

(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2004-512040

(P2004-512040A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
C O 7 K 14/31	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 5
C O 7 K 16/12	C O 7 K 14/31	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-537774 (P2002-537774)	(71) 出願人	502334308
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日 (2001.10.22)		インヒビテックス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アルファ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/032550		レッタ ウェストサイド パークウェイ
(87) 国際公開番号	W02002/034788		8 9 9 5
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)	(74) 代理人	100065215
(31) 優先権主張番号	60/241, 832		弁理士 三枝 英二
(32) 優先日	平成12年10月20日 (2000.10.20)	(74) 代理人	100076510
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 掛樋 悠路
(31) 優先権主張番号	60/277, 287	(74) 代理人	100086427
(32) 優先日	平成13年3月21日 (2001.3.21)		弁理士 小原 健志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100090066
			弁理士 中川 博司
		(74) 代理人	100094101
			弁理士 館 泰光
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MAPタンパク質に対するモノクローナル抗体、および感染を処置または予防することにおける使用方法

(57) 【要約】

MAPタンパク質 (Map 10タンパク質を含む) のサブドメインまたはMAPタンパク質の他の免疫原性亜領域を結合するモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (Staphylococcus aureusのようなブドウ球菌細菌からの処置およびこれらからの予防において有用であり得る) が提供される。さらに、医療機器は、それらが汚染されるまたはさらに汚染を拡大させる可能性を低減させるか、または排除するために、本発明の抗体を用いて処理され得る。特に、本発明の抗体は、これらが細菌の宿主細胞への接着を予防し且つ感染した宿主における細菌の殺傷を促進させるという二重の目的を果たす故に、有益である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S . a u r e u s 由来の M a p 1 0 タンパク質へ結合する単離抗体。

【請求項 2】

前記抗体がヒトまたは動物における S . a u r e u s 感染を予防する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体がブドウ球菌属細菌の真核細胞への結合を阻害する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体がヒトまたは動物における非経口、経口、鼻腔内、皮下、エアゾール化または静脈内投与に適する、請求項 1 に記載の抗体。 10

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体がキメラ、ヒト化、およびヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される型に属する、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が単鎖モノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 8】

S . a u r e u s M A P タンパク質へ結合する抗体と同一の結合特異性を有する抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の抗体。 20

【請求項 9】

配列番号 4 に記載の可変軽鎖配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 3 に記載の核酸配列またはその縮重体によってコードされる可変軽鎖配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

配列番号 6 に記載の可変重鎖配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号 5 に記載の核酸配列またはその縮重体によってコードされる可変軽鎖配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。 30

【請求項 13】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の抗体を含む単離抗血清。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の抗体およびその抗体による結合を検出するための手段を含む診断キット。

【請求項 16】

前記結合を検出するための手段が前記抗体へ結合された検出可能な標識を含む、請求項 1 5 に記載の診断キット。 40

【請求項 17】

請求項 1 に記載の抗体を S . a u r e u s に感染していると疑われるサンプルへ添加すること、および抗体が該サンプルへ結合したか否かを決定することを包含する、S . a u r e u s の感染を診断する方法。

【請求項 18】

有効量の請求項 1 に記載の抗体および薬学的に許容されるビヒクル、担体または賦形剤を含む、S . a u r e u s の感染を処置または予防するための薬学的組成物。

【請求項 19】

ヒトまたは動物患者へ有効量の請求項 1 に記載の抗体を投与することを包含する、S . a 50

ureusの感染を処置または予防する方法。

【請求項20】

ヒトまたは動物へ単離された*S. aureus* Map10タンパク質を投与することを包含する、免疫学的応答を誘導する方法。

【請求項21】

抗-MAP抗体を含むと疑われるサンプルへ単離Map10タンパク質を添加すること、および該抗体が添加されたMap10タンパク質へ結合したか否かを決定することを包含する、Map10タンパク質に対する抗体を同定する方法。

【請求項22】

*S. aureus*由来のMap10タンパク質へ結合する単離抗体。

10

【請求項23】

配列番号2のアミノ酸配列へ結合する能力を有する、請求項1に記載の単離抗体。

【請求項24】

配列番号1の核酸配列またはその縮重体によってコードされるアミノ酸配列へ結合する能力を有する請求項1に記載の単離抗体。

【請求項25】

配列番号4に記載の可変軽鎖配列を有する単離抗体。

【請求項26】

配列番号6に記載の可変重鎖配列を有する単離抗体。

【請求項27】

単離された*S. aureus* Map10タンパク質。

20

【請求項28】

配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、請求項27に記載の単離タンパク質。

【請求項29】

配列番号1に記載の核酸配列またはその縮重体によってコードされるアミノ酸配列を有する請求項27に記載の単離タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、概してMAPタンパク質、すなわち*Staphylococcus aureus*の實質的に全ての株によって発現される表面局在タンパク質に対して生成された抗体に関し、そして特にMap10タンパク質に対するモノクローナル抗体および*S. aureus*感染の処置および保護におけるそれらの使用に関する。

30

【0002】

発明の背景

*Staphylococcus aureus*は、広範囲な宿主組織にコロニー形成し(*colonizing*)、さらに皮膚損傷(創傷感染、インペチゴ、およびフランケルのような)から生命を脅かす状態(肺炎、敗血性関節炎(*septic arthritis*)、敗血症、心内膜炎、および生体材料に関連する感染を含む)までの範囲に渡る範囲の感染を引き起こし得る細菌性病原体である。宿主の首尾よいコロニー形成は、ほとんどの微生物(*S. aureus*を含む)が動物またはヒトにおいて感染を引き起こすのに必要とされるプロセスである。微生物の接着は、最終的に疾患を引き起こし得る一連の出来事における最初の重要な段階である。病原性微生物は、細菌の表面上に存在する特定の付着因子(*adhesins*)を介して、カテーテル、人工関節、および脈管移植片のような宿主組織または血清の準備され埋入された生体材料に結合することによって、その宿主にコロニー形成する。MSCRAMMTMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules)は、宿主の細胞外マトリックスにおける異なる成分を認識し且つ特異的に結合する細胞表面付着因子のファミリーである。一旦細菌が接着に成功し、そして宿主組織にコロニー形成すると、それらの生理機能が劇的に改変され、そして有害な成分(ト

40

50

キシンおよび加水分解酵素のような)が分泌される。さらに接着性細菌は、しばしば、バイオフィルムを産生し、そして素早くほとんどの抗生物質の殺傷効果に対してより耐性になる。

【0003】

このように *S. aureus* は、特定の宿主組織成分への細菌接着を促進するように、個別に、または協力的に働き得る異なる MSCRAMM^{T M}s のレパートリーを発現することが知られている。MAPタンパク質(実質的に全ての *S. aureus* 株によって発現される表面局在タンパク質)として知られる1つのこのようなタンパク質は、例えば、McGavinら、*Infect. Immun.* p2479-2485(1993)において記載される。しかしながら、異なる MSCRAMM^{T M}s の結合特性および細菌感染の感染力および蔓延におけるそれらの役割における多様性ゆえに、MAPタンパク質のような *S. aureus* からの MSCRAMM^{T M}s に関する情報を明らかにし且つ利用するという問題が依然として残っている。従って、広く多様なブドウ球菌(*staph*)感染を予防することだけでなく、ブドウ球菌生物の感染宿主からの迅速または強力な除去を促進することにおいて成果のある組成物を開発するという感染疾患の分野において大いに所望される目的が残されている。

10

【0004】

発明の要旨

従って、*S. aureus* MAPタンパク質に対する抗体を提供し、ブドウ球菌感染を防ぐことが本発明の目的である。

20

【0005】

S. aureus MAPタンパク質(Map10タンパク質を含む)の結合サブドメインに対する抗体を提供し、ブドウ球菌感染に対し保護することもまた、本発明の目的である。

【0006】

ブドウ球菌細菌の接着を防ぐことにおいて、およびオプソニン食作用性殺傷(*opsonophagocytic killing*)を介して、感染宿主からのこのような微生物の迅速な除去を促進することにおいて有用なMap10タンパク質に対するモノクローナル抗体を提供することもまた、本発明の目的である。

【0007】

MAPタンパク質を認識し得、それゆえブドウ球菌感染を同定および診断する方法において有用であり得る抗体および抗血清を提供することも、本発明のさらなる目的である。

30

【0008】

本発明のモノクローナル抗体の可変軽鎖配列および可変重鎖配列をコードするアミノ酸配列および核酸配列を提供することも、本発明のさらなる目的である。

【0009】

ブドウ球菌感染の予防および処置を目的とするMAPタンパク質および/またはその結合ドメイン(タンパク質Map10を含む)に対するモノクローナル抗体の単離および使用を含む本発明によって、これらおよびその他の目的が提供される。本発明に従う抗-MAP抗体の発見および単離は、従って、これらの抗体が、最初に微生物接着を予防し、そして次にオプソニン食作用殺傷を介する宿主からの感染生物の迅速な除去を促進するので、細菌に対する両刃(*double-edged*)の攻撃に使用され得る。単離MAPタンパク質およびそれらに惹起される抗体に基づく適切な組成物およびワクチン、ならびにそれらの使用のための方法がまた、本発明によって企図される。

40

【0010】

この開示される発明の精神および範囲を越えないこれらの実施形態ならびにその他の改変および改良は、本明細書および/または本明細書中に記載される参考文献(その全てが参考として援用される)を読むことによって、当業者に容易に明らかになるであろう。

【0011】

好ましい実施形態の詳細な説明

50

本発明に従って、本発明者らによって単離および精製され、且つ *S. aureus* 感染に対して保護することが示された *S. aureus* の MAP タンパク質に結合し得るモノクローナル抗体が提供される。MAP タンパク質は、実質的に全ての *S. aureus* 株によって発現される表面局在タンパク質である。McGavinら [(McGavinら、1993, *Infect. Immun.* p 2479 - 2485) は、様々な宿主タンパク質 (BSP、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ヒトロネクチン、およびトロンスポンジンを含む) に結合する 72 kDa 表面タンパク質 (*S. aureus* 株 FDA 574 由来) を同定した。Map と称されるその遺伝子はクローン化され、そして配列決定された (米国特許第 5,648,240 (本明細書中で参考として援用される))。map 遺伝子は 6 つの繰り返しユニットを含み、各サブドメイン (おおよそ約 100 - 140 アミノ酸を含む) は、哺乳類動物種からの MHC クラス II DR 分子のペプチド結合溝に類似性を示す。従って、MAP タンパク質は、それぞれ約 100 - 140 アミノ酸の範囲にある 6 つの分離したサブドメインを有すると考えられ、そしてその各々は約 35 残基の保存アミノ酸を含んでいると考えられる。当初は、Map 結合がレクチン様活性を伴うことが提唱されたが (McGavinら、1993, *Infect. Immun.* p 2479 - 2485)、その後の研究によって、Map とその標的タンパク質との間の相互作用がタンパク質 - タンパク質相互作用を伴うことが実証された (Jonssonら、*J. Biol. Chem.* 1995, p. 21457 - 21460)。サザンブロットおよび PCR 技術を用いて、2 つ目の map 遺伝子クラスもまた、*S. aureus* 分離株において発見された。map 遺伝子の 2 つ目のクラスによってコードされるタンパク質は、多数の繰り返し単位の有無を反映するようなサイズに関して異種性を示した。本発明に従って、本発明者らは、*S. aureus* の Map 10 タンパク質 (配列番号 2 として以下に記載される配列を参照のこと) が、全 MAP タンパク質の最小結合領域であるようであり、そしてそれゆえに、*S. aureus* のようなブドウ球菌属細菌の真核細胞への結合を予防することにおいて有用であり得、それゆえヒトおよび動物における *S. aureus* 型感染を処置または予防し得るモノクローナルおよび他の型の抗体を単離および獲得するために使用され得ることを決定づけた。

10

20

30

40

50

【0012】

従って、本発明は MAP タンパク質またはその結合サブドメイン (Map 10 タンパク質を含む) に結合し得、またそれゆえブドウ球菌感染を予防または処置するのに有効な量で使用される場合、このような感染を予防および処置する方法において有用であり得るモノクローナル抗体を単離および/または精製することに関する。これらのモノクローナル抗体は、例えば、Kohler および Milstein, *Nature* 256: 495 - 497 (1975) の方法または当該分野で公知の他の適切な方法を使用して産生され得、さらに当該分野において周知である方法でキメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体として調製され得る。さらになお、モノクローナル抗体は、単鎖 (軽または重鎖のような) から調製され得、さらに全抗体の結合特性を保持する抗体の活性フラグメントから調製され得る。活性フラグメントによって、MAP タンパク質に結合する完全な抗体と同じ結合特異性を有する抗体フラグメントが意味され、また本明細書中において使用される用語「抗体 (antibody)」は、上記フラグメントを含むことを意味される。さらに、本発明に従うモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて調製される抗血清もまた企図され、そして当業者によって認識されるような数多くの適切な方法によって調製され得る。

【0013】

上記に示したように、MAP タンパク質に対する抗体は、当該分野において周知である数多くの適切な方法 (MAP タンパク質に対するモノクローナル抗体を生成するために利用され得る上記の十分に確立された Kohler および Milstein 法のような) において調製され得る。1 つのこのような方法において、マウスは、1 週間に 1 回、長期間、精製組換え MAP タンパク質を用いて腹腔内注射され、その後この免疫されたマウスから得られた血液の試験を行い、精製 MAP タンパク質に対する反応性を測定する。MAP に

対して反応性であるマウスの同定に続いて、マウス脾臓から単離されるリンパ球がマウス骨髄腫細胞へ融合され、MAPに対する抗体に対して陽性なハイブリドーマ（これは、その後単離および培養され、その後精製およびアイソタイピングを行われる）が生産される。

【0014】

本発明に従うモノクローナル抗体を生成するためには、これらが、当該分野において周知の慣用的な方法を用いて組換的に調製されたMAPまたはMap10タンパク質を用いて生成されることが好ましい。例えば、1つのこのような方法は、組換えタンパク質およびペプチドをクローニングおよび発現させるための発現ベクターとして、E.coli発現ベクターpQE-30の使用を採用する。DNAの調製、精製、制限消化、アガロースゲル電気泳動およびライゲーションは、標準的な方法を用いて行われ得、そして生じる組換えMAPセグメントが単離および精製され、次いで上記の方法でモノクローナル抗体を生成するために使用され得る。

10

【0015】

PCRを用いる好ましい方法において、mapの最初のサブドメインがS.aureus FDA 574ゲノムDNAなどから増幅され、そしてE.coli発現ベクターPQE-30 (Qiagen)（これは、6つのヒスチジン残基を含む組換え融合タンパク質の発現を可能にする）へサブクローニングされ得る。このベクターは、続いて、適切なE.coli株へ形質転換され、適切な光学密度（例えば、OD₆₀₀）になるまで発酵槽の中で増殖され、さらに適切な化合物（0.2mM イソプロピル-1-β-Dガラクトシド (IPTG) のような）で誘導され得る。次いでこの細胞は、中空系アセンブリ (hollow-fiber assembly)（例えば、孔サイズ0.45μm）を使用して回収され得、そしてその細胞ペーストは凍結され、その後、適切な圧力（例えば、French Press @ 1100psiを通して2通過）で破碎される。次いで、破碎された細胞はスピンドウンされ、細胞破片が取り除かれ、キレート化カラムおよび適切な洗浄および溶出のような適した方法を用いて、適切なMAPタンパク質（またはMap10のような適切なサブドメイン）が単離される。MAPタンパク質はまた、エンドトキシン除去プロトコルを受ける。この産物をさらに精製することが必要とされる場合、さらなる工程が行われ得、そしてこの精製MAP抗体に対して生成される抗体は、さらに以下に記載される通りである。この方法を介して単離される1つのこのようなMap10タンパク質は、配列番号2に記載される様な配列を有し、そして配列番号1に記載される様な配列を有する核酸（またはその縮重体）によってコードされる。

20

30

【0016】

本発明に従って、MAPタンパク質に対するモノクローナル抗体が、数多くの適切な方法によって産生され得る。1つの好ましい方法において、この精製Map10サブドメインが使用され、マウスモノクローナル抗体のパネルが作製された。この好ましい方法において、Balb/Cマウスのグループに、溶液状態か、または皮下フロイント完全または不完全アジュバントのようなアジュバントと混合された135μgのMap10の一連の皮下免疫を行った。アジュバントの最後のブーストの3日後に、脾臓を取り出し、単一な細胞懸濁液へ細かく切り (teased)、そしてリンパ球を回収した。次いでこのリンパ球はSP2/0-Ag14骨髄腫細胞系 (ATCC#1581)へ融合された。細胞融合、続くプレティングおよびフィーディングは、Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2)からのthe Production of Monoclonal Antibodies protocolに従って行われた。

40

【0017】

次いでこの融合体から生成された任意のクローンが、特異的抗-Map.10抗体産生について、標準的なELISAアッセイを用いてスクリーニングされた。陽性クローンが増殖され (expanded)、さらに試験され、そして抗-Map.10抗体を生成した単一細胞クローンを生産するクローンが同定された。

50

【0018】

次いで、ハイブリドーマ細胞は、RPMI/DMEM(2mMピルビン酸ナトリウム、4mM L-グルタミンおよび2xペニシリン-ストレプトマイシンを含み2-3リットル培養体積になる1xNutridoma-SP培地)中で増殖された。次いでハイブリドーマの上清は、遠心分離によって回収された。上清は0.45μMフィルターを通して濾過され、そしてこのIgGは、Gタンパク質クロマトグラフィーを用いてアフィニティー精製された。このモノクローナル抗体は、0.1Mグリシン(pH2.7)を用いて溶出され、そして直ぐに10分の1体積の2M Tris(pH8.0)で中和された。次いで精製IgGは、1xD-リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)に対して透析された。必要ならば、この精製抗体を濃縮し、そしてアリコート凍結させた。本発明に従って作製されるモノクローナル抗体としては、配列番号4(配列番号3の配列を有する核酸、またはそれらの縮重体によってコードされる)に示されるような可変軽鎖配列、および配列番号6(配列番号5の配列を有する核酸、またはそれらの縮重体によってコードされる)に示されるような可変重鎖配列を有する抗体が挙げられる。

10

【0019】

モノクローナル抗体に加えて、本発明はまた、MAPまたはそのサブドメイン(Map10のような)からのポリクローナル抗体を生成することを企図する。このようなポリクローナル抗体は、当該分野において公知の多数の適切な方法(精製MAPまたはMap10タンパク質ペプチドの適切な動物宿主への導入、続く宿主動物において産生された生成抗体の単離および精製のような)のいずれかにおいて生成され得る。

20

【0020】

MAPまたはMapタンパク質の組換え型を用いる抗体の産生が好ましいけれども、抗体は、天然の単離および精製MAPタンパク質またはペプチドからも生成され得、また上記と同様の方法において天然MAPタンパク質を用いて、モノクローナルまたはポリクローナル抗体が生成され、このような抗体が得られ得る。なお他の慣用的な方法も、当業者によって認識されるように、組換えまたは天然精製MAPタンパク質を用いて本発明のMAP抗体を生成するのに使用可能である。

【0021】

当業者によって認識されるように、本発明の抗体はまた、ブドウ球菌属細菌によって引き起こされる感染を処置または予防するためのヒトまたは動物患者への投与のための適切な薬学的組成物中へ形成され得る。本発明の抗体(またはその有効フラグメント)を含む薬学的組成物は、当該分野において一般的に使用され得る適切な薬学的ビヒクル、賦形剤(excipient)または担体(生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、他の治療化合物、およびそれらの組み合わせなどを含む)と共に処方され得る。当業者が認識するように、使用される特定のビヒクル、賦形剤または担体は、患者および患者の状態に依存して異なり、また当業者によって認識されるように、種々の投与形態が本発明の組成物に適する。本出願に開示される任意の薬学的組成物の投与の適切な方法としては、局所、経口、肛門、腔、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内および皮内投与が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0022】

局所投与のために、該組成物は、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、滴剤(点眼剤および点耳剤のような)、または液剤(マウスウォッシュのような)の形態で処方される。創傷または外科用包帯、縫合糸およびエアロゾルは、この組成物で含浸され得る。この組成物は、慣用的な添加剤(保存剤、浸透を促進させるための溶媒、皮膚緩和薬(emollients)のような)を含み得る。局所製剤はまた、慣用的な担体(クリームまたは軟膏基剤、エタノール、あるいはオレイルアルコールのような)を含み得る。

40

【0023】

抗体組成物のさらなる形態、および組成物に関する他の情報、他のMSCRAMMTMsに関する情報についての方法および適用はまた、MAP MSCRAMMTMに対する抗体を含む本発明にも応用され、また例えば米国特許第6,288,214(Hookら)

50

(本明細書中で参考として援用される)に開示される。

【0024】

MAPタンパク質またはそのサブドメイン(Map10のような)に対して生成される本発明の抗体組成物はまた、この複合体に対する免疫原性応答を促進するのに有効な量の適切なアジュバントを用いて投与され得る。例えば、適切なアジュバントとしては、ミョウバン(リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)(これは、ヒトにおいて広く使用される)、および他のアジュバント(サポニンおよびその精製成分Quil A、フロイント完全アジュバント、および研究および獣医学の適用において使用される他のアジュバントのような)が挙げられ得る。さらに他の化学的に定義される調製物(ムラミルジペプチド、モノホスホリル脂質A、リン脂質複合体(Goodman-Snitkoffら、*J. Immunol.* 147: 410-415 (1991))によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるもののような)、プロテオリポソーム内での複合体のカプセル化(Millerら、*J. Exp. Med.* 176: 1739-1744 (1992))によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるような)、および脂質小胞(NovasomeTM脂質小胞(Microvescular Systems, Inc., Nashua, NH)のような)におけるタンパク質のカプセル化もまた、有用であり得る。

10

【0025】

とにかく、本発明の抗体組成物は、このように、ブドウ球菌細菌と宿主細胞上のMAPタンパク質との間の結合相互作用を妨げ、調節し、阻害するために、あるいは宿主細胞上のMAPへ結合されるようになるブドウ球菌細菌を追放することにおいて、有用であろう。従って、本発明は、ブドウ球菌感染を予防または処置する組成物および方法を開発することにおいて、ならびにブドウ球菌細菌の真核細胞への結合を阻害することにおいて、特別な適用を有するであろう。

20

【0026】

本発明に従って、ブドウ球菌感染を予防または処置するための方法(これは、この感染を処置または予防するために有効な量で、上記のようなMAPタンパク質またはMap10タンパク質に対する有効量の抗体を投与することを包含する)が提供される。上にも示したように、本発明に従うMap10抗体は、細菌の接着を防ぐことだけでなく、生物の殺傷の増大および宿主からの感染の迅速な除去を導くオプソニン食作用活性を増大させることも観察されてきたという点において、二重に効果的である。従って、本発明に従って、上記の慣用的な方法(例えば、局所、非経口(parenteral)、筋肉内など)のいずれかにおける本発明の抗体の投与は、ヒトまたは動物患者におけるブドウ球菌感染を処置または予防する特に有用な方法を提供するであろう。有効量によって、細菌の接着を防ぐのに(宿主細胞へのブドウ球菌細菌の結合を阻害するのに)十分な抗体力価(titer)のレベルが、あるいは事前の感染(prior infection)の場合、感染を処置するためにオプソニン食作用殺傷を促進し且つ細菌の宿主細胞からの除去を促進するのに十分であろう量が意味される。当業者によって認識されるように、ブドウ球菌感染を処置または予防するのに効果的であるために必要とされる抗体力価のレベルは、患者の性質(nature)および状態、および/または予め存在する(pre-existing)ブドウ球菌感染の重大度(severity)に依存して異なるであろう。上記のようなS. aureus感染を処置または予防するための方法におけるMAPタンパク質への抗体の使用に加え、本発明は、患者においてか、または感染されるかも知れない医療器具において、ブドウ球菌感染を診断するためのS. aureusの存在の検出を含む様々な方法におけるこれらの抗体の使用を企図する。本発明に従って、ブドウ球菌感染の存在を検出する好ましい方法は、1つ以上のブドウ球菌細菌種または株によって感染された疑いのあるサンプル(個体から(例えば、個体の血液、唾液、組織、骨、筋肉、軟骨または皮膚から)採取されたサンプルのような)を得る工程を包含する。次いで、この細胞は溶解され、そしてそのDNAが抽出され、沈殿され、さらに増幅され得る。このサンプルの単離後、本発明のMap10抗体を利用する診断アッセイが行われ、S. aur

30

40

50

e u s の存在を検出し得、そしてサンプル中のこのような存在を決定するためのこのようなアッセイ技術は、当業者に公知であり、且つラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット分析、および E L I S A アッセイのような方法を含む。概して、本発明に従って、S . a u r e u s 感染を診断する方法が企図され、ここで S . a u r e u s 感染に感染していると疑われているサンプルが本発明に従う M A P タンパク質抗体へ添加され、また S . a u r e u s がそのサンプル中の M A P タンパク質に結合する抗体によって表示される。

【 0 0 2 7 】

従って、本発明に従う抗体は、ブドウ球菌 m a p タンパク質の特異的検出のために、ブドウ球菌細菌からの感染の予防のために、進行中の感染症の処置のために、または研究道具としての使用のために、使用され得る。本明細書中において使用されるような用語「抗体 (a n t i b o d i e s) 」としては、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、単鎖、二重特異性、サル化 (s i m i a n i z e d) 、およびヒト化または霊長類化 (p r i m a t i z e d) 抗体、ならびに F a b フラグメント (M A P または M a p 1 0 タンパク質に対するその抗体の結合特異性を維持するそれらのフラグメント (F a b イムノグロブリン発現ライブラリーの産物を含む) のような) が挙げられる。これらの型の抗体または抗体フラグメントのいずれの生成も当業者に周知である。本発明の場合、M A P タンパク質に対するモノクローナル抗体は、生成および単離され、そしてブドウ球菌感染に対して保護することが示された。

10

【 0 0 2 8 】

上記抗体のいずれも、ブドウ球菌細菌の同定および定量化のための検出可能な標識を用いて直接的に標識され得る。イムノアッセイにおける使用のための標識は、一般的に当業者に公知であり、そして酵素、放射性同位体、ならびに蛍光、発光、および発色物質 (コロイダルゴールドおよびラテックスビーズのような着色粒子を含む) を含む。適切なイムノアッセイとしては、酵素 - 結合イムノソルベント検定法 (E L I S A) が挙げられる。

20

【 0 0 2 9 】

あるいは、この抗体は、イムノグロブリンに対する親和性を有する標識物質との反応によって間接的に標識され得る。この抗体は、二次物質と複合体化され、そして抗体に複合体化される二次物質に対する親和性を有する標識三次物質を用いて検出され得る。例えば、この抗体はビオチンへ複合体化され、そしてその抗体 - ビオチン複合体は、標識アビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出され得る。同様に、この抗体は、ハプテンへ複合体化され、そしてこの抗体 - ハプテン複合体は、標識抗 - ハプテン抗体を用いて検出され得る。抗体およびアッセイ複合体を標識化するこれらおよび他の方法が当業者に周知である。

30

【 0 0 3 0 】

M A P タンパク質に対する抗体はまた、製造施設または研究室において使用され、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによりさらなる量のタンパク質を単離し得る。例えば、本発明の抗体はまた、さらなる量の M A P タンパク質を単離するために利用され得る。

【 0 0 3 1 】

本発明の単離抗体、またはその活性フラグメントはまた、ブドウ球菌感染に対する受動免疫のためのワクチンの開発において利用され得る。さらに、薬学的組成物として創傷に投与されるか、あるいは医療用デバイスまたは i n v i t r o および i n v i v o における重合性生体材料をコーティングするために使用される場合、本発明の抗体は、細菌のオプソニン食作用性殺傷を増強するこの抗体の能力ゆえに、ブドウ球菌感染が既に存在するこれらの場合において有用である。さらに、この抗体は必要に応じて改変され得、そのため、ある場合において、それが投与される患者においてより低い免疫原性である。例えば、もし患者がヒトであるならば、抗体は、ハイブリドーマ - 由来抗体の相補的決定領域をヒトモノクローナル抗体へ移植する (t r a n s p l a n t i n g) ことによって「ヒト化」され得る (例えば、J o n e s ら、N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6) または T e m p e s t ら、B i o t e c h n o l o g y 9 : 2 6 6 - 2 7 3 (1

40

50

991)によって記載される)。

【0032】

本明細書中に記載される抗体、タンパク質または活性フラグメントでコーティングされるであろう医療デバイスまたは重合性生体材料としては、ステーブル(staple)、縫合糸、代替心臓弁(replacement heart valves)、心臓補助装置(cardiac assist device)、ハードおよびソフトコンタクトレンズ、眼内レンズインプラント(intraocular lens implant)(前眼房または後眼房)、角膜インレー(corneal inlays)、角膜-プロテーゼ(kerato-prostheses)、血管ステント(vascular stents)、エピケラトファリア(epikeratophalia)デバイス、緑内障シャント(glaucoma shunts)、網膜ステーブル(retinal staples)、強膜バックル(scleral buckles)、歯科プロテーゼ、甲状軟骨形成術用デバイス、喉頭形成術用(thyroplastic)デバイス、血管移植片、軟部および硬部組織プロテーゼ(ポンプを含むがこれに限定されない)、電気デバイス(刺激器および記録器を含む)、聴覚プロテーゼ、ペースメーカー、人工喉頭、歯科インプラント、乳房インプラント、陰茎インプラント、頭蓋/顔面の腱(craniofacial tendons)、人工関節、腱、靭帯、半月および盤(discs)、人工骨、人工臓器(人工脾臓、人工心臓、人工四肢、および心臓弁;ステント、ワイヤー、ガイドワイヤー、静脈内および中心静脈カテーテル、レーザーおよびバルーン血管形成術用デバイス、血管および心臓デバイス(チューブ、カテーテル、バルーン)、心室補助材、血液透析コンポーネント、血液酸素供給器、尿道/尿管/泌尿器デバイス(フォーリーカテーテル、ステント、チューブおよびバルーン)、気道カテーテル(気管内および気管開口チューブおよびカフ)、経腸栄養チューブ(経鼻胃、胃内および空腸チューブを含む)、創傷ドレーナッジチューブ(体腔(胸膜、腹膜、頭蓋、および心膜の腔のような)を除液する(drain)ために使用されるチューブ)、血液バッグ、試験管、血液採取管、ヴァキュテナー(vacutainers)、シリンジ、ニードル、ピペット、ピペットチップ、および血液チューピングが挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「コーティングされた」または「コーティング」が、抗体または活性フラグメント、またはそれに由来する薬学的組成物をデバイスの表面(好ましくはブドウ球菌細菌感染に曝される外表面)へ塗布することを意味することは、当業者によって理解されるであろう。デバイスの表面は、このタンパク質、抗体または活性フラグメントによって完全に覆われなくてもよい。

【0034】

好ましい実施形態において、抗体はまた、ブドウ球菌感染を処置または予防するのに適切な抗体を提供する際に有用であろう受動ワクチンとして使用され得る。当業者によって認識されるように、数多くの適切な方法(例えば、非経口(すなわち筋肉内、皮内または皮下)投与または鼻咽頭(すなわち鼻腔内)投与による)における投与のためにパッケージ化され得る。1つのこのような形態では、ワクチンが筋肉内的に(例えば、三角筋へ)注射されるが、しかしながら投与の特定の形態は、取り扱われる細菌感染の性質および患者の状態に依存する。ワクチンは、好ましくは、投与を促進するための薬学的に許容される担体と組み合わせられ、そしてこの担体は通常、保存剤を含むまたは含まない水または緩衝生理食塩水である。このワクチンは、投与時の再懸濁に適するよう凍結乾燥され得、または溶液であり得る。

【0035】

本発明に従う抗体組成物の投与のための好ましい用量は、ブドウ球菌感染を予防するまたは処置するのに有効であろう量であり、そしてこの量が感染の性質および患者の状態に依存して非常に大きく変化するであろうことは容易に認識される。上記に示すように、本発明に従って使用される抗体または薬剤の「有効量」は、所望の予防または治療効果をもたらすような、薬剤の無害であるが十分な量を意味することを意図される。以下に指摘する

であろうように、必要とされる抗体または特定の剤の正確な量は、被験体の種、年齢および全体的な状態、処置される状態の重篤度、使用される特定の担体またはアジュバントおよびその投与形態などに依存して、被験体ごとに異なる。従って、任意の特定の抗体組成物の「有効量」は、特定の環境に基づいて異なり、そして適切な有効量は、適用の各々の場合において、日常的に行われる実験のみを用いて当業者により決定され得る。その用量は、組成物が投与される個体に合わせて調整されるべきであり、また年齢、体重、および個体の代謝に伴って変化する。この組成物はさらに、(チメロサル(エチル(2-メルカプトベンゾエート-S)水銀ナトリウム塩)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)のような薬学的に許容される保存剤または安定化剤を含み得る。

10

【0036】

適切な標識または他のふさわしい検出可能な生体分子または化学物質と共に使用される場合、本明細書中において記載されるモノクローナル抗体は、ブドウ球菌感染の *in vivo* および *in vitro* 診断あるいはブドウ球菌属細菌の検出のような目的のために有用である。研究所の研究もまた、このような抗体の使用を通じて促進され得る。以下に示されるもののよう、様々な型の標識およびこの標識を本発明の抗体へ複合体化させる方法は、当業者に周知である。

【0037】

例えば、抗体は、³²P、³H、¹⁴C、³⁵S、¹²⁵I、または¹³¹I(これらに制限されない)のような放射性標識へ複合体化され得る。標識の検出は、シンチレーション計数、ガンマ線分光測定、またはオートラジオグラフィーのような方法によるものであり得る。生物発光標識(ホタルルシフェリンの誘導体のような)もまた、有用である。この生物発光物質は、従来法によってタンパク質へ共有結合され、そしてこの標識タンパク質は、酵素(ルシフェラーゼのような)が、生体発光分子に光の光子を放出させるATPを用いる反応を触媒する際に、検出される。発光物質(fluorogens)の例としては、フルオレセインおよび誘導体、フィコエリトリン、アロ-フィコシアニン、フィコシアニン、ローダミン、およびTexas Redが挙げられる。発光物質は一般的に、蛍光検出器によって検出される。

20

【0038】

細胞におけるリガンドの位置は、上記のように抗体を標識すること、および当業者に周知の方法(Warren and Nelson(Mol Cell Biol, 7: 1326-1337, 1987)によって記載されるような方法を用いる免疫蛍光顕微鏡法のような)に従って標識を検出することによって、決定され得る。

30

【0039】

上に示されるように、本発明のモノクローナル抗体、あるいはその活性部分またはフラグメントは、哺乳類動物細胞外マトリックスタンパク質(MAPタンパク質のような)への細菌の接着のような感染の原因となるブドウ球菌病原体と哺乳類動物宿主との間の最初の物理的相互作用を妨害するために特に有用であり、そしてこの物理的相互作用の妨害は、患者を処置すること、および内在する医療デバイスへの細菌感染を予防および減少させ、それらを使用により安全にすることを両方において有用であり得る。

40

【0040】

本発明の別の実施形態において、単一容器内に凍結乾燥され、後にブドウ球菌細菌を含むと疑われる水性サンプルの添加によって活性になるような適切な形態で本発明の抗体を含む、ブドウ球菌属細菌および感染を単離および同定することにおいて有用であり得るキットが提供される。このようなキットは代表的に、本発明のMAP抗体へ結合する複合体の同定を可能にするであろう適切な免疫検出試薬と共に適切な形態において抗体を収容するための適切な容器を含み得る。例えば、免疫検出試薬は、ピオチンまたは検出可能な色を生成する酵素などのような、通常抗体へ結合され得るか、またはその抗体が抗原へ結合する際に検出可能な結果をもたらすような別の方法において利用され得る適切な検出可能なシグナルまたは標識を含み得る。

50

【0041】

簡単には、MAPタンパク質またはその活性フラグメントに結合する本発明の抗体は、このように、ヒトおよび動物患者におけるブドウ球菌感染を処置または予防することにおいて、ならびに医療用または他の内在デバイスにおいて格別に有用である。従って、本発明は、MAPタンパク質へ結合し得且つ細菌のオプソニン食作用性殺傷を伴うブドウ球菌感染の処置の方法において使用され得る抗体を同定するおよび単離する方法に関する。Mapタンパク質を結合し得、そしてブドウ球菌感染を予防または処置し得るMAP抗体のような、本発明の方法を用いて同定および/または単離される抗体はそれゆえ、本発明の一部である。

【0042】

【実施例】

本発明の好ましい実施態様の局面を例示する以下の実施例が提供される。当業者らは以下の実施例に開示される当該技術が、本発明の実施において有効に機能するように本発明者らによって発見された技術であり、またそれゆえに、その実施のための好ましい様式を構成すると考えられることを理解すべきである。しかしながら、本開示に鑑み、当業者は開示される特定の態様において多くの改変がなされ得ることを理解すべきであり、そしてまた本発明の精神および範囲から逸脱することなく、同様もしくは類似の結果を得る。

【0043】

実施例1. MAPタンパク質およびDNAの単離ならびにシーケンシング

PCRを使用して、*S. aureus* FDA 574のゲノムDNAからmapの第一サブドメインを増幅し、そして6個のヒスチジン残基を含む組換え融合タンパク質の発現を可能にする*E. coli*発現ベクターPQE-30 (Qiagen)のサブクローニングを行った。その後、このベクターを*E. coli*株ATCC 55151中に形質転換し、15-リットル発酵槽中で光学密度(OD₆₀₀)0.7まで増殖させ、そして0.2 mMのイソプロピル-1-ベータ-D-ガラクトシド(IPTG)と共に4時間誘導した。AGテクノロジーズ中空糸アセンブリ(AG Technologies hollow-fiber assembly)(孔サイズ0.45 μm)を使用して細胞を回収し、そしてこの細胞ペーストを-80で凍結した。French Press@1100 psiによる2回の通過を使用して、細胞を1×PBS(10 mLの緩衝液/1 gの細胞ペースト)中で溶解した。溶解させた細胞を17,000 rpmで30分間スピンドウンし、細胞片を除いた。0.1 M NiCl₂で荷電した5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia)カラム上に、上清を通した。負荷後、5カラム容量の10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl(Buffer A)を用いて、このカラムを洗浄した。30カラム容量以上の10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl、200 mM イミダゾール(Buffer B)の0-100%グラディエントを使用して、タンパク質を溶出した。Map10は~13% Buffer B(~26 mMイミダゾール)にて溶出した。280 nmにおける吸光度をモニターした。Map10を含む画分を1×PBS中で透析した。

【0044】

その後、このタンパク質をエンドキシン除去プロトコールにかけた。このプロトコールの間使用された緩衝液は、5-mL Mono-Q セファロース(Pharmacia)カラム上を通過させることによって、エンドキシンフリーにされた。タンパク質を4×15 mL管の間で均等に分けた。Buffer Aを用いて、それぞれの管の容量を9 mLにした。1 mLの10% Triton X-114をそれぞれの管に加え、4で1時間、回転させながらインキュベーションした。相を分離するため、管を37の水浴中に置いた。管を2,000 rpmで10分間スピンドウンし、そしてそれぞれの管の上部水相を回収し、さらに界面活性剤抽出を繰り返した。二度目の溶出からの水相を混合し、そして残留する界面活性剤を除くために、0.1 M NiCl₂で荷電した5-mL IDA chelating (Sigma)カラム上を通過させた。3カラム容量のBuffer Bでこのタンパク質を溶出する前に、このカラムを9カラム容量のBuffer

10

20

30

40

50

Aで洗浄した。この溶出物は、5 - mL Detoxigel (Sigma) カラム上を通され、そしてその通過液 (flow-through) を回収し、そしてカラムに再アプライ (reapply) した。二度目の通過からの通過液を回収し、1 x PBS 中で透析した。マウスに投与する前に、この精製産物を濃度、純度、およびエンドトキシンレベルについて分析した。

Map 10 DNA 配列 (6 x His 融合を含む) (配列番号: 1) :

【0045】

【化1】

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCAGATTCCATATACAA
TCACTGTGAATGGTACAAGCCAAAACATTTTATCAAGCTTAACATTTAATAAG
AATCAACAAATTAGTTATAAAGATATAGAGAATAAAGTTAAATCAGTTTTATAC
TTTAATAGAGGTATTAGTGATATCGATTTAAGACTTTCTAAGCAAGCAAATA
CACGGTTCATTTAAGAATGGAACAAAAGAGTTGTCGATTTGAAAGCAGGC
ATTCACACAGCCGACTTAATCAATACAAGTGACATTAAGCAATTAAGTGTTAA
CGTAGATACTAAAAGCAAGTGAAAGATAAAGAGGCAAAGCAAATGTTGTC
GACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGA

10

【0046】

アミノ酸配列 (配列番号: 2) :

【0047】

【化2】

MRGSHHHHHH GSQIPYTITV NGTSQNILSS LTFNKNQQIS YKDIENTKVK
VLYFNRGISD IDLRLSKQAK YTVHFKNGTK RVVDLKAGIH TADLINTSDI
KAISVNVDTK KQVKDKAKA NVVDLQPSLI S

20

【0048】

実施例2. MAPモノクローナル抗体の生産および単離

この精製されたMap 10タンパク質を使用し、マウスモノクローナル抗体のパネル (panel) を生成した。簡潔には、Balb/Cマウスの群に、溶液中または以下に示すアジュバンドと混合される135 μgのMap. 10タンパク質の一連の皮下免疫を行った:

30

【0049】

【化3】

注入	日	量 (μg)	経路	アジュバンド
初回	0	135	皮下	フロイント完全
ブースト#1	39	135	皮下	フロイント不完全
ブースト#2	63	135	皮下	フロイント不完全
最終ブースト	130	135	皮下	フロイント不完全

【0050】

最終ブーストの三日後、その脾臓を除き、細かく切って (teased) 単細胞懸濁液にし、そしてそのリンパ球を回収した。その後、そのリンパ球をSP2/0-Ag14骨髓腫細胞株 (ATCC # 1581) へ融合した。細胞融合、続くプレティングおよび栄養補給 (feeding) は、Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2.) からの the Production of Monoclonal Antibodies protocol に従って行った。

40

【0051】

その後、標準的なELISAアッセイを用いて、この融合から生成された全てのクローンを特異的抗 Map. 10抗体産生についてスクリーンした。陽性のクローンを拡大し (

50

expanded)、さらに試験した。当初は10個の陽性クローンを同定したが、結局4個が死滅し、限界希釈によって最終的に単一細胞クローン化された6個のみを残した。単一細胞クローンを活性について試験し、そしてもとの6クローンのうち4クローンのみが抗 Map. 10 抗体を生産する単一細胞クローンを産生した。

【0052】

抗体のスケールアップおよび精製

ハイブリドーマ細胞を、RPMI / DMEM (2 - 3リットル培養容量に対し2 mM ピルビン酸ナトリウム、4 mM L - グルタミンおよび2 x ペニシリン - ストレプトマイシンを含む1 x Nutridoma - SP培地) 中で増殖した。その後、ハイブリドーマ上清を遠心分離によって回収した。この上清を0.45 μM フィルターを介して濾過し、そしてプロテインGクロマトグラフィーを用いて、このIgGをアフィニティ精製した。0.1 M グリシン、pH 2.7 を使用してこのモノクローナル抗体を溶出し、直ちに10分の1容量の2 M Tris、pH 8.0 で中和した。次いでこの精製IgGを、1 x D - リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4 に対して透析した。必要であれば、この精製抗体を濃縮し、アリコートで凍結した。

【0053】

Staphylococcus aureus 株

S. aureus 細胞は凍結グリセロールストックから取られ、そして一枚の血液寒天プレート上に植え付けられ、そして24時間、37 °C で増殖させた。その後、単独コロニーを選択し、そして新たな血液寒天プレート上に植え付けた。これを最終凍結ストックの20 ml 毎に約30プレートについて繰り返した。その後、このプレートを24時間、37 °C でインキュベーションした。インキュベーション後、この細菌をスクレイパー (scraper) から取り除くために穏やかにボルテックスしながら、このコロニーを各プレートの表面から50 ml 管 (10 ml の1 x PBS を含む) へ掻き取った (10 ml のPBS あたり20 - 30プレート)。次いで、細菌からの全ての寒天片の分離を容易にするため勢いよくボルテックスしながら、さらなる10 ml の1 x PBS を10 ml の細菌懸濁液に加えた。この懸濁液を10分間、3500 x g、4 °C で遠心分離することによって、ペレット化した。この細菌をD - PBS で3回洗浄し、そして所望容量の培地に再び懸濁した。この細菌ストックは、エタノール/ドライバス (ethanol / dry bath) 中で急速凍結することによって1 ml のアリコート中に入れられ、そして-80 °C の冷凍庫中に置いた。凍結ストックのCFU / ml 濃度は、ストックの1 ml を解凍し、10分間、3500 x g、4 °C で遠心分離し、管から上清をデカントし (decanting)、そしてペレットを1 ml の1 x PBS に再び懸濁することによって決定された。先の100 μl の希釈液および900 μl の1 x PBS を使用して10⁻¹ から10⁻⁸ までの一連の希釈液を作成し、50 μl の10⁻⁴ から10⁻⁸ の希釈液を、血液寒天プレート上に二重に (in duplicate) プレーティングし、そして37 °C で16 - 18時間インキュベーションした。10⁻¹ から10⁻² についての600 nm における吸光度を測定および記録した。平均CFU / ml を決定するため、各希釈液についてCFU / ml を決定し (CFU / ml = (平均#コロニー x 希釈ファクター) / 0.005 ml s)、そして平均した。注射の日に、2つの1 ml アリコートを解凍し、一つの管に混合し、そしてボルテックスした。注射後、10⁻⁵、10⁻⁶ および10⁻⁷ 希釈のサンプル調製物を血液寒天プレート上にプレーティングし、注射したCFU / ml を決定した。注射した細菌の量は2.2 x 10⁸ CFU / ml *S. aureus* Barnett であった。

【0054】

動物、性別、種、数、年齢および供給源

Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY) より雌のBalb / Cマウス (5 - 6週齢) を購入した。動物は、処理開始前に少なくとも14日間の間、順応させた。到着してすぐに、マウスは検診され、吸湿性のある敷きわらを敷いた

10

20

30

40

50

ポリカーボネート靴箱型ケージ中でグループ飼育した(5/ケージ)。全てのマウスは、the NIH Guide for the care and Use of Laboratory Animalsに示される必要な管理基準の下、12時間の明暗周期に置かれた。

【0055】

同定および無作為化

全ての動物は、投与前に尾の入れ墨を使用することによって、独自に同定された。処理の開始前に、動物は個別に体重測定され、そしてそれらの健康状態が評価された。マウスを無作為化し、そして等級別に分けた体重を用いて処理群に割り当てた。

【0056】

MAP特異的モノクローナル抗体(Mab)、アイソタイプ:

H01 MAP.10 Mab, IgG₁

H04 MAP.10 Mab, IgG₁

H07 MAP.10 Mab, IgG₁

H10 MAP.10 Mab, IgG₁

【0057】

コントロール

コントロールは、Life Technologies, Inc. (Cat. No. 10010-023; Lot No. 1078749)より購入したリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4(PBS)であった。

本実験のための実験計画は以下に示すとおりである:

実験計画

【0058】

【表1】

群番号	マウスの数	処置					チャレンジ		
		抗体	用量	経路	頻度	時間点	細菌	ストック希釈液	経路
1	10	H01 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	2.2 x 10 ⁸	IV
2	15	H04 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	2.2 x 10 ⁸	IV
3	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	2.2 x 10 ⁸	IV
4	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	2.2 x 10 ⁸	IV
5	15	D-PBS	N/A	IP	一回	-18 hr.	Barnett	2.2 x 10 ⁸	IV

【0059】

データ

0.5 mgのモノクローナルH01、H04、H07、H10またはPBSを用いる腹腔内(IP; 0.5 ml)注射により、マウスを処理した。IgG投与後18時間、そのマウスにS. aureus株Barnettを単一静脈注射でチャレンジ(challenged)した。その後、このマウスを7日間飼育し(Fig. 1)、そして各群におけるマウスの生存データを、Mantel-Coxとして知られるログランク(logrank)テストによって解析した。この結果は表2に要約される。

【0060】

【表2】

10

20

30

40

実験群	統計値
H01 vs. PBS	p = 0.5837
H04 vs. PBS	p = 0.0282
H07 vs. PBS	p = 0.0005
H10 vs. PBS	p = 0.0377

【0061】

10

モノクローナルH07はマウス菌血症モデルにおいて最も高い防御効果を示した。モノクローナルH01は全く効果を示さなかったが、モノクローナルH04およびH10はコントロールに比べて有意な防御を引き起こした(しかし、H07と比較すると幾分効果が低かった)。ここに示される結果は、MAPに対するモノクローナル抗体が*S. aureus*感染に対して防御することを明白に表した。

【0062】

実施例3. いくつかの*S. aureus*株に対するMab H07およびMab10の比較

抗体のスケールアップおよび精製

ハイブリドーマ細胞をRPMI/DMEM(2-3リットルの培養容量に対し、2mMピルビン酸ナトリウム、4mM L-グルタミンおよび2xペニシリン-ストレプトマイシンを含む1xNutridoma-SP培地)中で増殖した。その後、ハイブリドーマ上清を遠心分離によって回収した。この上清を0.45μMフィルターを介して濾過し、そしてプロテインGクロマトグラフィーを用いて、アフィニティ精製した。0.1Mグリシン、pH2.7を使用してこのモノクローナル抗体を溶出し、そして直ちに10分の1容量の2MTris、pH8.0によって中和した。次いでこの精製IgGを、1xD-リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4に対して透析した。必要であれば、この精製抗体を濃縮し、アリコートで凍結した。

20

【0063】

Staphylococcus aureus

30

*S. aureus*細胞は凍結グリセロールストックから取られ、一枚の血液寒天プレート上に植え付けられ、そして24時間、37°Cで増殖させた。その後、単独コロニーを選択し、そして新たな血液寒天プレート上に植え付けた。これを最終凍結ストックの20ml毎に、約30プレートについて繰り返した。その後、このプレートを24時間、37°Cでインキュベーションした。インキュベーション後、この細菌をスクレイパー(scraper)から取り除くために穏やかにボルテックスしながら、このコロニーを各プレートの表面から50ml管(10mlの1xPBSを含む)へ掻き取った(10mlのPBS当たり20-30プレート)。次いで、細菌からの全ての寒天片の分離を容易にするため勢いよくボルテックスしながら、さらなる10mlの1xPBSを10mlの細菌懸濁液に加えた。この懸濁液を10分間、3500xg、4°Cで遠心分離することによって、ペレット化した。この細菌をD-PBSで3回洗浄し、所望容量の培地に再び懸濁した。細菌ストックは、エタノール/ドライバス(ethanol/dry bath)中で急速凍結することによって1mlアリコート中に入れられ、-80°Cの冷凍庫中に置いた。凍結したストックのCFU/ml濃度は、ストックの1mlを解凍し、10分間、3500xg、4°Cで遠心分離し、管から上清をデカントし、そしてペレットを1mlの1xPBSに再び懸濁することによって決定された。先の100μlの希釈液および900μlの1xPBSを使用して10⁻¹から10⁻⁸までの一連の希釈液を作成し、50μlの10⁻⁴から10⁻⁸の希釈液を二重で血液寒天プレート上にプレーティングし、そして37°Cで16-18時間インキュベーションした。10⁻¹から10⁻²についての600nmにおける吸光度を測定および記録した。平均CFU/mlを決定するため、各希釈液に

40

50

ついでにCFU/mlを決定し(CFU/ml = (平均#コロニー × 希釈ファクター) / 0.005 ml)、そして平均した。注射の日に、2つの1mlアリコート溶液を解凍し、一つの管に混合し、ボルテックスした。注射後、 10^{-5} 、 10^{-6} および 10^{-7} 希釈のサンプル調製物を血液寒天プレート上にプレーティングし、注射したCFU/mlを決定した。注射した細菌の量は 1.4×10^9 CFU/ml *S. aureus* Barnett、 2.3×10^8 CFU/ml *S. aureus* ATCC 25923、 4.9×10^7 CFU/ml *S. aureus* ATCC 49230であった。

【0064】

動物、性別、種、数、年齢および供給源

Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY)より雌のBalb/Cマウス(5-6週齢)を購入した。動物は、処理の開始前に少なくとも14日間の間、順応させた。到着してすぐに、マウスは検診され、吸湿性のある敷きわらを敷いたポリカーボネート靴箱型ケージ中でグループ飼育した(5/ケージ)。全てのマウスは、The NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに示される、必要な管理基準の下、12時間の明暗周期に置かれた。

【0065】

同定および無作為化

全ての動物は、投与前に尾の入れ墨を使用することによって、独自に同定された。処理開始前に、動物は個別に体重測定され、そしてそれらの健康状態が評価された。マウスを無作為化し、そして等級別に分けた体重を用いて処理群に割り当てた。

【0066】

MAP特異的Mab

H07MAP.10Mab

H10MAP.10Mab

【0067】

コントロール

コントロールには、Life Technologies, Inc. (Cat. No. 10010-023; Lot No. 1078749)より購入したリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4(PBS)であった。

本実験のための実験計画は以下に示すとおりである：

実験計画

【0068】

【表3】

群番号	マウスの数	処置					チャレンジ		
		抗体	用量	経路	頻度	時間点	細菌	接種 CFU/ml	経路
1	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	1.4×10^9	IV
2	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	ATCC 25923	2.3×10^8	IV
3	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	ATCC 49230	4.5×10^7	IV
4	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	Barnett	1.4×10^9	IV
5	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	ATCC 25923	2.3×10^8	IV
6	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	一回	-18 hr.	ATCC 49230	4.5×10^7	IV
7	15	D-PBS	N/A	IP	一回	-18 hr.	Barnett	1.4×10^9	IV
8	15	D-PBS	N/A	IP	一回	-18 hr.	ATCC 25923	2.3×10^8	IV
9	15	D-PBS	N/A	IP	一回	-18 hr.	ATCC 49230	4.5×10^7	IV

【0069】

データ

0.5mgのモノクローナルH07、H10またはPBSを用いる腹腔内(IP; 0.5ml)注射により、マウスを処理した。IgG投与後18時間、S. aureus株Barnettを単一静脈(IV)注射でチャレンジした。その後、このマウスを7日間飼育し、そして各群のマウスの生存データをMantel-Coxとして知られるログランク(logrank)テストによって解析した。この結果は表4に要約される。

【0070】

【表4】

試験薬剤	チャレンジ細菌株	統計値
H07 vs. PBS	ATCC 25923	p < 0.0001
H10 vs. PBS	ATCC 25923	p = 0.0078
H07 vs. PBS	ATCC 49230	p < 0.0008
H10 vs. PBS	ATCC 49230	p = 0.0062
H07 vs. PBS	Barnett	p = 0.0173
H10 vs. PBS	Barnett	p = 0.0396

10

【0071】

これらのデータは、Map.10のモノクローナル抗体、H07およびH10の単一注入が、当該in vivoモデルにおけるS. aureusの多様な菌株に対して、菌血症媒介死を有意に防ぐことを明確に表している。この結果は、図2、3および4に示される。

20

【0072】

実施例4. 可変領域配列の単離および配列決定

Fast Track 2.0 キット(invitrogen; Cat. No. K4500)を使用して、Map H07ハイブリドーマ細胞からメッセンジャーRNAを単離した。簡潔には、10% FBSを含むDMEM-10培地中で培養した 1.4×10^8 ハイブリドーマ細胞をPBSで洗浄し、遠心分離によってペレット化した(pelletted)後、Protein/RNase Degradерを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース上でのアフィニティ精製によって、PolyA⁺ mRNAを単離した。第一鎖(first strand) cDNA合成は、mRNA (5 μg)、各可変重鎖および可変軽鎖に対する20 pmolの3'オリゴヌクレオチド・マウス-特異的プライマー(Novagen; Cat. Nos. 69796および69812)を含む、cDNA合成キット(Novagen; Cat. No. 69001-3)中の逆転写酵素を使用することによって達成された。PCR Regent System(Life Technologies; Cat. No. 10198-018)ならびにマウス可変重鎖および軽鎖特異的プライマーセット(Novagen; Cat. No. 70081-3、各5 pmol)を使用する30サイクル(94C ホットスタートの後、94C 1分間、50C 1分間、72C 1分間サイクル)のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、cDNAの一部(5から50 ng)を増幅した。PCR産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の1%超純粋アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズに適合するPCR断片をそのゲルから切り出し、そしてpCR2.1-TOPO(Invitrogen)プラスミドへのライゲーションのためにBIO 101 GeneCleanスピンカラム(Cat. No. 1101-400)を使用して精製し、続いてコンピテントTOP10 E. coli(Invitrogen; Cat. No. K4500)への形質転換を行った。QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN; Cat. No. 27106)を使用してプラスミドDNAを単離した後、インサートを含む陽性クローンを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いてM13 フォワードおよび

30

40

50

M 1 3 リバースプライマーを使用して A B I 自動シーケンサー上で配列決定した。

【 0 0 7 3 】

配列決定の結果は以下のとおりである：

H 0 7 V L G - 2 (可変軽鎖配列) (配列番号： 3 および 4)

【 0 0 7 4 】

【 化 4 】

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATC
AAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAATATTGCTTTTAGTGATGGAAC
CACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTG
ATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCA
GTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGTGTGGAGGCTGAGG
ATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCG
TGCTGGGACCAAGCTGGAGTTGAAT

10

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIAFSDGTTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISSVEAEDLGVYYCFQGSSHVPLTFGAGTK
LELN

【 0 0 7 5 】

C D R を示すアミノ酸には下線が引かれる。

H 0 7 V H D - 1 (可変重鎖配列) (配列番号： 5 および 6)

【 0 0 7 6 】

【 化 5 】

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAACTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCCACCAGCTACTGGAT
GAGCTGGACTAAGCAGAGGCCTGACCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGAAT
TGATCCTTACGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAGTTCAAGGACAAGGTC
ATATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCC
TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGGTCCCCCACTC
CACGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

30

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMSWTKQRPDQGLEWIGRID
PYDSETHYNQKFKDKVILTVDKSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCARLVPHSTDY
WGQGTTLTVSS

【 0 0 7 7 】

C D R を示すアミノ酸には下線が引かれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】

図 1 は、本発明に従うモノクローナル抗体で注射されたマウスの生存データのグラフ図である。

40

【 図 2 】

図 2 は、本発明に従うモノクローナル抗体で注射されたマウスの生存データのグラフ図である。

【 図 3 】

図 3 は、本発明に従うモノクローナル抗体で注射されたマウスの生存データのグラフ図である。

【 図 4 】

図 4 は、本発明に従うモノクローナル抗体で注射されたマウスの生存データのグラフ図である。

【 図 1 】

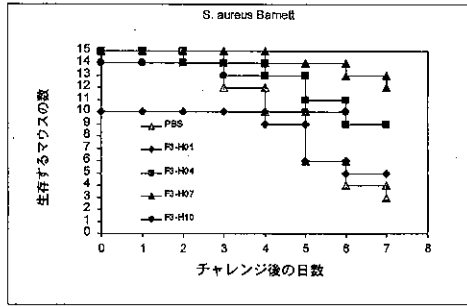


FIG. 1

【 図 3 】

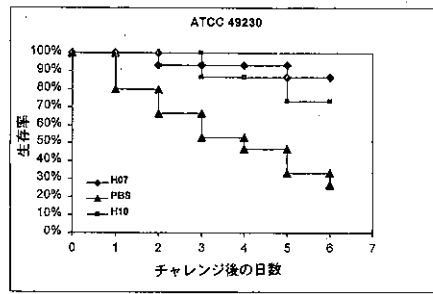


FIG. 3

【 図 2 】

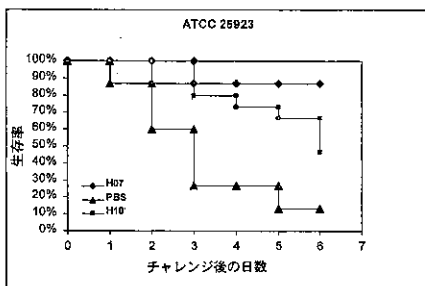


FIG. 2

【 図 4 】

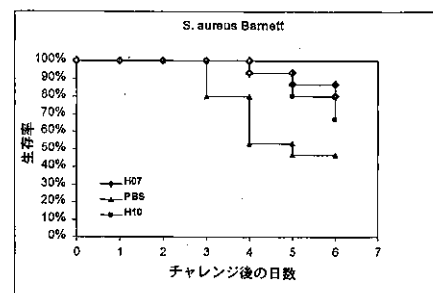


FIG. 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/34788 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00, 1/00, C12P 21/08, A61K 39/40, 39/395, 39/00, 39/02
 - (31) International Application Number: PCT/US01/32550
 - (22) International Filing Date: 22 October 2001 (22.10.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (36) Priority Data: 60/241,832 20 October 2000 (20.10.2000) US; 60/277,287 21 March 2001 (21.03.2001) US
 - (71) Applicant: INHIBITEX, INC. (US/US); 8995 Westside Parkway, Alpharetta, GA 30004 (US)
 - (72) Inventors: PATTI, Joseph, M., 6680 Stratford Place, Cumming, GA 30040 (US); DOMANSKI, Paul, 2655 N. Thompson Road, Atlanta, GA 30319 (US); PATEL, Pratiksha, 895 Yosemite Drive, Suwanee, GA 30019 (US)
 - (74) Agent: SCHULMAN, B., Aaron, Larson & Taylor, P.C., Suite 900, 1199 North Fairfax Street, Alexandria, VA 22314 (US)
 - (81) Designated States (national): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM); Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TN); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, IT, MC, NL, PL, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NR, SN, TD, TG)
- Published:
with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of amendment.
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/34788 A1

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE MAP PROTEIN AND METHOD OF USE IN TREATING OR PREVENTING INFECTIONS

(57) Abstract: Monoclonal and polyclonal antibodies to the binding subdomains of the MAP protein, including the Map 10 protein, or other immunogenic subregions of the MAP protein, are provided which can be useful in the treatment of and protection against infection from staphylococcal bacteria such as *Staphylococcus aureus*. In addition, medical instruments can be treated using the antibodies of the invention in order to reduce or eliminate the possibility of their becoming infected or further spreading the infection. In particular, the antibodies of the present invention are advantageous because they serve the double purpose of preventing adherence of the bacteria to host cells and enhancing the killing of the bacteria in an infected host.

WO 02/34788

PCT/US01/32550

**MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE MAP PROTEIN
AND METHOD OF USE IN TREATING OR PREVENTING INFECTIONS**

Field of the Invention

[0001] The present invention relates in general to antibodies that have been generated against the MAP protein, a surface localized protein expressed by virtually every strain of *Staphylococcus aureus*, and in particular to monoclonal antibodies against Map10 protein and their use in the treatment of and protection against *S. aureus* infections.

Background of the Invention

[0002] *Staphylococcus aureus* is a bacterial pathogen that is capable of colonizing a wide range of host tissues and causing a spectrum of infections that range from cutaneous lesions such as wound infections, impetigo, and furuncles to life-threatening conditions that include pneumonia, septic arthritis, sepsis, endocarditis, and biomaterial related infections. The successful colonization of the host is a process required for most microorganisms, including *S. aureus*, to cause infections in animals and humans. Microbial adhesion is the first crucial step in a series of events that can eventually lead to disease. Pathogenic microorganisms colonize the host by attaching to host tissues or serum conditioned implanted biomaterials, such as catheters, artificial joints, and vascular grafts, through specific adhesins present on the surface of the bacteria. MSCRAMM™s (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) are a family of cell surface adhesins that recognize and specifically

bind to distinct components in the host's extracellular matrix. Once the bacteria have successfully adhered and colonized host tissues, their physiology is dramatically altered and damaging components such as toxins and proteolytic enzymes are secreted. Moreover, adherent bacteria often produce a biofilm and quickly become more resistant to the killing effect of most antibiotics.

[0003] *S. aureus* is thus known to express a repertoire of different MSCRAMM™s that can act individually or in concert to facilitate microbial adhesion to specific host tissue components. One such protein is known as the MAP protein, a surface localized protein expressed by virtually every *S. aureus* strain, as described for example in McGavin et al, *Infect. Immun.* p 2479-2485 (1993). However, it has still remained a problem to identify and utilize the information concerning MSCRAMM™s from *S. aureus* such as the MAP protein because of the variability in the binding properties of the different MSCRAMM™s and their role in infectivity and spread of bacterial infections. It has thus remained a highly desirable goal in the field of infectious diseases to develop compositions which are successful not only in preventing a wide variety of staph infections, but in facilitating a rapid or increased clearance of staph organisms from an infected host.

Summary of the Invention

[0004] Accordingly, it is an object of the present invention to provide antibodies to the *S. aureus* MAP protein to protect against staphylococcal infections.

[0005] It is also an object of the present invention to provide antibodies to the binding subdomains of the *S. aureus* MAP protein, including the Map10 protein, to protect against staphylococcal infections.

[0006] It is also an object of the present invention to provide a monoclonal antibody to the Map10 protein which is useful in preventing adherence of Staphylococcal bacteria and in facilitating a rapid clearance of such microbial organisms from an infected host through opsonophagocytic killing.

[0007] It is a further object of the present invention to provide antibodies and antisera which can recognize the MAP protein and thus which can be useful in methods of identifying and diagnosing staphylococcal infections.

[0008] It is a further object of the invention to provide amino acid sequences and the nucleic acid sequences which code for the variable light sequence and the variable heavy sequences of the monoclonal antibodies of the present invention.

[0009] These and other objects are provided by virtue of the present invention which comprises the isolation and use of monoclonal antibodies to the MAP protein and/or its binding subdomains, including the protein Map10, for the prevention and treatment of *Staphylococcus* infection. The discovery and isolation of anti-MAP antibodies in accordance with the present invention can thus be used in a double-edged attack against bacteria since these antibodies first prevent microbial adherence, and second facilitate a rapid clearance of the infectious organisms from the host through opsonophagocytic killing. Suitable compositions and vaccines based on the isolated MAP protein and antibodies

raised thereto, as well as methods for their use, are also contemplated by the present invention.

[0010] These embodiments and other alternatives and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the present specification and/or the references cited herein, all of which are incorporated by reference.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING FIGURES

[0011] Figure 1 is a graphic representation of survival data of mice injected with monoclonal antibodies in accordance with the present invention.

[0012] Figure 2 is a graphic representation of survival data of mice injected with monoclonal antibodies in accordance with the present invention.

[0013] Figure 3 is a graphic representation of survival data of mice injected with monoclonal antibodies in accordance with the present invention.

[0014] Figure 4 is a graphic representation of survival data of mice injected with monoclonal antibodies in accordance with the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0015] In accordance with the present invention, there is provided monoclonal antibodies which can bind to the MAP protein of *S. aureus* which have been isolated and purified by the present inventors, and which have been shown to protect against *S. aureus* infections. The MAP protein is a surface localized protein expressed by virtually every *S. aureus* strain. McGavin et al (McGavin et

al, 1993, Infect. Immun. p 2479-2485) identified a 72 kDa surface protein, from *S. aureus* strain FDA 574, that binds a variety of host proteins including BSP, fibrinogen, fibronectin, vitronectin, and thrombospondin. The gene, designated *map*, was cloned and sequenced (U.S. Patent No. 5,648,240, incorporated herein by reference). The *map* gene contains 6 repeated units, each subdomain (with roughly about 100-140 amino acids) displaying similarity to the peptide binding groove of MHC class II DR β molecules from mammalian species. The MAP protein thus appears to have 6 separate subdomains each in the range of approximately 100-140 amino acids, and each which appear to contain a conserved amino acid sequence of about 35 residues. It was originally suggested that Map binding involved lectin-like activity (McGavin et al, 1993, Infect. Immun. p 2479-2485), however, subsequent studies demonstrated that the interaction between Map and its target proteins involves a protein-protein interaction (Jonsson et al. J. Biol. Chem. 1995, p.21457-21460). Using Southern blot and PCR techniques, a second *map* gene class was also discovered in *S. aureus* isolates. The proteins encoded by the second class of *map* genes displayed heterogeneity with respect to size as reflected by the presence or absence of the number of repeating units. In accordance with the present invention, the inventors have determined that the Map10 protein of *S. aureus* (see the sequence set forth below as SEQ ID NO:2) appears to be the minimal binding region of the whole MAP protein, and thus can be used to isolate and obtain monoclonal and other types of antibodies which can be useful in preventing binding of staphylococcal bacteria such as *S. aureus* to eukaryotic

cells and thus be capable of treating or preventing *S. aureus*-type infections in humans and animals.

[0016] Accordingly, the present invention relates to an isolated and/or purified monoclonal antibody which can bind to the MAP protein or its binding subdomains, including the Map10 protein, and which thus can be useful in methods of preventing and treating staphylococcal infection when used in amounts effective to prevent or treat such infections. These monoclonal antibodies may be produced using, e.g., the method of Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975), or other suitable ways known in the field, and in addition can be prepared as chimeric, humanized, or human monoclonal antibodies in ways that would be well known in this field. Still further, monoclonal antibodies may be prepared from a single chain, such as the light or heavy chains, and in addition may be prepared from active fragments of an antibody which retain the binding characteristics of the whole antibody. By active fragments is meant an antibody fragment which has the same binding specificity as a complete antibody which binds to the MAP protein, and the term "antibody" as used herein is meant to include said fragments. Additionally, antisera prepared using monoclonal or polyclonal antibodies in accordance with the invention are also contemplated and may be prepared in a number of suitable ways as would be recognized by one skilled in the art.

[0017] As indicated above, antibodies to the MAP protein may be prepared in a number of suitable ways that would be well known in the art, such as the well-established Kohler and Milstein method described above which can be utilized to

generate monoclonal antibodies to the MAP protein. In one such method, mice are injected intraperitoneally once a weeks for a prolonged period with a purified recombinant MAP protein, followed by a test of blood obtained from the immunized mice to determine reactivity to the purified MAP protein. Following identification of mice reactive to MAP, lymphocytes isolated from mouse spleens are fused to mouse myeloma cells to produce hybridomas positive for the antibodies against MAP which are then isolated and cultured, following by purification and isotyping.

[0018] In order to generate monoclonal antibodies in accordance with the invention, it is preferred that these be generated using recombinantly prepared MAP or Map10 proteins using conventional methods well known in the art. For example, one such method employs the use of *E. coli* expression vector pQE-30 as an expression vector for cloning and expressing recombinant proteins and peptides. DNA preparation, purification, restriction digestion, agarose gel electrophoresis and ligation may be performed using standard methods, and the resulting recombinant MAP segments may be isolated and purified and then utilized to generate monoclonal antibodies in the manner described above.

[0019] In the preferred method, using PCR, the first subdomain of *map* can be amplified such as from *S. aureus* FDA 574 genomic DNA and subcloned into the *E. coli* expression vector pQE-30 (Qiagen), which allows for the expression of a recombinant fusion protein containing six histidine residues. This vector may be subsequently transformed into a suitable *E. coli* strain, grown in a fermentor to a suitable optical density (e.g., OD₆₀₀) and induced with a suitable compound such

as 0.2 mM isopropyl-1-beta-D galactoside (IPTG). The cells may then be harvested using a hollow-fiber assembly (e.g., of pore size 0.45 μm) and the cell paste frozen prior to lysing using a suitable press (e.g., 2 passes through a French Press @ 1100psi). Lysed cells can then be spun down to remove cell debris, and isolating a suitable MAP protein, or a suitable subdomain such as Map10, using suitable methods such as chelating columns and appropriate washing and eluting. The MAP protein may also undergo an endotoxin removal protocol. Additional steps may be carried as needed to further purify the product, and antibodies generated to the purified MAP protein as described further below. One such Map10 protein isolated through this method has the sequence as set forth in SEQ ID NO:2, and is encoded by nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO:1, or degenerates thereof.

[0020] In accordance with the invention, monoclonal antibodies to the MAP proteins can be produced by a number of suitable ways. In one preferred method, the purified Map10 subdomain was used generate a panel of murine monoclonal antibodies. In this preferred method, a group of Balb/C mice received a series of subcutaneous immunizations of 135 μg of Map10 in solution or mixed with adjuvant such as Subcutaneous Freund's Complete or Incomplete adjuvant. Three days after the final boost of adjuvant, the spleens were removed, teased into a single cell suspension and the lymphocytes harvested. The lymphocytes were then fused to a SP2/0-Ag14 myeloma cell line (ATCC #1581). Cell fusion, subsequent plating and feeding were performed according

to the Production of Monoclonal Antibodies protocol from Current Protocols In Immunology (Chapter 2, Unit 2.).

[0021] Any clones that were generated from the fusion were then screened for specific anti-Map.10 antibody production using a standard ELISA assay. Positive clones were expanded and tested further, and clones were identified which produced single cell clones that generated anti-Map.10 antibodies.

[0022] Next, hybridoma cells were grown in RPMI/DMEM, 1X Nutridoma-SP media containing 2mM sodium pyruvate, 4mM L-glutamine and 2X penicillin-streptomycin to 2-3 liter culture volumes. Hybridoma supernatants were then harvested by centrifugation. The supernatants were filtered through 0.45 μ M filters and the IgG was affinity purified using protein G chromatography. The monoclonal antibodies were eluted using 0.1M glycine, pH 2.7 and immediately neutralized with one tenth volume of 2M Tris, pH 8.0. The purified IgG was then dialyzed against 1X D-phosphate buffered saline, pH 7.4. If needed, the purified antibody was concentrated and aliquots frozen. Monoclonal antibodies produced in accordance with the invention include an antibody having a variable light sequence as indicated in SEQ ID NO:4, encoded by nucleic acids having the sequence of SEQ ID NO:3, or degenerates thereof, and a variable heavy sequence as indicated in SEQ ID NO:6, encoded by nucleic acids having the sequence of SEQ ID NO:5, or degenerates thereof.

[0023] In addition to monoclonal antibodies, the present invention also contemplates generating polyclonal antibodies from MAP or its subdomains such as Map10 as well. Such polyclonal antibodies may be generated in any of a

number of suitable ways well known in the art, such as the introduction of a purified MAP or Map10 protein peptide into a suitable animal host, followed by isolation and purification of the generated antibodies produced in the host animal.

[0024] Although production of antibodies using recombinant forms of the MAP or Map protein is preferred, antibodies may be generated from natural isolated and purified MAP proteins or peptides as well, and monoclonal or polyclonal antibodies can be generated using the natural MAP proteins in the same manner as described above to obtain such antibodies. Still other conventional ways are available to generate the MAP antibodies of the present invention using recombinant or natural purified MAP proteins, as would be recognized by one skilled in the art.

[0025] As would be recognized by one skilled in the art, the antibodies of the present invention may also be formed into suitable pharmaceutical compositions for administration to a human or animal patient in order to treat or prevent an infection caused by staphylococcal bacteria. Pharmaceutical compositions containing the antibodies of the present invention, or effective fragments thereof, may be formulated in combination with any suitable pharmaceutical vehicle, excipient or carrier that would commonly be used in this art, including such as saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, other therapeutic compounds, and combinations thereof. As one skilled in this art would recognize, the particular vehicle, excipient or carrier used will vary depending on the patient and the patient's condition, and a variety of modes of administration would be suitable for

the compositions of the invention, as would be recognized by one of ordinary skill in this art. Suitable methods of administration of any pharmaceutical composition disclosed in this application include, but are not limited to, topical, oral, anal, vaginal, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal and intradermal administration.

[0026] For topical administration, the composition is formulated in the form of an ointment, cream, gel, lotion, drops (such as eye drops and ear drops), or solution (such as mouthwash). Wound or surgical dressings, sutures and aerosols may be impregnated with the composition. The composition may contain conventional additives, such as preservatives, solvents to promote penetration, and emollients. Topical formulations may also contain conventional carriers such as cream or ointment bases, ethanol, or oleyl alcohol.

[0027] Additional forms of antibody compositions, and other information concerning compositions, methods and applications with regard to other MSCRAMM™s will also apply to the present invention involving antibodies to the MAP MSCRAMM™ and are disclosed, for example, in U.S. Patent 6,288,214 (Hook et al.), incorporated herein by reference.

[0028] The antibody compositions of the present invention which are generated against the MAP protein or its subdomains such as Map10 may also be administered with a suitable adjuvant in an amount effective to enhance the immunogenic response against the conjugate. For example, suitable adjuvants may include alum (aluminum phosphate or aluminum hydroxide), which is used widely in humans, and other adjuvants such as saponin and its purified

component Quil A, Freund's complete adjuvant, and other adjuvants used in research and veterinary applications. Still other chemically defined preparations such as muramyl dipeptide, monophosphoryl lipid A, phospholipid conjugates such as those described by Goodman-Snitkoff *et al. J. Immunol.* 147:410-415 (1991) and incorporated by reference herein, encapsulation of the conjugate within a proteoliposome as described by Miller *et al., J. Exp. Med.* 176:1739-1744 (1992) and incorporated by reference herein, and encapsulation of the protein in lipid vesicles such as Novasome™ lipid vesicles (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH) may also be useful.

[0029] In any event, the antibody compositions of the present invention will thus be useful for interfering with, modulating, inhibiting binding interactions between staphylococcal bacteria and the MAP protein on host cells, or in displacing staphylococcal bacteria which has become bound to MAP on host cells. Accordingly, the present invention will have particular applicability in developing compositions and methods of preventing or treating staphylococcal infection, and in inhibiting binding of staphylococcal bacteria to eukaryotic cells.

[0030] In accordance with the present invention, methods are provided for preventing or treating a staphylococcal infection which comprise administering an effective amount of an antibody to the MAP protein or to the Map10 protein as described above in amounts effective to treat or prevent the infection. As also indicated above, the Map10 antibodies in accordance with the invention are doubly effective in that they have been observed not only to prevent bacterial adherence, but also to increase the opsonophagocytic activity which leads to

increasing killing of the organism and rapid clearance of the infection from the host. Accordingly, in accordance with the invention, administration of the antibodies of the present invention in any of the conventional ways described above (e.g., topical, parenteral, intramuscular, etc.), and will thus provide an extremely useful method of treating or preventing staphylococcal infections in human or animal patients. By effective amount is meant that level of antibody titer that will be sufficient to either prevent adherence of the bacteria, to inhibit binding of staph bacteria to host cells, or, in the case of a prior infection, that amount that will be sufficient to enhance opsonophagocytic killing and promote clearance of the bacteria from the host cells so as to treat the infection. As would be recognized by one of ordinary skill in this art, the level of antibody titer needed to be effective in treating or preventing staphylococcal infection will vary depending on the nature and condition of the patient, and/or the severity of the pre-existing staphylococcal infection.

[0031] In addition to the use of antibodies to the MAP protein in methods to treat or prevent *S. aureus* infection as described above, the present invention contemplates the use of these antibodies in a variety of ways, including the detection of the presence of *S. aureus* to diagnose a staph infection, whether in a patient or on medical equipment which may also become infected. In accordance with the invention, a preferred method of detecting the presence of staph infections involves the steps of obtaining a sample suspected of being infected by one or more staphylococcal bacteria species or strains, such as a sample taken from an individual, for example, from one's blood, saliva, tissues,

bone, muscle, cartilage, or skin. The cells can then be lysed, and the DNA extracted, precipitated and amplified. Following isolation of the sample, diagnostic assays utilizing the Map10 antibodies of the present invention may be carried out to detect the present of *S. aureus*, and such assay techniques for determining such presence in a sample are well known to those skilled in the art and include methods such as radioimmunoassay, Western blot analysis and ELISA assays. In general, in accordance with the invention, a method of diagnosing an *S. aureus* infection is contemplated wherein a sample suspected of being infected with *S. aureus* infection has added to it a MAP protein antibody in accordance with the present invention, and *S. aureus* is indicated by antibody binding to the MAP proteins in the sample.

[0032] Accordingly, antibodies in accordance with the invention may be used for the specific detection of staphylococcal map proteins, for the prevention of infection from staph bacteria, for the treatment of an ongoing infection, or for use as research tools. The term "antibodies" as used herein includes monoclonal, polyclonal, chimeric, single chain, bispecific, simianized, and humanized or primatized antibodies as well as Fab fragments, such as those fragments which maintain the binding specificity of the antibodies to the MAP or Map10 proteins, including the products of an Fab immunoglobulin expression library. Generation of any of these types of antibodies or antibody fragments is well known to those skilled in the art. In the present case, monoclonal antibodies to MAP proteins have been generated and isolated and shown to protect against staphylococcal infection.

[0033] Any of the above described antibodies may be labeled directly with a detectable label for identification and quantification of staph bacteria. Labels for use in immunoassays are generally known to those skilled in the art and include enzymes, radioisotopes, and fluorescent, luminescent and chromogenic substances, including colored particles such as colloidal gold or latex beads. Suitable immunoassays include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

[0034] Alternatively, the antibody may be labeled indirectly by reaction with labeled substances that have an affinity for immunoglobulin. The antibody may be conjugated with a second substance and detected with a labeled third substance having an affinity for the second substance conjugated to the antibody. For example, the antibody may be conjugated to biotin and the antibody-biotin conjugate detected using labeled avidin or streptavidin. Similarly, the antibody may be conjugated to a hapten and the antibody-hapten conjugate detected using labeled anti-hapten antibody. These and other methods of labeling antibodies and assay conjugates are well known to those skilled in the art.

[0035] Antibodies to the MAP protein may also be used in production facilities or laboratories to isolate additional quantities of the proteins, such as by affinity chromatography. For example, the antibodies of the invention may also be utilized to isolate additional amounts of the MAP protein.

[0036] The isolated antibodies of the present invention, or active fragments thereof, may also be utilized in the development of vaccines for passive immunization against staph infections. Further, when administered as

pharmaceutical composition to a wound or used to coat medical devices or polymeric biomaterials *in vitro* and *in vivo*, the antibodies of the present invention, are useful in those cases where there is a previous staph infection because of the ability of this antibody to enhance opsonophagocytic killing of bacteria. In addition, the antibody may be modified as necessary so that, in certain instances, it is less immunogenic in the patient to whom it is administered. For example, if the patient is a human, the antibody may be "humanized" by transplanting the complementarity determining regions of the hybridoma-derived antibody into a human monoclonal antibody as described, e.g., by Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986) or Tempest *et al.* *Biotechnology* 9:266-273 (1991).

[0037] Medical devices or polymeric biomaterials to be coated with the antibodies, proteins and active fragments described herein include, but are not limited to, staples, sutures, replacement heart valves, cardiac assist devices, hard and soft contact lenses, intraocular lens implants (anterior chamber or posterior chamber), other implants such as corneal inlays, kerato-prostheses, vascular stents, epikeratophalia devices, glaucoma shunts, retinal staples, scleral buckles, dental prostheses, thyroplastic devices, laryngoplastic devices, vascular grafts, soft and hard tissue prostheses including, but not limited to, pumps, electrical devices including stimulators and recorders, auditory prostheses, pacemakers, artificial larynx, dental implants, mammary implants, penile implants, cranio/facial tendons, artificial joints, tendons, ligaments, menisci, and disks, artificial bones, artificial organs including artificial pancreas, artificial hearts, artificial limbs, and heart valves; stents, wires, guide wires, intravenous

and central venous catheters, laser and balloon angioplasty devices, vascular and heart devices (tubes, catheters, balloons), ventricular assists, blood dialysis components, blood oxygenators, urethral/ureteral/urinary devices (Foley catheters, stents, tubes and balloons), airway catheters (endotracheal and tracheostomy tubes and cuffs), enteral feeding tubes (including nasogastric, intragastric and jejunal tubes), wound drainage tubes, tubes used to drain the body cavities such as the pleural, peritoneal, cranial, and pericardial cavities, blood bags, test tubes, blood collection tubes, vacutainers, syringes, needles, pipettes, pipette tips, and blood tubing.

[0038] It will be understood by those skilled in the art that the term "coated" or "coating", as used herein, means to apply the antibody or active fragment, or pharmaceutical composition derived therefrom, to a surface of the device, preferably an outer surface that would be exposed to streptococcal bacterial infection. The surface of the device need not be entirely covered by the protein, antibody or active fragment.

[0039] In a preferred embodiment, the antibodies may also be used as a passive vaccine which will be useful in providing suitable antibodies to treat or prevent a staphylococcal infection. As would be recognized by one skilled in this art, a vaccine may be packaged for administration in a number of suitable ways, such as by parenteral (i.e., intramuscular, intradermal or subcutaneous) administration or nasopharyngeal (i.e., intranasal) administration. One such mode is where the vaccine is injected intramuscularly, e.g., into the deltoid muscle, however, the particular mode of administration will depend on the nature

of the bacterial infection to be dealt with and the condition of the patient. The vaccine is preferably combined with a pharmaceutically acceptable carrier to facilitate administration, and the carrier is usually water or a buffered saline, with or without a preservative. The vaccine may be lyophilized for resuspension at the time of administration or in solution.

[0040] The preferred dose for administration of an antibody composition in accordance with the present invention is that amount will be effective in preventing or treating a staphylococcal infection, and one would readily recognize that this amount will vary greatly depending on the nature of the infection and the condition of a patient. As indicated above, an "effective amount" of antibody or pharmaceutical agent to be used in accordance with the invention is intended to mean a nontoxic but sufficient amount of the agent, such that the desired prophylactic or therapeutic effect is produced. As will be pointed out below, the exact amount of the antibody or a particular agent that is required will vary from subject to subject, depending on the species, age, and general condition of the subject, the severity of the condition being treated, the particular carrier or adjuvant being used and its mode of administration, and the like. Accordingly, the "effective amount" of any particular antibody composition will vary based on the particular circumstances, and an appropriate effective amount may be determined in each case of application by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation. The dose should be adjusted to suit the individual to whom the composition is administered and will vary with age, weight and metabolism of the individual. The compositions may additionally contain

stabilizers or pharmaceutically acceptable preservatives, such as thimerosal (ethyl(2-mercaptobenzoate-S)mercury sodium salt) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

[0041] When used with suitable labels or other appropriate detectable biomolecule or chemicals, the monoclonal antibodies described herein are useful for purposes such as *in vivo* and *in vitro* diagnosis of staphylococcal infections or detection of staphylococcal bacteria. Laboratory research may also be facilitated through use of such antibodies. Various types of labels and methods of conjugating the labels to the antibodies of the invention are well known to those skilled in the art, such as the ones set forth below.

[0042] For example, the antibody can be conjugated to a radiolabel such as, but not restricted to, ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , or ^{131}I . Detection of a label can be by methods such as scintillation counting, gamma ray spectrometry or autoradiography. Bioluminescent labels, such as derivatives of firefly luciferin, are also useful. The bioluminescent substance is covalently bound to the protein by conventional methods, and the labeled protein is detected when an enzyme, such as luciferase, catalyzes a reaction with ATP causing the bioluminescent molecule to emit photons of light. Fluorogens may also be used to label proteins. Examples of fluorogens include fluorescein and derivatives, phycoerythrin, allo-phycoyanin, phycoyanin, rhodamine, and Texas Red. The fluorogens are generally detected by a fluorescence detector.

[0043] The location of a ligand in cells can be determined by labeling an antibody as described above and detecting the label in accordance with methods

well known to those skilled in the art, such as immunofluorescence microscopy using procedures such as those described by Warren and Nelson (*Mol. Cell. Biol.*, 7: 1326-1337, 1987).

[0044] As indicated above, the monoclonal antibodies of the present invention, or active portions or fragments thereof, are particularly useful for interfering with the initial physical interaction between a staphylococcal pathogen responsible for infection and a mammalian host, such as the adhesion of the bacteria to mammalian extracellular matrix proteins such as the MAP protein, and this interference with the physical interaction may be useful both in treating patients and in preventing or reducing bacteria infection on in-dwelling medical devices to make them safer for use.

[0045] In another embodiment of the present invention, a kit which may be useful in isolating and identifying staphylococcal bacteria and infection is provided which comprises the antibodies of the present invention in a suitable form, such as lyophilized in a single vessel which then becomes active by addition of an aqueous sample suspected of containing the staphylococcal bacteria. Such a kit will typically include a suitable container for housing the antibodies in a suitable form along with a suitable immunodetection reagent which will allow identification of complexes binding to the MAP antibodies of the invention. For example, the immunodetection reagent may comprise a suitable detectable signal or label, such as a biotin or enzyme that produces a detectable color, etc., which normally may be linked to the antibody or which can be utilized

in other suitable ways so as to provide a detectable result when the antibody binds to the antigen.

[0046] In short, the antibodies of the present invention which bind to the MAP protein or active fragments thereof are thus extremely useful in treating or preventing staphylococcal infections in human and animal patients and in medical or other in-dwelling devices. Accordingly, the present invention relates to methods of identifying and isolating antibodies which can bind to the MAP protein and which can be used in methods of treatment of staph infections which involve opsonophagocytic killing of the bacteria. Antibodies which are identified and/or isolated using the present method, such as the MAP antibody which can bind the Map protein and which can prevent or treat a staph infection thus is part of the present invention

EXAMPLES

[0047] The following examples are provided which exemplify aspects of the preferred embodiments of the present invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

Example 1. Isolation and Sequencing of MAP protein and DNA

[0048] Using PCR, the first subdomain of *map* was amplified from *S. aureus* FDA 574 genomic DNA and subcloned into the *E. coli* expression vector PQE-30 (Qiagen), which allows for the expression of a recombinant fusion protein containing six histidine residues. This vector was subsequently transformed into the *E. coli* strain ATCC 55151, grown in a 15-liter fermentor to an optical density (OD_{600}) of 0.7 and induced with 0.2 mM isopropyl-1-beta-D galactoside (IPTG) for 4 hours. The cells were harvested using an AG Technologies hollow-fiber assembly (pore size of 0.45 μ m) and the cell paste frozen at -80° C. Cells were lysed in 1X PBS (10mL of buffer/1 g of cell paste) using 2 passes through the French Press @ 1100psi. Lysed cells were spun down at 17,000rpm for 30 minutes to remove cell debris. Supernatant was passed over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M $NiCl_2$. After loading, the column was washed with 5 column volumes of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl (Buffer A). Protein was eluted using a 0-100% gradient of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 200mM imidazole (Buffer B) over 30 column volumes. Map10 eluted at ~13% Buffer B (~26mM imidazole). Absorbance at 280nm was monitored. Fractions containing Map10 were dialyzed in 1x PBS.

[0049] The protein was then put through an endotoxin removal protocol. Buffers used during this protocol were made endotoxin free by passing over a 5-mL Mono-Q sepharose (Pharmacia) column. Protein was divided evenly between 4x 15mL tubes. The volume of each tube was brought to 9mL with

Buffer A. 1mL of 10% Triton X-114 was added to each tube and incubated with rotation for 1 hour at 4°C. Tubes were placed in a 37°C water bath to separate phases. Tubes were spun down at 2,000rpm for 10 minutes and the upper aqueous phase from each tube was collected and the detergent extraction repeated. Aqueous phases from the 2nd extraction were combined and passed over a 5-mL IDA chelating (Sigma) column, charged with 0.1M NiCl₂ to remove remaining detergent. The column was washed with 9 column volumes of Buffer A before the protein was eluted with 3 column volumes of Buffer B. The eluant was passed over a 5-mL Detoxigel (Sigma) column and the flow-through collected and reappplied to the column. The flow-through from the second pass was collected and dialyzed in 1x PBS. The purified product was analyzed for concentration, purity and endotoxin level before administering to mice.

Map10 DNA sequence (includes 6xHis fusion) (SEQ ID NO:1):

```
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCAGATTCCATATACAA
TCACTGTGAATGGTACAAGCCAAAACATTTTATCAAGCTTAACATTTAATAAG
AATCAACAAATTAGTTATAAAGATATAGAGAATAAAGTTAAATCAGTTTTATAC
TTTAATAGAGGTATTAGTGATATCGATTTAAGACTTTCTAAGCAAGCAAAATA
CACGGTTCATTTTAAGAATGGAACAAAAGAGTTGTCGATTTGAAAGCAGGC
ATTCACACAGCCGACTTAATCAATACAAGTGACATTAAGCAATTAGTGTAA
CGTAGATACTAAAAGCAAGTGAAAGATAAAGAGGCAAAAGCAAATGTTGTC
GACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGA
```

Amino acid sequence (SEQ ID NO:2):

```
MRGSHHHHHH GSQIPYTIV NGTSQNILSS LTFNKQQJS YKDIENKVKV
VLYFNRGISD IDLRLSKQAK YTVHFKNGTK RVVDLKAGIH TADLINTSDI
KAISVNVDTK KQVKDKKAKA NVVDLQPSLI S
```

Example 2. Production and Isolation of the MAP Monoclonal Antibody

[0050] The purified Map10 protein was used generate a panel of murine monoclonal antibodies. Briefly, a group of Balb/C mice received a series of subcutaneous immunizations of 135 µg of Map.10 protein in solution or mixed with adjuvant as described below:

Injection	Day	Amount (µg)	Route	Adjuvant
Primary	0	135	Subcutaneous	Freund's Complete
Boost #1	39	135	Subcutaneous	Freund's Incomplete
Boost #2	63	135	Subcutaneous	Freund's Incomplete
Final Boost	130	135	Subcutaneous	Freund's Incomplete

[0051] Three days after the final boost, the spleens were removed, teased into a single cell suspension and the lymphocytes harvested. The lymphocytes were then fused to a SP2/0-Ag14 myeloma cell line (ATCC #1581). Cell fusion, subsequent plating and feeding were performed according to the Production of Monoclonal Antibodies protocol from Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2).

[0052] Any clones that were generated from the fusion were then screened for specific anti-Map.10 antibody production using a standard ELISA assay. Positive clones were expanded and tested further. Ten positive clones were originally identified, however four eventually died, leaving only six that were eventually single cell cloned by limiting dilution. Single cell clones were tested for activity and only four of the original six clones produced single cell clones that generated anti-Map.10 antibodies.

Antibody Scale-up and Purification

[0053] Hybridoma cells were grown in RPMI/DMEM, 1X Nutridoma-SP media containing 2mM sodium pyruvate, 4mM L-glutamine and 2X penicillin-streptomycin to 2-3 liter culture volumes. Hybridoma supernatants were then harvested by centrifugation. The supernatants were filtered through 0.45 μ M filters and the IgG was affinity purified using protein G chromatography. The monoclonal antibodies were eluted using 0.1M glycine, pH 2.7 and immediately neutralized with one tenth volume of 2M Tris, pH 8.0. The purified IgG was then dialyzed against 1X D-phosphate buffered saline, pH 7.4. If needed, the purified antibody was concentrated and aliquots frozen.

Staphylococcus aureus strains

[0054] *S. aureus* cells were taken from a frozen glycerol stock and were inoculated onto a single blood agar plate and grown for 24 hours at 37°C. A single colony was then selected and inoculated onto a new blood agar plate. This was repeated for approximately 30 plates per 20 mls of final frozen stock. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. Following incubation, the colonies were scraped off the surface of each plate into a 50 ml tube containing 10 mls of 1XPBS, while gently vortexing to remove the bacteria from the scraper (20-30 plates per each 10 mls of PBS). An additional 10 mls of 1XPBS was then added to the 10 mls of bacterial suspension, while vigorously vortexing to facilitate separation of any agar debris from the bacteria. The suspension was pelleted by centrifugation, 3500xg at 4°C for 10 minutes. The bacteria was

washed three times in D-PBS and resuspended to the desired volume of media. The bacterial stock was placed into 1 ml aliquots by snap freezing in an ethanol/dry bath and placed in -80°C freezer. CFU/ml concentration of frozen stock was determined by thawing 1 ml of stock, centrifuging 3500xg at 4°C for 10 minutes, decanting supernatant from tube and resuspending pellet in 1 ml of 1XPBS. Serial dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁹ using 100µl of prior dilution and 900µl of 1XPBS were made and 50µl of 10⁻⁴ to 10⁻⁸ dilutions were plated in duplicate on blood agar plates and incubated for 37°C for 16-18 hours. The absorbance at 600nm for 10⁻¹ to 10⁻² was measured and recorded. The CFU/ml was determined (CFU/ml=(average # colonies X dilution factor)/0.050 mls) and averaged for each dilution to determine the average CFU/ml. On the day of injection two 1ml aliquots were thawed, combined into one tube and vortexed. Following injections, 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷ dilutions of the sample preparation were plated on blood agar plates to determine the CFU/ml injected. The amount of bacteria injected was 2.2 X10⁸ CFU/ml *S. aureus* Bernett.

Animal, Sex, Species, Number, Age and Source

[0055] Female Balb/C mice (5-6 weeks of age) were purchased from Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY). Animals were allowed to acclimate for at least 14 days prior to initiation of treatment. Upon arrival, the mice were examined, group housed (5 / cage) in polycarbonate shoe box cages with absorbent bedding. All mice were placed on

WO 02/34788

PCT/US01/32550

27

a 12 hour light-dark cycle under the required husbandry standards found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Identification and Randomization

[0056] All animals were uniquely identified using tail tattoos prior to dosing. Prior to initiation of treatment, the animals were individually weighed and their health was evaluated. Mice were randomized and assigned to treatment groups using stratified body weights.

MAP Specific Monoclonal Antibodies (Mab), Isotype:

H01 MAP.10 Mab, IgG₁

H04 MAP.10 Mab, IgG₁

H07 MAP.10 Mab, IgG₁

H10 MAP.10 Mab, IgG₁

Control

[0057] The control was Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 (PBS), purchased from Life Technologies, Inc. (Cat. No. 10010-023; Lot No. 1078749).

[0058] The experimental design for the experiments are shown below:

Experimental Design

Table 1.

WO 02/34788

PCT/US01/32550

28

Group #	No. of mice	TREATMENT					CHALLENGE		
		Antibody	Dose	Route	Frequency	Time Point	Bacteria	Stock Dilution	Route
1	10	H01 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	2.2×10^8	IV
2	15	H04 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	2.2×10^8	IV
3	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	2.2×10^8	IV
4	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	2.2×10^8	IV
5	15	D-PBS	N/A	IP	once	-18 hr.	Barnett	2.2×10^8	IV

DATA

[0059] Mice were treated by intraperitoneal (IP; 0.5ml) injection with 0.5 mg of monoclonal H01, H04, H07, H10 or PBS. Eighteen hours after IgG administration, the mice were challenged with a single intravenous (IV) injection of *S. aureus* strain Barnett. The mice were then followed for 7 days (Fig. 1) and the survival data of each group of mice was analyzed by a logrank test known as Mantel-Cox. The data are summarized in the Table 2.

Table 2.

Experimental Group	Statistic
H01 vs. PBS	$p = 0.5837$
H04 vs. PBS	$p = 0.0282$
H07 vs. PBS	$p = 0.0005$
H10 vs. PBS	$p = 0.0377$

[0060] Monoclonal H07 exhibited the best protective effects in the mouse bacteremia model. Monoclonal H01 had no efficacy, whereas monoclonals H04 and H10 produced significant protection compared to control, but somewhat less effective when compared to H07. The data presented here clearly demonstrated that monoclonal antibodies against MAP protect against *S. aureus* infections.

Example 3. Comparison of Mab H07 and Mab10 against several *S. aureus* strains

Antibody Scale-up and Purification

[0061] Hybridoma cells were grown in RPMI/DMEM, 1X Nutridoma-SP media containing 2mM sodium pyruvate, 4mM L-glutamine and 2X penicillin-streptomycin to 2-3 liter culture volumes. Hybridoma supernatants were then harvested by centrifugation. The supernatants were filtered through 0.45 μ M filters and the IgG was affinity purified using protein G chromatography. The monoclonal antibodies was eluted using 0.1M glycine, pH 2.7 and immediately neutralized with one tenth volume of 2M Tris, pH 8.0. The purified IgG was then dialyzed against 1X D-phosphate buffered saline, pH 7.4. If needed, the purified antibody was concentrated and aliquots frozen.

Staphylococcus aureus

[0062] *S. aureus* cells were taken from a frozen glycerol stock and were inoculated onto a single blood agar plate and grown for 24 hours at 37°C. A

WO 02/34788

PCT/US01/32550

30

single colony was then selected and inoculated onto a new blood agar plate. This was repeated for approximately 30 plates per 20 mls of final frozen stock. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. Following incubation, the colonies were scraped off the surface of each plate into a 50 ml tube containing 10 mls of 1XPBS, while gently vortexing to remove the bacteria from the scraper (20-30 plates per each 10 mls of PBS). An additional 10 mls of 1XPBS was then added to the 10 mls of bacterial suspension, while vigorously vortexing to facilitate separation of any agar debris from the bacteria. The suspension was pelleted by centrifugation, 3500xg at 4°C for 10 minutes. The bacteria was washed three times in D-PBS and resuspended to the desired volume of media. The bacterial stock was placed into 1 ml aliquots by snap freezing in an ethanol/dry bath and placed in -80°C freezer. CFU/ml concentration of frozen stock was determined by thawing 1 ml of stock, centrifuging 3500xg at 4°C for 10 minutes, decanting supernatant from tube and resuspending pellet in 1 ml of 1XPBS. Serial dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁹ using 100µl of prior dilution and 900µl of 1XPBS were made and 50µl of 10⁻⁴ to 10⁻⁶ dilutions were plated in duplicate on blood agar plates and incubated for 37°C for 16-18 hours. The absorbance at 600nm for 10⁻¹ to 10⁻² was measured and recorded. The CFU/ml was determined (CFU/ml=(average # colonies X dilution factor)/0.050 mls) and averaged for each dilution to determine the Average CFU/ml. On the day of injection two 1ml aliquots were thawed, combined into one tube and vortexed. Following injections, 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷ dilutions of the sample preparation were plated on blood agar plates to determine the CFU/ml injected. The amount of bacteria injected was

WO 02/34788

PCT/US01/32550

31

1.4 X 10⁹ CFU/ml *S. aureus* Barnett, 2.3 X 10⁸ CFU/ml *S. aureus* ATCC 25923,
4.9 X 10⁷ CFU/ml *S. aureus* ATCC 49230.

Animal, Sex, Species, Number, Age and Source

[0063] Female Balb/C mice (5-6 weeks of age) were purchased from Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY). Animals were allowed to acclimate for at least 14 days prior to initiation of treatment. Upon arrival, the mice were examined, group housed (5 / cage) in polycarbonate shoe box cages with absorbent bedding. All mice were placed on a 12 hour light-dark cycle under the required husbandry standards found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Identification and Randomization

[0064] All animals were uniquely identified using tail tattoos prior to dosing. Prior to initiation of treatment, the animals were individually weighed and their health was evaluated. Mice were randomized and assigned to treatment groups using stratified body weights.

MAP Specific Mabs

H07 MAP.10 Mab

H10 MAP.10 Mab

Control

[0065] The control was Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 (PBS), purchased from Life Technologies, Inc. (Cat. No. 10010-023; Lot No. 1078749).

[0066] The experimental design for the experiments are shown below:

Experimental Design

Table 3

Group #	No. of Mice	TREATMENT				CHALLENGE			
		Antibody	Dose	Route	Fre- quency	Time Point	Bacteria	Ino-culum CFU/ ml	Route
1	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	1.4X10 ⁸	IV
2	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	ATCC 25923	2.3X10 ⁸	IV
3	15	H07 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	ATCC 49230	4.5X10 ⁷	IV
4	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	Barnett	1.4X10 ⁸	IV
5	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	ATCC 25923	2.3X10 ⁸	IV
6	15	H10 MAP.10	0.5 mg	IP	once	-18 hr.	ATCC 49230	4.5X10 ⁷	IV
7	15	D-PBS	N/A	IP	once	-18 hr.	Barnett	1.4X10 ⁸	IV
8	15	D-PBS	N/A	IP	once	-18 hr.	ATCC 25923	2.3X10 ⁸	IV
9	15	D-PBS	N/A	IP	once	-18 hr.	ATCC 49230	4.5X10 ⁷	IV

DATA

[0067] Mice were treated by intraperitoneal (IP; 0.5ml) injection with 0.5 mg of monoclonal H07, H10 or PBS. Eighteen hours after IgG administration, the mice were challenged with a single intravenous (IV) injection of *S. aureus* strain Barnett. The mice were then followed for 7 days and the survival data of each

group of mice was analyzed by a logrank test known as Mantel-Cox. The data are summarized in Table 4.

Table 4.

Test Agents	Challenge Bacterial Strain	Statistic
H07 vs. PBS	ATCC 25923	p < 0.0001
H10 vs. PBS	ATCC 25923	p = 0.0078
H07 vs. PBS	ATCC 49230	p < 0.0008
H10 vs. PBS	ATCC 49230	p = 0.0062
H07 vs. PBS	Barnett	p = 0.0173
H10 vs. PBS	Barnett	p = 0.0396

[0058] These data clearly demonstrate that a single infusion of Map.10 monoclonal antibody H07 and H10 can significantly prevent bacteremia mediated death against multiple strains of *S. aureus* in a relevant in vivo model. The data are shown in Figures 2, 3, and 4.

Example 4. Isolation and Sequencing of Variable Region Sequences

[0069] Messenger RNA was isolated from Map H07 hybridoma cells using the Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; Cat. No. K4500). Briefly, 1.4×10^8 hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degradar. PolyA⁺ mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first strand cDNA was accomplished using 5 µg of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; Cat. No. 69001-3) containing 20 pmol of 3' oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; Cat. Nos. 69796 and 69842)

for each variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 50 ng) of the cDNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the PCR Reagent System (Life Technologies; Cat. No. 10198-018) and a mouse variable heavy and light chain specific primer set (Novagen; Cat. No. 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure agarose gel in sodium acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101 GeneClean spin columns (Cat. No. 1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E. coli. (Invitrogen; Cat. No. K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; Cat. No. 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

[0070] The results of the sequencing were as follows:

H07VLG-2 (variable light sequence) (SEQ ID NOS:3 and 4)

```
GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATC
AAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAATATTGCTTTAGTGATGGAAC
CACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTG
ATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCA
GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGTGTGGAGGCTGAGG
ATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGG
TGCTGGGACCAAGCTGGAGTTGAAT
```

WO 02/34788

PCT/US01/32550

35

DVLMTQTPLSLPVS¹LG²DQASISCRSSQNI³AFSDGTT⁴LEWYLQKPGQSPKLLIYK⁵
VSNRFSGV⁶PDRFSGSGSDFTL⁷KISSVEAEDLG⁸VVYCF⁹EQGSHVPLT¹⁰FGAGTK¹¹
LELN¹²

Amino acids representing a CDR are underlined

H07VHD-1 (variable heavy sequence) (SEQ ID NOS:5 and 6)

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGA¹AACTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCACCAGCTACTGGAT
GAGCTGGACTAAGCAGAGGCCTGACCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGAAT
TGATCCTTACGATAGTGA²AACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGTC
ATATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCC
TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGGTCCCCCACTC
CACGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

QVQLQQPGAE¹LVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY²WMSWTKQRPDQGLEWIGRID
PYDSETHYNQKFKD³KVILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARL⁴VPHSTDY
WGQGTTLVSS

Amino acids representing a CDR are underlined

What Is Claimed Is:

1. An isolated antibody which binds to the Map10 protein from *S. aureus*.
2. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody prevents *S. aureus* infection in a human or animal.
3. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody inhibits binding of staphylococcal bacteria to eukaryotic cells.
4. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody is suitable for parenteral, oral, intranasal, subcutaneous, aerosolized or intravenous administration in a human or animal.
5. An antibody according to Claim 1 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
6. An antibody according to Claim 5 wherein the monoclonal antibody is of a type selected from the group consisting of chimeric, humanized and human monoclonal antibodies.

7. An antibody according to Claim 5 wherein the antibody is a single chain monoclonal antibody.
8. An antibody according to Claim 1 which comprises a antibody fragment having the same binding specificity of an antibody which binds to the *S. aureus* MAP protein.
9. An antibody according to Claim 1 having a variable light sequence according to SEQ ID NO:4.
10. An antibody according to Claim 1 having a variable light sequence encoded by a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:3 or degenerates thereof.
11. An antibody according to Claim 1 having a variable heavy sequence according to SEQ ID NO:6.
12. An antibody according to Claim 1 having a variable light sequence encoded by a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:5 or degenerates thereof.
13. An antibody according to Claim 1 wherein the antibody is a polyclonal antibody.
14. Isolated antisera containing an antibody according to Claim 1.

15. A diagnostic kit comprising an antibody according to Claim 1 and means for detecting binding by that antibody.
16. A diagnostic kit according to Claim 15 wherein said means for detecting binding comprises a detectable label that is linked to said antibody.
17. A method of diagnosing an infection of *S. aureus* comprising adding an antibody according to Claim 1 to a sample suspected of being infected with *S. aureus*, and determining if antibodies have bound to the sample.
18. A pharmaceutical composition for treating or preventing an infection of *S. aureus* comprising an effective amount of the antibody of Claim 1 and a pharmaceutically acceptable vehicle, carrier or excipient.
19. A method of treating or preventing an infection of *S. aureus* comprising administering to a human or animal patient an effective amount of an antibody according to Claim 1.
20. A method of inducing an immunological response comprising administering to a human or animal an isolated *S. aureus* Map10 protein.

21. A method of identifying antibodies to the Map10 protein comprising adding an isolated Map10 protein to a sample suspected of containing anti-MAP antibodies, and determining if antibodies have bound to the added Map10 protein.
22. An isolated antibody which binds to the Map10 protein from *S. aureus*.
23. An isolated antibody according to Claim 1 that has the ability to bind to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
24. An isolated antibody according to Claim 1 that has the ability to bind to an amino acid sequence coded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or degenerates thereof.
25. An isolated antibody having a variable light sequence according to SEQ ID NO:4.
26. An isolated antibody having a variable heavy sequence according to SEQ ID NO:6.
27. An isolated *S. aureus* Map10 protein.

WO 02/34788

PCT/US01/32550

40

28. An isolated protein according to Claim 27 having an amino acid sequence according to SEQ ID NO:2.

29. An isolated protein according to Claim 27 having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1 or degenerates thereof.

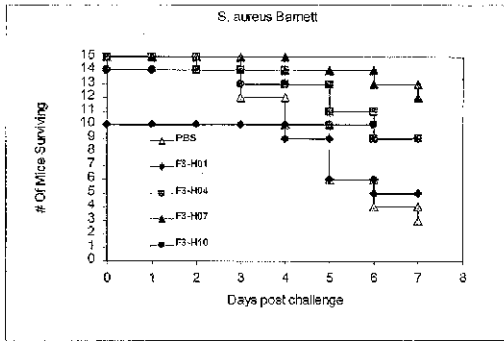


FIG. 1

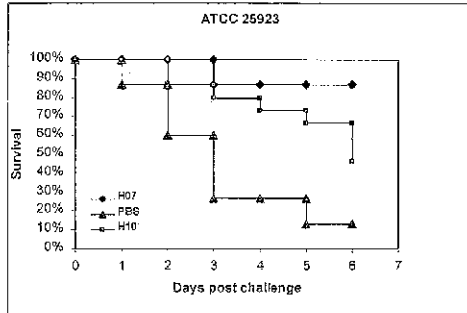


FIG. 2

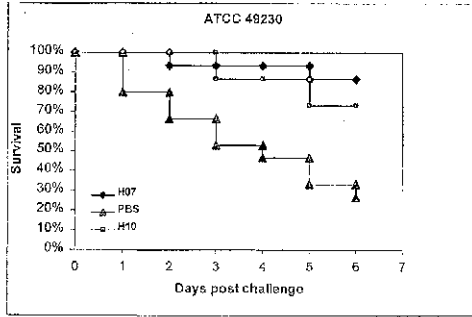


FIG. 3

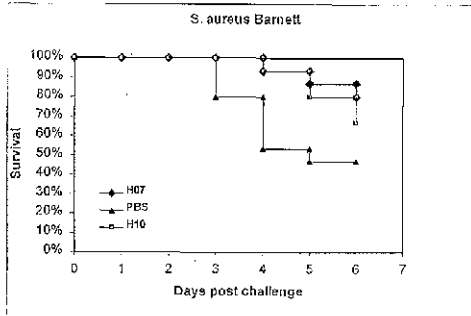


FIG. 4

WO 02/34788

PCT/US01/32550

1

SEQUENCE LISTING

<110> INHIBITEX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE MAP PROTEIN AND METHOD OF USE IN TREATING AND PREVENTING INFECTIONS

<130> P06922W000/BAS

<150> 60/277,287

<151> 2001-03-21

<150> 60/241,832

<151> 2000-10-20

<160> 6

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 396

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

```

atgagaggat cgcaccacca taccaccacac ggaccaccaga ttccatatac satcactgtg      60
aatggtaaca gcccaaacat ttatcaagc ttaaccattta atnagaatca acaaatagtt      120
tataaagata tagagaatca agttaaatca gttttact ttaagaggg ttttagtggat      180
atcattttaa gactttctac gccagcaaaa tacacggttc atttaagaa tggacaacaaa      240
agagttgtcg attgaaagc aggcattcac acagccgact taatcaatac aagtgaratt      300
aaagcaatta gtgttaacgt agatactaaa aagcaagtca aagataaga ggcaaaagca      360
aatgtttgtcg acctgcagcc aagottaatt agotga      396

```

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

```

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Gln Ile Pro Tyr
1           5           10           15
Thr Ile Thr Val Asn Gly Thr Ser Gln Asn Ile Leu Ser Ser Leu Thr
20           25           30
Phe Asn Lys Asn Gln Gln Ile Ser Tyr Lys Asp Ile Gln Asn Lys Val
35           40           45
Lys Ser Val Leu Tyr Phe Asn Arg Gly Ile Ser Asp Ile Asp Leu Arg
50           55           60

```

WO 02/34788

PCT/US01/32550

2

Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val His Phe Lys Asn Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 Arg Val Val Asp Leu Lys Ala Gly Ile His Thr Ala Asp Leu Ile Asn
 85 90 95
 Thr Ser Asp Ile Lys Ala Ile Ser Val Asn Val Asp Thr Lys Lys Gln
 100 105 110
 Val Lys Asp Lys Glu Ala Lys Ala Asn Val Val Asp Leu Gln Pro Ser
 115 120 125
 Leu Ile Ser
 130
 <210> 3
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 3
 gatggttttga tgaccacaac tccactctcc ctgctctgca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgcg gatctagtcg gaatattgct tctagtgatg gaaccaccta tttagaatgg 120
 taccctgcag aaccaggcca gtctccaaag cctctgatct acaaagtctc caaccgattt 180
 tctggggctc cagacagggt cagtggcagt ggalcagcga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagtgctg aggtcgagga tctgggagtt tattaactgct tccaaggttc acatgttccg 300
 ctcaagttcg gtgtcgggac caagctggag ttgaat 336
 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 4
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ala Phe Ser
 20 25 30
 Asp Gly Thr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

WO 02/34788

PCT/US01/32550

3

85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Asn
100 105 110

<210> 5
<211> 351
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 5
cagtcacaac tgcagcagcc tggggctgag ctgggtgagc ctgggacttc agtgaactg 50
tctgtcaagc cttctggcta cacttacc agtactgga tggctggac taagcagagc 120
cttgaccagc gcttgagtg gattggaaga attgacctt acgatagta tctcaactac 180
aatcaaatgt tcaaggacaa ggtcatattg actgtggaca aatctocag caagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctggctctt attactgac aagattggtc 300
ccccactuca oggactactg gggccaagcc accactctca cagtctctc a 351

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Thr Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Val Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Val Pro His Ser Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/22550
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Class. : Please See Extra Sheet. US CL. : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, DIALOG, DERWENT, US & Foreign Patent databases, sequence databases Map, keywords, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 and 6, Inventors' names		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y - A	US 5,649,240 A (HOOK et al) 15 July 1997, see entire document.	1-8, 13, 14, 18, 19, 23, 24, 29 ----- 15-17, 20, 21, 27 ----- 9, 11, 25, 26, 28
X	KOFLER et al. Mechanism of allergic cross-reactions-III. cDNA cloning and variable-region sequence analysis of two IgE antibodies specific for trinitrophenyl. Mol. Immunol. February 1992, Vol. 29, No. 2, pages 161-166, see entire document.	10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:	<input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) <input type="checkbox"/> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means <input type="checkbox"/> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <input type="checkbox"/> document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report 15 MAR 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box 100 Washington, D.C. 20530 Facsimile No. (703) 835-9290	Authorized officer <i>Debra Lawrence For</i> S. O.E.V. Ph.D. Telephone No. (703) 838-0198	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/52520
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,112,044 A (KARASUYAMA et al.) 12 September 2000, see entire document.	12
X	WO 96/39518 A1 (BIONEBRASKA, INC.) 12 December 1996, see entire document.	12
Y	McGAVIN et al. Identification of a Staphylococcus aureus extracellular matrix-binding protein with broad specificity. Infect Immun. June 1993, Vol. 61, No. 6, pages 2479-2485, see entire document.	20, 21, 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/54660
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	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.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Please See Extra Sheet.		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	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.	<input type="checkbox"/>	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 claim No.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/02520A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C07K 16/00, J/00; C10P 01/08; A61K 30/40, 30/305, 30/00, 30/08

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL.:

530/587.0, 587.9, 588.1, 387.1, 388.15, 388.4, 389.1, 360, 365; 434/130.1, 134.1, 130.1, 135.1, 139.1, 141.1, 109.1, 143.1, 254.1; 435/7.1, 7.2, 7.35, 8T6

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

530/587.0, 587.9, 588.1, 387.1, 388.15, 388.4, 389.1, 360, 365; 434/130.1, 134.1, 130.1, 135.1, 139.1, 141.1, 109.1, 143.1, 254.1; 435/7.1, 7.2, 7.35, 8T6

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

- Group I, claim(s) 1-16, 18 and 25-26, drawn to an antibody that binds to an amino acid sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 1 or degenerates thereof.
 Group II, claim(s) 17, drawn to a method of diagnosing a *Staph. aureus* infection using the antibody.
 Group III, claim(s) 19, drawn to a method of treating or preventing a *Staph. aureus* infection using the antibody.
 Group IV, claim(s) 27-29, drawn to an isolated *Staph. aureus* Map10 protein.
 Group V, claim(s) 20, drawn to a method of inducing an immunological response by administering the Map10 protein to an animal or human.
 Group VI, claim(s) 21, drawn to a method of identifying Map10 antibodies in a sample by adding the Map10 protein.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1; because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The antibody that binds to an amino acid sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 1 or degenerates thereof, is the unifying feature of the instant invention. However, such an antibody is already disclosed in the prior art. For example, see Example 7 of Hsieh et al. (US 5,046,240) and therefore, the special technical feature does not define a contribution over the prior art. Although the antigen or antibody product of the invention and the first method of using the product, i.e., claim 17, is a permitted combination under PCT Rule 13.2, in the instant case, since the special technical feature is already disclosed in the art, the first method of use of the product is placed in a separate group. It is further noted that, technically, the absence of a special technical feature would permit the separation of the method of using the product from the product itself. The Map10 protein is the second claimed product that is distinct from the antibody product. Note that PCT Rule 13 does not provide for multiple products or methods within a single application.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/566	
(C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/569	F
C 1 2 R 1:44)	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 R 1:44	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

(74)代理人 100105821

弁理士 藤井 淳

(74)代理人 100099911

弁理士 関 仁士

(74)代理人 100108084

弁理士 中野 睦子

(72)発明者 パッティ ジョセフ エム .

アメリカ合衆国 3 0 0 4 0 ジョージア州 カミング ストラットフォード プレイス 6 6 8 0

(72)発明者 ドマンスキ ポール

アメリカ合衆国 3 0 3 1 9 ジョージア州 アトランタ エヌ . トンプソン ロード 2 6 5 5

(72)発明者 パテル プラティスクシャ

アメリカ合衆国 3 0 3 1 9 ジョージア州 スワニー ヨセミテ ドライブ 8 9 5

Fターム(参考) 2G045 AA28 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36

FB02 FB03 FB07 JA01

4B024 AA01 AA11 BA50 BA80 CA02 CA04 GA03 HA12 HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4C085 AA13 AA14 AA16 BA13 BA34 BB11 CC22 CC23 EE01 GG01

GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA52 EA60

FA72 GA26

专利名称(译)	抗MAP蛋白的单克隆抗体和用于治疗或预防感染的方法		
公开(公告)号	JP2004512040A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002537774	申请日	2001-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	英希比泰克斯公司		
申请(专利权)人(译)	特克斯抑制公司		
[标]发明人	パッティジョセフエム ドマンスキポール パテルプラテイスクシャ		
发明人	パッティ ジョセフ エム. ドマンスキ ポール パテル プラテイスクシャ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61P31/04 C07K14/31 C07K16/12 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/44 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/31 A61K2039/505 C07K16/1271 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/04 C07K14/31 C07K16/12 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.F C12P21/08 C12R1/44		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/GA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BA13 4C085/BA34 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/EA60 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	武大原 中川浩 斋藤健治 藤井 淳 仁关 睦野		
优先权	60/241832 2000-10-20 US 60/277287 2001-03-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

正是在这些从葡萄球菌细菌，例如单克隆和多克隆抗体（金黄色葡萄球菌结合其它免疫原性的子区域的子域或MAP蛋白MAP蛋白（包括蛋白MAP10）的治疗和预防有用获得）。另外，可以用本发明的抗体治疗医疗装置，以减少或消除它们被污染或进一步污染的可能性。特别地，本发明的抗体是有益的，因为它们具有防止细菌宿主细胞粘附和促进感染宿主中细菌杀死的双重目的。

注入	日	量 (μg)	経路	アジュバント
初回	0	135	皮下	フロイント完全
ブースト#1	39	135	皮下	フロイント不完全
ブースト#2	63	135	皮下	フロイント不完全
最終ブースト	130	135	皮下	フロイント不完全