(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-504421
(P2015-504421A)
(43)公表日　平成27年2月12日(2015.2.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/12	(2006.01)	C07K	16/12	ZNA	4B024
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B064
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 146 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-540196 (P2014-540196)
(86)(22)出願日　平成24年11月6日 (2012.11.6)
(85)翻訳文提出日　平成26年7月1日 (2014.7.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/063722
(87)国際公開番号　WO2013/070615
(87)国際公開日　平成25年5月16日 (2013.5.16)
(31)優先権主張番号　61/556,645
(32)優先日　平成23年11月7日 (2011.11.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/625,299
(32)優先日　平成24年4月17日 (2012.4.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/697,585
(32)優先日　平成24年9月6日 (2012.9.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504333972
メディミューン，エルエルシー
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(71)出願人　508098350
メドイミューン・リミテッド
Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ　Ｌｉｍｉｔｅｄ
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合分子を用いた併用治療

(57)【要約】
本開示は、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合分子を含む併用療法、ならびにシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防および治療に用いるための関連組成物に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子またはその抗原結合断片であって、以下：
（ａ）ＳＹＡＭＮ（配列番号２１８）を含む重鎖ＣＤＲ１、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ＡＩＴＩＳＧＩＴＡＹＹＴＤＳＶＫＧ（配列番号２１９）を含む重鎖ＣＤＲ２、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；およびＥＥＦＬＰＧＴＨＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号２２０）を含む重鎖ＣＤＲ３、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；
（ｂ）ＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧ（配列番号２２１）を含む軽鎖ＣＤＲ１、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ＳＡＳＴＬＱＳ（配列番号２２２）を含む軽鎖ＣＤＲ２、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ならびにＬＱＤＹＮＹＰＷＴ（配列番号２２３）を含む軽鎖ＣＤＲ３、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；または（ａ）および（ｂ）の組み合わせ
を含む、単離結合分子またはその抗原結合断片。
【請求項２】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子またはその抗原結合断片であって、以下：
（ａ）ＳＹＡＭＮ（配列番号２１８）を含む重鎖ＣＤＲ１、ＡＩＴＩＳＧＩＴＡＹＹＴＤＳＶＫＧ（配列番号２１９）を含む重鎖ＣＤＲ２、およびＥＥＦＬＰＧＴＨＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号２２０）を含む重鎖ＣＤＲ３；ならびに
（ｂ）ＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧ（配列番号２２１）を含む軽鎖ＣＤＲ１、ＳＡＳＴＬＱＳ（配列番号２２２）を含む軽鎖ＣＤＲ２、およびＬＱＤＹＮＹＰＷＴ（配列番号２２３）を含む軽鎖ＣＤＲ３
を含む、単離結合分子またはその抗原結合断片。
【請求項３】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子またはその抗原結合断片であって、以下：
（ａ）配列番号２１６に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変領域；
（ｂ）配列番号２１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変領域；または（ａ）および（ｂ）の組み合わせ
を含む、単離結合分子またはその抗原結合断片。
【請求項４】
（ａ）配列番号２１６に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する重鎖可変領域；
（ｂ）配列番号２１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する軽鎖可変領域；または（ａ）および（ｂ）の組み合わせ
を含む、請求項３に記載の結合分子またはその断片。
【請求項５】
Ｖ２Ｌ２であり、以下：
（ａ）配列番号２１６を含む重鎖可変領域；および
（ｂ）配列番号２１７を含む軽鎖可変領域
を含む、請求項４に記載の結合分子またはその断片。
【請求項６】
前記Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する単離結合分子またはその抗原結合断片。
【請求項７】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、前記Ｖ２

Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する単離結合分子またはその抗原結合断片。

【請求項８】

組換え抗ＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項９】

モノクローナル抗ＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１０】

キメラ抗ＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１１】

ヒト化抗ＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１２】

ヒト抗ＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１３】

二重特異性抗体である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１４】

ＩＩＩ型分泌性毒素の標的細胞への輸送を阻害する、請求項１～１３のいずれか一項に記載の結合分子またはその断片。

【請求項１５】

シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインと、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインを含む二重特異性抗体。

【請求項１６】

Ｐｓｌ結合ドメインが、ｓｃＦｖ断片を含み、ＰｃｒＶ結合ドメインが、インタクトな免疫グロブリンを含む、請求項１５に記載の二重特異性抗体。

【請求項１７】

Ｐｓｌ結合ドメインが、インタクトな免疫グロブリンを含み、ＰｃｒＶ結合ドメインが、ｓｃＦｖ断片を含む、請求項１５に記載の二重特異性抗体。

【請求項１８】

ｓｃＦｖが、インタクトな免疫グロブリンのＶＨ領域のアミノ末端に融合される、請求項１６または１７に記載の二重特異性抗体。

【請求項１９】

ｓｃＦｖが、インタクトな免疫グロブリンのＣＨ３領域のカルボキシ末端に融合される、請求項１６または１７に記載の二重特異性抗体。

【請求項２０】

ｓｃＦｖが、インタクトな免疫グロブリンのヒンジ領域に挿入される、請求項１６または１７に記載の二重特異性抗体。

【請求項２１】

抗Ｐｓｌ結合ドメインが、ＷａｐＲ－００４の対応領域と少なくとも９０％同一の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する、請求項１５～２０のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２２】

抗Ｐｓｌ結合ドメインが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異

的に結合して、ＷａｐＲ－００４の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する、請求項１５～２１のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２３】

ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号１１および配列番号１２を含む、請求項２１または２２に記載の二重特異性抗体。

【請求項２４】

ＷａｐＲ－００４ＶＨおよびＶＬが、配列番号２２８、配列番号２２９、および配列番号２３５からなる群から選択される配列と一緒にＳｃＦｖとして配列される、請求項２３に記載の二重特異性抗体。

【請求項２５】

抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、請求項１５～２４のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２６】

抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する、請求項１５～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２７】

同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、Ｖ２Ｌ２の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む、請求項１５～２６のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２８】

Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬが、それぞれ、配列番号２１６および配列番号２１７を含む、請求項１５～２７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項２９】

ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬ（それぞれ、配列番号１１および配列番号１２）ならびにＶ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬ（それぞれ、配列番号２１６および配列番号２１７）を含む二重特異性抗体。

【請求項３０】

配列番号２２８、配列番号２２９、および配列番号２３５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む二重特異性抗体。

【請求項３１】

配列番号２１６または配列番号２１７のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項３２】

抗体である、請求項３１に記載のポリペプチド。

【請求項３３】

請求項１～２６のいずれか一項に記載の結合分子もしくはポリペプチドを含む、または産生する細胞。

【請求項３４】

請求項１～１４のいずれか一項に記載の結合分子、請求項１５～３０のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、または請求項３１もしくは３２に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド分子。

【請求項３５】

Ｖ２Ｌ２のＶＨ、Ｖ２Ｌ２のＶＬまたはＶ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬの両方をコードする単離ポリヌクレオチド分子であって、配列番号２３８、配列番号２３９、および配列番号２３８と配列番号２３９の両方からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

【請求項３６】
請求項３４または３５に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３７】
請求項３４もしくは３５に記載のポリヌクレオチド、または請求項３６に記載のベクターを含む細胞。
【請求項３８】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の結合分子、二重特異性抗体、またはポリペプチド、および薬学的に許容可能な担体を含む組成物。
【請求項３９】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインと、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインを含む組成物。
【請求項４０】
抗Ｐｓｌ結合ドメインが、ＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、またはＷａｐＲ－０１６の対応領域と少なくとも９０％同一の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する、請求項３９に記載の組成物。
【請求項４１】
抗Ｐｓｌ結合ドメインが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合して、ＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、またはＷａｐＲ－０１６の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む、請求項３９または４０に記載の組成物。
【請求項４２】
ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号１１および配列番号１２を含み、Ｃａｍ－００３のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号１および配列番号２を含み、Ｃａｍ－００４のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号３および配列番号２を含み、Ｃａｍ－００５のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号４および配列番号２を含み、ＷａｐＲ－００１のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号５および配列番号６を含み、ＷａｐＲ－００２のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号７および配列番号８を含み、ＷａｐＲ－００３のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号９および配列番号１０を含み、ＷａｐＲ－０１６のＶＨおよびＶＬが、それぞれ配列番号１５および配列番号１６を含む、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する、請求項３９～４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、Ｖ２Ｌ２の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬが、それぞれ、配列番号２１６および配列番号２１７を含む、請求項３９～４５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４７】
抗Ｐｓｌ結合ドメインが、ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬ領域、またはその抗原結合断片を含み、また、抗ＰｃｒＶ結合ドメインが、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬ領域、またはその抗原結合断片を含む、請求項３９～４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
抗Ｐｓｌ結合ドメインを含む第１結合分子と、ＰｃｒＶ結合ドメインを含む第２結合分子を含む、請求項３９～４７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４９】
第１結合分子が、抗体またはその抗原結合断片であり、第２結合分子が、抗体またはその抗原結合断片である、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
抗体またはその抗原結合断片が、独立して、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ）$_2$断片、ｓｃＦｖ断片、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５１】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメイン、およびシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインが、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上の異なる緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型に独立して結合する、請求項３９～５０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５２】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメイン、およびシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインが、感染患者から単離した緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％または少なくとも９５％に、独立して結合する、請求項３９～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】
緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株が、肺、唾液、眼、膿汁、糞便、尿、洞、創傷、皮膚、血液、骨、または膝液の１つまたは複数から単離される請求項５２に記載の組成物。
【請求項５４】
１つまたは複数の結合ドメインを、抗菌剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生物学的応答改質剤、医薬剤、リンホカイン、異種抗体またはその断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、および前記剤いずれかの２つ以上の組み合わせからなる群から選択される剤にコンジュゲートする、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５５】
検出可能な標識が、酵素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、または前記検出可能な標識いずれかの２つ以上の組み合わせからなる群から選択される、請求項５４に記載の組成物。
【請求項５６】
抗生物質をさらに含む、請求項３８～５５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５７】
抗生物質が、シプロフロキサシン、メロペネム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項５６に記載の組成物。
【請求項５８】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、有効量の請求項３９～５７のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含み、ここで、投与は、対象におけるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療に相乗的治療効果をもたらし、また、相乗効果が、個別の結合ドメ

インの等モル量の投与の個々の効果を合わせたものより大きい方法。
【請求項５９】
相乗的治療効果によって、結合ドメインの一方だけを投与した対象の相加生存率より高い生存率がもたらされる、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
組成物を２つ以上の予防／治療サイクルにわたって投与する、請求項５８または５９に記載の方法。
【請求項６１】
結合ドメインを同時に投与する、請求項５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
結合ドメインを連続的に投与する、請求項５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、有効量の請求項５６または５７に記載の組成物を対象に投与することを含み、ここで、投与が、対象におけるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療に相乗的治療効果をもたらし、また、相乗効果が、（ａ）シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインとシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメイン、および（ｂ）抗生物質の等モル量の投与の個々の効果を合わせたものより大きい方法。
【請求項６４】
相乗的治療効果が、（ａ）シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインとシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインのみ、または（ｂ）抗生物質のみを投与された対象の生存率より大きい相加生存率をもたらす、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
組成物を２つ以上の予防／治療サイクルにわたって投与する、請求項６３または６４に記載の方法。
【請求項６６】
（ａ）シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインとシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメイン、および（ｂ）抗生物質を同時に投与する、請求項６３～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
（ａ）シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインとシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメイン、および（ｂ）抗生物質を連続的に投与する、請求項６３～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染が、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染である、請求項５８～６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
対象が、ヒトである、請求項５８～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記感染が、眼感染、肺感染、熱傷感染、創傷感染、皮膚感染、血液感染、骨感染、または前記感染の２つ以上の組み合わせである、請求項５８～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
対象が、急性肺炎、熱傷、角膜感染、嚢胞性線維症、またはそれらの組み合わせを有する、請求項５８～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対

象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、有効量の請求項１～１４のいずれか一項に記載の結合分子もしくはその断片、請求項１５～３０のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、請求項３１または３２に記載のポリペプチド、請求項３８～５７のいずれか一項に記載の組成物、またはそれらの任意の組み合わせを前記対象に投与することを含む方法。

【請求項７３】

請求項３８～５７のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

電子書式で提出した配列表の参照

本出願と一緒に、２０１２年１１月６日作成、サイズ３８２キロバイトの「ｓｅｑｕｅｎｃｅｌｉｓｔｉｎｇ＿ＰＣＴａｓｃｉｉ．ｔｘｔ」という名称のＡＳＣＩＩテキストファイルにて電子書式で提出された配列表の内容は、参照により全体として本明細書に組み込むものとする。

【０００２】

本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防および治療に使用するための、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合分子ドメインを用いて併用療法に関する。さらに、本開示は、このような療法に有用な組成物を提供する。

【背景技術】

【０００３】

緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）は、易感染性個体内で急性および慢性感染の両方を引き起こすグラム陰性日和見病原体である（Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ １８９（２２）：８３５３－８３５６（２００７））。このことは、部分的には、臨床使用される抗生物質に対する細菌の高い自然耐性に起因し、部分的には、高度に抗生物質耐性のバイオフィルムの形成に起因する（Ｄｒｅｎｋａｒｄ Ｅ．，Ｍｉｃｒｏｂｅｓ Ｉｎｆｅｃｔ ５：１２１３－１２１９（２００３）；Ｈａｎｃｏｋｃ ＆ Ｓｐｅｅｒｔ，Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔ Ｕｐｄａｔｅ ３：２４７－２５５（２０００））。

【０００４】

緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）は、西洋諸国における院内感染の一般的原因である。これは、熱傷患者および免疫不全個体において菌血症の原因となる作用物質であることが多い。（Ｌｙｃｚａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｅｓ Ｉｎｆｅｃｔ ２：１０５１－１０６０（２０００））。これは、特に、人工呼吸器装着患者において院内感染グラム陰性肺炎の最も一般的な原因でもあり（Ｃｒａｖｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｎ Ｒｅｓｐｉｒ Ｉｎｆｅｃｔ １１：３２－５３（１９９６））、嚢胞性線維症の個体の肺中で最も高頻度に見られる病原体である。（Ｐｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＡＳＭ Ｎｅｗｓ ６：３３９－３４７（１９９８））。

【０００５】

シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエキソ多糖は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の表面に固定されることが報告されており、宿主組織のコロニー化の易化およびバイオフィルム形成の樹立／維持に重要であると考えられている（Ｊａｃｋｓｏｎ，Ｋ．Ｄ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １８６，４４６６－４４７５（２００４））。この構造は、マンノースリッチ繰り返し五糖を含む（Ｂｙｒｄ，Ｍ．Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ７３，６２２－６３８（２００９））。

【０００６】

ＰｃｒＶは、ＩＩＩ型分泌系の比較的保存された成分である。ＰｃｒＶは、ＩＩＩ型分泌性毒素の標的真核細胞への送達を媒介するＩＩＩ型分泌装置の輸送装置の不可欠な成分

であると考えられる（Ｓａｗａ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．５，３９２－３９８（１９９９））。ＰｃｒＶに対する能動および受動免疫は、細胞傷害性緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）に感染したマウスの急性肺傷害および死亡率を改善した（Ｓａｗａ　ｅｔ　ａｌ．２００９）。ＰｃｒＶに対する免疫の主要な作用は、ＩＩＩ型分泌性毒素の標的真核細胞への輸送の遮断によるものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

多剤耐性の増加に起因して、新たなシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）特異的防止および治療剤の同定のための新規方針の開発が当分野において依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

簡単な概要

本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子またはその抗原結合断片を提供し、これは、以下を含む：（ａ）ＳＹＡＭＮ（配列番号２１８）を含む重鎖ＣＤＲ１、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ＡＩＴＩＳＧＩＴＡＹＹＴＤＳＶＫＧ（配列番号２１９）を含む重鎖ＣＤＲ２、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ＥＥＦＬＰＧＴＨＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号２２０）を含む重鎖ＣＤＲ３、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；（ｂ）ＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧ（配列番号２２１）を含む軽鎖ＣＤＲ１、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ＳＡＳＴＬＱＳ（配列番号２２２）を含む軽鎖ＣＤＲ２、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；ならびにＬＱＤＹＮＹＰＷＴ（配列番号２２３）を含む軽鎖ＣＤＲ３、または１、２、３、もしくは４つの保存アミノ酸置換を含むそのバリアント；あるいは（ａ）および（ｂ）の組み合わせ。一実施形態では、結合分子またはその抗原結合断片は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合し、これは、以下を含む：（ａ）ＳＹＡＭＮ（配列番号２１８）を含む重鎖ＣＤＲ１、ＡＩＴＩＳＧＩＴＡＹＹＴＤＳＶＫＧ（配列番号２１９）を含む重鎖ＣＤＲ２、およびＥＥＦＬＰＧＴＨＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号２２０）を含む重鎖ＣＤＲ３；ならびに（ｂ）ＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧ（配列番号２２１）を含む軽鎖ＣＤＲ１、ＳＡＳＴＬＱＳ（配列番号２２２）を含む軽鎖ＣＤＲ２、およびＬＱＤＹＮＹＰＷＴ（配列番号２２３）を含む軽鎖ＣＤＲ３。一実施形態では、単離された結合分子またはその抗原結合断片は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合し、これは、以下を含む：（ａ）配列番号２１６に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する重鎖可変領域；（ｂ）配列番号２１７に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する軽鎖可変領域；または（ａ）および（ｂ）の組み合わせ。別の実施形態では、結合分子またはその抗原結合断片は、以下を含む：（ａ）配列番号２１６に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する重鎖可変領域；（ｂ）配列番号２１７に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する軽鎖可変領域；または（ａ）および（ｂ）の組み合わせ。別の実施形態では、結合分子またはその抗原結合断片は、Ｖ２Ｌ２であり、以下を含む：（ａ）配列番号２１６を含む重鎖可変領域；および（ｂ）配列番号２１７を含む軽鎖可変領域。

【０００９】

一実施形態において、本開示は、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する単離結合分子またはその抗原結合断片を提供する。別の実施形態では、本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する単離結合分子またはその抗原結

合断片を提供する。一実施形態では、結合分子またはその断片は、組換え抗体である。一実施形態では、結合分子またはその断片は、モノクローナル抗体である。一実施形態では、結合分子またはその断片は、キメラ抗体である。一実施形態では、結合分子またはその断片は、ヒト化抗体である。一実施形態では、結合分子またはその断片は、ヒト抗体である。一実施形態では、結合分子またはその断片は、二重特異性抗体である。

【００１０】

一実施形態において、結合分子またはその抗原結合断片は、ＩＩＩ型分泌性毒素の標的細胞への輸送を阻害する。

【００１１】

一実施形態において、本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインと、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインを含む二重特異性抗体を提供する。一実施形態では、Ｐｓｌ結合ドメインは、ｓｃＦｖ断片を含み、ＰｃｒＶ結合ドメインは、インタクトな免疫グロブリンを含む。一実施形態では、Ｐｓｌ結合ドメインは、インタクトな免疫グロブリンを含み、前記ＰｃｒＶ結合ドメインは、ｓｃＦｖ断片を含む。一実施形態では、ｓｃＦｖは、インタクトな免疫グロブリンのＶＨ領域のアミノ末端に融合させる。一実施形態では、ｓｃＦｖは、インタクトな免疫グロブリンのＣＨ３領域のカルボキシ末端に融合させる。一実施形態では、ｓｃＦｖは、インタクトな免疫グロブリンのヒンジ領域に挿入する。

【００１２】

一実施形態において、抗Ｐｓｌ結合ドメインは、ＷａｐＲ－００４の対応領域と少なくとも９０％同一の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）領域の抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、抗Ｐｓｌ結合ドメインは、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合し、ＷａｐＲ－００４の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する。一実施形態では、ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号１１および配列番号１２を含む。一実施形態では、ＷａｐＲ－００４配列は、配列番号２２８、配列番号２２９、および配列番号２３５からなる群から選択される。一実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する。別の実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号２１６および配列番号２１７を含む。一実施形態では、ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬ（それぞれ配列番号１１および配列番号１２）ならびにＶ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬ（それぞれ配列番号２１６および配列番号２１７）。一実施形態では、二重特異性抗体は、配列番号２２８、配列番号２２９、および配列番号２３５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１３】

一実施形態において、本開示は、配列番号２１６または配列番号２１７のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。一実施形態では、ポリペプチドは抗体である。

【００１４】

一実施形態において、本開示は、本明細書に開示する結合分子もしくはポリペプチドを含むまたは産生する細胞を提供する。

【００１５】

一実施形態において、本開示は、本明細書に記載する、結合分子もしくはポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド分子を提供する。一実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、配列番号２３８および配列番号２３９からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、本開示は、本明細書に記載するポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。別の実施形態では、本開示は、ポリヌクレオチドまたはベクターを含む細胞を提供する。

【００１６】

一実施形態では、本開示は、本明細書に記載する、結合分子、二重特異性抗体、もしくはポリペプチド、および薬学的に許容可能な担体を含む組成物を提供する。

【００１７】

一実施形態において、本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに結合する結合ドメインと、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合する結合ドメインを含む組成物を提供する。一実施形態では、抗Ｐｓｌ結合ドメインは、ＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、またはＷａｐＲ－０１６の対応領域と少なくとも９０％同一の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、抗Ｐｓｌ結合ドメインは、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合して、ＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、またはＷａｐＲ－０１６の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する。一実施形態では、ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号１１および配列番号１２を含み、Ｃａｍ－００３のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号１および配列番号２を含み、Ｃａｍ－００４のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号３および配列番号２を含み、Ｃａｍ－００５のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号４および配列番号２を含み、ＷａｐＲ－００１のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号５および配列番号６を含み、ＷａｐＲ－００２のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号７および配列番号８を含み、ＷａｐＲ－００３のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号９および配列番号１０を含み、ＷａｐＲ－０１６のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号１５および配列番号１６を含む。一実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合して、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻止する。一実施形態では、抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２の対応領域と少なくとも９０％同一のＶＨおよびＶＬ領域を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬは、それぞれ配列番号２１６および配列番号２１７を含む。一実施形態では、抗Ｐｓｌ結合ドメインは、ＷａｐＲ－００４のＶＨおよびＶＬ領域を含み、また、前記抗ＰｃｒＶ結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２のＶＨおよびＶＬ、またはその抗原結合断片を含む。

【００１８】

一実施形態では、組成物は、前記抗Ｐｓｌ結合ドメインを含む第１結合分子と、ＰｃｒＶ結合ドメインを含む第２結合分子を含む。一実施形態では、第１結合分子は、抗体またはその抗原結合断片であり、前記第２結合分子は、抗体またはその抗原結合断片である。一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、独立して、モノクローナル、ヒト化、キメラ、ヒト、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ）２断片、およびｓｃＦｖ断片からなる群から選択される。一実施形態では、結合ドメイン、結合分子またはその断片は、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上の異なる緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓ

ａ）血清型に結合する。一実施形態では、結合ドメイン、結合分子またはその断片は、感染患者から単離した緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％または少なくとも９５％に結合する。一実施形態では、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株は、肺、唾液、眼、膿汁、糞便、尿、洞、創傷、皮膚、血液、骨、または膝液の１つまたは複数から単離される。一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片を、抗菌剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生物学的応答改質剤、医薬剤、リンホカイン、異種抗体またはその断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、および前記薬剤いずれかの２つ以上の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートする。一実施形態では、検出可能な標識は、酵素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、または前記検出可能な標識いずれかの２つ以上の組み合わせからなる群から選択される。

【００１９】

一実施形態において、本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、対象に、有効量の本明細書に記載の組成物を投与することを含む方法を提供し、ここで、前記投与は、前記対象におけるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療に相乗的治療効果をもたらし、また、前記相乗効果は、個別の結合ドメインの等モル量の投与の個々の効果を合わせたものより大きい。一実施形態では、相乗的治療効果によって、結合ドメインの一方だけを投与した対象の相加生存率より高い生存率がもたらされる。一実施形態では、組成物を２つ以上の予防／治療サイクルにわたって投与する。一実施形態では、結合ドメインまたは結合分子を同時に投与する。一実施形態では、結合ドメインまたは結合分子を連続的に投与する。一実施形態では、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）である。一実施形態では、対象はヒトである。一実施形態では、感染は、眼感染、肺感染、熱傷感染、創傷感染、皮膚感染、血液感染、骨感染、または前記感染の２つ以上の組み合わせである。一実施形態では、対象は、急性肺炎、熱傷、角膜感染、嚢胞性線維症、またはそれらの組み合わせを有する。

【００２０】

一実施形態において、本開示は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、対象に、有効量の本明細書に記載の結合分子もしくはその断片、二重特異性抗体、ポリペプチド、または組成物を投与することを含む方法を提供する。

【００２１】

一実施形態において、本開示は、本明細書に記載の組成物を含むキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１－１】図１（Ａ－Ｆ）：ヒト抗体ファージライブラリーを用いる表現型全細胞スクリーニングは、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）機能的活性特異的抗体を同定した。（Ａ）完全抗体選択方針の概要。（Ｂ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）に最近曝露された患者から抗体可変領域遺伝子を単離する方法を記載するフローダイヤグラム。（Ｃ）クローニングされた抗体レパートリーのサイズおよび多様性を示すｓｃＦｖファージディスプレイライブラリーの特徴。（Ｄ）懸濁液中の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）３０６４ΔＷａｐＲ（[1]）または緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰＡＯ１　ＭｅｘＡＢ　ＯｐｒＭΔＷａｐＲ（[2]）に基づき選択する場合の患者抗体ライブラリーまたはナイーブ抗体ライブラリーのいずれかを効率的に使用するファージディスプレイ選択効率の比較。バーは、それぞれの選択ラウンドにおけるアウトプット力価（ＣＦＵ）を示し、円は、重複ＶＨＣＤＲ３配列の比率、クローン濃縮の指標を示す。（Ｅ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の複数の株への結合を試験するためのファージディスプレイからのｓｃＦＶのＥＬＩＳＡスクリーン。ＥＬＩＳＡデータ（４５０ｎｍにおける吸光度）を選択

からの８つの個々のファージ－ｓｃＦｖおよび１つの無関連ファージ－ｓｃＦｖについて示す。（Ｆ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）特異的抗体とユニークな緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型からの代表株とのＦＡＣＳ結合。それぞれの試験抗体について、ヒトＩｇＧ陰性対照抗体を陰影ピークとして示す。

【図１－２】図１－１に同じ。

【図１－３】図１－１に同じ。

【００２３】

【図２】図２（Ａ－Ｂ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進するｍＡｂの評価。（Ａ）ファージパニングに由来する精製モノクローナル抗体の希釈物を用いる発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）を用いるオプソニン食菌アッセイ。（Ｂ）ファージパニングに由来する精製ＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３モノクローナル抗体の希釈物を用いる発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ１１株（９８８２－８０．ｌｕｘ）を用いるオプソニン食菌アッセイ。ＡおよびＢの両方において、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）抗原に結合しないアイソタイプ適合ヒトモノクローナル抗体Ｒ３４７を陰性対照として使用した。

【００２４】

【図３－１】図３（Ａ－Ｉ）：表現型スクリーニングに由来する抗体の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）Ｐｓｌエキソ多糖標的の同定。抗体の反応性は、示された緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株によりコートされたプレート上で間接ＥＬＩＳＡにより測定した：（Ａ）野生型ＰＡＯ１、ＰＡＯ１ΔｗｂｐＬ、ＰＡＯ１ΔｒｍｌＣおよびＰＡＯ１ΔｇａｌＵ。（Ｂ）ＰＡＯ１ΔｐｓｌＡ。Ｇｅｎｗａｙ抗体は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外膜タンパク質に特異的であり、陽性対照として使用した。（Ｃ）ＰＡＯ１およびＰＡＯ１ΔｐｓｌＡへのＣａｍ－００３のＦＡＣＳ結合分析。Ｃａｍ－００３を、黒色実線および明確なピークにより示し；アイソタイプ適合非緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）特異的ヒトＩｇＧ１抗体を陰性対照として使用し、灰色線および陰影ピークにより示す。（Ｄ）ＰＡＯ１およびＰＡＯ１ΔｐｓｌＡから精製されたＬＰＳをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分解し、外膜へのＯ抗原輸送およびアルギネート産生を欠損する突然変異株ＰＡＯ１ΔｗａｐＲΔａｌｇＤによりワクチン接種させたマウスに由来する抗血清により免疫ブロットした。（Ｅ）ＰＡＯ１のアイソジェニック突然変異体を用いるＣａｍ－００３ＥＬＩＳＡ結合データ。Ｃａｍ－００３は、Ｐｓｌを発現する株にのみ結合することができる。ｐＰＷ１４５は、ｐｓｌＡを含有するｐＵＣＰ発現ベクターである。（ＦおよびＧ）Ｃａｍ－００３が、Ｐｓｌを産生し得る株（野生型ＰＡＯ１、およびｐｓｌＡ遺伝子によりトランスで補完されたＰＡＯ１ΔｐｓｌＡ）の殺傷のみを媒介することを示すオプソニン食菌アッセイ。（ＨおよびＩ）抗Ｐｓｌ抗体ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００４、およびＷａｐＲ－０１６とＰＡＯ１ΔｗｂｐＬΔａｌｇＤおよびＰＡＯ１ΔｗｂｐＬΔａｌｇＤΔｐｓｌＡとの反応性を示すＥＬＩＳＡデータ。Ｒ３４７を全ての実験において陰性対照として使用した。

【図３－２】図３－１に同じ。

【図３－３】図３－１に同じ。

【００２５】

【図４】図４：抗ＰｓｌｍＡｂは、Ａ５４９細胞への発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１．ｌｕｘの細胞付着を阻害する。対数増殖期ＰＡＯ１．ｌｕｘをＡ５４９細胞のコンフルエント単層に１０のＭＯＩにおいて添加し、次いで繰り返し洗浄して未結合緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）を除去した後にＲＬＵを分析した。結果は、それぞれの抗体濃度についてデュプリケートで実施された３つの独立実験を代表するものである。

【００２６】

【図５】図５（Ａ－Ｃ）インビボ継代した緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株は、Ｐｓｌの発現を維持／増加させる。Ｃａｍ－００３抗体を黒色実線および明確なピークにより示し；ヒトＩｇＧ陰性対照抗体を灰色線および陰影ピークにより示す。（Ａ）陽性対照

については、Ｃａｍ－００３を一晩培養物から対数増殖期に成長させた株（約５×１０^{8}／ｍｌ）への結合についてアッセイした。（Ｂ）それぞれの株についての接種材料は、細胞叢に成長させた一晩ＴＳＡプレートから５×１０^{8}ＣＦＵ／ｍｌに調製し、フローサイトメトリーによりＣａｍ－００３に対する反応性について試験した。（Ｃ）腹腔内チャレンジ４時間後、細菌をマウスから腹腔洗浄により回収し、フローサイトメトリーによりＣａｍ－００３を用いてＰｓｌの存在についてアッセイした。

【００２７】

【図６－１】図６（Ａ－Ｆ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎モデルにおける抗Ｐｓｌモノクローナル抗体Ｃａｍ－００３またはＷａｐＲ－００４により処理された動物についての生存率。（Ａ～Ｄ）動物を、Ｃａｍ－００３により４５、１５、および５ｍｇ／ｋｇにおいて、およびＲ３４７により４５ｍｇ／ｋｇにおいてまたはＰＢＳにより２４時間処理してから（Ａ）ＰＡＯ１（１．６×１０^{7}ＣＦＵ）、（Ｂ）３３３５６（３×１０^{7}ＣＦＵ）、（Ｃ）６２９４（７×１０^{6}ＣＦＵ）、（Ｄ）６０７７（１×１０^{6}ＣＦＵ）により鼻腔内感染させた。（Ｅ～Ｆ）動物を、ＷａｐＲ－００４により５および１ｍｇ／ｋｇにおいて示されるとおり処理し、次いで６０７７により（Ｅ）（８×１０^{5}ＣＦＵ）、または（Ｆ）（６×１０^{5}ＣＦＵ）において感染させた。動物を７２時間（Ａ～Ｄ）までまたは１２０時間（Ｅ～Ｆ）についての生存率について慎重にモニタリングした。全ての実験において、ＰＢＳおよびＲ３４７は陰性対照として機能した。結果は、カプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差をＣａｍ－００３対Ｒ３４７についてログランク検定により計算した。（Ａ）Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００３；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００３３）。（Ｂ）Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１２；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１２；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０３７３）。（Ｃ）Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００７；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１９；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０２１２）。（Ｄ）Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００１）。結果は、少なくとも２つの独立実験を代表するものである。（Ｅ）［Ｃａｍ－００３（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．０２；Ｃａｍ－００３（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．４８４８；ＷａｐＲ－００４（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＜０．０００１；ＷａｐＲ－００４（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．０８８６；ＷａｐＲ－００４（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｃａｍ－００３（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．００１７；ＷａｐＲ－００４（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｃａｍ－００３（１ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．２４６８；Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）対ＰＢＳ：Ｐ＝０．６６７６］（Ｆ）［Ｃａｍ－００３（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．０００４；Ｃａｍ－００３（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＜０．０００１；ＷａｐＲ－００４（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＜０．０００１；ＷａｐＲ－００４（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＜０．０００１；ＷａｐＲ－００４（５ｍｇ／ｋｇ）対Ｃａｍ－００３（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．０００２；ＷａｐＲ－００４（１ｍｇ／ｋｇ）対Ｃａｍ－００３（１ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．２６２８；Ｒ３４７（５ｍｇ／ｋｇ）対ＰＢＳ：Ｐ＝０．６６７６。結果は、５つの独立実験を代表するものである。

【図６－２】図６－１に同じ。

【図６－３】図６－１に同じ。

【００２８】

【図７－１】図７（Ａ－Ｆ）：抗Ｐｓｌモノクローナル抗体Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４は、急性肺炎の誘導後の臓器負荷を低減させる。マウスをＣａｍ－００３抗体により２４時間処理してから（Ａ）ＰＡＯ１（１．１×１０^{7}ＣＦＵ）、（Ｂ）３３３５６（１×１０^{7}ＣＦＵ）、（Ｃ）６２９４（６．２５×１０^{6}ＣＦＵ）（Ｄ）６０７７（１×１０^{6}ＣＦＵ）により感染させ、ＷａｐＲ－００４抗体により２４時間処理してから（Ｅ）６２９４（約１×１０^{7}ＣＦＵ）、および（Ｆ）６２０６（約１×１０^{6}ＣＦＵ）

により感染させた。感染２４時間後、動物を安楽死させ、次いで生存ＣＦＵの同定のために臓器を摘出した。生存ＣＦＵの差は、Ｃａｍ－００３またはＷａｐＲ－００４対Ｒ３４７についてマン・ホイットニーＵ検定により決定した。（Ａ）肺：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１５；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００２１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１５）；脾臓：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０１２０；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０３６７）；腎臓：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００９２；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００５６）；（Ｂ）肺：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１０；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００４５）；（Ｃ）肺：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００３；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００３９；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００６８）；脾臓：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００５７；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０２３０；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１２）；（Ｄ）肺：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００５；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００３；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００７）；脾臓：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１５；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００８９；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００８９）；腎臓：Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０１９１；１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０３５５；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００２１）。（Ｅ）肺：ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００４；１ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００２）；脾臓：ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００１４；１ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１）；Ｆ）肺：ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００６；１ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００７９）；脾臓：ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００５９；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０２６１；１ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．００４７）；腎臓：ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０２０８；５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０２６８。

【図７－２】図７－１に同じ。

【図７－３】図７－１に同じ。

【００２９】

【図８－１】図８（Ａ－Ｇ）：抗Ｐｓｌモノクローナル抗体Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）角膜炎モデルおよび熱損傷モデルにおいて活性である。マウスを対照ＩｇＧ１抗体またはＣａｍ－００３により４５ｍｇ／ｋｇ（Ａ、Ｂ）もしくは１５ｍｇ／ｋｇ（Ｃ、Ｄ）においてまたはＰＢＳまたは対照ＩｇＧ１抗体またはＣａｍ－００３により４５ｍｇ／ｋｇにおいてまたはＷａｐＲ－００４により４５ｍｇ／ｋｇもしくは１５ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ（Ｆ、Ｇ）において２４時間処理してから６０７７（Ｏ１１－細胞毒性－２×１０^{6}ＣＦＵ）により感染させた。感染直前、３つの１ｍｍの擦り傷をそれぞれの動物の左角膜上に作り、次いで５μｌの接種材料中の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）を局所塗布した。感染２４時間後、角膜病理学的スコアを計算し、次いで生存ＣＦＵの測定のために眼を摘出した。病理学的スコアおよび生存ＣＦＵの差は、マン・ホイットニーＵ検定により決定した。（Ａ）Ｐ＝０．０００１、（Ｂ）Ｐ＜０．０００１、（Ｃ）Ｐ＝０．０００３、（Ｄ）Ｐ＝０．００１５。（Ｆ）および（Ｇ）Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ）対ＷａｐＲ－００４（４５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．０１８；Ｃａｍ－００３（４５ｍｇ／ｋｇ）対ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．００２５；ＷａｐＲ－００４（４５ｍｇ／ｋｇ）対ＷａｐＲ－００４（１５ｍｇ／ｋｇ）：Ｐ＝０．１３３１；ＷａｐＲ－００４（５ｍｇ／ｋｇ）対対照：Ｐ＜０．０００１。結果は、５つの独立実験を代表するものである。（Ｅ）６０７７感染（２×１０^{5}ＣＦＵ）後の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおけるＣａｍ－００３およびＲ３４７処理ＣＦ－１マウスからの生存率分析（ログランク：Ｒ３４７対Ｃａｍ－００３　１５ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００９４；Ｒ３４７対Ｃａｍ－００３　５ｍｇ／ｋｇ、Ｐ＝０．００１７）。結果は、少なくとも３つの独立実験を代表するものである。（ｎ）は、それぞれの群の動物数を指す。図８（Ｈ）：抗Ｐｓｌおよび抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）マウス眼角膜炎モデ

ルにおいて活性である。マウスに、ＰＢＳもしくは対照ＩｇＧ１抗体（Ｒ３４７）を４５ｍｇ／ｋｇで、またはＷａｐＲ－００４（α－Ｐｓｌ）を５ｍｇ／ｋｇで、またはＶ２Ｌ２（α－ＰｃｒＶ）を５ｍｇ／ｋｇで腹腔内（ＩＰ）注射してから１６時間後に、６０７７（Ｏ１１－細胞傷害性－１×１０^{6}ＣＦＵ）により感染させた。感染直前に、マウスを麻酔してから、解剖顕微鏡下で２７ゲージ針を用い、３つの１ｍｍの擦り傷を各マウスの片方の眼の角膜および間質表層上に作り、次いで５μｌの接種材料中の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６０７７株を局所塗布した。

【図８－２】図８－１に同じ。

【図８－３】図８－１に同じ。

【００３０】

【図９】図９（Ａ－Ｃ）：Ｃａｍ－００３Ｆｃ突然変異抗体、Ｃａｍ－００３－ＴＭは、ＯＰＫおよびインビボ効力を縮小させたが、抗細胞付着活性を維持した。（Ａ）Ｃａｍ－００３およびＦｃγ受容体とのＦｃ相互作用を妨げるＦｃドメイン中の突然変異を保有するＣａｍ－００３－ＴＭ（Ｏｇａｎｅｓｙａｎ，Ｖ．，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ　Ｄ　Ｂｉｏｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ　６４，７００－７０４（２００８））を用いるＰＡＯ１．ｌｕｘ　ＯＰＫアッセイ。Ｒ３４７を陰性対照として使用した。（Ｂ）Ｃａｍ－００３およびＣａｍ－００３－ＴＭを用いるＰＡＯ１細胞付着アッセイ。（Ｃ）Ｃａｍ－００３対Ｃａｍ－００３－ＴＭの効力を比較する急性肺炎モデル。

【００３１】

【図１０－１】図１０（Ａ－Ｃ）抗Ｐｓｌモノクローナル抗体についてのエピトープマッピングおよびその相対結合親和性の同定。エピトープマッピングは、競合ＥＬＩＳＡにより実施し、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１の一晩培養物の上澄みに由来するＰｓｌを用いるＯＣＴＥＴ（登録商標）フローシステムを使用して確認した。相対結合親和性は、ＦＯＲＴＥＢＩＯ（登録商標）ＯＣＴＥＴ（登録商標）３８４装置上で計測した。細胞付着が最大で阻害された抗体濃度およびそれぞれの抗体についてのＯＰＫ　ＥＣ５０値も示す。Ｂ．ＦＯＲＴＥＢＩＯ（登録商標）ＯＣＴＥＴ（登録商標）３８４装置上で計測された種々のＷａｐＲ－００４突然変異体の相対結合親和性。それぞれの突然変異体についてのＯＰＫ　ＥＣ５０値も示す。

【図１０－２】図１０－１に同じ。

【図１０－３】図１０－１に同じ。

【００３２】

【図１１－１】図１１（Ａ－Ｍ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）オプソニン食作用傷害（ＯＰＫ：ｏｐｓｏｎｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ　ｋｉｌｌｉｎｇ）アッセイにおけるＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体クローンの評価。（Ａ～Ｍ）ｓｃＦｖ－Ｆｃフォーマットの異なるＷ４突然変異体クローンの希釈物を用いる発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）を用いるＯＰＫアッセイ。一部の例において、Ｗ４ＩｇＧ１をアッセイに含め、Ｗ４－ＩｇＧ１として示した。Ｗ４－ＲＡＤ－ＣａｍおよびＷ４－ＲＡＤ－ＧＢは、本明細書に記載の同一のＷａｐＲ－００４ＲＡＤ配列を表す。「Ｗ４－ＲＡＤ」は、ＷａｐＲ－００４ＲＡＤの略称であり、パネルＤからＭのＷ４－ＲＡＤ－ＣａｍおよびＷ４－ＲＡＤ－ＧＢの名称は、ＷａｐＲ－００４ＲＡＤの２つの異なる調製物を表す。図１１（Ｎ－Ｑ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＯＰＫアッセイにおけるリード（ＷａｐＲ－００４）最適化由来の最適化抗Ｐｓｌ　ｍＡｂｓの評価。（Ｎ～Ｏ）精製したリード最適化モノクローナル抗体の希釈物を用いた、発光ＰＡＯ１．ｌｕｘによるＯＰＫアッセイ。（Ｐ～Ｑ）結果を確認するための、精製ｍＡｂｓの希釈物を用いた、ＰＡＯ１．ｌｕｘによる反復ＯＰＫアッセイ。（Ｎ～Ｑ）：Ｗ４－ＲＡＤを比較陽性対照として用いた。全ての実験において、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）抗原に結合しないヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体Ｒ３４７を陰性対照として使用した。

【図１１－２】図１１－１に同じ。

【図１１－３】図１１－１に同じ。

【図１１－４】図１１－１に同じ。
【図１１－５】図１１－１に同じ。
【図１１－６】図１１－１に同じ。
【図１１－７】図１１－１に同じ。
【図１１－８】図１１－１に同じ。
【００３３】
【図１２－１】図１２（Ａ－Ｈ）：（Ａ）ＰｃｒＶエピトープ多様性。（Ｂ）親Ｖ２Ｌ２ｍＡｂ、ｍＡｂ１６６（陽性対照）およびＲ３４７（陰性対照）についての細胞傷害性の阻害率（％）の分析。（Ｃ）ＲＢＣの溶解を阻害するＶ２Ｌ２ｍＡｂ、ｍＡｂ１６６（陽性対照）およびＲ３４７（陰性対照）の能力の評価。（Ｄ）ＲＢＣの溶解を阻害するＶ２Ｌ２－生殖系列化ｍＡｂ（Ｖ２Ｌ２－ＧＬ）および最適化Ｖ２Ｌ２－ＧＬ　ｍＡｂ（Ｖ２Ｌ２－Ｐ４Ｍ、Ｖ２Ｌ２－ＭＦＳ、Ｖ２Ｌ２－ＭＤおよびＶ２Ｌ２－ＭＲ）の評価。（Ｅ）ＲＢＣの溶解を阻害するｍＡｂ　１Ｅ６、１Ｆ３、１１Ａ６、２９Ｄ２、ＰＣＲＶ０２およびＶ２Ｌ７の評価。（Ｆ）ＲＢＣの溶解を阻止するｍＡｂ　Ｖ２Ｌ２および２９Ｄ２の評価。（Ｇ～Ｈ）Ｖ２Ｌ２－ＧＬおよびＶ２Ｌ２－ＭＤ抗体の相対結合親和性。
【図１２－２】図１２－１に同じ。
【図１２－３】図１２－１に同じ。
【図１２－４】図１２－１に同じ。
【図１２－５】図１２－１に同じ。
【図１２－６】図１２－１に同じ。
【図１２－７】図１２－１に同じ。
【００３４】
【図１３－１】図１３（Ａ－Ｉ）：抗ＰｃｒＶ抗体処理マウスのｉｎ　ｖｉｖｏ生存試験。（Ａ）マウスを４５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（陰性対照）、４５ｍｇ／ｋｇ、１５．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは１．０ｍｇ／ｋｇのｍＡｂ１６６（陽性対照）、または１５ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは０．２ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２で処理してから２４時間後に、１．０３×10^6ＣＦＵ６０７７（ｅｘｏＵ$^+$）により感染させた。生存を９６時間モニタリングした。（Ｂ）マウスを１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（陰性対照）、１５．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは１．０ｍｇ／ｋｇのｍＡｂ１６６（陽性対照）、または１５．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは１．０ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２で処理してから２４時間後に、２．１×10^7ＣＦＵ６２９４（ｅｘｏＳ$^+$）により感染させた。生存を１６８時間モニタリングした。マウスをＲ３４７（陰性対照）、５ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ抗体ＰｃｒＶ－０２、もしくは５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇもしくは０．０４ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２で処理してから２４時間後に、（Ｃ）６２９４（Ｏ６）または（Ｄ）ＰＡ１０３Ａにより感染させた。マウスをＲ３４７（陰性対照）、５ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ抗体ＰｃｒＶ－０２、Ｖ２Ｌ７（５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）、３Ｇ５（５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）、または１１Ａ６（５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）（Ｅ）、または２５ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ７、１Ｅ６、１Ｆ３、２９Ｄ２、Ｒ３４７もしくは１ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ抗体ＰｃｒＶ－０１（Ｆ）、または２５ｍｇ／ｋｇの２１Ｆ１、Ｖ２Ｌ２、２Ｈ３、４Ａ８、ＳＨ３、ＬＥ１０、Ｒ３４７もしくは１ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ－０２（Ｇ）、または２９Ｄ２（１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇもしくは１０ｍｇ／ｋｇ）、Ｖ２Ｌ２（１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇもしくは１０ｍｇ／ｋｇ）、Ｒ３４７または１ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ－０２（Ｈ）で処理してから２４時間後に、６０７７株により感染させた。マウスをＶ２Ｌ２（０．０４ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、Ｒ３４７または５ｍｇ／ｋｇのＰｃｒＶ－０２で処理してから２４時間後に、６２９４（Ｏ６）またはＰＡ１０３Ａに感染させた。急性肺炎モデルで生存パーセントをアッセイした。
【図１３－２】図１３－１に同じ。
【図１３－３】図１３－１に同じ。

【図１３－４】図１３－１に同じ。
【図１３－５】図１３－１に同じ。
【図１３－６】図１３－１に同じ。
【図１３－７】図１３－１に同じ。
【００３５】
【図１４－１】図１４：Ｖ２Ｌ２処理マウスの臓器負荷分析。マウスを（Ａ）Ｒ３４７（陰性対照）、１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、もしくは０．０７ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２、および（Ｂ）１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（陰性対照）；１５．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは１．０ｍｇ／ｋｇのｍＡｂ１６６（陽性対照）；または５．０ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは０．２ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２で２４時間処理してから、６２０６株により感染させた。コロニー形成単位は、肺、脾臓および腎臓の組織のグラム当たりで決定した。
【図１４－２】図１４－１に同じ。
【００３６】
【図１５】図１５：Ｖ２Ｌ２およびＷａｐＲ－００４（Ｗ４）処理マウスの臓器負荷分析。マウスをＲ３４７（陰性対照）、Ｖ２Ｌ２単独、またはＷ４の濃度を増しながら（０．１、０．５、１．０、もしくは２．０ｍｇ／ｋｇ）これと併用したＶ２Ｌ２（０．１ｍｇ／ｋｇ）で処理してから２４時間後に、６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）により感染させた。コロニー形成単位は、肺、脾臓および腎臓の組織のグラム当たりで決定した。
【００３７】
【図１６－１】図１６（Ａ－Ｇ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎モデルにおける抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２により処理された動物についての生存率。パネルＡ～ＧのＶ２Ｌ２－ＧＬ、Ｖ２Ｌ２－ＭＤ、Ｖ２Ｌ２－ＰＭ４、Ｖ２Ｌ２－ＡおよびＶ２Ｌ２－ＭＦＳの名称は、Ｖ２Ｌ２の様々な調製物を表す。（Ａ～Ｃ）動物を１ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２、または０．５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから、（Ａ）６０７７（９．７５×10^5ＣＦＵ）、（Ｂ、Ｃ）６０７７（９．５×10^5ＣＦＵ）により鼻腔内感染させた。（Ｄ～Ｆ）動物を０．５ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２、または０．５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから、（Ｄ）（１×10^6ＣＦＵ）、（Ｅ）（９．５×10^5ＣＦＵ）またはＦ（１．０２６×10^6ＣＦＵ）の６０７７により感染させた。（Ｇ）動物をＶ２Ｌ２－ＭＤ（０．０４ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、もしくは５ｍｇ／ｋｇ）、（０．２ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇもしくは１５ｍｇ／ｋｇ）のｍＡｂ１６６（陽性対照）、または０．５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから、６２０６（２×10^{7+}ＣＦＵ）により感染させた。
【図１６－２】図１６－１に同じ。
【図１６－３】図１６－１に同じ。
【図１６－４】図１６－１に同じ。
【００３８】
【図１７】図１７（Ａ－Ｂ）：（Ａ）Ｂｓ１－ＴＮＦα／Ｗ４、Ｂｓ２－ＴＮＦα／Ｗ４、Ｂｓ３－ＴＮＦα／Ｗ４ならびに（Ｂ）Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２／Ｗ４－ＲＡＤ、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２／Ｗ４－ＲＡＤ、およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２／Ｗ４－ＲＡＤ　Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体の概略図。（Ａ）Ｂｓ１－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＴＮＦαＶＬのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ２－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＴＮＦαＶＨのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ３－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＣＨ３のカルボキシ末端に融合させる。（Ｂ）Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃの場合、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＶ２Ｌ２ＶＨのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ２－Ｗ４－ＲＡＤ－２Ｃの場合、Ｖ２Ｌ２ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＷ４－ＲＡＤＶＨのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃの場合、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＣＨ３のカルボキシ末端に融合

させる。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃの場合、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖをヒンジ領域に挿入し、ｓｃＦｖのＮ末端およびＣ末端で（Ｇ４Ｓ）２リンカーにより連結させる。

【００３９】

【図１８】図１８：図１７Ａに表示した二重特異性構築物におけるＷａｐＲ－００４（Ｗ４）ｓｃＦｖ活性の評価。ＴＮＦα結合アームを有する２つの異なる二重特異性構築物（反対のＮ－またはＣ－配向）にＷ４ｓｃＦｖを連結させる。各Ｗ４－ＴＮＦα二重特異性構築物（Ｂｓ１－ＴＮＦα／Ｗ４、Ｂｓ２－ＴＮＦα／Ｗ４およびＢｓ３－ＴＮＦα／Ｗ４）は、ＰＡＯ１．ｌｕｘ（Ｏ５）アッセイを用いて、Ｗ４と同様に細胞結合を阻害する能力を保持していたが、これは、Ｗ４ｓｃＦｖが、二重特異性フォーマットにおいてその活性を保持することを示す。Ｒ３４７を陰性対照として用いた。

【００４０】

【図１９－１】図１９（Ａ－Ｃ）：図１７ＢのＴＮＦα抗体をＶ２Ｌ２で置換することにより、抗Ｐｓｌおよび抗ＰｃｒＶ結合ドメインを二重特異性フォーマットで組み合わせた。これらの構築物は、安定化Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖの代わりに非安定化Ｗ４－ｓｃＦｖを用いた以外は、図１７Ｂに示すものと同一のである。Ｗ４およびＷ４－ＲＡＤの両方が同一のエピトープをターゲティングし、同一の機能的活性を有する。細胞傷害性の阻害パーセントを、（Ａ）６２０６および（Ｂ）６２０６ΔｐｓｌＡ処理Ａ５４９細胞の両方を用いて、ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ３－Ｖ２Ｌ２の両者について分析した。（Ｃ）ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２、ＢＳ３－Ｖ２Ｌ２、およびＢＳ４－Ｖ２Ｌ２を、親対照と比較して、これらがＲＢＣの溶解を阻止する能力について評価した。全ての二重特異性構築物が、６２０６および６２０６ΔｐｓｌＡ感染細胞を用いて、親Ｖ２Ｌ２と同様の抗細胞傷害性活性を保持し、親対照（Ｖ２Ｌ２）と同様に、ＲＢＣ溶解を阻害した。全ての実験において、Ｒ３４７を陰性対照として用いた。

【図１９－２】図１９－１に同じ。

【００４１】

【図２０－１】図２０（Ａ－Ｃ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫの促進についての抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性構築物の評価。精製Ｐｓｌ／ＴＮＦα二重特異性抗体（Ｂｓ２－ＴＮＦαおよびＢｓ３－ＴＮＦα）；Ｗ４－ＲＡＤもしくはＶ２Ｌ２－ＩｇＧ１親抗体；Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２もしくはＢｓ３－Ｖ２Ｌ２、またはＢｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣまたはＹＴＥ突然変異を保有するＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ）の希釈液を用いた、発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）のオプソニン食菌アッセイを示す。（Ａ）Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２抗体の殺傷は低減した。（Ｂ）Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体の殺傷は低減した。（Ｃ）Ｗ４－ＲＡＤおよびＷ４－ＲＡＤ－ＹＴＥの名称は、Ｗ４－ＲＡＤの異なる調製物を表す。Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（古いロット）およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（新しいロット）の名称は、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃの異なる調製物を表す。Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥのＹＴＥ改変は、抗体の半減期を延長する、抗体に実施された改変である。Ｂｓ４抗体の異なる調製物（古いロット対新しいロット）は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ抗体は、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと比較して、ＯＰＫ活性の３倍低下を呈した（ＥＣ５０表を参照）。全ての実験において、Ｒ３４７を陰性対照として用いた。

【図２０－２】図２０－１に同じ。

【００４２】

【図２１－１】図２１（Ａ－Ｉ）：６２０６急性肺炎モデル系における抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性抗体Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ処理マウスのｉｎ　ｖｉｖｏ生存試験。マウス（ｎ＝１０）を以下で処理した：（Ａ）Ｒ３４７（陰性対照、０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ

２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）またはＷ４－ＲＡＤ（０．２ｍｇ／ｋｇ）；（Ｂ～Ｃ）Ｒ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）、またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）；（Ｄ）Ｒ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）、またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）；（Ｅ）Ｒ３４７（陰性対照、２ｍｇ／ｋｇ）、個別のＷ４およびＶ２Ｌ２抗体（各々、０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）の組み合わせまたはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは２ｍｇ／ｋｇ）；（Ｆ）Ｒ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、個別のＷ４およびＶ２Ｌ２抗体（各々、０．５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ）の混合物またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは０．５ｍｇ／ｋｇ）。処理から２４時間後、全てのマウスを約（６．２５×10^5～１×10^6ＣＦＵ／動物）６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）により感染させた。全てのマウスを１２０時間にわたってモニターした。（Ａ）感染後約３０時間までに、全対照マウスが感染により死んだ。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２マウスは全て、Ｖ２Ｌ２対照を受けたマウスと共に生存した。約９０％のＷ４－ＲＡＤ免疫動物が生存した。対照的に、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２マウスの約５０％が、１２０時間までに感染により死んだ。（Ｂ～Ｆ）感染後約４８時間までに、全対照マウスが感染により死んだ。（Ｂ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは、１．０ｍｇ／ｋｇおよび０．５ｍｇ／ｋｇ両方のＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して高い活性を有した。（Ｃ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは、１．０ｍｇ／ｋｇのＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して高い活性を有すると考えられる（結果は、統計的に有意ではない）。（Ｄ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは、０．５ｍｇ／ｋｇのＢｓ３－Ｖ２Ｌ２と比較して高い活性を有した。（Ｅ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは、２ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇの両方で、１．０ｍｇ／ｋｇおよび０．５ｍｇ／ｋｇ両方の抗体混合物と比較して、高い活性を有した。（Ｆ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２（１ｍｇ／ｋｇ）は、１．０ｍｇ／ｋｇおよび０．５ｍｇ／ｋｇの両方で同様の活性を有した。（Ｇ～Ｈ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥは、１．０ｍｇ／ｋｇおよび０．５ｍｇ／ｋｇの両方で同様の活性を有した。結果は、カプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差を以下についてログランク検定により計算した：（Ｂ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ対Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（１ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０３４；０．５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＝０．０００２）；（Ｄ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ対Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．５ｍｇ／ｋｇ－Ｐ＜０．０００１）；（Ｅ）Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（２ｍｇ／ｋｇ）対抗体混合物（各々、１ｍｇ／ｋｇ）－Ｐ＝０．００１２；Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇ）対抗体混合物（各々、０．５ｍｇ／ｋｇ）－Ｐ＝０．０００２。（Ｇ～Ｈ）マウス（ｎ＝８）をＲ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１および０．５ｍｇ／ｋｇ）、およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ（１および０．５ｍｇ／ｋｇ）、並びに６２０６（９ｅ５ＣＦＵ）で処理した。ログランク検定によって、いずれの用量のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥの間に生存率の差は認められなかった。（Ｉ）各抗体構築物の効果を分析するために、マウスを０．１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇまたは１５ｍｇ／ｋｇで処理した後、６２０６致死肺炎モデルにおいて生存について分析した。括弧内に示す各比較用マウスの数と共に、生存パーセントを表に表示する。

【図２１－２】図２１－１に同じ。

【図２１－３】図２１－１に同じ。

【図２１－４】図２１－１に同じ。

【図２１－５】図２１－１に同じ。

【図２１－６】図２１－１に同じ。

【図２１－７】図２１－１に同じ。

【図２１－８】図２１－１に同じ。

【００４３】

【図２２】図２２：６２０６急性肺炎モデルを用いた抗Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体治療動物の臓器負荷分析。マウスをＲ３４７（陰性対照）、Ｖ２Ｌ２もしくは$W4-RAD$単独（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、またはＢＳ３－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）で処理してから２４時間後に、６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）により感染させた。コロニー形成単位は、肺、脾臓および腎臓の組織のグラム当たりで決定した。試験濃度で、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、肺において臓器負荷を有意に低減させた。しかし、二重特異性抗体のいずれも、親抗体と比較して、脾臓または腎臓において臓器負荷を有意に低減させることはできなかった。

【００４４】

【図２３－１】図２３（Ａ－Ｂ）：６２９４モデル系を用いた抗Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体治療動物の臓器負荷分析。マウスをＲ３４７（陰性対照）、Ｖ２Ｌ２もしくは$W4-RAD$単独（０．５ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．７ｍｇ／ｋｇ）、もしくはＢｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．７ｍｇ／ｋｇ）（Ａ）、またはＶ２Ｌ２もしくは$W4-RAD$単独（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）もしくは個別の$W4-RAD$およびＶ２Ｌ２抗体（各々、０．１ｍｇ／ｋｇ）の併用（Ｂ）で２４時間処理した後に、６２９４により感染させた。抗体の投与から２４時間後に、全てのマウスを2.5×10^{7}ＣＦＵ６２９４（Ａ）または$1.7\ 2\times10^{7}$ＣＦＵ６２９４（Ｂ）含有の接種材料により感染させた。コロニー形成単位は、肺、脾臓および腎臓の組織のグラム当たりで決定した。６２９４モデル系を用いて、（Ａ）ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、全ての組織において臓器負荷をＶ２Ｌ２親抗体と同等のレベルまで、有意に低減させた。$W4-RAD$親抗体は、臓器負荷の低減に影響をもたらさなかった。（Ｂ）Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２、および$W4-RAD+$Ｖ２Ｌ２組み合わせは、全組織において臓器負荷をＶ２Ｌ２親抗体と同等のレベルまで、有意に低減させた。

【図２３－２】図２３－１に同じ。

【００４５】

【図２４】図２４：６２９４モデル系におけるＢｓ２－$W4$／Ｖ２Ｌ２およびＢｓ３－$W4$／Ｖ２Ｌ２で処理したマウスのｉｎ　ｖｉｖｏ生存試験。マウスをＲ３４７（陰性対照、０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）もしくは$W4-RAD$（０．２ｍｇ／ｋｇ）で処理した。処理から２４時間後、全てのマウスを６２９４によって感染させた。全てのマウスを１２０時間にわたってモニターした。感染後約７５時間までに、対照マウスの全てが感染により死んだ。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２マウスの６０％およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２マウスの５０％が、感染から１２０時間後も生存した。臓器負荷試験で観察されたように、$W4-RAD$免疫は生存に影響せず、全てのマウスが、感染により、対照とほぼ同時に死んだ。

【００４６】

【図２５－１】図２５（Ａ－Ｄ）：６２０６モデル系における抗Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体または$W4+$Ｖ２Ｌ２併用療法の臓器負荷分析。抗体活性を解読することができるように、準最適濃度の抗体を用いた（Ａ～Ｃ）。（Ｄ）高濃度のＢｓ４を用いた。マウスをＲ３４７（陰性対照）、Ｖ２Ｌ２もしくは$W4-RAD$単独（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ４（１５．０、５．０および１．０ｍｇ／ｋｇ）、または個別の$W4$およびＶ２Ｌ２抗体（各々、０．１ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理してから２４時間後に、６２０６により感染させた。抗体の投与から２４時間後に、全てのマウスを（Ａ）、（Ｂ）4.75×10^{5}ＣＦＵ６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）、または（Ｃ）7.75×10^{5}ＣＦＵ６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）または（Ｄ）9.5×10^{5}ＣＦＵ６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）含有の接種材料により感染させた。コロニー形成単位は、肺、脾臓および腎臓の組織のグラム当たりで決定した。６２０６モデル系を用いて、ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、肺、脾臓および腎臓において臓器負荷を$W4+$Ｖ２Ｌ２組み合わせと

同等のレベルまで低減させた。肺の場合、ダンの事後検定（Ｄｕｎｎ’ｓ　ｐｏｓｔ　ｔｅｓｔ）を含むクラスカル－ウォリス（Ｋｒｕｓｋａｌ－Ｗａｌｌｉｓ）検定を用いると、併用は、細菌ＣＦＵ　Ｂｓ２－およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２ならびにＶ２Ｌ２を有意に低減させた。脾臓および腎臓における細菌負荷に有意な差は観察されなかったが、低減への傾向は認められた。（Ｄ）最適濃度（１５．０、５．０および１．０）のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを用いた場合、肺からの急速かつ効率的な細菌クリアランスが観察された。さらに、脾臓および腎臓への細菌の播種も除去された。星印は、ダンの事後検定（Ｄｕｎｎ’ｓ　ｐｏｓｔ　ｔｅｓｔ）を含むクラスカル－ウォリス検定を用いて、Ｒ３４７対照と比較した際の統計的有意を示す。

【図２５－２】図２５－１に同じ。

【図２５－３】図２５－１に同じ。

【図２５－４】図２５－１に同じ。

【００４７】

【図２６－１】図２６（Ａ－Ｊ）：治療補助療法：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ＋抗生物質。（Ａ）～（Ｂ）マウスを０．５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（陰性対照）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（０．２ｍｇ／ｋｇもしくは０．５ｍｇ／ｋｇ）で２４時間処理した後、１×１０^{6}ＣＦＵ６２０６により感染させるか、または、感染から１時間後に、シプロフロキサシン（ＣＩＰ）（２０ｍｇ／ｋｇもしくは６．７ｍｇ／ｋｇ）で処理するか、あるいは、感染の２４時間前のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＣＩＰ（それぞれ、０．５ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは０．５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは０．２ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは０．２ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｃ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから１時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７、またはＣＩＰ（２０ｍｇ／ｋｇもしくは６．７ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｄ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから２時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７、またはＣＩＰ（２０ｍｇ／ｋｇもしくは６．７ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいは、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣｉｐｒｏ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｅ）マウスを９．７５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから２時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）で処理するか、または感染から１時間後にＣＩＰ（２０ｍｇ／ｋｇもしくは６．７ｍｇ／ｋｇ）で処理するか、あるいは感染から２時間後のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２０ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）との併用で処理した。（Ｆ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから１時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７またはメロペネム（Ｍｅｒｏｐｅｎｅｍ）（ＭＥＭ）（０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは２．３ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＭＥＭ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｇ）マウスを９．７５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから２時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）で処理するか、あるいは感染から１時間後にＭＥＭ（０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは２．３ｍｇ／ｋｇ）で処理するか、または感染から２時間後のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＭＥＭ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／

ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇ）との併用で処理した。（Ｈ）マウスを１×１０^{6}ＣＦＵ６２０６により感染させてから２時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）またはＭＥＭ（０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは２．３ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＭＥＭ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋２．３ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｉ）マウスを９．２５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７またはＣＩＰ（６．７ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｊ）マウスを１．２×１０^{6}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７＋ＣＩＰ（６．７ｍｇ／ｋｇ）、ＣＩＰ（６．７ｍｇ／ｋｇ）、またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ａ～Ｊ）ＣＩＰまたはＭＥＭのいずれかと併用したＢｓ４抗体は、抗生物質療法の効果を高めるが、これは、分子を組み合わせた場合の相乗的防御を示している。さらに、単独で、または緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）非特異的抗体と併用して送達される抗生物質は、肺の細菌ＣＦＵを低減もしくは制御することができるが、抗生物質単独では、この設定においてマウスは致死から防御されない。この設定における最適防御は、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと抗生物質の併用である。

【図２６－２】図２６－１に同じ。

【図２６－３】図２６－１に同じ。

【図２６－４】図２６－１に同じ。

【図２６－５】図２６－１に同じ。

【図２６－６】図２６－１に同じ。

【図２６－７】図２６－１に同じ。

【図２６－８】図２６－１に同じ。

【図２６－９】図２６－１に同じ。

【図２６－１０】図２６－１に同じ。

【００４８】

【図２７】図２７（Ａ－Ｃ）：二重特異性抗体ＢＳ４－ＷＴ、ＢＳ４－ＧＬおよびＢＳ４－ＧＬＯの機能活性の差：オプソニン食菌アッセイ（Ａ）、抗細胞接着アッセイ（Ｂ）、およびＲＢＣ溶解抗細胞傷害性アッセイ（Ｃ）。

【００４９】

【図２８】図２８（Ａ－Ｂ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株を用いた予防（Ａ）または治療（Ｂ）設定でチャレンジしたマウスにおける致命的肺炎に対する防御パーセント。生存パーセントは、カッコ内に示す各比較用動物の数と共に、表に表示する。ダッシュは試験されなかったことを示す。

【００５０】

【図２９】図２９（Ａ－Ｂ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）致命的菌血症モデルにおける二重特異性抗体Ｂｓ４－ＧＬＯで治療した動物の生存率。（Ａ）動物を１５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから２４時間後に、６２９４（Ｏ６）（５．５８×１０^{7}ＣＦＵ）により腹腔内感染させた。（Ｂ）動物を５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから２４時間後に、６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）（６．４８×１０^{6}ＣＦＵ）により腹腔内感染させた。結果は、カプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差を、各濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７についてログランク検定により計算した。（Ａ）全濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７　Ｐ＜０．０００１。（Ｂ）全濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７　Ｐ＝０．０００３。結果は、

３つの独立した実験を代表するものである。

【００５１】

【図３０】図３０（Ａ－Ｃ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおけるＢｓ４－ＧＬＯで予防的に処理（予防）した動物の生存率。（Ａ）動物を１５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから２４時間後に熱損傷を誘導し、１．４×１０^{5}ＣＦＵの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）を創傷下に直接、皮下感染させた。（Ｂ）動物を１５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから２４時間後に熱損傷を誘導し、４．１５×１０^{4}ＣＦＵの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）を創傷下に直接、皮下感染させた。（Ｃ）動物を１５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理してから２４時間後に熱損傷を誘導し、７．５×１０^{1}ＣＦＵの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２９４（Ｏ６）を創傷下に直接、皮下感染させた。結果をカプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差を、各濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７についてログランク検定により計算した。（Ａ～Ｃ）全濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７－Ｐ＜０．０００１。結果は、各緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株について、２つの独立した実験を代表するものである。

【００５２】

【図３１】図３１（Ａ－Ｂ）：緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおけるＢｓ４－ＧＬＯで予防的に処理（予防）した動物の生存率。（Ａ）熱損傷の誘導から４時間後に、動物を４２．６ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または４５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理して、１．６×１０^{5}ＣＦＵの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）を創傷下に直接、皮下感染させた。（Ｂ）熱損傷の誘導から１２時間後に、動物を１５ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ、または１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７で処理して、１．０×１０^{5}ＣＦＵの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）を創傷下に直接、皮下感染させた。結果をカプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差を、各濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７についてログランク検定により計算した。（Ａ）両濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７－Ｐ＝０．０００４。（Ｂ）５ｍｇ／ｋｇのＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７－Ｐ＝０．０４８。結果は、２つの独立した実験を代表するものである。

【００５３】

【図３２】図３２（Ａ－Ｂ）：治療補助療法：Ｂｓ４ＧＬＯ＋シプロフロキサシン（ＣＩＰ）：（Ａ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７＋ＣＩＰ（６．７ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－ＷＴ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－ＷＴとＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｂ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７＋ＣＩＰ（６．７ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－ＧＬＯ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－ＧＬＯとＣＩＰ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋６．７ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。

【００５４】

【図３３】図３３（Ａ－Ｂ）：治療補助療法：Ｂｓ４－ＧＬＯ＋メロペネム（ＭＥＭ）：（Ａ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後に、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７＋ＭＥＭ（０．７５ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－ＷＴ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－ＷＴとＭＥＭ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。（Ｂ）マウスを９．５×１０^{5}ＣＦＵ６２０６により感染させてから４時間後、５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７＋ＭＥＭ（０．７５ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－ＧＬＯ（１ｍｇ／ｋｇもしくは５ｍｇ／ｋｇ）、あるいはＢｓ４－ＧＬＯとＭＥＭ（それぞれ、５ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇもしくは１ｍｇ／ｋｇ＋０．７５ｍｇ／ｋｇ）の併用で処理した。

【００５５】
【図３４】図３４（Ａ－Ｃ）：治療補助療法：致死的菌血症モデルにおけるＢｓ４－ＧＬＯ＋抗生物質：マウスをＢｓ４－ＧＬＯ（０．２５ｍｇ／ｋｇもしくは０．５ｍｇ／ｋｇ）またはＲ３４７（陰性対照）で処理してから２４時間後に、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２９４（Ｏ６）９．３×10^{7}により腹腔内感染させた。感染から１時間後、マウスを（Ａ）１ｍｇ／ｋｇのＣＩＰ、（Ｂ）２．５ｍｇ／ｋｇのＭＥＭまたは（Ｃ）２．５ｍｇ／ｋｇのＴＯＢで皮下処理した。結果をカプラン・マイヤー生存曲線として表し；生存率の差を、各濃度のＢｓ４－ＧＬＯ対Ｒ３４７についてログランク検定により計算した。
【００５６】
【図３５－１】図３５（Ａ－Ｂ）：Ｂｓ４構築物の代替フォーマットの概略図：（Ａ）抗ＰｃｒＶ可変領域は、重鎖および軽鎖上に個別に存在するが、抗Ｐｓｌ可変領域は、重鎖のヒンジ領域内にｓｃＦｖとして存在し、また（Ｂ）抗Ｐｓｌ可変領域は、重鎖および軽鎖上に個別に存在するが、抗ＰｃｒＶ可変領域は、重鎖のヒンジ領域内にｓｃＦｖとして存在する。
【図３５－２】図３５－１に同じ。
【発明を実施するための形態】
【００５７】
詳細な説明
Ｉ．定義
用語「ａ」または「ａｎ」で修飾された実体は、その実体の１つまたは複数を指し、例えば、「シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子」は、「シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する１つまたは複数の結合分子を表すと理解されることに留意すべきである。したがって、用語「ａ」（または「ａｎ」）、「１つまたは複数」および「少なくとも１つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。
【００５８】
本明細書において使用される用語「ポリペプチド」は、単数形「ポリペプチド」および複数形「ポリペプチド」を包含するものとし、アミド結合（ペプチド結合としても公知）により直鎖状に結合しているモノマー（アミノ酸）から構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は、２つ以上のアミノ酸の任意の１つまたは複数の鎖を指し、規定の長さの生成物を指さない。したがって、２つ以上のアミノ酸の１つまたは複数の鎖を指すために使用されるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、それらの用語のいずれにも代えて、またはそれらの用語と互換的に使用することができる。用語「ポリペプチド」は、ポリペプチドの発現後修飾、例として、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解開裂、または非天然に生じたアミノ酸による修飾の生成物も指すものとする。ポリペプチドは、天然生物学的資源に由来し得、または組換え技術により産生することができるが、指定される核酸配列から必ずしも翻訳されない。これは、任意の様式、例として化学合成により生成することができる。
【００５９】
本明細書に開示のポリペプチドは、約３アミノ酸以上、５アミノ酸以上、１０アミノ酸以上、２０アミノ酸以上、２５アミノ酸以上、５０アミノ酸以上、７５アミノ酸以上、１００アミノ酸以上、２００アミノ酸以上、５００アミノ酸以上、１０００アミノ酸以上、または２０００アミノ酸以上のサイズであり得る。ポリペプチドは、定義された３次元構造を有し得るが、それらは、そのような構造を必ずしも有さない。定義された３次元構造を有するポリペプチドは、フォールドと称され、定義された３次元構造を有さないが、多数の異なる立体構造を採り得るポリペプチドは、アンフォールドと称される。本明細書において使用される糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基または

アスパラギン残基の酸素含有または窒素含有側鎖を介してタンパク質に付着している少なくとも１つの炭水化物部分に結合しているタンパク質を指す。

【００６０】

「単離」ポリペプチドまたはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、その天然環境中に存在しないポリペプチドを意図する。特定のレベルの精製は要求されない。例えば、単離ポリペプチドは、そのネイティブまたは天然環境から取り出すことができる。宿主細胞中で発現された組換え産生ポリペプチドおよびタンパク質は、本明細書に開示の単離とみなされ、任意の好適な技術により分離、分別、または部分的もしくは実質的に精製されたネイティブまたは組換えポリペプチドと同様である。

【００６１】

本明細書に開示の他のポリペプチドは、上記ポリペプチドの断片、誘導体、アナログ、またはバリアント、およびそれらの任意の組み合わせである。用語「断片」、「バリアント」、「誘導体」および「アナログ」には、例えば、本明細書に開示のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、抗体を指す場合、対応するネイティブ抗体またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの断片には、本明細書の他箇所で考察される特異的抗体断片に加え、例えば、タンパク質分解断片、および欠失断片が含まれる。本明細書に開示のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば抗体のバリアントには、上記の断片、およびアミノ酸置換、欠失、または挿入に起因して変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。バリアントは、天然に生じ得、または非天然に生じ得る。非天然に生じるバリアントは、当分野において公知の突然変異導入技術を使用して産生することができる。バリアントポリペプチドは、保存または非保存アミノ酸置換、欠失または付加を含み得る。本明細書に開示のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体の誘導体は、ネイティブポリペプチド上に見出されない追加の特徴を示すように変化させたポリペプチドである。例には、融合タンパク質が含まれる。バリアントポリペプチドは、本明細書において「ポリペプチドアナログ」と称することもできる。本明細書において使用される、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体の「誘導体」は、側鎖官能基の反応により化学的に誘導体化された１つまたは複数の残基を有する対象のポリペプチドを指す。「誘導体」として、２０種の標準的なアミノ酸の１つまたは複数の天然に生じるアミノ酸誘導体を含有するペプチドも含まれる。例えば、４－ヒドロキシプロリンは、プロリンに代えて用いることができ；５－ヒドロキシリジンは、リジンに代えて用いることができ；３－メチルヒスチジンは、ヒスチジンに代えて用いることができ；ホモセリンは、セリンに代えて用いることができ；オルニチンは、リジンに代えて用いることができる。

【００６２】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数形の核酸および複数形の核酸を包含するものとし、単離核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）またはプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を指す。ポリヌクレオチドは、慣用のホスホジエステル結合または非慣用結合（例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）中に見出されるもの）を含み得る。用語「核酸」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の１つまたは複数の核酸セグメント、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ断片を指す。「単離」核酸またはポリヌクレオチドは、そのネイティブ環境から取り出された核酸分子、ＤＮＡまたはＲＮＡを意図する。例えば、ベクター中に含有されるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本明細書に開示の単離とみなされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞中で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の精製された（部分的または実質的に）ポリヌクレオチドが含まれる。単離ＲＮＡ分子には、ポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロＲＮＡ転写物が含まれる。単離ポリヌクレ

オチドまたは核酸には、さらに合成により産生されたそのような分子が含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、調節エレメント、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターであり得、またはそれらを含み得る。

【００６３】

本明細書において使用される「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部分である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ、またはＴＡＡ）はアミノ酸に翻訳されないが、それは、コード領域の一部とみなすことができるが、任意のフランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどはコード領域の一部でない。２つ以上のコード領域が、単一ポリヌクレオチド構築物中、例えば、単一ベクター上に、または別個のポリヌクレオチド構築物中、例えば別個の（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一コード領域を含有し得、または２つ以上のコード領域を含み得、例えば、単一ベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別個にコードし得る。さらに、ベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体をコードする核酸に融合されておりまたは融合されていない異種コード領域をコードし得る。異種コード領域には、限定されるものではないが、特殊化エレメントまたはモチーフ、例えば分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメインが含まれる。

【００６４】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸はＤＮＡである。ＤＮＡの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、１つまたは複数のコード領域と作動可能に会合しているプロモーターおよび／または他の転写もしくは翻訳制御エレメントを含み得る。作動可能な会合は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドについてのコード領域が、遺伝子産物の発現を調節配列の影響または制御下に配置するように１つまたは複数の調節配列と会合している場合である。２つのＤＮＡ断片（例えば、ポリペプチドコード領域およびそれと会合しているプロモーター）は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写をもたらす場合および２つのＤＮＡ断片間の結合の性質が遺伝子産物の発現を指向する発現調節配列の能力もＤＮＡテンプレートの転写される能力も妨害しない場合、「作動可能に会合している」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらし得る場合、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に会合している。プロモーターは、所定の細胞中でのみＤＮＡの実質的な転写を指向する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターに加え、他の転写制御エレメントは、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルが細胞特異的転写を指向するためにポリヌクレオチドと作動可能に会合していてよい。好適なプロモーターおよび他の転写制御領域は、本明細書に開示される。

【００６５】

種々の転写制御領域は、当業者に公知である。これらには、限定されるものではないが、脊椎動物において機能する転写制御領域、例えば、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（イントロンＡと連携する前初期プロモーター）、シミアンウイルス４０（初期プロモーター）、およびレトロウイルス（例えば、ラウス肉腫ウイルス）からのプロモーターおよびエンハンサーセグメントが含まれる。他の転写制御領域には、脊椎動物遺伝子に由来するもの、例えば、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギβ－グロビンならびに真核細胞中で遺伝子発現を制御し得る他の配列が含まれる。追加の好適な転写制御領域には、組織特異的プロモーターおよびエンハンサーならびにリンホカイン誘導プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘導可能なプロモーター）が含まれる。

【００６６】

同様に、種々の翻訳制御エレメントは、当業者に公知である。これらには、限定されるものではないが、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにピコルナウ

イルスに由来するエレメント（特に、内部リボソーム進入部位、またはＩＲＥＳ、ＣＩＴＥ配列とも称される）が含まれる。

【００６７】

他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態であり得る。

【００６８】

ポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの分泌を指向する分泌またはシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と会合していてよい。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞により分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を越える成長タンパク質鎖の輸送が開始されると成熟タンパク質から開裂されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞により分泌されるポリペプチドが一般に、ポリペプチドの分泌または「成熟」形態を産生するために完全または「全長」ポリペプチドから開裂されるポリペプチドのＮ末端に融合しているシグナルペプチドを有することに精通している。ある実施形態において、ネイティブシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチド、または作動可能に会合しているポリペプチドの分泌を指向する能力を保持するその配列の機能的誘導体が使用される。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチド、またはその機能的誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）またはマウスβ－グルクロニダーゼのリーダー配列により置換することができる。

【００６９】

ある結合分子、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体が本明細書に開示される。特に全長サイズ抗体、例えば天然に生じる抗体を指さない場合、用語「結合分子」は、全長サイズ抗体およびそのような抗体の抗原結合断片、バリアント、アナログ、または誘導体、例えば、天然に生じる抗体または免疫グロブリン分子またはエンジニアリングされた抗体分子または抗体分子と同様の様式で抗原に結合する断片を包含する。

【００７０】

本明細書において使用される用語「結合分子」は、最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。本明細書にさらに記載するように、結合分子は、本明細書に記載の結合ドメインの１つまたは複数を含み得る。本明細書において使用される「結合ドメイン」には、抗原決定基に特異的に結合する部位が含まれる。抗原結合分子の非限定的な例は、抗体または抗原特異的結合を保持するその断片である。

【００７１】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書において互換的に使用することができる。抗体（または本明細書に開示のその断片、バリアント、もしくは誘導体は、少なくとも重鎖の可変ドメインならびに少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的十分に理解されている。例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）参照。

【００７２】

以下により詳細に考察されるとおり、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別することができる種々の広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン（γ、μ、α、δ、ε）として分類され、それらは一部のサブクラス（例えば、γ１～γ４）を有することを認識する。抗体の「クラス」をＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ ＩｇＧ、またはＩｇＥとしてそれぞれ決定するのはこの鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1などは、十分に特性決定されており、機能的特殊化を付

与することが公知である。これらのクラスおよびアイソタイプのそれぞれの改変バージョンは、本開示に照らして当業者に容易に認識可能であり、したがって本開示の範囲内である。

【００７３】

軽鎖は、カッパまたはラムダ（κ、λ）のいずれかに分類される。それぞれの重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖と結合していてよい。一般に、軽鎖および重鎖は、互いに共有結合しており、免疫グロブリンがハイブリドーマ、Ｂ細胞または遺伝子エンジニアリングされた宿主細胞のいずれかにより生成された場合、２つの重鎖の「テール」部分が共有ジスルフィド結合または非共有結合により互いに結合している。重鎖において、アミノ酸配列は、Ｙ形状のフォーク型末端におけるＮ末端からそれぞれの鎖の下方部におけるＣ末端に及ぶ。

【００７４】

軽鎖および重鎖の両方は、構造および機能ホモロジーの領域に分割される。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。これに関して、軽（ＶＬ）鎖および重（ＶＨ）鎖部分の両方の可変ドメインが抗原認識および特異性を決定することが認識される。逆に、軽鎖（ＣＬ）および重鎖（ＣＨ１、ＣＨ２またはＣＨ３）の定常ドメインは、重要な生物学的特性、例えば、分泌、経胎盤移動、Ｆｃ受容体結合、補体結合などを付与する。慣習により、定常領域ドメインの番号付与は、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠くなるにつれて増加する。Ｎ末端部分は可変領域であり、Ｃ末端部分は定常領域であり；ＣＨ３およびＣＬドメインは、実際には、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端をそれぞれ含む。

【００７５】

上記のとおり、可変領域は、結合分子が抗原上のエピトープを選択的に認識し、それに特異的に結合することを可能とする。すなわち、結合分子、例えば、抗体のＶＬドメインおよびＶＨドメイン、または相補性決定領域（ＣＤＲ）のサブセットは、組み合わさって３次元抗原結合部位を定義する可変領域を形成する。この４元結合分子構造は、Ｙのそれぞれのアームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、ＶＨおよびＶＬ鎖のそれぞれの３つのＣＤＲにより定義される。

【００７６】

天然に生じる抗体において、それぞれの抗原結合ドメイン中に存在する６つの「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」は、抗体が水性環境中でその３次元形状を取るため、抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置しているアミノ酸の短い不連続配列である。抗原結合ドメイン中のアミノ酸の残部は、「フレームワーク」領域と称され、より小さい分子内変動性を示す。フレームワーク領域は、概して、β－シート立体構造を採用し、ＣＤＲは、このβ－シート構造を接続し、一部の場合、その一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖内非共有相互作用による正確な配向におけるＣＤＲの位置決めを提供する足場を形成するように作用する。位置決めされたＣＤＲにより形成された抗原結合ドメインは、免疫反応抗原上のエピトープに対する表面相補性を定義する。この相補性表面は、抗体のそのコグネートエピトープへの非共有結合を促進する。ＣＤＲおよびフレームワーク領域をそれぞれ含むアミノ酸は、任意の所与の重鎖または軽鎖可変領域について当業者により容易に同定することができる。それというのも、それらは既に定義されているためである（参照により全体として本明細書に組み込まれる“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，”Ｋａｂａｔ，Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，（１９８３）；およびＣｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１－９１７（１９８７）参照）。

【００７７】

当分野の範囲内で使用および／または許容される用語の２つ以上の定義が存在する場合、本明細書において使用される用語の定義は、特に明確に逆の記載がない限り全てのその

ような意味を含むものとする。具体例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される不連続抗原結合部位を説明するための用語「相補性決定領域」（ＣＤＲ）の使用である。この特定の領域は、参照により本明細書に組み込まれるＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”（１９８３）およびＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）により記載されており、これらの定義は、互いを比較した場合、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにも関わらず、抗体またはそのバリアントのＣＤＲを指すためのいずれの定義の適用も、本明細書において定義および使用される用語の範囲内であるものとする。上記の参照文献のそれぞれにより定義されるＣＤＲを包含する適切なアミノ酸残基を、比較として表１に以下に記載する。特定のＣＤＲを包含する正確な残基数は、ＣＤＲの配列およびサイズに応じて変動する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮してどの残基が特定のＣＤＲを含むかを定型的に決定することができる。

【表１】

表 1:CDR 定義[1]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1] 表 1 の全ての CDR 定義の番号付与は、Kabat et al.(下記参照)により記載される番号付与慣習に従う。

【００７８】

Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．は、あらゆる抗体に適用可能な可変ドメイン配列についての番号付与系も定義した。当業者は、配列自体を越えるいかなる実験データにも依存することなく「Ｋａｂａｔ番号付与」のこの系をあらゆる可変ドメイン配列に明確に割り当てることができる。本明細書において使用される「Ｋａｂａｔ番号付与」は、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”（１９８３）により記載される番号付与系を指す。特に記載のない限り、本明細書に開示のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体中の規定のアミノ酸残基位置の番号付与への言及は、Ｋａｂａｔ番号付与系に従う。

【００７９】

結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体には、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、ＶＬまたはＶＨドメインのいずれかを含む断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生された断片が含まれる。ｓｃＦｖ分子は、当分野において公知であり、例えば、米国特許第５，８９２，０１９号明細書に記載されている。本開示により包含される免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意のタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスの免疫グロブリン分子のものであり得る。

【００８０】
「特異的に結合する」は、一般に、結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体が、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間の一部の相補性を必要とすることを意味する。この定義によれば、結合分子は、それがその抗原結合ドメインを介してランダムの無関連なエピトープに結合するよりも容易にそのエピトープに結合する場合、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書において、ある結合分子があるエピトープに結合する相対親和性を特定するために使用される。例えば、結合分子「Ａ」は、所与のエピトープについて結合分子「Ｂ」よりも高い特異性を有するとみなすことができ、または結合分子「Ａ」は、それが関連エピトープ「Ｄ」について有するよりも高い特異性でエピトープ「Ｃ」に結合すると言うことができる。
【００８１】
「優先的に結合する」は、抗体がエピトープに、それが関連、類似、同種、または相似エピトープに結合するよりも容易に特異的に結合することを意味する。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が関連エピトープと交差反応し得るとしても、関連エピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高い。
【００８２】
非限定的な例として、結合分子、例えば、抗体は第１のエピトープに、それが前記第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のK_D未満の解離定数（K_D）で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例において、結合分子、例えば、抗体は、第１の抗原に、それが第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のK_Dよりも少なくとも１桁小さい親和性で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例において、結合分子は、第１のエピトープに、それが第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のK_Dよりも少なくとも２桁小さい親和性で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。
【００８３】
別の非限定的な例において、結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、第１のエピトープに、それが第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも小さいオフ速度（ｏｆｆ　ｒａｔｅ）（ｋ（ｏｆｆ））で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。別の限定的な例において、結合分子は、第１のエピトープに、それが第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも１桁小さい親和性で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例において、結合分子は、第１のエピトープに、それが第１のエピトープに第２のエピトープについての抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも２桁小さい親和性で結合する場合、優先的に結合するとみなすことができる。
【００８４】
本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、5×10^{-2}秒$^{-1}$、10^{-2}秒$^{-1}$、5×10^{-3}秒$^{-1}$または10^{-3}秒$^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ）で本明細書に開示の標的抗原、例えば、多糖またはその断片もしくはバリアントに結合すると言うことができる。本明細書に開示の結合分子は、5×10^{-4}秒$^{-1}$、10^{-4}秒$^{-1}$、5×10^{-5}秒$^{-1}$、または10^{-5}秒$^{-1}$ 5×10^{-6}秒$^{-1}$、10^{-6}秒$^{-1}$、5×10^{-7}秒$^{-1}$または10^{-7}秒$^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））で標的抗原、例えば、多糖に結合すると言うことができる。
【００８５】
本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、$10^{3}M^{-1}$秒$^{-1}$、$5\times10^{3}M^{-1}$秒$^{-1}$、$10^{4}M^{-1}$秒$^{-1}$または$5\times10^{4}M^{-1}$秒$^{-1}$以上のオン速度（ｋ（ｏｎ））で標的抗原、例えば、多糖に結合すると言うことができる。本明細書に開示の結合分子は、$10^{5}M^{-1}$秒$^{-1}$、$5\times10^{5}M^{-1}$秒$^{-1}$、$10^{6}M^{-1}$秒$^{-1}$、または$5\times10^{6}M^{-1}$秒$^{-1}$または$10^{7}M^{-1}$秒$^{-1}$以上のオン速度（ｏｎ　ｒａｔｅ）（ｋ（ｏｎ））で標的抗原、例えば、多糖に結

合すると言うことができる。

【００８６】

結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、それがある程度、エピトープへの参照抗体または抗原結合断片の結合を遮断する程度にそれがそのエピトープに優先的に結合する場合、所与のエピトープへの参照抗体または抗原結合断片の結合を競合阻害すると言われる。競合阻害は、当分野において公知の任意の方法、例えば、競合ＥＬＩＳＡアッセイにより測定することができる。結合分子は、所与のエピトープへの参照抗体または抗原結合断片の結合を少なくとも９０％、少なくとも８０％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、または少なくとも５０％だけ競合阻害すると言うことができる。

【００８７】

本明細書において使用される用語「親和性」は、個々のエピトープと免疫グロブリン分子のＣＤＲとの結合の強さの尺度を指す。例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）の２７－２８ページ参照。本明細書において使用される用語「アビディティー」は、免疫グロブリンの集団と抗原との複合体の総合安定性、すなわち、抗原との免疫グロブリン混合物の機能的組み合わせ強度を指す。例えば、Ｈａｒｌｏｗの２９－３４ページ参照。アビディティーは、集団における個々の免疫グロブリン分子と規定のエピトープとの親和性、ならびにさらには免疫グロブリンおよび抗原の価数の両方に関する。例えば、２価モノクローナル抗体と高度に反復するエピトープ構造を有する抗原、例えば、ポリマーとの相互作用は、高いアビディティーの１つである。

【００８８】

本明細書に開示の結合分子またはその抗原結合断片、バリアントもしくは誘導体は、それらの交差反応性に関して記載または規定することもできる。本明細書において使用される用語「交差反応性」は、１つの抗原に特異的な結合分子、例えば抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体の、第２の抗原と反応する能力を指し；２つの異なる抗原物質間の関連性の尺度である。したがって、結合分子は、それがその形成を誘導したもの以外のエピトープに結合する場合、交差反応性である。交差反応性エピトープは、一般に、誘導エピトープと同一の相補性構造特徴の多くを含有し、一部の場合、実際に元のものよりも良好に適合し得る。

【００８９】

結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、抗原に対するそれらの結合親和性に関して記載または規定することもできる。例えば、結合分子は、5×10^{-2}Ｍ、10^{-2}Ｍ、5×10^{-3}Ｍ、10^{-3}Ｍ、5×10^{-4}Ｍ、10^{-4}Ｍ、5×10^{-5}Ｍ、10^{-5}Ｍ、5×10^{-6}Ｍ、10^{-6}Ｍ、5×10^{-7}Ｍ、10^{-7}Ｍ、5×10^{-8}Ｍ、10^{-8}Ｍ、5×10^{-9}Ｍ、10^{-9}Ｍ、5×10^{-10}Ｍ、10^{-10}Ｍ、5×10^{-11}Ｍ、10^{-11}Ｍ、5×10^{-12}Ｍ、10^{-12}Ｍ、5×10^{-13}Ｍ、10^{-13}Ｍ、5×10^{-14}Ｍ、10^{-14}Ｍ、5×10^{-15}Ｍ、または10^{-15}Ｍ以下の解離定数またはK_Dで抗原に結合し得る。

【００９０】

単鎖抗体を含む抗体断片は、可変領域を単独でまたは以下のものの全部または一部との組み合わせで含み得る：ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメイン。可変領域とヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインとの任意の組み合わせも含む抗原結合断片も含まれる。本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片は、任意の動物起源、例として鳥類および哺乳動物からのものであり得る。抗体は、ヒト、ネズミ、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体であり得る。別の実施形態において、可変領域は、コンドリクトイド（ｃｏｎｄｒｉｃｔｈｏｉｄ）起源（例えば、サメから）であり得る。本明細書において使用される「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、下記のおよび例

えばＫｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許第５，９３９，５９８号明細書に記載のヒト免疫グロブリンライブラリーから、または１つまたは複数のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体が含まれる。

【００９１】

本明細書において使用される用語「重鎖部分」には、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。重鎖部分を含む結合分子、例えば、抗体は、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中央部、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、またはそのバリアントもしくは断片の少なくとも１つを含む。例えば、結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、ＣＨ１ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、およびＣＨ２ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、およびＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖、またはＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態において、結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、ＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本開示において使用される結合分子は、ＣＨ２ドメインの少なくとも一部分を欠損し得る（例えば、ＣＨ２ドメインの全部または一部）。上記のとおり、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）は、それらのアミノ酸配列が天然に生じる免疫グロブリン分子から変動するように改変することができることが当業者により理解される。

【００９２】

本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体の重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子から由来してよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、ＩｇＧ１分子に由来するＣＨ１ドメインおよびＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例において、重鎖部分は、部分的にはＩｇＧ１分子に由来し、部分的にはＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例において、重鎖部分は、部分的にはＩｇＧ１分子に由来し、部分的にはＩｇＧ４分子に由来するキメラヒンジを含み得る。

【００９３】

本明細書において使用される用語「軽鎖部分」には、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。軽鎖部分は、ＶＬまたはＣＬドメインの少なくとも１つを含む。

【００９４】

本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、それらが認識または特異的に結合する抗原、例えば、標的多糖のエピトープまたは部分に関して記載または規定することができる。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的多糖の部分は、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的抗原、例えば、多糖は、単一エピトープを含み得るが、典型的には、少なくとも２つのエピトープを含み、抗原のサイズ、立体構造、およびタイプに応じて任意数のエピトープを含み得る。

【００９５】

上記のとおり、種々の免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および３次元形状は周知である。本明細書において使用される用語「ＶＨドメイン」には、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインが含まれ、用語「ＣＨ１ドメイン」には、免疫グロブリン重鎖の第１（ほとんどはアミノ末端）の定常領域ドメインが含まれる。ＣＨ１ドメインは、ＶＨドメインに隣接しており、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対してアミノ末端である。

【００９６】

本明細書において使用される用語「ＣＨ２ドメイン」には、例えば、慣用の番号付与スキームを使用して抗体の約残基２４４から残基３６０に及ぶ重鎖分子の部分が含まれる（残基２４４から３６０、Ｋａｂａｔ番号付与系；および残基２３１～３４０、ＥＵ番号付

与系；前掲のＫａｂａｔ　ＥＡ　ｅｔ　ａｌ．参照。ＣＨ２ドメインは、それが別のドメインと密接に対合しないという点でユニークである。むしろ、２つのＮ結合分枝炭水化物鎖が、インタクトなネイティブＩｇＧ分子の２つのＣＨ２ドメイン間に介入される。ＣＨ３ドメインがＩｇＧ分子のＣＨ２ドメインからＣ末端に及び、約１０８残基を含むことも十分に立証されている。

【００９７】

本明細書において使用される用語「ヒンジ領域」には、ＣＨ１ドメインをＣＨ２ドメインに連結させる重鎖分子の部分が含まれる。このヒンジ領域は、約２５残基を含み、フレキシブルであり、したがって２つのＮ末端抗原結合領域が独立して移動することを可能とする。ヒンジ領域は、３つの区別されるドメイン：上部、中央部、および下部ヒンジドメイン（Ｒｏｕｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１：４０８３（１９９８））に下位分類することができる。

【００９８】

本明細書において使用される用語「ジスルフィド結合」には、２つの硫黄原子間に形成される共有結合が含まれる。アミノ酸システインは、第２のチオール基とのジスルフィド結合または架橋を形成し得るチオール基を含む。ほとんどの天然に生じるＩｇＧ分子において、ＣＨ１およびＣＬ領域はジスルフィド結合により結合しており、２つの重鎖は、Ｋａｂａｔ番号付与系を使用して２３９および２４２（２２６または２２９位、ＥＵ番号付与系）に対応する位置において２つのジスルフィド結合により結合している。

【００９９】

本明細書において使用される用語「キメラ抗体」は、免疫反応領域または部位が第１の種から得られまたはそれに由来し、定常領域（インタクト、部分的または改変されていてよい）が第２の種から得られる任意の抗体を意味するものとする。一部の実施形態において、標的結合領域または部位は非ヒト資源（例えば、マウスまたは霊長類）を形成し、定常領域はヒトである。

【０１００】

本明細書において使用される用語「二重特異性抗体」は、単一の抗体分子内に２つの異なる抗原に対する結合部位を有する抗体を指す。規定抗体構造に加えて、２つの結合特異性を備える他の分子を構築できることは理解されよう。さらに、二重特異性抗体による抗原結合は、同時とすることも連続的とすることもできることも理解されよう。トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌することができる細胞系の２つの例である。二重特異性抗体はまた、組換え手段によって構築することもできる（ＳｔｒｏｅｈｌｅｉｎおよびＨｅｉｓｓ，Ｆｕｔｕｒｅ　Ｏｎｃｏｌ．６：１３８７－９４（２０１０）；ＭａｂｒｙおよびＳｎａｖｅｌｙ，ＩＤｒｕｇｓ　１３：５４３－９（２０１０））。

【０１０１】

本明細書において使用される用語「エンジニアリングされた抗体」は、重鎖および軽鎖のいずれかまたは両方の可変ドメインが、既知の特異性の抗体からの１つまたは複数のＣＤＲの少なくとも部分的な置換により、ならびに必要により、部分的なフレームワーク領域置換および配列変化により変化した抗体を指す。ＣＤＲはフレームワーク領域が由来する抗体と同一のクラスまたはさらにはサブクラスの抗体に由来し得るが、ＣＤＲは異なるクラスの抗体、好ましくは、異なる種からの抗体に由来することが想定される。既知の特異性の非ヒト抗体からの１つまたは複数の「ドナー」ＣＤＲがヒト重鎖または軽鎖フレームワーク領域中にグラフトされたエンジニアリングされた抗体は、本明細書において「ヒト化抗体」と称される。ＣＤＲの全てをドナー可変領域からの完全なＣＤＲにより置き換えてある可変ドメインの抗原結合能を別のものに移すことは必要でないことがある。むしろ、標的結合部位の活性を維持するために必要な残基を移すことのみが必要であることがある。例えば、米国特許第５，５８５，０８９号明細書、米国特許第５，６９３，７６１号明細書、米国特許第５，６９３，７６２号明細書、および米国特許第６，１８０，３７０号明細書に記載の説明を考慮すると、それは定型実験の実施により、または機能的エン

ジニアリングもしくはヒト化抗体を得るための試行錯誤試験により、当業者の能力の十分範囲内である。

【０１０２】

本明細書において使用される用語「適切にフォールドされたポリペプチド」には、ポリペプチドを含む機能ドメインの全てが明確に活性であるポリペプチド（例えば、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ抗体）が含まれる。本明細書において使用される用語「不適切にフォールドされたポリペプチド」には、ポリペプチドの機能ドメインの少なくとも１つが活性でないポリペプチドが含まれる。一実施形態において、適切にフォールドされたポリペプチドは、少なくとも１つのジスルフィド結合により結合しているポリペプチド鎖を含み、逆に、不適切にフォールドされたポリペプチドは、少なくとも１つのジスルフィド結合により結合していないポリペプチド鎖を含む。

【０１０３】

本明細書において使用される用語「エンジニアリングされた」には、合成手段による（例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、ペプチドの酵素もしくは化学カップリングまたはそれらの技術のいくつかの組み合わせによる核酸またはポリペプチド分子の操作が含まれる。

【０１０４】

本明細書において使用される用語「結合している」、「融合している」または「融合」は、互換的に使用される。これらの用語は、あらゆる手段、例として化学コンジュゲーションまたは組換え手段によるさらに２つのエレメントまたは構成成分の連結を指す。「インフレーム融合」は、元のＯＲＦの正確な翻訳リーディングフレームを維持する様式で連続するより長いＯＲＦを形成するための２つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の連結を指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のＯＲＦ（セグメントが通常、天然では連結されていない）によりコードされるポリペプチドに対応する２つ以上のセグメントを含有する単一タンパク質である。リーディングフレームはこうして融合セグメント全体にわたり連続的とされるが、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列により物理的または空間的に分離することができる。例えば、免疫グロブリン可変領域のＣＤＲをコードするポリヌクレオチドはインフレームで融合することができるが、「融合」ＣＤＲが連続ポリペプチドの一部として同時翻訳される限り、少なくとも１つの免疫グロブリンフレームワーク領域または追加のＣＤＲ領域をコードするポリヌクレオチドにより分離することができる。

【０１０５】

ポリペプチドに関して、「直鎖配列」または「配列」は、配列中で互いに隣接する残基がポリペプチドの１次構造中で連続する、アミノからカルボキシ末端方向におけるポリペプチド中のアミノ酸の順序である。

【０１０６】

本明細書において使用される用語「発現」は、遺伝子が生化学物質、例えば、ポリペプチドを産生するプロセスを指す。このプロセスには、細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の顕在化、例として、限定されるものではないが、遺伝子ノックダウンならびに一過的発現および安定的発現の両方が含まれる。それには、限定されるものではないが、遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）への転写、およびそのようなｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳が含まれる。最終所望産物が生化学物質である場合、発現には、その生化学物質および任意の前駆体の作出が含まれる。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を産生する。本明細書において使用される遺伝子産物は、遺伝子の転写により産生される核酸、例えば、メッセンジャーＲＮＡ、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれでもよい。本明細書に記載の遺伝子産物には、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解開裂などを有するポリペプチドがさらに含まれる。

【０１０７】

本明細書において使用される用語「治療する」または「治療」は、目的が含む所望な生

理学的変化、感染、または障害を予防または遅滞（縮減）させることである療法的治療および防止的または予防的措置の両方を指す。利益または所望の臨床結果には、限定されるものではないが、検出可能か検出不能かにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しない）、対象における感染原因物質、例えば緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のクリアランスまたは低減、疾患進行の遅延または遅滞、疾患状態の改善または緩和、および寛解（一部または完全を問わない）が含まれる。「治療」は、治療を受けない場合に予期される生存率と比較した生存率の延長も意味し得る。治療を必要とする者には、既に感染、病態、または障害を有する者ならびに病態または障害を有しやすい者または病態もしくは障害を予防すべき者、例えば、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染を受けやすい熱傷患者または免疫抑制患者が含まれる。

【０１０８】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後診断、または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象には、ヒト、家畜動物、農場動物、および動物園、競技、または愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、ウシ、クマなどが含まれる。

【０１０９】

本明細書において使用される「抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合ドメインまたは結合分子の投与から利益を受ける対象」および「治療を必要とする動物」などの語句には、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合ドメインまたは結合分子、例えば、上記結合ドメインの１つまたは複数を含む抗体の投与から利益を受ける対象、例えば、哺乳動物対象が含まれる。このような結合ドメイン、または結合分子は、例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌもしくはＰｃｒＶの検出（例えば、診断手順のため）、および／または治療、すなわち、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合分子による疾患の緩和もしくは予防のために用いることができる。本明細書により詳細に記載される通り、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合分子は、非コンジュゲート形態で使用することができ、または例えば、薬物、プロドラッグ、もしくは同位体にコンジュゲートすることができる。

【０１１０】

本明細書において使用される用語「相乗効果」は、化合物の併用によって生じる相加より大きな治療効果を指し、この場合、併用によって得られる治療効果は、化合物単独の個々の投与から生じるであろう相加効果を超える。特定の実施形態は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の治療において、相乗効果を生み出す方法を包含し、ここで、前記効果は、対応する相加効果より、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも５００％、または少なくとも１０００％大きい。

【０１１１】

「共投与」は、抗Ｐｓ１および抗ＰｃｒＶ結合ドメイン、または抗Ｐｓ１および抗ＰｃｒＶ結合ドメインの一方もしくは両方を含む結合分子などの様々な化合物の投与を指し、その際、上記化合物が、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）免疫を誘導するようにする。化合物は、同一のまたは異なる組成物において投与することができ、これらは、もし個別であれば、互いに短い間隔で、一般には互いに２４時間以内、より典型的には互いに約１～８時間以内、より典型的には、互いに約１～４時間以内に投与するか、あるいは、ほぼ同時投与する。相対量は、所望の相乗効果を達成する投与量である。

【０１１２】

ＩＩ．結合ドメイン及び結合分子

Ｐｓｌに結合する抗体およびこれらの抗体を用いるフォーマットは、当分野で記載されている。例えば、２０１２年６月８日に提出されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ／２０１２／

０４１５３８号明細書、および２０１２年１１月６日に提出されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ／２０１２／６３６３９号明細書（代理人整理番号ＡＥＭＳ－１１５ＷＯ１、名称「ＭＵＬＴＩＳＰＥＣＩＦＩＣ ＡＮＤ ＭＵＬＴＩＶＡＬＥＮＴ ＢＩＮＤＩＮＧ ＰＲＯＴＥＩＮＳ ＡＮＤ ＵＳＥＳ ＴＨＥＲＥＯＦ」）（参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０１１３】

一実施形態は、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する結合ドメインであって、結合によって、ＩＩＩ型毒素分泌系の活性を破壊し得るドメインを対象とする。特定の実施形態では、結合ドメインは、抗体Ｖ２Ｌ２と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）結合特異性を有する。

【０１１４】

別の実施形態は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶに特異的に結合する結合ドメインであって、（ａ）上皮細胞への緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を阻害すること、（ｂ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のオプソニン食菌殺傷（ＯＰＫ）を促進、媒介、もしくは増強すること、（ｃ）上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を阻害すること、または（ｄ）ＩＩＩ型毒素分泌系の活性を破壊することによって、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染に対する相乗効果を生み出す結合ドメインを対象とする。ある実施形態において、上記結合ドメインは、抗体Ｃａｍ－００３、ＷａｐＲ－００４、Ｖ２Ｌ２、または２９Ｄ２と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）結合特異性を有する。

【０１１５】

別の実施形態は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する一方もしくは両方のドメインを含む単離結合分子であって、結合分子の投与により、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染に対する相乗効果を生み出す分子を対象とする。ある実施形態において、上記結合分子は、限定されるものではないが、Ｃａｍ－００３、ＷａｐＲ－００４、Ｖ２Ｌ２、もしくは２９Ｄ２２などの抗体またはその断片由来の結合ドメインを含むことができる。

【０１１６】

本明細書において使用される用語「抗原結合ドメイン」または「抗原結合分子」には、抗原上のエピトープ（例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶのエピトープ）に特異的に結合する部位が含まれる。。抗体の抗原結合ドメインは、典型的には、免疫グロブリン重鎖可変領域の少なくとも一部および免疫グロブリン軽鎖可変領域の少なくとも一部を含む。これらの可変領域により形成される結合部位が、抗体の特異性を決定する。

【０１１７】

本開示は、より具体的には、少なくとも２つの抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）結合ドメインを含む組成物であって、一方の結合ドメインがＰｓｌに特異的に結合し、他方の結合ドメインがＰｃｒＶに特異的に結合する、組成物を対象とする。一実施形態において、本組成物は、ＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、もしくはＷａｐＲ－０１６の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する１つの結合ドメインを含む。ある実施形態において、第２結合ドメインは、Ｖ２Ｌ２または２９Ｄ２の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する。

【０１１８】

一実施形態において、組成物は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する、および／またはＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００

４、Ｃａｍ－００５、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、ＷａｐＲ－００３、もしくはＷａｐＲ－０１６のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する１つの結合ドメインを含む。ある実施形態では、第２結合ドメインは、同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、および／またはＶ２Ｌ２または２９Ｄ２の重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶへの結合を競合阻害する。

【０１１９】

別の実施形態は、Ｖ２Ｌ２または２９Ｄ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を対象とする。

【０１２０】

また、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合し、Ｖ２Ｌ２または２９Ｄ２のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶ結合を競合阻害する、単離結合分子、例えば、抗体またはその断片も含まれる。

【０１２１】

一実施形態は、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、もしくはＷａｐＲ－００３のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を対象とする。

【０１２２】

また、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合し、ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、もしくはＷａｐＲ－００３のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する単離結合分子、例えば、抗体またはその断片も含まれる。

【０１２３】

さらには、ＷａｐＲ－０１６のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片と同一のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌエピトープに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその断片も含まれる。

【０１２４】

また、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合し、ＷａｐＲ－０１６のＶＨおよびＶＬを含む抗体またはその抗原結合断片によるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合を競合阻害する単離結合分子、例えば、抗体またはその断片も含まれる。

【０１２５】

抗体を作製する方法は、当分野において周知であり、本明細書に記載される。シグナル配列を有さないシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶの種々の断片または全長シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶに対する抗体を産生したら、本明細書に記載のエピトープマッピングプロトコルおよび当分野において公知の方法（例えば、“Ｃｈａｐｔｅｒ　１１－Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，”Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｅｄ．Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｖ．２，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（１９９６）に記載の二重抗体サンドイッチＥＬＩＳＡ）により抗体または抗原結合断片が結合するシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌのアミノ酸、またはエピトープを決定することが決定できる。追加のエピトープマッピングプロトコルは、Ｍｏｒｒｉｓ，Ｇ．Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ：Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６）に見出すことができ、それらは両方とも参照により全体として本明細書に組み込まれる。エピトープマッピングは、市販の

手段（すなわち、ＰｒｏｔｏＰＲＯＢＥ，Ｉｎｃ．（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ））により実施することもできる。

【０１２６】

ある態様において、本開示は、前記参照モノクローナル抗体についてのK_D未満の解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体を対象とする。

【０１２７】

ある実施形態において、本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアントもしくは誘導体は、ＰｓｌまたはＰｃｒＶの少なくとも１つのエピトープに特異的に結合し、すなわち、そのようなエピトープに、それが無関連またはランダムエピトープに結合するよりも容易に結合し；ＰｓｌまたはＰｃｒＶの少なくとも１つのエピトープに優先的に結合し、すなわち、そのようなエピトープに、それが関連、類似、同種、または相似エピトープに結合するよりも容易に結合し；ＰｓｌまたはＰｃｒＶのあるエピトープに特異的または優先的にそれ自体結合する参照抗体の結合を競合阻害し；または約５×１０$^{-2}$Ｍ、約１０$^{-2}$Ｍ、約５×１０$^{-3}$Ｍ、約１０$^{-3}$Ｍ、約５×１０$^{-4}$Ｍ、約１０$^{-4}$Ｍ、約５×１０$^{-5}$Ｍ、約１０$^{-5}$Ｍ、約５×１０$^{-6}$Ｍ、約１０$^{-6}$Ｍ、約５×１０$^{-7}$Ｍ、約１０$^{-7}$Ｍ、約５×１０$^{-8}$Ｍ、約１０$^{-8}$Ｍ，約５×１０$^{-9}$Ｍ，約１０$^{-9}$Ｍ、約５×１０$^{-10}$Ｍ、約１０$^{-10}$Ｍ、約５×１０$^{-11}$Ｍ、約１０$^{-11}$Ｍ、約５×１０$^{-12}$Ｍ、約１０$^{-12}$Ｍ、約５×１０$^{-13}$Ｍ、約１０$^{-13}$Ｍ、約５×１０$^{-14}$Ｍ、約１０$^{-14}$Ｍ、約５×１０$^{-15}$Ｍ、または約１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数K_Dを特徴とする親和性でＰｓｌまたはＰｃｒＶの少なくとも１つのエピトープに結合する。

【０１２８】

結合解離定数に関して使用される用語「約」は、抗体親和性を計測するために利用される方法における固有のバリエーションの程度を許容する。例えば、使用される装置類の精度のレベル、計測される試料の数に基づく標準誤差、および丸め誤差に応じて、用語「約１０$^{-2}$Ｍ」は、例えば、０．０５Ｍから０．００５Ｍを含み得る。

【０１２９】

具体的な実施形態において、結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、５×１０$^{-2}$秒$^{-1}$、１０$^{-2}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-3}$秒$^{-1}$または１０$^{-3}$秒$^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに結合する。あるいは、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、５×１０$^{-4}$秒$^{-1}$、１０$^{-4}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-5}$秒$^{-1}$、または１０$^{-5}$秒$^{-1}$　５×１０$^{-6}$秒$^{-1}$、１０$^{-6}$秒、$^{-1}$５×１０$^{-7}$秒$^{-1}$または１０$^{-7}$秒$^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに結合する。

【０１３０】

他の実施形態において、本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、１０^{3}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$、５×１０^{3}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$、１０^{4}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$または５×１０^{4}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$以上のオン速度（ｋ（ｏｎ））でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに結合する。あるいは、本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、１０^{5}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$、５×１０^{5}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$、１０^{6}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$、または５×１０^{6}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$または１０^{7}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$以上のオン速度（ｋ（ｏｎ））でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに結合する。

【０１３１】

種々の実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎ

ａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）のオプソニン食菌殺傷を促進し、または上皮細胞へのシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）結合を阻害する。本明細書に記載のある実施形態において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ標的は、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶである。他の実施形態において、本明細書に記載のある結合分子は、それらの資源にかかわらず構造的に関連する多糖分子に結合し得る。そのようなＰｓｌ様分子は、緑膿菌（ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）Ｐｓｌと同一でありまたは十分な構造関連性を有して開示される結合分子の１つまたは複数による特異的認識を可能とすることが予期される。他の実施形態において、本明細書に記載する特定の結合分子は、それらの供給源にかかわらず構造的に関連するポリペプチド分子に結合し得る。そのようなＰｃｒＶ様分子は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰｃｒＶと同一であるか、または開示される結合分子の１つまたは複数による特異的認識を可能にするのに十分な構造関連性を有することが予想される。従って、例えば、本明細書に記載の特定の結合分子は、他の細菌種により産生されるＰｓｌ様および／またはＰｃｒＶ様分子、例えば、他のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種、例えば、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）、またはシュードモナス・アルカリゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）により産生されるＰｓｌ様またはＰｃｒＶ様分子に結合し得る。あるいは、本明細書に記載のある結合分子は、合成により、またはＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ様分子を産生するように遺伝子改変された宿主細胞により産生されるＰｓｌ様またはＰｃｒＶ様分子に結合し得る。

【０１３２】

特に記載のない限り、結合分子、例えば、抗体への言及において本明細書において使用される「その断片」は、抗原結合断片、すなわち、抗原に特異的に結合する抗体の一部分を指す。

【０１３３】

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、１つまたは複数のエフェクター機能を媒介する定常領域を含み得る。例えば、抗体定常領域への補体のＣ１構成成分の結合は、補体系を活性化し得る。補体の活性化は、病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化は、炎症応答も刺激し、自己免疫過敏にも関与し得る。さらに、抗体は、Ｆｃ領域を介して種々の細胞上の受容体に結合し、抗体Ｆｃ領域上のＦｃ受容体結合部位が細胞上のＦｃ受容体（ＦｃＲ）に結合する。異なるクラスの抗体、例としてＩｇＧ（ガンマ受容体）、ＩｇＥ（イプシロン受容体）、ＩｇＡ（アルファ受容体）およびＩｇＭ（ミュー受容体）に特異的な多数のＦｃ受容体が存在する。細胞表面上のＦｃ受容体への抗体の結合は、多数の重要および多様な生物学的応答、例として、抗体コートされた粒子の飲込みおよび破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体コートされた標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞毒性、またはＡＤＣＣと呼ばれる）、炎症メディエーターの放出、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を誘発する。

【０１３４】

したがって、本明細書に開示のある実施形態は、定常領域ドメインの１つまたは複数の少なくとも一部分が所望の生化学的特徴、例えば、ほぼ同一の免疫原性の完全な未変化抗体と比較してエフェクター機能の低減、非共有結合ダイマー化能、腫瘍の部位における局在化能の増加、血清半減期の低減、または血清半減期の増加を提供するように欠失され、そうでなければ変化した抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体を含む。例えば、本明細書に記載のある結合分子は、免疫グロブリン重鎖と類似のポリペプチド鎖を含むが、１つまたは複数の重鎖ドメインの少なくとも一部分を欠くド

メイン欠失抗体である。例えば、ある抗体において、改変抗体の定常領域の１つのドメイン全体が欠失され、例えば、ＣＨ２ドメインの全部または一部が欠失される。

【０１３５】

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体の改変形態は、当分野において公知の技術を使用して完全前駆体または親抗体から作製することができる。例示的な技術を本明細書の他箇所に考察する。

【０１３６】

ある実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片の可変領域および定常領域の両方は、完全ヒトである。完全ヒト抗体は、当分野において公知のおよび本明細書に記載の技術を使用して作製することができる。例えば、特異的抗原に対する完全ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してそのような抗体を産生するように改変されたが、内在性遺伝子座が損なわれたトランスジェニック動物に抗原を投与することにより調製することができる。そのような抗体を作製するために使用することができる例示的な技術は、米国特許第６，１５０，５８４号明細書、米国特許第６，４５８，５９２号明細書、米国特許第６，４２０，１４０号明細書に記載されている。他の技術は、当分野において公知である。完全ヒト抗体は、同様に、種々のディスプレイ技術、例えば、本明細書の他箇所により詳細に記載されるファージディスプレイ系または他のウイルスディスプレイ系により産生することができる。

【０１３７】

本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、当分野において公知の技術を使用して作製または製造することができる。ある実施形態において、結合分子またはその断片は、「組換え産生」することができ、すなわち、組換えＤＮＡ技術を使用して産生される。抗体分子またはその断片を作製するための例示的な技術は、本明細書の他箇所により詳細に考察される。

【０１３８】

本明細書に記載のある抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体において、Ｆｃ部分は、当分野において公知の技術を使用してエフェクター機能を減少させるように突然変異させることができる。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化（点突然変異または他の手段を介する）は、循環改変抗体のＦｃ受容体結合を低減させ得、それにより腫瘍局在化を増加させる。他の場合、定常領域改変は補体結合を抑え、したがって血清半減期およびコンジュゲート細胞毒素の非特異的会合を低減させ得る。抗原特異性および抗体フレキシビリティーの増加に起因して局在の向上を可能とする定常領域のさらに他の改変を使用してジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を改変することができる。得られる生理学的プロファイル、バイオアベイラビリティーおよび改変の他の生化学的効果、例えば、局在化、生体分布および血清半減期は、周知の免疫学的技術を使用して過度の実験なしで容易に計測および定量することができる。

【０１３９】

ある実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、治療すべき動物において、例えば、ヒトにおいて有害な免疫応答を誘発しない。一実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、当分野において認識される技術を使用してそれらの免疫原性を低減させるように改変される。例えば、抗体は、ヒト化、脱免疫化することができ、またはキメラ抗体を作製することができる。これらのタイプの抗体は、親抗体の抗原結合特性を保持し、または実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性がより小さい非ヒト抗体、典型的には、

ネズミまたは霊長類抗体に由来する。このことは、種々の方法、例として、（ａ）非ヒト可変ドメイン全体をヒト定常領域上にグラフト化してキメラ抗体を生成すること；（ｂ）非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）の１つまたは複数の少なくとも一部を、クリティカルなフレームワーク残基を保持してまたは保持せずにヒトフレームワークおよび定常領域中にグラフト化すること；または（ｃ）非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によりヒト様セクションによりそれらを覆うことにより達成することができる。そのような方法は、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：６８５１－６８５５（１９８４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４４：６５－９２（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６（１９８８）；Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎ．２８：４８９－４９８（１９９１）；Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎ．３１：１６９－２１７（１９９４）、ならびに米国特許第５，５８５，０８９号明細書、米国特許第５，６９３，７６１号明細書、米国特許第５，６９３，７６２号明細書、および米国特許第６，１９０，３７０号明細書に開示されており、それらの全ては参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【０１４０】

脱免疫化を使用して抗体の免疫原性を減少させることもできる。本明細書において使用される用語「脱免疫化」には、Ｔ細胞エピトープを改変するための抗体の変化が含まれる（例えば、国際公開第９８５２９７６Ａ１号パンフレット、国際公開第００３４３１７Ａ２号パンフレット参照）。例えば、出発抗体からのＶＨおよびＶＬ配列を分析し、相補性決定領域（ＣＤＲ）および配列内の他のキー残基に関してエピトープの局在を示すそれぞれのＶ領域からヒトＴ細胞エピトープを「マッピング」する。Ｔ細胞エピトープマップからの個々のＴ細胞エピトープを分析して最終抗体の活性の変化が低リスクな代替アミノ酸置換を同定する。アミノ酸置換の組み合わせを含む一連の代替ＶＨおよびＶＬ配列を設計し、続いてこれらの配列を本明細書に開示の一連の結合ポリペプチド、例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ特異的抗体またはその抗原結合断片中に取り込み、次いで機能について試験する。次いで、改変ＶおよびヒトＣ領域を含む完全な重鎖および軽鎖遺伝子を発現ベクター中にクローニングし、後続のプラスミドを完全抗体の産生のために細胞系中に導入する。次いで、抗体を適切な生化学および生物学的アッセイにおいて比較し、最適なバリアントを同定する。

【０１４１】

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、当分野において公知の任意の好適な方法により生成することができる。対象の抗原に対するポリクローナル抗体は、当分野において周知の種々の手順により産生することができる。例えば、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ抗体またはその抗原結合断片は、種々の宿主動物、例として、限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラット、ニワトリ、ハムスター、ヤギ、ロバなどに投与して抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘導することができる。種々のアジュバントを使用して宿主種に応じて免疫学的応答を増加させることができ、それには、限定されるものではないが、フロイント（完全および不完全）、ミネラルゲル、例えば、水酸化アルミニウム、表面活性物質、例えば、リゾレシチン、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント、例えば、ＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・バルブム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）が含まれる。そのようなアジュバントも当分野において周知である。

【０１４２】

モノクローナル抗体は、当分野において公知の広範な技術、例として、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術の使用、またはそれらの組み合わせを使用し

て調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、例として当分野において公知のものおよび例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．（１９８８）に教示されるものを使用して産生することができる。

【０１４３】

抗体または抗体断片（例えば、抗原結合部位）をコードするＤＮＡは、抗体ライブラリー、例えば、ファージディスプレイライブラリーに由来していてもよい。特に、そのようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはネズミ）から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために利用することができる。対象の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原により、例えば、標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。これらの方法において使用されるファージは、典型的には、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆｖ ＯＥ ＤＡＢ（軽鎖または重鎖からの個々のＦｖ領域）またはファージ遺伝子ＩＩＩもしくは遺伝子ＶＩＩＩタンパク質に組換え融合されたジスルフィド安定化Ｆｖ抗体ドメインを有するファージから発現されるｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む糸状ファージである。例示的な方法は、例えば、欧州特許第３６８６８４Ｂ１号明細書；米国特許第５，９６９，１０８号明細書、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｈ．Ｒ．ａｎｄ Ｃｈａｍｅｓ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ２１：３７１（２０００）；Ｎａｇｙ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．８：８０１（２００２）；Ｈｕｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８：２６８２（２００１）；Ｌｕｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３１５：１０６３（２００２）に記載されており、それらのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの刊行物（例えば、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９－７８３（１９９２））は、鎖シャフリングによる高親和性ヒト抗体の産生、ならびに大ファージライブラリーの構築のための方針としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換えを記載している。別の実施形態において、リボソームディスプレイを使用してバクテリオファージをディスプレイプラットフォームとして置き換えることができる（例えば、Ｈａｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：１２８７（２０００）；Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８：３７５０（２００１）；またはＩｒｖｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４８：３１（２００１）参照）。さらに別の実施形態において、細胞表面ライブラリーを抗体についてスクリーニングすることができる（Ｂｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：１０７０１（２０００）；Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４３：２１１（２０００））。そのような手順は、モノクローナル抗体の単離および後続のクローニングのための慣習的なハイブリドーマ技術の代替手段を提供する。

【０１４４】

ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上でディスプレイされる。例えば、ＶＨおよびＶＬ領域をコードするＤＮＡ配列は、動物ｃＤＮＡライブラリー（例えば、リンパ組織のヒトまたはネズミｃＤＮＡライブラリー）または合成ｃＤＮＡライブラリーから増幅される。ある実施形態において、ＶＨおよびＶＬ領域をコードするＤＮＡは、ＰＣＲによりｓｃＦｖリンカーにより一緒に連結させ、ファージミドベクター（例えば、ｐＣＡＮＴＡＢ６またはｐＣｏｍｂ３ＨＳＳ）中にクローニングする。ベクターを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中にエレクトロポレートし、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）をヘルパーファージにより感染させる。これらの方法において使用されるファージは、典型的には、糸状ファージ、例として、ｆｄおよびＭ１３であり、ＶＨまたはＶＬ領域を通常、ファージ遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩのいずれかに組換え融合させる。対象の抗原（すなわち、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶ）に結合する抗原結合ドメイン

を発現するファージは、抗原により、例えば、標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。

【０１４５】

抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の追加の例には、Ｂｒｉｎｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８２：４１－５０（１９９５）；Ａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８４：１７７－１８６（１９９５）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２－９５８（１９９４）；Ｐｅｒｓｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １８７：９－１８（１９９７）；Ｂｕｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５７：１９１－２８０（１９９４）；ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４号明細書；ＰＣＴ公開国際公開第９０／０２８０９号パンフレット；国際公開第９１／１０７３７号パンフレット；国際公開第９２／０１０４７号パンフレット；国際公開第９２／１８６１９号パンフレット；国際公開第９３／１１２３６号パンフレット；国際公開第９５／１５９８２号パンフレット；国際公開第９５／２０４０１号パンフレット；および米国特許第５，６９８，４２６号明細書；米国特許第５，２２３，４０９号明細書；米国特許第５，４０３，４８４号明細書；米国特許第５，５８０，７１７号明細書；米国特許第５，４２７，９０８号明細書；米国特許第５，７５０，７５３号明細書；米国特許第５，８２１，０４７号明細書；米国特許第５，５７１，６９８号明細書；米国特許第５，４２７，９０８号明細書；米国特許第５，５１６，６３７号明細書；米国特許第５，７８０，２２５号明細書；米国特許第５，６５８，７２７号明細書；米国特許第５，７３３，７４３号明細書および米国特許第５，９６９，１０８号明細書に開示のものが含まれ、それらのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【０１４６】

上記参照文献および下記実施例において記載されるとおり、ファージ選択後、ファージからの領域をコードする抗体を単離し、使用して完全抗体、例として、ヒト抗体、または任意の他の所望の抗原結合断片を生成し、任意の所望の宿主、例として哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌中で発現させることができる。例えば、当分野において公知の方法、例えば、ＰＣＴ公開国際公開第９２／２２３２４号パンフレット；Ｍｕｌｌｉｎａｘ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １２（６）：８６４－８６９（１９９２）；およびＳａｗａｉ ｅｔ ａｌ．，ＡＪＲＩ ３４：２６－３４（１９９５）；およびＢｅｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１－１０４３（１９８８）（前記参照文献は、参照により全体として本明細書に組み込まれる）に開示のものを使用してＦａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$断片を組換え産生する技術も用いることができる。

【０１４７】

単鎖Ｆｖおよび抗体を産生するために使用することができる技術の例には、米国特許第４，９４６，７７８号明細書および米国特許第５，２５８，４９８号明細書；Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２０３：４６－８８（１９９１）；Ｓｈｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９０：７９９５－７９９９（１９９３）；およびＳｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０３８－１０４０（１９８８）に記載のものが含まれる。ある実施形態、例えば、治療投与において、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を使用することができる。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子、例えば、ネズミモノクローナル抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。キメラ抗体を産生する方法は、当分野において公知である。例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれるＭｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２５：１９１－２０２（１９８９）；米国特許第５，８０７，７１５号明細書；米国特許第４，８１６，５６７号明細書；および米国

特許第４，８１６３９７号明細書参照。ヒト化抗体は、非ヒト種からの１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する所望抗原に結合する非ヒト種抗体からの抗体分子である。ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変化、好ましくは、改善させるためにＣＤＲドナー抗体からの対応する残基により置換されることが多い。これらのフレームワーク置換は、当分野において周知の方法により、例えば、ＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用をモデリングして抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定し、配列比較して特定の位置において特殊なフレームワーク残基を同定することにより同定される。（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれるＱｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５８５，０８９号明細書；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３（１９８８）参照）。抗体は、当分野において公知の種々の技術、例として、例えばＣＤＲグラフト化（欧州特許第２３９，４００号明細書；ＰＣＴ公開国際公開第９１／０９９６７号パンフレット；米国特許第５，２２５，５３９号明細書；米国特許第５，５３０，１０１号明細書；および米国特許第５，５８５，０８９号明細書）、ベニアリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）またはリサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（欧州特許第５９２，１０６号明細書；欧州特許第５１９，５９６号明細書；Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａ．ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９１：９６９－９７３（１９９４））および鎖シャフリング（米国特許第５，５６５，３３２号明細書）を使用してヒト化することができる。

【０１４８】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の療法的治療に特に望ましい。ヒト抗体は、当分野において公知の種々の方法、例として、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記ファージディスプレイ法により作製することができる。それぞれが参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第４，４４４，８８７号明細書および米国特許第４，７１６，１１１号明細書；ならびにＰＣＴ公開国際公開第９８／４６６４５号パンフレット、国際公開第９８／５０４３３号パンフレット、国際公開第９８／２４８９３号パンフレット、国際公開第９８／１６６５４号パンフレット、国際公開第９６／３４０９６号パンフレット、国際公開第９６／３３７３５号パンフレット、および国際公開第９１／１０７４１号パンフレットも参照。

【０１４９】

ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現し得ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを使用して産生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体をランダムにまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞中に導入することができる。さらに、種々の会社は、上記と同様の技術を使用して選択抗原に対して指向されたトランスジェニックマウスにおいて産生されたヒト抗体の提供に参画し得る。

【０１５０】

選択エピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選択（ｇｕｉｄｅｄ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ）」と称される技術を使用して生成することができる。このアプローチにおいて、選択非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を使用して同一エピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドする（Ｊｅｓｐｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：８９９－９０３（１９８８）。米国特許第５，５６５，３３２号明細書も参照）。

【０１５１】

別の実施形態において、所望のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、慣用の手順を使用して容易に単離および配列決定することができる（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブの使用による）。単離およびサブクローニングされたハイブリドーマ細胞または単離ファージは、例

えば、そのようなＤＮＡの資源として機能し得る。ＤＮＡを単離したら、発現ベクター中に配置し、次いで他では免疫グロブリンを産生しない原核または真核宿主細胞、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または骨髄腫細胞中に形質移入することができる。より特定すると、単離ＤＮＡ（本明細書に記載のとおり合成であり得る）を使用して、参照により本明細書に組み込まれるＮｅｗｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第５，６５８，５７０号明細書、１９９５年１月２５日出願に記載のとおり抗体を製造するために定常および可変領域配列をクローニングすることができる。所望の抗体を発現する形質転換細胞は、比較的大量に成長させて免疫グロブリンの臨床および市販供給品を提供することができる。

【０１５２】

一実施形態において、単離結合分子、例えば、抗体は、抗体分子の少なくとも１つの重鎖または軽鎖ＣＤＲを含む。別の実施形態において、単離結合分子は、１つまたは複数の抗体分子からの少なくとも２つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、単離結合分子は、１つまたは複数の抗体分子からの少なくとも３つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、単離結合分子は、１つまたは複数の抗体分子からの少なくとも４つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、単離結合分子は、１つまたは複数の抗体分子からの少なくとも５つのＣＤＲを含む。別の実施形態において、本明細書の単離結合分子は、１つまたは複数の抗体分子からの少なくとも６つのＣＤＲを含む。

【０１５３】

具体的な実施形態において、重鎖および／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を調査して相補性決定領域（ＣＤＲ）の配列を、当分野において周知の方法により、例えば、他の重鎖および軽鎖可変領域の既知アミノ酸配列を比較して配列超可変性の領域を決定することにより同定することができる。定型的なＤＮＡ技術を使用して、ＣＤＲの１つまたは複数をフレームワーク領域内、例えば、ヒトフレームワーク領域中に挿入して非ヒト抗体をヒト化することができる。フレームワーク領域は、天然に生じるものまたはコンセンサスフレームワーク領域、好ましくは、ヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、ヒトフレームワーク領域の列記についてＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７８：４５７－４７９（１９９８）参照）。フレームワーク領域およびＣＤＲの組み合わせにより生成されたポリヌクレオチドは、所望の抗原、例えば、ＰｓｌまたはＰｃｒＶの少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する抗体をコードする。１つまたは複数のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内に作製することができ、アミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、そのような方法を使用して鎖内ジスルフィド結合に関与する１つまたは複数の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製して１つまたは複数の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を生成することができる。ポリヌクレオチドに対する他の変化は、本開示により包含され、当業者の能力の範囲内である。

【０１５４】

結合分子またはその断片がシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶに特異的に結合する本明細書に記載の抗体分子（例えば、ＶＨ領域および／またはＶＬ領域）のバリアント（誘導体を含む）を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる結合分子も提供される。当業者に公知の標準的な技術、例として、限定されるものではないが、アミノ酸置換をもたらす部位特異的突然変異導入およびＰＣＲ媒介突然変異導入を使用してシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子またはその断片をコードするヌクレオチド配列中に突然変異を導入することができる。バリアント（誘導体を含む）は、参照ＶＨ領域、ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、ＶＨＣＤＲ３、ＶＬ領域、ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、またはＶＬＣＤＲ３に対して５０未満のアミノ酸置換、４０未満のアミノ酸置換、３０未満のアミノ酸置換、２５未満のアミノ酸置換、２０未満のアミノ酸置換、１５未満のアミノ酸置換、１０未満のアミノ酸置換、５未満のアミノ酸置換、４未満のアミノ酸置換、３未満のアミノ酸置換、または２未満のアミノ酸置換を含むポリペプチドをコードする。「保存ア

ミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基により置き換えられたものである。類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。あるいは、突然変異は、コード配列の全部または一部に沿って、例えば飽和突然変異導入によりランダムに導入することができ、得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングして活性（例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶ結合能）を保持する突然変異体を同定することができる。

【０１５５】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域中にのみ、またはＣＤＲ領域中にのみ突然変異を導入することが可能である。導入される突然変異は、サイレントまたは中立ミスセンス突然変異であり得、すなわち、抗体の抗原結合能に対して影響を有さずまたはほとんど有さない。これらのタイプの突然変異は、コドン使用頻度を最適化するためまたはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中立ミスセンス突然変異は、抗体の抗原結合能を変化させ得る。ほとんどのサイレントおよび中立ミスセンス突然変異の局在は、フレームワーク領域中である可能性が高い一方、ほとんどの非中立ミスセンス突然変異の局在は、ＣＤＲ中である可能性が高いが、これらは絶対要件ではない。当業者は、所望の特性、例えば、不変の抗原結合活性または変化した結合活性（例えば、抗原結合活性の改善または抗体特異性の変化）を有する突然変異体分子を設計および試験することができる。突然変異導入後、コードされるタンパク質は定型的に発現させることができ、コードされるタンパク質の機能的および／または生物学的活性（例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌまたはＰｃｒＶの少なくとも１つのエピトープに結合する能力）は、本明細書に記載の技術を使用してまたは当分野において公知の定型的改変技術により測定することができる。

【０１５６】

一実施形態は、本明細書に開示する抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびＰｃｒＶ結合ドメインを含む二重特異性抗体を提供する。ある実施形態において、二重特異性抗体は、第１のＰｓｌ結合ドメインと、第２のＰｃｒＶ結合ドメインを含む。２より大きい原子価を有する二重特異性抗体が考慮される。例えば、本明細書に記載の方法を用いて、三重特異性抗体を作製することも可能である（Ｔｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：６０（１９９１））。

【０１５７】

一実施形態は、二重特異性抗体を製造する方法を提供し、この方法は、二重特異性分子に存在する両重鎖可変ドメインと対合することができる単一軽鎖を使用する。この軽鎖を同定するために、様々な戦略を用いることができる。一実施形態では、二重特異性抗体を用いてターゲティングすることができる各抗原に対して、一連のモノクローナル抗体を同定した後、これらの抗体に使用した軽鎖のどれが、第２標的に対して同定された抗体のいずれかの重鎖と対合したとき機能することができるかを決定する。このようにして、両方の抗原との結合を可能にするように２つの重鎖と機能し得る軽鎖を同定することができる。別の実施形態では、ファージディスプレイなどのディスプレイ技術によって、２つ以上の重鎖と共に機能し得る軽鎖を同定することができる。一実施形態では、多様なレパトアの重鎖可変ドメインと単一の軽鎖可変ドメインを含むファージライブラリーを構築する。このライブラリーをさらに使用して、目的とする様々な抗原に結合する抗体を同定することができる。従って、ある実施形態では、同定された抗体は、共通の軽鎖を有することになる。

【０１５８】
特定の実施形態において、二重特異性抗体は、少なくとも１つの一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）を含む。ある実施形態では、二重特異性抗体は、２つのｓｃＦｖを含む。例えば、１抗体内に含まれるＣＨ３ドメイン－含有ポリペプチドの一方または両方にｓｃＦｖを融合することができる。ある方法は、二重特異性分子を製造するステップを含み、ここで、少なくともＣＨ３ドメインを含む重鎖定常領域の一方または両方を一本鎖Ｆｖドメインと一緒に用いることにより、抗原結合を提供する。
【０１５９】
ＩＩＩ．抗体ポリペプチド
本開示はさらに、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を構成する単離ポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象とする。本明細書に開示の結合分子、例えば、抗体またはその断片は、ポリペプチド、例えば、例えば免疫グロブリン分子に由来するＰｓｌおよび／またはＰｃｒＶ特異的抗原結合領域をコードするアミノ酸配列を含む。指定のタンパク質「に由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。ある場合、特定の出発ポリペプチドまたはアミノ酸配列に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、出発配列、または少なくとも１０～２０アミノ酸、少なくとも２０～３０アミノ酸、少なくとも３０～５０アミノ酸からなりもしくは他では起源を出発配列中に有すると当業者に同定可能であるその一部分と本質的に同一のアミノ酸配列を有する。
【０１６０】
表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、または配列番号７４の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一の免疫グロブリン重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列を含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片も開示される。
【０１６１】
さらに、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、または配列番号７４の１つまたは複数と同一、または１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一のＶＨアミノ酸配列を含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片が開示される。
【０１６２】
一部の実施形態は、ＶＨを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＨのＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２またはＶＨＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、または配列番号７４の１つまたは複数の１つまたは複数の参照重鎖ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２またはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一の単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を含む。
【０１６３】
さらに、ＶＨを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＨのＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２またはＶＨＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、または配列番号７４の１つまたは複数の１つまたは複数の参照重鎖ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２および／またはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列と同一、または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一の単離結合分子、例えば、抗体ま

たはその抗原結合断片が開示される。したがって、この実施形態によれば、ＶＨは、表３に示すＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、またはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列の１つまたは複数と同一または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一のＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、またはＶＨＣＤＲ３の１つまたは複数を含む。

【０１６４】

表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、または配列番号１６の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一の免疫グロブリン軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列を含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片も開示される。

【０１６５】

一部の実施形態は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、または配列番号１６の１つまたは複数と同一、または１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一のＶＬアミノ酸配列を含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を開示する。

【０１６６】

ＶＬを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＬのＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、または配列番号１６の１つまたは複数の１つまたは複数の参照軽鎖ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一である単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片も提供される。

【０１６７】

さらに、ＶＬを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＬのＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、または配列番号１６の１つまたは複数の１つまたは複数の参照重鎖ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２および／またはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列と同一、または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一である単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片が提供される。したがって、この実施形態によれば、ＶＬは、表３に示すＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、またはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列の１つまたは複数と同一、または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一のＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、またはＶＬＣＤＲ３の１つまたは複数を含む。

【０１６８】

他の実施形態において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離抗体またはその抗原結合断片は、（ａ）それぞれ、配列番号１および配列番号２、（ｂ）それぞれ、配列番号３および配列番号２、（ｃ）それぞれ、配列番号４および配列番号２、（ｄ）それぞれ、配列番号５および配列番号６、（ｅ）それぞれ、配列番号７および配列番号８、（ｆ）それぞれ、配列番号９および配列番号１０、（ｇ）それぞれ、配列番号１１および配列番号１２、（ｈ）それぞれ、配列番号１３および配列番号１４；（ｉ）それぞれ、配列番号１５および配列番号１６または（ｊ）それぞれ、配列番号７４および配列番号１２と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一のＶＨおよびＶＬアミノ酸配列を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる。ある実施形態において、上記抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列配列番号１１を有するＶＨおよび配列番号１２のアミノ酸配列を有するＶＬを含む。一部の実施形態において、上記抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列配列番号１を有するＶＨおよび配列番号２のアミノ酸配列を有するＶＬを含む。他の実施形態において、上記抗体ま

たはその抗原結合断片は、アミノ酸配列配列番号１１を有するＶＨおよび配列番号１２のアミノ酸配列を有するＶＬを含む。

【０１６９】

特定の実施形態は、各々が相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む免疫グロブリンＶＨおよび免疫グロブリンＶＬを含有するシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を提供し、ここで、ＶＨ　ＣＤＲ１は、ＰＹＹＷＴ（配列番号４７）であり、ＶＨ　ＣＤＲ２は、ＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳ（配列番号４８）であり、ＶＨ　ＣＤＲ３は、以下：ＡＤＷＤＲＬＲＡＬＤＩ（Ｐｓｌ００９６、配列番号２５８）、ＡＭＤＩＥＰＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０２２５、配列番号２６７）、ＡＤＤＰＦＰＧＹＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８８、配列番号２６８）、ＡＤＷＮＥＧＲＫＬＤＩ（Ｐｓｌ０５６７、配列番号２６９）、ＡＤＷＤＨＫＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０３３７、配列番号２７０）、ＡＴＤＥＡＤＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２７１）、ＡＤＷＳＧＴＲＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０３０４，配列番号２７２）、ＧＬＰＥＫＰＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０３４８、配列番号２７３)、ＳＬＦＴＤＤＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５７３、配列番号２７４）、ＡＳＰＧＶＶＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５７４、配列番号２７５）、ＡＨＩＥＳＨＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８２、配列番号２７６）、ＡＴＱＡＰＡＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８４、配列番号２７７）、ＳＱＨＤＬＥＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８５、配列番号２７８）、およびＡＭＰＤＭＰＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８９、配列番号２７９)から成る群から選択され、ＶＬ　ＣＤＲ１は、ＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮ（配列番号５０）であり、ＶＬ　ＣＤＲ２は、ＧＡＳＮＬＱＳ（配列番号５１）であり、また、ＶＬ　ＣＤＲ３は、以下：ＱＱＳＴＧＡＷＮＷ（Ｐｓｌ００９６、配列番号２８０）、ＱＱＤＦＦＨＧＰＮ（Ｐｓｌ０２２５、配列番号２８１）、ＱＱＳＤＴＦＰＬＫ（Ｐｓｌ０５８８、配列番号２８２）、ＱＱＳＹＳＦＰＬＴ（ＷａｐＲ００４、Ｐｓｌ０５６７、Ｐｓｌ０５７３、Ｐｓｌ００５７４、Ｐｓｌ０５８２、Ｐｓｌ０５８４、Ｐｓｌ０５８５、配列番号５２）、ＱＤＳＳＳＷＰＬＴ（Ｐｓｌ０３３７、配列番号２８３）、ＳＱＳＤＴＦＰＬＴ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２８４）、ＧＱＳＤＡＦＰＬＴ(Ｐｓｌ０３０４、配列番号２８５)、ＬＱＧＤＬＷＰＬＴ（Ｐｓｌ０３４８、配列番号２８６）、およびＱＱＳＬＥＦＰＬＴ（Ｐｓｌ０５８９、配列番号２８７）から成る群から選択され、ここで、ＶＨおよびＶＬ　ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従う。

【０１７０】

特定の実施形態は、各々が相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、免疫グロブリンＶＨおよび免疫グロブリンＶＬを含有するシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を提供し、ここで、ＶＨ　ＣＤＲ１は、ＰＹＹＷＴ（配列番号４７）であり、ＶＨ　ＣＤＲ２は、ＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳ（配列番号４８）であり、ＶＬ　ＣＤＲ１は、ＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮ（配列番号５０）であり、ＶＬ　ＣＤＲ２は、ＧＡＳＮＬＱＳ（配列番号５１）であり、また、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ３は、それぞれ、ＡＤＷＤＲＬＲＡＬＤＩ（Ｐｓｌ００９６、配列番号２５８）およびＱＱＳＴＧＡＷＮＷ（Ｐｓｌ００９６、配列番号２８０）；ＡＭＤＩＥＰＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０２２５、配列番号２６７）およびＱＱＤＦＦＨＧＰＮ（Ｐｓｌ０２２５、配列番号２８１）；ＡＤＤＰＦＰＧＹＬＤＩ（Ｐｓｌ０５８８、配列番号２６８）およびＱＱＳＤＴＦＰＬＫ（Ｐｓｌ０５８８、配列番号２８２）；ＡＤＷＮＥＧＲＫＬＤＩ（Ｐｓｌ０５６７、配列番号２６９）およびＶＬ　ＣＤＲ３はＱＱＳＹＳＦＰＬＴ（ＷａｐＲ０００４、Ｐｓｌ０５６７、Ｐｓｌ０５７３、Ｐｓｌ００５７４、Ｐｓｌ０５８２、Ｐｓｌ０５８４、Ｐｓｌ０５８５、配列番号５２）であり；ＡＤＷＤＨＫＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０３３７、配列番号２７０）およびＱＤＳＳＳＷＰＬＴ（Ｐｓｌ０３３７、配列番号２８３）；ＡＴＤＥＡＤＨＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２７１）およびＳＱＳＤＴＦＰＬＴ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２８４）；ＡＤＷＳＧＴＲＡＬＤＩ（Ｐｓｌ０３０４，配列番号２７２）およびＧＱＳＤＡＦＰＬＴ(Ｐｓｌ０３０４、配列番号２８５)；ＧＬＰＥＫＰＨＡＬ

ＤＩ（ＰｓｌＯ３４８、配列番号２７３)および（ＰｓｌＯ３４８、配列番号２８６）；ＳＬＦＴＤＤＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５７３、配列番号２７４）および配列番号５２；ＡＳＰＧＶＶＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５７４、配列番号２７５）および配列番号５２；ＡＨＩＥＳＨＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５８２、配列番号２７６）および配列番号５２；ＡＴＱＡＰＡＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５８４、配列番号２７７）および配列番号５２；ＳＱＨＤＬＥＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５８５、配列番号２７８）および配列番号５２；またはＡＭＰＤＭＰＨＡＬＤＩ（ＰｓｌＯ５８９、配列番号２７９)およびＱＱＳＬＥＦＰＬＴ（ＰｓｌＯ５８９、配列番号２８７）を含む。

【０１７１】

特定の実施形態は、免疫グロブリンＶＨおよび免疫グロブリンＶＬを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片を提供し、ここで、ＶＨは、

【化１】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISPYYWTWIRQPPGK**X1**LELIGYIHSSGY

TDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADWDRLRALDIWG

QGTMVTVSS

（Ｘ１は、ＧまたはＣである）（ＰｓｌＯＯ９６、配列番号２８８）を含み、また、ＶＬは、

【化２】

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQS

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTGAWNWFG**X2**GTKVEIK

（Ｘ２は、ＧまたはＣである）（ＰｓｌＯＯ９６、配列番号２８９）を含み；ここで、ＶＨは、ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＭＤＩＥＰＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（ＰｓｌＯ２２５、配列番号２９０）を含み、また、ＶＬは、ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＤＤＧＦＰＮＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（ＰｓｌＯ２２５、配列番号２９１）を含み；ここで、ＶＨは、ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＤＤＰＦＰＧＹＬＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（ＰｓｌＯ５８８、配列番号２９２）を含み、またＶＬは、ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＤＴＦＰＬＫＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（ＰｓｌＯ５８８、配列番号２９３）を含み；ＶＨは、ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＤＷＮＥＧＲＫＬＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（ＰｓｌＯ５６７、配列番号２９４）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＤＷＤＨＫＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（ＰｓｌＯ３３７、配列番号２９５）を含み、また、ＶＬは、ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＤＳＳＳＷＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（ＰｓｌＯ３３７、配列番号２９６）

を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＴＤＥＡＤＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２９７）を含み、また、ＶＬは、ＥＩＶＬＴＱＳＰＳＳＬＳＴＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＳＱＳＤＴＦＰＬＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（Ｐｓｌ０１７０、配列番号２９８）を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＤＷＳＧＴＲＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０３０４、配列番号２９９）を含み、また、ＶＬは、ＥＩＶＬＴＱＳＰＳＳＬＳＴＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＷＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＧＱＳＤＡＦＰＬＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（Ｐｓｌ０３０４、配列番号３００）を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＧＬＰＥＫＰＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０３４８、配列番号３０１）を含み、また、ＶＬは、ＥＩＶＬＴＱＳＰＳＳＬＳＴＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＬＱＧＤＬＷＰＬＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（Ｐｓｌ０３４８、配列番号３０２）を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＳＬＦＴＤＤＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５７３、配列番号３０３）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＳＰＧＶＶＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５７４、配列番号３０４）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＨＩＥＳＨＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５８２、配列番号３０５）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＴＱＡＰＡＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５８４、配列番号３０６）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＳＱＨＤＬＥＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５８５、配列番号３０７）を含み、また、ＶＬは、配列番号１１を含み；ここで、ＶＨは、ＥＶＱＬＬＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＮＶＡＧＧＳＩＳＰＹＹＷＴＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＬＩＧＹＩＨＳＳＧＹＴＤＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＧＤＴＳＫＫＱＦＳＬＨＶＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＦＣＡＲＡＭＰＤＭＰＨＡＬＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（Ｐｓｌ０５８９、配列番号３０８）を含み；ここで、ＶＬは、ＥＩＶＬＴＱＳＰＳＳＬＳＴＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＲＳＨＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＬＥＦＰＬＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（Ｐｓｌ０５８９、配列番号３２５）を含む。

【０１７２】
また、式ＶＨ－Ｌ－ＶＬ、あるいは、ＶＬ－Ｌ－ＶＨ（Ｌは、リンカー配列である）を含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌＩに特異的に結合する単離抗体一本鎖Ｆｖ（ＳｃＦｖ）断片（「抗ＰｓｌＩＳｃＦｖ」）も開示される。特定の態様において、リンカーは、（ａ）［ＧＧＧＧＳ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、（ｂ）［ＧＧＧＧ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、または（ａ）および（ｂ）の組み合わせを含み得る。例えば、リンカーの一例は、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３２６）を含む。特定の実施形態では、リンカーは、リンカーのＣ末端にアミノ酸アラニン－ロイシンをさらに含む。特定の実施形態では、抗ＰｓｌＩＳｃＦｖは、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、または配列番号２６２のアミノ酸配列を含む。

【０１７３】
また、式ＶＨ－Ｌ－ＶＬ、あるいは、ＶＬ－Ｌ－ＶＨ（Ｌは、リンカー配列である）を含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離抗体一本鎖Ｆｖ（ＳｃＦｖ）断片（「抗ＰｃｒＶＳｃＦｖ」）も開示される。特定の態様において、リンカーは、（ａ）［ＧＧＧＧＳ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、（ｂ）［ＧＧＧＧ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、または（ａ）および（ｂ）の組み合わせを含み得る。例えば、リンカーの一例は、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３２６）を含む。特定の実施形態では、リンカーは、リンカーのＣ末端にアミノ酸アラニン－ロイシンをさらに含む。

【０１７４】
さらに、配列番号２１６または配列番号２１７と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％同一である免疫グロブリン重鎖可変領域（ＶＨ）および／または軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列を含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片も開示される。

【０１７５】
さらにまた、ＶＨを含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＨのＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２もしくはＶＨＣＤＲ３領域の１つまたは複数が、表３に示す配列番号２１８～２２０の１つもしくは複数の１つまたは複数の参照重鎖ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２および／もしくはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列と同一であるか、または４つ、３つ、２つ、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一である、単離結合分子も開示される。従って、この実施形態によれば、ＶＨは、表３に示すＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２もしくはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列の１つまたは複数と同一であるか、または４つ、３つ、２つ、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一であるＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、もしくはＶＨＣＤＲ３の１つもしくは複数を含む。

【０１７６】
さらには、ＶＬを含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＬのＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２もしくはＶＬＣＤＲ３領域の１つまたは複数が、表３に示す配列番号２２１～２２３の１つもしくは複数の１つまたは複数の参照軽鎖ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２および／もしくはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列と同一であるか、または４つ、３つ、２つ、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一である、単離結合分子も提供される。従って、この実施形態によれば、ＶＬは、表３に示すＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、もしくはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列の１つまたは複数と同一であるか、または４つ、３つ、２つ、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一であるＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２もしくはＶＬＣＤＲ３の１つもしくは複数を含む。

【０１７７】
また、ＶＨおよびＶＬを含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片であって、ＶＨが、配列番号２５５および配列番号２５７から成る群から選択されるアミノ酸配列を含み、また、ＶＬが、配列番号２５６のアミノ酸配列を含む、単離結合分子も提供される。
【０１７８】
さらに、各々がＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、ＶＨおよびＶＬを含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片も提供され、ここで、ＶＨ　ＣＤＲ１は、（ａ）ＳＹＡＭＳ（配列番号３１１）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであり、ＶＨ　ＣＤＲ２は、ＡＩＳＧＳＧＹＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号３１２）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであり、ＶＨ　ＣＤＲ３は、ＥＹＳＩＳＳＮＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号３１３）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであるか；あるいは（ｂ）ＶＬ　ＣＤＲ１は、ＷＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡ（配列番号３１４）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであり、ＶＬ　ＣＤＲ２は、ＡＡＳＴＬＱＳ（配列番号３１５）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであり、ＶＬ　ＣＤＲ３は、ＱＱＬＮＳＳＰＬＴ（配列番号３１６）、または１つ、２つ、３つ、もしくは４つの保存的アミノ酸置換を含むそのバリアントであるか；あるいは（ｃ）（ａ）および（ｂ）の組み合わせであり、ここで、ＶＨおよびＶＬ　ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従う。この実施形態の特定の態様では、（ａ）ＶＨは、配列番号３１７と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列を含み、（ｂ）ＶＬは、配列番号３１８と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列を含むか；あるいは（ｃ）（ａ）および（ｂ）の組み合わせである。
【０１７９】
さらにまた、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよびシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する単離二重特異性結合分子、例えば、二重特異性抗体またはその抗原結合断片も開示され、この分子は、配列番号２２８、配列番号２２９、もしくは配列番号２３５と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％同一の免疫グロブリン重鎖可変領域（ＶＨ）および／または軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列を含む。
【０１８０】
特定の実施形態において、本明細書に開示する二重特異性抗体は、ＢＳ１、ＢＳ２、ＢＳ３、またはＢＳ４の構造を有し、これらは全て、図１７に示す。本明細書に開示する特定の二重特異性抗体において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する結合ドメインは、抗ＰｓｌＳｃＦｖ分子を含む。他の態様では、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する結合ドメインは、通常の重鎖および軽鎖を含む。同様に、本明細書に開示する特定の二重特異性抗体において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する結合ドメインは、抗ＰｃｒＶＳｃＦｖ分子を含む。他の態様では、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに特異的に結合する結合ドメインは、通常の重鎖および軽鎖を含む。
【０１８１】
特定の実施形態において、本明細書に開示する二重特異性抗体は、２０１２年４月１６日に提出された米国仮特許出願第６１／６２４，６５１号明細書および２０１２年１１月６日に提出された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／６３６３９号明細書（代理人整理番号ＡＥＭＳ－１１５ＷＯ１、名称「ＭＵＬＴＩＳＰＥＣＩＦＩＣ　ＡＮＤ　ＭＵＬＴＩＶＡＬＥＮＴ　ＢＩＮＤＩＮＧ　ＰＲＯＴＥＩＮＳ　ＡＮＤ　ＵＳＥＳ　ＴＨＥＲＥＯＦ」）（これらは、参照により全体として本明細書に組み込まれる）に詳細に開示されているＢ

Ｓ４構造を有した。例えば、本開示は、抗ＰｓｌＳｃＦｖ分子が、抗ＰｃｒＶ抗体またはその断片の各重鎖のヒンジ領域に挿入されている二重特異性抗体を提供する。

【０１８２】

本開示は、抗体重鎖および抗体軽鎖を含む単離結合分子、例えば、二重特異性抗体を提供し、ここで、抗体重鎖は、式ＶＨ－ＣＨ１－Ｈ１－Ｌ１－Ｓ－Ｌ２－Ｈ２－ＣＨ２－ＣＨ３を含み、式中、ＣＨ１は、重鎖定常領域ドメイン－１であり、Ｈ１は、第１重鎖ヒンジ領域断片であり、Ｌ１は、第１リンカーであり、Ｓは、抗ＰｃｒＶＳｃＦｖ分子であり、Ｌ２は、第２リンカーであり、Ｈ２は、第２重鎖ヒンジ領域断片であり、ＣＨ２は、重鎖定常領域ドメイン－２であり、ＣＨ３は、重鎖定常領域ドメイン－３である。特定の態様では、ＶＨは、配列番号２５５、配列番号２５７、または配列番号３１７のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、Ｌ１およびＬ２は、同一のまたは異なっており、独立して、（ａ）［ＧＧＧＧＳ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、（ｂ）［ＧＧＧ］ｎ（ｎは、０、１、２、３、４、もしくは５である）、または（ａ）および（ｂ）の組み合わせを含む。特定の実施形態では、Ｈ１は、ＥＰＫＳＣ（配列番号３２０）を含み、Ｈ２は、ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号３２１）を含む。

【０１８３】

特定の態様において、Ｓは、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２４３、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６、配列番号２４７、配列番号２４８、配列番号２４９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５２、配列番号２５３、配列番号２５４、もしくは配列番号２６２のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列の２つ以上の任意の組み合わせを有する抗ＰｓｌＳｃＦｖ分子を含む。

【０１８４】

さらなる態様において、ＣＨ２－ＣＨ３は、（配列番号３２２）を含み、ここで、Ｘ１は、ＭまたはＹであり、Ｘ２は、ＳまたはＴであり、Ｘ３はＴまたはＥである。別の態様では、抗体軽鎖は、ＶＬ－ＣＬを含み、ここで、ＣＬは、抗体軽鎖κ定常領域または抗体軽鎖λ定常領域である。別の態様では、ＶＬは、配列番号２５６または配列番号３１８のアミノ酸配列を含む。ＣＬは、例えば、配列番号３２３のアミノ酸配列を含み得る。

【０１８５】

さらに、配列番号２６４を含むＶＨと、配列番号２６３のアミノ酸配列を含むＶＬを含む、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよびシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶの両方に特異的に結合する、単離結合分子、例えば、二重特異性抗体が提供される。

【０１８６】

一部の実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、タンデム一本鎖（ｓｃ）Ｆｖ断片であってよく、これは、リンカー（例えば、ポリペプチドリンカー）により互いに共有結合的にテザリングされた２つの異なるｓｃＦｖ断片（すなわち、Ｖ２Ｌ２およびＷ４）を含有する（Ｒｅｎ－Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ １００：１０９５－１１０３（２００４）；Ｋｏｒｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ ６：６４２－６５１（２００４））。いくつかの実施形態では、リンカーは、ＣＨ１ドメインなどの重鎖ポリペプチド定常領域の全部もしくは一部を含有するか、またはこの領域であり得る。いくつかの実施形態では、２つの抗体断片は、米国特許第７，１１２，３２４号明細書および第５，５２５，４９１号明細書に記載されているように、ポリグリシン－セリンまたはポリセリン－グリシンリンカーによって共有結合することができる。二重特異性タンデムｓｃＦｖ抗体を作製する方法は、Ｍａｌｅｔｚ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ９３：４０９－４１６（２００１）；およびＨｏｎｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ １８：６３６－６４４（２００４）に記載されている。あるいは、抗体は、Ｚａｐａｔａ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８：１０５７－１０６２（１９９５）に記載されているように、「線状抗体」であってもよい。手短には、これらの抗体は、１対の抗原結合領域を形成する１対のタンデムＦｄセグメント（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む。

【０１８７】
本開示はまた、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２５（１１）：１２９０－１２９７に記載の四価ドュアル可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ）分子などの二重特異性抗体のバリアント形態も包含する。ＤＶＤ－Ｉｇ分子は、２つの異なる親抗体由来の２つの異なる軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、組換えＤＮＡ技術により直接または短いリンカーを介してタンデムで連結され、これに軽鎖定常ドメインか続くように設計される。例えば、ＤＶＤ－Ｉｇ軽鎖ポリペプチドは、（ａ）Ｖ２Ｌ２由来のＶＬ；および（ｂ）ＷａｐＲ－００４由来のＶＬをタンデムで含有することができる。同様に、重鎖は、タンデムで連結された２つの異なる重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、これに続く定常ドメインＣＨ１およびＦｃ領域を含む。例えば、ＤＶＤ－Ｉｇ重鎖ポリペプチドは、（ａ）Ｖ２Ｌ２由来のＶＨ；および（ｂ）ＷａｐＲ－００４由来のＶＨをタンデムで含有することができる。この場合、細胞中の２つの鎖の発現によって、４つの抗原結合部位を含むヘテロテトラマーが形成され、その２つは、Ｖ２Ｌ２に特異的に結合し、２つはＰｓｌに特異的に結合する。２つの親抗体からＤＶＤ－Ｉｇ分子を生成する方法は、例えば、ＰＣＴ公開番号：国際公開第２００８／０２４１８８号パンフレットおよび国際公開第２００７／０２４７１５号パンフレットにさらに記載されている。

【０１８８】
ある実施形態において、本明細書に記載の単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍ、または１０$^{-15}$Ｍ以下の解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。

【０１８９】
具体的な実施形態において、本明細書に記載の単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、約１×１０$^{-10}$から約１×１０$^{-6}$Ｍの範囲の解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。一実施形態において、本明細書に記載の単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のＯＣＴＥＴ（登録商標）結合アッセイにより測定される約１．１８×１０$^{-7}$ＭのK_Dを特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。別の実施形態において、本明細書に記載の単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のＯＣＴＥＴ（登録商標）結合アッセイにより測定される約１．４４×１０$^{-7}$ＭのK_Dを特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。

【０１９０】
一部の実施形態は、（ａ）上皮細胞への緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を阻害することができ、（ｂ）緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進することができ、または（ｃ）上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を阻害することができ、しかも、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進することができる上記単離結合分子、例えば、前述したような抗体またはその断片を含む。

【０１９１】
一部の実施形態において、上記単離結合分子、例えば、抗体またはその断片において、上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）付着の最大阻害は、約５０μｇ／ｍｌ以下、５．０μｇ／ｍｌ以下、もしくは約０．５μｇ／ｍｌ以下の抗体濃度、または約３０μｇ／ｍｌから約０．３μｇ／ｍｌの範囲の抗体濃度、または約１μｇ／ｍｌの抗体濃

度、または約０．３μｇ／ｍｌの抗体濃度において達成される単離結合分子、例えば、抗体またはその断片。

【０１９２】

特定の実施形態は、ＯＰＫ　ＥＣ５０が、約０．５μｇ／ｍｌ未満、約０．０５μｇ／ｍｌ未満、もしくは約０．００５μｇ／ｍｌ未満であり、また、ＯＰＫ　ＥＣ５０が、約０．００１μｇ／ｍｌから約０．５μｇ／ｍｌの範囲であり、またはＯＰＫ　ＥＣ５０が、約０．０２μｇ／ｍｌから約０．０８μｇ／ｍｌの範囲であり、またはＯＰＫ　ＥＣ５０は、約０．００２μｇ／ｍｌから約０．０１μｇ／ｍｌの範囲であり、またはＯＰＫ　ＥＣ５０は、約０．２μｇ／ｍｌ未満であり、またはＯＰＫ　ＥＣ５０は、約０．０２μｇ／ｍｌ未満である、上記単離結合分子、例えば、前述したような抗体またはその断片を含む。ある実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａ）Ｐｓｌ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－００４、ＷａｐＲ－００４ＲＡＤ、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、もしくはＣａｍ－００５と同一のＰｓｌエピトープに特異的に結合し、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。ＷａｐＲ－００４ＲＡＤは、配列番号１１のＶＨアミノ酸配列のアミノ酸置換Ｇ９８Ａを除いてＷａｐＲ－００４と同一である。

【０１９３】

一部の実施形態は、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１３５、配列番号１３６、配列番号１３７、配列番号１３８、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１４４、配列番号１４５；または配列番号１４６の１つまたは複数と同一、または１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一のｓｃＦｖ－Ｆｃ分子アミノ酸配列を含むＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体を含む。

【０１９４】

他の実施形態は、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１３５、配列番号１３６、配列番号１３７、配列番号１３８、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１４４、配列番号１４５；または配列番号１４６の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一のｓｃＦｖ－Ｆｃ分子アミノ酸配列を含むＷａ

ｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体を含む。

【０１９５】

一部の実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌ結合分子、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、もしくはＷａｐＲ－００３と同一のエピトープに特異的に結合し、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。

【０１９６】

ある実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－０１６と同一のエピトープに特異的に結合し、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。

【表２－１】

表 2: 参照 VH および VL アミノ酸配列*

抗体名	VH	VL
Cam-003	QVRLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSTS**PYFWS**WLRQPPGKGLEWIG**YIHSNGGTNYNPSLKS**RLTISGDTSKNQFSLNLSFVTAADTALYYCARTDYDVYGPAFDIWGQGTMVTV 配列番号 1	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGNHVV**FGGGTKLTVL 配列番号 2
Cam-004	QVQLQQSGPGRVKPSETLSLTCTVSGYSVS**SGYYWG**WIRQSPGTGLEWIG**SISHSGSTYYNPSLKS**RVTISGDASKNQFFLRLTSVTAADTAVYYCAR**SEATANFDS**WGRGTLVTVSS 配列番号 3	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGNHVV**FGGGTKLTVL 配列番号 2
Cam-005	QVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVS**SSGYYWT**WIRQPPGKGLEWIG**SIYSSGSTYYSPSLKS**RVTISGDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR**LNWGTVSAFDI**WGRGTLVTV 配列番号 4	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGNHVV**FGGGTKLTVL 配列番号 2

【表２－２】

抗体名	VH	VL
WapR-001	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCSASGFTFS**RYP MH**WVRQAPGKGLEY VS**DIGTNGGSTNYADS VKG**RFTISRDNSKNTV YLQMSSLRAEDTAVY HCVA**GIAAAYGFDV**W GQGTMVTVSS 配列番号５	QAGLTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSS DIATYNYVS**WYQQHPGKAPKLMIY**E GTKRPS**GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYC**SSYARSYTYV**FGT GTELTVL 配列番号６
WapR-002	QVQLVQSGGGLVQPG GSLRLSCSASGFTFS**SY PMH**WVRQAPGKGLD YVS**DISPNGGSTNYAD SVKG**RFTISRDNSKNT LFLQMSSLRAEDTAVY YCVM**GLVPYGFDI**WG QGTLVTVSS 配列番号７	QTVVTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSS DVGGYNYVS**WYQQHPGKAPKLMIY **EVSNRPS**GVSNHFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYC**SSYTTSSTYV**FGT GTKVTVL 配列番号８
WapR-003	QMQLVQSGGGLVQPG GSLRLSCSASGFTFS**SY PMH**WVRQAPGKGLD YVS**DISPNGGATNYA DSVKG**RFTISRDNSKN TVYLQMSSLRAEDTAV YYCVM**GLVPYGFDN** WGQGTMVTVSS 配列番号９	QTVVTQPASVSASPGQSITISC**AGTSG DVGNYNFVS**WYQQHPGKAPKLLIY**E GSQRPS**GVSNRFSGSRSGNTASLTIS GLQAEDEADYYC**SSYARSYTYV**FGT GTKLTVL 配列番号１０

【表２－３】

抗体名	VH	VL
WapR-004	EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSIS**PYYWT**WIRQPPGKGLELIG**YIHSSGYTDYNPSLKS**RVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCAR**GDWDLLHALDI**WGQGTLVTVSS 配列番号 11	EIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITC**RASQSIRSHLN**WYQQKPGKAPKLLIY**GASNLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSFPLT**FGGGTKLEIK 配列番号 12
WapR-007	EVQLVQSGADVKKPGASVRVTCKASGYTFT**GHNIH**WVRQAPGQGLEWMG**WINPDSGATSYAQKFQG**RVTMTRDTSITTAYMDLSRLRSDDTAVYYCAT**DTLLSNH**WGQGTLVTVSS 配列番号 13	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYTN**WFQQKPGQAPLLVVY**AKNKRPP**GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC**HSRDSSGNHVV**FGGGTKLTVL 配列番号 14
WapR-016	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFS**SYATS**WVRQAPGKGLEWVA**GISGSGDTTDYVDSVKG**RFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAS**RGGLGGYYRGGFDF**WGQGTMVTVSS 配列番号 15	QSVLTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGGYNYVS**WYQQHPGKAPKLMIY**EVSNRPS**GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYC**SSYSSGTVV**FGGGTELTVL 配列番号 16

【表２－４】

抗体名	VH	VL
WapR-004RAD	EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSIS**PYYWT**WIRQPPGKGLELIG**YIHSSGYTDYNPSLKS**RVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCAR**ADWDLLHALDI**WGQGTLVTVSS 配列番号 74	EIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITC**RASQSIRSHLN**WYQQKPGKAPKLLIY**GASNLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSFPLT**FGGGTKLEIK 配列番号 12
V2L2	EMQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMN**WVRQAPGEGLEWVS**AITISGITAYYTDSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAK**EEFLPGTHYYYGMDV**WGQGTTVTVSS 配列番号 216	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGIRNDLG**WYQQKPGKAPKLVIY**SASTLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLSISSLQPDDFATYYC**LQDYNYPWT**FGQGTKVEIK 配列番号 217

*VH および VL CDR1、CDR2、および CDR3 アミノ酸配列を下線により示す

【表３－１】

表 3: 参照 VH ならびに VL CDR1、CDR2、および CDR3 アミノ酸配列

抗体名	VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
Cam-003	PYFWS 配列番号 17	YIHSNGGTNYNPSLKS 配列番号 18	TDYDVYGPAFDI 配列番号 19	QGDSLRSYYAS 配列番号 20	GKNNRPS 配列番号 21	NSRDSSGNHVV 配列番号 22

【表３－２】

抗体名	VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
Cam-004	SGYYWG 配列番号23	SISHSGSTYYNPSLKS 配列番号24	SEATANFDS 配列番号25	QGDSLRSYYAS 配列番号20	GKNNRPS 配列番号21	NSRDSSGNHVV 配列番号22
Cam-005	SSGYYWT 配列番号26	SIYSSGSTYYSPSLKS 配列番号27	LNWGTVSAFDI 配列番号28	QGDSLRSYYAS 配列番号20	GKNNRPS 配列番号21	NSRDSSGNHVV 配列番号22
WapR-001	RYPMH 配列番号29	DIGTNGGSTNYADSVKG 配列番号30	GIAAAYGFDV 配列番号31	TGTSSDIATYNYVS 配列番号32	EGTKRPS 配列番号33	SSYARSYTYV 配列番号34
WapR-002	SYPMH 配列番号35	DISPNGGSTNYADSVKG 配列番号36	GLVPYGFDI 配列番号37	TGTSSDVGGYNYVS 配列番号38	EVSNRPS 配列番号39	SSYTTSSTYV 配列番号40
WapR-003	SYPMH 配列番号41	DISPNGGATNYADSVKG 配列番号42	GLVPYGFDN 配列番号43	AGTSGDVGNYNFVS 配列番号44	EGSQRPS 配列番号45	SSYARSYTYV 配列番号46

【表３－３】

抗体名	VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
WapR-004	PYYWT 配列番号 47	YIHSSGYTDYNPSLKS 配列番号 48	GDWDLLHALDI 配列番号 49	RASQSIRSHLN 配列番号 50	GASNLQS 配列番号 51	QQSYSFPLT 配列番号 52
WapR-007	GHNIH 配列番号 53	WINPDSGATSYAQKFQG 配列番号 54	DTLLSNH 配列番号 55	QGDSLRSYYTN 配列番号 56	AKNKRPP 配列番号 57	HSRDSSGNHVV 配列番号 58
WapR-016	SYATS 配列番号 59	GISGSGDTTDYVDSVKG 配列番号 60	RGGLGGYYRGGFDF 配列番号 61	TGTSSDVGGYNYVS 配列番号 62	EVSNRPS 配列番号 63	SSYSSGTVV 配列番号 64
WapR-004RAD	PYYWT 配列番号 47	YIHSSGYTDYNPSLKS 配列番号 48	ADWDLLHALDI 配列番号 75	RASQSIRSHLN 配列番号 50	GASNLQS 配列番号 51	QQSYSFPLT 配列番号 52
V2L2	SYAMN 配列番号 218	AITISGITAYYTDSVKG 配列番号 219	EEFLPGTHYYYGMDV 配列番号 220	RASQGIRNDLG 配列番号 221	SASTLQS 配列番号 222	LQDYNYPWT 配列番号 223

【０１９７】

特定の実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２と同一のＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、および／またはこうしたモノクローナル抗体がシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合するのを競合阻害する。

【０１９８】

例えば、ある態様では、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、Ｖ２Ｌ２および／またはＶ２Ｌ２－ＭＤを含む。

【０１９９】

ある実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体２９Ｄ２と同一のＰｃｒＶエピトープに特異的に結合する、および／またはこうしたモノクローナル抗体がシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｃｒＶに結合するのを競合阻害する。

【０２００】
本明細書に記載の任意の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、追加のポリペプチド、例えば、コードされるポリペプチドの分泌を指向させるためのシグナルペプチド、本明細書に記載の抗体定常領域、または本明細書に記載の他の異種ポリペプチドをさらに含み得る。さらに、本明細書の結合分子またはその断片は、他箇所に記載のポリペプチド断片を含む。さらに、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、本明細書に記載の融合ポリペプチド、Ｆａｂ断片、ｓｃＦｖ、または他の誘導体であり得る。

【０２０１】
また、本明細書の他箇所により詳細に記載されるとおり、本開示は、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体を含む組成物を含む。

【０２０２】
本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、それらが由来した天然に生じる結合ポリペプチドからのそれらのアミノ酸配列において変動するように改変することができることも当業者により理解される。例えば、設計されたタンパク質に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、類似であり得、例えば、出発配列とある同一性パーセントを有し、例えば、それは出発配列と６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％同一であり得る。

【０２０３】
当分野では公知のように、２つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、１つのポリペプチドのアミノ酸配列を第２のポリペプチドの配列と比較することにより決定する。本明細書において述べる場合、いずれか特定のポリペプチドが、別のポリペプチドと約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％同一であるかどうかは、当分野において公知の方法およびコンピュータプログラム／ソフトウエア、例えば、限定されるものではないが、ＢＥＳＴＦＩＴプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ ５３７１１）を使用して決定することができる。ＢＥＳＴＦＩＴは、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２：４８２－４８９（１９８１）の局所相同性アルゴリズムを使用して２つの配列間の相同性の最良のセグメントを見出す。特定の配列が、例えば参照配列と９５％同一かどうかを決定するためにＢＥＳＴＦＩＴまたは任意の他の配列アラインメントプログラムを使用する場合、パラメータは、無論、同一性の割合が参照ポリペプチド配列の全長にわたり計算され、参照配列中のアミノ酸の総数の５％までの相同性のギャップが許容されるように設定される。

【０２０４】
「配列同一性」の割合はまた、比較ウインドウにわたって２つの最適にアラインメントした配列を比較することにより決定することもできる。比較用の配列を最適にアラインメントするために、比較ウインドウ内中のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの部分は、ギャップと呼ばれる付加または欠失を含み得るが、参照配列は一定に維持する。最適なアラインメントは、ギャップがある場合でも、参照および比較配列間の可能な限り大きな数の「同一」位置をもたらすアラインメントである。２つの配列間の「配列同一性」パーセントの決定は、２００４年９月１日現在、国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）から入手可能なプログラムのバージョン「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」を用いて決定することができ、このプログラムは、プログラムＢＬＡＳＴＮ（ヌクレオチ

ド配列比較用）およびＢＬＡＳＴＰ（ポリペプチド配列比較用）を組み込んでおり、これらのプログラムは、ＫａｒｌｉｎおよびＡｌｔｓｃｈｕｌ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０（１２）：５８７３－５８７７，１９９３）に基づく。「ＢＬＡＳＴ　２　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」を使用する場合、２００４年９月１日現在のデフォルトパラメータであるパラメータは、語長（３）、オープンギャップペナルティ（１１）、伸張ギャップペナルティ（１）、ギャップドロップオフ（５０）、例外値（１０）およびいずれか他の要求されるパラメータ、限定されるものではないが、マトリックスオプションなどに用いることができる。

【０２０５】

さらに、「非必須」アミノ酸領域における保存置換または変化に導くヌクレオチドまたはアミノ酸置換、欠失、または挿入を作製することができる。例えば、設計されたタンパク質に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、１つまたは複数の個々のアミノ酸置換、挿入、または欠失、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０以上の個々のアミノ酸置換、挿入、または欠失を除いて出発配列と同一であり得る。ある実施形態において、設計されたタンパク質に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、出発配列に対して１から５、１から１０、１から１５、または１から２０の個々のアミノ酸置換、挿入、または欠失を有する。

【０２０６】

本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、融合タンパク質を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなり得る。融合タンパク質は、例えば、少なくとも１つの標的結合部位、および少なくとも１つの異種部分、すなわち、天然で自然に結合しない部分を有する免疫グロブリン抗原結合ドメインを含むキメラ分子である。アミノ酸配列は、通常、融合ポリペプチドに一緒になる別個のタンパク質中に存在し得、またはそれらは通常、同一タンパク質中に存在し得るが、融合ポリペプチド中の新たな配置で配置される。融合タンパク質は、例えば、化学合成により、またはペプチド領域が所望の関係でコードされるポリヌクレオチドを作出および翻訳することにより作出することができる。

【０２０７】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または他の部分に適用される用語「異種」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または他の部分が比較されている実体の残部から区別される実体に由来することを意味する。非限定的な例において、結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体に融合すべき「異種ポリペプチド」は、同一種の非免疫グロブリンポリペプチド、または異なる種の免疫グロブリンもしくは非免疫グロブリンポリペプチドに由来する。

【０２０８】

ＩＶ．融合タンパク質および抗体コンジュゲート

一部の実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、コンジュゲート形態で複数回投与することができる。さらに別の実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、未コンジュゲート形態で投与し、次いでコンジュゲート形態で投与することができ、またはその逆で投与することができる。

【０２０９】

具体的な実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、１つまたは複数の抗菌剤、例えば、ポリミキシンＢ（ＰＭＢ）にコンジュゲートすることができる。ＰＭＢは、多剤耐性グラム陰性感染の治療について承認された小分子リポペプチド抗生物質である。ＰＭＢは、その殺菌活性に加え、リポ多糖（ＬＰＳ）に結合

し、その炎症促進効果を中和する。（Ｄｉｘｏｎ，Ｒ．Ａ．＆　Ｃｈｏｐｒａ，Ｉ．Ｊ　Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ　１８，５５７－５６３（１９８６））。ＬＰＳは、炎症およびグラム陰性敗血症の発症に顕著に寄与すると考えられている。（Ｇｕｉｄｅｔ，Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｓｔ　１０６，１１９４－１２０１（１９９４））。担体分子へのＰＭＢのコンジュゲートは、内毒素血症および感染の動物モデルにおいてＬＰＳを中和し、保護を媒介することが示されている。（Ｄｒａｂｉｃｋ，Ｊ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ　Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ　４２，５８３－５８８（１９９８））。１つまたは複数のＰＭＢ分子を、本開示のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）のＦｃ領域中に導入されたシステイン残基に付着する方法も開示される。例えば、Ｃａｍ－００３－ＰＭＢコンジュゲートは、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）への特異的なｍＡｂ媒介結合を保持し、ＯＰＫ活性も保持した。さらに、ｍＡｂ－ＰＭＢコンジュゲートは、インビトロでＬＰＳに結合し、それを中和した。具体的な実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、抗生物質（例えば、シプロフロキサシン、メロペネム、トブラマイシン、アズトレオナム）と併用することができる。

【０２１０】

ある実施形態において、本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、抗体と通常会合していない異種アミノ酸配列または１つまたは複数の他の部分（例えば、抗菌剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生物学的応答改質剤、医薬剤、リンホカイン、異種抗体またはその断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、および任意の前記薬剤の２つ以上の組み合わせ）を含み得る。さらなる実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、酵素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、または任意の前記検出可能な標識の２つ以上の組み合わせからなる群から選択される検出可能な標識を含み得る。

【０２１１】

Ｖ．結合分子をコードするポリヌクレオチド

本明細書に記載の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードする核酸分子も、本明細書において提供される。

【０２１２】

一実施形態は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号７４、または配列番号２１６の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％もしくは１００％同一である免疫グロブリン重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列をコードする核酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２１３】

一実施形態は、配列番号２５７または配列番号２５９の免疫グロブリン重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列をコードする核酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。例えば、それぞれ、配列番号２６１、および配列番号２５９の核酸配列。

【０２１４】

別の実施形態は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号７４、または配列番号２１６の１つもしくは複数と同一であるか、あるいは１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一であるＶＨアミノ酸配列をコードする核酸を含む、本質的にそれから構成される、またはそれから構成される単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２１５】
さらに別の実施形態は、ＶＨをコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、ＶＨのＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２またはＶＨＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号７４、または配列番号２１６の１つもしくは複数の１つもしくは複数の参照重鎖ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２および／またはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列と同一であるか、あるいは４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２１６】
別の実施形態は、ＶＨを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、ＶＨのＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２またはＶＨＣＤＲ３領域の１つまたは複数は、表２に示す配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、または配列番号７４の１つまたは複数の１つまたは複数の参照重鎖ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２および／またはＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列と同一、または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一の単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２１７】
さらなる実施形態は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的または優先的に結合するポリヌクレオチドによりコードされるＶＨを含む単離結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片を提供する。

【０２１８】
別の実施形態は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、または配列番号２１７の１つもしくは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一の免疫グロブリン軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列をコードする核酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２１９】
別の実施形態は、配列番号２５６の免疫グロブリン軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列をコードする核酸、例えば、配列番号２６０の核酸配列を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２２０】
さらなる実施形態は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、または配列番号２１７の１つもしくは複数と同一であるか、あるいは１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一であるＶＬアミノ酸配列をコードする核酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２２１】
別の実施形態は、ＶＬをコードする核酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、ＶＬのＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３領域の１つもしくは複数は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、もしくは配列番号１６、または配列番号２１７の１つもしくは複数の１つもしくは複数の参照軽鎖ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２２２】
さらなる実施形態は、ＶＬを含むシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌに特異的に結合する単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片をコードする核

酸を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、ＶＬのＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３領域の１つもしくは複数は、表２に示す配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、または配列番号２１７の１つもしくは複数の１つもしくは複数の参照重鎖ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２および／またはＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列と同一であるか、または４、３、２、もしくは１つのアミノ酸置換を除いて同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２２３】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドによりコードされるＶＬを含む単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的または優先的に結合する。

【０２２４】

一実施形態は、ＶＨおよびＶＬを含むｓｃＦｖ分子をコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、ｓｃＦｖは、表４に示す配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、または配列番号７０の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【表４－１】

表 4: 参照 scFv 核酸配列

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
Cam-003	CAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCCAG GACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCACCAGTCCTTACTTCTGGAGCTGGCTCCGGC AGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGTTATATCCATTC CAATGGGGGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGACTC ACCATATCAGGAGACACGTCCAAGAACCAATTCTCCCTGAATC TGAGTTTTGTGACCGCTGCGGACACGGCCCTCTATTACTGTGCG AGAACGGACTACGATGTCTACGGCCCCGCTTTTGATATCTGGG GCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTC AGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGATCGTCTGAGCTGAC TCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGG ATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCT GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTA TGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGG CTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGGA CAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAGGTGCGGCCGCA **配列番号 65**

【表４－２】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
Cam-004	CAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCCAG GACGGGTGAAGCCTTCGGAGACGCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTTACTCCGTCAGTAGTGGTTACTACTGGGGCTGGATCC GGCAGTCCCCAGGGACGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTC TCATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA GTCACCATATCAGGAGACGCATCCAAGAACCAGTTTTTCCTGA GGCTGACTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTTTATTACTGT GCGAGATCTGAGGCTACCGCCAACTTTGATTCTTGGGGCAGGG GCACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGG AGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGATCGTCTGAGCTGACTCAGGAC CCTGCCGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACAT GCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCA GCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAA AACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCA GCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGC GGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGGACAGCAGT GGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC TAGGTGCGGCCGCA **配列番号** 66

10 20 30

【表４－３】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
Cam-005	CAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCCAG GACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTAGTGGTTATTACTGGACCTGG ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGT ATCTATTCTAGTGGGAGCACATATTACAGCCCGTCCCTCAAGA GTCGAGTCACCATATCCGGAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTCAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACAGCCGTGTAT TACTGTGCGAGACTTAACTGGGGCACTGTGTCTGCCTTTGATAT CTGGGGCAGAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGC GGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGATCGTCTGAG CTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAG TCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGC AAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTC ATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAT TCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACT GGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCC GGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCA AGCTGACCGTCCTAGGTGCGGCCGCA **配列番号** 67

【表４－４】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-001	TCTATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGA GTCTGGGGGAGGTTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTTCAGCCTCTGGGTTCACCTTCAGTCGGTATCCTATGCA TTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCA GATATTGGTACTAATGGGGGTAGTACAAACTACGCAGACTCCG TGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GGTGTATCTTCAAATGAGCAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCT GTGTATCATTGTGTGGCGGGTATAGCAGCCGCCTATGGTTTTGA TGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGAGGC GGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGAAGTGCA CAGGCAGGGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTG GACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACAT TGCTACTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGC AAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGGCACTAAGCGGCCCT CAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACG GCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTG ATTATTACTGTTCCTCATATGCACGTAGTTACACTTATGTCTTC GGAACTGGGACCGAGCTGACCGTCCTAGCGGCCGC **配列番号** 68

【表４－５】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-002	CTATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG TCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT CCTGTTCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATCCTATGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGATTATGTTTCAG ACATCAGTCCAAATGGGGGTTCCACAAACTACGCAGACTCCGT GAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACA CTGTTTCTTCAAATGAGCAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG TGTATTATTGTGTGATGGGGTTAGTACCCTATGGTTTTGATATC TGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGAGGCGGCG GTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGAAGTGCACAGA CTGTGGTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTG GTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGC CCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGG GTTTCTAATCACTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTC CCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAT TACTGCAGCTCATATACAACCAGCAGCACTTATGTCTTCGGAA CTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGCGGCCG **配列番号 69**

【表４－６】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-003	CGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGATGCAGCTGGTGCAGTCGGG GGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT TCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATCCTATGCACTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGATTATGTTTCAGACATC AGTCCAAATGGGGGTGCCACAAACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGT ATCTTCAAATGAGCAGTCTGAGAGCTGAAGACACGGCTGTCTA TTATTGTGTGATGGGGTTAGTGCCCTATGGTTTTGATAACTGGG GCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGAGGCGGCGGTTC AGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGAAGTGCACAGACTGT GGTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGCATCTCCTGGACAGTCG ATCACCATCTCCTGCGCTGGAACCAGCGGTGATGTTGGGAATT ATAATTTTGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCC CAAACTCCTGATTTATGAGGGCAGTCAGCGGCCCTCAGGGGTT TCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACGGCCTCCCT GACAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTAC TGTTCCTCATATGCACGTAGTTACACTTATGTCTTCGGAACTGG GACCAAGCTGACCGTCCTAGCGGCCGCA **配列番号 70**

【表４－７】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-004	TATGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGT CGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC CTGCAATGTCGCTGGTGGCTCCATCAGTCCTTACTACTGGACCT GGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTTGATTGGTTA TATCCACTCCAGTGGGTACACCGACTACAACCCCTCCCTCAAG AGTCGAGTCACCATATCAGGAGACACGTCCAAGAAGCAGTTCT CCCTGCACGTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTA CTTCTGTGCGAGAGGCGATTGGGACCTGCTTCATGCTCTTGATA TCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGAGGCGG CGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGAAGTGCACTC GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTACATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATT AGGAGCCATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAACTCCTGATCTATGGTGCATCCAATTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC TCTCACCATTAGTAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTTTCCCCCTCACTTTCGGCGGAGG GACCAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGC **配列番号** 71

【表４－８】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-007	GCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GGGCTGACGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAGGGTCACCTG CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCCACAACATACACTGG GTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGATGG ATCAACCCTGACAGTGGTGCCACAAGCTATGCACAGAAGTTTC AGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCACCACAG CCTACATGGACCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGT ATATTACTGTGCGACCGATACATTACTGTCTAATCACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAGG CGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGATCGTCTGAGCTGACTCAG GACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCA CTTGCCAAGGAGACAGTCTCAGAAGCTATTACACAAACTGGTT CCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTCTACTTGTCGTCTATGCT AAAAATAAGCGGCCCCCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCT CCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCA GGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTCATTCCCGGGACAGC AGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG TCCTAGGTGCGGCCGCA **配列番号** 72

【表４－９】

抗体名	scFv ヌクレオチド配列
WapR-016	CAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATACACCTTTAGCAGCTATGCCACGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCG CAGGTATTAGTGGTAGTGGTGATACCACAGACTACGTAGACTC CGTGAAGGGCCGGTTCACCGTCTCCAGAGACAATTCC AAGAACACCCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGTCGAGAGGAGGTTT AGGGGGTTATTACCGGGGCGGCTTTGACTTCTGGGGCCAGGGG ACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGAGGCGGCGGTTCAG GCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGAAGTGCACAGTCTGTGCT GACGCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTG GTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGG CAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCC TCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGA CGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGC GGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCGAGCTGACCGTCCTAG CGGCCGCA **配列番号**:73

【表４－１０】

抗体 名	
V2L2 - VH	GAGATGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTACTATTAGTGGTATTACCGCA TACTACACCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGGGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGAAGAATTTT TACCTGGAACGCACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA **配列番号** 238

【表４－１１】

抗体名	
V2L2‐VL	GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATT AGAAATGATTTAGGCTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAAAGCCC CTAAACTCGTGATCTATTCTGCATCCACTTTACAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCT CTCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGACGATTTTGCAACTTATTACT GTCTACAAGATTACAATTACCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGAC CAAGGTTGAAATCAAA 配列番号239

【０２２５】

一部の実施形態において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる単離抗体またはその抗原結合断片は、（ａ）それぞれ、配列番号１および配列番号２、（ｂ）それぞれ、配列番号３および配列番号２、（ｃ）それぞれ、配列番号４および配列番号２、（ｄ）それぞれ、配列番号５および配列番号６、（ｅ）それぞれ、配列番号７および配列番号８、（ｆ）それぞれ、配列番号９および配列番号１０、（ｇ）それぞれ、配列番号１１および配列番号１２、（ｈ）それぞれ、配列番号１３および配列番号１４；（ｉ）それぞれ、配列番号１５および配列番号１６；または（ｊ）それぞれ、配列番号７４および配列番号１２と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一のＶＨおよびＶＬアミノ酸配列を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる。

【０２２６】

ある実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、5×10^{-2}Ｍ、10^{-2}Ｍ、5×10^{-3}Ｍ、10^{-3}Ｍ、5×10^{-4}Ｍ、10^{-4}Ｍ、5×10^{-5}Ｍ、10^{-5}Ｍ、5×10^{-6}Ｍ、10^{-6}Ｍ、5×10^{-7}Ｍ、10^{-7}Ｍ、5×10^{-8}Ｍ、10^{-8}Ｍ、5×10^{-9}Ｍ、10^{-9}Ｍ、5×10^{-10}Ｍ、10^{-10}Ｍ、5×10^{-11}Ｍ、10^{-11}Ｍ、5×10^{-12}Ｍ、10^{-12}Ｍ、5×10^{-13}Ｍ、10^{-13}Ｍ、5×10^{-14}Ｍ、10^{-14}Ｍ、5×10^{-15}Ｍ、または10^{-15}Ｍ以下の解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。

【０２２７】

具体的な実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、約1×10^{-10}Ｍから約1×10^{-6}Ｍの範囲の解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。一実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のＯＣＴＥＴ（登録商標）結合アッセイにより測定される約1.18×10^{-7}Ｍの解離定数（K_D）を特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。別の実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる単離結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のＯＣＴＥＴ（登録商標）結合アッセイにより測定される約1.44×10^{-7}ＭのK_Dを特徴とする親和性でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する。

【０２２８】

特定の実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つもしくは複数によりコードされる抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分

子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－００４、ＷａｐＲ－００４ＲＡＤ、Ｃａｍ－００３、Ｃａｍ－００４、もしくはＣａｍ－００５と同一のＰｓｌエピトープに特異的に結合するか、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害し；ならびに／またはモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２と同一のＰｃｒＶエピトープに特異的に結合するか、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。ＷａｐＲ－００４ＲＡＤは、配列番号１１のＶＨアミノ酸配列をコードするＶＨ核酸配列の核酸置換Ｇ２９３Ｃ（配列番号７１の３１７位におけるＶＨコード部分中のヌクレオチドの置換）を除いてＷａｐＲ－００４と同一である。ＷａｐＲ－００４ＲＡＤ　ＶＨをコードする核酸配列は配列番号７６として提示する。

【０２２９】

一部の実施形態は、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１３５、配列番号１３６、配列番号１３７、配列番号１３８、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１４４、配列番号１４５；または配列番号１４６の１つまたは複数と同一、または１、２、３、４、５つ以上のアミノ酸置換を除いて同一のＷ４突然変異体ｓｃＦｖ－Ｆｃ分子アミノ酸配列をコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２３０】

他の実施形態は、配列番号７８、配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１、配列番号８２、配列番号８３、配列番号８４、配列番号８５、配列番号８６、配列番号８７、配列番号８８、配列番号８９、配列番号９０、配列番号９１、配列番号９２、配列番号９３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号９７、配列番号９８、配列番号９９、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４、配列番号１１５、配列番号１１６、配列番号１１７、配列番号１１８、配列番号１１９、配列番号１２０、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２３、配列番号１２４、配列番号１２５、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２８、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１３５、配列番号１３６、配列番号１３７、配列番号１３８、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１４４、配列番号１４５；または配列番号１４６の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一のＷ４突然変異体ｓｃＦｖ－Ｆｃ分子アミノ酸配列をコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２３１】

一実施形態は、Ｗ４突然変異体ｓｃＦｖ－Ｆｃ分子をコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、核酸は、配列番号１

４７、配列番号１４８、配列番号１４９、配列番号１５０、配列番号１５１、または配列番号１５２、配列番号１５３、配列番号１５４、配列番号１５５、配列番号１５６、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１５９、配列番号１６０、配列番号１６１、配列番号１６２、配列番号１６３、配列番号１６４、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１７７、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８１、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９８、配列番号１９９、配列番号２００、配列番号２０１、配列番号２０２、配列番号２０３、配列番号２０４、配列番号２０５、配列番号２０６、配列番号２０７、配列番号２０８、配列番号２０９、配列番号２１０、配列番号２１１、配列番号２１２、配列番号２１３、配列番号２１４；または配列番号２１５の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２３２】

一実施形態は、Ｖ２Ｌ２ポリペプチドをコードする核酸を含み、本質的にそれからなり、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドであって、核酸が、配列番号２３８または配列番号２３９の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または１００％同一である単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０２３３】

他の実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－００１、ＷａｐＲ－００２、もしくはＷａｐＲ－００３と同一のエピトープに特異的に結合し、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。

【０２３４】

ある実施形態において、上記ポリヌクレオチドの１つまたは複数によりコードされる抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、モノクローナル抗体ＷａｐＲ－０１６と同一のエピトープに特異的に結合し、またはそのようなモノクローナル抗体をシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌへの結合から競合阻害する。

【０２３５】

本開示は、本明細書の他箇所に記載のポリヌクレオチドの断片も含む。さらに、上記の融合ポリヌクレオチド、Ｆａｂ断片、および他の誘導体をコードするポリヌクレオチドも提供される。

【０２３６】

ポリヌクレオチドは、当分野において公知の任意の方法により産生または製造することができる。例えば、抗体のヌクレオチド配列が既知である場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学合成オリゴヌクレオチドからアセンブルすることができ（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１７：２４２（１９９４）に記載のとおり）、手短に述べると、抗体をコードする配列の部分を含有する重複オリゴヌクレオチドを合成し、それらのオリゴヌクレオチドをアニールおよびライゲートし、次いでライゲートされたオリゴヌクレオチドのＰＣＲによる増幅を含む。

【０２３７】

あるいは、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、好適な資源からの核酸から生成することができる。特定の抗体をコー

ドする核酸を含有するクローンは入手可能でないが、抗体分子の配列が既知の場合、抗体をコードする核酸は、化学合成することができ、または好適な資源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞もしくは例えば抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞から生成されたｃＤＮＡライブラリー、またはそれから単離された核酸、好ましくは、ポリＡ＋ＲＮＡ）から、配列の３’および５’末端にハイブリダイズする合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅により、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングにより、例えば抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーからのｃＤＮＡクローンを同定することにより得ることができる。次いで、ＰＣＲにより生成された増幅核酸を、当分野において周知の任意の方法を使用して複製可能なクローニングベクター中にクローニングすることができる。

【０２３８】

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を決定したら、そのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作の分野において周知の方法、例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的突然変異導入、ＰＣＲなどを使用して操作して（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９９０）およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９８）に記載の技術参照、これらは両方とも参照により全体として本明細書に組み込まれる）、例えば、アミノ酸置換、欠失、および／または挿入を作出するために異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成することができる。

【０２３９】

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、未改変ＲＮＡもしくはＤＮＡまたは改変ＲＮＡもしくはＤＮＡであり得る任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成することができる。例えば、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、１本鎖および２本鎖ＤＮＡ、１本鎖および２本鎖領域の混合物であるＤＮＡ、１本鎖および２本鎖ＲＮＡ、ならびに１本鎖および２本鎖領域の混合物であるＲＮＡ、１本鎖またはより典型的には２本鎖または１本鎖および２本鎖領域の混合物であり得るＤＮＡおよびＲＮＡを含むハイブリッド分子から構成することができる。さらに、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡもしくはＤＮＡまたはＲＮＡおよびＤＮＡの両方を含む３本鎖領域から構成することができる。抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、１つまたは複数の改変塩基または安定性もしくは他の理由のために改変されたＤＮＡもしくはＲＮＡ骨格も含有し得る。「改変」塩基には、例えば、トリチル化塩基および特殊塩基、例えば、イノシンが含まれる。種々の改変をＤＮＡおよびＲＮＡに作製することができ；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的改変形態を包含する。

【０２４０】

免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）に由来するポリペプチドの非天然バリアントをコードする単離ポリヌクレオチドは、１つまたは複数のアミノ酸置換、付加または欠失がコードされるタンパク質中に導入されるように、１つまたは

複数のヌクレオチド置換、付加または欠失を免疫グロブリンのヌクレオチド配列中に導入することにより作出することができる。突然変異は、標準的な技術、例えば、部位特異的突然変異導入およびＰＣＲ媒介突然変異導入により導入することができる。保存アミノ酸置換は、１つまたは複数の非必須アミノ酸残基において作製することができる。

【０２４１】

ＶＩ．抗体ポリペプチドの発現

周知のとおり、ＲＮＡは、元のハイブリドーマ細胞または他の形質転換細胞から標準的な技術、例えば、グアニジニウムイソチオシアネート抽出および沈殿に続く遠心分離またはクロマトグラフィーにより単離することができる。所望により、ｍＲＮＡは、総ＲＮＡから標準的な技術、例えば、オリゴｄＴセルロース上でのクロマトグラフィーにより単離することができる。好適な技術は、当分野において知られている。

【０２４２】

一実施形態において、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体の軽鎖および重鎖をコードするｃＤＮＡは、周知の方法に従って逆転写酵素およびＤＮＡポリメラーゼを使用して同時または別個に作製することができる。ＰＣＲは、コンセンサス定常領域プライマーによりまたは公開されている重鎖および軽鎖ＤＮＡおよびアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーにより開始することができる。上記のとおり、ＰＣＲを使用して抗体軽鎖および重鎖をコードするＤＮＡクローンを単離することもできる。この場合、ライブラリーはコンセンサスプライマーまたはより大きい相同プローブ、例えば、マウス定常領域プローブによりスクリーニングすることができる。

【０２４３】

ＤＮＡ、典型的には、プラスミドＤＮＡは、当分野において公知の技術を使用して細胞から単離し、例えば、組換えＤＮＡ技術に関する上記の参照文献に詳細に記載される標準的な周知技術に従って制限マッピングおよび配列決定することができる。無論、ＤＮＡは、単離プロセスまたは後続の分析の間の任意の時点において本開示による合成物であり得る。

【０２４４】

本開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体を提供するための単離遺伝子材料の操作後、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子をコードするポリヌクレオチドは、典型的には、所望量の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子を産生するために使用することができる宿主細胞中への導入のために発現ベクター中に挿入する。

【０２４５】

抗体、またはその断片、誘導体もしくはアナログ、例えば、上記標的分子、例えば、Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに結合する抗体の重鎖または軽鎖の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を要求する。本開示の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはその部分（重鎖または軽鎖可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドを得たら、抗体分子産生のためのベクターを当分野において周知の技術を使用する組換えＤＮＡ技術により産生することができる。したがって、本明細書に記載のヌクレオチド配列をコードする抗体を含有するポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製する方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を使用して抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。したがって、本開示は、プロモーターに作動可能に結合している本開示の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチ

ド配列を含み得（例えば、ＰＣＴ公開国際公開第８６／０５８０７号パンフレット；ＰＣＴ公開国際公開第８９／０１０３６号パンフレット；および米国特許第５，１２２，４６４号明細書参照）、抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖全体の発現のためにそのようなベクター中にクローニングすることができる。

【０２４６】

用語「ベクター」または「発現ベクター」は、所望遺伝子を宿主細胞中に導入し、および発現させるためのビヒクルとして本開示により使用されるベクターを意味するために本明細書において使用される。当業者に公知のとおり、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から容易に選択することができる。一般に、本開示と同等なベクターは、選択マーカー、所望遺伝子のクローニングならびに原核または真核細胞中への進入および／またはその細胞中での複製能を易化するための適切な制限部位を含む。

【０２４７】

本開示の目的のため、多数の発現ベクター系を用いることができる。例えば、ベクターの１つのクラスは、動物ウイルス、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶまたはＭＯＭＬＶ）またはＳＶ４０ウイルスに由来するＤＮＡエレメントを利用する。他には、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロニック系の使用が含まれる。さらに、ＤＮＡを染色体中に統合させた細胞を、形質移入された宿主細胞の選択を可能とする１つまたは複数のマーカーを導入することにより選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）または重金属、例えば、銅耐性を提供し得る。選択可能マーカー遺伝子は、発現させるべきＤＮＡ配列に直接結合させ、または同一の細胞中に同時形質転換により導入することができる。追加のエレメントがｍＲＮＡの最適な合成に必要とされることもある。これらのエレメントには、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルが含まれ得る。

【０２４８】

一部の実施形態において、クローニングされた可変領域遺伝子を上記の合成重鎖および軽鎖定常領域遺伝子（例えば、ヒト）とともに発現ベクター中に挿入する。無論、真核細胞中で発現を誘発し得る任意の発現ベクターを本開示において使用することができる。好適なベクターの例には、限定されるものではないが、プラスミドｐｃＤＮＡ３、ｐＨＣＭＶ／Ｚｅｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＥＦ１／Ｈｉｓ、ｐＩＮＤ／ＧＳ、ｐＲｃ／ＨＣＭＶ２、ｐＳＶ４０／Ｚｅｏ２、ｐＴＲＡＣＥＲ－ＨＣＭＶ、ｐＵＢ６／Ｖ５－Ｈｉｓ、ｐＶＡＸ１、およびｐＺｅｏＳＶ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡから入手可能）、およびプラスミドｐＣＩ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩから入手可能）が含まれる。一般に、高レベルの免疫グロブリン重鎖および軽鎖を好適に発現するものについての大量の形質転換細胞のスクリーニングは、例えば、ロボットシステムにより実施することができる定型実験である。

【０２４９】

より一般には、本開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体のモノマーサブユニットをコードするベクターまたはＤＮＡ配列を調製したら、発現ベクターを適切な宿主細胞中に導入することができる。宿主細胞中へのプラスミドの導入は、当業者に周知の種々の技術により達成することができる。これらには、限定されるものではないが、形質移入（電気泳動およびエレクトロポレーションを含む）、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープＤＮＡとの細胞融合、マイクロインジェクション、およびインタクトウイルスによる感染が含まれる。Ｒｉｄｇｗａｙ，Ａ．Ａ．Ｇ．“Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ”Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ ａｎｄ Ｄｅｎｈａｒｄｔ，Ｅｄｓ．，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．，Ｃｈａｐｔｅｒ ２４．２，ｐｐ．４７０－４７２（１９８８）

参照。典型的には、宿主中へのプラスミド導入は、エレクトロポレーションを介する。発現構築物を保有する宿主細胞は、軽鎖および重鎖の産生に適切な条件下で成長させ、重鎖および／または軽鎖タンパク質合成についてアッセイする。例示的アッセイ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、または蛍光活性化細胞ソーター分析（ＦＡＣＳ）、免疫組織化学などが含まれる。

【０２５０】

発現ベクターを慣用の技術により宿主細胞に移し、次いで形質移入細胞を慣用の技術により培養して本明細書に記載の方法において使用される抗体を産生する。したがって、本開示は、異種プロモーターに作動可能に結合している抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体、またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。２本鎖抗体の発現についての一部の実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、下記に詳述するとおり免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中で同時発現させることができる。

【０２５１】

ある実施形態は、上記ＶＨおよびＶＬをコードする核酸を含む単離ポリヌクレオチドであって、ポリヌクレオチドにより発現される結合分子またはその抗原結合断片は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する単離ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、表４に示す配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、または配列番号７０の１つまたは複数と少なくとも８０％、８５％、９０％　９５％または１００％同一のＶＨおよびＶＬを含むｓｃＦｖ分子をコードする。

【０２５２】

一部の実施形態は、上記ポリヌクレオチドを含むベクターを含む。さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に会合している。追加の実施形態において、本開示は、そのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。さらなる実施形態において、本開示は、ポリヌクレオチドがプロモーターに作動可能に会合しており、好適な宿主細胞中でシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子を発現し得るベクターを提供する。

【０２５３】

シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶに特異的に結合する結合分子またはその断片を産生する方法であって、上記ポリヌクレオチドを含むベクターを含有する宿主細胞を培養すること、および前記抗体、またはその断片を回収することを含む方法も提供される。さらなる実施形態において、本開示は、上記方法により産生される単離結合分子またはその断片を提供する。

【０２５４】

本明細書において使用される「宿主細胞」は、組換えＤＮＡ技術を使用して構築され、少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターを保有する細胞を指す。組換え宿主からの抗体の単離方法の記載において、用語「細胞」および「細胞培養物」は、特に明確に記載のない限り、抗体の資源を示すために互換的に使用される。換言すると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠沈させた全細胞、または培地および懸濁細胞を両方含有する細胞培養物からのいずれかを意味し得る。

【０２５５】

種々の宿主発現ベクター系を利用して本明細書に記載の方法において使用される抗体分子を発現させることができる。そのような宿主発現系は、対象のコード配列を産生することができ、続いて精製することができるビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換または形質移入された場合、インサイチューで本開示の抗体分子を発現し得る細胞も表す。これらには、限定されるものではないが、微生物、例えば、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターにより形質転換された細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、枯草菌

（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ピチア属（Ｐｉｃｈｉａ））；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）により感染された昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）により感染され、または組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）により形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）に由来するプロモーターを含有する組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＬＫ、２９３、３Ｔ３細胞）が含まれる。細菌細胞、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、または真核細胞は、特に完全組換え抗体分子の発現のため、組換え抗体分子の発現に使用される。例えば、ベクター、例えばヒトサイトメガロウイルスからの主要前初期遺伝子プロモーターエレメントと連携する哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）は、抗体のための有効な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：２（１９９０）。

【０２５６】

タンパク質発現に使用される宿主細胞系は、哺乳動物起源であることが多く；当業者には、発現させるべき所望の遺伝子産物に最良に適合する特定の宿主細胞系を決定することができる能力があると考えられている。例示的な宿主細胞系には、限定されるものではないが、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）、ＤＧ４４およびＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣系、ＤＨＦＲマイナス）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓系）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原を有するＣＶＩの誘導体）、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ（ベビーハムスター腎臓）、ＭＤＣＫ、２９３、ＷＩ３８、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓系）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）および２９３（ヒト腎臓）が含まれる。宿主細胞系は、典型的には、市販サービス、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、または公開文献から入手可能である。

【０２５７】

さらに、挿入配列の発現をモジュレートし、または望まれる規定の様式で遺伝子産物を修飾およびプロセシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセシング（例えば、開裂）は、タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾についての特徴および規定の機序を有する。適切な細胞系または宿主系を、発現される外来タンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確保するように選択することができる。この目的のため、１次転写物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用することができる。

【０２５８】

組換えタンパク質の長期高収量産生のため、安定的発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞系をエンジニアリングすることができる。ウイルス複製起源を含有する発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞を適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）、および選択可能なマーカーにより制御されたＤＮＡにより形質転換することができる。外来ＤＮＡの導入後、エンジニアリングされた細胞を強化培地中で１～２日間成長させることができ、次いで選択培地にスイッチする。組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをそれらの染色体中に安定的に統合さ

せ、成長してフォーカスを形成することを可能とし、次いで細胞系中にクローニングおよび拡張することができる。この方法は、有利には、抗体分子を安定的に発現する細胞系をエンジニアリングするために使用することができる。

【０２５９】

多数の選択系、例として、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ ＆ Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ４８：２０２（１９９２））を使用することができ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２２：８１７ １９８０）遺伝子を、ｔｋ、ｈｇｐｒｔまたはａｐｒｔ細胞中でそれぞれ用いることができる。また、代謝拮抗物質耐性を以下の遺伝子についての選択をベースとして使用することができる：メトトレキセート耐性を付与するｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：１５２７（１９８１））；ミコフェノール酸耐性を付与するｇｐｔ（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ＆ Ｂｅｒｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：２０７２（１９８１））；アミノグリコシドＧ４１８耐性を付与するｎｅｏ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８－５０５；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６－９３２（１９９３）；およびＭｏｒｇａｎ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；ＴＩＢ ＴＥＣＨ １１（５）：１５５－２１５（Ｍａｙ，１９９３）ならびにハイグロマイシン耐性を付与するｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ３０：１４７（１９８４）。使用することができる組換えＤＮＡ技術の分野において一般に公知の方法は、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）；およびＣｈａｐｔｅｒｓ １２ ａｎｄ １３，Ｄｒａｃｏｐｏｌｉ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１（１９８１）に記載されており、それらは参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【０２６０】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅により増加させることができる（概説については、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｈｅｎｔｓｃｈｅｌ，Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｖｅｃｔｏｒｓ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｇｅｎｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｃｌｏｎｅｄ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｖｏｌ．３．（１９８７）参照）。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅領域が抗体遺伝子と会合するため、抗体の産生も増加する（Ｃｒｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２５７（１９８３））。

【０２６１】

インビトロ産生は、大量の所望のポリペプチドを与えるためのスケールアップを可能とする。組織培養条件下での哺乳動物培養のための技術は、当分野において公知であり、それには、例えば、エアリフト反応器もしくは連続撹拌反応器中での均一懸濁液培養、また

は例えば、中空繊維、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上での固定化もしくは捕捉細胞培養が含まれる。必要および／または所望により、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成の後または本明細書に記載のＨＩＣクロマトグラフィー工程の前またはその後、ポリペプチドの溶液を慣用のクロマトグラフィー法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ＤＥＡＥ－セルロース上でのクロマトグラフィーまたは（免疫）親和性クロマトグラフィーにより精製することができる。

【０２６２】

本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体をコードする構築物は、非哺乳動物細胞、例えば、細菌または酵母または植物細胞中で発現させることもできる。容易に核酸を取り込む細菌には、腸内細菌、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）またはサルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）；バシラス科（Ｂａｃｉｌｌａｃｅａｅ）、例えば、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、肺炎球菌属（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）、連鎖球菌属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）およびインフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）の株のメンバーが含まれる。異種ポリペプチドは、細菌中で発現される場合、典型的には、封入体の一部になることがさらに認識される。異種ポリペプチドは、単離、精製し、次いで機能分子にアセンブルしなければならない。抗体の４価形態が望ましい場合、次いでサブユニットは４価抗体に自己組織化する（国際公開第０２／０９６９４８Ａ２号パンフレット）。

【０２６３】

細菌系において、発現される抗体分子に意図される使用に応じて多数の発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、大量のそのようなタンパク質を産生すべき場合、抗体分子の医薬組成物の生成のため、容易に精製することができる高レベルの融合タンパク質産物の発現を指向するベクターが望ましいことがある。そのようなベクターには、限定されるものではないが、融合タンパク質が産生されるように抗体コード配列をベクター中にインフレームでｌａｃＺコード領域と個々にライゲートすることができる大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．２：１７９１（１９８３））；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ ＆ Ｉｎｏｕｙｅ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：３１０１－３１０９（１９８５）；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ ＆ Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４：５５０３－５５０９（１９８９））などが含まれる。ｐＧＥＸベクターを使用して外来ポリペプチドをグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として発現させることもできる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、溶解細胞からマトリックスグルタチオン－アガロースビーズへの吸着および結合に続く遊離グルタチオンの存在下での溶出により容易に精製することができる。ｐＧＥＸベクターは、クローニングされる標的遺伝子産物をＧＳＴ部分から放出させることができるように、トロンビンまたはＸａ因子プロテアーゼ開裂部位を含むように設計される。

【０２６４】

原核生物に加え、真核微生物を使用することもできる。出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、または一般的なパン酵母が、真核微生物のうちで最も一般に使用されるが、多数の他の株、例えば、メタノール資化酵母（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）が一般に利用可能である。

【０２６５】

サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）における発現のため、例えば、プラスミドＹＲｐ７（Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２８２：３９（１９７９）；Ｋｉｎｇｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ７：１４１（１９７９）；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １０：１５７（１９８０））が一般に使用される。このプラスミドは、トリプトファン中での成長能を欠く酵母の突然変異株、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６またはＰＥＰ４－１（Ｊｏｎｅｓ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ８５

：１２（１９７７））のための選択マーカーを提供するＴＲＰ１遺伝子を既に含有する。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのｔｒｐｌ傷害の存在は、トリプトファンの不存在下での成長による形質転換の検出に有効な環境を提供する。

【０２６６】

昆虫系において、キンウワバ科（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）を典型的には、ベクターとして使用して外来遺伝子を発現させる。このウイルスは、ヨトウガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞中で成長する。抗体コード配列をウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）中に個々にクローニングし、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置することができる。

【０２６７】

本開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）Ｐｓｌおよび／またはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体を組換え発現させたら、それを免疫グロブリン分子の精製についての分野において公知の任意の方法により、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインＡ後の特異的抗原についての親和性によるもの、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差により、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術により精製することができる。本開示の抗体の親和性を増加させる別の方法は、米国特許出願公開第２００２０１２３０５７Ａ１号明細書に開示されている。

【０２６８】

ＶＩＩ．血清型無差別結合分子の同定

本開示は、優れたまたは所望の治療活性を有する血清型非依存性治療結合分子、例えば、抗体またはその断片を同定するための標的無差別全細胞アプローチを包含する。本方法を利用して感染作用物質、例えば、細菌病原体の不所望な活性をアンタゴナイズ、中和、クリアランス、または遮断し得る結合分子を同定することができる。当分野において公知のとおり、多くの感染作用物質は、それらのドミナント表面抗原の顕著なバリエーションを示し、それらが免疫学的監視を回避することを可能とする。本明細書に記載の同定法は、多くの異なるシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種または他のグラム陰性病原体に共有される抗原を標的化する結合分子を同定し得、したがって複数種からの複数の病原体を標的化し得る治療剤を提供する。例えば、本方法を利用して血清型非依存様式で緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の表面に結合し、細菌病原体に結合した場合、細菌細胞、例えば、細菌病原体、例えば、日和見シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種（例えば、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）、およびシュードモナス・アルカリゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ））に対するオプソニン食菌（ＯＰＫ）活性を媒介、促進、または向上させ、および／または上皮細胞へのそのような細菌細胞の付着を阻害する一連の結合分子を同定することができる。

【０２６９】

ある実施形態は、血清型無差別結合分子を同定する方法であって、（ａ）ナイーブおよび／または回復期抗体ライブラリーをファージ中で調製すること、（ｂ）血清型特異的抗体をライブラリーから枯渇パニングにより除去すること、（ｃ）血清型非依存性の全細胞に特異的に結合する抗体についてライブラリーをスクリーニングすること、および（ｄ）得られた抗体を所望の機能特性についてスクリーニングすることを含む方法を開示する。

【０２７０】

ある実施形態は、ナイーブまたは緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染回復期患者に由来する抗体ファージライブラリーを用いる本明細書に開示の全細胞表現型スクリーニングアプローチを提供する。血清型特異的反応性に対して最初に選択したパニング方針を使用して、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）全細胞に結合する異なるクローンを単離した。選択されたクローンをヒトＩｇＧ１抗体に変換し、血清型分類または組織単離の部

位にかかわらず緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）臨床単離物と反応することを確認した（実施例参照）。本明細書に記載の機能活性スクリーンは、抗体が哺乳動物細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）付着の予防に有効であり、オプソニン食菌（ＯＰＫ）殺傷を濃度依存および血清型非依存様式で媒介することを示した。

【０２７１】

さらなる実施形態において、上記結合分子もしくはその断片、抗体もしくはその断片、または組成物は、２つ以上、３つ以上、４つ以上、もしくは５つ以上の異なる緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型、または感染患者から単離された緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％もしくは少なくとも９５％に結合する。さらなる実施形態において、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株は、肺、唾液、眼、膿汁、糞便、尿、洞、創傷、皮膚、血液、骨、または膝液の１つまたは複数から単離される。

【０２７２】

ＶＩＩＩ．抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子を含む医薬組成物

本開示において使用される医薬組成物は、当業者に周知の薬学的に許容可能な担体を含む。非経口投与のための調製物には、無菌水性または非水性液剤、懸濁液、または乳濁液が含まれる。本明細書に開示のある医薬組成物は、許容可能な剤形、例として、例えば、カプセル剤、錠剤、水性懸濁液または液剤で経口投与することができる。ある医薬組成物は、鼻腔エアゾールまたは吸入により投与することもできる。保存剤および他の添加剤、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート化剤、および不活性ガスなども存在し得る。本明細書に開示の治療方法において使用される好適な配合物は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，１６ｔｈ ｅｄ．（１９８０）に記載されている。

【０２７３】

単一剤形を産生するために担体材料と組み合わせることができる抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体の量は、治療される宿主および特定の投与方式に応じて変動する。投与量レジメンは、最適な所望応答（例えば、治療または防止応答）を提供するように調整することもできる。組成物は、化合物に好適な送達または担持系として機能する生体適合性担体材料中に分散した抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体も含み得る。

【０２７４】

ＩＸ．治療結合分子を使用する治療方法

本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体を調製およびそれが必要とされる対象に投与する方法は周知であり、または当業者により容易に決定することができる。抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入によるものまたは局所であり得る。本明細書において使用される非経口という用語には、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、または皮下投与が含まれる。投与に好適な形態は、注射、特に静脈内もしくは動脈内注射または点滴用液剤である。しかしながら、本明細書に教示と同等な他の方法において、本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、有害細胞集団、例えば、感染の部位に直接送達することができ、それにより治療剤への疾患組織の曝露を増加させる。例えば、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子は、眼組織、熱傷損傷、または肺組織に直接投与することができる。

【０２７５】
本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染のインビボ治療について薬学的有効量で投与することができる。これに関して、開示結合分子は、活性剤の投与を易化し、安定性を促進するように配合されることが認識される。本出願の目的のため、薬学的有効量は、標的への有効な結合を達成するためおよび利益、例えば、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の治療、改善、縮減、クリアランス、または予防を達成するために十分な量を意味するものとする。

【０２７６】
一部の実施形態は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の予防または治療が必要とされる対象においてシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染を予防または治療する方法であって、対象に有効量の本明細書に記載の結合分子もしくはその断片、抗体もしくはその断片、組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞を投与することを含む方法を対象とする。さらなる実施形態において、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染である。一部の実施形態において、対象はヒトである。ある実施形態において、感染は眼感染、肺感染、熱傷感染、創傷感染、皮膚感染、血液感染、骨感染、または前記感染の２つ以上の組み合わせである。さらなる実施形態において、対象は、急性肺炎、熱傷損傷、角膜感染、嚢胞性線維症、またはそれらの組み合わせを罹患する。

【０２７７】
ある実施形態は、上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を遮断または予防する方法であって、上皮細胞および緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の混合物を、本明細書に記載の結合分子もしくはその断片、抗体もしくはその断片、組成物、ポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞と接触させることを含む方法を対象とする。

【０２７８】
緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを向上させる方法であって、食細胞および緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の混合物を、本明細書に記載の結合分子もしくはその断片、抗体もしくはその断片、組成物、ポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞と接触させることを含む方法も開示される。さらなる実施形態において、食細胞は、分化ＨＬ－６０細胞またはヒト多形核白血球（ＰＭＮ）である。

【０２７９】
本開示の範囲に従うと、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体もしくは誘導体は、上記の治療方法に従って治療効果を産生するために十分な量でヒトまたは他の哺乳動物に投与することができる。本明細書に開示の抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、そのようなヒトまたは他の動物に、本開示の抗体を公知の技術に従って慣用の薬学的に許容可能な担体または希釈剤と組み合わせることにより調製された慣用の剤形で投与することができる。

【０２８０】
シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染の治療のための本開示の組成物の有効用量は、多くの異なる要因、例として、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトか動物か、投与される他の医薬品、および治療が防止的か療法的かに応じて変動する。通常、患者はヒトであるが、非ヒト哺乳動物、例として、トランスジェニック哺乳動物を治療することもできる。治療投与量を当業者に公知の定型方法を使用して力価測定して安全性および効力を最適化することができる。

【０２８１】
抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、当業者に公知の種々の

要因に応じて種々の頻度において複数の場合に投与することができる。あるいは、抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は徐放配合物として投与することができ、この場合、低頻度の投与が要求される。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変動する。

【０２８２】

本開示の組成物は、任意の好適な方法により、例えば、非経口、脳室内、経口、吸入スプレーにより、局所、直腸、鼻腔、バッカル、経膣または植込リザーバーを介して投与することができる。本明細書において使用される用語「非経口」には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、鞘内、肝内、病巣内および頭蓋内注射または注入技術が含まれる。

【０２８３】

Ｘ．相乗作用

ＣｈｏｕおよびＴａｌａｌａｙ（Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｇｕｌ．，２２：２７－５５（１９８４））は、定性および定量的方法で併用薬効果の実験的知見を表すための数学的方法を開発した。相互排他的薬物については、一般化アイソボール（ｉｓｏｂｏｌ）方程式が、あらゆる程度の作用に適用されることを証明した（ＣｈｏｕおよびＴａｌａｌａｙの第５２頁を参照）。アイソボール（ｉｓｏｂｏｌ）、すなわちアイソボログラムは、同一の程度の作用を有する２つの薬物のあらゆる用量での併用の図式表示である。アイソボログラムでは、直線が相加作用を、凹曲線（直線下方の曲線）が相乗作用を、また凸曲線（直線上方の曲線）が拮抗作用をそれぞれ表す。これらの曲線は、相互排他的薬物の併用が、相加、相乗、もしくは拮抗作用的のいずれであっても、全濃度範囲にわたって同一のタイプの作用を示すであろうことも明らかにする。ほとんどの併用は、相加作用を示す。しかし、場合によっては、併用が、相加作用より小さいか、または大きい作用を示す例もある。これらの併用は、それぞれ、拮抗作用的または相乗作用的と呼ばれる。併用は、その最適用量で用いられる上記成分の一方または他方より治療的に優れていれば、治療的相乗作用を発現する。Ｔ．Ｈ．Ｃｏｒｂｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ Ｒｅｐｏｒｔｓ，６６，１１８７（１９８２）を参照されたい。Ｔａｌｌａｒｉｄａ ＲＪ（Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｅｘｐ Ｔｈｅｒ．２００１ Ｓｅｐ；２９８（３）：８６５－７２）はまた、「明らかに類似の作用を生成する２つの薬物は、同時に用いると、増大または低減した作用を生成することがある。これらのケースを単純に相加的な作用から識別するためには、定量的評価が必要である」と述べている。

【０２８４】

相乗作用は、半数影響原理に基づくＣｈｏｕおよびＴａｌａｌａｙの併用係数（ＣＩ）方法を用いて測定することができる（Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４５：２４３４－２４３９，（１９８５）を参照）。この方法は、様々な細胞傷害性レベルの２つの薬物間の相乗、相加、または拮抗作用の程度を計算する。ＣＩ値が１より小さい場合、２つの薬物間に相乗作用がある。ＣＩ値が１であれば、２つの薬物間に相加作用はあるが、相乗作用はない。１より大きいＣＩ値は、拮抗作用を示す。ＣＩ値が小さいほど、相乗作用が大きい。別の実施形態では、部分阻害濃度（ＦＩＣ）を用いて相乗作用を決定する。この部分値は、単独で作用するＩＣ５０の関数として、併用で作用する薬物のＩＣ５０を表すことにより決定する。２つの相互作用する薬物については、各薬物のＦＩＣ値の和が、相乗相互作用の尺度を表す。ＦＩＣが１より小さい場合、２つの薬物間に相乗作用がある。ＦＩＣ値が１であれば、相加作用を示す。ＦＩＣ値が小さいほど、相乗作用が大きい。

【０２８５】

いくつかの実施形態において、１種または複数種の結合剤を「低用量」（すなわち、単独で投与すると非治療的とみなされる用量）で投与するシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）治療において相乗作用が得られ、この場合、他の結合剤（低用量または治療用量で投与される）と併用した低用量の結合剤の投与によって、上記結合剤を単独で個別

に投与して得られるであろう相加作用を上回る相乗作用が得られる。ある実施形態では、相乗作用は、「低用量」で投与される１種または複数種の結合剤の投与によって達成され、ここで、低用量は、毒性または他の望ましくない副作用を回避するように提供される。

【０２８６】

ＸＩ．免疫アッセイ

抗シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）ＰｓｌおよびまたはＰｃｒＶ結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリアントもしくは誘導体は、当分野において公知の任意の方法により免疫特異的結合についてアッセイすることができる。使用することができる免疫アッセイには、限定されるものではないが、いくつか例を挙げると、ウエスタンブロットのような技術を使用する競合および非競合アッセイ系、放射免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインＡ免疫アッセイが含まれる。そのようなアッセイは定型的であり、当分野において周知である（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれるＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｖｏｌ．１（１９９４）参照）。例示的な免疫アッセイを以下に手短に記載する（しかし、限定を意図するものではない）。

【０２８７】

抗体－抗原相互作用の親和性の計測に利用可能な種々の方法が存在するが、速度定数の測定については比較的少ない。ほとんどの方法は、抗体または抗原のいずれかの標識に依存し、定型的な計測の煩雑化が不可避であり、計測量が不確実になる。抗体親和性は、多数の方法、例として、ＯＣＴＥＴ（登録商標）、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）、ＥＬＩＳＡ、およびＦＡＣＳにより計測することができる。

【０２８８】

ＯＣＴＥＴ（登録商標）システムは、９６ウェルプレートフォーマット中のバイオセンサーを使用して速度論的分析を報告する。タンパク質結合および解離イベントは、溶液中のあるタンパク質の、ＦｏｒｔｅＢｉｏバイオセンサー上に固定化された第２のタンパク質への結合を計測することによりモニタリングすることができる。ＰｓｌまたはＰｃｒＶへの抗ＰｓｌまたはＰｃｒＶ抗体の結合を計測する場合、ＰｓｌまたはＰｃｒＶをＯＣＴＥＴ（登録商標）チップ上に固定化し、次いで溶液中の抗体の結合を分析する。次いで、固定化ＰｓｌまたはＰｃｒＶに対する抗体の会合および解離を装置センサーにより検出する。次いで、データを収集し、親和性曲線フィッティングのためにＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍにエクスポートする。

【０２８９】

ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）上で実施される表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）は、抗体－抗原相互作用の親和性を計測する慣用の方法と比べて多数の利点を提供する：（ｉ）抗体にも抗原にも標識する必要がない；（ｉｉ）抗体を予め精製する必要がなく、細胞培養物上澄みを直接使用することができる；（ｉｉｉ）異なるモノクローナル抗体相互作用の迅速な半定量比較を可能とするリアルタイム計測が可能であり、多くの評価目的に十分である；（ｉｖ）生物特異的表面を、一連の異なるモノクローナル抗体を同一条件下で容易に比較することができるように再生することができる；（ｖ）分析手順を完全自動化し、広範な計測系列を使用者の介在なしで実施することができる。ＢＩＡａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，ｖｅｒｓｉｏｎ ＡＢ（１９９８年再版）、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）コード番号ＢＲ－１００１－８６；ＢＩＡｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，ｖｅｒｓｉｏｎ ＡＢ（１９９８年再版）、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）コード番号ＢＲ－１００１－８４。

【０２９０】

ＳＰＲベース結合試験は、結合ペアの一方のメンバーをセンサー表面上に固定化するこ

とを要求する。固定化された結合パートナーは、リガンドと称される。溶液中の結合パートナーは、分析物と称される。一部の場合、リガンドは、捕捉分子と称される別の固定化分子への結合を介して表面に間接的に付着される。ＳＰＲ応答は、分析物が結合または解離したときの検出器表面における質量濃度の変化を反映する。

【０２９１】

ＳＰＲに基づき、リアルタイムＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）計測は、相互作用をそれらが生じたときに直接モニタリングする。この技術は速度論的パラメータの決定に十分適合する。競合親和性ランキングは極端に実施しやすく、速度論および親和性定数の両方をセンサーグラムデータから導くことができる。

【０２９２】

分析物をリガンド表面にわたり別々のパルスでインジェクトする場合、得られたセンサーグラムを３つの必須相に分割することができる：（ｉ）試料インジェクションの間の分析物とリガンドとの会合；（ｉｉ）分析物結合の速度が複合体からの解離により平衡される試料インジェクションの間の平衡または定常状態；（ｉｉｉ）緩衝液流動間の表面からの分析物の解離。

【０２９３】

会合および解離相は、分析物－リガンド相互作用（k_aおよびk_d、複合体形成および解離の速度、$k_d/k_a=K_D$）のキネティクスに関する情報を提供する。平衡相は、分析物－リガンド相互作用（K_D）の親和性に関する情報を提供する。

【０２９４】

ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウエアは、数値積分およびグローバルフィッティングアルゴリズムの両方を使用して曲線フィッティングのための包括的ファシリティーを提供する。データの好適な分析により、相互作用についての分離速度および親和性定数を簡単なＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）調査から得ることができる。この技術により計測可能な親和性の範囲は極めて広く、ｍＭからｐＭに及ぶ。

【０２９５】

エピトープ特異性は、モノクローナル抗体の重要な特徴である。ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）によるエピトープマッピングは、放射免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡまたは他の表面吸着法を使用する慣用の技術とは対照的に、抗体の標識も精製も要求せず、いくつかのモノクローナル抗体の配列を使用して多部位特異性試験を可能とする。さらに、大量の分析物を自動的に処理することができる。

【０２９６】

ペアワイズ結合実験は、２つのＭＡｂの同一抗原に同時に結合する能力を試験する。別個のエピトープに対して指向されたＭＡｂは、独立して結合する一方、同一または密接に関連するエピトープに対して指向されたＭＡｂは、互いの結合を干渉する。ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）によるこれらの結合実験は、実施が容易である。

【０２９７】

例えば、第１のＭａｂに結合させるための捕捉分子を使用し、次いで抗原および第２のＭＡｂを連続的に添加することができる。センサーグラムは、１．どれほどの数の抗原が第１のＭａｂに結合するか、２．どの程度、第２のＭＡｂが表面付着抗原に結合するか、３．第２のＭＡｂが結合しない場合、ペアワイズ試験の順序の逆転は結果を変えるかどうかを明らかにする。

【０２９８】

ペプチド阻害は、エピトープマッピングに使用される別の技術である。この方法は、ペアワイズ抗体結合試験を補完し得、抗原の１次配列が既知の場合、機能的エピトープを構造的特徴と関連づけ得る。ペプチドまたは抗原断片を、固定化抗原への異なるＭＡｂの結合の阻害について試験する。所与のＭＡｂの結合を干渉するペプチドは、そのＭＡｂにより定義されるエピトープと構造的に関連すると想定される。

【０２９９】

ＸＩＩ．投与

抗Ｐｓｌもしくは抗ＰｃｒＶ結合ドメインのいずれかを含む組成物、または抗Ｐｓｌおよび抗ＰｃｒＶ結合ドメインの両方を含む組成物は、患者のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）の治療において相乗効果をもたらすように、投与する。投与は、所望の治療効果、すなわち相乗作用をもたらすものであれば、あらゆる好適な手段によって行うことができる。特定の実施形態において、療法の同一のサイクル中に抗体を投与する。例えば、規定された期間内の療法の１サイクル中に、両方の抗体を対象に投与する。ある実施形態では、抗体の投与は、個別の治療サイクルでの連続的な投与中に行ってもよく、例えば、第１治療サイクルは、抗Ｐｓｌ抗体の投与を含み、第２治療サイクルは、抗ＰｃｒＶ抗体の投与を含む。患者への投与される結合ドメインの投与量も投与の頻度に応じて変動し、当業者によって容易に決定され得る。

【０３００】

他の実施形態において、結合ドメインを治療サイクル中に２回以上投与する。例えば、いくつかの実施形態において、結合ドメインは、３または４週間の治療サイクル中、連続３週にわたり毎週投与する。

【０３０１】

投与が所望の効果をもたらす限りにおいて、１つ若しくは複数の結合ドメインを含む組成物の投与を同一のまたは異なる日に行ってよい。

【０３０２】

当業者であれば、所望の治療効果をもたらす他の用量または投与頻度が、本発明での使用に適していることを容易に理解されよう。

【０３０３】

ＸＩＩ．キット

また別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法を実施するのに用いることができるキットを提供する。特定の実施形態において、キットは、１つまたは複数の容器に本明細書に記載の結合分子を含む。当業者であれば、本発明の開示された結合ドメイン、ポリペプチドおよび抗体を、当分野では公知の確立されたキットフォーマットの１つに容易に導入できることは容易に認識されよう。

【０３０４】

本開示の実施は、特に記載のない限り、当分野の技能の範囲内の細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えＤＮＡ、および免疫学の慣用の技術を用いる。そのような技術は、文献に十分説明されている。例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：（１９８９）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９２），ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖｅｒ ｅｄ．，Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ ａｎｄ ＩＩ（１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ ｅｄ．，（１９８４）；Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．米国特許第４，６８３，１９５号明細書；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ＆ Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ．（１９８４）；Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ＆ Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ．（１９８４）；Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，（１９８７）；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ Ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；論文、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ Ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ，Ｊ．Ｈ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ

Harbor Laboratory（１９８７）；Methods In Enzymology, Vols. １５４ and １５５（Wu et al. eds.）；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London（１９８７）；Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I－IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.,（１９８６）；Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.,（１９８６）；およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland（１９８９）参照。

【０３０５】

抗体改変の一般原理は、Antibody Engineering, 2nd edition, C. A. K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press（１９９５）に記載されている。タンパク質改変の一般原理は、Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.（１９９５）に記載されている。抗体および抗体－ハプテン結合の一般原理は、以下の文献に記載されている：Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA（１９８４）；ならびにSteward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY（１９８４）。さらに、当分野において公知であり、詳細に記載していない免疫学の標準的方法は、一般に以下の文献に記載のように実施する：Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York；Stites et al.（eds）, Basic and Clinical－Immunology（8th ed.）, Appleton & Lange, Norwalk, CT（１９９４）ならびにMishell and Shiigi（eds）, Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York（１９８０）。

【０３０６】

免疫学の一般原理を記載する標準的な参照文献には、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York；Klein, J., Immunology：The Science of Self－Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York（１９８２）；Kennett, R., et al., eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma：A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York（１９８０）；Campbell, A.,“Monoclonal Antibody Technology”in Burden, R., et al., eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. １３, Elsevere, Amsterdam（１９８４）, Kuby Immunnology 4th ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, H. Freemand & Co.（２０００）；Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., Immunology, 6th ed. London：Mosby（２００１）；Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., Cellular a

nd Molecular Immunology, Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division（２００５）；Kontermann and Dubel, Antibody Engineering, Springer Verlan（２００１）；Sambrook and Russell, Molecular Cloning：A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press（２００１）；Lewin, Genes VIII, Prentice Hall（２００３）；Harlow and Lane, Antibodies：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press（１９８８）；Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer Cold Spring Harbor Press（２００３）が含まれる。

【実施例】

【０３０７】

実施例１

ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーの構築およびスクリーニング

本実施例は、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）感染に対する新規保護抗原を同定するためのナイーブおよび緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染回復期患者の両方に由来するヒト抗体ファージライブラリーを用いる標的無差別全細胞パニングアプローチを記載する（図１Ａ）。インビトロ機能スクリーンに含まれるアッセイは、オプソニン食菌（ＯＰＫ）殺傷アッセイおよび上皮細胞系Ａ５４９を使用する細胞付着アッセイを含んだ。リード候補物は、優れたインビトロ活性に基づき、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎、角膜炎、および熱傷感染モデルにおいて試験した。

【０３０８】

図１Ｂは、患者抗体ファージディスプレイライブラリーの構築を示す。全血を６人の回復期患者から診断７～１０日後にプールし、次いでＲＮＡ抽出し、上記のとおりファージライブラリーを構築した（Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １４，３０９－３１４（１９９６）；Ｗｒａｍｍｅｒｔ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４５３，６６７－６７１（２００８））。図１Ｃは、最終クローニングｓｃＦｖライブラリーが５．４×10^8個の形質転換体を含有したことを示し、配列決定は、ｓｃＦｖ遺伝子の７９％が全長でありインフレームであることを明らかにした。ＶＨ ＣＤＲ３ループは、エピトープ特異性の決定に重要なことが多く、ライブラリー選択前にアミノ酸レベルにおいて８４％の多様性であった。

【０３０９】

患者ライブラリーに加え、最大１×10^{11}個の結合メンバーを含有するナイーブヒトｓｃＦｖファージディスプレイライブラリー（Ｌｌｏｙｄ，Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ ２２，１５９－１６８（２００９））を、抗体単離に使用した（Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １４，３０９－３１４（１９９６））。加熱殺傷した緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）（１×10^9）をＩＭＭＵＮＯ（商標）チューブ（Ｎｕｎｃ；ＭＡＸＩＳＯＲＰ（商標））中に固定化し、次いで上記のとおりファージディスプレイ選択を行い（Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １４，３０９－３１４（１９９６））、但しトリエタノールアミン（１００ｎＭ）を溶出緩衝液として使用した。懸濁液中の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）に基づく選択のため、加熱殺傷細菌をブロッキングし、次いでブロッキングされたファージを細胞に添加した。洗浄後、溶出させたファージを使用して上記のとおり大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に感染させた（Ｖａｕｇｈａｎ，１９９６）。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）からのファージのレスキューおよびＥＬＩＳＡによる加熱殺傷緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）への結合は、上記のとおり実施した（Ｖａｕｇｈａｎ，１９９６）。

【０３１０】

全細胞親和性選択方法の開発および評価後、新たな回復期患者ライブラリーおよび既に

構築されたナイーブライブラリーの両方（Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４，３０９－３１４（１９９６））を、完全Ｏ抗原を有する緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株３０６４およびＯ抗原の表面発現を欠くアイソジェニックｗａｐＲ突然変異株の懸濁液に対する親和性選択に供した。図１Ｄは、連続患者ライブラリー選択からのアウトプット力価が、ナイーブライブラリーよりも患者ライブラリーについてより大きい速度において増加することが見出されたことを示す（ラウンド３においてそれぞれ1×10^{7}対3×10^{5}）。さらに、ライブラリーにおけるＶＨＣＤＲ３ループ配列の重複（選択の間のクローン濃縮の尺度）も、ラウンド３において患者ライブラリーにおいて８８～９２％に達し、ナイーブライブラリーにおける１５～２５％と比較して高いことが見出された（図１Ｄ）。次に、親和性選択からの個々のｓｃＦｖファージを緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）異種血清型株に対する反応性についてＥＬＩＳＡによりスクリーニングした（図１Ｅ）。ＥＬＩＳＡプレート（Ｎｕｎｃ；ＭＡＸＩＳＯＲＰ（商標））を、上記のとおり一晩培養物からの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株によりコートした（ＤｉＧｉａｎｄｏｍｅｎｉｃｏ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ　７２，７０１２－７０２１（２００４））。希釈抗体をブロッキングしたプレートに１時間添加し、洗浄し、ＨＲＰコンジュゲート抗ヒト２次抗体により１時間処理し、次いで上記のとおり発色および分析した（Ｕｌｂｒａｎｄｔ，Ｎ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　８０，７７９９－７８０６（２００６））。両方のライブラリーを用いる全細胞選択から得られたファージのドミナント種は、血清型特異的反応性をもたらした（データ示さず）。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）またはウシ血清アルブミンへの非特異的結合の不存在下で血清型非依存性結合を示すクローンをさらなる評価のために選択した。

【０３１１】

ＩｇＧ発現のため、選択抗体のＶＨおよびＶＬ鎖をヒトＩｇＧ１発現ベクター中にクローニングし、ＨＥＫ２９３細胞中で同時発現させ、上記のとおりプロテインＡ親和性クロマトグラフィーにより精製した（Ｐｅｒｓｉｃ，Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　１８７，９－１８（１９９７））。これらの選択血清型非依存的ファージからの可変領域から作製されたヒトＩｇＧ１抗体を、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）特異性について確認し、ＦＡＣＳ分析によりドミナント臨床関連血清型への全細胞結合により後続の分析のために優先順位を付けた（図１Ｆ）。それというのも、この方法は、ＥＬＩＳＡよりもストリンジェントであるためである。フローサイトメトリーをベースとする結合アッセイのため、対数増殖中期の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株をＰＢＳ中に２．０のOD_{650}まで濃縮した。抗体（１０μｇ／ｍＬ）および細菌（約1×10^{7}個の細胞）を振とうしながら４℃において１時間インキュベートした後、洗浄した細胞をＡＬＥＸＡ　ＦＬＵＯＲ６４７（登録商標）ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）と４℃において０．５時間インキュベートした。洗浄した細胞を、推奨されるとおりＢＡＣＬＩＧＨＴ（商標）緑色細菌染色により染色した（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）。試料をＬＳＲ　ＩＩフローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上でランさせ、ＢＤ　ＦａｃｓＤｉｖａ（ｖ．６．１．３）およびＦｌｏｗＪｏ（ｖ．９．２；ＴｒｅｅＳｔａｒ）を使用して分析した。ＦＡＣＳにより結合を示す抗体を、オプソニン食菌殺傷（ＯＰＫ）アッセイにおける機能的活性試験のためにさらに優先順位を付けた。

【０３１２】

実施例２

緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進するｍＡｂの評価

本実施例は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進する優先順位を付けたヒトＩｇＧ１抗体の評価を記載する。図２Ａは、ＷａｐＲ－００７および陰性対照抗体Ｒ３４７を除き、全ての抗体が発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）の濃度依存的殺傷を媒介したことを示す。ＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３は、優れたＯＰＫ活性を示した。ＯＰＫアッセイは、修正した（ＤｉＧｉａ

ｎｄｏｍｅｎｉｃｏ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ ７２，７０１２－７０２１（２００４））に記載のとおり実施した。手短に述べると、アッセイを、９６ウェルプレート中で０．０２５ｍｌのそれぞれのＯＰＫ構成成分を使用して実施した；緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株；希釈子ウサギ血清；分化ＨＬ－６０細胞；およびモノクローナル抗体。一部のＯＰＫアッセイにおいて、記載（Ｃｈｏｉ，Ｋ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２，４４３－４４８（２００５））のとおり構築した発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株を使用した。発光ＯＰＫアッセイは、上記のとおり実施したが、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ ＥＮＶＩＳＩＯＮ Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を使用して相対ルシフェラーゼ単位（ＲＬＵ）を測定した。

【０３１３】

ＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３抗体が別の臨床関連Ｏ抗原血清型株９８８２－８０．ｌｕｘに対するＯＰＫ活性を媒介する能力を評価した。図２Ｂは、ＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３ＯＰＫ活性の向上が株９８８２－８０（Ｏ１１）に及ぶことを示す。

【０３１４】

さらに、本実施例は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進するｓｃＦｖ－Ｆｃフォーマットにおける ＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体の評価を記載する。ある突然変異体Ｗａｐ－００４ＲＡＤ（Ｗ４－ＲＡＤ）は、部位特異的突然変異導入を介して特異的に作出してＶＨ中のＲＧＤモチーフを除去した。他のＷ４突然変異体は以下のとおり調製した。ネステッドＰＣＲを記載（Ｒｏｕｘ，Ｋ．Ｈ．，ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ ４，Ｓ１８５－１９４（１９９５））のとおり実施して回復期緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）感染患者に由来するｓｃＦｖライブラリーから分析のためにＷ４バリアント（体細胞超突然変異に由来）を増幅させた。これは、ＷａｐＲ－００４が由来したライブラリーである。Ｗ４バリアント断片を、当分野において公知の標準的手順を使用してサブクローニングおよび配列決定した。Ｗ４突然変異体軽鎖（ＬＣ）をＷａｐＲ－００４重鎖（ＨＣ）により組み換えてｓｃＦｖ－ＦｃフォーマットのＷ４突然変異体を産生した。さらに、ＷａｐＲ－００４ＲＡＤ重鎖（ＨＣ）突然変異体をｓｃＦｖ－ＦｃフォーマットのＭ７およびＭ８の親ＬＣにより組み換えた。構築物は、当分野において公知の標準的な手順を使用して調製した。図１１（Ａ～Ｍ）は、陰性対照抗体Ｒ３４７を除き、全てのＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体が発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）の濃度依存的殺傷を媒介したことを示す。

【０３１５】

潜在的免疫原性を低減するようにＷａｐＲ－００４－ＲＡＤ可変領域を生殖系列化して、ＷａｐＲ－００４－生殖系（「ＷａｐＲ－００４－ＧＬ」）を作製し、部位指定突然変異誘発によりリード最適化した。Ｐｓｌに対して改善された親和性を有するクローンを競合スクリーンで選択した。上位のクローンを親和性改善により等級付けし、インビトロ機能性アッセイで分析した。１４のリード最適化クローンは、Ｐｓｌ００９６、Ｐｓｌ０１７０、Ｐｓｌ０２２５、Ｐｓｌ０３０４、Ｐｓｌ０３３７、Ｐｓｌ３４８、Ｐｓｌ０５６７、Ｐｓｌ０５７３、Ｐｓｌ０５７４、Ｐｓｌ０５８２、Ｐｓｌ０５８４、Ｐｓｌ０５８５、Ｐｓｌ０５８８およびＰｓｌ０５８９である。

【０３１６】

実施例３

血清型非依存性抗緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）抗体は、Ｐｓｌエキソ多糖を標的化する

本実施例は、表現型スクリーニングに由来する抗緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）抗体の標的の同定を記載する。標的分析は、血清型非依存性抗体がタンパク質または炭水化物抗原を標的化したかどうかを試験するように実施した。ＥＬＩＳＡにおいて、プロテイナーゼＫにより完全に消化されたＰＡＯ１全細胞抽出物への結合の損失は観察されず、このことは反応性が表面接近可能な炭水化物残基を標的化したことを示唆する（データ示

さず）。アイソジェニック突然変異体は、Ｏ抗原、アルギネート、およびＬＰＳコア生合成を担う遺伝子において構築した；ｗｂｐＬ（Ｏ抗原欠損）；ｗｂｐＬ／ａｌｇＤ（Ｏ抗原およびアルギネート欠損）；ｒｍｌＣ（Ｏ抗原欠損およびトランケート外部コア）；およびｇａｌＵ（Ｏ抗原欠損およびトランケート内部コア）。緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）突然変異体は、Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ（Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ，Ｈ．Ｐ．，Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ６，１１９５－１２０４（１９９２）；Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ，Ｈ．Ｄ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １５，８３１－８３４（１９９３））により記載されるアレル置換方針に基づき構築した。ベクターは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｓ１７．１から緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１中に動員させ；組換え体を記載（Ｈｏａｎｇ，Ｔ．Ｔ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ２１２，７７－８６（１９９８））のとおり単離した。遺伝子欠失は、ＰＣＲにより確認した。緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）突然変異体は、野生型遺伝子を保有するｐＵＣＰ３０Ｔベース構築物により補完した。抗体の反応性は、間接ＥＬＩＳＡにより上記緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株によりコートしたプレート上で測定した：図３Ａは、ｗｂｐＬまたはｗｂｐＬ／ａｌｇＤ二重突然変異体へのＣａｍ－００３結合が影響を受けなかったが、ｒｍｌＣおよびｇａｌＵ突然変異体への結合が消失したことを示す。これらの結果はＬＰＳコアへの結合と一致した一方、ＰＡＯ１から精製されたＬＰＳに対する反応性は観察されなかった。ｒｍｌＣおよびｇａｌＵ遺伝子は、近年、Ｐｓｌエキソ多糖、Ｄ－マンノース、Ｌ－ラムノース、およびＤ－グルコースからなる繰り返し五糖ポリマーの生合成に要求されることが示された。ｐｓｌＡがＰｓｌ生合成に要求されるため、アイソジェニックｐｓｌＡノックアウトＰＡＯ１ΔｐｓｌＡへのＣａｍ－００３結合を試験した（Ｂｙｒｄ，Ｍ．Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ７３，６２２－６３８（２００９））。ＰＡＯ１ΔｐｓｌＡへのＣａｍ－００３の結合は、ＥＬＩＳＡ（図３Ｂ）およびＦＡＣＳ（図３Ｃ）により試験した場合に消失した一方、この突然変異体中のＬＰＳ分子は影響を受けなかった（図３Ｄ）。Ｃａｍ－００３の結合は、ｐｓｌＡにより補完されたＰＡＯ１ΔｗｂｐＬ／ａｌｇＤ／ｐｓｌＡ三重突然変異体においてにおいて回復し（図３Ｅ）、これはＣａｍ－００３がこの突然変異体とは対照的に補完ＰＡＯ１ΔｐｓｌＡに対するオプソニン殺傷を媒介する能力と同様であった（図３Ｆおよび３Ｇ）。Ｐｅｌエキソ多糖突然変異体へのＣａｍ－００３抗体の結合も、影響を受けず、このことはさらに、Ｐｓｌを本発明者らの抗体標的として確認する（図３Ｅ）。結合アッセイは、残留抗体もＰｓｌに結合することを確認した（図３Ｈおよび３Ｉ）。

【０３１７】

実施例４

抗ＰｓｌｍＡｂは、培養上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の付着を遮断する。

本実施例は、抗Ｐｓｌ抗体が上皮細胞との緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）会合を遮断したことを示す。抗Ｐｓｌ抗体を、不透明９６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ Ｎｕｎｃｌｏｎ Ｄｅｌｔａ）中で成長させたＡ５４９細胞（腺癌ヒト肺胞基底上皮細胞系）のコンフルエント単層に添加した。対数増殖期の発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰＡＯ１株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）を１０のＭＯＩにおいて添加した。ＰＡＯ１．ｌｕｘをＡ５４９細胞と３７℃において１時間インキュベートした後、Ａ５４９細胞を洗浄し、次いでＬＢ＋０．５％グルコースを添加した。実施例２に記載のＯＰＫアッセイにおいて実施したとおり、３７℃における短時間のインキュベーション後に細菌を定量した。Ａ５４９細胞を有さないウェルからの計測値を使用して非特異的結合について補正した。図４は、Ｃａｍ－００５およびＷａｐＲ－００７を除き、全ての抗体がＡ５４９細胞へのＰＡＯ１．ｌｕｘの会合を用量依存様式で低減させたことを示す。ＯＰＫアッセイにおいて最良に機能したｍＡｂのＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３（図２Ａ～Ｂ、および実施例２参照）も、Ａ５４９肺上皮細胞への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）細胞付着の阻害において最も活性であり、陰性対照と比較して最大約８０％の低減を提供した。ＷａｐＲ－０１６は、３番目に活性の抗体であり、ＷａｐＲ－００４およびＣａｍ－００３と同様

の阻害活性を示したが、１０倍高い抗体濃度において示した。

【０３１８】

実施例５

インビボ継代緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株は、Ｐｓｌの発現を維持／増加させる

インビボでのＰｓｌ発現が維持されるかどうかを試験するため、マウスに緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）単離物を腹腔内注射し、次いで注射４時間後に腹腔洗浄により細菌を回収した。Ｐｓｌの存在は、対照抗体およびＣａｍ－００３を用いてフローサイトメトリーにより分析した。それというのも、抗体結合についての条件がよりストリンジェントであり、Ｐｓｌ発現に陽性または陰性である細胞の定量を可能とするためである。エクスビボ結合のため、細菌接種材料（０．１ｍｌ）を、一晩ＴＳＡプレートから調製し、ＢＡＬＢ／ｃマウスに腹腔内送達した。チャレンジ４時間後において、細菌を回収し、ＲＢＣを溶解させ、超音波処理し、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０および１％ＢＳＡを補給したＰＢＳ中で再懸濁させた。実施例１に既に記載したとおり試料を染色し、分析した。図５は、野生型緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株を有する腹腔洗浄後に回収された細菌が、対数増殖期の培養細菌と同等の濃いＣａｍ－００３染色を示したことを示す（図５Ａおよび５Ｃを比較）。インビボ継代野生型細菌は、接種材料と比較して染色の向上を示した（図５Ｂおよび５Ｃを比較）。接種材料内で、Ｐｓｌは株６０７７について検出されず、株ＰＡＯ１（Ｏ５）および６２０６（Ｏ１１－細胞毒性）について最少で検出された。細菌へのＣａｍ－００３の結合は接種材料に関して増加し、このことは、Ｐｓｌ発現がインビボで維持または増加されることを示す。野生型株６０７７、ＰＡＯ１、および６２０６は、インビボ継代後にＰｓｌを発現するが、ｐｓｌＡを欠失する株ＰＡＯ１（ＰＡＯ１Δｐｓｌ Ａ）は、Ｃａｍ－００３と反応し得ない。これらの結果は、Ｐｓｌをモノクローナル抗体の標的としてさらに強調する。

【０３１９】

実施例６

緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎モデルにおける抗Ｐｓｌモノクローナル抗体Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４により処理した動物についての生存率

抗体またはＰＢＳをそれぞれのモデルに感染２４時間前に投与した。緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎、角膜炎、および熱傷感染モデルを上記のとおり修正して実施した（ＤｉＧｉａｎｄｏｍｅｎｉｃｏ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０４，４６２４－４６２９（２００７））。急性肺炎モデルにおいて、ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）を０．０５ｍｌの接種材料中で懸濁させた緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株により感染させた。熱傷モデルにおいて、ＣＦ－１マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ）は、９２℃への１０秒間の金属焼印加熱により１０％の総体表面積熱傷を受けた。動物を緑膿菌（Ｐ． ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７により示した用量において皮下感染させた。臓器負荷実験のため、急性肺炎をマウスにおいて誘導し、次いでＣＦＵの決定のために肺、脾臓、および腎臓を感染２４時間後に回収した。

【０３２０】

モノクローナル抗体Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４を、臨床疾患と関連する最も高頻度の血清型を表す緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株に対して急性致死肺炎モデルにおいて評価した。図６Ａおよび６Ｃは、対照と比較して株ＰＡＯ１および６２９４により感染させたＣａｍ－００３処理マウスの有意な濃度依存性生存率を示す。図６Ｂおよび６Ｄは、３３３５６および細胞毒性株６０７７によるチャレンジからの完全な保護が、Ｃａｍ－００３により４５および１５ｍｇ／ｋｇにおいて行われた一方、８０および９０％の生存率が５ｍｇ／ｋｇにおいて３３３５６および６０７７についてそれぞれ観察されたことを示す。図６Ｅおよび６Ｆは、株６０７７（Ｏ１１）（8×10^{5} ＣＦＵ）（図６Ｅ）、または６０７７（０１１）（6×10^{5} ＣＦＵ）（図６Ｆ）を有する急性肺炎モデルにおけるＷａｐＲ－００４処理マウスにおける有意な濃度依存性生存率を示す。

【０３２１】
次に、Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４をそれらの肺における緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）臓器負荷を低減させ、遠位の臓器に拡散する能力について試験し、その後、動物を種々の濃度のＷａｐＲ－００４、Ｃａｍ－００３、または対照抗体によりいくつかの異なる濃度において処理した。Ｃａｍ－００３は、試験された４つ全ての株に対する緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）肺負荷の低減において有効であった。Ｃａｍ－００３は、高病原性細胞毒性株６０７７に対して最も有効であり、低用量が高用量と同様に有効であった（図７Ｄ）。Ｃａｍ－００３は、ＰＡＯ１（図７Ａ）、６２９４（図７Ｃ）、および６０７７（図７Ｄ）により感染させたマウスの脾臓および腎臓への播種の低減における顕著な効果も有した一方、これらの臓器への播種は、３３３５６感染マウスにおいては観察されなかった（図７Ｂ）。図７Ｅおよび７Ｆは、同様に、ＷａｐＲ－００４が６２９４（Ｏ６）および６２０６（Ｏ１１）による急性肺炎の導入後に臓器負荷を低減させたことを示す。具体的には、ＷａｐＲ－００４は、感染マウスにおける脾臓および腎臓への緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）播種の低減において有効であった。

【０３２２】
実施例７
抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２の構築
ｒ－ＰｃｒＶを用いたＵｌｔｒａ－Ｓｈｏｒｔ免疫方法により、ＶｅｌｏｃＩｍｍｕｎｅ（登録商標）マウス（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）を免疫し、ＰｃｒＶへの結合および生存緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）の溶血活性の中和について血清力価を追跡した。血清中に抗溶血活性を示すマウスを死なせ、脾臓およびリンパ節（腋窩、鼠径部および膝窩）を採取した。これらの器官からの細胞集団をビオチン化ｒ－ＰｃｒＶでパニングして、抗ＰｃｒＶ特異的Ｂ細胞を選択した。次に、選択した細胞をマウス骨髄腫パートナーＰ３Ｘ６３－Ａｇ８と融合させ、ハイブリドーマ選択培地中に２５Ｋ細胞／ウェルで接種した。１０日後、ハイブリドーマウェルからの培地を新鮮な培地と完全に交換し、さらに３～４日後、ハイブリドーマ上澄みを抗溶血活性についてアッセイした。抗溶血活性を示すコロニーを、９６ウェルプレートの０．２細胞／ウェルで限界希釈クローニングし、抗溶血活性アッセイを反復した。抗溶血活性を示すクローンをＵｌｔｒａ－ｌｏｗ　ＩｇＧ含有ハイブリドーマ培地に順応させた。順化培地からのＩｇＧを精製し、インビトロ抗溶血活性についてアッセイし、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）による感染からの防御についてインビボでアッセイした。また、競合アッセイにより抗体を様々なグループに分類した。目的の抗体からの可変（Ｖ）ドメインを、それぞれの異なるクローンに由来するｃＤＮＡからサブクローニングした。サブクローン化Ｖセグメントを、哺乳動物発現プラスミド中の対応定常ドメインのｃＤＮＡとフレーム内で融合させた。組換えＩｇＧを発現させ、ＨＥＫ２９３細胞から精製した。特定のクローンから２つ以上のｃＤＮＡ　Ｖ－配列を取得した場合には、可変重鎖および軽鎖のあらゆる組み合わせを発現させ、特性決定することにより、機能性ＩｇＧを同定した。

【０３２３】
実施例８
緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）角膜感染モデルにおける抗Ｐｓｌモノクローナル抗体Ｃａｍ－００３、ＷａｐＲ－００４および抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２により処理した動物についての生存率
次に、Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４の効力を、病原体の付着および損傷組織のコロニー化能を強調する緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）角膜感染モデルにおいて評価した。図８Ａ～Ｄおよび８Ｆ～Ｇは、Ｃａｍ－００３およびＷａｐＲ－００４を受けたマウスが、陰性対照処理動物に観察されたものよりも眼の総ホモジネートにおいて顕著に少ない病原性および細菌カウント数の低減を有したことを示す。図８Ｅは、Ｃａｍ－００３は熱傷モデルにおいて試験した場合でも有効であったことを示し、抗体処理対照と比較して１５および５ｍｇ／ｋｇにおいて顕著な保護を提供する。図８（Ｈ）：抗Ｐｓｌおよび抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２を緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）マウ

ス角膜炎モデルにおいて試験した。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに、ＰＢＳもしくは対照ＩｇＧ１抗体（Ｒ３４７）を４５ｍｇ／ｋｇで、またはＷａｐＲ－００４（α－Ｐｓｌ）を５ｍｇ／ｋｇで、またはＶ２Ｌ２（α－ＰｃｒＶ）を５ｍｇ／ｋｇで腹腔内（ＩＰ）注射してから１６時間後に、６０７７（Ｏ１１－細胞毒性－１×１０^{6}ＣＦＵ）により感染させた。感染直前、マウスを麻酔してから、解剖顕微鏡下で２７ゲージ針を用い、３つの１ｍｍの擦り傷を各マウスの片方の眼の角膜および間質表層上に作り、次いで５μｌの接種材料中の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６０７７株を局所塗布した。感染から４８時間後に眼を撮影し、続いて、解剖顕微鏡下で眼の視覚化により角膜の等級付けを行った。角膜感染の等級付けは、Ｐｒｅｓｔｏｎらによって以前記載されているように実施した（Ｐｒｅｓｔｏｎ，ＭＪ．，１９９５，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６３：３４９７）。手短には、動物処理について知らない検査者によって、株６０７７による感染から４８時間後に感染した免疫を等級付けした。以下の等級付け計画を用いた：グレード０、肉眼で非感染の目と同一の眼；グレード１、薄い混濁が瞳を一部覆っている；グレード２、濃い混濁が瞳を覆っている；グレード３、濃い混濁が瞳全体を覆っている；グレード４、角膜穿孔（眼球の収縮）。全身投与（ＩＰ）したＣａｍ－００３またはＷａｐＲ－００４ＲＡＤは、Ｒ３４７対照ｍＡｂ治療動物で観察されたものより、眼の総ホモジネートにおいて有意に少ない病原性および低減した細菌コロニー形成単位（ＣＦＵ）を示した。同様の結果が、Ｒ３４７処理対照と比較して、Ｖ２Ｌ２処理動物でも観察された。

【０３２４】

実施例９

Ｃａｍ－００３Ｆｃ突然変異抗体Ｃａｍ－００３－ＴＭは、縮小したＯＰＫおよびインビボ効力を有するが、抗細胞付着活性を維持する。

二重の作用機序についての潜在性を考慮して、Ｆｃγ受容体との相互作用を低減させるＦｃドメイン中の突然変異を保有するＣａｍ－００３Ｆｃ突然変異抗体Ｃａｍ－００３－ＴＭ（Ｏｇａｎｅｓｙａｎ，Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６４，７００－７０４（２００８））を作出して、保護が抗細胞付着またはＯＰＫ活性とより相関性を示すかどうかを同定した。緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）突然変異体を、Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ（Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ，Ｈ．Ｐ．，Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ６，１１９５－１２０４（１９９２）；Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ，Ｈ．Ｄ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １５，８３１－８３４（１９９３））により記載されるアレル置換方針に基づき構築した。ベクターを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｓ１７．１から緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１中に動員させ；組換え体を記載（Ｈｏａｎｇ，Ｔ．Ｔ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ２１２，７７－８６（１９９８））のとおり単離した。遺伝子欠損はＰＣＲにより確認した。緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）突然変異体は、野生型遺伝子を保有するｐＵＣＰ３０Ｔベース構築物により補完した。図９Ａは、Ｃａｍ－００３－ＴＭが、Ｃａｍ－００３と比較してＯＰＫ活性の４倍の降下を示したが（それぞれ、０．２４および０．０６のＥＣ$_{50}$）、細胞付着アッセイにおいて有効であったことを示す（図９Ｂ）。図９Ｃは、Ｃａｍ－００３－ＴＭが肺炎に対してもあまり有効でなかったことを示し、このことは、最適なＯＰＫ活性が最適な保護に必要であることを示唆する。ＯＰＫおよび細胞付着アッセイは、それぞれ実施例２および４に既に記載のとおり実施した。

【０３２５】

実施例１０

抗Ｐｓｌ抗体についてのエピトープマッピングおよび相対親和性

エピトープマッピングを競合ＥＬＩＳＡにより実施し、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１の一晩培養物の上澄みに由来するＰｓｌを用いるＯＣＴＥＴ（登録商標）フローシステムを使用して確認した。競合ＥＬＩＳＡのため、ＥＺ－Ｌｉｎｋスルホ－ＮＨＳ－ビオチンおよびビオチン化キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して抗体をビオチン化した。抗原コートプレートを、未標識抗体と同時インキュベートしたＥＣ$_{50}$のビオチン化抗体により処理した。ＨＲＰ－コンジュゲートストレプトアビ

ジン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とインキュベートした後、プレートを上記のとおり発色させた。抗ＰｓｌｍＡｂ間の競合実験は、抗体が少なくとも３つのユニークエピトープを標的化することを決定し、クラス１、２、および３抗体と称した（図１０Ａ）。クラス１および２抗体は、結合について競合しないが、クラス３抗体ＷａｐＲ－０１６は、クラス１および２抗体の結合を部分的に阻害する。

【０３２６】

抗体親和性は、一晩ＰＡＯ１培養物の上澄みに由来するＰｓｌを使用してＯＣＴＥＴ（登録商標）結合アッセイにより測定した。抗体K_Dは、それぞれの抗体について７つの濃度の結合キネティクスを平均化することにより測定した。親和性計測値は、３８４傾斜底ウェルプレートを使用するＦＯＲＴＥＢＩＯ（登録商標）ＯＣＴＥＴ（登録商標）３８４装置により取った。一晩ＰＡＯ１培養物±ｐｓｌＡ遺伝子からの上澄みをＰｓｌ資源として使用した。試料をＯＣＴＥＴ（登録商標）アミノプロピルシラン（ＰＢＳ中で水和）センサー上にロードし、ブロッキングし、次いでいくつかの濃度において抗ＰｓｌｍＡｂ結合、およびＰＢＳ＋１％ＢＳＡ中への解離を計測した。全ての手順は、記載（Ｗａｎｇ，Ｘ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　３６２，１５１－１６０）のとおり実施した。会合および解離生ΔｎＭデータをＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにより曲線フィッティングした。図１０Ａは、上記で特性決定された抗Ｐｓｌ抗体の相対結合親和性を示す。クラス２抗体は、全ての抗Ｐｓｌ抗体のうちで最大の親和性を有した。図１０Ａは、細胞付着およびＯＰＫデータ実験のまとめも示す。図１０Ｂは、実施例２に記載した部位指定突然変異誘発によりリード最適化したＷａｐ－００４ＲＡＤ（Ｗ４ＲＡＤ）突然変異体ならびに他のＷ４突然変異体の相対結合親和性およびＯＰＫ　ＥＣ５０値を示す。図１０Ｃは、Ｗａｐ－００４ＲＡＤ（Ｗ４ＲＡＤ）、Ｗａｐ－００４ＲＡＤ－生殖系列（Ｗ４ＲＡＤ－ＧＬ）、ならびにリード最適化した抗Ｐｓｌモノクローナル抗体（Ｐｓｌ００９６、Ｐｓｌ０１７０、Ｐｓｌ０２２５、Ｐｓｌ０３０４、Ｐｓｌ０３３７、Ｐｓｌ３４８、Ｐｓｌ０５６７、Ｐｓｌ０５７３、Ｐｓｌ０５７４、Ｐｓｌ０５８２、Ｐｓｌ０５８４、Ｐｓｌ０５８５、Ｐｓｌ０５８８およびＰｓｌ０５８９）の相対結合親和性を示す。以下の実施例１０に示すように、そのＯＰＫ活性増大に基づき、強調表示したクローンＰｓｌ００９６、Ｐｓｌ０２２５、Ｐｓｌ０３３７、Ｐｓｌ０５６７およびＰｓｌ０５８８を選択した。

【０３２７】

実施例１１

緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）オプソニン食菌殺傷（ＯＰＫ）アッセイにおけるリード最適化ＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体クローンおよびリード最適化抗Ｐｓｌモノクローナル抗体の評価

この実施例は、実施例２に記載の方法を用いて、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを促進するリード最適化ＷａｐＲ－００４（Ｗ４）突然変異体クローンおよびリード最適化抗Ｐｓｌモノクローナル抗体の評価について記載する。図１１Ａ～Ｑから、陰性対照抗体Ｒ３４７を除くすべての抗体が、発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）の抗体濃度依存的殺傷を媒介したことがわかる。

【０３２８】

実施例１２

抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２は、複数の株からの急性肺炎による致死率を低下させる

ＰｃｒＶエピトープ多様性を３つのアプローチ：ビーズを用いたフローサイトメトリー法、競合ＥＬＩＳＡおよび断片化ｒＰｃｒＶのウエスタンブロットを用いて分析した。抗ＰｃｒＶｍＡｂ間の競合実験により、抗体が、少なくとも６つのユニークなエピトープ（クラス１、２、３、４、５および６抗体と称する）をターゲティングしたことが判明した（図１２Ａ）。クラス２および３抗体は、結合について部分的に競合する。以下に記載するように、別のエピトープクラス：クラス１（Ｖ２Ｌ７、３Ｇ５、４Ｃ３および１１Ａｂ）、クラス２（１Ｅ６および１Ｆ３）、クラス３（２９Ｄ２、４Ａ８および２Ｈ３）、ク

ラス４（Ｖ２Ｌ２）およびクラス５（２１Ｆ１、ＬＥ１０およびＳＨ３）を呈示するｍＡｂを、インビボ保護について試験した。

【０３２９】

ハイブリドーマ技術を用いて、新規抗ＰｃｒＶｍＡｂを単離し、ウサギ赤血球溶解阻害アッセイを用いて、大部分の強力なＴ３ＳＳ阻害物質を選択した。細胞傷害性アッセイの阻害パーセントを親Ｖ２Ｌ２ｍＡｂ、ｍＡｂ１６６（陽性対照）およびＲ３４７（陰性対照）について分析したが、ここでは、約１０のＭＯＩで対数増殖期緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６０７７（ｅｘｏＵ＋）と混合した培養気管上皮細胞系Ａ５４９に、抗体を投与した。放出された乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）活性を測定することによりＡ５４９溶解をアッセイし、ｍＡｂの存在下での溶解をｍＡｂなしのウェルと比較することにより、阻害パーセントを決定した。Ｖ２Ｌ２ｍＡｂ、ｍＡｂ１６６（陽性対照）およびＲ３４７（陰性対照）をＲＢＣの溶解を阻止するその能力について評価したが、ここでは、抗体を対数増殖期緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６０７７（ｅｘｏＵ＋）および洗浄済ウサギ赤血球（ＲＢＣ）と混合し、３７℃で２時間インキュベートした。インタクトなＲＢＣをペレット化し、溶解の程度を無細胞上澄みのOD_{405}を測定することにより決定した。抗ＰｃｒＶｍＡｂの存在下での溶解をｍＡｂなしのウェルと比較することにより、阻害パーセントを決定した。陽性対照抗体のｍＡｂ１６６は、以前特性決定された抗ＰｃｒＶ抗体である（Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ．１８６：６４－７３（２００２），Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．４０：２３２０－２３２６（２０１２））。（Ｂ）親Ｖ２Ｌ２ｍＡｂは、０．１０μｇ／ｍｌのＩＣ５０で、細胞傷害性の阻害を示し、ｍＡｂ１６６（ＩＣ５０：２．８μｇ／ｍｌ）より２８倍低いＩＣ５０濃度を呈示した。（Ｃ）Ｖ２Ｌ２も、０．３７μｇ／ｍｌのＩＣ５０で、ＲＢＣ溶解の阻害を示し、ｍＡｂ１６６（ＩＣ５０：３．７μｇ／ｍｌ）より１０倍低いＩＣ５０濃度を呈示した。

【０３３０】

潜在的免疫原性を低減するように、Ｖ２Ｌ２可変領域を完全に生殖系列化した。全６つのＣＤＲについて２０個のアミノ酸で各位置をランダム化する節減突然変異誘発を用いて、Ｖ２Ｌ２を親和性成熟させ、親和性が改善した単一突然変異を同定した。次に、コンビナトリアルライブラリーを用いて、親和性が改善した単一突然変異のあらゆる可能な組み合わせをコードした。ＩｇＧフォーマットの結合ＥＬＩＳＡを用いて、ＰｃｒＶに対する親和性が改善したクローンを選択した。親和性の改善により上位クローンをランク付けし、インビトロ機能性アッセイで分析した。Ｖ２Ｌ２ＣＤＲを系統的に突然変異誘発し、競合スクリーンにより、ＰｃｒＶに対する親和性が改善したクローンを選択した。親和性増大によりクローンをランク付けし、機能性アッセイで分析した。図１２Ｄに示すように、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）株６０７７感染Ａ５４９細胞を用いて、Ｖ２Ｌ２生殖系列化ＭＡｂ（Ｖ２Ｌ２－ＧＬ）、Ｖ２Ｌ２－ＧＬ最適化ｍＡｂ（Ｖ２Ｌ２－Ｐ４Ｍ、Ｖ２Ｌ２－ＭＦＳ、Ｖ２Ｌ２－ＭＤおよびＶ２Ｌ２－ＭＲ）、ならびに陰性対照Ｒ３４７について、ＲＢＣ溶解を分析した。Ｖ２Ｌ２－ＧＬ、Ｖ２Ｌ２－Ｐ４Ｍ、Ｖ２Ｌ２－ＭＦＳ、Ｖ２Ｌ２－ＭＤおよびＶ２Ｌ２－ＭＲは、ＲＢＣ溶解の阻害を示した。図１２Ｅに示すように、ｍＡｂ１Ｅ６、１Ｆ３、１１Ａ６、２９Ｄ２、ＰＣＲＶ０２およびＶ２Ｌ７は、ＲＢＣ溶解の阻害を示した。図１２Ｆに示すように、Ｖ２Ｌ２は、ＲＢＣ溶解の阻害において２９Ｄ２より強力であった。

【０３３１】

Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＰｒｏｔｅＯｎ（商標）ＸＰＲ３６計器を用いて、Ｖ２Ｌ２－ＧＬおよびＶ２Ｌ２－ＭＤの結合反応速度を測定した。抗ヒトＩｇＧ試薬を用いて、ＧＬＣバイオセンサーチップ上で抗体を捕捉した。ｒＰｃｒＶタンパク質を様々な濃度で注射した後、解離期が６００秒にわたり続いた。データを取得し、ＰｒｏｔｅＯｎ Ｍａｎａｇｅｒソフトウエアを用いて分析した。図１２（Ｇ～Ｈ）は、（Ｇ）Ｖ２Ｌ２－ＧＬおよび（Ｈ）Ｖ２Ｌ２－ＭＤ抗体の相対結合親和性を示す。クローンＶ２Ｌ２－ＭＤは、Ｖ２Ｌ２－ＧＬに対しＫｄを２～３倍増大した。

【０３３２】

急性肺炎モデルを用い、抗ＰｃｒＶ抗体の投与のインビボ効果をマウスにおいて試験した。図１３（Ａ～Ｂ）に示すように、各回で濃度を増加させるＶ２Ｌ２抗体、陽性対照抗ＰｃｒＶ抗体（ｍＡｂ１６６）、または陰性対照（Ｒ３４７）のいずれかでマウスのグループを処理した。また、図１３（Ｃ～Ｄ）に示すように、各回で濃度を増加させるＶ２Ｌ２抗体、ＰｃｒＶ抗体ＰｃｒＶ－０２、または陰性対照（Ｒ３４７）のいずれかによってマウスのグループを処理した。処理から２４時間後、全マウスを５×１０^{7}ＣＦＵ（Ｃ）緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２９４（Ｏ６）または（Ｄ）ＰＡ１０３Ａ（Ｏ１１）により感染させた。図１３に示すように、ほぼ全ての対照マウスが、感染後４８時間までに感染により死んだ。しかし、Ｖ２Ｌ２は、感染後１６８時間まで、生存の向上に用量依存的効果を示した。さらに、Ｖ２Ｌ２は、同様の用量でｍＡｂ１６６より有意に強力な防御をもたらした（６０７７株の場合、Ｐ＝０．０２５、５ｍｇ／ｋｇ；６２９４株の場合、Ｐ＜０．０００１、１ｍｇ／ｋｇ）。

【０３３３】

図１３（Ｅ～Ｈ）に示すように、各回で濃度を増加させる１１Ａ６、３Ｇ５もしくはＶ２Ｌ７、同一の濃度の２９Ｄ２、１Ｆ３、１Ｅ６、Ｖ２Ｌ２、ＬＥ１０、ＳＨ３、４Ａ８、２Ｈ３、または２１Ｆ１、濃度を増加させる２９Ｄ２、濃度を増加させるＶ２Ｌ２、ＰｃｒＶ抗体ＰｃｒＶ－０２、または陰性対照（Ｒ３４７）のいずれかによって、マウスのグループを処理した。マウスにｍＡｂを腹腔内（ＩＰ）注射してから２４時間後、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）株６０７７（６×１０^{6}ＣＦＵ／動物）を鼻腔内注射した。図１３Ｅに示すように、ｍＡｂ１１Ａ６、３Ｇ５およびＶ２Ｌ７は、インビボで防御をもたらさなかった。図１３Ｆに示すように、ｍＡｂ２９Ｄ２は、インビボで防御をもたらす。図１３Ｇに示すように、ｍＡｂＶ２Ｌ２も、インビボで保護をもたらす。図１３Ｈは、２９Ｄ２およびＶ２Ｌ２のインビボ比較を示す。図１３Ｉは、ｍＡｂＶ２Ｌ２が、別のシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）株（すなわち、６２９４およびＰＡ１０３Ａ）から防御することを示している。

【０３３４】

また、Ｖ２Ｌ２の投与に応答するシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）に感染したマウスの臓器負荷も試験した。図１４（Ａ）マウスを１ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（対照）、または１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、もしくは０．０７ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２のいずれかで処理した後、１．２×１０^{6}ｃｆｕのシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）株６２０６で鼻腔内感染させた。図１４（Ｂ）マウスはまた、１５ｍｇ／ｋｇのＲ３４７（陰性対照）；１５．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは１．０ｍｇ／ｋｇのｍＡｂ１６６（陽性対照）；または５．０ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、もしくは０．２ｍｇ／ｋｇのＶ２Ｌ２のいずれかによっても処理し、次いで、５．５×１０^{6}ｃｆｕのシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）株６２０６で鼻腔内感染させた。図１４（Ａ～Ｂ）に示すように、Ｖ２Ｌ２は、腎臓におけるクリアランスにほとんど効果がないが、用量依存的に、肺および脾臓の両方に対する播種を大幅に低減した。さらに、Ｖ２Ｌ２は、同様の用量で、ｍＡｂ１６６より有意な臓器ＣＦＵ低減をもたらした（Ｐ＜０．０００１、１ｍｇ／ｋｇ、肺）。

【０３３５】

実施例１３

ＷａｐＲ－００４（抗Ｐｓｌ）およびＶ２Ｌ２（抗ＰｃｒＶ）抗体を用いた併用療法のインビボ活性

抗体Ｖ２Ｌ２およびＷａｐＲ－００４（ＲＡＤ）を用いて、抗Ｐｓｌおよび抗ＰｃｒＶ結合ドメインの併用投与のインビボ効果をさらに試験した。マウスのグループをＲ３４７（２．１ｍｇ／ｋｇ－陰性対照）、Ｖ２Ｌ２（０．１ｍｇ／ｋｇ）、Ｗ４－ＲＡＤ（０．５ｍｇ／ｋｇ）、またはＶ２Ｌ２／Ｗ４併用（各々、０．１、０．５、１．０もしくは２．０ｍｇ／ｋｇのいずれか）で処理した。抗体の投与から２４時間後、全マウスを、５．２５×１０^{5}ｃｆｕ６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）含有の接種材料で感染させた。感染から２４時間後、肺、脾臓、および腎臓を採取し、ホモジナイズした後、組織のグラム当

たりのコロニー形成単位（ＣＦＵ）決定のために平板培養した。図１５に示すように、試験濃度で、Ｖ２Ｌ２およびＷ４のいずれも、臓器負荷の低減に有効であり、Ｖ２Ｌ２／Ｗ４併用は、組織クリアランスにおいて相加作用を示した。肺組織の組織学的検査から、Ｖ２Ｌ２またはＷａｐＲ－００４を単独で受けたマウスと比較して、少ない出血、少ない浮腫、および炎症性浸潤の低減が明らかにされた（表５）。

【０３３６】

同様に免疫した動物も、急性肺炎感染からの生存について評価した。

【表５】

表 5

グループ(n)	処理	全体的影響（影響を受けた肺表面部位）	出血	浮腫	炎症性浸潤	グラム染色
1(2)	R347 (2.1 mg/kg)	気管支間質性肺炎(75%) 類線維素壊死および顕著な充血	3+	3+	PMN 3+	
6(3)	V2L2 (0.1 mg/kg)	気管支間質性肺炎(55%) 気管支上皮細胞傷害および 顕著な充血	3+	3+	PMN 3+	
7(3)	WapR-004 (0.5 mg/kg)	気管支間質性肺炎(50%) 気管支上皮細胞傷害および 顕著な充血	2-3+	3+	PMN 2-3+	
2(3)	V2L2 + WapR-004 (0.1 mg/kg + 0.1 mg/kg)	気管支間質性肺炎(15%) 軽度の気管支上皮細胞傷害	1+	3+	PMN 1+	
3(3)	V2L2 + WapR-004 (0.1 mg/kg + 0.5 mg/kg)	気管支間質性肺炎(40%)、中度の充血	2+	3+	PMN 2+	
4(3)	V2L2 + WapR-004 (0.1 mg/kg + 1.0 mg/kg)	主として気管支肺炎; 気管支間質性肺炎(20%)	1-3+	3+	PMN1-2+	
5(3)	V2L2 + WapR-004 (0.1 mg/kg + 2.0 mg/kg)	軽度の気管支肺炎(20%)	1+	3+	PMN1-2+	

【０３３７】

実施例１４

緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）急性肺炎モデルにおける抗ＰｃｒＶモノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２により処理した動物についての生存率

実施例１１に既述したように、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）に対する急性致死的肺炎モデルにおいて、モノクローナル抗体Ｖ２Ｌ２－ＧＬ、Ｖ２Ｌ２－ＭＤ、Ｖ２Ｌ２－Ａ、Ｖ２Ｌ２－Ｃ、Ｖ２Ｌ２－ＰＭ４およびＶ２Ｌ２－ＭＦＳを評価した。図１６（Ａ～Ｆ）は、対照と比較して、６０７７株に感染させた全てのＶ２Ｌ２処理マウスにおける生存を示す。しかし、各用量：０．５ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇ（Ａ～Ｃ）または０．５ｍｇ／ｋｇおよび０．１ｍｇ／ｋｇ（Ｄ～Ｆ）のＶ２Ｌ２抗体間で生存における有意な差は観察されない。図１６（Ｇ～Ｉ）は、対照と比較して、６０７７株に感染させた全てのＶ２Ｌ２処理マウスにおける生存を示す。各用量：０．５ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇ（Ｇ～Ｉ）のＶ２Ｌ２抗体間で生存に有意な差は観察されない。（Ａ～Ｈ）

【０３３８】

全ての対照マウスが、感染後約４８時間までに感染により死んだ。

【０３３９】

実施例１５

ＷａｐＲ－００４／Ｖ２Ｌ２二重特異性抗体の構築

図１７Ａは、ＴＮＦα二重特異性モデル構築物を示す。Ｂｓ１－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＴＮＦαＶＬのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ２－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＴ

ＮＦαＶＨのアミノ末端に融合させる。Ｂｓ３－ＴＮＦα／Ｗ４の場合、Ｗ４ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＣＨ３のカルボキシ末端に融合させる。

【０３４０】

ＷａｐＲ－００４＋Ｖ２Ｌ２の併用が、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）チャレンジからの防御をもたらすことから、ＷａｐＲ－００４ｓｃＦｖ（Ｗ４－ＲＡＤ）およびＶ２Ｌ２ＩｇＧを含む二重特異性構築物を作製した（図１７Ｂ）。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを作製するために、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＶ２Ｌ２ＶＨのＮ末端に融合させた。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを作製するために、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＣＨ３のＣ末端に融合させた。Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを作製するために、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖをヒンジ領域に挿入し、ｓｃＦｖのＮ末端およびＣ末端上に（Ｇ４Ｓ）２リンカーにより連結させた。Ｂｓ２－Ｗ４－ＲＡＤ－２Ｃを作製するために、Ｖ２Ｌ２ｓｃＦｖを、（Ｇ４Ｓ）２リンカーを介してＷ４－ＲＡＤＶＨのアミノ末端に融合させた。

【０３４１】

Ｂｓ３構築物のＷ４－ＲＡＤｓｃＦｖを作製するために、Ｗ４－ＲＡＤＶＨおよびＶＬをＰＣＲにより増幅した。Ｗ４－ＲＡＤＶＨを増幅するのに用いたプライマーは、以下の通りであった：（Ｇ４Ｓ）２リンカーと、２２ｂｐのＶＨ　Ｎ末端配列（ＧＴＡＡＡＧＧＣＧＧＡＧＧＧＧＧＡＴＣＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＧＧＣＴＣＴＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＧＧ（配列番号２２４））とを含むＷ４－ＲＡＤＶＨフォワードプライマー；および（Ｇ４Ｓ）２リンカーの一部と、２２ｂｐのＶＨ　Ｃ末端配列（ＧＡＴＣＣＴＣＣＧＣＣＧＣＣＧＣＴＧＣＣＣＣＣＴＣＣＣＣＣＡＧＡＧＣＣＣＣＣＴＣＣＧＣＣＡＣＴＣＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＧＧＧＴＣ（配列番号２２５））とを含むＷ４－ＲＡＤＶＨリバースプライマー。同様に、Ｗ４－ＲＡＤＶＬを、以下のプライマーを用い、ＰＣＲにより増幅した：（Ｇ４Ｓ）２リンカーの一部と、２２ｂｐのＶＬ　Ｎ末端配列（ＡＧＧＧＧＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＣＧＧＡＧＧＡＴＣＴＧＧＧＧＧＡＧＧＧＧＧＣＡＧＣＧＡＡＡＴＴＧＴＧＴＴＧＡＣＡＣＡＧＴＣＴＣ（配列番号２２６））とを含むＷ４－ＲＡＤＶＬフォワードプライマー；およびベクター配列の一部と、２２ｂｐのＶＬ　Ｃ末端配列（ＣＡＡＴＧＡＡＴＴＣＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＣＡＣ（配列番号２２７））とを含むＷ４－ＲＡＤＶＬリバースプライマー。次に、重複断片を互いに融合させることにより、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを形成した。

Ｂｓ３ベクターのＷ４－ＲＡＤｓｃＦｖ配列：下線で示す配列は、Ｇ４Ｓリンカーである

【化３】

GGGGSGGGGSEVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIRQPPGKCLELIGY
IHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCARADWDLLHALDIW
GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRS
HLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS
YSFPLTFGCGTKLEIK（配列番号228）

【０３４２】

Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖ断片を増幅した後、これを精製してから、ＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩで消化しておいたＢｓ３ベクターに連結させた。連結は、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎシステムを用いて行い、続いて、Ｓｔｅｌｌａｒコンピテント細胞で形質転換を実施した。コロニーを配列決定することにより、正しいＷ４－ＲＡＤｓｃＦｖ挿入片を確認した。

【０３４３】

Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを作製するために、Ｂｓ３ベクター中のＩｇＧ部分をＶ２Ｌ２ＩｇＧで置換した。手短には、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖを含有するＢｓ３ベクターをＢｓｓＨＩＩ／ＳａｌＩで消化し、得られたベクターバンドをゲル精製した。同様に、Ｖ２Ｌ２ベクターを含有するベクターをＢｓｓＨＩＩ／ＳａｌＩで消化し、Ｖ２Ｌ２挿入片をゲル精製した。次に、Ｖ２Ｌ２挿入片をＢｓ３－Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖベクターと連結させてから、コロニーを配列決定することにより、正しいＶ２Ｌ２ＩｇＧ挿入片を確認した。

【０３４４】
同様の手法を用いて、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを作製した。
Ｂｓ２ベクターの$W4-RADscFv-V2L2VH$配列：下線で示す配列は、Ｇ４Ｓリンカーである
【化４】

EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNP
SLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCARADWDLLHALDIWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPG
KAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPLTFGCGT
KLEIKGGGGSGGGGSEMQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGE
GLEWVSAITISGITAYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKEEFLP
GTHYYYGMDVWGQGTTVTVSS（配列番号229）

【０３４５】
以下のプライマーを用いて、$W4-RADscFv$を増幅した。ＶＨ（フォワードプライマー）およびＶＬ（リバースプライマー）：一部のイントロン、３’シグナルペプチドと、２２ｂｐの$W4-RADVH$　Ｎ末端配列（ＴＴＣＴＣＴＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＴＣＣＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＧＧ（配列番号２３０））とを含むＢｓ２ベクターの$W4-RADVH$フォワードプライマー、および（Ｇ４Ｓ）２リンカーと、３２ｂｐのＶＬ　Ｃ末端配列（ＣＣＣＣＣＴＣＣＧＣＣＧＧＡＴＣＣＣＣＣＴＣＣＧＣＣＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＣＡＣＡＧＣＣＧＡＡＡＧ（配列番号２３１））とを含むＢｓ２ベクターの$W4-RADVL$リバースプライマー。
【０３４６】
Ｖ２Ｌ２ＶＨ領域を増幅するために、以下のプライマーを用いた：（Ｇ４Ｓ）２リンカーと、２２ｂｐのＶ２Ｌ２ＶＨ　Ｎ末端配列（ＧＧＣＧＧＡＧＧＧＧＧＡＴＣＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＧＧＣＴＣＴＧＡＧＡＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＴＧＧ（配列番号２３２））とを含むＶ２Ｌ２ＶＨフォワードプライマー、およびＣＨ１Ｎ末端配列と、２２ｂｐのＶ２Ｌ２ＶＨ　Ｃ末端配列（ＡＴＧＧＧＣＣＣＴＴＧＧＴＣＧＡＣＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＧＴＣ（配列番号２３３））とを含むＶ２Ｌ２ＶＨリバースプライマー。
【０３４７】
次に、これらのプライマーを用いて、Ｖ２Ｌ２ＶＨを増幅した後、これをオーバーラップにより$W4-RADscFv$およびＶ２Ｌ２ＶＨと結合させることにより、$W4-RADscFv-V2L2-VH$を取得した。次いで、$W4-RADscFv-V2L2-VH$をゲル精製し（オーバーラップＰＣＲから）；ＢｓｒＧＩ／ＳａｌＩでＢｓ２ベクターを消化し、ベクターバンドをゲル精製することにより、$W4-RADscFv-V2L2VH$をＢｓ２ベクターに連結させた。次に、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎシステムにより、$W4-RADscFv-V2L2-VH$をＢｓ２ベクターと連結させ、Ｓｔｅｌｌａｒコンピテント細胞中に形質転換させて、正しい$W4-RADscFv-V2L2-VH$挿入片についてコロニーを確認した。Ｂｓ２ベクター中のＶＬをＶ２Ｌ２ＶＬで置換するために、$W4-RADscFv-V2L2-VH$を含むＢｓ２ベクターをＢｓｓＨＩＩ／ＢｓｉＷＩで消化し、ベクターバンドをゲル精製した。次に、ｐＯＥ－Ｖ２Ｌ２ベクターをＢｓｓＨＩＩ／ＢｓｉＷＩで消化し、Ｖ２Ｌ２ＶＬ挿入片をゲル精製した。次いで、Ｖ２Ｌ２ＶＬ挿入片を$B_{s2}-W4-RADscFv-V2L2-VH$ベクターと連結させて、正しいＶ２Ｌ２ＩｇＧ挿入片についてコロニーを配列決定した。
【０３４８】
最後に、同様のＰＣＲに基づく手法を用いて、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ構築物を作製した。リンカー配列を含むヒンジ領域を以下に示す：

【化５】

リンカー配列を含むヒンジ領域:

KVDKRVEPKSC*GGGGSGGGGS – N-terminus of scFv*（配列番号329）
CH1　ヒンジ　リンカー

***C-terminus of scFv – GGGGSGGGGS*DKTHTCPPCPAPELL（配列番号330）**
リンカー　ヒンジ　CH2

BS4ベクターのW4－RADscFv配列:W4－RADscFvは**太字の斜字体で示し、**
G4Sリンカーは、**太字の斜字体で下線により示す**;ヒンジ領域は、二重下線により示す

KVDKRVJEPKSC***GGGGSGGGGS*EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIR**
QPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCARAD
***WDLLHALDIWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EIVLTQSPSSLSTSVGDRV**
TITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
***EDFATYYCQQSYSFPLTFGCGTKLEIK*GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP**APELL(**配列番号**
324)

W4－RADscFvは**太字の斜字体で示し**、G4Sリンカーは、**太字の斜字体で下線により示す**

EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNP
SLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCARADWDLLHALDIWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGK
APKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPLTFGCGTK
LEIK

【０３４９】
ＷＡ－ＲＡＤｓｃＦｖをＰＣＲおよび以下のプライマーを用いて作製した：リンカー配列の一部と、２４ｂｐのＷ４－ＲＡＤＶＨ　Ｎ末端配列（ＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＴＴＧＧＡＧＴＣＧＧＧＣ（配列番号２３６））を含むＢｓ４ベクターのＷ４－ＲＡＤＶＨフォワードプライマー；ならびに一部のヒンジ配列、リンカーおよび２１ｂｐのＷ４－ＲＡＤＶＬ　Ｃ末端配列（ＧＴＧＴＧＡＧＴＴＴＴＧＴＣｇｇａｔｃｃＣＣＣＴＣＣＧＣＣＡＧＡＧＣＣＡＣＣＴＣＣＧＣＣＴＴＴＧＡＴＣＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＣ（配列番号２３７））を含むＢｓ４ベクターのＷ４－ＲＡＤＶＬリバースプライマー。
【０３５０】
次に、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖ（ＰＣＲから）をゲル精製することにより、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖをＢｓ４ベクターに連結して、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃを取得し；Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２ベクターをＢａｍＨＩで消化した後、ベクターバンドをゲル精製した。続いて、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎシステムおよびベクター形質転換Ｓｔｅｌｌａｒコンピテント細胞により、Ｗ４－ＲＡＤｓｃＦｖをＢｓ４ベクターと連結させた。正しいＷ４－ＲＡＤｓｃＦｖ挿入片についてコロニーを確認した。
【０３５１】
Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ構築物の軽鎖および重鎖の配列をそれぞれ、配列番号３２７および３２８に記載する。
【０３５２】
実施例１６
Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体は、肺炎モデルにおいて生存を促進する
初めに、Ｂｓ２およびＢｓ３二重特異性抗体を試験して、これらが、二重特異性フォーマットにおいてそのＷ４またはＶ２Ｌ２活性を保持するかどうかを調べた。親Ｗ４ｓｃＦｖについて、Ｗ４およびＴＮＦα結合アームを有する二重特異性抗体を作製した。発光緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株ＰＡＯ１．ｌｕｘを用いて、細胞付着アッセイを実

施した。図１８に示すように、全ての二重特異性構築物が、親Ｗ４－ＩｇＧ１構築物と同様に機能した。

【０３５３】

図１９（Ａ～Ｃ）に示すように、（Ａ）６２０６および（Ｂ）６２０６ΔｐｓｌＡ感染細胞の両方を用いて、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２の両者について、細胞傷害性の阻害パーセントを分析し、また（Ｃ）６２０６感染細胞を用いて、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃについて、ＲＢＣ溶解の阻害パーセントを分析した。図１９（Ａ～Ｃ）に示すように、全ての二重特異性抗体が、６２０６および６２０６ΔｐｓｌＡ感染細胞を用いた親Ｖ２Ｌ２抗体と同様のレベルで、抗細胞傷害活性を保持し、ＲＢＣ溶解を阻止した。

【０３５４】

Ｂｓ２およびＢｓ３二重特異性抗体が、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）のＯＰＫを媒介する能力を、実施例２に記載の方法を用いて評価した。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２抗体の殺傷は低下した（図２０Ａ）。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体の殺傷は低下した（図２０Ｂ）。図２０Ｃは、Ｂｓ４抗体の様々な調製物（古いロット対新しいロット）が、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示したが、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ抗体は、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと比較して、ＯＰＫ活性の３倍低下を呈したことを示す。ＹＴＥ突然変異体は、ＩｇＧの重鎖に導入された３つの「ＹＴＥ突然変異」Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、およびＴ２５６Ｅ（番号付けは、Ｋａｂａｔに記載のＥＵインデックスに従う）の組み合わせを含む。米国特許第７，６５８，９２１号明細書（参照として本明細書に組み込む）を参照されたい。ＹＴＥ突然変異体は、同一の抗体の野生型と比較して、約４倍抗体の血清半減期を延長することが判明している。例えば、Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８１：２３５１４－２４（２００６）および米国特許第７，０８３，７８４号明細書（参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０３５５】

Ｗ４およびＶ２Ｌ２の両方が二重特異性フォーマットにおいて活性を保持することを確認した後、急性肺炎感染からの生存について、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２構築物を評価した。図２１Ａに示すように、感染後約３０時間までに、全ての対照マウスが感染により死んだ。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２マウスは全て、Ｖ２Ｌ２対照を受けたマウスと共に生存した。約９０％のＷ４－ＲＡＤ免疫動物が生存した。対照的に、図Ｂ～Ｆは、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２マウスの約５０％が、１２０時間までに感染により死んだことを示す。感染後約４８時間までに、全ての対照マウスが感染により死んだ。図Ｇ～Ｈから、いずれの用量でＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ－ＹＴＥ処理したマウスの間にも生存率の差は認められない。これらの結果は、両抗体が、６２０６急性肺炎モデルにおいて同等に機能することを示すものである。図２１Ｉから、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、およびＷ４－ＲＡＤ＋Ｖ２Ｌ２抗体混合物が、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６（ＥｘｏＵ＋）でチャレンジしたマウスの致死的肺炎に対する防御において最も有効であることがわかる。

【０３５６】

前述と同様の免疫マウスについて臓器負荷も評価した。前述のように免疫した後、マウスを２．７５×10^5ＣＦＵ６２０６によりチャレンジした。図２２に示すように、試験濃度で、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、肺において臓器負荷を有意に低減させた。しかし、二重特異性構築物を準最適濃度で用いたために、二重特異性構築物のいずれも、親抗体と比較して、脾臓または腎臓における臓器負荷を有意に低減させることはできなかった。準最適濃度を用いて、抗体活性を解読することができた。

【０３５７】

６２９４株を用いて、二重特異性抗体の生存および臓器負荷効果も評価した。６２９４

モデル系を用いて、ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、全ての組織において臓器負荷を、Ｖ２Ｌ２親抗体のそれと同等のレベルまで有意に低減させた。Ｗ４－ＲＡＤ親抗体は、臓器負荷の低減に影響をもたらさなかった（図２３Ａ）。図２３Ｂに示すように、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２、およびＷ４－ＲＡＤ＋Ｖ２Ｌ２の組み合わせは、全ての組織において臓器負荷をＶ２Ｌ２親抗体と同等のレベルまで有意に低減させた。

【０３５８】

免疫マウスについての生存データは、前記と同様の６２９４チャレンジマウスにおいて同様であった。図２４に示すように、ＢＳ３－Ｖ２Ｌ２は、Ｖ２Ｌ２単独処理マウスと同様の生存活性を示したが、ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２処理マウスは、やや低いチャレンジからの防御レベルを示した。

【０３５９】

また、前述のように併用治療動物と比較して、二重特異性抗体治療動物においても臓器負荷を評価した。図２５（Ａ～Ｃ）に示すように、ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ３－Ｖ２Ｌ２の両方が、肺、脾臓および腎臓において臓器負荷をＷ４＋Ｖ２Ｌ２併用と同等のレベルまで低減させた。肺の場合、ダンの事後検定（Ｄｕｎｎ’ｓ　ｐｏｓｔ　ｔｅｓｔ）を含むクラスカル－ウォリス（Ｋｒｕｓｋａｌ－Ｗａｌｌｉｓ）検定を用いると、併用は、細菌ＣＦＵ　Ｂｓ２－およびＢｓ３－Ｖ２Ｌ２ならびにＶ２Ｌ２を有意に低減させた。低減への傾向は認められたものの、脾臓および腎臓における細菌負荷に有意な差は観察されなかった。肺炎モデルにおいて、６２０６を用い、Ｂｓ４－ＧＬＯについても臓器負荷試験を実施した。図２５（Ｄ）に示すように、より高い濃度の抗体をマウスの予防に用いると、肺からの有意な（ダンの事後検定（Ｄｕｎｎ’ｓ　ｐｏｓｔ　ｔｅｓｔ）を含むクラスカル－ウォリス（Ｋｒｕｓｋａｌ－Ｗａｌｌｉｓ）検定）レベルの細菌負荷の低減が観察された。さらに、このモデルに、より高い濃度のＢｓ４－ＧＬＯを用いると、脾臓および腎臓への細菌播種の有意な低減も観察された。

【０３６０】

これらの結果を、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２９４を用いた１．３３×10^7ＣＦＵ（表６Ａ）、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２９４を用いた１．７×10^7ＣＦＵ（表６Ｂ）、および緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６を用いた９．２５×10^5ＣＦＵ（表７）によりチャレンジした免疫ＢＡＬＢ／ｃマウスの肺組織の組織学的検査によって確認した。

【０３６１】

実施例１７

治療補助療法：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ＋抗生物質

実施例６に既述したように、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２０６株に対するＢｓ４二重特異性抗体および抗生物質補助療法の生存効果を急性致死的肺炎モデルにおいて評価した（図２６（Ａ～Ｊ））。（Ａ～Ｂ）マウスをＲ３４７（陰性対照）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃで処理してから２４時間後、６２０６により感染させるか、または、感染から１時間後、シプロフロキサシン（ＣＩＰ）で処理するか、あるいは、感染から２４時間前のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＣＩＰの併用で処理した。（Ｃ）マウスを６２０６により感染させてから１時間後に、Ｒ３４７またはＣＩＰまたはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣＩＰの併用で処理した。（Ｄ）マウスを６２０６により感染させてから２時間後に、Ｒ３４７またはＣＩＰまたはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣＩＰの併用で処理した。（Ｅ）マウスを６２０６により感染させてから２時間後に、Ｒ３４７もしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃで処理するか、または感染から１時間後にＣＩＰで処理するか、あるいは感染から２時間後のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＣＩＰとの併用で処理した。（Ｆ）マウスを６２０６により感染させてから１時間後に、Ｒ３４７またはメロペネム（Ｍｅｒｏｐｅｎｅｍ）（ＭＥＭ）もしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＭＥＭの併用で処理した。（Ｇ）マウスを６２０６により感染させてか

ら２時間後に、Ｒ３４７もしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃで処理するか、または感染から１時間後にＭＥＭで処理するか、あるいは感染から２時間後のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のＭＥＭとの併用で処理した。（Ｈ）マウスを６２０６により感染させてから２時間後に、Ｒ３４７またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣもしくはＭＥＭ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＭＥＭの併用で処理した。（Ｉ）マウスを６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７またはＣｉｐｒｏもしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとＣｉｐｒｏの併用で処理した。全ての対照マウスは、感染後約２４時間までに感染により死んだ。図２６（Ａ～Ｉ）からわかるように、ＣＩＰまたはＭＥＭのいずれかと併用したＢｓ４抗体は、抗生物質療法の効果を高めるが、これは、分子を組み合わせた場合の相乗的防御を示すものである。さらに別の試験では、Ｂｓ４もしくはＣＩＰ単独で、または併用（Ｂｓ４＋ＣＩＰ）で処理したマウスにおける細菌負荷のレベルに焦点を当てる。図２６（Ｊ）に示すように、全ての臓器（肺、脾臓および腎臓）における細菌負荷のレベルは、Ｒ３４７＋ＣＩＰおよびＢｓ４＋ＣＩＰで同様であったが、ＣＩＰと併用してＢｓ４を含有させたマウスだけは、感染から生き残る（図２６（Ａ～Ｅ、Ｉ））。総合すると、これらのデータは、この動物モデル設定において細菌負荷を低減する上で抗生物質は重要であるが、細菌病原性を低減し、従って、正常な宿主免疫を保護するためには、特異的抗体が必要であることがわかる。

【０３６２】

実施例６に既述したように、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２０６株に対するＢｓ４二重特異性抗体およびトブラマイシン（Ｔｏｂｒａｍｙｃｉｎ）抗生物質補助療法の生存効果を急性致死的肺炎モデルにおいて評価する。マウスをＲ３４７（陰性対照）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃで処理してから２４時間後に、６２０６により感染させるか、または、感染から１時間後にトブラマイシンで処理するか、あるいは、感染の２４時間前のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のトブラマイシンの併用で処理する。また、マウスを６２０６により感染させてから１時間後に、Ｒ３４７またはトブラマイシンもしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとトブラマイシンのＬ２－２Ｃと、感染から１時間後のトブラマイシンとの併用で処理する。マウスを６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７またはトブラマイシンもしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとトブラマイシンのＬ２－２Ｃと、感染から１時間後のトブラマイシンとの併用で処理する。

【０３６３】

実施例６に既述したように、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２０６株に対するＢｓ４二重特異性抗体およびアズトオレナム（Ａｚｔｒｅｏｎａｍ）抗生物質補助療法の生存効果を急性致死的肺炎モデルにおいて評価する。マウスをＲ３４７（陰性対照）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃで２４時間処理した後、６２０６により感染させるか、または、感染から１時間後にアズトレオナムで処理するか、あるいは、感染の２４時間前のＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃと、感染から１時間後のアズトレオナムの併用で処理する。また、マウスを６２０６により感染させてから１時間後に、Ｒ３４７またはアズトレオナムもしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとアズトレオナムのＬ２－２Ｃと、感染から１時間後のアズトレオナムとの併用で処理する。さらに、マウスを６２０６により感染させてから２時間後に、Ｒ３４７またはアズトレオナムまたはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２ＣとアズトレオナムのＬ２－２Ｃと、感染から１時間後のアズトレオナムとの併用で処理する。マウスを６２０６により感染させてから４時間後、Ｒ３４７またはアズトレオナムもしくはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、

あるいはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃとアズトレオナムの併用で処理する。

【０３６４】

実施例１８

ＢＳ４－ＧＬＯ二重特異性抗体の構築

図３５Ａに示すように、抗ＰｓｌｓｃＦｖ（Ｐｓｌ００９６ｓｃＦｖ）およびＶ２Ｌ２－ＭＤ（ＶＨ＋ＶＬ）を含むＢＳ４－ＧＬＯ（生殖系列化リード最適化）二重特異性構築物を作製した。ＢＳ４－ＧＬＯ軽鎖は、生殖系列化リード最適化抗ＰｃｒＶ抗体軽鎖可変領域（すなわち、Ｖ２Ｌ２－ＭＤ）を含む。ＢＳ４－ＧＬＯ重鎖は、式ＶＨ－ＣＨ１－Ｈ１－Ｌ１－Ｓ－Ｌ２－Ｈ２－ＣＨ２－ＣＨ３を含み、ここで、ＣＨ１は、重鎖定常領域ドメイン１であり、Ｈ１は、第１重鎖ヒンジ領域断片であり、Ｌ１は、第１リンカーであり、Ｓは、抗ＰｃｒＶＳｃＦｖ分子であり、Ｌ２は、第２リンカーであり、Ｈ２は、第２重鎖ヒンジ領域断片であり、ＣＨ２は、重鎖定常領域ドメイン２であり、ＣＨ３は、重鎖定常領域ドメイン３である。

【化６】

Bs4－GLO軽鎖:

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPWTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:…)

GLO（生殖系列化リード最適化）V2L2（すなわち、V2L2－MD）軽鎖可変領域は、下線により示す

Bs4－GLO重鎖:

EMQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGEGLEWVSAITIS
GITAYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAKEEFLPGTHYY
YGMDVWGQGTTVTVSS]ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRV]EPKSC***GGGGSGGGGSEVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYW***
TWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTA
VYFCARADWDLLHALDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ
SPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK GLO（生殖系列化ーリード最適化）V2L2（すなわち、V2L2－MD）重鎖可変領域は、下線により示す;CH1に[]を付ける;GLO（生殖系列化ーリード最適化）W4－RAD(すなわち、Psl0096）scFvは、***太字の斜字体で示し***、G4Sリンカーは、***太字の斜字体で下線により示す***;ヒンジ領域は二重下線により示す。

【０３６５】

抗ＰｓｌＳｃＦｖおよび抗Ｐｓｌ（ＶＨ＋ＶＬ）を含む別のＢｓ４－ＧＬＯ二重特異性構築物を図３５Ｂに示し、これを同様に作製する。

【０３６６】

実施例１９

Ｂｓ４－ＧＬＯ二重特異性抗体の機能活性および効果の評価

二重特異性抗体Ｂｓ４－ＷＴ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃとも称する）、ＢＳ４－ＧＬ（生殖系列化抗ＰｃｒＶおよび抗Ｐｓｌ可変領域を含む）および実施例１８に記載のように作製したＢｓ４－ＧＬＯを、実施例２に既述したように、オプソニン食菌殺傷アッセイ（図２７Ａ）、実施例４に既述したように、抗細胞付着アッセイ（図２７Ｂ）、および実施例１２に既述したように、ＲＢＣ溶解抗細胞傷害性アッセイ（図２７Ｃ）における機能活性の差について試験した。抗体間に、機能活性のインビトロでの差は観察されなかった。

【０３６７】

Ｂｓ４－ＧＬＯのインビトロ効果を以下のように調べた。予防評価の場合、マウスを複数の濃度（すなわち、０．００７ｍｇ／ｋｇ、０．０２ｍｇ／ｋｇ、０．０７ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇもしくは１５ｍｇ／ｋｇ）のＢｓ４－ＧＬＯで予防的に処理し（図２８Ａ）、その２４時間後に、以下の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株（６２０６（１．０×１０^{6}），６０７７（１．０×１０^{6}），６２９４（２．０×１０^{7}）またはＰＡ１０３(１．０×１０^{6}））により感染させた。治療評価の場合、マウスを以下の緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株（６２０６（１．０×１０^{6}），６０７７（１．０×１０^{6}），６２９４（２．０×１０^{7}）またはＰＡ１０３(１．０×１０^{6}））により感染させてから１時間後に、複数の濃度（すなわち、０．０３ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇもしくは４５ｍｇ／ｋｇ）のＢｓ４－ＧＬＯで治療的に処理した（図２８Ｂ）。

【０３６８】

実施例６に既述したように、様々な緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株に対するＢｓ４－ＧＬＯ二重特異性抗体の生存効果を急性致死的肺炎モデルにおいて評価した。図２９は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）致命的菌血症モデルにおけるＢｓ４－ＧＬＯで治療した動物の生存率を示す。菌血症モデルの態様は、２０１２年１１月６日に提出された米国仮特許出願第６１／７２３，１２８号明細書（代理人整理番号：ＡＴＯＸ－５００Ｐ１、名称「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＯＦ　ＴＲＥＡＴＩＮＧ　Ｓ．ＡＵＲＥＵＳ　ＡＳＳＯＣＩＡＴＥＤ　ＤＩＳＥＡＳＥＳ」）（参照により全体として本明細書に組み込む）に開示されている。

【０３６９】

動物をＢｓ４－ＧＬＯまたはＲ３４７で２４時間処理した後、（Ａ）６２９４（Ｏ６）または（Ｂ）６２０６により腹腔内感染させた。ＢＳ４－ＧＬＯは、全ての試験濃度で、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株（Ａ）６２９４および（Ｂ）６２０６でチャレンジしたマウスにおいて致死的肺炎からの保護に有効である。

【０３７０】

様々な緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株に対するＢｓ４－ＧＬＯ二重特異性抗体の生存効果を熱損傷モデルにおいて評価した。図３０は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおけるＢｓ４－ＧＬＯで予防的に処理した動物の生存率を示す。動物をＢｓ４－ＧＬＯまたはＲ３４７で数時間処理した後、熱損傷を誘導し、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株（Ａ）６０７７（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）または（Ｂ）６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）または（Ｃ）６２９４（Ｏ６）を創傷下に直接、皮下感染させた。Ｂｓ４－ＧＬＯは、全ての試験濃度で、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株（Ａ）６０７７、（Ｂ）６２０６および（Ｃ）６２９４でチャレンジしたマウスの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルでの予防に有効である。

【０３７１】

図３１は、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおいて、二重特異性抗体Ｂｓ４－ＧＬＯで予防的に処理した動物の生存率を示す。（Ａ）熱損傷の誘導から（Ａ）４時間または（Ｂ）１２時間後に、動物をＢｓ４－ＧＬＯまたはＲ３４７で処理し、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７（Ｏ１１－ＥｘｏＵ$^{+}$）を創傷下に直接、皮下感染させた。ＢＳ４－ＧＬＯは、全ての試験濃度で、熱損傷の誘導の後（Ｂ）４時間または（Ｂ）１２時間後にＢｓ４－ＧＬＯで処理し、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６０７７により皮下感染させたマウスの緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）熱損傷モデルにおいて有効である。

【０３７２】

実施例２０

治療補助療法：Ｂｓ４ＧＬＯ＋抗生物質

実施例６に既述したように、Ｂｓ４－ＧＬＯ二重特異性抗体および抗生物質補助療法の生存効果を、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２０６株に対する急性致死的肺炎モデルにおいて評価した。

【０３７３】

図３２は、シプロフロキサシン（ＣＩＰ）を用いた治療補助療法を示す。（Ａ）マウスを緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７＋ＣＩＰまたはＢｓ４－ＷＴ、あるいはＢｓ４－ＷＴとＣＩＰの併用で処理した。（Ｂ）マウスを緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７＋ＣＩＰまたはＢｓ４－ＧＬＯ、あるいはＢｓ４－ＧＬＯとＣＩＰの併用で処理した。（Ａ～Ｂ）ＣＩＰと併用したＢｓ４－ＷＴまたはＢＳ４－ＧＬＯ抗体は、抗生物質療法の効果を増大した。

【０３７４】

図３３は、メロペネム（ＭＥＭ）を用いた治療補助療法を示す：（Ａ）マウスを緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７＋ＭＥＭまたはＢｓ４－ＷＴ、あるいはＢＳ４－ＷＴとＭＥＭの併用で処理した。（Ｂ）マウスを緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６により感染させてから４時間後に、Ｒ３４７＋ＭＥＭまたはＢｓ４、あるいはＢｓ４－ＧＬＯとＭＥＭの併用で処理した。（Ａ～Ｂ）ＭＥＭと併用したＢｓ４－ＷＴまたはＢｓ４－ＧＬＯ抗体は、抗生物質療法の効果を増大した。

【０３７５】

図３４は、致死的菌血症モデルにおける治療補助療法：Ｂｓ４－ＧＬＯと抗生物質を示す。表示濃度（このモデルにおいて準治療防御用量濃度であると事前に決定されたもの）のＢｓ４－ＧＬＯまたはＲ３４７（陰性対照）でマウスを処理してから２４時間後に、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２９４により腹腔内感染させた。感染から１時間後、マウスを表示濃度（このモデルにおいて準治療防御用量濃度であると事前に決定されたもの）の抗生物質（Ａ）シプロフロキサシン（ＣＩＰ）、（Ｂ）メロペネム（ＭＥＭ）または（Ｃ）トブラマイシン（ＴＯＢ）で皮下処理した。感染から７２時間後まで動物を生存について注意深くモニターした。準保護濃度で、ＣＩＰ、ＭＥＭもしくはＴＯＢのいずれと併用したＢｓ４－ＧＬＯ抗体も、抗生物質療法の効果を増大した。

【０３７６】

本開示は、記載された具体的な実施形態により範囲を限定するものではなく、それは本開示の個々の態様の単一の説明として意図されるものであり、機能的に均等であるあらゆる組成物または方法が本開示の範囲内である。実際には、本明細書に示され、記載されたものに加えた本開示の種々の改変形態が、上記詳細な説明および添付の図面から当業者に明らかである。そのような改変形態は、添付の特許請求の範囲の範囲内であるものとする。

【０３７７】

本明細書に挙げられた全ての刊行物および特許出願は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が個別具体的に参照により取り込まれることを示されるかのごとく同程度に参照

により本明細書に組み込まれる。さらに、２０１１年１１月７日に提出された米国仮特許出願第６１／５５６，６４５号；２０１２年４月１６日に提出された第６１／６２４，６５１号；２０１２年４月１７日に提出された第６１／６２５，２９９号；２０１２年９月６日に提出された第６１／６９７，５８５号ならびに２０１２年１１月６日に提出された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／６３６３９号明細書（代理人整理番号ＡＥＭＳ－１１５ＷＯ１、名称「ＭＵＬＴＩＳＰＥＣＩＦＩＣ ＡＮＤ ＭＵＬＴＩＶＡＬＥＮＴ ＢＩＮＤＩＮＧ ＰＲＯＴＥＩＮＳ ＡＮＤ ＵＳＥＳ ＴＨＥＲＥＯＦ」）は、あらゆる目的のために、参照により全体として本明細書に組み込むものとする。

【表６－１】

表 6A

グループ(n)	処理	全体的影響 (影響を受けた肺表面部位)	出血	浮腫	炎症性浸潤	細菌
4(3)	R347 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(57%)、上皮細胞傷害、顕著な充血	3+ 広範	3+	PMN 3+	2+
1(3)	V2L2 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(57%)、軽度の上皮細胞傷害、中度の充血	3+ 広範	3+	PMN 3+	陰性-1+
6(3)	WapR-004 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(57%)、中度の上皮細胞傷害、顕著な充血	3+ 広範	3+	PMN 3+	2+
2(3)	BS2-V2L2 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(27%)、軽度の上皮細胞傷害、軽度から中度の充血	3+ 中度	2+-3+	PMN 2+	±
3(3)	BS3-V2L2 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(20%)、軽度の上皮細胞傷害、軽度から中度の充血	3+ 軽度	2+	PMN 1+-2+	±
5(2)	WapR-4 + V2L2 (各0.1mg/kg)	主として気管支肺炎 (20%) 軽度の上皮細胞傷害、軽度の充血	3+ 軽度	2+	PMN 1+-2+	陰性- ±

【表６－２】

表 6B

グループ(n)	処理	全体的影響 (影響を受けた肺表面部位)	出血	浮腫	炎症性浸潤	細菌
4(3)	R347 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(40%)、軽度の上皮細胞傷害、中度の充血	3+	3+	PMN 2+	2+
1(3)	V2L2 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(30%)、軽度の上皮細胞傷害、軽度の充血	2+	3+	PMN 2+	陰性
6(3)	WapR-004 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎(40%)、中度の上皮細胞傷害、中度の充血	3+	3+	PMN 2+	陰性-2+
2(3)	BS2-V2L2 (0.2mg/kg)	気管支間質性肺炎 (20%)、軽度の上皮細胞傷害、軽度の充血	2+	2+	PMN 1+	陰性
3(3)	BS3-V2L2 (0.2mg/kg)	気管支肺炎軽度の上皮細胞傷害	1+	±	±	陰性
5(2)	WapR-4 + V2L2 (各0.1mg/kg)	主として気管支肺炎 軽度の上皮細胞傷害,	1+	±	±	陰性

【表７】

表７

グループ (n)	処理	全体的影響（影響を受けた肺表面部位）	出血	浮腫	炎症性浸潤	細菌
4(3)	R347 (0.2 mg/kg)	気管支間質性肺炎(57%)、上皮細胞傷害、顕著な充血	3+	3+	PMN 3+	1+
1(3)	V2L2 (0.2 mg/kg)	気管支間質性肺炎(40%)、軽度の上皮細胞傷害、中度の充血	3+	3+	PMN 2-3+	±
6(3)	WapR-004 (0.2 mg/kg)	気管支間質性肺炎(36%)、軽度の上皮細胞傷害、顕著な充血	3+	3+	PMN 2+	陰性-1+
2(3)	BS2-V2L2 (0.2 mg/kg)	気管支間質性肺炎(22%)、軽度から中度の充血	1+-2+	1+-2+	PMN 1-2+	陰性
3(3)	BS3-V2L2 (0.2 mg/kg)	気管支間質性肺炎(20%)、軽度から中度の充血	1+	1+	PMN 1+	陰性
5(3)	WapR-4 + V2L2 (各0.1mg/kg)	主として気管支肺炎 (<10%) 軽度の充血	1+	2+	±	陰性

【図１－１】

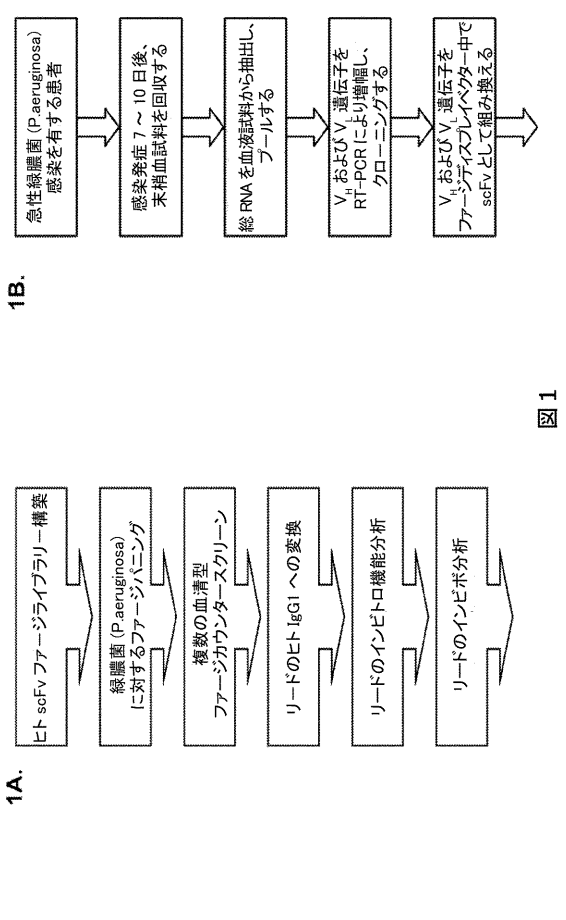


図１

【図１－２】

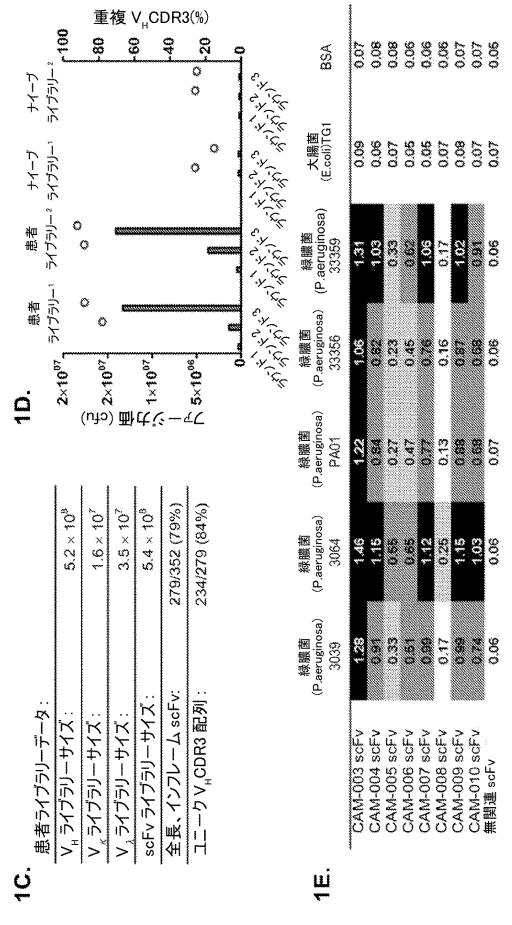


図１

【図１－３】

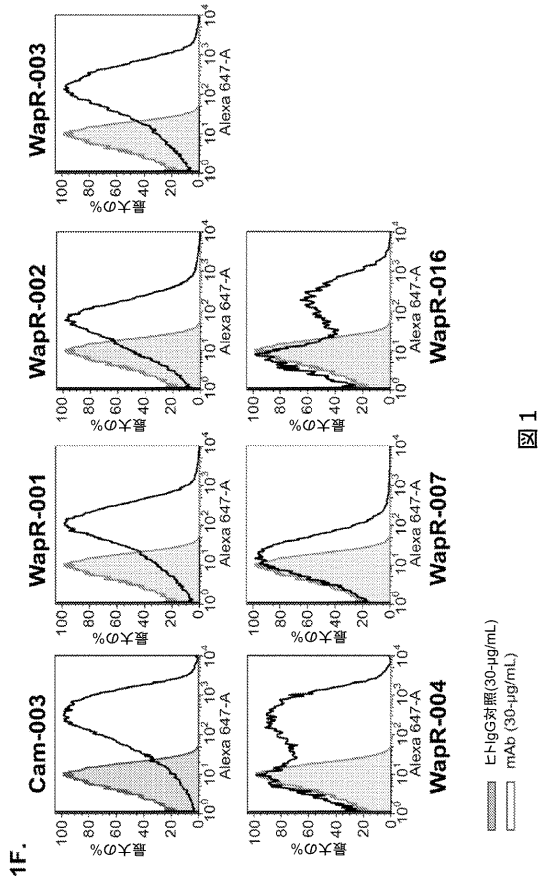


図１

【図２】

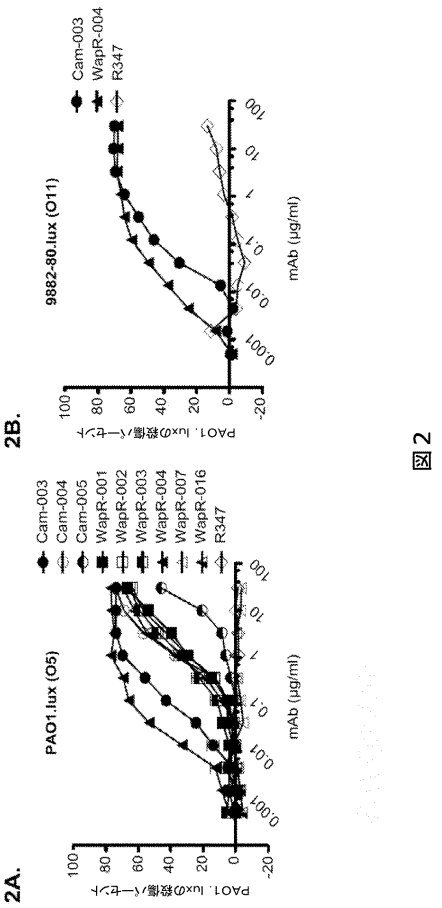


図２

【図３－１】

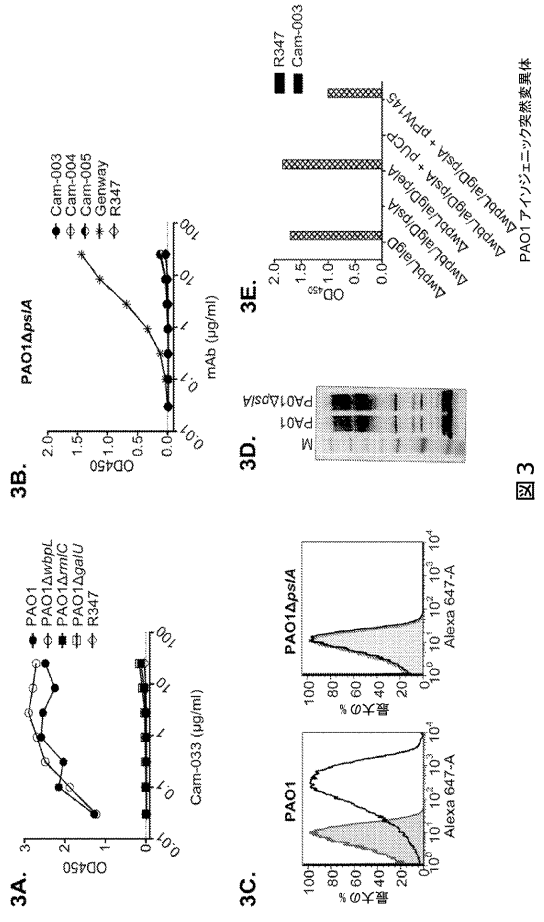


図３

【図３－２】

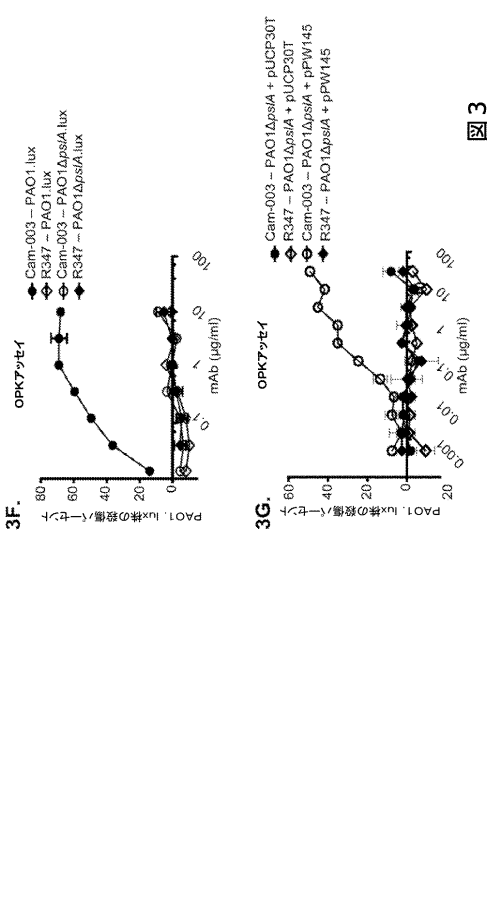


図３

【図３－３】

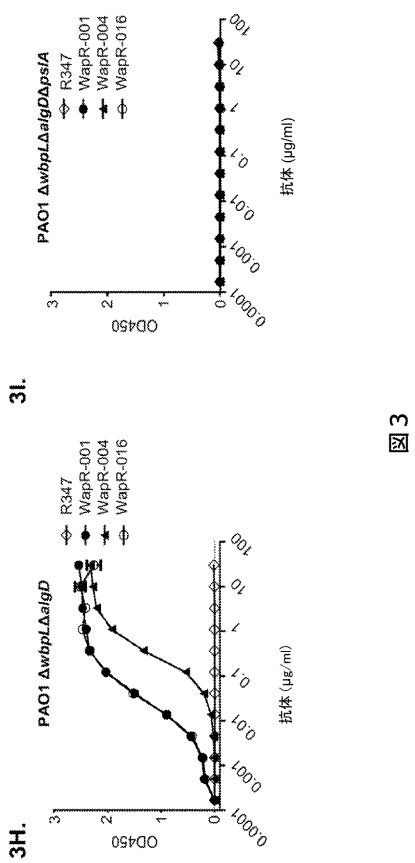


図３

【図４】

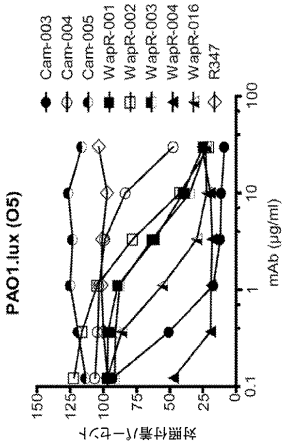


図４

【図５】

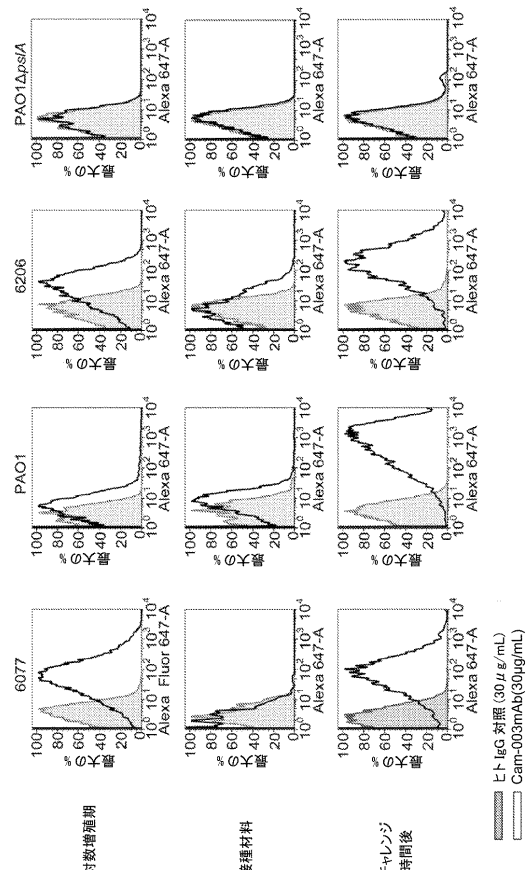


図５

【図６－１】

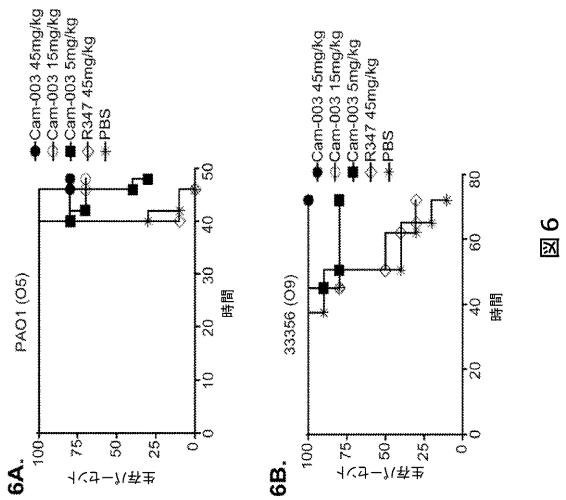


図６

【図６－２】

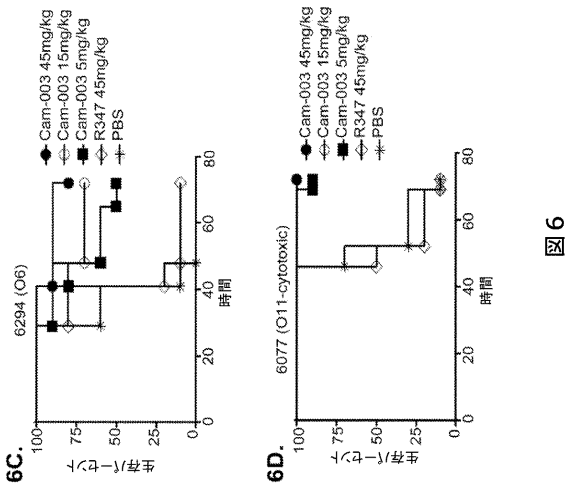


図６

【図６－３】

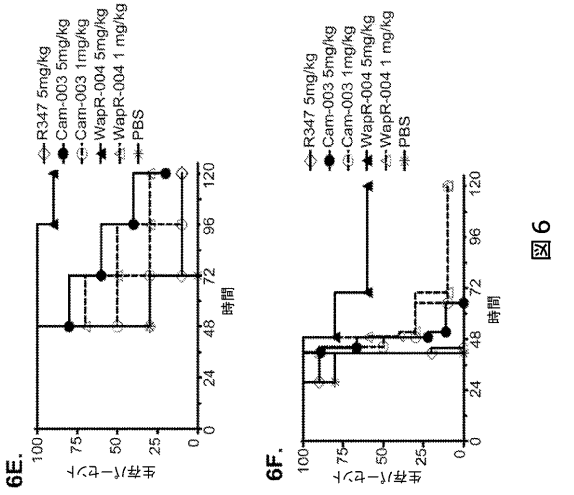


図６

【図７－１】

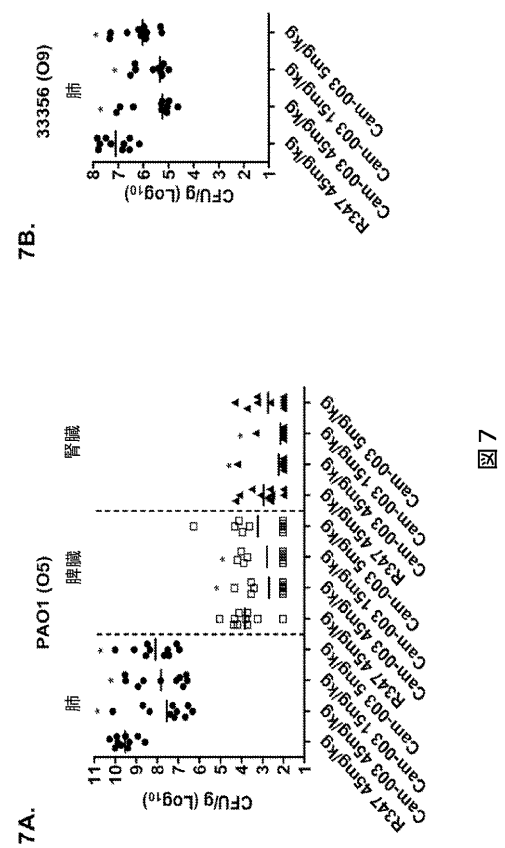


図７

【図７－２】

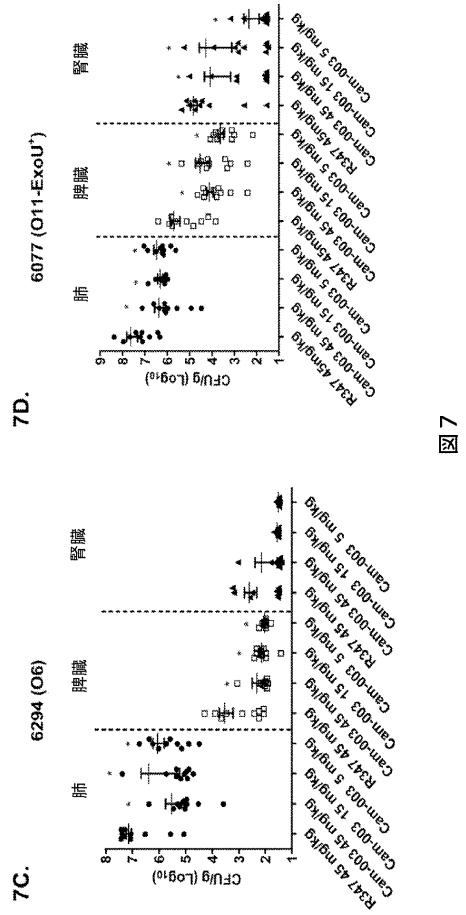


図７

【図７－３】

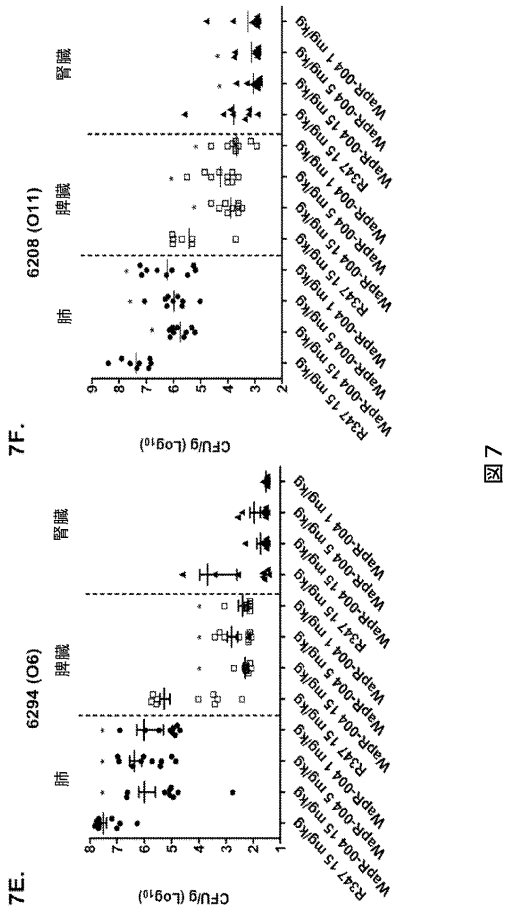


図７

【図８－１】

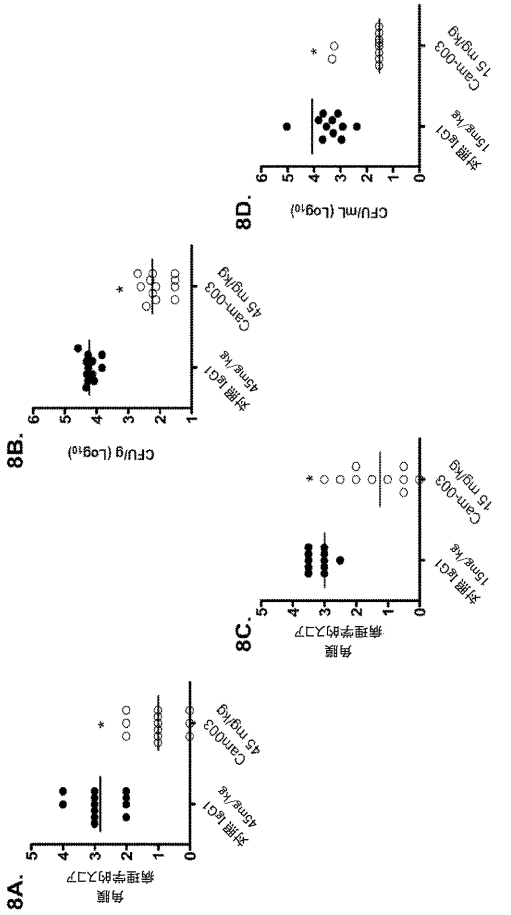


図８

【図８－２】

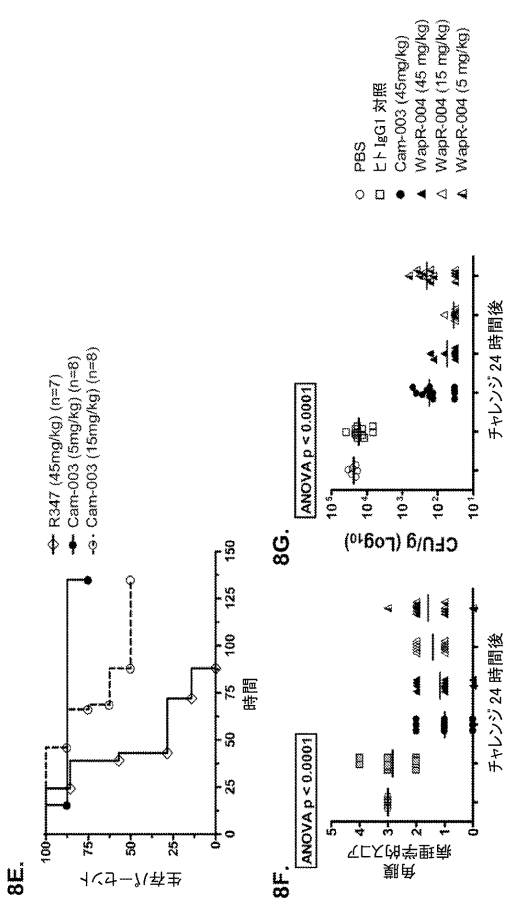


図８

【図８－３】

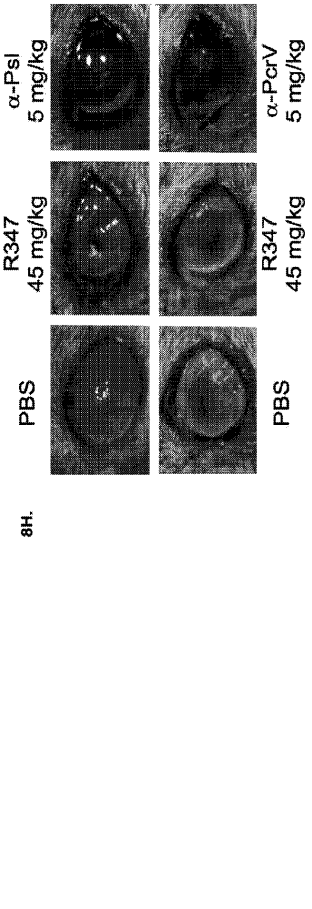


FIG. 8

【図９】

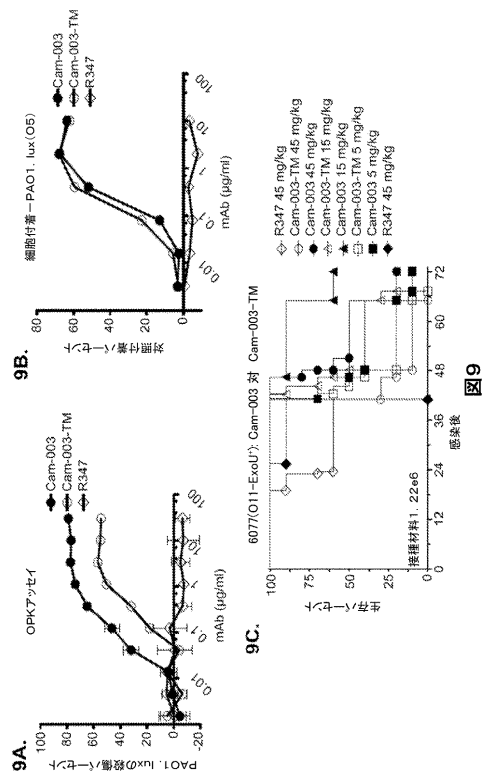


図9

【図１０－１】

エピトープ	mAb	K_D(nM)	細胞付着最大阻害 (μg/ml)	OPK EC50 (μg/ml)
クラス１	WapR-004	118.00	0.3	0.0027
	Cam-003	144.00	1.0	0.0220
	Cam-004	2100.00	>30.0	0.2771
	Cam-005	8400.00	NA	NA
クラス２	WapR-001	0.84	30.0	0.3100
	WapR-003	12.20	30.0	0.2778
	WapR-002	12.60	ND	0.3960
クラス３	WapR-016	75.00	ND	0.2417

図10A

【図１０－２】

scFv-Fc	k_{off}	k_{on}	K_D (nM)	OPK EC50
W4 RAD	1.30E-02	5.39E+04	241	0.0068
W4-M1	8.18E-02	1.69E+05	483	0.0475
W4-M7	1.28E-02	6.49E+04	196	0.0060
W4-M8	1.90E-02	1.54E+05	124	0.0056
W4-M9	1.66E-02	1.98E+05	84	0.0167
W4-M11	8.50E-03	1.25E+05	68	0.0045
W4-M12	9.10E-03	1.26E+05	72	0.0085
W4-M17	1.91E-01	9.60E+04	1990	1.3935

FIG. 10B

【図１０－３】

	実験例1	実験例2	実験例3	実験例4	平均KD(nM)
W4-RAD	57.6	147.0	139.0	131.0	118.7
W4-RAD(GL)	24.6	57.7	44.8	35.2	40.6
Psi0096	29.8	11.8			20.8
Psi00170	41.9	26.2			34.1
Psi00225	10.7	17.5			14.1
Psi00304	60.8	57.9			59.4
Psi00337	70.9	51.1			61.0
Psi00348	72.9	12.6			42.8
Psi00567	74.5	31.9			53.2
Psi00573	84.2	30.0			57.1
Psi00574	48.1	64.0			56.1
Psi00582	48.1	54.4			51.3
Psi00584	49.7	28.9			39.3
Psi00585	57.8	28.8			43.3
Psi00588	46.2	25.6			35.9
Psi00589	37.8	52.6			45.2

図10C

【図１１－１】

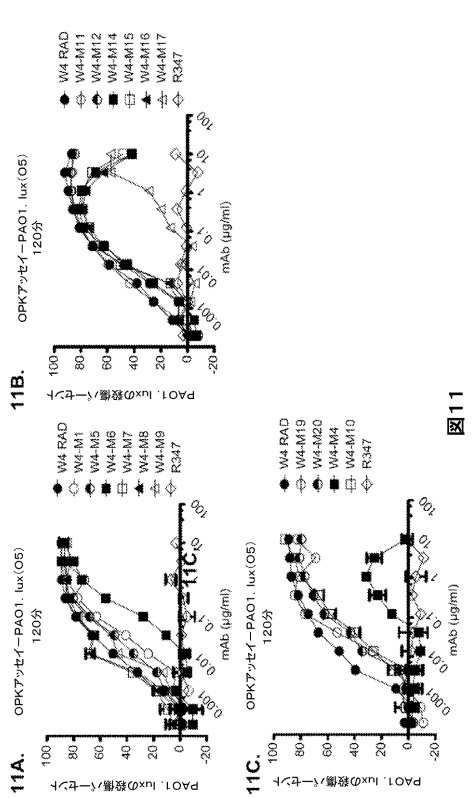


図11

【図１１－２】

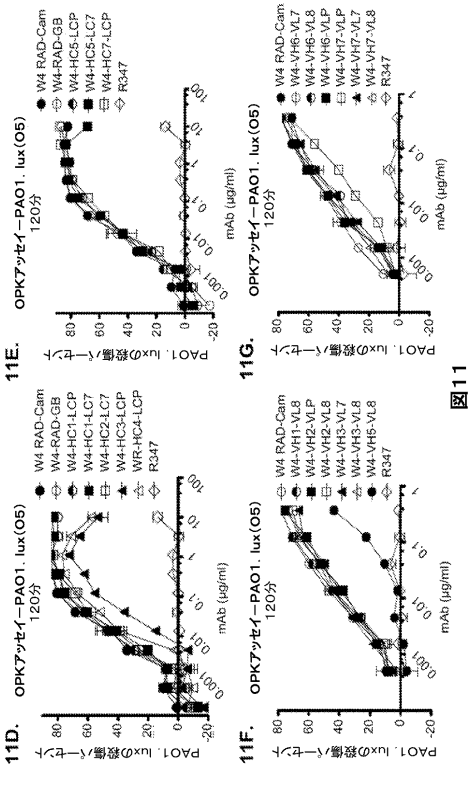


図11

【図１１－３】

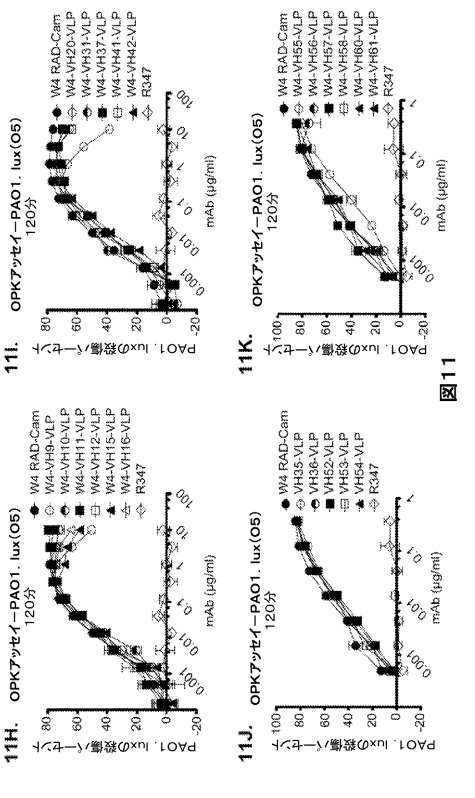


図11

【図１１－４】

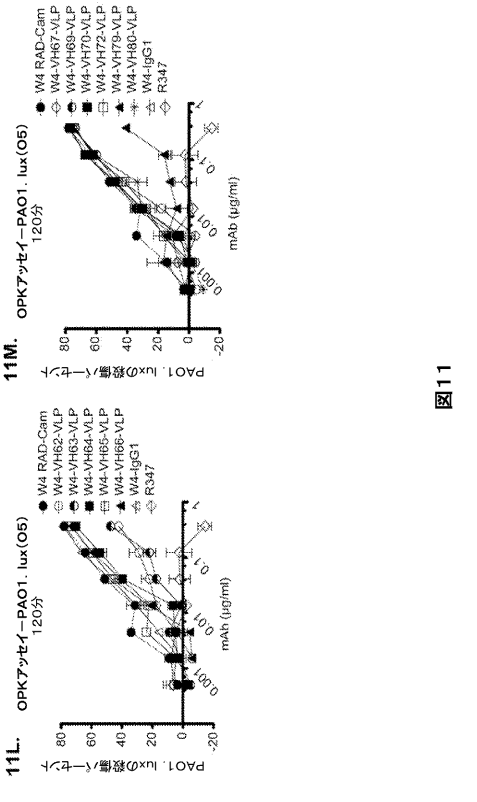


図11

【図１１－５】

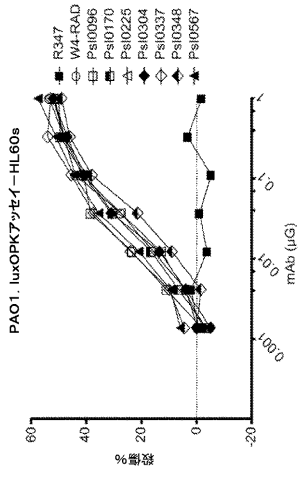


図11

【図１１－６】

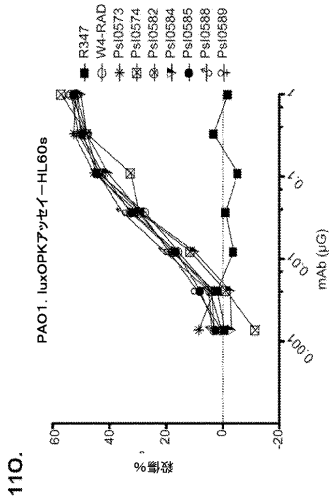


図11

【図１１－７】

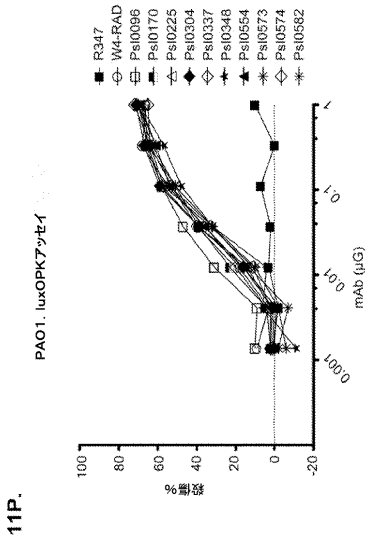


図11

【図１１－８】

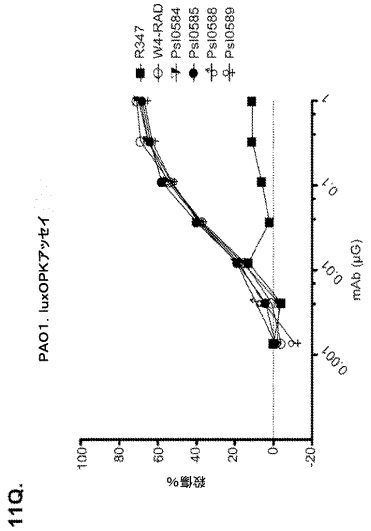


図11

【図１２－１】

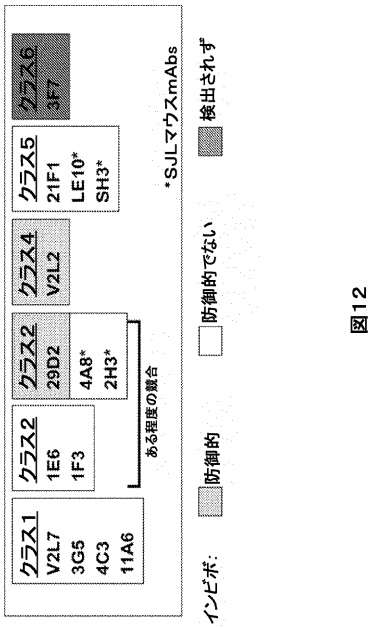


図12

【図１２－２】

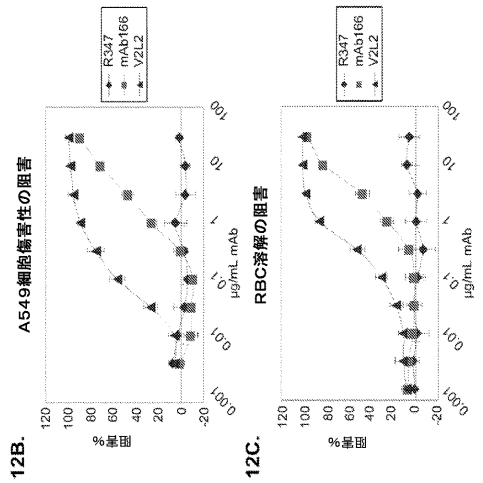


図12

【図１２－３】

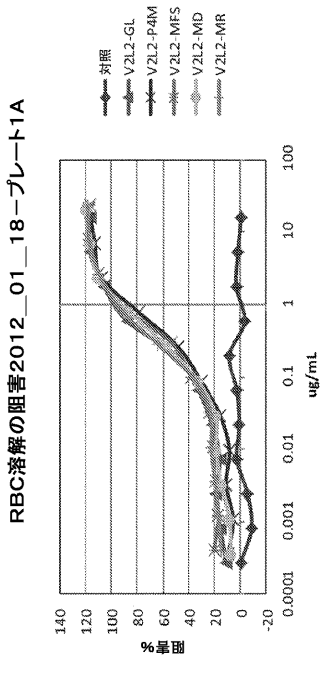


図12

【図１２－４】

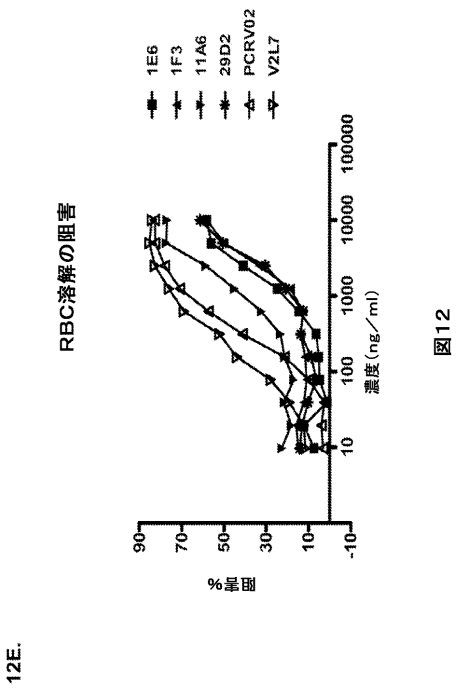


図12

【図１２－５】

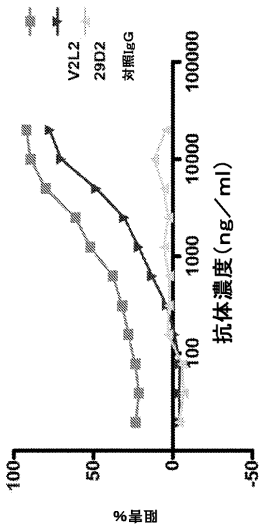


図12

【図１２－６】

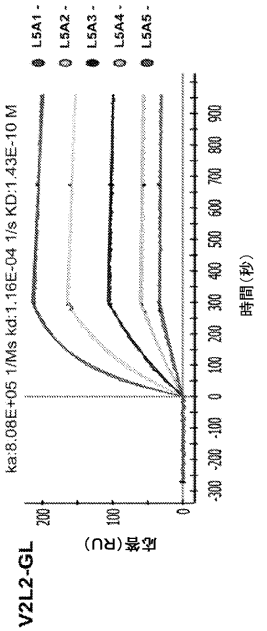
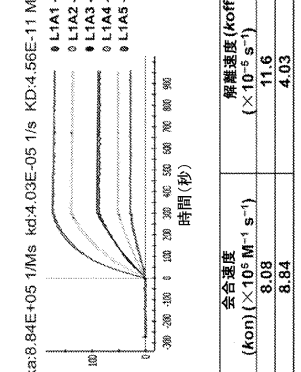


図12

【図１２－７】



クローン	会合速度 (kon) ($\times 10^5$ M^{-1} s^{-1})	解離速度 (koff) ($\times 10^{-6}$ s^{-1})	K_D (pM)
V2L2GL	8.08	11.6	143
V2L2MD	8.84	4.03	46

図12

【図１３－１】

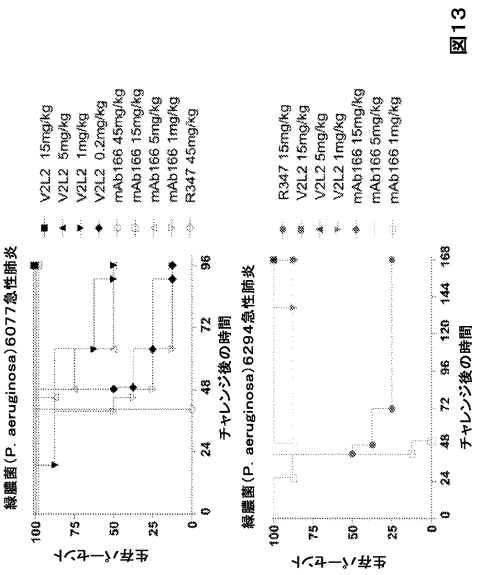


図13

【図１３－２】

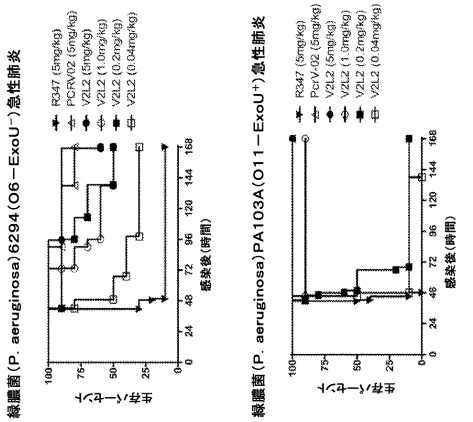


図13

【図１３－３】

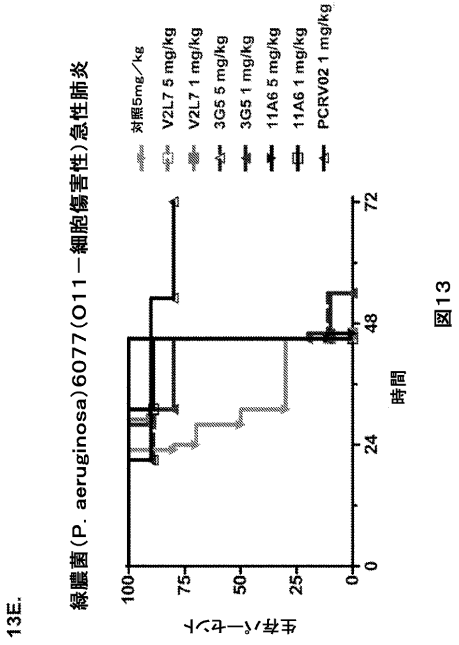


図13

【図１３－４】

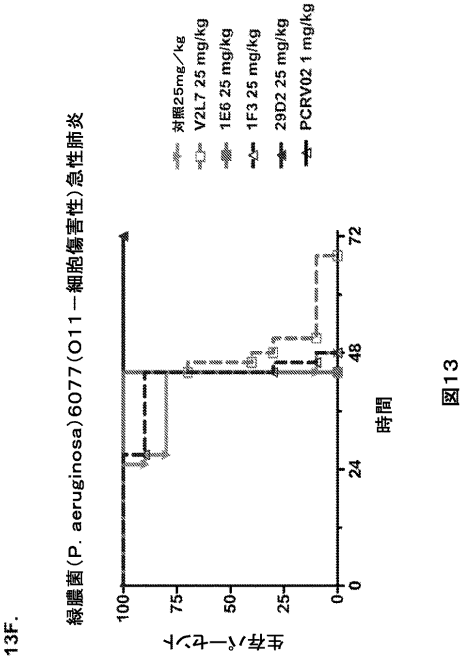


図13

【図１３－５】

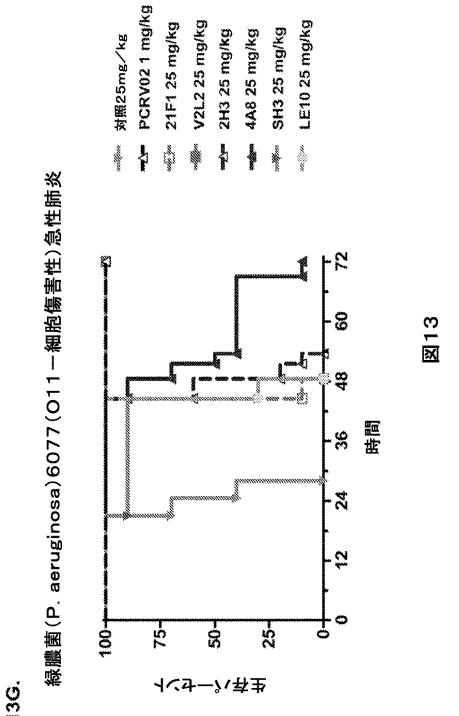


図13

【図１３－６】

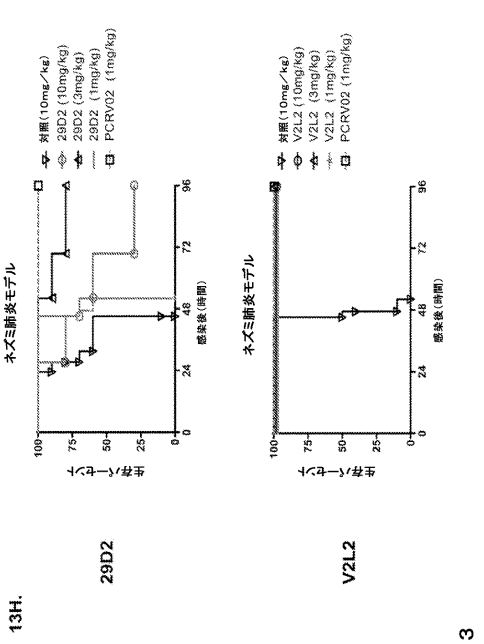


図13

【図１３－７】

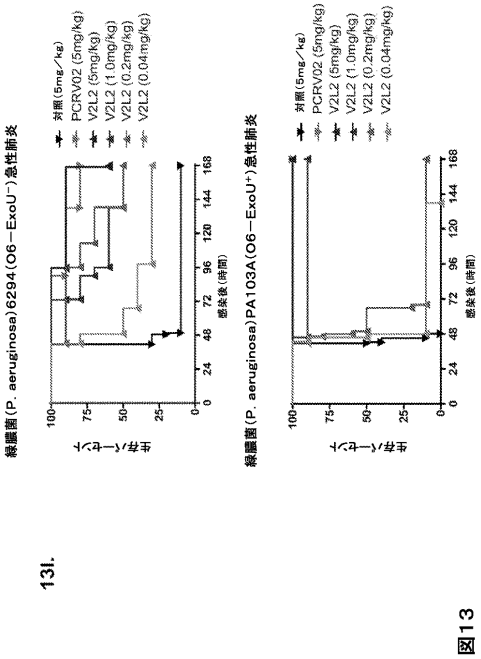


図13

【図１４－１】

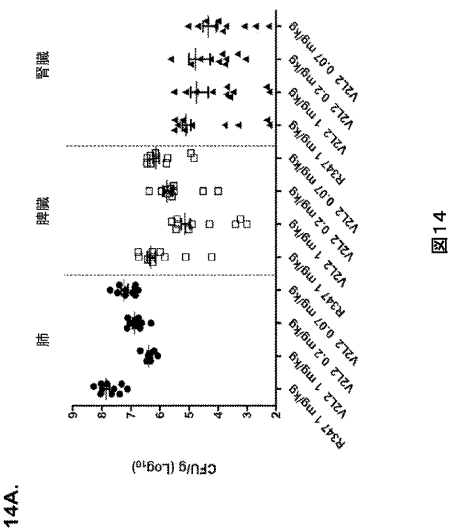


図14

【図１４－２】

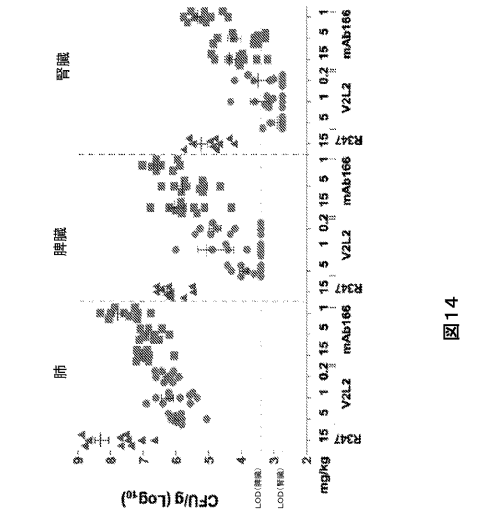


図14

【図１５】

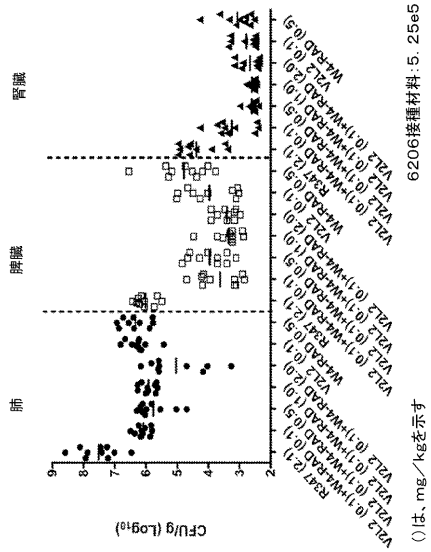
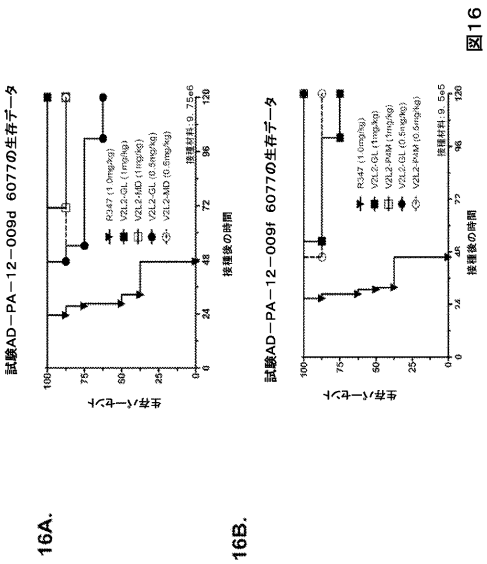


図15

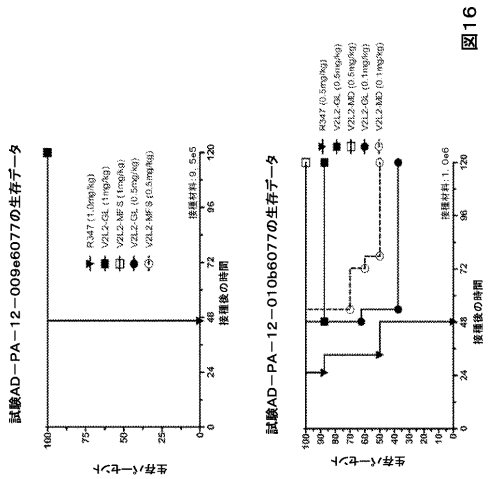
【図１６－１】



16A. 16B.

図16

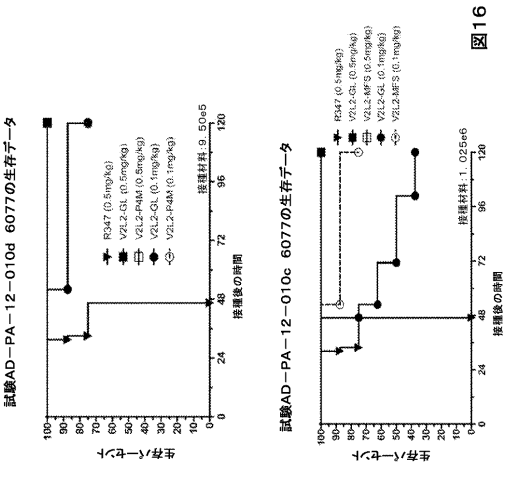
【図１６－２】



16C. 16D.

図16

【図１６－３】



16E. 16F.

図16

【図１６－４】

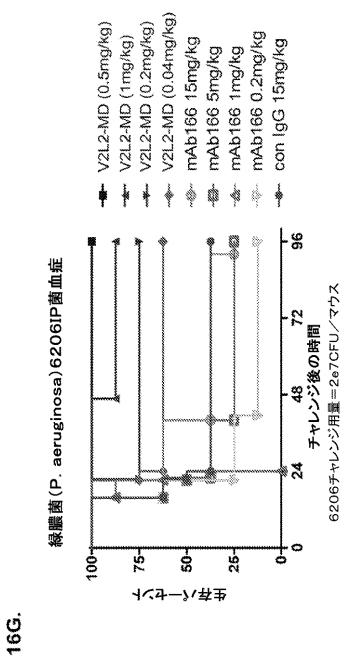


図16

【図１７】

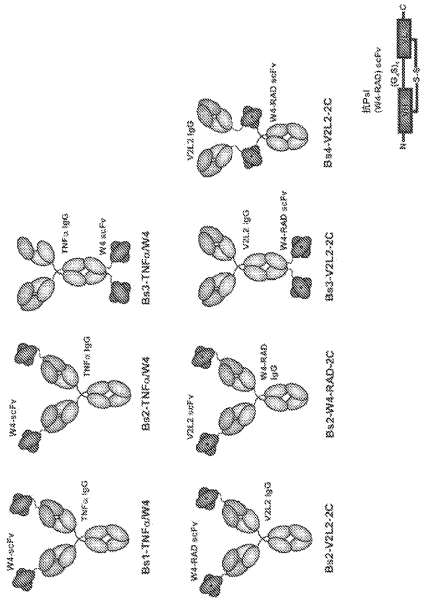


図17

【図１８】

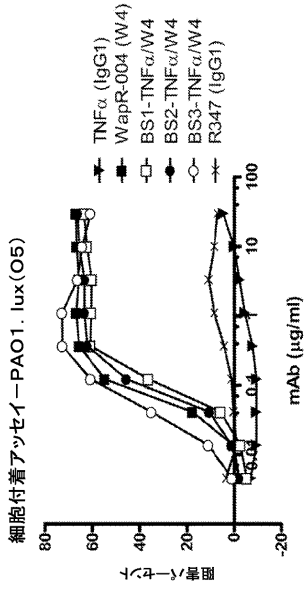


図18

【図１９－１】

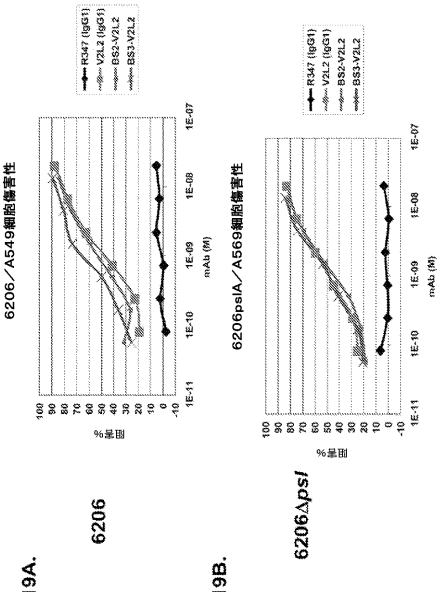


図19

【図１９－２】

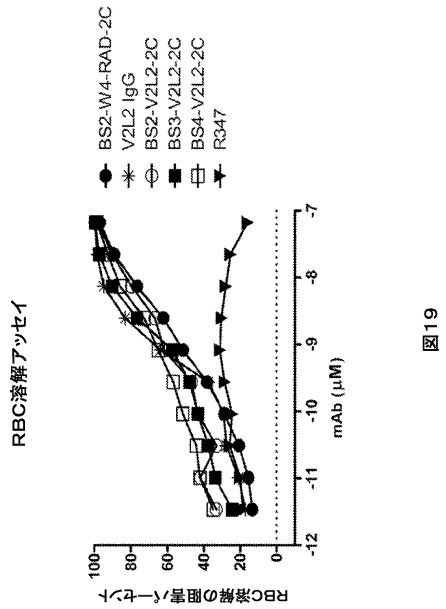


図19

【図２０－１】

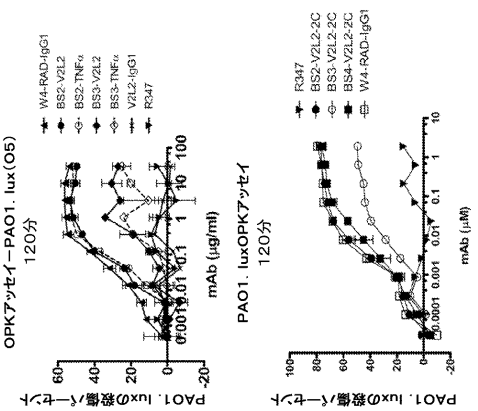
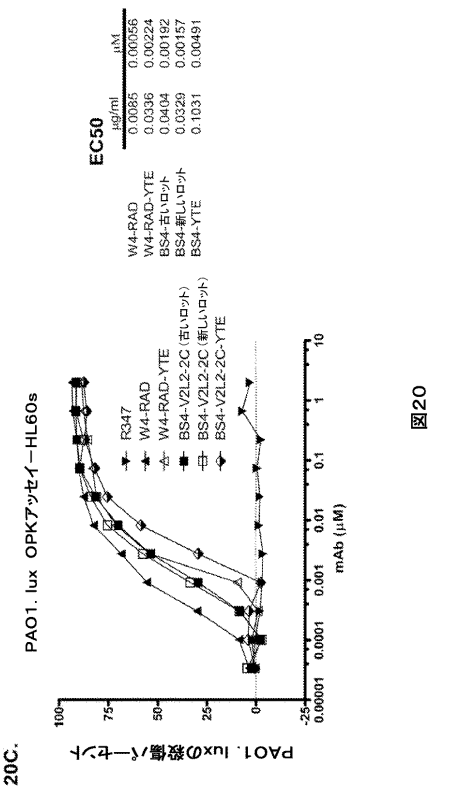


図20

【図２０－２】



EC50

	μg/ml	μM
W4-RAD	0.0085	0.00056
W4-RAD-YTE	0.0336	0.00224
BS4-古いロット	0.0404	0.00192
BS4-新しいロット	0.0329	0.00157
BS4-YTE	0.1031	0.00491

図20

【図２１－１】

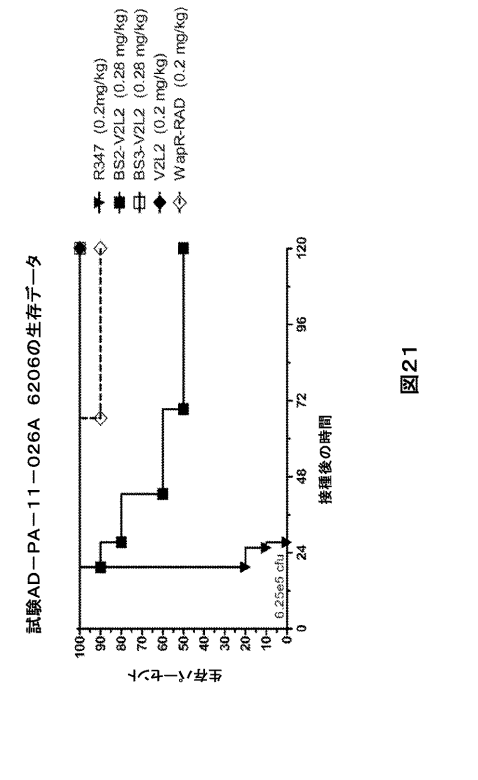
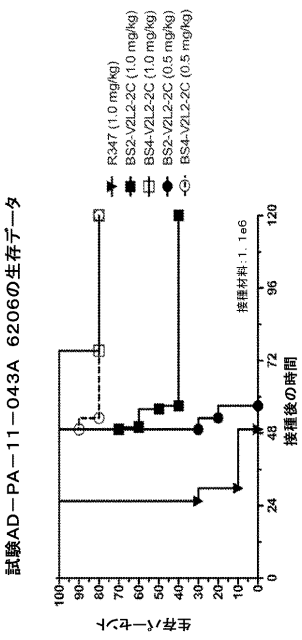


図21

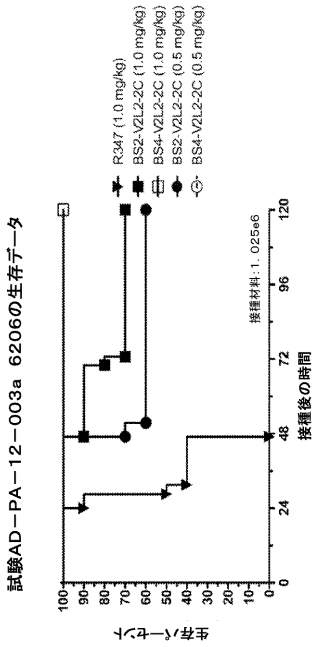
【図２１－２】



21B.

図21

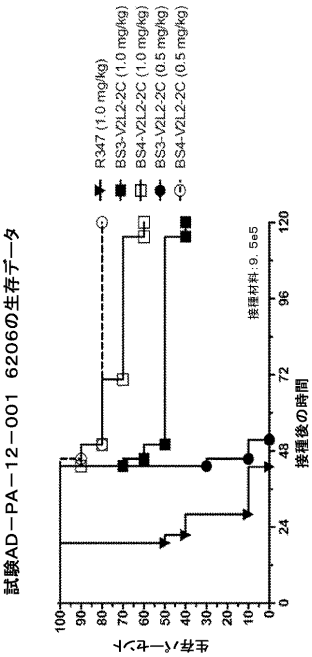
【図２１－３】



21C.

図21

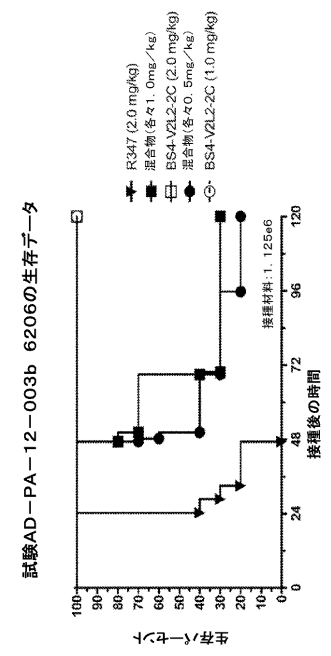
【図２１－４】



21D.

図21

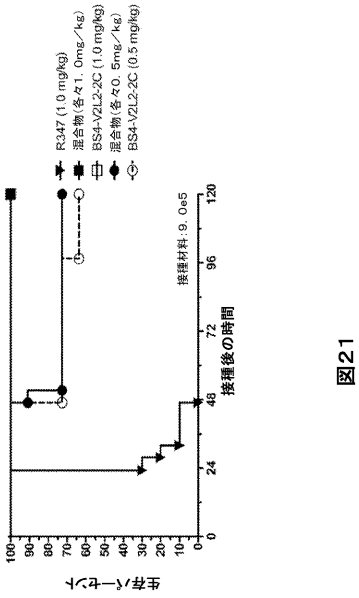
【図２１－５】



21E.

図21

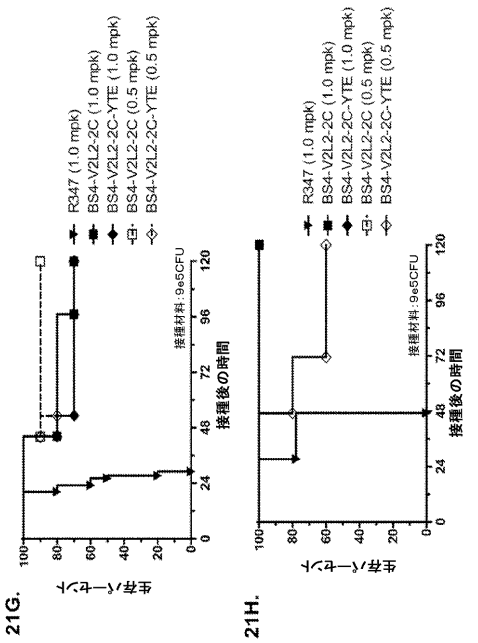
【図２１－６】



21F.

図21

【図２１－７】



21G.

21H.

図21

【図２１－８】

21I.

緑膿菌(P. aeruginosa)株6206(O11−ExoU+)によりチャレンジしたマウスにおける致死的肺炎からの防御パーセント

抗体	抗体濃度(mg／kg)						
	15	10	5	2	1	0.5	0.2	0.1
BS2-V2L2*	100 (10)	-	100 (10)	-	67 (30)	40 (50)	-	-
BS2-V2L2-2C			90 (20)		25 (20)	0 (20)	0 (10)	
BS2-W4-RAD-2C			70 (10)		10 (10)	0 (10)	0 (10)	
BS3-V2L2-2C	-	80 (10)	40 (20)	-	10 (20)	0 (20)	0 (20)	-
BS4-V2L2-2C	-	-	100 (80)	-	88 (90)	60 (80)	10 (60)	-
V2L2	-	-	80 (10)	-	20 (10)	10 (10)	0 (10)	-
W4-RAD	0 (10)	-	0 (10)	-	0 (10)	-	-	-

混合物	抗体濃度(各mAbについてのmg／kg)						
	5	2	1	0.5	0.2	0.1
W4-RAD + V2L2	-	-	100 (10)	100 (40)	78 (40)	15 (40)	-	3 (40)

感染後120時間(接種材料−1. 0e6 CFU／動物)
括弧は、動物の総数を示す
*1mg／kgおよび0. 5mg／kgは、それぞれ、1. 7および0. 55mg／kgで動物を処理した試験を含む

図21

【図２２】

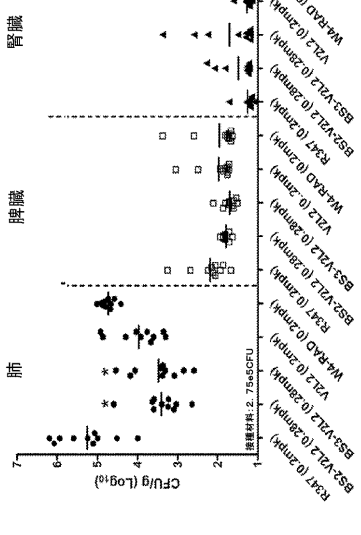
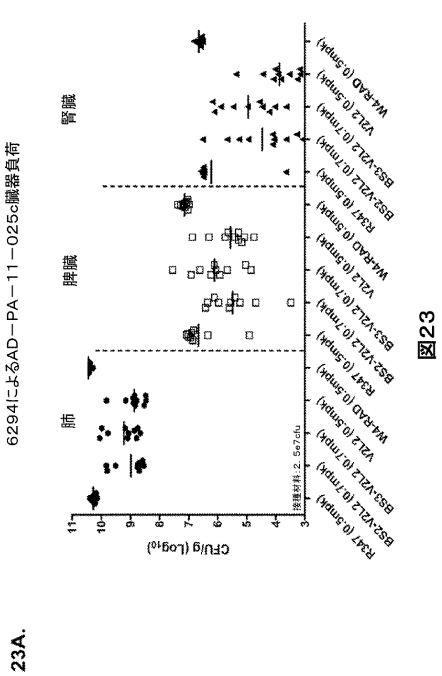


図22

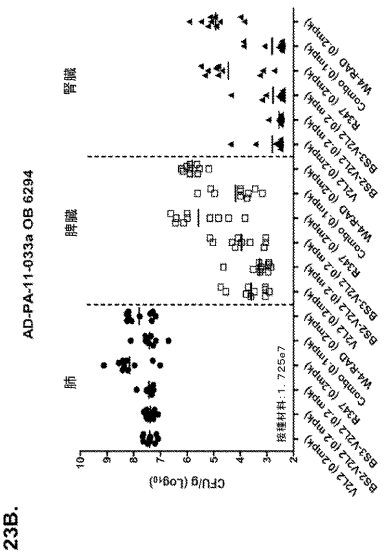
【図２３－１】



23A.

図23

【図２３－２】



23B.

図23

【図２４】

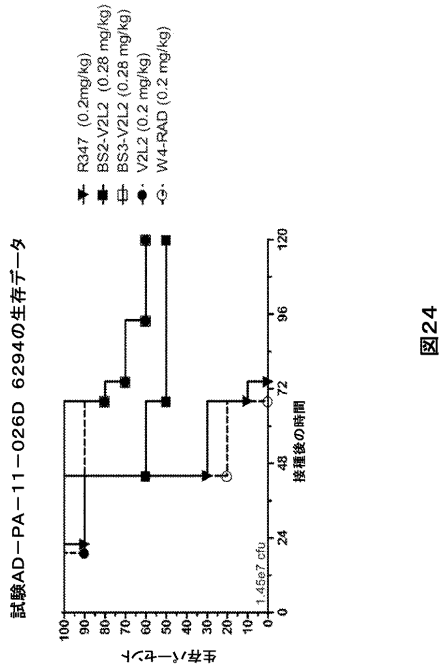
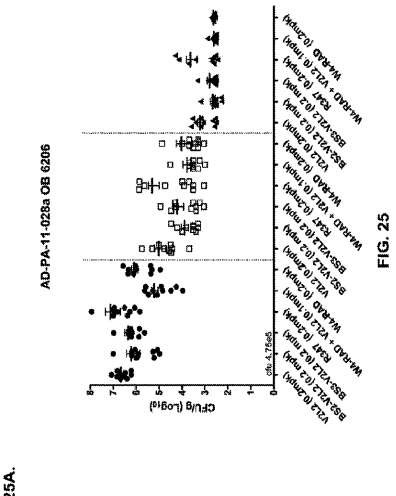


図24

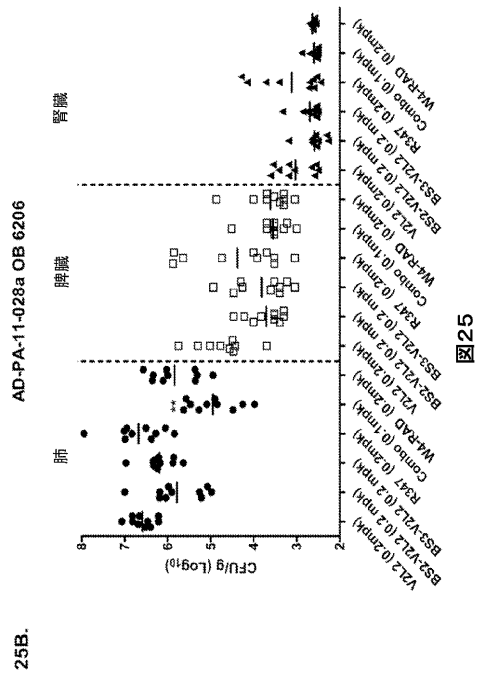
【図２５－１】



25A.

FIG. 25

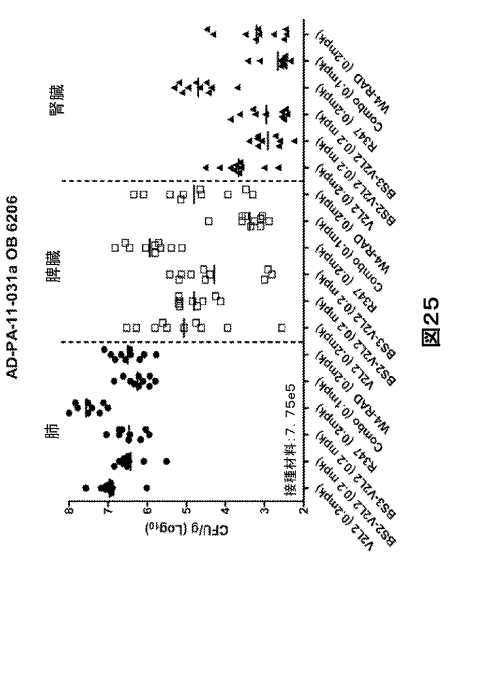
【図２５－２】



25B.

図25

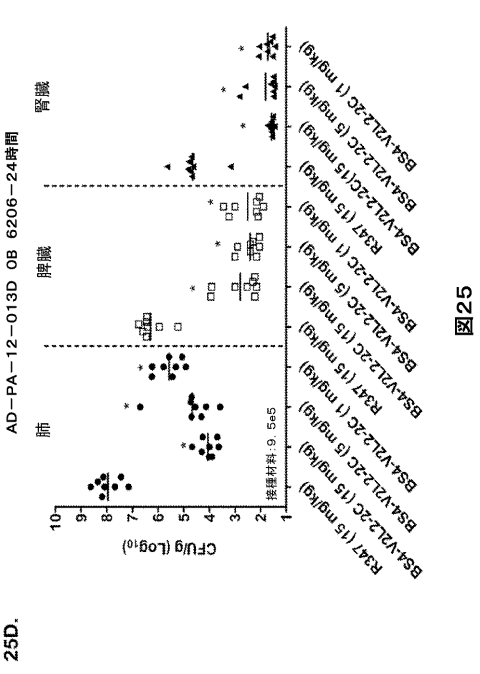
【図２５－３】



25C.

図25

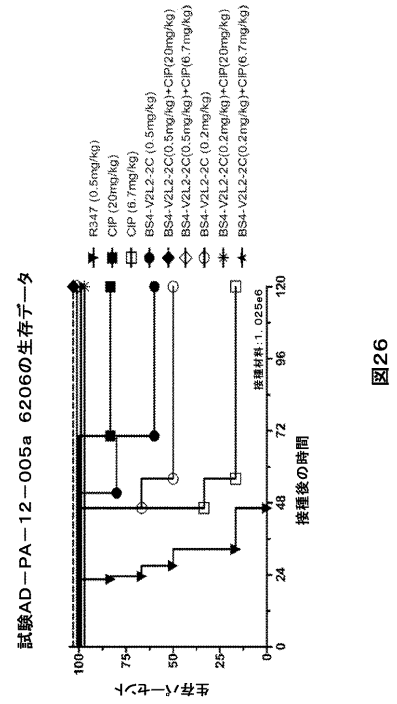
【図２５－４】



25D.

図25

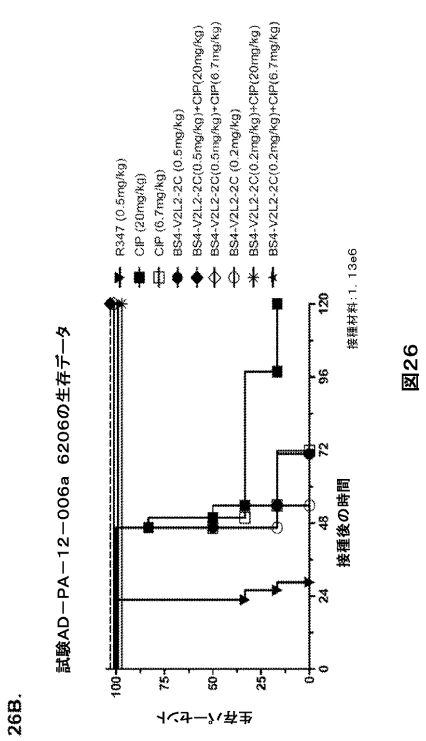
【図２６－１】



26A.

図26

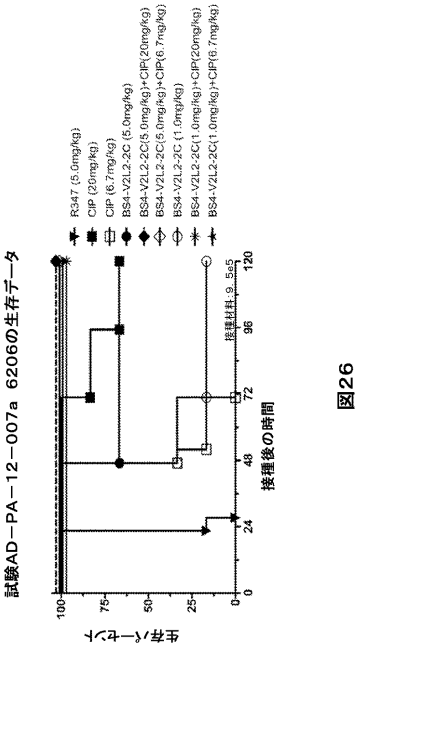
【図２６－２】



26B.

図26

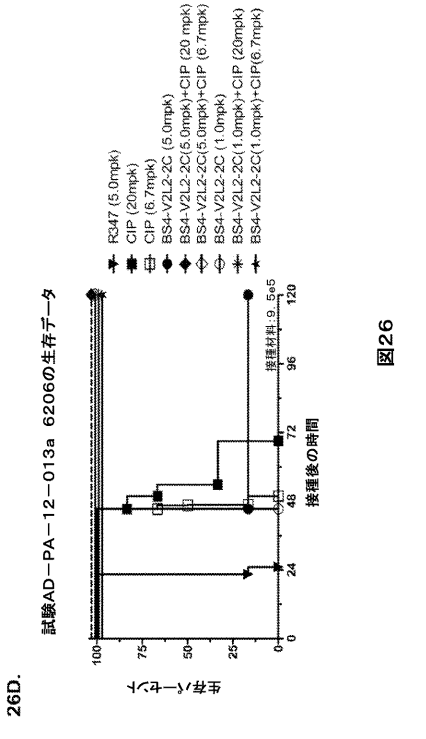
【図２６－３】



26C.

図26

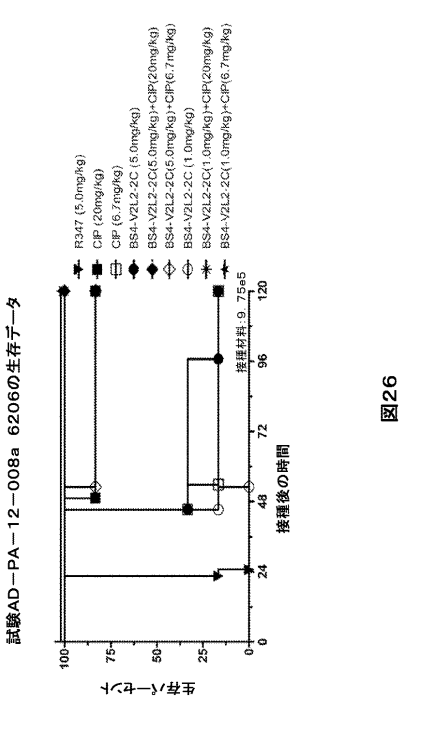
【図２６－４】



26D.

図26

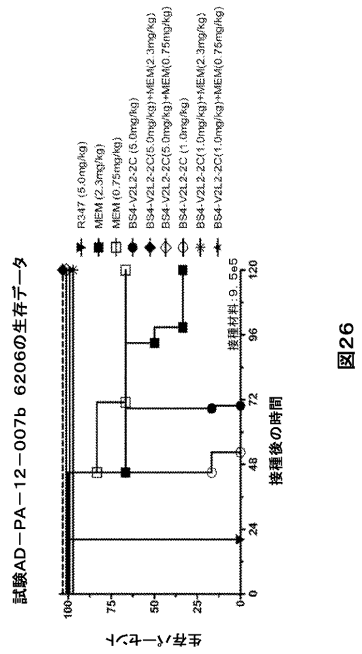
【図２６－５】



26E.

図26

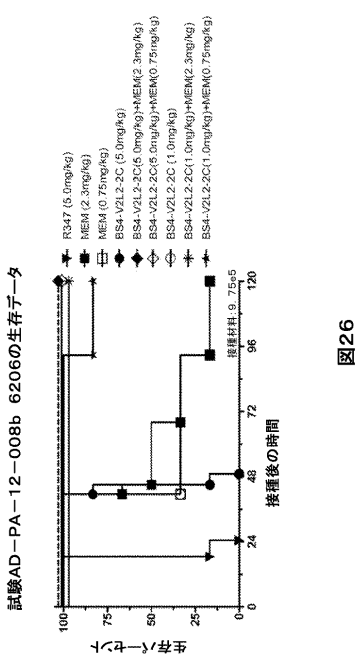
【図２６－６】



26F.

図26

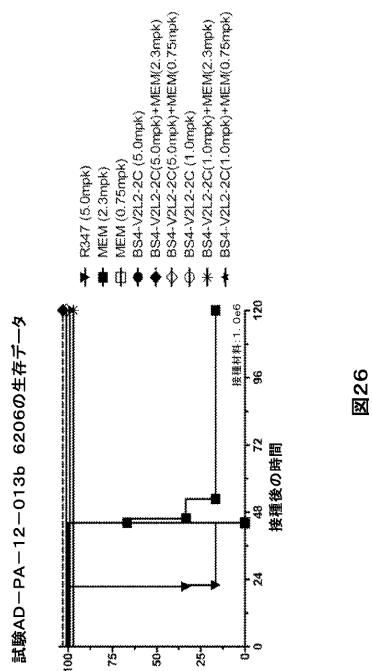
【図２６－７】



26G.

図26

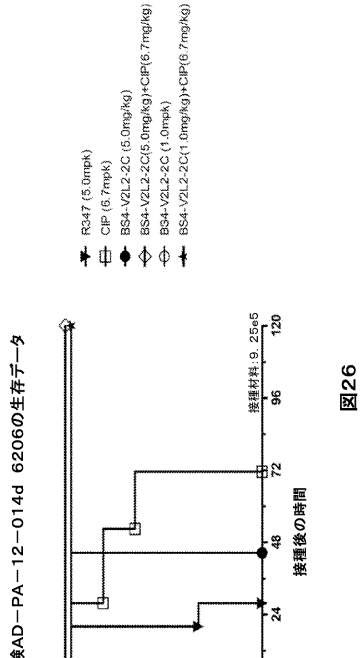
【図２６－８】



26H.

図26

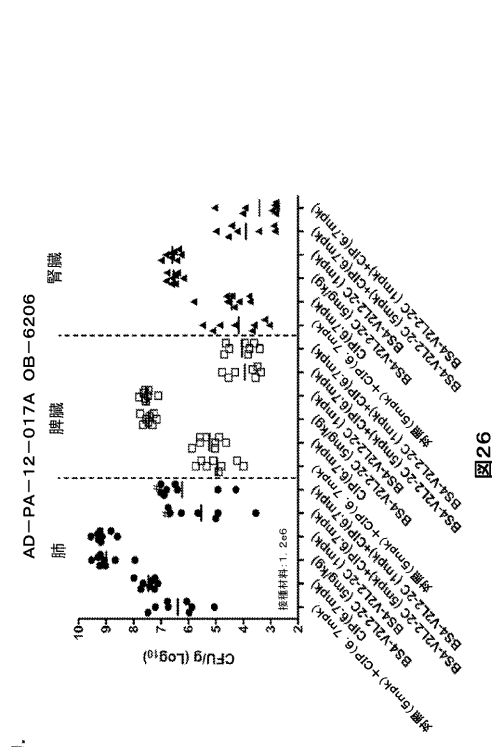
【図２６－９】



26I.

図26

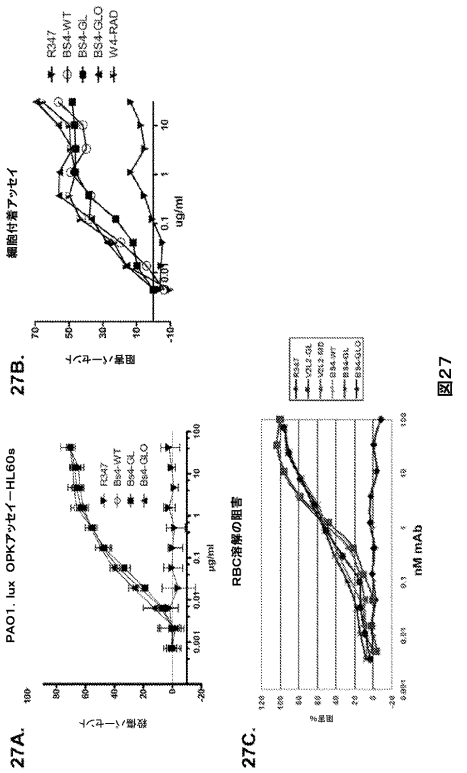
【図２６－１０】



26J.

図26

【図２７】



27A. 27B. 27C.

図27

【図２８】

28A.

予防(T＝−24時間)−感染後120時間

株／接種材料	BS4−GLO用量(mg／kg)											
	15	10	5	3	1	0.5	0.2	0.07	0.02	0.007		
6206 (1e6)	-	-	100 (60)	-	89 (60)	60 (60)	10 (60)	-	-	-		
6077 (1e6)	-	-	-	-	100 (10)	100 (10)	95.8 (26)	91.6 (26)	50 (16)	12.5 (16)		
6294 (2e7)	-	100 (5)	-	80 (5)	60 (5)	11.1 (18)	11.1 (18)	-	-	-		
PA103 (1e6)	60 (5)	-	40 (5)	-	0 (5)	-	-	-	-	-		

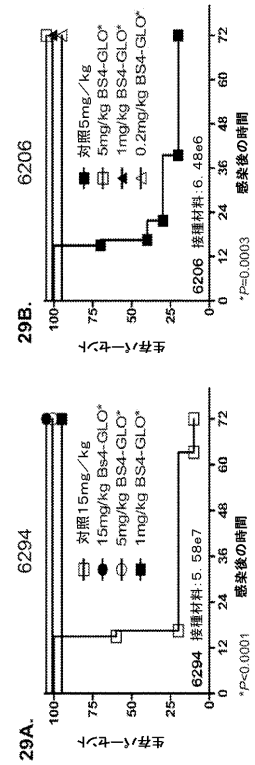
28B.

治療(T＝1時間)−感染後120時間

株／接種材料	BS4−GLO用量(mg／kg)									
	45	15	10	5	2	1	0.5	0.3	0.03	
6206 (1e6)	72.2 (18)	55.6 (18)	-	33.3 (18)	-	11.1 (18)	-	-	-	
6077 (1e6)	-	-	-	-	-	92 (22)	83.3 (12)	80 (10)	30 (16)	
6294 (2e7)	-	-	-	70 (10)	-	10 (10)	0 (10)	-	0 (10)	
PA103 (1e6)	-	0 (5)	-	0 (5)	-	0 (5)	-	-	-	

図28

【図２９】



29A. 29B.

図29

【図３０】

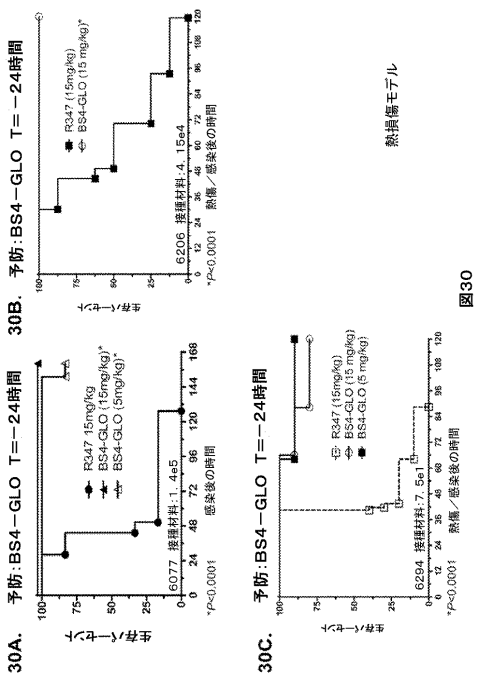


図30

【図３１】

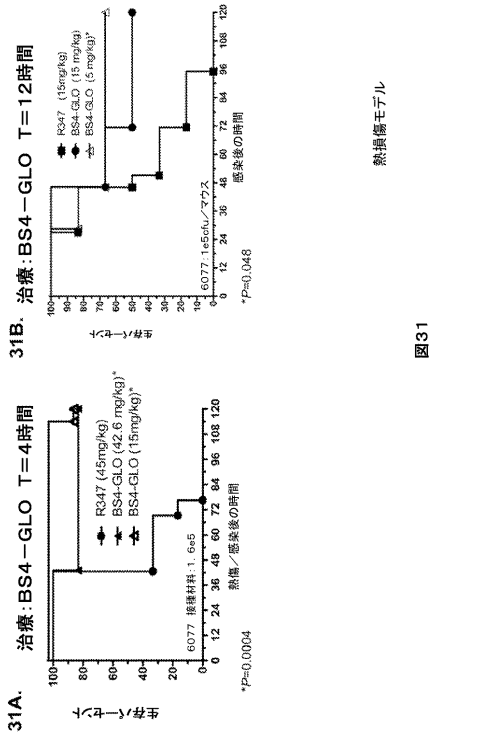


図31

【図３２】

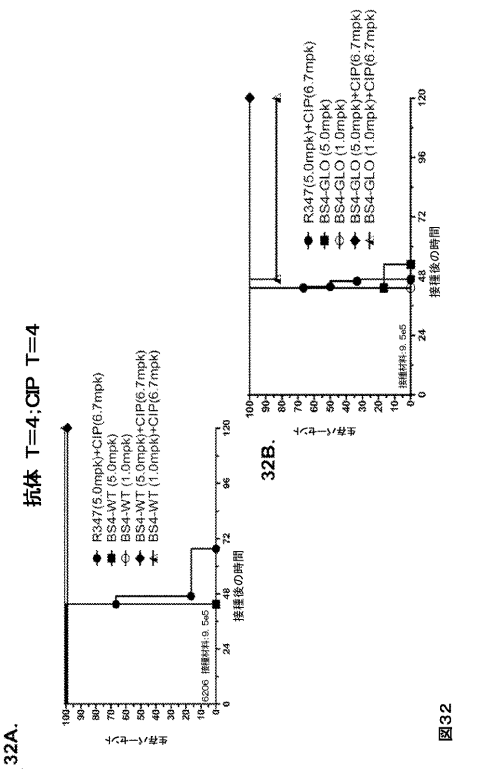


図32

【図３３】

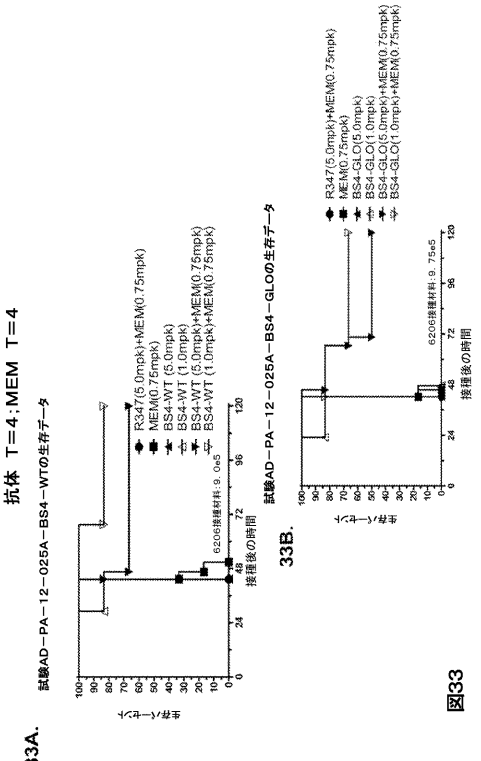
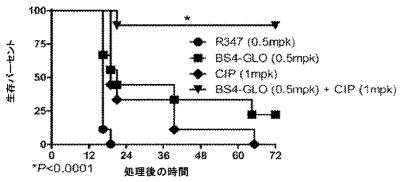


図33

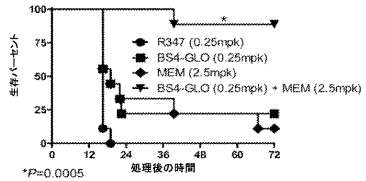
Bs4　T＝－24時間；抗生物質　T＝1時間

34A.　BS4－GLO＋シプロフロキサシン(CIP)



*P<0.0001

34B.　BS4－GLO＋メロペネム(MEM)

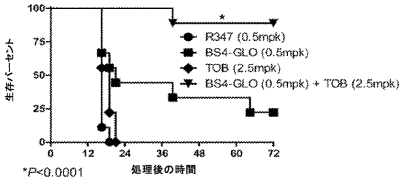


*P=0.0005

6294株(O6)

菌血症モデル

34C.　BS4－GLO＋トブラマイシン(TOB)



*P<0.0001

図34

35A.　Bs4バージョン I

軽鎖

抗PcrV軽鎖可変領域－

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（ここに表示されるκ軽鎖定常領域－はλ領域であってもよい

重鎖

抗PcrV重鎖可変領域－

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV***EPKSC***GGGGS
G GGGS 抗PslscFV
***GGGGSGGGGS*DKTHTCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒンジ領域は、***太字斜字体で下線により示す***
G4Sリンカーは、*斜字体で下線により示す*

図35

35B.　Bs4バージョンII

軽鎖

抗Psl軽鎖可変領域－RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（ここに表示されるκ軽鎖定常領域－はλ領域であってもよい
（例えば、配列番号＃を参照）

重鎖

抗Psl重鎖可変領域－ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV***EPKSC***GGGGS
G GGGS 抗PcrVscFV－
***GGGGSGGGGS*DKTHTCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒンジ領域は、***太字斜字体で下線により示す***
G4Sリンカーは、*斜字体で下線により示す*

図35

【配列表】
2015504421000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/63722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395; A61K 39/00; C07K 16/00; C12P 21/08 (2012.01)
USPC - 424/130.1
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)
USPC - 424/130.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 530/387.1, 387.3 (text search, see terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase; PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google Scholar: Anti-PcrV, PcrV, antibod*, mAb, V2L2
GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 218-223

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0272736 A1 (BAER, et al.) 28 October 2010 (28.10.2010); paras [0011]; [0025]; [0029]; para [0191]	1, 2, 8
A	US 2011/0150896 A1 (NUMATA, et al.) 23 June 2011 (23.06.2011) Figure 10: third underlined sequence in the light chain	1, 2, 8
A	US 2002/0146753 A1 (DITZEL, et al.) 10 October 2002 (10.10.2002) SEQ ID NO:19, Figure 4A, paras [0007], [0008]	1, 2, 8
A	US 2010/0150939 A1 (BLANCHETOT, et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) SEQ ID NO:529, paras [0154], [0159]	1, 2, 8
A	US 2008/0095775 A1 (LEWIS, et al.) 24 April 2008 (24.04.2008) SEQ ID NO:489, para [0157]	1, 2, 8
A	US 2003/0232387 A1 (LU) 18 December 2003 (18.12.2003) SEQ ID NO:30, Figure 4B, para [0021]	1, 2, 8
A	US 2008/0131423 A1 (MORI, et al.) 05 June 2008 (05.06.2008) Abstract, SEQ ID NO:27, Table 1: clone D1	1, 2, 8
A	US 2010/0166768 A1 (SLEEMAN, et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) Abstract, SEQ ID NO:112, para [0026]	1, 2, 8
A	WO 2010/107778 A1 (Mizel, et al.) 23 September 2010 (23.09.2010)	1, 2, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 March 2013 (06.03.2013)	25 MAR 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/63722

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 9-14, 21-28, 33-34, 36-38 and 42-73
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
- Please see extra sheet for Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2 and 8, restricted to SEQ ID NOs: 218-223

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/63722

Continuation of:
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group I+: claims 1-8, 31-32 and 35, drawn to an isolated binding molecule or antigen binding fragment thereof that specifically binds Pseudomonas PcrV, which comprises:
(a) a heavy chain CDR1 comprising SYAMN (SEQ ID NO: 218), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a heavy chain CDR2 comprising AITISGITAYYTDSVKG (SEQ ID NO: 219), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and a heavy chain CDR3 comprising EEFLPGTHYYYGMDV (SEQ ID NO: 220), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions;
(b) a light chain CDR1 comprising RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 221), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; a light chain CDR2 comprising SASTLQS (SEQ ID NO: 222), or a variant thereof comprising 1, 2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; and a light chain CDR3 comprising LQDYNYPWT (SEQ ID NO: 223), or a variant thereof comprising 1,2, 3, or 4 conservative amino acid substitutions; or combinations of
(a) and (b). The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 218-223 (Claims 1, 2 and 8). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

Group II+: claims 15-20, 29-30 and 39-41, drawn to a bispecific antibody comprising a binding domain that binds to Pseudomonas Psl and a binding domain that binds to Pseudomonas PcrV. The first invention is restricted to SEQ ID NOs: 11-12 and 216-217 (Claims 15-20, 29, 39-41). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional formula(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general 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 inventions of Group I+ do not include the inventive concept of a bispecific antibody, as required by Group II+.

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of an isolated binding molecule or antigen binding fragment thereof that specifically binds Pseudomonas PcrV. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2011/0150896 A1 to Numata et al. (hereinafter 'Numata'). Numata discloses an isolated binding molecule or antigen binding fragment thereof that specifically binds Pseudomonas PcrV (para [0006]-[0011]). Further, Numata discloses a bispecific antibody comprising a binding domain that binds to Pseudomonas PcrV (para [0070] and [0076], Diabody), but does not specifically teach that the second binding domain comprising a binding domain that binds to Pseudomonas Psl. Mizel et al. (WO 2010/107778 A1) provides an effective Pseudomonas aeruginosa vaccine to induce antigen-specific IgG that exhibits a high degree of functional activity (pg 2, ln 33-36) comprising a flagellin adjuvant and a Pseudomonas areuginosa antigen (pg 3, ln 1-8) such as PcrV (pg 9, ln 14-25 and pg 17, ln 8-12) and Psl polysaccharide (pg 3, ln 16-17 and 31-36, pg 18, ln 26-31). Mizel teaches that Psl is implicated in biofilm formation (pg 18, ln 26-31) and important virulent factor in P. aeruginosa-induced lung inflammation in CF patient (pg 1, ln 19-35). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have selected Psl as the second binding domain of the bispecific antibody of Numata, because Mizel teaches that multivalent vaccine comprising PcrV and Psl is effective in preventing and/or treating infection in CF patients (pg 2, ln 28-30). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Groups I+ and II+ is the specific sequences recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among recited sequences. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI				テーマコード（参考）
C12N 5/10		*(2006.01)*	C12N	5/00	101		4C086
C12N 15/09		*(2006.01)*	C12N	15/00		A	4H045
A61K 39/395		*(2006.01)*	A61K	39/395		N	
A61P 31/04		*(2006.01)*	A61K	39/395		D	
A61K 38/00		*(2006.01)*	A61P	31/04			
A61K 45/00		*(2006.01)*	A61K	37/02			
A61P 43/00		*(2006.01)*	A61K	45/00			
A61K 31/496		*(2006.01)*	A61P	43/00	121		
A61K 31/407		*(2006.01)*	A61K	31/496			
A61K 49/00		*(2006.01)*	A61K	31/407			
G01N 33/53		*(2006.01)*	A61K	49/00		A	
G01N 33/569		*(2006.01)*	G01N	33/53		D	
C12P 21/08		*(2006.01)*	G01N	33/569		D	
			C12P	21/08			

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(74)代理人 100157956
弁理士 稲井 史生
(72)発明者 アントニオ・ディジャンドメニコ
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ポール・ウォレナー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 チャールズ・ストーバー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ブレット・セルマン
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ラルフ・ミンター
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング、メドイミューン・リミテッド内
(72)発明者 サンドリン・ギラード
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング、メドイミューン・リミテッド内
(72)発明者 スティーブン・ラスト
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディン

グ、メドイミューン・リミテッド内
(72)発明者 ムラデン・トミッチ
アメリカ合衆国１９３４１ペンシルベニア州エクストン、アサートン・ドライブ１１７番
(72)発明者 ビグネシュ・ベンカトラマン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング、メドイミューン・リミテッド内
(72)発明者 リーナ・バーキー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 リ・ペン
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 メリッサ・ダムシュローダー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 パルタ・チョウドゥリー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ナザレノ・ディマーシ
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ライアン・フレミング
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ビンヤム・ベザベー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 チャンシュウ・ガオ
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ゴッドフリー・レイニー
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内
(72)発明者 ツイホア・ガオ
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メドイミューン・ウェイ、メドイミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA50 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02
DA05 DA11 DA12 EA04 GA11 HA01 HA09 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA42X AA42Y AA57X AA58X AA87X AB01 AC14 BA01 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA07 AA19 BA01 BA08 BA21 BA23 CA04 MA02
NA05 NA14 ZB352 ZC751
4C085 AA13 AA14 BA19 BB11 CC07 CC21 EE01 EE03 HH03 HH11
KA03 KA04 KA27 KA29 KA37
4C086 AA01 AA02 BC50 CC08 GA07 GA12 MA02 MA04 NA05 ZB32
ZB35 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015504421A5	公开(公告)日	2015-12-24
申请号	JP2014540196	申请日	2012-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司 Medoiμ有限公司排放		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司，有限责任公司 MedImmune公司有限公司		
[标]发明人	アントニオディジャンドメニコ ポールウォレナー チャールズストーバー ブレットセルマン ラルフミンター サンドリンギラード スティーブンラスト ムラデントミッチ ビグネシュベンカトラマン リーナバーキー リペン メリッサダムシュローダー パルタチョウドゥリー ナザレノディマーシ ライアンフレミング ビンヤムベザベー チャンシュウガオ ゴッドフリーレイニー ツイホアガオ		
发明人	アントニオ·ディジャンドメニコ ポール·ウォレナー チャールズ·ストーバー ブレット·セルマン ラルフ·ミンター サンドリン·ギラード スティーブン·ラスト ムラデン·トミッチ ビグネシュ·ベンカトラマン リーナ·バーキー リ·ペン メリッサ·ダムシュローダー パルタ·チョウドゥリー ナザレノ·ディマーシ ライアン·フレミング ビンヤム·ベザベー チャンシュウ·ガオ ゴッドフリー·レイニー ツイホア·ガオ		
IPC分类号	C07K16/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 A61K39/395 A61P31/04 A61K38/00 A61K45/00 A61P43/00 A61K31/496 A61K31/407 A61K49/00 G01N33/53 G01N33/569 C12P21/08		

CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/507 A61P43/00 A61P31/04 C07K16/1214 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/33 C07K2317/622 C07K2317/734 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/40 C07K2317/56 C07K2317/565
FI分类号	C07K16/12.ZNA C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.A A61K39/395.N A61K39/395.D A61P31/04 A61K37/02 A61K45/00 A61P43/00.121 A61K31/496 A61K31/407 A61K49/00.A G01N33/53.D G01N33/569.D C12P21/08
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA09 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA42X 4B065/AA42Y 4B065/AA57X 4B065/AA58X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA19 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KA37 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC50 4C086/CC08 4C086/GA07 4C086/GA12 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB32 4C086/ZB35 4C086/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二
优先权	61/556645 2011-11-07 US 61/625299 2012-04-17 US 61/697585 2012-09-06 US
其他公开文献	JP6182152B2 JP2015504421A

摘要(译)

本公开涉及包含抗假单胞菌Psl和PcrV结合分子的组合疗法和相关组合物，用于预防和治疗假单胞菌感染。