管に存在する免疫活性は低いので、抗体検出は、抗原検出ほど有用ではない。したがって、糞便試料中のピロリ菌を検出するための、A b b a 3 抗体を用いた検出キットが好ましい。A b b a 3 は完全ヒト I g G 1 抗体であるので、それは、補体によって誘導された細菌溶解の活性化に効果的であり、したがって免疫系を活性化するのも効果的であるという利点を有する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

したがって、本発明の目的は、受動ワクチン接種に使用するための、ピロリ菌の B a b A に特異的に結合する能力について選択された抗体である A b b a 3 を提供することである。糞便試料中のピロリ菌抗原を検出するための A b b a 3 の使用も、本発明の目的である。さらに、本発明の目的は、ピロリ菌の B a b A に特異的に結合する能力について、本明細書の発明に記載の方法を用いて選択された任意の抗体を提供することである。他の目的及び利点は、以下の開示及び添付されている特許請求の範囲によって、より完全に明らかとなるであろう。

20

【課題を解決するための手段】

【0020】

病原体であるピロリ菌がヒト胃粘膜に接着するには、ピロリ菌外膜 (H O P) タンパク質ファミリーに属するアドヘシンが必要である。最も詳細に特徴付けられている相互作用は、B a b A アドヘシンと、糖化合物として胃腸 (G I) の管壁に沿って発現されるフコシル化された血液型 A B O / L e b 抗原との間の相互作用である。ここで、本発明者らは、B a b A タンパク質への特異性を有するヒト s c F v 抗体断片、とりわけルイス b 抗原 (L e b) との結合に関して競合する s c F v クローンの同定及び選択について記述する。B a b A によって媒介された L e b と細菌の結合と競合的な結合活性をその血清が示したピロリ菌感染患者を選択し、末梢血リンパ球 (P B L) から単離された R N A を用いて、ファージディスプレイ s c F v ライブラリーを構築した。精製されたピロリ菌由来の天然 B a b A アドヘシンを用いてライブラリーをプロービングし、クローン (A b b a 3) を同定した。このクローンを完全ヒト I g G 1 抗体に完成させ、昆虫細胞で発現させた。L e b との競合的結合及び高次構造依存的な B a b A 免疫エピトープとの結合は、天然の受容体、すなわち A B H / L e b 抗原に類似した結合部位を示す。A b b a 3 抗体は、A s p h o l m - H u r t i g ら、2004年によって記載されたジェネラリスト (A B O / L e b 抗原) 結合特性を有するピロリ菌株に優先的に結合した。これは、ジェネラリストタイプの B a b A とスペシャリストタイプの B a b A との間の構造上及び高次構造上の相違を示唆している。

30

【0021】

B a b A に結合することによってピロリ菌を中和して、この細菌が粘膜にコロニー形成することを困難にし、その結果、A b b a 3 / B a b A 複合体が胃腸管から自然に消滅する A b b a 3 抗体を本発明者らは同定した。A b b a 3 は、非免疫原性であるという利点を有する完全ヒト抗体であり、かつ I g G 1 アイソタイプは、免疫エフェクター機能の活性化に効果的である。A b b a 3 s c F v は、可変結合領域を指し、これには、その誘導体が含まれる。さらに、糞便試料中のピロリ菌を検出するための、A b b a 3 抗体及び誘導体を用いた検出キットを開示する。

40

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】 B a b A 結合に関して E L I S A で分析された、個々のファージミド保持クロー

50

ンによって発現された s c F v - p I I I 融合タンパク質を示す図である。検出は、抗 p I I I m A b で行った。括弧内の名前は、配列決定の後にクローンに与えられた。陰性対照である、同じファージミドベクター内にクローニングされた無関係な抗 p h O x s c F v も、同じく検出された。

【図2】単離された B a b A - 結合体の予測 V H アミノ酸配列 ( a ) 及び V L アミノ酸配列 ( b ) と、それらに最も近縁なヒト生殖系列 V 遺伝子との配列比較を示す図である。( a ) V H 鎖がそれらの生殖系列遺伝子と比較して多数の変異を有することは、親和性成熟を示している。クローン 5 及び 6 の V H 配列は、F R 2 領域における 1 アミノ酸置換のみで、A b b a 3 配列と異なっている。ダッシュは配列同一性を示し、点は配列中のギャップを指す(クローン C 4 の V H : I g H V 3 - 4 8 \* 3、I g H D - 1 9 \* 0 1、I g H J 4 \* 0 2 ; クローン C 5 の V H : I g H V 1 - 1 8 \* 0 1、I g H D 3 - 1 0 \* 0 2、I g H J 4 \* 0 2 )。A b b a 3 - V L は、生殖系列遺伝子 I g K V 1 - 3 9 \* 0 1 及び J セグメント I g K J 1 \* 0 1 から生じた。クローン 6 及びクローン C 5 は、同じ生殖系列及び J - セグメント ( I g K J 4 \* 0 1 ) から発しているので、同じ前駆体から生じた可能性が最も高い。クローン 5 の V L は、I g K J 1 \* 0 1 との組換えによって、生殖系列遺伝子 I g K V 2 - 3 0 - 1 から生じた。

【図3】s c F v - A b b a 3 がピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b には結合するが、B a b A 遺伝子がロックアウトされている対応株 b a b A 1 A 2 変異株には結合しないことを示す図である。I M A C 精製された s c F v - A b b a 3 を P B S 中に連続希釈し、対応株でコーティングされた E L I S A ウェル上でインキュベートした。結合は、抗 m y c タグ m A b ( 9 E 1 0 ) 及び H R P 結合抗マウス A b を用いて検出した。

【図4】S c F v - A b b a 3 は、ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b 溶解物由来の B a b A を認識するが(レーン 1)、B a b A の二重ロックアウト株 b a b A 1 A 2 の溶解物とは可視的なバンドがない(レーン 2)ことを示す図である。株 1 7 8 7 5 / L e b 溶解物由来の B a b A は、強度な変性条件下でさえ認識される。(レーン 3 ~ 6)。対照的に、株 1 7 8 7 5 / L e b から精製された B a b A は、このタンパク質が穏やかに処理された場合にのみ認識され(レーン 7)、メルカプトエタノールの添加及び熱処置の後では、エピトープが破壊されている(レーン 8)。これは、細菌溶解物中の安定化タンパク質の存在を示唆する。レーン 1 : 非還元の前駆体溶解物 ( 5 μ l の株 1 7 8 7 5 / L e b、O D 1 . 0 ) ; レーン 2 : 非還元の前駆体 b a b A 1 A 2 ( 5 μ l、O D 1 . 0 ) ; レーン 3 ~ レーン 6 : 強度に還元されたピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b 溶解物 (それぞれ 1 2 μ l、5 μ l、1 μ l、0 . 2 μ l、O D 1 . 0 ; 2 . 5 % メルカプトエタノール、3 % S D S、及び 9 6 ° C で 1 5 分間加熱) ; レーン 7 : 非還元の前駆体、株 1 7 8 7 5 / L e b 由来の精製 B a b A ( 5 0 0 n g ) ; レーン 8 : 還元された、株 1 7 8 7 5 / L e b 由来の精製 B a b A ( 5 0 0 n g )。

【図5】I g G - A b b a 3 及び s c F v 誘導体がピロリ菌上での結合に関して B a b A 受容体 L e b と競合することを示す図である。ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b を、様々な量の競合物質の存在下で、一定量の放射標識 H S A - ルイス b 結合体と共にインキュベートした。相対的親和性は、ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b への放射標識ルイス b の結合を 5 0 % に低減するのに必要な競合物質の量で表した(本文を参照)。抗体 A b b a 3 ( 4 7 p M ) の相対的親和性は、s c F v - A b b a 3 ( 2 4 7 p M ) より 5 倍高いことが明らかになった。E 1 - H C V エンベロープタンパク質への特異性を有する対照抗体、及び ハプテン 2 - フェニルオキサゾロンへの特異性を有する s c F v は、L e b 結合に関して競合しなかった。

【図6】A b b a 3 - A b によるピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b の B a b A 染色を示す電子顕微鏡写真を示す図である。細菌をヒト抗体と共にインキュベートし、結合画分をプロテイン A 標識された金で検出した。ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b との抗体 A b b a 3 - A b のインキュベーション ( A、B ) ; ピロリ菌株 D M との抗体 A b b a 3 のインキュベーション ( C ) ; ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b との無関係な抗体 ( 抗 E 1 H C V エンベロープ ) のインキュベーション ( D )。

10

20

30

40

50

【図7】ELISAによる、様々なピロリ菌臨床分離株と結合する、Abba3 - 抗体の能力(A)を示す図である。(A)機能的BabA - 発現があるかどうか、臨床ピロリ菌単離株をELISAで試験した。コーティングされた株をビオチン-Leb結合体でプロービングし、APストレプトアビジンで検出した。(B)同じコーティング条件を用いて、AP結合抗ヒト抗体で検出することによって、Abba3 - IgG1結合を試験した。Abba3 - IgGは、合計で、分析された株の79%(52株のうちの41株)に結合した。スペシャリスト株は で印をつけている。

【図8】イムノプロットで、様々なピロリ菌臨床分離株からのBabAを認識する、Abba3 - 抗体の能力を示す図である。プレートからピロリ菌コロニーを擦り取り、PBSで2回洗浄し、0.6のODに標準化する。SDSで可溶化した培養抽出物を37 でインキュベートし、SDS-PAGEで分離して、ニトロセルロース膜に転写する。検出は、Abba3 - IgG(6 $\mu$ g/ml)及びそれに続くHRP結合抗ヒトIgGを用いて行った。2つの代表的なプロットを示す。

【図9】図1のELISA及びウエスタンプロット結合データをグラフ表示する図である。ジェネラリストのLisb結合特性を有するほとんどすべての株がAbba3抗体によって認識されたが(31株のうちの30株)、スペシャリストのLisb結合特性を有する株の約半分(21株のうちの11株)のみが結合した。フィッシャーの正確確率検定は、 $p < 0.0002$ という信頼値の統計的有意性を示す。

【図10】ELISAとイムノプロットによるAbba3抗体の結合分析を要約する表である。様々な株に対するELISA結合とイムノプロット結合との間で異なった一貫性を認めることができる。列5は、Aspholm-Hurtigら(4)による、Leb結合とA-Leb結合との間の比率を示す。2.5より大きい値を、スペシャリスト結合体として分類し、太字で表示した。(4)及びこの公開によって決定された株から得られたBabA遺伝子配列の受入番号を列6に示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

BabAに関して血清陽性なドナーの選択

ピロリ菌に感染した36人のスウェーデン人患者から得られた血清を、125I標識されたアルブミンに多価結合したLeb(Leb結合体)がピロリ菌株17875/Leb細菌に結合するのを阻害するそれらの能力に関して試験した。ほとんどすべての患者は、低い阻害力価を示した(平均で1:50)。しかし、6種の血清は、高力価のLeb阻害を示し(1:355から1:8361)、これらを、2株のスウェーデン株(Sw7、Sw44)、1株のペルー株(P436)1株のアラスカ株(A714)1株のスペイン株(S863)1株の中国株(Ch1)及び1株の参考株J99(3)を用いた、Leb結合の阻害に関してさらに試験した。これらの血清のうち3種は、これらの株の大部分に対して高い阻害力価を示した(データは示されていない)。

【0024】

V遺伝子レパートリー及びscFv - ライブラリーの産生

阻害陽性血清を有する3人の患者からのPBLからRNAを単離し、対応するcDNAを生成し、抗体V領域をコードする遺伝子の増幅に使用した。優勢なクローンの優先的増幅による偏りを避けるために、各患者からのVH領域及びVL領域をファミリー特異的プライマーで別々に増幅した。各患者からのV<sub>L</sub>カッパ領域をプールし、ファージミドベクターpSEX81にクローニングし(8)、その結果、それぞれ約 $7 \times 10^5$ の独立なクローンを含む3つのカッパVLサブライブラリーを得た。20の個別なクローンの配列決定は、完全な多様性を示した。各患者の増幅されたVH領域を、対応するVLカッパサブライブラリーにクローニングし、その結果、それぞれ約 $7 \times 10^6$ の個別なクローンを有する3つの別々なscFvライブラリーを得た。ライブラリーの品質管理のために、pIIIDメインに対するmAb(41)を用いて、scFv - pIII融合タンパク質の完全長発現をウエスタンプロットで分析した。15の個別なクローンのうち6クローンがscFv - pIII融合タンパク質を発現していたので、ライブラリーの実際のサイズ

10

20

30

40

50

は、それぞれ  $3 \times 10^6$  の機能的クローンを含むものと推定された。

【0025】

特異的な結合体についてのパニング

ヘルパーファージと共に過剰感染させることによって、3通りのライブラリープールに由来するファージ粒子を産生し、B a b A コーティングされたイムノチューブ ( i m m u n o t u b e ) で3ラウンドのパニングにかけた。B a b A 特異的な結合体の増加をモニターするために、これらのファージをB S A コーティングされたイムノチューブでの選択にもかけた。B S A でブロックされたのみのイムノチューブから溶出されたファージに対する、B a b A コーティングされたイムノチューブから溶出されたファージの比率によって測定される濃縮係数は、パニングの第2ラウンドでは55であり、パニングの第3ラウンドでは2381であることが示された。パニングの第3ラウンドの後に得られた単一のクローンをs c F v - g I I I 融合タンパク質として発現させ、B a b A に結合するものを得るために、E L I S A によってスクリーニングした。分析された24クローンのうち、14クローンは、B a b A に特異的に結合することが明らかになった。図1は、ファージミドで発現された単一クローンのスクリーニングE L I S A アッセイを示す。

10

【0026】

配列分析は、ひとつのクローンの優勢な(6倍)出現、及び同様なV領域の組合せを示し、それゆえ、これをA b b a 3 (抗b a b A)と命名した(図2)。I M G T データベースに対するA b b a 3 - V H 領域のスクリーニングによって、それが、DセグメントI g H D 2 - 1 5 \* 0 1 及びJセグメントI g H J 4 \* 0 3 との生殖系列遺伝子I g H V 3 - 4 8 \* 3 の組換えによって生成されたことが判明した。他の代表的な結合体のV H - 領域は、それらが異なった生殖系列遺伝子から生じたか、又は異なったDセグメント若しくはJセグメントと組換えが起こったものなので、異なったB細胞前駆体から生じたものであった(図2の説明を参照)。A b b a 3 V L 鎖は、JセグメントI g K J 1 \* 0 1 とのV L 生殖系列遺伝子I g G K V 1 D - 3 9 \* 0 1 の組換えによって生じた。同様に、他の結合体のV L 領域は、異なったV L セグメント及びJセグメントから組換えが起こったものなので、異なったB細胞前駆体から生じたものであった。

20

【0027】

固定された株17875 / L e b でも、パニングの第2ラウンドから得られたファージをパニングし、B a b A リガンド、すなわち通常のトリエチルアミン緩衝液の代わりにL e b を用いてアフィニティー溶出し、その結果、A b b a 3 クローンの排他的な選択を得た(データは示されていない)。

30

【0028】

A b b a 3 の結合特異性

優勢なs c F v A b b a 3 を原核細胞発現ベクターにサブクローニングし、c - m y c に対するモノクローナル抗体での検出及びI M A C 精製を可能にした(13、14)。s c F v - A b b a 3 が細菌表面のB a b A を認識できるかどうか試験するために、固定されたピロリ菌を用いたE L I S A 結合アッセイを行った。A b b a 3 - s c F v の連続希釈は、ピロリ菌株17875 / L e b には結合するが、対応する陰性対照株D M、すなわち機能的B a b A 遺伝子(B a b A 2)だけでなく、転写されないB a b A 遺伝子(B a b A 1)もノックアウトされている株(22)には結合しないことを示した(図3)。イムノプロット分析は、A b b a 3 - s c F v が、細菌溶解物中の予測された分子量のバンドと、株17875 / L e b から精製されたタンパク質とを認識したので、A b b a 3 - s c F v の特異性をさらに立証した(図4)。興味深いことに、記載されているルイスb結合特性(22)と同様に、精製されたB a b A タンパク質が穏和な条件下で処理されていた場合にのみ特異的認識が起こり、還元剤での処理及び96 °Cへの加熱は、A b b a 3 のエピトープを破壊した(図4、レーン8)。これは、強度の還元及び変性条件でさえ、ウエスタンプロットにおけるs c F v の結合を消滅させなかった、ピロリ菌17875 / L e b 溶解物からのB a b A の認識と対照的である。これはおそらく、B a b A と、精製後のタンパク質調製物には存在しない他の安定化タンパク質との間の複合体形成に起因

40

50

する可能性がある。B a b AのC末端領域には複数のN - グリコシル化部位 ( N - X - S / T ) が位置しているので、細菌溶解物中の二重バンドの出現は、異なったグリコシル化パターンに起因する可能性がある。

#### 【 0 0 2 9 】

安定性、結合活性及びより優れた取り扱いの容易さを得るために、他に記載されている発現ベクターを用いて、s c F vを完全ヒトI g Gに変換した( 2 4 )。A b b a 3抗体を昆虫細胞内で産生させたところ、E L I S Aプレート上でコーティングされた細菌への無制限な結合を示し、これは複数の融解サイクルを経ても減失しなかった( データは示されていない )。ルイスbとの競合的結合があるかどうか試験するために、A b b a 3 - s c F v及びA b b a 3 - 抗体を連続希釈し、一定量の放射標識ルイスbの存在下でピロリ菌株1 7 8 7 5 / L e bと共にインキュベートした。ルイスb結合をその最大値の半分に低減するのに十分な、s c F v及びI g G抗体の濃度は、それぞれ0 . 2 5 μ M及び4 7 p Mであると測定された。無関係のs c F v ( ハプテン2 - フェニルオキサゾロンに対して産生されたもの ) ( 3 1 ) 又は組換え産生された無関係なアイソタイプ一致ヒトモノクローナル抗体 ( H C Vエンベロープタンパク質E 1に対して産生されたもの ( 2 3 ) ) を用いた場合には、ルイスb結合の阻害は観察されなかった( 図5 )。ピロリ菌株1 7 8 7 5 / L e b上でのA b b a 3 - 抗体のインキュベーションは、電子顕微鏡検査における細菌外膜上のB a b Aの染色を示すことができたが、対応するB a b Aノックアウト株D Mとのインキュベーションは示さなかった。追加の陰性対照であるアイソタイプ一致ヒト抗体は、B a b Aを発現するピロリ菌株1 7 8 7 5 / L e bでいかなる染色も示さなかった( 図6 )。

10

20

#### 【 0 0 3 0 】

##### ピロリ菌単離株に対する反応性

世界中の臨床ピロリ菌株の間での、B a b AにおけるA b b a 3免疫エピトープの優勢について試験するために、本発明者らは、代表的な株を用いた完全なシリーズのE L I S A及びイムノプロット試験を行った。A b b a 3分析には、機能的なB a b Aタンパク質を発現するこれらのピロリ菌株のみを考慮した。それゆえ、本発明者らは、株が血液型抗原に結合する能力に関して、E L I S A結合アッセイでそれらを試験した( 図7 a )。同じE L I S A条件を用いて、同じ株をA b b a 3結合に関して試験した( 図7 b )。イムノプロット分析は、「穏やかなプロトコール」に従って、すなわち、S D S - P A G E分離の前に、還元条件を用いず、かつ低温によって処理されたピロリ菌全細胞抽出物を使用することによって行った( 2 2 ) ( 図8 )。表1は、使用された臨床分離株の結合特性、すなわち、L e bリガンド及びA b b a 3 - 抗体への結合能を要約する。加えて、対応するb a b A遺伝子の受入番号を示す。A b b a 3抗体は、上記シリーズのA B O / L e b抗原に結合するピロリ菌株 ( ( 4 ) によってジェネラリスト ( G e n e r a l i s t ) と定義されている ) からのB a b Aを最も良く認識するが、A b b a 3抗体は、スペシャリスト ( s p e c i a l i s t ) 株 ( スペシャリスト ) からのB a b Aを、より低い効率で認識することが判明した( 図9 )。A b b a 3 - A bは、ジェネラリスト株の大部分 ( 3 1株のうち3 0株 ) に結合したが ( 日本株J 5 0 7は例外であった )、2 1株のスペシャリスト株のうち1 1株のみが、A b b a 3 - A bによって認識された ( S w 6 0、S w 1 0 3、P 3 0 2、P 3 0 4、P 3 0 8、P 3 2 6、P 3 3 0、P 4 4 5、P 4 4 9、P 4 5 4、P 4 5 5 )。

30

40

#### 【 0 0 3 1 】

A b b a 3抗体が、スペシャリストと比較して、ジェネラリストに優先的に結合するのは、それぞれA - ルイス及びB - ルイス血液型糖抗原の、より嵩高なG a l及びG a l N A c末端基を反映する、抗体のパラトープに起因する可能性がある。( H e n n i n g r a、2 0 0 4年 ) に記載された抗体と比較して、A b b a 3抗体の結合がより優勢であるのは、受容体の競合的な結合特性、及びその結果であるより保存されたエピトープ認識に起因する可能性がある。高親和性抗体の選択の成功は、特定の抗体結合特性を有する適した患者血清の徹底的なスクリーニングに基づく本発明者らは考える。

50

## 【0032】

さらに、固定された抗原がその受容体への結合を保持する条件下でファージ選択を行った。この条件は、固定された B a b A の、ビオチン化リス b との結合をイムノチューブ内で試験することによって確かめられる（データは示されていない）。ピロリ菌感染患者由来の免疫レパートリーの利用及び救出のためにファージディスプレイを適用することは、特定の特徴を有するモノクローナル抗体を選択するのに奏功することが立証された。ドナーはすべてスウェーデン人であったので、ジェネラリスト株に感染していた可能性が高く、抗体可変領域はファージディスプレイライブラリーの構築用に再編されているが、機能の再構築の尤度は明らかに十分であった。

## 【0033】

免疫活性は胃腸管では限定的なので、受動免疫感作が好ましい。A b b a 3 抗体は B a b A に結合して、ピロリ菌が胃粘膜に結合するのを防止する。

## 【0034】

抗体が動物由来である場合、アレルギー反応により、受動免疫感作に関連した合併症がときどき起こる。A b b a 3 抗体はヒト抗体であるので、副作用の危険性は低減している。

## 【0035】

胃腸管の免疫活性は限定的であるため、抗体の検出によってピロリ菌感染を診断する可能性が制限されている。この理由で、検出は、糞便試料中で行うことが好ましい。

## 【0036】

粘膜部位を通して伝染する感染症を予防する新規のアプローチは、乳酸桿菌又は他の G R A S 微生物による抗体断片の *i n s i t u* 送達から成る（30）。したがって、A b b a 3 及び B a b A に対する特異性を有するその断片を使用して、粘膜上でのピロリ菌のコロニー形成を予防することができる。

## 【0037】

さらに、ますます増加している証拠によって、冠動脈疾患の発病機序におけるピロリ菌の関与が示唆されている（29）。非ヒト抗体と比較して、A b b a 3 抗体は、免疫原性反応を誘発しない完全にヒト由来のものであり、I g G 1 型は、補体によって誘導される細菌溶解の活性化に効果的であり、したがって、免疫系のエフェクター機能を活性化するのに効果的であるという利点を有する。

## 【実施例】

## 【0038】

## (実施例1)

B a b A - 抗体に関して陽性なドナーの選択

ピロリ菌に感染した36人のスウェーデン人患者から得た血清を、ピロリ菌株 C C U G 1 7 8 7 5 に結合した放射標識リス b - H S A ( 1 7 8 7 5 / L e b ) の結合を阻害するそれらの能力に関して試験した。ペレットの回収をより容易にするために、0.1のODを有する細菌株 1 7 8 7 5 / L e b を、L e b への結合能を失っている細菌株 1 7 8 7 4 で 1 : 6 0 に希釈した。ブロッキング緩衝液 ( P B S 、 0 . 0 5 % トウイン 2 0 、 1 % B S A ) 中に血清の連続希釈を行い、放射標識リス b - H S A 結合体 ( 0 . 0 1 n g /  $\mu$  l ) 5 0  $\mu$  l を最終容積 5 0 0  $\mu$  l に添加した。細菌 5 0 0  $\mu$  l を添加した後、チューブを R T ( 室温 ) で 1 7 時間、穏やかに混合した。試料を遠心処理し ( 1 3 0 0 0 g 、 1 3 分間 ) 、その後、ペレット及び上清の放射能を測定し、相互に相関させて、結合体及び遊離結合体を表すものとした。試験した血清の相対力価は、いかなる血清も存在しない状態での結合体の結合によって測定した結合を最大値の半分に低減するのに十分な濃度であった。最も高い力価を有する6種の血清を、7株のピロリ菌臨床分離株 ( S w 7 、 S w 4 4 、 P 4 3 6 、 A 7 1 4 、 S 8 6 3 、 C h 1 ( 本明細書に記載 ) 及び J 9 9 ( 3 ) ) への放射標識リス b 抗原結合の阻害に関してさらに試験した。

## 【0039】

## (実施例2)

10

20

30

40

50

## ヒト可変領域のcDNA合成及びPCR増幅

10 mlの患者血液の末梢血単核細胞(PBMC)をフィコール勾配で単離し、標準プロトコール(Qiagen社、ドイツヒルデン(Hilden)所在)を用いて全RNAを抽出した。第1鎖cDNAは、オリゴ-d(T)プライマー(Amersham Biosciences社、英国バッキンガム(Buckingham)所在)を用いて合成し、cDNA 1 µl、200 µM dNTP、10×反応緩衝液5 µl、ポリメラーゼ(BD-Advantage 2、BD Biosciences Clontech社、米国カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto)所在)1 U、及び適切なファミリーベースのセンスプライマー及びアンチセンスプライマー(500 nM)を含有する反応液50 µl中で、36サイクル(94 での変性15秒、65 でのアニーリング30秒、72 で30秒)を用いて、ヒト可変免疫グロブリン遺伝子をPCR増幅した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーは他に記載されている(31、42)。可変カップ軽鎖の増幅用には、センスプライマーが、MluIクローニング部位を導入するために、TACAGGATCCACGCGTA(配列番号1)という配列によって5'末端で伸長しており、アンチセンスプライマーが、NotI部位を導入するために、TGACAAGCTTGCGGCCGCG(配列番号2)という配列によって伸長している。可変重鎖増幅用には、センスプライマーがGAATAGGCCATGGCG(NcoI)(配列番号3)という配列によって伸長し、アンチセンスプライマーがCAGTCAAGCTT(HindIII部位)(配列番号4)という配列によって伸長している。アンチセンスプライマーは、それぞれ、CH1及び定常カップ領域の5'末端とアニールする。すべての増幅は、ファミリー特異的なセンスプライマーそれぞれに関して独立に行った。PCR産物をプールし、ゲル抽出(Qiagen社)、可変軽鎖用にはMluI/NotI(New England Biolabs社)で消化し、可変重鎖のクローニング用にはNcoI/HindIIIで消化した。消化の後、断片を再度ゲル精製し、-20 で保存した。

## 【0040】

## (実施例3)

## scFvライブラリーの構築

ファージミドベクターpSEX81-phOx(8)を、CIP存在下でMluI/NotIで消化し、0.7%アガロースゲル中で分離し、抽出した(Qiagen社、ドイツ所在)。消化されたベクター100 ngを、精製された可変軽鎖10 ngと、1 Uのリガーゼ(Roche社)を用いて、最終容積40 µl中、16 で終夜、連結した。プラスミドDNAをエタノールで沈殿させ、大腸菌(E.coli)株XL1-blue(Stratagene社)にエレクトロポレーションで導入し、細菌を1 mlのSOC培地(0.1 Mグルコースを含有するLB)中で1 h培養して回復させた。その後、細菌をSOBGATプレート(0.1 Mグルコース、100 µg/mlアンピシリン、12.5 µg/mlテトラサイクリン)上にプレティングし、37 で終夜インキュベートした。クローンを擦り取り、ベクターDNAを陰イオン交換クロマトグラフィーカラム(Macherey & Nagel社、ドイツ所在)で単離した。可変重鎖のクローニングには、HindIII/NcoI(New England Biolabs社)でベクターDNAを消化し、適切に消化されたVH鎖を連結し、XL-1 blueを形質転換させて、上述の通り培養した。独立したクローンを擦り取り、25%グリセリン中で80 に保存し、最終scFv-ライブラリーとした。

## 【0041】

## (実施例4)

## ファージディスプレイ選択

ファージに結合した抗体は、本質的にはSchierら、1996年による記載の通りにライブラリーから回収した(39)。パニングは、精製されたBabA(スウェーデンウメオ(Umea)大学口腔生物学科)5 µgで終夜、コーティングされたMaxisorb(登録商標)イムノチューブ(Immuntube)(Nunc社、ドイツヴィー

スバーデン (Wiebaden) 所在) 中で、4 で行い、2% MPBS (2% (w/v) 低脂肪乾燥スキムミルクを含有する PBS) でブロッキングした。BSA でコーティングされたチューブを陰性対照として用いた。選択には、4% の乳 (w/v) を含有する等容積の PBS を添加して、ファージ (1012 コロニー形成単位) をブロッキングし、チューブに添加し、定常的な回転の下、室温 (RT) で 2h インキュベートした。その後、この溶液を廃棄し、パニングの第 1 ラウンドにおいて、PBS でチューブを 10 回洗浄した。パニングのラウンドを進行させながら、PBS / 0.1% トウイン 20 で 10 回ボルテックスすることによって、洗浄のストリンジェンシーを増大させた。結合したファージは、5 分間、穏やかに攪拌しながら トリエチルアミン (0.1 M) 1 ml を添加し、Tris-HCl、pH 7.4 (1 M) 0.5 ml で中和して溶出した。中和された混合物を用いて、2YT (12.5 μg/ml テトラサイクリン) 中、37 で培養された 20 ml の指数期の大腸菌 XL1-blue を感染させた。振盪させずに 37 で 15 分間インキュベートした後、細菌を 45 分間振盪させ、SOBGAT-プレート (上記参照) 上にプレティングし、37 で終夜インキュベートした。記述した通りに細菌を採取し、0.4 の OD で、10 ml の LB 培地 (アンピシリン 100 μg/ml、0.1 M グルコース) に接種することによって、以降のパニングラウンド用のファージ産生を行った。本質的には Kochら、2000 年 (28) の記載通りに、ヘルパーファージゲノム又はファージミドゲノムを含有する溶出ファージの力価を、それぞれ LB カナマイシン (70 μg/ml) プレート又は LB アンピシリン (100 μg/ml) プレート上での cfu の力価測定によって決定した。選択手順中における特異的な結合体の濃縮は、BabA コーティングされたイムノチューブから溶出されたファージの数を、BSA コーティングされたイムノチューブから溶出されたファージの数で割ることによって決定した。

#### 【0042】

##### (実施例 5)

##### scFv-gIII 融合タンパク質を用いた ELISA スクリーニング

BabA 特異的な scFv は、ファージミドベクター中にコードされている pIII-タンパク質の発現を利用することによって、改変されてはいるが本質的に Merzmannら、1998 年 (32) による記載の通りにスクリーニングした。簡潔には、対数成長期にある細菌における scFv-gIII 融合タンパク質の産生を、IPTG (100 μM) によって 30 で 16h 誘導した。細菌を遠心処理し、ペレットを氷上のスフェロプラスト溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、20% ショ糖、1 mM EDTA) 中で 20 分間インキュベートし、その後、4 で、20000 g で 45 分間遠心処理した。周辺質抽出物に相当する上清を等容積の 4% MPBS で希釈し、ELISA アッセイで使用した。コーティング緩衝液 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>、pH 9.6) 中、4 において、ELISA ウェル (Nunc 社製マイクロタイタープレート、ドイツ所在) を 200 ng の BabA でコーティングした。2% MPBS でブロッキングした後、周辺質抽出物を添加し、RT で 4h インキュベートした。pIII に特異的なマウスモノクローナル抗体 (41); Mobitec 社、ドイツ所在) と共に RT で 1h インキュベートし、その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス抗体 (Dako 社、デンマーク所在) と共に RT で 1h インキュベートすることによって、抗原に結合した scFv-pIII 融合タンパク質を検出した。発色は、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、Merck 社、ドイツ所在) で、基質緩衝液 (100 mM 酢酸ナトリウム/クエン酸、pH 4.9 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.004%) 中で行った。陰性結合対照として、2-フェニルオキサゾロン (抗 phOx) (31) scFv を、同一のファージミドベクターで発現させ、phOx 結合 BSA コーティングされた ELISA を用いてこの scFv の発現を分析した。

#### 【0043】

##### (実施例 6)

##### 原核細胞発現ベクター pOPE101 へのサブクローニング

ファージミドベクター pSEX81 由来の scFv 発現カセット全体を、NcoI 部位

10

20

30

40

50

及びNotI部位で、原核細胞発現ベクターpOPE101 (Genbank番号Y14585) にサブクローニングした (このクローンは、pOPE101 - Abba3と命名され、ブダペスト条約の下、DSMZ - ドイツ微生物菌株保存機構 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、ドイツブラウンシュバイク (Braunschweig) 所在) に受託され、受託番号DSM19101及び受託日2007年2月28日を付与された)。C末端mycタグ及び(His)6タグによって、それぞれ、検出及びIMAC精製が可能となる。細胞膜周辺腔からの精製は、Breitlingら、2001年(9)による記載の通りに行った。

#### 【0044】

(実施例7)

##### イムノプロット

scFv - ライブラリーの品質管理には、IPTGで誘導された単一コロニー細菌から得られた周辺質抽出物10 $\mu$ lを12% SDS NuPage (登録商標) ビストリスゲル (Invitrogen社、米国カリフォルニア州所在) で分離した。分離されたタンパク質を、2% MPBS (2% 低脂肪乾燥スキムミルクを含有するPBS) でブロッキングされたImmobilon (商標) PVDF膜 (Millipore社、米国マサチューセッツ州ベッドフォード (Bedford) 所在) に転写し、抗gIII mAb (MobiTec社、ドイツゲッティンゲン (Göttingen) 所在) と、それに続く、AP結合ウサギ抗マウス (Fab) 2Ab (Sigma - Aldrich社、ドイツ) 及び基質とを用いて可視化した。機能的結合分析には、BabA又は再懸濁されてOD0.6にPBSで調整された変動的な量のピロリ細菌を、1容積のSDS - 試料緩衝液 (62mM Tris - HCl、pH6.8、25% グリセロール、2% SDS、プロモフェノールブルー) 中に可溶化し、37 $^{\circ}$ Cで10分間加熱するか (Ilverら、1998年に従った)、1容積のメルカプトエタノール (5%) (又は追加の3% SDS) を含有するSDS - 試料緩衝液中に再懸濁し、96 $^{\circ}$ Cで加熱した。試料をSDS - PAGEにかけ、分離されたタンパク質をHybond (商標) - ECLニトロセルロース膜 (Amersham Biosciences社) に転写した。この膜を2% M - PBSでブロッキングし、IMAC精製されたscFv - Abba3 (PBS中に希釈されている) 又はAbba3 - Ab (T - PBS 0.05% 中に6 $\mu$ g/ml) を添加して、4 $^{\circ}$ Cで終夜置いた。結合したscFvの検出は、ビオチン化されたマウス抗myc mAb 9E10と共に膜をインキュベートし、その後、ストレプトアビジン - HRP結合体と共にインキュベートすることによって行った。結合したAbba3 - 抗体は、T - PBS 0.05% 中に1:3000に希釈されたHRP結合抗ヒトIgG Ab (Dako社、デンマーク所在) と共にインキュベートすることによって検出した。各抗体インキュベーションステップの後に、T - PBS 0.05% で膜を4回洗浄した。可視化は、製造業者のプロトコルに従って、ECL plus ウェスタンブロッティング検出システムキット (Amersham Biosciences社) で行った。

#### 【0045】

(実施例8)

##### 完全ヒト抗体の産生

可変領域は、ヒトIgG1重鎖及びヒトカッパ鎖の定常領域をそれぞれ保持する昆虫細胞発現ベクターであるpMThIgG1 - V (24) にクローニングした。PCR増幅は、VL鎖用のプライマーである

10

20

30

40

## 【化 1】

VL 5' SfiI, TTA<sub>2</sub>CTCGCCTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTGGGCGACAT  
CCAGATGACCCAGTC (SEQ ID NO:5);

VL 3' BsiWI, AGCGTACGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCC (SEQ ID NO:6);

と、VH鎖用である

## 【化 2】

10

VH5' SnaBI, GATGTCTACGTAGGCCTCTCGCTGGGCCAGGTGCAGCTGGTCCAGTC;  
(SEQ ID NO:7);

VH 3' ApaI, ACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCGGAGGAGACGGCGACCAGGG  
(SEQ ID NO:8);

とを用いて行った。PCR増幅は、鋳型として100ngのファージミドベクター、それぞれ25pmolのVL及びVHプライマー対、2μM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、並びに10UのTaqポリメラーゼ(Promega社)を用いて行った。94で2分間の初期変性ステップの後に、以下の通り、すなわち94で15秒間、62で30秒、72で30秒を32サイクル行い、最終の1伸長ステップを72で5分間行った。PCR産物をQiagen社製PCR精製キット(ドイツヒルデン所在)で精製し、適切な制限酵素で消化した後、クローニングした。抗体を安定して分泌するS2細胞系(Invitrogen社、米国所在)を、以前の記載の通りに確立し、プロテインGカラム(Amersham Pharmacia社、スウェーデンウプサラ(Uppsala)所在)を用いて、培地中の抗体を精製及び濃縮した。精製された抗体の純度及び機能性は、それぞれクマシー染色及びELISAによって分析した。

20

## 【0046】

30

(実施例9)

抗体断片を発現する乳酸菌の産生

Abba3抗体の可変領域(VH及びVL)に由来するscFvコード遺伝子は、センスプライマーとして、

5' ClaI-ABBA3(TTTGCATCGATCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG)(配列番号9)というプライマーと、アンチセンスプライマーとして、

## 【化 3】

Vk-mycXhoI

(ACCCCTCGAGGGATAGATCTTCTTCTGAGATCAGCTTTTGTTTCAGTTCGTTTGAT  
TTCCACCTTGGT)(SEQ ID NO:10); 又は Vk-myc-STOP-XhoI

40

(ACCCCTCGAGTTAGGATAGATCTTCTTCTGAGATCAGCTTTTGTTTCAGTTCGTT  
TGATTTCCACCTTGGT)(SEQ ID NO:11);

とを用いて、それぞれベクターpLP502-1及びpLP502-2にクローニングするために、PCRによって増幅した。このシャトルベクターは、大腸菌(Escherichia coli)及びラクトバシラス両方の複製開始点と、それらのクローニング部位の上流にラクトバシラス特異的な調節配列及びプロモーターとを含有しているので、大

50

腸菌におけるクローニング及び増殖と、ラクトバシラスにおける発現とを可能にする。ベクター pLP502-1では、ラクトバシラス膜タンパク質遺伝子である prt p への融合体として、scFv 発現カセットがクローニングされており、これが細胞表面での scFv カセットの発現を媒介している。ベクター pLP502-2は、scFv 配列後の終止シグナルの存在により、細菌細胞外への scFv の分泌を可能にしている。ScFv 発現は、同時発現される myc - タグに対するモノクローナル抗体と AP 結合抗マウス検出用抗体とを用いて、イムノプロットングによって、又はカセイ菌 (*Lactobacillus casei*) (ATCC 293) 形質転換株の可溶性 ELISA アッセイによって分析した。

【0047】

(実施例 10)

改変乳酸菌を用いた経口ワクチンの産生及び使用

実施例 9 の修正乳酸菌株を、当業界で知られている通りに培養、採取、及び凍結乾燥し、その後、1グラムあたりの少なくとも  $10^4 \sim 10^7$  CFU の範囲の量で、標準的な硬ゼラチンカプセル内に充填する。そのようなカプセルを、ピロリ菌に感染していることが判っている患者群に 1 週間与える。この期間の後に、標準法又は本明細書に記載の方法を用いて、ピロリ菌感染に関して患者を再分析し、数人の患者で感染が消失又は軽減していることを示す。

【0048】

(実施例 11)

ピロリ菌株上での ELISA 結合

ピロリ菌の臨床分離株に結合する能力に関して、抗体 - Abba3 を試験した。株は、10%ウシ血液及び 1% Iso Vitox (Svenska LABFAB 社、スウェーデンユスネ (Ljusne) 所在) を補足したブルセラ寒天培地上で、10%CO<sub>2</sub> 及び 5%O<sub>2</sub> の下に 37 °C で 40 ~ 45 時間培養した。細菌を擦り取り、PBS 中に懸濁し、4000g で遠心処理し、ペレットを PBS 中に再懸濁することによって、2 回洗浄した。光学濃度を 0.6 の OD<sub>600nm</sub> に調整し、100 µl を用いて 96 ウェル Maxi sorb (登録商標) ELISA プレート (Nunc 社、デンマーク所在) の個々のウェルをコーティングした。4 °C で終夜インキュベートした後、2% M-PBS でプレートをブロッキングし、T-PBS (PBS、0.05% トウイン 20) 中に希釈された抗体を添加して、4 °C で終夜置いた。抗体の検出は、AP 結合抗ヒト IgG (Dako 社、デンマーク所在) を RT で 1 時間インキュベートし、その後、1 mg/ml で 4 - ニトロフェニルリン酸 (Sigma - Aldrich 社、ドイツ所在) を添加することによって行った。40 分間の発色の後、吸光度を 405 nm で測定した。ルイス b 結合アッセイには、ピロリ菌コーティングされた ELISA プレートのウェルに、ビオチン化された HS A ルイス b 複合糖質 (Iso sep. 社、スウェーデントゥリンゲ (Tullinge) 所在) を添加した (0.115 µg/ml、4 °C で終夜)。結合した複合糖質は、AP 結合ストレプトアビジンの 1 : 2000 希釈液と共に RT で 45 分間インキュベートすることによって検出した。ウェルを T-PBS 0.05% で 4 回洗浄し、その後、1 mg/ml の 4 - ニトロフェニルリン酸 (Sigma - Aldrich 社、ドイツ所在) を添加した 10 分後に、405 nm の色の吸光を測定した。

【0049】

(実施例 12)

BabA のヌクレオチド配列分析

株を上述の通りに培養し、コロニーをプレートから擦り取り、洗浄し、PBS 中に OD<sub>1</sub> の光学濃度に再懸濁した。この懸濁液のうち 1 ml を用いて、製造業者の指示に従って (Qiagen 社、ドイツ所在) ゲノム DNA を単離した。鋳型である 4 µl の細菌ゲノム DNA、及び順方向プライマー babA2-271 (4) (5' - ATCCAAAAGGAGAAAACATGAAA - 3') (配列番号 12) / babA2-リーダー (5' - GCTTTTAGTTTCCACTTTGAG - 3') (配列番号 13) のいずれ

10

20

30

40

50

れかひとつと、逆方向プライマー J 1 1 R ( 5 ' - T G T G T G C C A C T A G T G C C A G C - 3 ' ) ( 配列番号 1 4 ) 又は A 2 6 R ( 5 ' - T T G C T C C A C A T A G G C G C A - 3 ' ) ( 配列番号 1 5 ) のひとつとの組合せを使用し、第 1 ヌクレオチドからヌクレオチド約 1 2 0 0 までをカバーする B a b A 断片を P C R によって増幅した。P C R 断片を T - ベクター中に連結し、T 7 プロモーター特異的プライマー及び S P 6 プロモーター特異的プライマーで配列決定した。

#### 【 0 0 5 0 】

( 実施例 1 3 )

##### 配列決定及び D N A 分析

ヌクレオチド配列は、B i g D y e ( 登録商標 ) ターミネーターサイクル配列決定キット ( A p p l i e d B i o s y s t e m s 社、米国カリフォルニア州フォスターシティ所在 ) を用いて S a n g e r のジデオキシ鎖終止法で決定するか、又は M W G - B i o t e c h A G 社、ドイツエーバースベルク ( E b e r s b e r g ) 所在のサービスを用いて決定した。ヒト V - D - J セグメントの I g G 生殖系列配列は、ウェブサイト <http://imgt.cines.fr> を用いて決定した。構築及び配列分析は、ベクター N T I 1 0 プログラム ( I n v i t r o g e n 社、米国カリフォルニア州所在 ) を用いて行った。

10

#### 【 0 0 5 1 】

( 実施例 1 4 )

##### 事前免疫電子顕微鏡 ( p - i E M )

ピロリ菌株 1 7 8 7 5 / L e b 及び D M ( B a b A 2 及び B a b A の二重ノックアウト ) を上述の通り培養し、プレートから擦り取り、再懸濁し、P B S 中に 1 の O D 6 0 0 n m に調整した。2 % ウシ血清アルブミン ( B S A 画分 V ) を含む 0 . 1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 ( c a c o ) 中に、各株のアリコートをして 1 5 分間再懸濁した。その後、細菌を遠心処理し、0 . 1 M c a c o + 0 . 1 % B S A 中に ( 1 + 1 ) に希釈された 1 次ヒト抗体 A b b a 3 又は同じアイソタイプの無関係なヒト抗 C 型肝炎ウイルス抗体 ( H C V ) と共に再懸濁し、6 0 分間インキュベートした。インキュベーションの後、0 . 1 M c a c o + 0 . 1 % B S A 中で細菌を 2 回洗浄し、1 0 n m 金粒子 ( A m e r s h a m 社、英国所在 ) に結合したプロテイン A を含有する同一の緩衝液中に再懸濁し、4 5 分間インキュベートした。インキュベーションは、グルタルアルデヒドを最終濃度 1 % まで添加することによって終了させた。この試料を 4 で終夜固定した。その後、細菌を遠心処理してペレットにし、他 ( 1 7 ) に記載されている通り、従来の電子顕微鏡用に包埋し、T e c n a i ( 商標 ) 1 0 透過電子顕微鏡 ( F e i 社、オランダ所在 ) で 8 0 k V で検査し、M e g a v i e w I I I カメラ ( A n a l y S i S 社、ドイツミュンスター所在 ) によってデジタル画像を収集した。

20

30

#### 【 0 0 5 2 】

( 実施例 1 5 )

##### 直接免疫電子顕微鏡法 ( d - i E M )

包埋の前に、ペレットの少量のアリコートを取り、蒸留水中に再懸濁した。少量の液滴 ( 3  $\mu$  l ) をホルムバルコーティングされたグリッド上に置き、5 分間付着させた。過剰な水を濾紙で除去し、グリッドを 5 分間空気乾燥させ、T e c n a i ( 商標 ) 1 0 電子顕微鏡で 1 0 0 k V で検査し、画像を写真フィルムに記録した。

40

#### 【 0 0 5 3 】

( 実施例 1 6 )

ピロリ菌又は B a b A を検出するための i n v i t r o 診断使用のためのイムノアッセイ

i n v i t r o 診断使用には、糞便試料中の病原因子のひとつとして、ピロリ菌又は B a b A を定量測定するための酵素イムノアッセイとして A b b a 3 を使用することができる。この試験では、サンドイッチ型の方法で、特異的抗体によってピロリ菌を捕捉する。すなわち、ポリクローナル抗ヘリコバクター ( H e l i c o b a c t e r ) 血清をマイ

50

クローエルプレートのウェルに固定し、ブロッキング及びPBSでの洗浄ステップの後に、当技術分野で知られている通り、検査する糞便試料の懸濁液及び対照をインキュベーション用に常温でピペティングする。結合した細菌の検出は、酵素（例えばペルオキシダーゼ）に結合したAbba3抗体を室温でマイクロエルプレートに添加し、その後、さらなる洗浄ステップを行い、基質を添加して発色させることによって行う。消衰は、試料中に存在しているピロリ菌の濃度に比例する。

【0054】

（実施例17）

試験キットの生産

イムノアッセイ技法を用いたキットは、抗原と対応する抗体、例えばAbba3との間の特異的な結合作用に依存しており、標本中の病原体、この場合は糞便試料中のピロリ菌の存在（又は不在）を判定するための信頼できる方法であることが立証されている。

10

【0055】

イムノクロマトグラフィ検査（ICT）装置として知られているクラスの装置は、抗体に結合した標識と組み合わせたイムノアッセイ技法を使用するもので、現在、特定の分析物の存在又は不在を判定するための、迅速かつ信頼できる現地試験に一般的に用いられている。この標識は、次に特定の限定された領域内に共に集められる抗体/抗原分子に結合した場合、ヒトの裸眼によって、又は使用される標識のタイプに応じた走査装置によって容易に検出できるようになる。一般的には、この標識は、ラテックス、金若しくは炭素の粒子、放射性粒子、磁性粒子であるか、特定の確定された領域にそれが固定又は誘引されることを可能にする他の物理的若しくは化学的特性を有するものでありうる。サンドイッチ技法を用いたICT装置は、使用するのがとりわけ容易である。この技法を用いる場合、アッセイする特定の抗原に結合する標識抗体を、特定の抗原を含有していると思われる試料と混合する。試料中に抗原が存在している場合には、標識抗体が抗原と結合して、標識-抗体-抗原複合体を形成させる。試験ゾーンに不動に固定され、かつ上記特異的抗原にも結合する2次抗体が、試験ゾーンで、この標識-抗体-抗原複合体に結合する。陽性の結果は、試験ゾーンに標識が蓄積することによって可視化される。そのような装置は、標準的製品であり、容易に利用可能であり、経済的であり、かつ未熟練作業員によっても使用できる。

20

【0056】

（実施例18）

AbbaVH及びAbbaVLの配列

本明細書には、AbbaVH（配列番号16）及びAbbaVL（配列番号17）のヌクレオチド配列、並びにAbbaVH（配列番号18）及びAbbaVL（配列番号19）のアミノ酸配列を示す配列表が添付されている。

30

【0057】

（参考文献）

1. **Achtman, M., T. Azuma, D. E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z. J. Pan, S. Suerbaum, S. A. Thompson, A. van der Ende, and L. J. van Doorn.** 1999. 様々な地理領域から得られたピロリ菌内の組換え及びクローン群分類 (Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions.) *Mol Microbiol* **32**:459-470.
2. **Alm, R. A., J. Bina, B. M. Andrews, P. Doig, R. E. Hancock, and T. J. Trust.** 2000. ピロリ菌の比較ゲノミクス：外膜タンパク質ファミリーの分析 (Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families.) *Infect Immun* **68**:4155-4168.
3. **Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and Trust.** 1999. 2株の無関係なヒト胃病原ピロリ菌単離株のゲノム配列比較 (Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.) *Nature* **397**:176-180. 10
4. **Aspholm-Hurtig, M., G. Dailide, M. Lahmann, A. Kalia, D. Ilver, N. Roche, S. Vikstrom, R. Sjostrom, S. Linden, A. Backstrom, C. Lundberg, A. Arnqvist, J. Mahdavi, U. J. Nilsson, B. Velapatino, R. H. Gilman, M. Gerhard, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, T. Nakazawa, J. G. Fox, P. Correa, M. G. Dominguez-Bello, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, S. Normark, I. Carlstedt, S. Oscarson, S. Teneberg, D. E. Berg, and T. Boren.** 2004. ピロリ菌ABO血液型抗原結合アドヘシンBabAの機能適応 (Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin.) *Science* **305**:519-522. 20
5. **Backstrom, A., C. Lundberg, D. Kersulyte, D. E. Berg, T. Boren, and A. Arnqvist.** 2004. ピロリ菌babアドヘシン遺伝子の準安定性及びルイスb抗原結合の動態 (Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding.) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16923-16928.
6. **Blaser, M. J., and D. E. Berg.** 2001. ピロリ菌遺伝子の多様性及びヒト疾患の危険性 (*Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease.) *J Clin Invest* **107**:767-773. 30
7. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. 血液型抗原によって媒介された、ヒト胃上皮へのピロリ菌の結合 (Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens.) *Science* **262**:1892-1895.
8. **Breitling, F., S. Dubel, T. Seehaus, I. Klewinghaus, and M. Little.** 1991. 抗体スクリーニング用の表面発現ベクター (A surface expression vector for antibody screening.) *Gene* **104**:147-153.
9. **Breitling, F., Moosmayer, D., Brocks, B., Dubel, S.** 2001. 2ステップクローニングによる、ハイブリドーマからのscFvの構築 (Constuction of scFv from hybridoma by two-step cloning.) *Antibody Engineering* ISDN 3-540-41354-5:41-55. 40
10. **Cao, J., Y. Sun, T. Berglinth, B. Mellgard, Z. Li, B. Mardh, and S. Mardh.** 2000. 繊維状M13ファージ上に発現されたピロリ菌抗原結合断片は細菌増殖を阻止する (*Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth.) *Biochim Biophys Acta* **1474**:107-113.

11. **Casswall, T. H., H. O. Nilsson, L. Bjorck, S. Sjostedt, L. Xu, C. K. Nord, T. Boren, T. Wadstrom, and L. Hammarstrom.** 2002. 経口免疫療法用のウシ抗ピロリ菌抗体 (Bovine anti-*Helicobacter pylori* antibodies for oral immunotherapy.) *Scand J Gastroenterol* 37:1380-1385.
12. **Colbeck, J. C., L. M. Hansen, J. M. Fong, and J. V. Solnick.** 2006. ピロリ菌臨床分離株における外膜タンパク質 BabA 及び BabB の遺伝子型 プロフィール (Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*.) *Infect Immun* 74:4375-4378.
13. **Dubel, S., F. Breitling, P. Fuchs, M. Braunagel, I. Klewinghaus, and M. Little.** 1993. 表面ディスプレイ及び抗体産生用ベクターのファミリー (A family of vectors for surface display and production of antibodies.) *Gene* 128:97-101. 10
14. **Dubel, S., F. Breitling, I. Klewinghaus, and M. Little.** 1992. 大腸菌における組換え抗体の調節性分泌及び精製 (Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in *E. coli*.) *Cell Biophys* 21:69-79.
15. **Falush, D., C. Kraft, N. S. Taylor, P. Correa, J. G. Fox, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2001. ピロリ菌による長期胃内コロニー形成中の組換え及び変異: クロック速度、組換えサイズ及び最低齢の推定 (Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age.) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15056-15061. 20
16. **Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Mielhke, M. Classen, and C. Prinz.** 1999. 血液型抗原結合アドヘシンのピロリ菌遺伝子の臨床的重要性 (Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin.) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12778-12783.
17. **Gross, N. T., K. Hultenby, S. Mengarelli, P. Camner, and C. Jarstrand.** 2000. クリプトコックス・ネオフォルマンズ、カンジダ・アルビカンス又はアスペルギルス・フミガーツスに攻撃された肺胞マクロファージによる脂質過酸化 (Lipid peroxidation by alveolar macrophages challenged with *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* or *Aspergillus fumigatus*.) *Med Mycol* 38:443-449. 30
18. **Gustafsson, A., A. Hultberg, R. Sjostrom, I. Kaeskovics, M. E. Breimer, T. Boren, L. Hammarstrom, and J. Holgersson.** 2006. ブタ乳を用いた、ピロリ菌コロニー形成の糖依存性阻害 (Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonization using porcine milk.) *Glycobiology* 16:1-10.
19. **Haas, G., G. Karaali, K. Ebermayer, W. G. Metzger, S. Lamer, U. Zimny-Arndt, S. Diescher, U. B. Goebel, K. Vogt, A. B. Roznowski, B. J. Wiedenmann, T. F. Meyer, T. Aebischer, and P. R. Jungblut.** 2002. ピロリ菌感染及び胃疾患との関係に関するイムノプロテオミクス (Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease.) *Proteomics* 2:313-324. 40
20. **Hennig, E. E., J. M. Allen, and T. L. Cover.** 2006. ピロリ菌における babA 遺伝子の多重染色体遺伝子座 (Multiple chromosomal loci for the babA gene in *Helicobacter pylori*.) *Infect Immun* 74:3046-3051. 50

21. Hennig, E. E., R. Mernaugh, J. Edl, P. Cao, and T. L. Cover. 2004. ピロリ菌株間における外膜タンパク質BabAの発現の不均一性 (Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA.) *Infect Immun* **72**:3429-3435.
22. Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren. 1998. 再タグ付けによって明らかにされた、フコシル化された組織血液型抗原へのピロリ菌アドヘシンの結合 (*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.) *Science* **279**:373-377.
23. Johansson, D. X., K. Drakenberg, K. H. Hopmann, A. Schmidt, F. Yari, J. Hinkula, and M. A. Persson. 2007. ショウジョウバエS2細胞における組換えヒトモノクローナル抗体の効率的発現 (Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells.) *J Immunol Methods* **318**:37-46. 10
24. Johansson, D. X., Drakenberg, J. K., Hopmann, K.H., Schmidt, A., Yari, F., Hinkula, J. and Persson M.AA. 2006. ショウジョウバエS2細胞における組換えヒトモノクローナル抗体の効率的発現 (Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *drosophila* S2 cells.) *J Immunol Methods*.
25. Keenan, J., S. Neal, R. Allardyce, and J. Roake. 2002. ピロリ菌感染に対する保護機構としての、血清由来IgG1に媒介された免疫排除 (Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection.) *Vaccine* **20**: 2981-2988. 20
26. Kim, S. Y., C. W. Woo, Y. M. Lee, B. R. Son, J. W. Kim, H. B. Chae, S. J. Youn, and S. M. Park. 2001. 韓国人患者からのピロリ菌単離株のCagA、VacAサブタイプ、IceA1及びBabA遺伝子型決定、並びに胃十二指腸疾患とのそれらの関連性 (Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases.) *J Korean Med Sci* **16**:579-584.
27. Kimmel, B., A. Bosserhoff, R. Frank, R. Gross, W. Goebel, and D. Beier. 2000. ピロリ菌からの免疫優性抗原の同定及び様々な胃十二指腸病態を有する患者からの血清とのそれらの反応性の評価 (Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies.) *Infect Immun* **68**:915-920. 30
28. Koch, J., F. Breitling, and S. Dubel. 2000. ニトロセルロースフィルター上における、繊維状バクテリオファージ (M13) の多重試料の迅速力価測定 (Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters.) *Biotechniques* **29**:1196-1198, 2002.
29. Kowalski, M., M. Pawlik, J. W. Konturek, and S. J. Konturek. 2006. 冠状動脈心疾患におけるピロリ菌感染 (*Helicobacter pylori* infection in coronary heart disease.) *J Physiol Pharmacol* **57**:101-111. 40
30. Kruger, C., Y. Hu, Q. Pan, H. Marcotte, A. Hultberg, D. Delwar, P. J. van Dalen, P. H. Pouwels, R. J. Leer, C. G. Kelly, C. van Dollenweerd, J. K. Ma, and L. Hammarstrom. 2002. 一本鎖抗体を産生する乳酸菌による受動免疫のin situ送達 (In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies.) *Nat Biotechnol* **20**:702-706.

31. **Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, and G. Winter.** 1991. 免疫感作のバイパス。ファージ表面にディスプレイされたV遺伝子ライブラリーに由来するヒト抗体 (By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.) *J Mol Biol* **222**:581-597.
32. **Mersmann, M., A. Schmidt, M. Tesar, A. Schoneberg, M. Welschof, S. Kipriyanov, P. Terness, M. Little, K. Pfizenmaier, and D. Moosmayer.** 1998. マイクロタイタースケールのアッセイにおけるscFvpIII融合タンパク質の検出を用いた、ファージディスプレイによって選択されたscFvのモニタリング (Monitoring of scFv selected by phage display using detection of scFvpIII fusion proteins in a microtiter scale assay.) *J Immunol Methods* **220**:51-58. 10
33. **Mizushima, T., T. Sugiyama, Y. Komatsu, J. Ishizuka, M. Kato, and M. Asaka.** 2001. 日本の臨床分離株におけるピロリ菌babA2遺伝子型の臨床的重要性 (Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates.) *J Clin Microbiol* **39**: 2463-2465.
34. **Peck, B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt, and B. Knapp.** 1999. ピロリ菌の結合に関与するタンパク質であるHopZの保存、局在及び発現 (Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*.) *Nucleic Acids Res* **27**: 3325-3333. 20
35. **Pride, D. T., R. J. Meinersmann, and M. J. Blaser.** 2001. ピロリ菌babA及びbabB内の対立遺伝子変異 (Allelic Variation within *Helicobacter pylori* babA and babB.) *Infect Immun* **69**:1160-1171.
36. **Prinz, C., N. Hafsi, and P. Volland.** 2003. ピロリ菌病原因子と宿主免疫応答: 治療用ワクチン接種への示唆 (*Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination.) *Trends Microbiol* **11**:134-138.
37. **Rhen, M., S. Eriksson, M. Clements, S. Bergstrom, and S. J. Normark.** 2003. 持続細菌感染の基礎 (The basis of persistent bacterial infections.) *Trends Microbiol* **11**:80-86. 30
38. **Rondot, S., J. Koch, F. Breitling, and S. Dubel.** 2001. ファージディスプレイにおける一本鎖抗体の提示を改善するヘルパーファージ (A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display.) *Nat Biotechnol* **19**:75-78.
39. **Schier, R., J. Bye, G. Apell, A. McCall, G. P. Adams, M. Malmqvist, L. M. Weiner, and J. D. Marks.** 1996. 親和性主導の選択を用いた高親和性単量体ヒト抗c-erbB-2単鎖Fvの単離 (Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection.) *J Mol Biol* **255**:28-43. 40
40. **Solnick, J. V., L. M. Hansen, N. R. Salama, J. K. Boonjakuakul, and M. Syvanen.** 2004. アカゲザルの実験感染中におけるピロリ菌外膜タンパク質発現の変化 (Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques.) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2106-2111.

41. **Tesar, M., C. Beckmann, P. Rottgen, B. Haase, U. Faude, and K. N. Timmis.** 1995. 線維状ファージのpIIIに対するモノクローナル抗体：ファージディスプレイシステムでのpIII融合タンパク質発現を研究する免疫学的ツール ( Monoclonal antibody against pIII of filamentous phage: an immunological tool to study pIII fusion protein expression in phage display systems. ) *Immunotechnology* **1**:53-64.
42. **Welschof, M., P. Terness, F. Kolbinger, M. Zewe, S. Dubel, H. Dorsam, C. Hain, M. Finger, M. Jung, G. Moldenhauer, and et al.** 1995. 再編成されたヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変領域遺伝子を増幅するための、アミノ酸配列ベースのPCRプライマー ( Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. ) *J Immunol Methods* **179**:203-214. 10
43. **Xu, H. T., Y. F. Zhao, Z. X. Lian, B. L. Fan, Z. H. Zhao, S. Y. Yu, Y. P. Dai, L. L. Wang, H. L. Niu, N. Li, L. Hammarstrom, T. Boren, and R. Sjostrom.** 2004. ルイスb抗原へのピロリ菌の結合に対する、ヤギ及びマウスのフコシル化乳の影響 ( Effects of fucosylated milk of goat and mouse on *Helicobacter pylori* binding to Lewis b antigen. ) *World J Gastroenterol* **10**:2063-2066.
44. **Yamaoka, Y., J. Soucek, S. Odenbreit, R. Haas, A. Arnqvist, T. Boren, T. Kodama, M. S. Osato, O. Gutierrez, J. G. Kim, and D. Y. Graham.** 2002. ピロリ菌の推定病原性因子に基づいた、十二指腸潰瘍の症例と胃炎の症例との間の識別 ( Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. ) *J Clin Microbiol* **40**:2244-2246. 20

【 0 0 5 8 】

【表 1 - 1】

0-1	様式 <b>PCT/RO/134 (SAFE)</b> 寄託された微生物又はその他の 生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)		
0-1-1	作成に使用したソフトウェア	PCTオンライン出願 バージョン <b>3.5.000.193 MT/FOP</b> <b>20020701/0.20.5.9</b>	
0-2	国際出願番号		10
0-3	出願人又は代理人の書類記号	<b>211212</b>	
1	寄託された微生物又は生体材料 に関する下記の表示は、 明細書中の下記の記載と 関連している。		
1-1	頁	<b>16</b>	
1-2	行	<b>24</b>	
1-3	寄託物の識別表示		20
1-3-1	寄託機関の名称	<b>DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH</b> DSMZ-ドイツ微生物菌株保存機構	
1-3-2	寄託機関のあて名	<b>Mascheroder Weg 1b, D-38124</b> マツシェローダーバーク 1b, D-38124 <b>Braunschweig, Germany</b>	
1-3-3	寄託の日付	ブラウンシュバイク、ドイツ 2007年2月28日 (28. 02. 2007)	
1-3-4	受託番号	<b>DSMZ 19101</b>	
1-5	表示を行うための指定国	すべての指定国	30
2	寄託された微生物又は生体材料 に関する下記の表示は、 明細書中の下記の記載と 関連している。		
2-1	頁	<b>16</b>	
2-2	行	<b>24</b>	
2-3	寄託物の識別表示		40
2-3-1	寄託機関の名称	<b>DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH</b> DSMZ-ドイツ微生物菌株保存機構	
2-3-2	寄託機関のあて名	<b>Mascheroder Weg 1b, D-38124</b> マツシェローダーバーク 1b, D-38124 <b>Braunschweig, Germany</b>	
2-3-3	寄託の日付	ブラウンシュバイク、ドイツ 2007年2月28日 (28. 02. 2007)	
2-3-4	受託番号	<b>DSMZ 19101</b>	
2-5	表示を行うための指定国	すべての指定国	

【表 1 - 2】

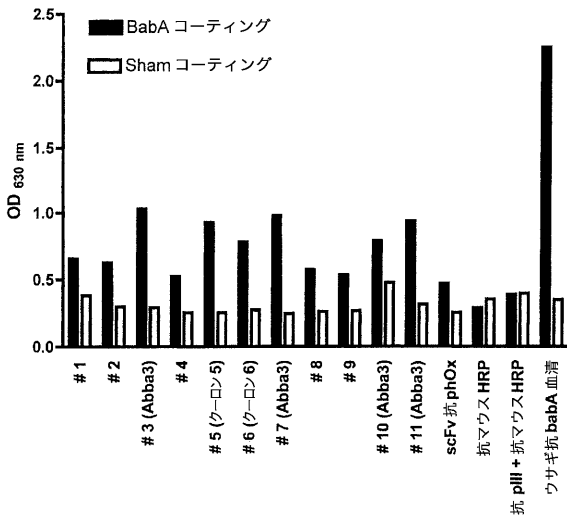
受理官庁専用

0-4	この様式は国際出願で 受理した： (はい/いいえ)	はい
0-4-1	担当官	Marie Gvseff

国際事務局専用

0-5	この様式は国際事務局により 受理された	
0-5-1	担当官	

【図 1】



【図 2 - 1】

(a) VH 領域

```

1       FR1      26   CDR1   39       FR2   55       CDR2
IGHV3-48*3  EVQLVPSGGSLVQPGGSLRLSCAAS  GFTFSSEYF  MNWVRQAPGKLEWVS  Y  ISSSGSTI
Abba3 -VH   Q-----IG-----A-E-----NLF-  A-----QS--VI--  -G-----T
クローン56-VH  Q-----IG-----A-E-----NLF-  A-----QS--VI--  -G-----T
クローン64-VH  Q-----Q--AW-----A-----EV-  --P-NL--  I-----IA--  -G-----TLM

66       FR3      104   CDR3
IGHV1-18*01  YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYIQMNSLRADTAVYIC  AR.....
Abba3 -VH   R-----IV-----DKE-MF--L-S--VD--T-F-  --LNGWAGSGLDH  WGQGTIVAVSS
クローン56-VH  R-----IV-----DKE-MF--L-S--VD--T-F-  --LNGWAGSGLDH  WGQGTIVAVSS
クローン64-VH  K-----L-V-----S-----HL--FEV-----I-----  --FNGWSSGSLDY  WGQGTIVSVSS

1       FR1      26   CDR1   39       FR2   55       CDR2
IGHV1-18*01  QVQLVQSGAEVAKPGASVKYSCKAS  GYFTFSYC  ISWVRQAPGQGLEWVGW  ISAYNGVF
クローン5-VH  Q-----T-----T-----D-KAH-  M-----P-----  --GN-Y-

66       FR3      104   CDR3
IGHV1-18*01  NYAQKIQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYIC  AR.....
クローン5-VH  T---SVR---V-----T-V-----KN-----F-  --DQGSRFGEILLDY  WGQGTIVSVSS

```

【 図 2 - 2 】

(b) VL 領域

```

1      FR1      26  CDR1  39  FR2      55  CDR2
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAS QSISSY LNWYQKPKGKPKLLIY AAS
IGKV1-39*01
Abba3 -VL
クローン6 -VL
クローンC5-VL
-V-----Q-----D--N-----
65      FR3      104  CDR3  114  FR4      C-カッパ
SLQSGVPSRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYIC QQSYSTP...
IGKV1-39*01
Abba3 -VL
クローン6 -VL
クローンC5-VL
-----G-----LWT FGQGTVEIK RTVAAPS
-----P-LT FGQGTVEIK RTVAAPS
-----LT FGQGTVEIK RTVAAPS

1      FR1      26  CDR1  39  FR2      55  CDR2
DVTMTQSPISLPVTLGQPASISCRSS QSLVYSDGNTY LNWYQKPKGKPKLLIY KVS
IGKV2-30-1
クローン5 -VL
-----S-----G--L--N-----A-----R--
65      FR3      104  CDR3  114  FR4      C-カッパ
NRDSGVPSRFSGSGGTFTLTKISRVEAEADVGYIC MQGTHTP...
IGKV2-30-1
クローン5 -VL
-----WT FGQGTVEIK RTVAAPS

```

【 図 4 】

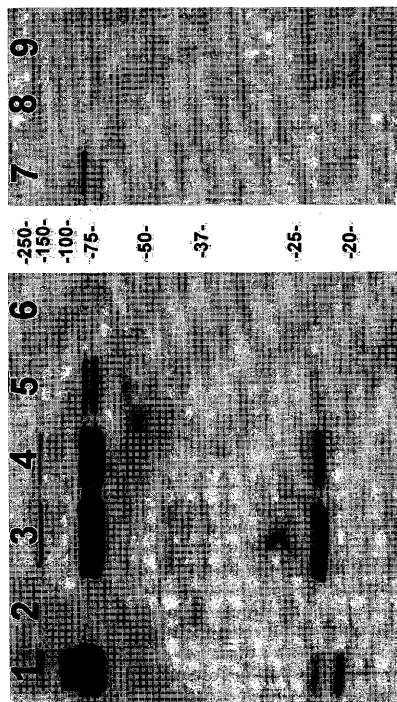
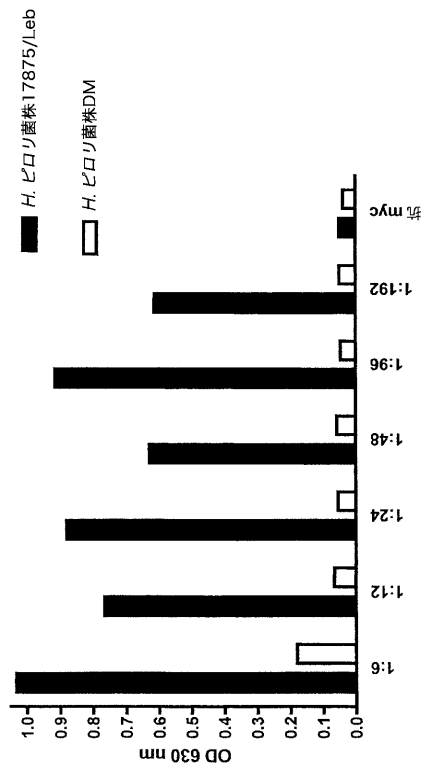
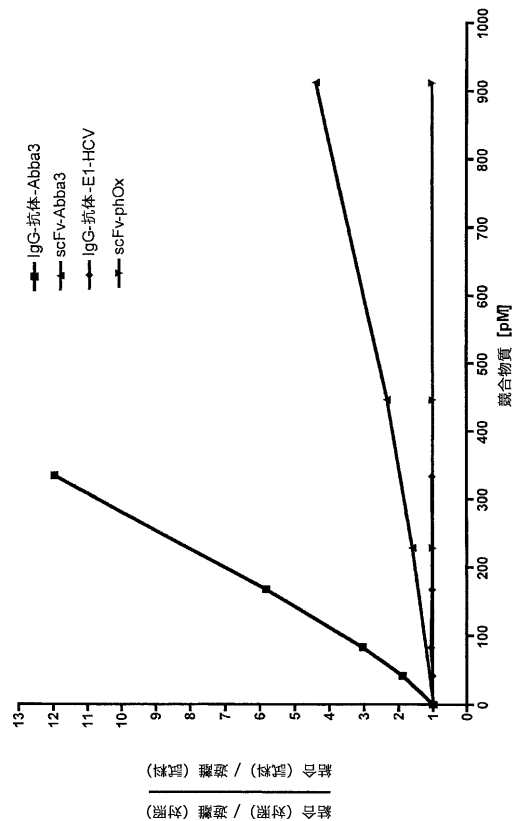


Fig 4

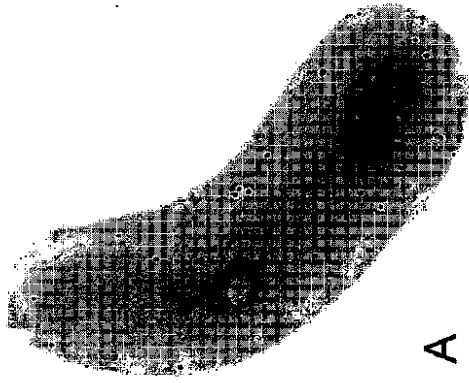
【 図 3 】



【 図 5 】



【図 6 A】



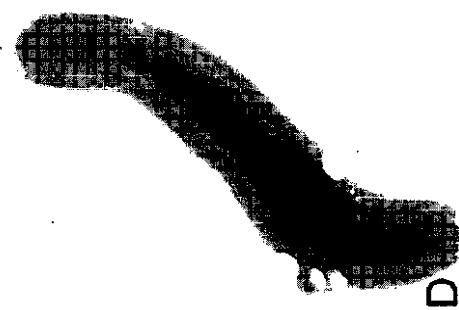
【図 6 B】



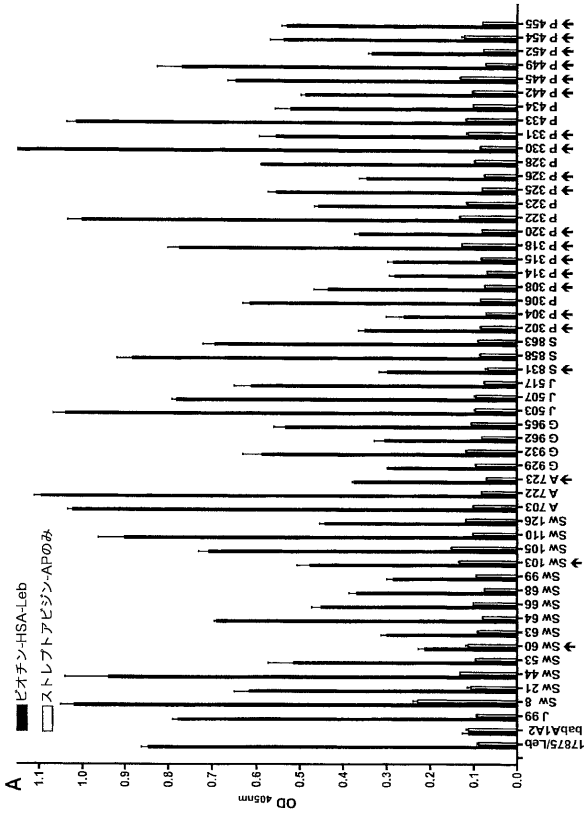
【図 6 C】



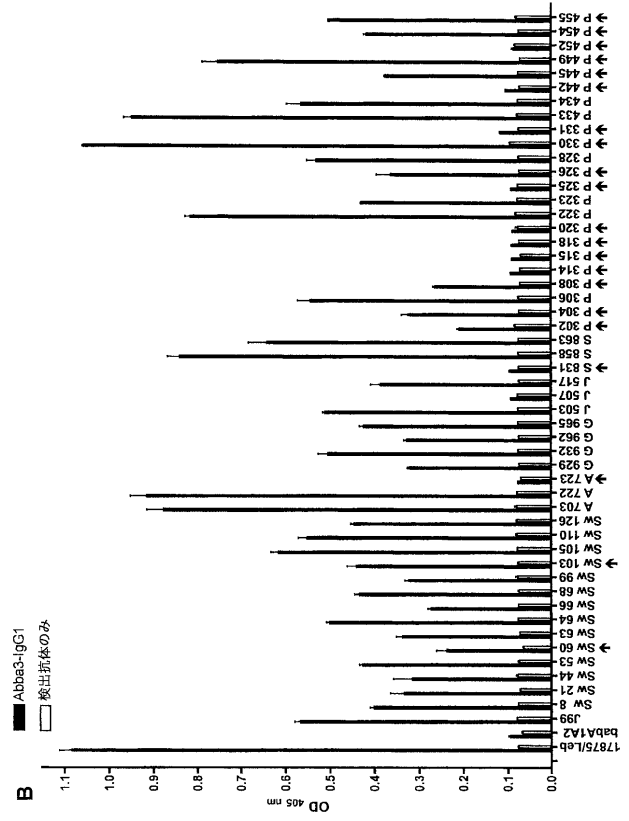
【図 6 D】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 8 】

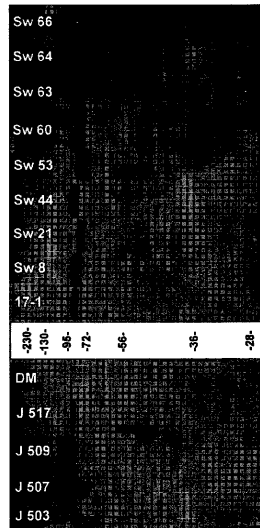


Fig 8

【 図 8 b 】

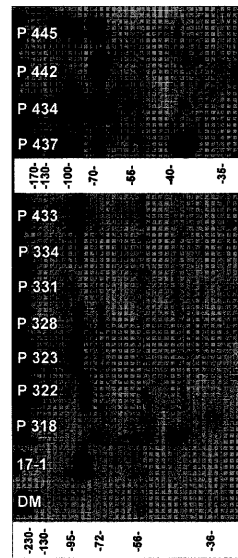
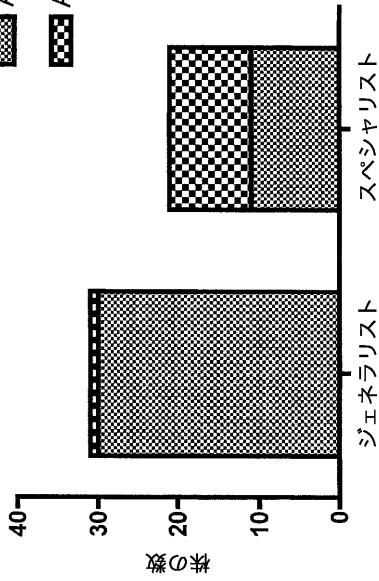


Fig 8b

【 図 9 】

Abba3 結合  
Abba3 非結合



【 図 10 A 】

株	Abba3-Ab ELISA/プロット	Abba3-Ab ELISA	ジエネラリスト ELISA	Abba3-Ab ELISA	Abba3-Ab ELISA	Leb/ ALeb	配列	受入番号
I7875/lab	++	++	++	++	++	1.3	Her 5, 1998年	AE03654.1
J 99	+	++	++	++	++	1.6	Am 5, 1999年	AE001512.1
Sw 8	++	++	++	++	++	1.0	この公明	xxx
Sw 21	++	++	++	++	++	0.9	配列決定されていない	xxx
Sw 44	++	++	++	++	++	1.4	この公明	xxx
Sw 53	++	++	++	++	++	1.0	この公明	xxx
Sw 60	++	++	++	++	++	2.5	この公明	xxx
Sw 63	++	++	++	++	++	0.9	配列決定されていない	xxx
Sw 64	+	++	++	++	++	0.8	この公明	xxx
Sw 66	+	++	++	++	++	1.0	この公明	xxx
Sw 68	+	++	++	++	++	1.2	この公明	xxx
Sw 99	-	++	++	++	++	1.0	この公明	xxx
Sw 103	++	++	++	++	++	2.7	この公明	xxx
Sw 105	++	++	++	++	++	0.8	この公明	xxx
Sw 110	++	++	++	++	++	0.9	この公明	xxx
Sw 126	++	++	++	++	++	0.9	この公明	xxx
A 703	++	++	++	++	++	0.7	Aspholm-Hurtig 5	AA166379.1
A 722	++	++	++	++	++	0.9	配列決定されていない	xxx
A 723	-	++	++	++	++	8.8	Aspholm-Hurtig 5	AA166405.1
P 302	+	++	++	++	++	15.6	Aspholm-Hurtig 5	xxx
P 304	+	++	++	++	++	17.8	配列決定されていない	xxx
P 306	++	++	++	++	++	1.2	配列決定されていない	xxx
P 308	++	++	++	++	++	6.7	配列決定されていない	xxx
P 314	..	++	++	++	++	17.5	配列決定されていない	xxx

【 図 10 B 】

株	Abba3-Ab ELISA/プロット	Abba3-Ab ELISA	ジエネラリスト ELISA	Leb/ ALeb	配列	受入番号
P 315	..	..	+	22.1	配列決定されていない	xxx
P 318	..	..	++	61.6	この公明	xxx
P 320	..	..	++	21.5	配列決定されていない	xxx
P 322	++	++	++	1.5	この公明	xxx
P 323	++	++	++	1.2	この公明	xxx
P 325	..	..	+	14.8	配列決定されていない	xxx
P 326	..	..	+	4.6	配列決定されていない	xxx
P 328	++	++	++	1.2	この公明	xxx
P 330	++	++	++	51	配列決定されていない	xxx
P 331	..	..	++	90.4	この公明	xxx
P 433	++	++	++	0.8	Aspholm-Hurtig 5	AA166350.1
P 434	++	++	++	0.8	Aspholm-Hurtig 5	AA166351.1
P 442	++	++	++	8.1	Aspholm-Hurtig 5	AA166344.1
P 445	++	++	++	14.4	Aspholm-Hurtig 5	AA166343.1
P 449	++	++	++	11.3	Aspholm-Hurtig 5	AY648169.1
P 452	++	++	++	7.1	Aspholm-Hurtig 5	AY648188.1
P 454	++	++	++	22.1	Aspholm-Hurtig 5	AA166361.1
P 455	++	++	++	31.7	Aspholm-Hurtig 5	AA166367.1
S 831	++	++	++	70.8	Aspholm-Hurtig 5	AA166373.1
S 858	++	++	++	1.4	Aspholm-Hurtig 5	AA166373.1
S 863	++	++	++	1.2	Aspholm-Hurtig 5	AA166375.1
J 503	+	++	++	1.9	配列決定されていない	xxx
J 507	+	++	++	1.9	この公明	xxx
J 517	++	++	++	1.3	Aspholm-Hurtig 5	AA166396.1

【 図 10 C 】

株	Abba3-Ab ELISA/プロット	Abba3-Ab ELISA	ジエネラリスト ELISA	Leb/ ALeb	配列	受入番号
G 929	++	++	++	1.4	この公明	xxx
G 932	++	++	++	1.4	この公明	xxx
G 962	++	++	++	1.6	この公明	xxx
G 965	++	++	++	1.5	この公明	xxx

【配列表】

2010519901000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2008/050236
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>IPC: see extra sheet</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
<b>IPC: A61K, C07K, G01N</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<b>SE,DK,FI,NO classes as above</b>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EBI</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20060177440 A1 (SIEGEL, DONALD L.), 10 August 2006 (10.08.2006), -& Database GeneSeq (online) Accession no. AEJ64234, 05-OCT-2006, retrieved from EBI, 100% identity in 107 aa overlap with Seq ID No 19  --	4
P,Y	WO 2007031550 A2 (CRUCCELL HOLLAND B.V.), 22 March 2007 (22.03.2007), page 7, line 25 - page 19, line 30, claims 1,5-11,14-16, example  --	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 June 2008		01-07-2008
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer  Terese Sandström/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2008/050236

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2427194 A (DOMANTIS LIMITED), 20 December 2006 (20.12.2006), page 1, line 30 - page 2, line 9; page 4, line 4 - page 5, line 22; page 6, line 28 - line 34, page 16, line 16 - page 17, line 2; page 36, line 20 - page 37, line 11, claims 2, 13, abstract	1
X	--	3
X	US 20040234529 A1 (BOREN, THOMAS ET AL), 25 November 2004 (25.11.2004), page 5, column 2, line 15 - page 6, column 2, line 8, claims 3, 14, 16, 24, 25, 26, abstract	2,3
A	US 5871942 A (LARKA, CHRISTOPHER VANCE ET AL), 16 February 1999 (16.02.1999), abstract	6
A	REICHE, NICOLE et al, "Generation and Characterization of Human Monoclonal scFv Antibodies against Helicobacter pylori Antigens", Infection and Immunity, August 2002, Vol. 70, No. 8, page 4158 - page 4164, abstract	1
A	JOHANSSON, DANIEL X. et al, "Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in Drosophila S2 cells", Journal of Immunological Methods, 10 January 2007, Available online 25 September 2006, Vol. 318, No. 1-2, page 37 - page 46, the whole document	1
A	HENNING, EWA E. et al, "Heterogeneity among Helicobacter pylori Strains in Expression of the Outer Membrane Protein BabA", Infection and Immunity June 2004, Vol. 72, No. 6, page 3429 - page 3435; page 3430 - page 3431, abstract	1
X	-----	3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2008/050236

**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.: 2  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 2 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy, see PCT rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been made for this claim. The search has been directed to the technical content of the claim.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2008/050236

**International patent classification (IPC)**

**A61K 39/40** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded at [www.prv.se](http://www.prv.se) by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **CNEVUEAMTT**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

26/01/2008

International application No.  
PCT/SE2008/050236

US	20060177440	A1	10/08/2006	AT	300738	T	15/08/2005
				AT	331727	T	15/07/2006
				AU	722978	B	17/08/2000
				AU	732758	B	26/04/2001
				AU	4746197	A	11/05/1998
				AU	4824797	A	11/05/1998
				CA	2268339	A	23/04/1998
				CA	2268397	A,C	23/04/1998
				DE	69733828	D,T	05/01/2006
				DE	69736239	D,T	10/05/2007
				EP	0935604	A,B	18/08/1999
				EP	0935754	A,B	18/08/1999
				SE	0935754	T3	
				ES	2246510	T	16/02/2006
				JP	3901222	B	04/04/2007
				JP	2001508865	T	03/07/2001
				JP	2002503085	T	29/01/2002
				US	5876925	A	02/03/1999
				US	5985543	A	16/11/1999
				US	6255455	B	03/07/2001
				US	6858719	B	22/02/2005
				US	6979534	B	27/12/2005
				US	20030040605	A	27/02/2003
				US	20050282252	A	22/12/2005
				WO	9816541	A	23/04/1998
				WO	9816827	A	23/04/1998
				AT	300872	T	15/08/2005
				AU	4080299	A	06/12/1999
				CA	2332354	A,C	25/11/1999
				DE	69926499	D,T	14/06/2006
				EP	1079694	A,B	07/03/2001
				US	6086935	A	11/07/2000
				US	6613371	B	02/09/2003
				US	20010043966	A	22/11/2001
				WO	9959418	A	25/11/1999
-----							
WO	2007031550	A2	22/03/2007	NONE			
-----							
GB	2427194	A	20/12/2006	GB	0512278	D	00/00/0000
-----							

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

26/01/2008

International application No.  
PCT/SE2008/050236

US	20040234529	A1	25/11/2004	US	7271251	B	18/09/2007
				AT	353337	T	15/02/2007
				AU	726429	B	09/11/2000
				AU	3199997	A	07/01/1998
				CA	2257826	A	18/12/1997
				DE	69737323	D,T	08/11/2007
				EP	0909272	A,B	21/04/1999
				SE	0909272	T3	
				ES	2281914	T	01/10/2007
				JP	2001503606	T	21/03/2001
				NZ	333250	A	26/05/2000
				SE	9602287	D	00/00/0000
				US	6410719	B	25/06/2002
				US	6709656	B	23/03/2004
				WO	9747646	A	18/12/1997
				AU	3365497	A	21/01/1998
				SE	9701014	D	00/00/0000
-----							
US	5871942	A	16/02/1999	AT	211552	T	15/01/2002
				AU	698513	B	29/10/1998
				AU	1502997	A	13/11/1997
				CA	2198336	A,C	10/11/1997
				CN	1165299	A	19/11/1997
				CN	1271408	C	23/08/2006
				DE	806667	T	07/10/1999
				DE	69709434	D,T	19/09/2002
				EP	0806667	A,B	12/11/1997
				ES	2132044	T	16/08/1999
				GR	99300022	T	30/07/1999
				JP	3043999	B	22/05/2000
				JP	10010128	A	16/01/1998
				US	RE38088	E	22/04/2003
				US	5716791	A	10/02/1998
				US	5932430	A	03/08/1999
-----							

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/569 F

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100102897  
弁理士 池田 幸弘

(74)代理人 100097870  
弁理士 梶原 斎子

(74)代理人 100140556  
弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719  
弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258  
弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969  
弁理士 井上 洋一

(74)代理人 100132492  
弁理士 弓削 麻理

(72)発明者 ボレン、トマス  
スウェーデン国、ウメオ、ピエールンベージェン 4 0 0

(72)発明者 ハマーストレム、レンナート  
スウェーデン国、フッディング、プロムステルグレンド 7 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA51 CA04 CA11 HA15  
4B063 QA18 QQ79 QR32 QR35 QR55 QS24 QS32  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 CA40 DA75 EA53 FA74

专利名称(译)	针对幽门螺杆菌的新型免疫球蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010519901A</a>	公开(公告)日	2010-06-10
申请号	JP2009551655	申请日	2008-03-03
申请(专利权)人(译)	Herikyua 激活宝来获得		
[标]发明人	ボレントマス ハマーストレムレンナート		
发明人	ボレン、トマス ハマーストレム、レンナート		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/12 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61P1/00 C07K16/121 C07K2317/21 C07K2317/622 G01N33/56922		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C07K16/12 G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QS24 4B063/QS32 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一		
优先权	60/904241 2007-03-01 US 12/072429 2008-02-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于预防，治疗和诊断由幽门螺杆菌（幽门螺杆菌）引起的感染的材料和方法。更具体地，本发明涉及新的特异性可变抗体区域，其衍生物和完全人免疫球蛋白Abba3，其表现出对幽门螺杆菌表达的 BabA 抗原的特异性活性，所述免疫球蛋白的产生方法，它们的分离和使用。例如，在检测引起幽门螺杆菌的疾病中。本发明还涉及免疫疗法，即用于治疗 and 预防由幽门螺杆菌菌株引起的病理感染的被动接种。

1	寄託された微生物又は生体材料に関する下記の表示は、明細書中の下記の記載と関連している。	
1-1	頁	16
1-2	行	24
1-3	寄託物の識別表示	
1-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSMZ -ドイツ微生物菌株保存機構 Mascheroder Weg 1b, D-38124 マッシャーローダーベーク 1b, D-38124 Braunschweig, Germany ブラウンシュバイグ、ドイツ 2007年2月28日 (28. 02. 2007)
1-3-2	寄託機関のあて名	DSMZ 19101
1-3-3	寄託の日付	
1-3-4	受託番号	DSMZ 19101
1-5	表示を行うための指定国	すべての指定国
2	寄託された微生物又は生体材料に関する下記の表示は、明細書中の下記の記載と関連している。	
2-1	頁	16
2-2	行	24
2-3	寄託物の識別表示	
2-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSMZ -ドイツ微生物菌株保存機構 Mascheroder Weg 1b, D-38124 マッシャーローダーベーク 1b, D-38124 Braunschweig, Germany ブラウンシュバイグ、ドイツ 2007年2月28日 (28. 02. 2007)
2-3-2	寄託機関のあて名	DSMZ 19101
2-3-3	寄託の日付	
2-3-4	受託番号	DSMZ 19101
2-5	表示を行うための指定国	すべての指定国