

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534000
(P2004-534000A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1		テーマコード (参考)
C07K 16/12	C 07 K 16/12	Z N A	4 B 0 2 4
A61K 9/12	A 61 K 9/12		4 B 0 6 4
A61K 9/72	A 61 K 9/72		4 C 0 7 6
A61K 39/395	A 61 K 39/395	R	4 C 0 8 5
A61P 31/04	A 61 P 31/04		4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 127 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-571513 (P2002-571513)	(71) 出願人	502334308 インヒビテックス インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成14年1月28日 (2002.1.28)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アルファ レッタ ウエストサイド パークウェイ 8 9 9 5
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月23日 (2003.7.23)	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/002296	(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路
(87) 國際公開番号	W02002/072600	(74) 代理人	100086427 弁理士 小原 健志
(87) 國際公開日	平成14年9月19日 (2002.9.19)	(74) 代理人	100099988 弁理士 斎藤 健治
(31) 優先権主張番号	60/264,072	(74) 代理人	100105821 弁理士 藤井 淳
(32) 優先日	平成13年1月26日 (2001.1.26)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/274,611		
(32) 優先日	平成13年3月12日 (2001.3.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/298,413		
(32) 優先日	平成13年6月18日 (2001.6.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 C L F A タンパク質に対するモノクローナル抗体および感染症を処置または予防することにおける使用の方法

(57) 【要約】

C l f A タンパク質へ結合し得、そして S t a p h y l o c o c c a l a u r e u s 由来の C l f A タンパク質の結合サブドメインまたは結合フラグメント (そのフィブリノゲン結合ドメインからの活性フラグメントタンパク質 (C l f 4 0 タンパク質、 C l f 3 3 タンパク質、または C l f A N 3) を含む) から生成されるモノクローナル抗体が提供され、これは、 S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s のようなブドウ球菌属細菌からの感染を処置または予防することにおいて有用であり得る。さらに、医療機器は、それらが汚染される、またはさらに感染を広める可能性を低減または排除するために、本発明のモノクローナル抗体を用いて処理され得る。特に、本発明の抗体は、 S . a u r e u s C l f A のフィブリノゲンまたはフィブリノヘ結合する能力を弱めるまたは妨げるこ 10 とによって、宿主細胞への細菌の付着を阻害することができ、それゆえブドウ球菌発明 (s t a p h y l o c o c c a l i n v e n t i o n s) を処置または予防する方法において利用され得るので、有益である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

S. aureus 由来の C1fA タンパク質に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体が *S. aureus* C1f40 タンパク質、*S. aureus* C1f33 タンパク質、および *S. aureus* C1fA N3 タンパク質からなる群より選択されるタンパク質に対して惹起される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体がヒトまたは動物における *S. aureus* 感染を処置または予防する、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記抗体が、フィブリノゲン (fibrinogen) またはフィブリン (fibrin) へのブドウ球菌属細菌 (staphylococcal bacteria) の結合を阻害する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、ヒトまたは動物における非経口、経口、鼻腔内、皮下、エアゾール化 (aerosolized) または静脈内投与に適している、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、マウス、キメラ、ヒト化およびヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される型に属する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

抗体が、単鎖モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

S. aureus C1fA タンパク質へ結合する抗体と同一の結合特異性を有する抗体フラグメントを含む請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 2 および配列番号 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質に対して惹起される請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

タンパク質が配列番号 1 または配列番号 3 に記載の核酸配列、またはその縮重体によってコードされるアミノ酸配列を有する、請求項 9 に記載の抗体。

30

【請求項 11】

配列番号 6 、配列番号 10 、配列番号 14 および配列番号 18 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する可変軽鎖を有する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号 5 、配列番号 9 、配列番号 13 、配列番号 17 およびその縮重体からなる群より選択される配列に従う核酸配列によってコードされる可変軽鎖配列を有する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 13】

配列番号 8 、配列番号 12 、配列番号 16 および配列番号 20 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖を有する請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 14】

配列番号 7 、配列番号 11 、配列番号 15 、配列番号 19 からなる群より選択される配列を有する核酸、およびその縮重体によってコードされる可変重鎖を有する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の抗体を含む単離抗血清。

【請求項 16】

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

50

。

【請求項 17】

前記結合を検出するための手段が前記抗体へ連結される検出可能な標識を含む、請求項16に記載の診断キット。

【請求項 18】

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

【請求項 19】

有効量の請求項1の抗体および薬学的に許容されるビヒクリ(vehicule)、担体、または賦形剤を含む、 *S. aureus* の感染を処置又は予防するための、薬学的組成物 10。

【請求項 20】

有効量の請求項1に記載の抗体をヒトまたは動物患者へ投与することを包含する、 *S. aureus* の感染を処置または予防する方法。

【請求項 21】

S. aureus C1f40タンパク質、 *S. aureus* C1f33タンパク質、および *S. aureus* N3タンパク質からなる群より選択される *S. aureus* 由来の単離C1fAタンパク質の免疫原性量をヒトまたは動物へ投与することを包含する、免疫応答を誘導する方法。

【請求項 22】

S. aureus C1f40、C1f33およびC1fA N3からなる群より選択される単離タンパク質を、抗-C1fA抗体を含むと疑われるサンプルへ添加すること、および抗体が該サンプルへ添加される単離タンパク質へ結合したか否かを決定することを包含する、C1fAタンパク質に対するモノクローナル抗体を同定する方法。

【請求項 23】

配列番号2のアミノ酸配列へ結合する能力を有する請求項1に記載の単離抗体。

【請求項 24】

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

【請求項 25】

C1f40タンパク質、C1f33タンパク質およびC1fA N3領域からなる群より選択される *S. aureus* 由来C1fAタンパク質のAドメインからの単離活性フラグメント。

【請求項 26】

生理学的に許容される抗生物質をさらに含む請求項1に記載の単離抗体。

【請求項 27】

可変重鎖が配列 R Y S V H を含む C D R 1 領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 28】

可変重鎖が配列 M I W G G G N T D Y N S A L K S を含む C D R 2 領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 29】

可変重鎖が配列 K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A を含む C D R 1 領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 30】

可変軽鎖が配列 W A S T R E S を含む C D R 2 領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 31】

可変軽鎖が配列 H Q Y L S S Y T を含む C D R 3 領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 32】

S. aureus の複数の株に対して交差反応性(cross-reactive)である、請求項1に記載の単離抗体。

20

30

40

50

【請求項 3 3】

可変軽鎖が配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3 4】

可変軽鎖が配列番号 17 に記載の配列を有する核酸またはその縮重体によってコードされる、請求項 6 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3 5】

可変重鎖が配列番号 20 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3 6】

可変重鎖が配列番号 19 に記載の配列を有する核酸またはその縮重体によってコードされる、請求項 6 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3 7】

S. aureus C1fA タンパク質の A ドメインを認識する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願へのクロスリファレンス

本出願は、U.S. 仮出願 Ser. No. 60/308,116 (2001年7月30日提出)、Ser. No. 60/298,413 (2001年6月18日提出)、Ser. No. 60/274,611 (2001年3月12日提出)、および Ser. No. 60/264,072 (2001年1月26日提出) の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、概して、凝集因子 A (clumping factor A) (または C1fA) に対して生成された抗体、staphylococcus aureus またはその他のブドウ球菌属細菌において発現される表面局在タンパク質に、そして特に、C1fA タンパク質に対するモノクローナル抗体およびその活性フラグメントまたはそのフィブリノゲン (fibrinogen) 結合ドメインからのタンパク質 (C1f40、C1f33 または C1fA N3 のような)、さらにフィブリノゲンまたはフィブリン (fibrin) への C1fA タンパク質の結合を阻害することおよび S. aureus 感染を処置または予防することにおけるそれらの使用に関する。

【背景技術】**【0003】**

発明の背景

宿主の首尾よいコロニー形成は、動物およびヒトにおいて、ほとんどの微生物が感染を引き起こすのに必要とされるプロセスである。微生物の付着 (adhesion) は、最終的に疾患を引き起こし得る一連の出来事において、最初の重要なステップである。病原性微生物は、細菌の表面上に存在する特定の付着素 (adhesins) を介して、カテーテル、人工関節、および脈管移植片のような宿主組織または血清のならされ埋入された生体材料に結合することによって、その宿主にコロニー形成する (colonized)。MSCRAMM™s (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) は、宿主の細胞外マトリックスにおける異なる成分を認識し且つ特異的に結合する細胞表面付着素のファミリーである。一旦細菌が付着に成功し、そして宿主組織にコロニー形成すると、それらの生理機能が劇的に変化し、そして損傷を与える成分 (トキシンおよび蛋白加水分解酵素のような) が分泌される。さらに、付着性細菌はしばしば、バイオフィルムを生成し、そして迅速に主要な抗生物質の殺傷効果に対してより耐性になる。

【0004】

S. aureus は、皮膚損傷 (創傷感染、インペチゴ、およびフランケルのような) から生命を脅かす状態 (肺炎、敗血性関節炎 (septic arthritis)、敗血

症、心内膜炎、および生体材料に関連する感染を含む)までにわたる感染スペクトルをもたらす。 *S. aureus* は、特定の宿主組織成分への微生物付着を促進するよう、個別にか、または協調的に働き得る、異なる M S C R A M M のレパートリーを発現することが知られている。 M S C R A M M は、抗体(特に、モノクローナル抗体)による免疫学的攻撃のための優れた標的を提供する。適切な抗-M S C R A M M 高親和性抗体の存在は、両刃の攻撃(*double-edged attack*)を有すし、先ず、抗体が微生物付着を予防し、そして次に、増大したレベルの M S C R A M M 抗体が、オプソニン食作用殺傷(*opsonophagocytic killing*)を介して、体からの微生物の迅速な除去を促進する。

【0005】

10

しかしながら、有効なモノクローナル抗体を生成するための *S. aureus* 由来の M S C R A M MTM (C 1 f A タンパク質のような) に関する情報を特定および利用するという問題が、異なる M S C R A M MTM の結合特性における多様性ならびに細菌感染の伝染力および蔓延(*spread*)におけるそれらの役割ゆえに、依然として残されている。特に、 C 1 f A へ結合することができ、且つフィブリノゲンまたはフィブリンへのブドウ球菌 C 1 f A の結合を阻害するまたは弱める(*impair*)のに役立つことができるゆえにブドウ球菌感染を予防または処置する方法において有用である、モノクローナル抗体を開発することが問題であった。従って、とりわけ細菌のフィブリノゲンまたはフィブリンへ結合する能力を阻害することまたは弱めることによって多種多様なブドウ球菌感染を首尾良く処置および予防するモノクローナル抗体および他の組成物を開発するという感染疾患の分野において非常に所望される課題が残っている。 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

発明の要旨

従って、本発明の目的は、 *S. aureus* C 1 f A タンパク質へ結合し、それゆえブドウ球菌感染を処置または予防するための方法において有用であり得る、モノクローナル抗体を提供することである。

【0007】

30

本発明の目的はまた、 C 1 f A を結合することができ、また *S. aureus* C 1 f A タンパク質の結合サブドメイン(C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 および C 1 f A N 3 タンパク質を含む)またはそれらの活性部分から生成され、ブドウ球菌感染に対して処置または予防する方法において利用される、モノクローナル抗体を提供することである。

【0008】

本発明の目的はまた、フィブリノゲンまたはフィブリンへの C 1 f A タンパク質の結合を阻害することまたは弱めることによってブドウ球菌属細菌の付着を予防するのに有用であり得る、 C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 および C 1 f A N 3 タンパク質に対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0009】

40

本発明のさらなる目的は、 C 1 f A タンパク質のフィブリノゲン結合 A ドメインを認識することができ、それゆえブドウ球菌感染を処置、予防、同定、または診断する方法において有用であり得る、抗体および抗血清を提供する事である。

【0010】

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

【0011】

本発明の目的はまた、さらに、 *S. aureus* からの感染に対して保護し、そして他の型のブドウ球菌感染に対して交差反応性を成し遂げることができる、 C 1 f A に対するモノクローナル抗体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

50

【0012】

これらおよび他の目的は、ブドウ球菌感染の予防および処置のための、C1fAタンパク質および／またはその結合サブドメイン（タンパク質C1f40、C1f33およびC1fAN3を含む）に対するモノクローナル抗体の単離および使用を包含する本発明によって、提供される。よって、本出願は、C1fA（実質的に全てのS.aureus株によって発現される表面局在タンパク質）に対するモノクローナル抗体の発見、生成、キャラクタライゼーション、およびin vivo評価を記載する。本明細書中で示されるデータは、C1fAおよびその活性サブドメイン（C1f40、C1f33およびN3のような）に対するモノクローナル抗体がS.aureus感染に対する処置または保護（protect）のために使用され得ることを明確に実証する。

10

【0013】

よって、本発明に記載の抗-C1fAモノクローナル抗体の発見および単離は、フィブリノゲンまたはフィブリソーゲンへのC1fAタンパク質の結合を弱めるか、または阻害し、それによってブドウ球菌感染を処置または予防するのに有用であるように使用され得る。本発明に従って、単離C1fAタンパク質サブドメインおよびそれらに対して惹起される抗体に基づく好適な組成物およびワクチン、ならびにそれらの使用のための方法が、さらに企図される。

【0014】

これらの実施形態ならびに本開示発明の精神および範囲内での他の変更および改変は、本明細書および／または本明細書中に引用される参考文献（参照によって援用されるものの全て）の範囲から、当業者に容易に明らかになるであろう。

20

【0015】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明に従って、S.aureusのC1fAタンパク質へ結合し得るモノクローナル抗体が提供され、これらのモノクローナル抗体は、本発明によって単離され且つ精製された活性な結合サブドメインタンパク質（C1f40、C1f33、およびC1fAN3領域を含む）に対して惹起された。本発明に従うモノクローナル抗体は、S.aureus感染を処置または予防することが示された。

【0016】

以前に、McDevittら（McDevitt et al., 1994, Mol. Microbiol. 11, 237-248）は、92kDa表面タンパク質（S.aureus株Newman由来）を同定し、細菌のフィブリノゲン-依存凝集の原因であることを実証し、これは、U.S.Pat.No.6,177,084（本明細書中で参考として援用される）において開示される。遺伝子（C1fAと称される）は、クローン化および配列決定され、そしてU.S.Pat.No.6,008,341（これもまた、参考として援用される）において開示され、そしてこの領域（DNA配列から予測されるような896アミノ酸タンパク質を表す）は、フィブリノゲンコーティングされた表面（fibrinogen-coated surfaces）への細菌の付着を媒介し、それゆえC1fAは、MSCRAMMTMと同定される。C1fA遺伝子は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン（transmembrane domain）、細胞壁へのアンカードメイン（anchoring domain）および細胞アンカードメインをNH₂-末端領域A（特有の520残基セグメントからなる）と結合させる領域（Rと称される）からなる。このMSCRAMMのフィブリノゲン-結合ドメインは、領域A内の218残基セグメントに局在された。McDevittら（McDevittら、1995, Mol. Microbiol. 16, 895-907）は、C1fAの領域Aが凝集表現型（the clumping phenotype）に十分であることを示した。

40

【0017】

しかしながら、誰もS.aureus C1fAタンパク質に対するモノクローナル抗体を生成できなかった。従って、本発明は、C1fAタンパク質またはその結合サブドメイ

50

ン (C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 および C 1 f A N 3 タンパク質を含む) へ結合することができ、それゆえブドウ球菌感染を予防または処置するのに有効な量において使用される場合にこのような感染を予防または処置する方法において有用であり得る、単離および / または精製モノクローナル抗体に関する。これらのモノクローナル抗体は、例えば、 K o h l e r および M i l s t e i n , N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 (1 9 7 5) の方法、または当該分野において知られる他の適切な方法を用いて生産され得、さらに、当該分野において周知であろう方法においてキメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体として調製され得る。なお、さらに、モノクローナル抗体は、単鎖 (軽鎖または重鎖のような) から調製され得、さらに全抗体の結合特性 (例えば、特異性および / または親和性) を維持する抗体の活性フラグメントから調製され得る。活性フラグメントによって、 C 1 f A タンパク質に結合する完全な抗体と同じ結合特異性を有する抗体フラグメントが意味され、また本明細書中において使用される場合の用語「抗体」は、該フラグメントを含むことを意味する。さらに、本発明に従うモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて調製される抗血清もまた企図され、当業者によって認識される多くの適切な方法において調製され得る。

【 0 0 1 8 】

上記に示されるように、 C 1 f A に対する抗体は、当該分野において周知である多数の適切な方法 (モノクローナル抗体を作製するために利用され得る十分に確立された上記の K o h l e r および M i l s t e i n 法のような) において調製され得る。1つのこのような方法において、マウスは、腹腔内に、週一回、長期間、精製された組換え C 1 f A タンパク質、または単離サブドメインタンパク質 (C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 および C 1 f A N 3 のような) 、またはそれらの活性部分を注射され、次いで、精製 C 1 f A に対する反応性を測定するために、免疫されたマウスから採取された血液の検査が行われる。 C 1 f A に対して反応性のマウスの同定が行われた後に、マウス脾臓から単離されたリンパ球がマウスミエローマ細胞へ融合され、 C 1 f A に対する抗体に対して陽性なハイブリドーマが作製され、次いでそれらは単離および培養され、その後精製およびアイソタイピング (i s o t y p i n g) される。

よって、本発明に従うモノクローナル抗体を作製するために、これらは、当該分野において周知の慣用方法を用いて、組換的に調製される C 1 f A 、 C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 または N 3 タンパク質を用いて作製されることが好ましい。例えば、1つのこのような方法は、組換えタンパク質およびペプチドをクローニングおよび発現するための発現ベクターとして E . c o l i 発現ベクター p Q E - 3 0 の使用を採用する。

【 0 0 1 9 】

P C R を用いて、 C 1 f A の A ドメイン (C 1 f 4 0 では A A 4 0 - 5 5 9 を意味し、または C 1 f 3 3 では A A 2 2 1 - 5 5 0 を意味する) を S . a u r e u s N e w m a n ゲノム D N A から増幅し、そして 6 個のヒスチジン残基を含む組換え融合タンパク質の発現を可能にする E . c o l i 発現ベクター P Q E - 3 0 (Q i a g e n) へのサブクローニングした。その後、このベクターを E . c o l i 株 A T C C 5 5 1 5 1 中に形質転換し、 1 5 - リットル発酵槽中で光学密度 (O D ₆₀₀) 0 . 7 まで増殖させ、そして 0 . 2 m M のイソプロピル - 1 - ベータ - D - ガラクトシド (I P T G) と共に 4 時間誘導した。 A G テクノロジーズ中空糸アッセンブリー (A G T e c h n o l o g i e s h o l l o w - f i b e r a s s e m b l y) (孔サイズ 0 . 4 5 μ m) を使用して細胞を回収し、そしてこの細胞ペーストを - 8 0 で凍結した。 F r e n c h P r e s s @ 1 1 0 0 p s i による 2 回の通過を使用して、細胞を 1 × P B S (1 0 m L の緩衝液 / 1 g の細胞ペースト) 中で溶解した。溶解させた細胞を 1 7 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間スピンドラウンし、細胞片を除いた。 0 . 1 M N i C l ₂ でチャージした 5 - m L H i T r a p C h e l a t i n g (P h a r m a c i a) カラム上に、上清を通した。負荷後、 5 カラム容量の 1 0 m M T r i s 、 pH 8 . 0 、 1 0 0 m M N a C l (B u f f e r A) を用いて、このカラムを洗浄した。 3 0 カラム容量以上の 1 0 m M T r i s 、 pH 8 . 0 、 1 0 0 m M N a C l 、 2 0 0 m M イミダゾール (B u f f e r B)

10

20

30

40

50

の 0 - 100 % グラディエントを使用して、タンパク質を溶出した。C1f40 または C1f33 は ~13 % Buffer B (~26 mM イミダゾール) にて溶出した。280 nm における吸光度をモニターした。C1f40 または C1f33 を含む画分を 1 x PBS 中で透析した。

【0020】

その後、このタンパク質をエンドトキシン除去プロトコールにかけた。このプロトコールの間使用された緩衝液は、5 - mL Mono - Q セファロース (Pharmacia) カラム上を通過させることによって、エンドトキシンフリーにされた。タンパク質を 4 x 15 mL 管の間で均等に分けた。Buffer A を用いて、それぞれの管の容量を 9 mL にした。1 mL の 10 % Triton X-114 をそれぞれの管に加え、4 で 1 時間、回転させながらインキュベーションした。相を分離するため、管を 37 の水浴中に置いた。管を 2,000 rpm で 10 分間スピンドダウンし、そしてそれぞれの管の上部水相を回収し、さらに界面活性剤抽出を繰り返した。二度目の抽出物からの水相を混合し、そして残留する界面活性剤を除くために、0.1 M NiCl₂ でチャージした 5 - mL IDA chelating (Sigma) カラム上を通過させた。3 カラム容量の Buffer B でこのタンパク質を溶出する前に、このカラムを 9 カラム容量の Buffer A で洗浄した。この溶出物は、5 - mL Detoxyigel (Sigma) カラム上を通され、そしてその通過液 (flow-through) を回収し、そしてカラムに再アプライ (reapply) した。二度目の通過からの通過液を回収し、1 x PBS 中で透析した。マウスに投与する前に、この精製産物を濃度、純度、およびエンドトキシンレベルについて分析した。

【0021】

この方法において得られる C1f40 についてのアミノ酸配列は、本明細書中で配列番号 2 として示され、そして配列番号 1 に記載されるような配列を有する核酸、またはその縮重体によってコードされる。さらに、この方法において得られる C1f33 についてのアミノ酸配列は、本明細書中で配列番号 4 として示され、そして配列番号 3 に記載されるような配列を有する核酸、またはそれらの縮重体によってコードされる。

【0022】

本発明に従って、C1fA タンパク質またはその活性サブドメイン (C1f40, C1f33 または C1fA N3 のような) の単離の後に、これらのタンパク質に対するモノクローナル抗体が多くの適切な方法によって生産され得る。例えば、1 つの好ましい方法において、マウスモノクローナル抗体のパネルを生成するために、精製 C1f40 または C1f33 タンパク質を使用した。簡単には、Balb/C マウスの群は、溶液状態か、または以下に記載されるようなアジュバントと混合された 50 g の C1f40 または C1f33 タンパク質の一連の皮下免疫を受けた

【0023】

【表 1】

注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
一次	0	50	皮下	フロイント完全
ブースト #1	14	5(C1f40) 10(C1f33)	静脈内	PBS

最終ブーストの三日後、脾臓を除き、細かく切って (teased) 単一細胞懸濁液にし、そしてそのリンパ球を回収した。その後、そのリンパ球を SP2/0 - Ag14 骨髄腫細胞株 (ATCC #1581) へ融合した。細胞融合、続くプレーティングおよび栄養補給 (feeding) は、Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2.) からの the Production of Monoclonal Antibodies protocol に従って行った。

10

20

30

40

50

その後、標準的なELISAアッセイを用いて、この融合から生成された全てのクローンを特異的抗-C1f40抗体産生についてスクリーニングした(screened)。陽性のクローンを拡大し(expanded)、さらに試験した。当初、15個の陽性クローンを同定し、さらなるキャラクタライゼーションのために、限界希釈(limiting dilution)によってクローン化した。単一細胞クローンを、直接結合ELISA(CLF40へのフィブリノゲン結合の阻害を測定するための改良されたELISA)において活性、フローサイトメトリーによって全細菌細胞結合性、そしてビアコア(Biacore)解析によってC1f40結合に対する親和性、について試験した。

【0024】

ウサギIgG(50mg/ml)でタンパク質A部位をブロッキングした後、*S. aureus*細菌サンプル(Barnett株、67-0、ATCC#25923およびATCC#49230)を回収し、洗浄し、そして2mg/mlの濃度のMab 13-2、12-9、13-1またはPBS単独(コントロール)と共にインキュベートした。抗体を用いるインキュベーションの後、細菌細胞を、検出抗体として働くヤギ-F_(ab')₂-抗マウス-F_(ab')₂-FITCと共にインキュベーションした。抗体標識化の後、細菌細胞は、蛍光発光(励起:488、発光:570)を分析するために、FACScaliberフローサイトメーターを通してアスピレーションされた(aspirated)。各細菌株について、10,000の事象(event)が収集され、そして測定された。

【0025】

高結合96ウェルプレート(high binding 96 well plates)を1mg/ml C1f40 PBS(pH7.4)溶液でコーティングし、覆い、そして室温で2時間インキュベーションした。次いで、プレートをPBS、0.05%Tween20で洗浄し、1時間、室温にて、1%BSA溶液を用いてブロッキングした(blocked)。洗浄の後、モノクローナル抗体上清を添加し、そしてプレートを1時間、室温にて、インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、そして0.1mg/mlヒトフィブリノゲン溶液を各ウェルへ添加した。プレートを一時間、室温にて、インキュベートし、さらに洗浄した。ヒツジ抗-フィブリノゲンAP複合体を1:750希釈率で、PBS、0.05%Tween20、0.1%BSA中に添加し、そして1時間、室温にてインキュベートさせた。次いで、プレートを洗浄し、pNPP(現像溶液(developing solution))を1mg/mlの最終濃度で添加した。プレートを15-30分間37°でインキュベートし、そして結果を、Perkin Elmer HTS 7000 Bio-Assay readerを用いて、405nmで読み取り、そして分析した。

【0026】

動力学的分析は、ソフトウェア中に入っているリガンドキャプチャ法(Ligand capture method)を用いて、Biacore 3000にて行った。ウサギ抗-マウス-Fc抗体(Biacore)をCM5チップにアミン結合させた(amine coupled)。次いで、分析されるモノクローナル抗体をチップ上へ通し、Fc部分へ結合させる。次に、種々の濃度のC1f40またはC1f33タンパク質をチップ表面上へ通し、そしてデータを収集した。Biacore provided Evaluation software(バージョン3.1)を用いて、K_{on}およびK_{off}を測定し、K_AおよびK_Dを計算した。

【0027】

以下のデータにおいて示されるように、C1f40またはC1f40の活性部分(N2N3またはN3領域)に対する本発明に従うモノクローナル抗体を作製するための免疫(immunization)は、異なる多様な反応性および交差反応性プロフィールを有するモノクローナル抗体を生成した。

【0028】

C1fAタンパク質の組換え型を用いる抗体の産生が好ましいけれども、抗体は、天然の単離および精製されたC1fAタンパク質または領域からも生成され得、また上記と同様

10

20

30

40

50

の方法において天然 C1fA タンパク質または活性領域を用いて、モノクローナルまたはポリクローナル抗体が生成され、このような抗体が得られ得る。なお他の慣用的な方法も、当業者によって認識されるように、組換えまたは天然精製 C1fA タンパク質またはその活性領域を用いて本発明の C1fA 抗体を生成するのに使用可能である。

【 0 0 2 9 】

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

【 0 0 3 0 】

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

【 0 0 3 1 】

抗体組成物のさらなる形態、および他の M S C R A M MTM についての組成物、方法および適用に関する他の情報もまた、概して、C1fA M S C R A M MTM に対する抗体を含む本発明に適用可能であり、例えば、米国特許 6,288,214 (H o o k l a) (本明細書中で参考として援用される) に開示される。

【 0 0 3 2 】

C1fA タンパク質またはその有効なサブドメイン (C1f40、C1f33 または N3 のような) に対して生成される本発明の抗体組成物はまた、この複合体に対する免疫原性応答を促進させるのに有効な量の好適なアジュバントを用いて投与され得る。例えば、好適なアジュバントとしては、ミョウバン（リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）（これは、ヒトにおいて広く使用される）、および他のアジュバント（サポニンおよびその精製成分 Quill A、フロイント完全アジュバント、R I B B I アジュバントおよび研究および獣医学の適用において使用される他のアジュバントのような）が挙げられ得る。さらに他の化学的に定義される調製物（ムラミルジペプチド、モノホスホリル脂質 A、リン脂質複合体（Goodman-Snitskoffら、J. Immunol. 147:410-415 (1991) によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるもののような）、プロテオリポソーム内の複合体のカプセル化（Millerら、J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992) によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるような）、および脂質小胞（NovasomeTM 脂質小胞（Micro Vescular Systems, Inc., Nashua, NH）のような）におけるタンパク質のカプセル化もまた、有用であり得る。

【 0 0 3 3 】

いずれにしても、本発明の抗体組成物は、このように、ブドウ球菌属細菌上の C1fA と宿主細胞または組織上のフィブリノゲンとの間の結合相互作用を妨げ、調節し、阻害するために、または宿主細胞または組織と結合するフィブリノゲンへ結合したブドウ球菌属細菌を追放すること（displacement）において、有用であろう。従って、本発明は、ブドウ球菌感染を予防または処置する組成物および方法を開発すること、ならびに宿主

組織および／または細胞へのブドウ球菌属細菌の結合を阻害することにおいて、特別な適用性を有するであろう。

【0034】

本発明に従って、上記のような C1fA タンパク質またはその活性サブ領域 (C1f40、C1f33、N3 のような) に対する抗体の有効量を感染の処置または予防に有効な量において投与することを包含する方法が、ブドウ球菌感染を予防または処置するために提供される。さらに、これらのモノクローナル抗体は、フィブリノゲンまたはフィブリンへのブドウ球菌属細菌の結合を損なわせるのに有用であることが示され、そしてそれゆえ S. aureus のようなブドウ球菌からの感染を処置または予防するのに有効であることが証明された。一層さらに、本発明に従う抗体は、多種多様な S. aureus 株にわたり交差反応性であることが示されたことから、二重に有効であり、それゆえ、本発明のモノクローナルに基づく組成物の有効性および効率を改善するであろう。

【0035】

従って、本発明に従って、上記の慣用的な方法（例えば、局所的、非経口、筋肉内など）のいずれかにおいて本発明の抗体の投与がなされ、それゆえ、ヒトまたは動物患者におけるブドウ球菌感染を処置または予防する極めて有効な方法が提供されるであろう。有効量とは、細菌の付着を予防するか、宿主細胞へのブドウ球菌の結合を阻害するかのいずれかに十分であり、それゆえブドウ球菌感染の処置または予防において有用である使用レベル（抗体力価のような）を意味する。当業者によって認識されるように、ブドウ球菌感染の処置または予防において有効であるために要求される抗体力価のレベルは、患者の性質および状態、および／または予め存在するブドウ球菌感染の重篤度に非常によく依存するであろう。

【0036】

上記のような S. aureus 感染を処置または予防するための C1fA タンパク質およびそのタンパク質の A ドメイン内の領域に対する抗体の使用に加え、本発明は、患者中か汚染される可能性のある医療機器上において、種々の方法におけるこれらの抗体の使用（ブドウ球菌感染を診断するための S. aureus の存在の検出）を企図する。本発明に従って、ブドウ球菌感染の存在を検出する好ましい方法は、1つ以上のブドウ球菌属細菌種または株によって感染していると疑われるサンプル（個体から採取されるサンプル（例えば、該個体の血液、唾液、組織、骨、筋肉、軟骨または皮膚）のような）を得る工程を包含する。次いで、細胞が破碎され得、そして DNA が抽出され、沈殿され、そして増幅され得る。サンプルの単離に続いて、S. aureus の存在を検出するために本発明の抗体を使用する診断アッセイが行われ得、サンプル中のこのような存在を検出するためのこのようなアッセイ技術は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンプロット分析および E L I S A アッセイのような方法を含む。概して、本発明に従って、S. aureus 感染に感染した疑いのあるサンプルが本発明に従う C1fA タンパク質抗体へ添加され、さらに S. aureus がサンプル中の C1fA タンパク質へ結合する抗体によって示される S. aureus 感染の診断方法が企図される。

【0037】

従って、本発明に従う抗体は、ブドウ球菌の m a p タンパク質の特異的検出のためにか、ブドウ球菌からの感染を予防するためにか、進行中の感染の処置か、あるいは研究道具としての使用のために用いられ得る。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、単鎖、二重特異的 (b i s p e c i f i c)、サル化 (s i m i a n i z e d)、およびヒト化または靈長類化 (p r i m a t i z e d) 抗体、ならびに F a b イムノグロブリン発現ライブラリーの産物を含む F a b フラグメント (C1fA タンパク質に対する抗体の結合特異性を維持するこれらのフラグメントのような) が挙げられる。従って、本発明は、以下に示されるような抗体の可変重鎖および軽鎖のような単鎖の使用を企図する。これらのいかなる型の抗体または抗体フラグメントの生成も、当業者に周知である。本発明の場合において、C1fA タンパク質に対するモノクローナル抗体は、生成および単離され、そしてブドウ球菌属感染から保護することが示

10

20

30

40

50

された。

【0038】

上記抗体のいずれも、ブドウ球菌の同定および定量のための検出可能な標識で直接的に標識され得る。イムノアッセイにおける使用のための標識は、一般的に当業者に知られており、酵素、放射性同位体、ならびに蛍光、発光および発色物質（コロイドゴールド（*c o l l o i d a l g o l d*）またはラテックスビーズのような着色粒子を含む）が挙げられる。好適なイムノアッセイとしては、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）が挙げられる。

【0039】

あるいは、抗体は、イムノグロブリンに対する親和性を有する標識物質との反応によって間接的に標識され得る。抗体は第二物質と結合され、そしてその抗体に結合された第二物質に対する親和性を有する標識された第三物質を用いて検出され得る。例えば、抗体がビオチンへ結合され、そしてこの抗体-ビオチン複合体が標識されたアビジンまたはストレプトアビジンを用いて検出され得る。同様に、抗体がハプテンへ結合され、そして抗体-ハプテン複合体が標識された抗-ハプテン抗体を用いて検出され得る。抗体およびアッセイ複合体を標識するこれらおよび他の方法は、当業者に周知である。

【0040】

上記のようなC1fAに対する抗体はまた、さらなる量のタンパク質を単離する（例えば、アフィニティクロマトグラフィーによる）ために、製造施設または実験室において使用され得る。例えば、本発明の抗体はまた、さらなる量のC1fAタンパク質またはその活性フラグメントを単離するために利用され得る。

【0041】

本発明の単離抗体またはその活性フラグメントはまた、ブドウ球菌感染に対する受動免疫のためのワクチンの開発において利用され得る。さらに、薬学的組成物として創傷へ投与されるか、または*in vitro*および*in vivo*の医療デバイスまたはポリマー生体材料（*polymeric biomaterials*）をコーティングするために使用される場合、本発明の抗体は、予めブドウ球菌感染が存在する場合において、フィブリノゲンまたはフィブリンに対する*S. aureus*結合をさらに制限および阻害し、それによって感染の拡大（*extent*）および蔓延（*spread*）を制限するこの抗体の能力のために、有用であり得る。さらに抗体は、必要に応じて、ある場合において、それが投与される患者においてより低い免疫原性であるように改変される。例えば、患者がヒトである場合、抗体は、ヒトモノクローナル抗体中へハイブリドーマ由来の抗体の相補性決定領域を移植することによって「ヒト化」されるか（例えば、Jonesら、*Nature* 321:522-525（1986）またはTempestら、*Biotechnology* 9:266-273（1991）に記載されるように）、または相同意のヒトフレームワーク対応物を真似るようにイムノグロブリン可変領域中の表面に露出されるマウスフレームワーク残基を変更することによって「うわべを飾られ（*veneered*）」得る（例えば、Padlan, *Molecular Immunology* 28:489-498（1991）によって記載されるように）（これらの参考文献は、本明細書中において参考として援用される）。またさらに、そのように所望される場合、本発明のモノクローナル抗体は、本発明の組成物の細菌感染と戦う能力をさらに高めるのに適する抗生物質と共に投与され得る。

【0042】

本明細書中に記載される抗体、タンパク質または活性フラグメントでコーティングされるであろう医療デバイスまたは重合性生体材料としては、ステープル（*staple*）、縫合糸、代替心臓弁（*replacement heart valves*）、心臓補助装置（*cardiac assist device*）、ハードおよびソフトコンタクトレンズ、眼内レンズインプラント（*intracocular lens implant*）（前眼房または後眼房）、角膜インレー（*corneal inlays*）、ケラト-プロテーゼ（*kerato-prostheses*）、血管ステント（*vascular*

10

20

30

40

50

stents)、エピケラトファリア(epikeratophalia)デバイス、緑内障シャント(glucoma shunts)、網膜ステープル(retinal staples)、強膜バックル(scleral buckles)、歯科プロテーゼ、甲状軟骨形成術用デバイス、喉頭形成術用(thyroplastic)デバイス、血管移植片、軟部および硬部組織プロテーゼ(ポンプを含むがこれに限定されない)、電気デバイス(刺激器および記録器を含む)、聴覚プロテーゼ、ペースメーカー、人工喉頭、歯科インプラント、乳房インプラント、陰茎インプラント、頭蓋/顔面の腱(crani/o/facial tendons)、人工関節、腱、靭帯、半月および盤(discs)、人工骨、人工臓器(人工肺臓、人工心臓、人工四肢、および心臓弁；ステント、ワイヤー、ガイドワイヤー、静脈内および中心静脈カテーテル、レーザーおよびバルーン血管形成術用デバイス、血管および心臓デバイス(チューブ、カテーテル、バルーン)、心室補助材、血液透析コンポーネント、血液酸素供給器、尿道/尿管/泌尿器デバイス(フォーリーカテーテル、ステント、チューブおよびバルーン)、気道カテーテル(気管内および気管開口チューブおよびカフ)、経腸栄養チューブ(経鼻胃、胃内および空腸チューブを含む)、創傷ドレーナッジチューブ(体腔(胸膜、腹膜、頭蓋、および心膜の腔のような)を除液する(drain)ために使用されるチューブ)、血液バッグ、試験管、血液採取管、ヴァキューテナー(vacutainers)、シリング、ニードル、ピペット、ピペットチップ、および血液チュービングが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0043】

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

20

【0044】

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

30

【0045】

本発明に従う抗体組成物の投与のための好ましい用量は、ブドウ球菌感染を予防するまたは処置するのに有効であろう量であり、そしてこの量が感染の性質および患者の状態に依存して非常に大きく変化するであろうことは容易に認識される。上記に示すように、本発明に従って使用される抗体または薬剤の「有効量」は、所望の予防または治療効果をもたらすような、薬剤の非毒性であるが十分な量を意味することを意図される。以下に指摘するであろうように、必要とされる抗体または特定の剤の正確な量は、被験体の種、年齢および全体的な状態、処置される状態の重篤度、使用される特定の担体またはアジュバントおよびその投与形態などに依存して、被験体ごとに異なる。従って、任意の特定の抗体組成物の「有効量」は、特定の環境に基づいて異なり、そして適切な有効量は、適用の各々の場合において、日常的に行われる実験のみを用いて当業者により決定され得る。その用量は、組成物が投与される個体に合わせて調整されるべきであり、また年齢、体重、および個体の代謝に伴って変化する。この組成物はさらに、(チメロサール(エチル(2-メルカプトベンゾエート-S)水銀ナトリウム塩)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)のような薬学的に許容される保存剤または

40

50

安定化剤を含み得る。

【0046】

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

【0047】

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

10

20

【0048】

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

【0049】

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

30

【0050】

本発明の別の実施形態において、後にブドウ球菌細菌を含むと疑われる水性サンプルの添加によって活性になるような、単一容器内に凍結乾燥され、適切な形態で本発明の抗体を含む、ブドウ球菌属細菌および感染を単離および同定することにおいて有用であり得るキットが提供される。このようなキットは代表的に、本発明の C1fA 抗体へ結合する複合体の同定を可能にするであろう適切な免疫検出試薬と共に適切な形態において抗体を収容するための適切な容器を含み得る。例えば、免疫検出試薬は、ビオチンまたは検出可能な色を生成する酵素のような、通常抗体へ結合され得るか、またはその抗体が抗原へ結合する際に検出可能な結果をもたらすような別の好適な方法において利用され得る適切な検出可能なシグナルまたは標識を含み得る。

40

【0051】

簡単には、C1fA タンパク質またはその活性フラグメントに結合する本発明の抗体は、このように、ヒトおよび動物患者におけるブドウ球菌感染を処置または予防することにおいて、ならびに医療用または他の内在デバイスにおいて格別に有用である。従って、本発明は、C1fA へ結合し得且つ細菌のオプソニン食作用性殺傷を伴うブドウ球菌感染の処置の方法において使用され得る抗体を同定するおよび単離する方法に関する。C1fA タンパク質を結合し得、そしてブドウ球菌感染を予防または処置し得る C1fA 抗体のような、本発明の方法を用いて同定および / または単離される抗体はそれゆえ、本発明の一部

50

である。

【0052】

実施例

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

【0053】

実施例1. C1f40およびC1f33の単離ならびに配列決定

PCRを使用し、C1fAのAドメイン(AA40-599を表すC1f40またはAA221-550を表すC1f33)を、*S. aureus* NewmanゲノムDNAから増幅し、そして6つのヒスチジン残基を含む組換え融合タンパク質の発現を可能にするE. coli i発現ベクターPQE-30(Qiagen)中にサブローニングを行った。その後、このベクターをE. coli株ATCC 55151中に形質転換し、15-リットル発酵槽中で光学密度(OD₆₀₀)0.7まで増殖させ、そして0.2 mMイソプロピル-1-ベータ-Dガラクトシド(IPTG)と共に4時間誘導した。AGテクノロジーズ中空糸アッセンブリー(AG Technologies hollow-fiber assembly)(孔サイズ0.45 μm)を使用してこの細胞を回収し、そしてこの細胞ペーストを-80にて凍結した。French Press @ 1100 psi.による2回の通過を用い、細胞を1×PBS(10 mLの緩衝溶液/1 g細胞ペースト)中で溶解した。細胞片を除去するために、溶解させた細胞を17.000 rpmにて30分間スピンドウンした。0.1 M NiCl₂でチャージした5-mL HiTrap Chelating(Pharmacia)カラム上に、上清を通した。負荷後、該カラムを5カラム容量の10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl(Buffer A)で洗浄した。30カラム容量以上の10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl、200 mM イミダゾール(Buffer B)の0-100%グラディエントを使用して、タンパク質を溶出した。C1f40またはC1f33は、~13% Buffer B(~26 mMイミダゾール)にて溶出された。280 nmにおける吸光度をモニターした。C1f40またはC1f33を含む画分を、1×PBS中で透析した。

【0054】

その後、該タンパク質をエンドトキシン除去プロトコールにかけた。このプロトコールの間使用された緩衝溶液を、5-mL Mono-Qセファロース(Pharmacia)カラム上を通過させることによって、エンドトキシンフリーにした。タンパク質を、4×15 mL管間で均等に分けた。Buffer Aを用いて、それぞれの管の容量を9 mLにした。1 mLの10% Triton X-114を各管に加え、4で1時間回転させながらインキュベーションした。相を分離するため、管を37の水浴中に置いた。管を2,000 rpmで10分間スピンドウンし、そしてそれぞれの管から上部水相を回収し、さらに界面活性剤抽出を繰り返した。二度目の抽出からの水相を混合し、そして残留する界面活性剤を除くために、0.1 M NiCl₂でチャージした5-mL IDA chelating(Sigma)カラム上を通過させた。3カラム容量のBuffer Bでこのタンパク質を溶出する前に、このカラムを9カラム容量のBuffer Aで洗浄した。この溶出物を、5-mL Detoxyge1(Sigma)カラム上に通し、そしてその通過液(flow-through)を回収し、そしてカラムに再アプライ(reapply)した。二度目の通過からの通過液を回収し、1×PBS中で透析した。マウスに投与する前に、この精製産物を濃度、純度、およびエンドトキシンレベルについて分析した。

【0055】

10

20

30

40

50

該タンパク質および核酸配列は、以下に含まれる。C1f40アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2として以下に含まれ、そしてこれは核酸配列SEQ ID NO: 1によってコードされ、またそれらへの縮重物(degenerates)によって同様にコードされる。C1f33アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4として以下に含まれ、そしてこれは核酸配列SEQ ID NO: 3によってコードされ、またそれらへの縮重物(degenerates)によって同様にコードされる。

【0056】

実施例2. C1f40およびC1f33を使用したモノクローナル抗体の生産

この精製されたC1f40またはC1f33タンパク質を使用し、マウスモノクローナル抗体のパネル(panel)を生成した。簡潔には、Balb/Cマウスの群は、溶液中または以下の表Iに示すアジュバンドと混合される50 μgのC1f40またはC1f33タンパク質の一連の皮下免疫を受けた：

【0057】

【表2】

表I:

注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
初回	0	50	皮下	フロイント完全
ブースト#1	14	5(C1f40) 10(C1f33)	静脈	PBS

10

20

最終ブーストの三日後、脾臓を除き、細かく切って(teased)单一細胞懸濁液にし、そしてそのリンパ球を回収した。その後、そのリンパ球をSP2/0-Ag14骨髄腫細胞株(ATCC #1581)へ融合した。細胞融合、続くプレーティングおよび栄養補給(feeding)は、Current Protocol in Immunology (Chapter 2, Unit 2.)からのthe Production of Monoclonal Antibodies protocolに従って行った。

【0058】

その後、標準的なELISAアッセイを用いて、この融合から生成された全てのクローンを特異的抗-C1f40抗体産生についてスクリーンした。陽性のクローンを拡大し(expanded)、さらに試験した。当初は、15個の陽性クローンを同定し、そしてさらなる特徴付けのために限界希釀によってクローニングした(cloned)。C1f40へのフィブリノゲン結合の阻害、フローサイトメトリーによる全細菌細胞結合およびBiacore解析によるC1f40結合への親和性を測定するために改良されたELISAである、直接結合ELISAにおいて、单一細胞クローンを、活性について試験した。試験結果は、以下の表II中に挙げられる：

30

【0059】

【表3】

表 II :

ClfA モノクロー ¹⁰ ナル抗体	結合速度論	Fbg 結合阻害	S.aureus Barnett への結合	S.aureus 67-0 への結合	S.aureus ATCC#25923 への結合	S.aureus ATCC # 49230 への結合
F12-9	$k_{on} 7.74 \times 10^5$ $k_{off} 4.46 \times 10^{-4}$ $K_D 5.76 \times 10^{-10}$	50-70%	72%	62%	60%	94%
F13-1	$k_{on} 1.11 \times 10^5$ $k_{off} 6.13 \times 10^{-3}$ $K_D 5.51 \times 10^{-8}$	0-15%	-	-	-	9%
F13-2	$k_{on} 1.19 \times 10^5$ $k_{off} 2.81 \times 10^{-4}$ $K_D 2.35 \times 10^{-9}$	40-60%	59%	65%	55%	93%

全細菌への結合

S. aureus 細菌の試料 (Barnett 株、67-0、ATCC # 25923 および ATCC # 49230) を採取、洗浄し、そしてウサギ IgG (50 mg / ml) でタンパク質 A 部位をブロッキングした後、2 mg / ml の濃度にて Mab 13-2, 12-9、13-1 または PBS 単独 (コントロール) と共にインキュベートした。抗体とのインキュベーションに続き、検出抗体として役立つヤギ - F(ab')₂ - 抗 - マウス - F(ab')₂ - FITC と共に、細菌の細胞をインキュベートした。抗体標識後、蛍光発光を解析するために FACScaliber フローサイトメーターを通して、細菌細胞を吸引した (励起: 488、発光: 570)。各細菌株について、10,000 イベントを採取し、測定した。

【0060】

阻害 (Inhibition) (ELISA)

高結合 96 ウェルプレートを、PBS (pH 7.4) 中に 1 μg / ml の Clf40 溶液でコーティングし、カバー (covered) し、そして室温で 2 時間インキュベートした。その後、プレートを PBS、0.05% Tween 20 で洗浄し、そして 1% BSA 溶液で 1 時間、室温にてブロックした。洗浄に続き、モノクローナル抗体上清を加え、そしてプレートを 1 時間、室温にてインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、そして 0.1 mg / ml ヒトフィブリノゲン溶液を各ウェルに加えた。プレートを 1 時間、室温にてインキュベートし、そして洗浄した。ヒツジ抗フィブリノゲン A P 複合体を、PBS、0.05% Tween 20、0.1% BSA 中に 1:750 希釈にて加え、そして 1 時間、室温でインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、pNPP (現像溶液) を 1 mg / ml の最終濃度で加えた。プレートを 15-30 分、37° にてインキュベートし、405 nm にて結果を読みとり、そして Perkin Elmer HTS7000 Bio-Assay reader を使用して解析した。

【0061】

反応速度論分析 (Kinetic Analysis)

ソフトウェアに含まれる、リガンド捕捉法 (Ligand Capture method) を使用する Biacore 3000 上にて反応速度論解析を行った。ウサギ抗 - マウス - Fc 抗体 (Biacore) を、CM5 チップにアミン結合 (amin coupled) した。その後、この解析されたモノクローナル抗体を、前記 Fc タンパク質への結合を可能にするために、このチップ上を通した。その後、様々な濃度の Clf40 また

は C 1 f 3 3 タンパク質を、このチップ表面上を通し、そしてデータを採取した。 Bi a core provided Evaluation software (バージョン 3.1) を使用して K_{on} および K_{off} を測定し、そして K_A および K_D を算出した。

【 0 0 6 2 】

実施例 3 . C 1 f 4 0 および C 1 f 3 3 の追加研究

PCR を使用し、C 1 f A の A ドメイン (AA 4 0 - 5 9 9 を表す C 1 f 4 0 、AA 2 2 1 - 5 5 0 を表す C 1 f 3 3 - N 2 N 3 ドメインまたは AA 3 7 0 - 5 5 9 を表す C 1 f - N 3 ドメイン) を、S. aureus Newman ゲノム DNA から増幅し、そして 6 つのヒスチジン残基を含む組換え融合タンパク質の発現を可能にする E. coli 発現ベクター-PQE-30 (Qiagen) 中にサブローニングを行った。その後、このベクターを E. coli 株 ATCC 55151 中に形質転換し、15 - リットル発酵槽中で光学密度 (OD₆₀₀) 0.7 まで増殖させ、そして 0.2 mM イソプロピル - 1 - ベータ - D ガラクトシド (IPTG) と共に 4 時間誘導した。AG テクノロジーズ中空糸アッセンブリー (AG Technologies hollow-fiber assembly) (孔サイズ 0.45 mm) を使用して細胞を回収し、そしてこの細胞ペーストを -80 にて凍結した。French Press @ 1100 psi. による 2 回の通過を用い、細胞を 1 × PBS (10 mL の緩衝溶液 / 1 g 細胞ペースト) 中で溶解した。溶解させた細胞を 17.000 rpm にて 30 分間スピンドウンし、細胞片を除去した。0.1 M NiCl₂ でチャージした 5 - mL HiTrap Chelating (Pharmacia) カラム上に、上清を通した。負荷後、該カラムを 5 カラム容量の 10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl (Buffer A) で洗浄した。30 カラム容量以上の 10 mM Tris、pH 8.0、100 mM NaCl、200 mM イミダゾール (Buffer B) の 0 - 100% グラディエントを使用して、タンパク質を溶出した。C 1 f タンパク質を、~13% Buffer B (~26 mM イミダゾール) にて溶出した。280 nm における吸光度をモニターした。C 1 f 4 0 および C 1 f 3 3 を含む画分を、1 × PBS 中で透析した。

【 0 0 6 3 】

その後、該タンパク質をエンドトキシン除去プロトコールにかけた。5 - mL Mono - Q セファロース (Pharmacia) カラム上を通過させることによって、このプロトコールの間使用された緩衝溶液を、エンドトキシンフリーにした。タンパク質を、4 × 15 mL 管間で均等に分けた。Buffer A を用いて、それぞれの管の容量を 9 mL にした。1 mL の 10% Triton X-114 を各管に加え、4 で 1 時間回転させながらインキュベーションした。相を分離するため、管を 37 の水浴中に置いた。管を 2,000 rpm で 10 分間スピンドウンし、そしてそれぞれの管の上部水相を採取し、さらに界面活性剤抽出を繰り返した。二度目の抽出からの水相を混合し、そして残留する界面活性剤を除くために、0.1 M NiCl₂ でチャージした 5 - mL IDA Chelating (Sigma) カラム上を通過させた。3 カラム容量の Buffer B でこのタンパク質を溶出する前に、このカラムを 9 カラム容量の Buffer A で洗浄した。この溶出物を、5 - mL Detoxigel (Sigma) カラム上に通し、そしてその通過液 (flow-through) を回収し、そしてカラムに再アプライ (reapply) した。二度目の通過からの通過液を回収し、1 × PBS 中で透析した。マウスに投与する前に、この精製産物を濃度、純度、およびエンドトキシンレベルについて分析した。

【 0 0 6 4 】

モノクローナル抗体産生

マウスモノクローナル抗体のパネルを生成するために、精製した C 1 f 4 0 、 C 1 f 3 3 または N 3 タンパク質を使用した。簡潔には、Balb/C または SJL マウスの群は溶液または以下の表 I II に示すアジュバントと混合したタンパク質 1 - 10 mg の一連の皮下免疫を受けた：

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

【表4】

表III:

RIMMS 注射	日	量 (mg)	経路	アジュバント
#1	0	5	皮下	FCA/RIBI
#2	2	1	皮下	FCA/RIBI
#3	4	1	皮下	FCA/RIBI
#4	7	1	皮下	FCA/RIBI
#5	9	1	皮下	FCA/RIBI

コンベンショナル				
注射	日	量 (mg)	経路	アジュバント
初回	0	5	皮下	FCA
ブースト # 1	14	1	腹腔内	RIBI
ブースト # 2	28	1	腹腔内	RIBI
ブースト # 3	42	1	腹腔内	RIBI

犠牲の際 (RIMMS) またはブースト (コンベンショナル (conventional)) の 7 日後、血清を採取し、そして MSCRAMM^s に対する ELISA アッセイにおいて、または全ての細胞 (S. aureus および S. epidermidis) について力値を測定した (titrated)。最終ブーストの三日後、脾臓またはリンパ節を除き、細かく切って (teased) 単一細胞懸濁液にし、そしてそのリンパ球を回収した。その後、そのリンパ球を SP2/0-Ag14 骨髄腫細胞株 (ATCC # 1581) へ融合した。細胞融合、続くプレーティングおよび栄養補給 (feeding) は、Current Protocol in Immunology (Chapter 2, Unit 2.) からの the Production of Monoclonal Antibodies protocol に従って行った。

【0066】

その後、標準的な ELISA アッセイを用いて、この融合から生成された全てのクローンを特異的抗-C1f40、SdrG または FnbpA 抗体産生についてスクリーンした。陽性のクローンを拡大し (expanded)、さらに試験した。さらに、候補物 (Candidate) を直接結合 ELISA において活性を試験し、C1f40 に対するフィブリノゲン結合阻害、フローサイトメトリーによる全細菌細胞結合および Biacore 解析によるフィブリノゲン-C1f40 結合の C1f40 結合 / 阻害を測定した。

【0067】

Biacore 解析

この解析を通し、流速を常に 10 ml / min に保った。C1fA40 注入の前に、RA M - Fc 結合を通して、試験抗体を前記チップに吸着した。時間 0 にて、30 mg / ml の濃度での C1f40 を 3 分間、前記チップ上に注入し、続いて 2 分間解離 (dissociation) した。解析のこの段階では、Mab / C1fA 相互作用の相対的な結合および解離速度を測定した。この解析の第 2 段階において、フィブリノゲンに作用および結合するための C1fA に結合する Mab の能力 (ability) を測定した。100 mg / ml 濃度でのフィブリノゲンを前記チップ上に注入し、そして 3 分後にレポートポイント (report point) を取った。

【0068】

全細菌への結合

細菌の試料 (Newman) を採取、洗浄し、そしてウサギ IgG (50 mg / ml) でタンパク質 A サイトをブロッキングした後、2 mg / ml の濃度にて Mab または PBS 単独 (コントロール) と共にインキュベートした。抗体とのインキュベーションに続き、

10

20

30

40

50

検出抗体として役立つヤギ - $F_{(ab')_2}$ - 抗 - マウス - $F_{(ab')_2}$ - FITCと共に、細菌細胞をインキュベートした。抗体標識後、蛍光発光を分析するために F A C S c a l i b e r フローサイトメーターを通して、細菌細胞を吸引した(励起: 488、発光: 570)。各細菌株について、10,000イベントを採取し、測定した。

【0069】

阻害(ELISA)

高結合96ウェルプレートを、PBS(pH7.4)中に1 μ g/mlのClf40溶液でコーティングし、カバー(covered)し、そして室温で2時間インキュベートした。その後、プレートをPBS、0.05%Tween20で洗浄し、そして1%BSA溶液で1時間、室温にてブロックした。洗浄に続き、モノクローナル抗体上清を加え、そしてプレートを1時間、室温にてインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、そして0.1mg/mlヒトフィブリノゲン溶液を各ウェルに加えた。プレートを1時間、室温にてインキュベートし、洗浄した。ヒツジ抗フィブリノゲンAP複合体を、PBS、0.05%Tween20、0.1%BSA中に1:750希釈にて加え、そして1時間、室温でインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、pNPP(現像溶液)を1mg/mlの最終濃度で加えた。プレートを15-30分、37にてインキュベートし、405nmにて結果を読みとり、そしてPerkin Elmer HTS7000 Bio-Assay readerを使用して解析した。

【0070】

実施例4. 異なる反応パターンを有するClf40生成モノクローナル抗体の全てまたは一部を用いた免疫

以下の表IVは、Clf40、Clf33(ClfaドメインのN2N3領域を構成する)、およびClfaN3領域のみを含む、本発明の活性領域との免疫試験の結果を示す。

【0071】

【表5】

表 IV:

抗原	融合	モノクローナル	反応性						阻害	阻害	阻害
			ELISA	SdrG	FnbP	Biacore	結合	阻害			
ClfA N3	RIMMS	F29-19	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
以下を含む：		F29-71	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
F29 F30 F31 F32		F29-92	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
F34 F36		F31-20	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F31-36	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F31-100	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F31-195	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F32-22	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F34-15	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F36-77	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
		F36-197	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt	nt
ClfA N2N3 (Clf33)	コンベンショナル	INH-M010001	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
以下を含む：		F12-3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
F11 F12 F17 F18		F12-1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F12-5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F12-10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ClfA N2N3 (Clf33)	RIMMS	F33-7	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
以下を含む：		F35-279	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
F33 F35 F38 F40		F35-177	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F40-7	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F38-300	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F35-129	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ClfA N2N3 (Clf33)	コンベンショナル	INH-M000030	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
以下を含む：		INH-M010004	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
F13 F14 F15 F16		INH-M010003	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		F13-6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Nt=試験せず

N=陰性結合

Y=陽性結合

10

20

30

40

50

この表中に表される結果は、ClfA 40 または ClfA 40 の一部 (N2N3 または N3) とのモノクローナル抗体生成のための免疫は、幅広く、かつ多様な反応プロフィールを有し、また様々なスタフィロコッカス株にわたって、十分な交叉反応性 (cross-reactivity) を示すモノクローナル抗体をもたらすということを示す。

【0072】

実施例5. フィブリノゲンに対する ClfA 結合をブロックする高親和性 Mabs を選択するための Biacore の使用

Biacore 解析

図1に表されるこの実験を通し、流速を常に 10 ml/min に保った。ClfA 40 注入の前に、RAM-Fc 結合を通して、Mab 13-1 の 946 RU および Mab 13-2 の 768 RU を前記チップに吸着した。グラフ上の時間 0 にて、30 mg/ml の濃度での ClfA 40 を 3 分間、前記チップ上に注入し、続いて 2 分間の解離 (dissociation) を行った。ClfA 40 注入時間の終わりにおいて、13-1 Mab は ClfA の 58 RU に結合し、また 13-2 Mab は ClfA の 168 RU に結合した。該実験

のこの段階は、Mab / C1fA相互作用の相対的な結合および解離速度論を測定した。該実験の第2段階において、フィブリノゲンに作用および結合するためにC1fAに結合するMabの能力を測定した。100mg/ml濃度でのフィブリノゲンを前記チップ上に注入し、そして3分後、C1fAに結合するフィブリノゲンの64RUはMab13-1に結合したが、C1fAに結合するフィブリノゲンの0RUがMab13-2に結合した。

【0073】

実施例6. *S. aureus*株Barnettおよび*S. aureus* ATCC25923に対するMab13.2の比較

抗体のスケールアップおよび精製

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

【0074】

*Staphylococcus aureus*株

*S. aureus*細胞は凍結グリセロールストックから得られ、そして一枚の血液寒天プレート上に植え付けられ、そして24時間、37で増殖させた。その後、単独コロニーを新たな血液寒天プレート上に移した。50mlsの最終凍結ストックを用意するために、80プレートに植え付けた。その後、このプレートを24時間、37でインキュベーションした。インキュベーション後、この細菌をスクレイパー(scraper)から取り除くために穏やかにボルテックスしながら、このコロニーを各プレートの表面から10mlsの1×PBSを含む4つの50ml管(1管あたり20プレート)へ搔き取った。次いで、細菌からの全ての寒天片の分離を容易にするため勢いよくボルテックスしながら、さらなる10mlsの1×PBSを10mlsの細菌懸濁液に加えた。この懸濁液を10分間、3500×g、4で遠心分離することによって、ペレット化した。この細菌をD-PBS中で洗浄し、そして50mlsの凍結培地に再び懸濁した。この細菌ストックを、エタノール/ドライアイス浴中で急速凍結することによって1mlのアリコートに入れ、そして-80の冷凍庫中に置いた。凍結ストックの濃度(CFU/ml)を、ストックの1mlアリコートを解凍し、10⁻⁵から10⁻¹¹の連続希釈液を調製することで測定した。希釈液を二分して、血液寒天プレート上にプレーティングし、そして16-18時間、37でインキュベートした。このCFU/mlを測定し(CFU/ml = (コロニー平均# × 希釈ファクター) / 0.050mls)そして平均CFU/mlを測定するために各希釈液を平均した。注射の日、各株のアリコートを解凍し、その後それぞれの株について1つの管に混合し、そして攪拌した。

動物、性別、種、数、年齢および供給源

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

同定および無作為化

10

20

30

40

50

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

C 1 f A 特異的モノクローナル抗体 (M a b)、アイソタイプ

C 1 f A 特異的マウスモノクローナル抗体を、マウスのアイソタイピング用の B e c t o n D i c k e n s o n C y t o m e t r i c B e a d A r r a y を使用してアイソタイプ化 (i s o t y p e d) した。製造業者プロトコルに従い、フローサイトメトリーを使用してアイソタイプを決定した。

1 3 . 1 C 1 f 4 0 M a b , I g G ,

1 3 . 2 C 1 f 4 0 M a b , I g G ,

1 2 . 9 C 1 f 3 3 M a b , I g G ,

コントロール

A T T C 1 7 7 1 , I g G ,

リン酸緩衝食塩水、p H 7 . 4 (P B S) を、L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c (C a t . N o . 1 0 0 1 0 - 0 2 3 ; L o t N o . 1 0 7 8 7 4 9) から購入した。

実験計画

【 0 0 7 5 】

【表 6 】

表 V.

10

20

30

40

群#	マウスの数	処理					チャレンジ		
		抗体	用量	経路	頻度	時間点	細菌	ストック希釈	用量／経路
1	12	13-2	36 mg/kg	i.p.	一回	-18 hr,	ATCC 25923	1:20	0.1 ml/IV
2	15	CRL17 71	36 mg/kg				ATCC 25923	1:20	
3	15	D-PBS	N/A				ATCC 25923	1:20	
4	12	13-2	36 mg/kg				Barnett	1:20	
5	15	CRL17 71	36 mg/kg				Barnett	1:20	
6	15	D-PBS	N/A				Barnett	1:20	

i n v i v o 動物データ

0 . 5 m g のモノクローナル抗体 1 3 - 2 、アイソタイプコントロールモノクローナル抗体 C R L - 1 7 7 1 、または P B S でマウスを腹腔内 (I P ; 0 . 5 m l) 注射によって処理した。I g G 投与の 1 8 時間後、マウスを S . a u r e u s B e r n e t t または S . a u r e u s A T C C 2 5 9 2 3 の単独静脈 (I V) 注射でチャレンジ (c h a l l e n g e) した。1 2 日間の後、この時点にて全ての生存しているマウスを犠牲にした。処理群間での相対的な生存時間において、有意差が検出された。M a b 1 3 - 2 を受けたマウスの 8 3 パーセント (1 0 / 1 2) 、C R L - 1 7 7 1 を受けた動物の 1 3 % (2

50

/ 15)、およびPBSを受けたものの0% (0/15)が、S. aureus Bennett (13-2 vs. PBS, $p < 0.0001$; 13-2 vs. CRL-1771, $p = 0.0009$)との細菌チャレンジを生き延びた(survived)。動物データの統計分析は、Mantel-Cox (logrank) 試験と共にKaplan-Meier Survival Analysisを使用して実施された。S. aureus ATCC 25923が細菌チャレンジであった実験において、Mab13-2を投与されたマウスの67% (8/12)が生存し、CRL-1771処理群においては27% (4/12)が生存し、そしてPBSグループでは、7% (1/15)のみが生存した (13-2 vs. CRL-1771, $p = 0.02$; 13-2 vs. PBS, 0.0002)。これらの結果は、MSCRAMM特異モノクローナル抗体は、S. aureus株での致死的感染に対する有意なレベルの防御を提供することを明確に示している。
10

【0076】

実施例 7. 可変領域配列の単離および配列決定

A. モノクローナル抗体13-2

Fast Track 2.0キット(Invitrogen; cat# K4500)を使用して、ClfA13-2ハイブリドーマ細胞からメッセンジャーRNAを単離した。簡潔には、10% FBSを含むDMEM-10培地で培養した 1.4×10^8 ハイブリドーマ細胞をPBSで洗浄し、遠心分離によってペレット化した後、Protein/RNase Degraderを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース上でのアフィニティ精製によって、Poly A⁺ mRNAを単離した。第一鎖(first strand) cDNA合成は、5 μgのmRNAおよび各可変重および可変軽鎖に対する、20 pmolの3'オリゴヌクレオチドマウス-特異的プライマー (Novagen; cat# 69796および69812)を含む、cDNA合成キット (Novagen; cat# 69001-3)中の逆転写酵素を使用することによって達成された。PCR Reagent System (Life Technologies; cat# 10198-018)ならびにマウス可変重鎖および軽鎖特異的プライマーセット (Novagen; cat# 70081-3、各5 pmol)を使用する30サイクル (94C ホットスタートの後、94C 1分間、50C 1分間そして72C 1分間のサイクル)のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、cDNAの一部 (5から50ng)を増幅した。PCR産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の1%超純粹アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングするPCR断片をそのゲルから切り出し、そしてpCR2.1-TOPO (Invitrogen) プラスミドへのライゲーションのためにBIO101 Gene cleanスピンカラム (cat# 1101-400)を使用して精製し、続いてコンピテンントTOP10 E. coli (Invitrogen; cat# K4500)への形質転換を行った。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; cat# 27106)を使用してプラスミドDNAを単離した後、インサートを含む陽性クローニングを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いてM13フォワードおよびM13リバースプライマーを使用してABI自動シークエンサー上で配列決定した。
20
30
40

【0077】

得られた配列は以下のとおりである：

13-2 VLA-1 (可変軽配列)

【0078】

【化1】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
 GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTAACTACAGTCAAATCAGAA
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTACTGA
 TCTACTGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTACTCTTACCATCAACAGTGTACAAGCTGAAGACCTG
 GCAGTTTATTACTGTCAATACCTCTCGCACACGTTGGAGGGGGAC
 CAAGCTGGAAATAAAA

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSHTFGGGTKLE
 IK

10

20

30

40

50

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【 0 0 7 9 】

1 3 - 2 V H C - 3 (可変重配列)

【 0 0 8 0 】

【 化 2 】

CAGGTGCATCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
 TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGATTCTCATTATCCAGATATAATATACACTG
 GGTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGT
 GGTGAAAACACAGACTATAATTCACTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACGTGATGA
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTGCTTA
 CTGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVHLKESGPGLVAPSQSLISITCTVSGFSLSRYNIHWRQPPGKGLEWLGMIWGGE
NTDYNNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYCCASAYYGNSWFAYWG
 QGTLVTVSA

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【 0 0 8 1 】

B. モノクローナル抗体 1 2 - 9

F a s t T r a c k 2 . 0 キット (I n v i t r o g e n ; c a t # K 4 5 0 0)
 を使用して、 C l f A 1 2 - 9 ハイブリドーマ細胞からメッセンジャー R N A を単離した。
 簡潔には、 1 0 % F B S を含む D M E M - 1 0 培地で培養した 1 . 4 × 1 0 ⁸ ハイブ
 リドーマ細胞を P B S で洗浄し、遠心分離によってペレット化した後、 P r o t e i n /
 R N a s e D e g r a d e r を含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ - d T セルロー
 ス上のアフィニティ精製によって、 P o l y A ⁺ m R N A を単離した。第一鎖 (f i r
 st s t r a n d) c D N A 合成は、 5 μ g の m R N A および各可変重および可変軽
 鎖に対する、 2 0 p m o l の 3 ' オリゴヌクレオチドマウス - 特異的プライマー (N o v
 a g e n ; c a t # 6 9 7 9 6 および 6 9 8 1 2) を含む、 c D N A 合成キット (N o
 v a g e n ; c a t # 6 9 0 0 1 - 3) 中の逆転写酵素を使用することによって達成され
 た。 P C R R e a g e n t S y s t e m (L i f e T e c n o l o g i e s ; c a
 t # 1 0 1 9 8 - 0 1 8) ならびにマウス可変重および軽鎖特異的プライマーセット (N
 o v a g e n ; c a t # 7 0 0 8 1 - 3 、各 5 p m o l) を使用する 3 0 サイクル (9 4
 C ホットスタートの後、 9 4 C 1 分間、 5 0 C 1 分間そして 7 2 C 1 分間のサイ
 クル) のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、 c D N A の一部 (5 から 5 0 n g)
 を増幅した。 P C R 産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の 1 % 超純粹アガロースゲル中で電気
 泳動的に分別し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマ
 ッチングする P C R 断片をそのゲルから切り出し、そして p C R 2 . 1 - T O P O (I n

vitrogen) プラスミドへのライゲーションのために B I O 1 0 1 G e n e c l e a n スピンカラム (cat # 1 1 0 1 - 4 0 0) を使用して精製し、続いてコンピテント T O P 1 0 E . c o l i (Invitrogen; cat # K 4 5 0 0) への形質転換を行った。Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t (Q I A G E N; cat # 2 7 1 0 6) を使用してプラスミド D N A を単離した後、インサートを含む陽性クローニングを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いて M 1 3 フォワードおよび M 1 3 リバースプライマーを使用して A B I 自動シーケンサー上で配列決定した。

【 0 0 8 2 】

得られた配列は以下のとおりである：

1 2 - 9 V L A - 1 (可変軽配列)

【 0 0 8 3 】

【 化 3 】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTAACTACAGTTCAAATCAGAA
GAACACTTGGCCTGGTACCAAGCAGAAACCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGAAACTCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTACTGTATCAATACCTCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA

10

20

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEI
K

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【 0 0 8 4 】

1 2 - 9 V H C - 1 (可変重配列)

【 0 0 8 5 】

【 化 4 】

30

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACATGCGCTATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
GGGTTGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
TGGTGGAAACACAGACTATAATTAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTCTAAAAATGAACAGTCTGCAAACGTGATGA
CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
GGTTTGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCAISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG
GNTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARKGEFYYGYDGF
YWGQGTLVTSA

40

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【 0 0 8 6 】

C. モノクローナル抗体 3 5 - 2 2 0

可変領域配列の単離および配列決定：

F a s t T r a c k 2 . 0 キット (Invitrogen; cat # K 4 5 0 0) を使用して、 C l f A 3 5 - 2 2 0 ハイブリドーマ細胞からメッセンジャー R N A を単離した。簡潔には、 1 0 % F B S を含む D M E M - 1 0 培地の中で培養した $1 \cdot 4 \times 1 0^8$ ハイブリドーマ細胞を P B S で洗浄し、遠心分離によってペレット化した後、 P r o t e i

50

n / R N a s e D e g r a d e r を含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-d T セルロース上でのアフィニティ精製によって、P o l y A⁺ m R N A を単離した。第一鎖 (f i r s t s t r a n d) c D N A 合成は、5 mg の m R N A および各可変重および可変軽鎖に対する、20 pmol の 3' オリゴヌクレオチドマウス - 特異的プライマー (N o v a g e n ; c a t # 6 9 7 9 6 および 6 9 8 1 2) を含む、c D N A 合成キット (N o v a g e n ; c a t # 6 9 0 0 1 - 3) 中の逆転写酵素を使用することによって達成された。P C R R e a g e n t S y s t e m (L i f e T e c h n o l o g i e s ; c a t # 1 0 1 9 8 - 0 1 8) ならびにマウス可変重鎖および軽鎖特異的プライマーセット (N o v a g e n ; c a t # 7 0 0 8 1 - 3 、各 5 pmol) を使用する 30 サイクル (9 4 C ホットスタートの後、9 4 C 1 分間、5 0 C 1 分間そして 7 2 C 1 分間のサイクル) のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、c D N A の一部 (5 から 5 0 n g) を増幅した。P C R 産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の 1 % 超純粹アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングする P C R 断片をそのゲルから切り出し、そして p C R 2 . 1 - T O P O (I n v i t r o g e n) プラスミドへのライゲーションのために B I O 1 0 1 G e n e c l e a n スピンカラム (c a t # 1 1 0 1 - 4 0 0) を使用して精製し、続いてコンピメント T O P 1 0 E . c o l i (I n v i t r o g e n ; c a t # K 4 5 0 0) への形質転換を行った。Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t (Q I A G E N ; c a t # 2 7 1 0 6) を使用してプラスミド D N A を単離した後、インサートを含む陽性クローニングを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いて M 1 3 フォワードおよび M 1 3 リバースプライマーを使用して A B I 自動シーケンサー上で配列決定した。
 10
 20

【 0 0 8 7 】

得られた配列は以下のとおりである :

3 5 - 2 2 0 V L D - 4 (可変軽配列 D N A)

【 0 0 8 8 】

【 化 5 】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTGCAGGGAGAAAA
 GGTCACTATGAGCTGTAGGTCCAGTCAAAGTGT T T T A T A C A G T C A A A T C A G A A
 GAACTACTTGGCCTGGTACCCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTACACTGCTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAACTCTGGTGTCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
 GGCAGTTTATTACTGTCAATAACCTCTCCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
 CCAAGCTGGAAATAAAA

30

3 5 - 2 2 0 V L D - 4 (可変軽配列)

【 0 0 8 9 】

【 化 6 】

N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C R S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P T L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K

40

C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【 0 0 9 0 】

3 5 - 2 2 0 V H C - 1 (可変重配列 D N A)

【 0 0 9 1 】

【 化 7 】

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
 TGTCATCACATGCACTGCTCTGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
 GGGTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAA
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTCTTAAAATGAACAGTCTGCAAACGTGATGA
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCTACTATGGTAACCTGGTTGCTTA
 CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTGCA

35-220VHC-1 (可変重配列)

【0092】

10

【化8】

Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G N T D Y N
S A L K S R L S I T K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
M Y Y C A T A Y Y G N S W F A Y W G Q G T L V T V S A

CDRを表すアミノ酸には下線が引かれる。

【0093】

20

D.モノクローナル抗体35-006

可変領域配列の単離および配列決定:

Fast Track 2.0キット(Invitrogen; cat# K4500)を使用して、Clfa35-006ハイブリドーマ細胞からメッセンジャーRNAを単離した。簡潔には、10%FBSを含むDMEM-10培地で培養した 1.4×10^8 ハイブリドーマ細胞をPBSで洗浄し、遠心分離によってペレット化した後、Protein/RNase Degraderを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース上でのアフィニティ精製によって、Poly A⁺ mRNAを単離した。第一鎖cDNA合成は、5mgのmRNAおよび各可変重および可変軽鎖に対する、20pmolの3'オリゴヌクレオチドマウス-特異的プライマー(Novagen; cat# 69796および69812)を含む、cDNA合成キット(Novagen; cat# 69001-3)中の逆転写酵素を使用することによって達成された。PCR Reagent System(Life Technologies; cat# 10198-018)ならびにマウス可変重鎖および軽鎖特異的プライマーセット(Novagen; cat# 70081-3、各5pmol)を使用する30サイクル(94C ホットスタートの後、94C 1分間、50C 1分間そして72C 1分間のサイクル)のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、cDNAの一部(5から50ng)を増幅した。PCR産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の1%超純粹アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングするPCR断片をそのゲルから切り出し、そしてpCR 2.1-TOPO(Invitrogen)プラスミドへのライゲーションのためにBIO101 Gene cleanスピンドラム(cat# 1101-400)を使用して精製し、続いてコンピテントTOP10 E. coli(Invitrogen; cat# K4500)への形質転換を行った。QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN; cat# 27106)を使用してプラスミドDNAを単離した後、インサートを含む陽性クローンを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いてM13フォワードおよびM13リバースプライマーを使用してABI自動シーケンサー上で配列決定した。

【0094】

得られた配列は以下のとおりである:

35-006VLD-1 (可変軽配列DNA)

【0095】

40

50

【化9】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAA
 GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTTCAAATCAGAA
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
 GGCAGTTATTGCTGTCAATAACCTCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
 CCGAGCTGGAAATAAAA

35-006VLD-1(可変軽配列)

10

【0096】

【化10】

N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
V Y C C H Q Y L S S Y T F G G G T E L E I K

CDRを表すアミノ酸には下線が引かれる

35-006VHC-1(可変重配列DNA)

20

【0097】

【化11】

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
 TGTCCATCACATGCACTGTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
 GGGTTGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGCTGGGAATGATATGGGG
 TGGTGGAAAGCACAGACTATAATTCTAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA
 GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTAAAAATGAACAGTCTGCAAACACTGATGA
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCGGGGCG
 CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

30

35-006VHC-1(可変重配列)

【0098】

【化12】

Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G S T D Y N
S A L K S R L N I S K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
M Y Y C A R R L W Y F D V W G A G T T V T V S S

CDRを表すアミノ酸には下線が引かれる。

【0099】

40

実施例8.マウス12-9に対する全細胞反応性および結合速度論において等価なキメラ12-9の生成

ヒト志願者の全血から単離されたヒト不变領域(軽鎖:カッパ;重鎖:G1、3または4)を使用して、キメラ12-9を生成した(Poly A RNAの選択および第一鎖cDNAのPCR增幅)。哺乳類細胞中での発現のため、重および軽鎖可変領域配列の両方の5'末端に、固有の制限サイトBsm1を加えた。3'末端(それぞれの不变領域に対するスプライス部位)では、Bsiw1部位を軽鎖可変領域に加え、また重鎖可変領域にはApal部位を加えた。これは、オリゴヌクレオチドプライマーの設計および適切な12-9DNAテンプレートのPCR增幅に続く確認DNA配列決定(confirmatory DNA sequencing)によって達成された。

50

【0100】

キメラバージョンの 12-9 タンパク質の発現は、軽鎖発現のためのカッパ不变領域または重鎖発現のためのガンマ(1、3または4)不变領域を含む、ヒト免疫グロブリンリーダー(leader)分泌配列(Bsm1をクローニングサイトとする)を含む pCEP4 (Invitrogen, cat # V044-50) 哺乳類発現ベクターを使用することで達成された。この哺乳類発現プラスミドは、同一プラスミド上の別々の hCMV プロモーターを有する重鎖および軽鎖の両方の発現、またはコトランスフェクション(cotransfection)による別々の pCEP4 プラスミド上の軽鎖および重鎖の発現のために設計された。12-9 の重鎖および軽鎖を含むプラスミドDNAのFugene を有する HEK293 EBNA 細胞 (Roche Diagnostic, cat # 1814443) へのトランスフェンション後、ハイグロマイシン (300 µg / ml) 選択下にて機能的キメラ 12-9 を発現させた。上清を回収し、Biacore によって結合速度論、および *S. aureus* 細胞への結合をフローサイトメトリーによって解析した。

【0101】

組換えキメラ 12-9 とともに図 2 および 3 に示される結果は、12-9 の重鎖および軽鎖の配列は、ハイブリドーマ上清として特徴付けられるオリジナル 12-9 の結合速度論および特異性を複製することを確認する。

【0102】

実施例 9. 12-9 の重および軽鎖可変領域のヒト化

このヒト化工程は、分子の特異性および C1fA 標的抗原に対する親和性に関与しないマウス可変領域の溶媒露出残基 (solvent exposed residue) のみを変化することに焦点を合わせている。これらの決定のための情報は、Padlan によって出版された、溶媒利用可能性決定 (solvent availability determinations) (抗体可変ドメインの免疫原性を減少する一方、それらのリガンド結合特性を保存するために可能な方法。Molecular Immunology, 28 (4); 489-498, 1991) を利用し、またこれらの決定をするために、T-細胞エピトープを決定するためのインシリコまたはアルゴリズムにおける分子モデリングは、使用しなかった。

【0103】

このアプローチは、公式データベースから最も相同性の高い (most homologous) ヒト可変領域の表面露出構造を反映するために、部位特異的突然変異誘発によって、軽および重鎖のマウス可変領域残基を変化させる方法を表す。具体的には、可変重および軽鎖を規定するアミノ酸を各ヒトフレームワークサブ-グループ (重鎖の I-II および軽鎖の I-IV) からのアミノ酸のアラインメントを可能にする Padlan に基づく Kabot ポジション番号および “露出 (exposure)” 記号 (designation) が与えられる。この解析をサポートするために、ヒト免疫グロブリンデータベース上において BLAST サーチを行い、同様にこの可変領域がこのマウス配列に最も高い相同性を有する全タンパク質データベース (生殖細胞系および成熟の両方) を選択し、そして対象のマウス配列と並べた (aligned)。ひとたび並べられると (aligned)、このマウス配列に最も高い相同性を有するヒトサブグループが同定された。露出したマウスアミノ酸残基を、最も相同なヒトサブグループに似せるため変異させた。この部位においてこのサブグループ中に 1 を超えるアミノ酸が見出された場合、12-9 に対して最も高い相同性を有するヒト生殖細胞系配列において示されたアミノ酸を使用した。これらの変化は、PCR による変異原性オリゴヌクレオチド、続くコンフォーメーション DNA 配列決定で達成された。

【0104】

12-9 VL-Hu (ヒト化可変軽配列DNA)

【0105】

【化13】

10

20

30

40

50

GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTGGCTGTCTCTGGGAGAAAG
 GGTCACTATGAAGTCCAGTCAAAGTGTAACTACAGTCAAATCAGAA
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGAAACTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTACTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
 GGCAGTTTATTACTGTCATCAATAACCTCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
 CCAAGCTGGAAATAAAA

12-9VL-Hu (ヒト化可変軽配列)

【0106】

10

【化14】

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKE
 IK

CDRを表すアミノ酸には下線が引かれ、太字のアミノ酸はヒト化の変化を表す。

【0107】

12-9VH-Hu (ヒト化可変重配列DNA)

【0108】

20

【化15】

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGGCCCTCACAGACCC
 TGTCCATCACATGCACCATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
 GGGTTGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCTAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
 AGACAACTCCAAGAACCAAGTTCTAAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA
 CACAGCCGTGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
 GGTTTGTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCC

12-9VH-Hu (ヒト化可変重配列)

30

【0109】

【化16】

QVQLKESGPGLVKPSQTLSITCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG
GNTDYNSALKSRLSISKDNSKNQVFLKMNSLTAADTAVYYCARKGEFYGYDGFV
YWGQGTLVTVSS

CDRを表すアミノ酸には下線が引かれ、太字のアミノ酸はヒト化の変化を表す。

【0110】

実施例10. メチシリン耐性 *S. aureus* 株 67-0 (MRSA) を使用したマウス敗血症モデルにおける、C1fAモノクローナル抗体、12-9A (INH-M010001) および 35-052.1 (INH-M01016) のアイソタイプ適合コントロール CRL1771 抗体、INH-M000029 との比較。

【0111】

本実施例の目的は、マウス敗血症モデルにおいて 0.3 mg 用量の抗体および *S. aureus* 株 67-0 を使用し、アイソタイプ適合コントロール CRL1771 抗体 (INH-M000029) と比較した C1fA モノクローナル抗体、12-9A (INH-M010001) および 35-052.1 (INH-M01016) の防御効果を特徴付けることである。

【0112】

40

50

【表7】

種	系統	性別	数	年齢*	重量*	供給
マウス	Balb/C	雌	90	4-5週	12-16 グラム	Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)

* 研究の開始にて、計測された範囲

適当な動物（下記参照）へのモノクローナル抗体の腹腔内（i.p.）注射の投与によって、投薬を行った。 *S. aureus* の静脈（i.v.）注射の約18時間前に、抗体の投与を行った。単独パラメーター（死亡率）を用いて、全身感染を測定した。

10

【0113】

【表8】

群#	マウス の数	処理					チャレンジ		
		抗体	用量	経路	頻度	時間点	細菌	CFU	用量／経路
1	30	12-9A	0.3 mg.	i.p.	一回	-18 hr.	<i>S. aureus</i> 67-0	~10 ⁴	0.1 ml./ i.v.
2	30	35-052	0.3 mg.						
3	30	CRL1771	0.3 mg.						

* 時間点は、細菌チャレンジ後の時間を反映する

20

調製、保存および取り扱い：

S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s

M R S A 株 6 7 - 0 細胞は凍結グリセロールストックから得られ、そして一枚の血液寒天プレート上に植え付けられ、そして 24 時間、 37 で増殖させた。その後、単独コロニーを新たな血液寒天プレート上に移した。 80 プレートを接種し、 50 m l s の最終凍結ストックを調製した。その後、プレートを 24 時間、 37 でインキュベーションした。インキュベーション後、細菌をスクレイパー（scraper）から取り除くために穏やかにボルテックスしながら、コロニーを各プレートの表面から 10 m l s の 1 × P B S を含む 4 つの 50 m l 管（1 管あたり 20 プレート）へ搔き取った。次いで、細菌からの全ての寒天片の分離を容易にするため勢いよくボルテックスしながら、さらなる 10 m l s の 1 × P B S を 10 m l s の細菌懸濁液に加えた。この懸濁液を 10 分間、 3500 × g 、 4 で遠心分離することによって、ペレット化した。この細菌を D - P B S 中で洗浄し、そして 50 m l s の凍結培地に再び懸濁した。この細菌ストックを、エタノール／ドライアイス浴中で急速凍結することによって 1 m l のアリコート中に入れ、そして -80 の冷凍庫中に置いた。凍結ストックの濃度（CFU / m l ）を、ストックの 1 m l アリコートを解凍し、 10⁻⁵ から 10⁻¹¹ の連続希釈液を用意することで測定した。希釈液を二分して、血液寒天プレート上にプレーティングし、そして 16 - 18 時間、 37 でインキュベートした。この CFU / m l を測定し（CFU / m l = (コロニー平均 # × 希釈ファクター) / 0.050 m l s ）そして平均 CFU / m l を決定するために各希釈液を平均した。注射の日、各株のアリコートを解凍し、 1 つの管に混合し、攪拌した。その後、各ストックの希釈液が用意される。

30

40

【0114】

C 1 f A 1 2 - 9 A モノクローナル抗体、 I N H - M 0 1 0 0 0 1 (L N : I A A 2 E 1 3 5 4)

12 - 9 A モノクローナル抗体（IgG₁ サブタイプ）を、プロテイン G アフィニティクロマトグラフィーを使用して、血清フリーハイブリドーマ培養液から精製した。この材料は、エンドトキシン濃度 1.0 E U / m g タンパク質を有する 7.0 m g / m l の濃度であると報告された。この材料を、 4 にて冷蔵保存した。注射の日、この材料を、 0.6 m g / m l まで希釈し、そして 0.5 m l を適切な動物群に腹腔内注射を介して投与する

50

。投与される最終用量は、0.3 mg の IgG になる。

【0115】

C1fA35-052.1 モノクローナル抗体、INH-M01016 (LN:IAA2H1422)

35-052 モノクローナル抗体 (IgG, サブタイプ) を、プロテインGアフィニティクロマトグラフィーを使用して、血清フリーハイブリドーマ培養液から精製した。この材料は、エンドトキシン濃度 1.0 EU / mg タンパク質を有する 4.2 mg / ml の濃度であると報告された。この材料を、4°にて冷蔵保存した。注射の日、この材料を、0.6 mg / ml まで希釈し、そして 0.5 ml を適切な動物群に腹腔内注射を介して投与する。投与される最終用量は、0.3 mg の IgG になる。

10

【0116】

コントロール CRL1771 モノクローナル抗体 (INH-M000029, LN:IAA2E1337)

CRL1771 モノクローナル抗体 (IgG, サブタイプ) を、プロテインGアフィニティクロマトグラフィーを使用して、血清フリーハイブリドーマ培養液から精製した。この材料は、エンドトキシン濃度 0.2 EU / mg タンパク質を有する 5.0 mg / ml の濃度であると報告された。この材料を、4°にて冷蔵保存した。注射の日、この材料を、0.6 mg / ml まで希釈し、そして 0.5 ml を腹腔内注射を介して投与する。投与される最終用量は、0.3 mg の IgG になる。

20

【0117】

ハウジング、食物、水および環境：

受け取ってすぐに、全ての動物を検診し、吸湿性のある bed - o - cobb 敷きわらを敷いたポリカーボネート靴箱型ケージ中でグループ飼育した (5 / ケージ)。全ての動物は、12 時間の明暗周期で、自由に食事 (Harlan / Teklad Mouse Pelleted Diet #7012) および水道水を得ることができる。動物の世話および必要な飼育条件の全ての面は、the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に従った。

【0118】

同定および無作為化：

全てのマウスは、処理前に尾の入れ墨を使用することによって、独自に同定された。処理の開始前に、マウスは個別に体重測定され、そしてそれらの健康状態が再評価された。マウスを体重の階層化による無作為化に基づき処理群に割り当てた。

30

このデータは、C1fA - フィブリノゲン結合と無関係な部位において C1fA を認識する特異的コントロール (35-052) だけでなく、非 C1fA 特異的アイソタイプコントロール (CRL1771) と比較した、C1fA - フィブリノゲン接着を妨げる 12-9 などの抗 - C1fA 抗体の治療価値を示す。

【0119】

実施例 11. アイソタイプコントロール (CRL1771) と比較した 12-9 および 35-052 の S. aureus 株認識

S. aureus 細菌試料 (株 Newman - WT, 67-0, 560 Sal 1 1, 203 Sal 2, 451 Sal 4, 206 Sal 5, 397 Sal 6, 49, 189, 203 および 4046) を、3 時間および一晩にて採取し、洗浄し、そしてウサギ IgG (50 mg / ml) でタンパク質 A 部位をプロッキングした後、2 mg / ml の濃度にて Mab 12-9、35-52 または 1771 単独 (コントロール) と共にインキュベートした。Sal 記号 (designation) を含む S. aureus 株は、全ての臨床分離株の 65.68% を占める 5 つの明確な系を表す (Booth, ら, Infect. Immun. 69, 345-353, 2001)。同様に、Newman C1fA : emr (C1fA ノックアウト) および Newman Spa : kan (プロテイン A ノックアウト) を、特異性コントロールと同じように解析した。抗体とのインキュベーションに続き、検出抗体として役立つヤギ - F(ab')2 -

40

50

抗-マウス- $F_{(ab')2}$ -FITCと共に、細菌の細胞をインキュベートした。抗体標識後、蛍光発光を解析するためにFACScaliber フローサイトメーターを通して、細菌細胞を吸引した(励起:488、発光:570)。各細菌株について、10,000イベントを採取し、測定した。

【0120】

【表9】

表 VI. *S.aureus* 株反応性

S.aureus 株	培養時間	蛍光強度(幾何平均)		
		12-9	35-052	CRL 1771
NewmanWT	3hr	30.8	11.1	0.5
	一晩	44.3	30	0.9
67-0	3hr	11.2	4.2	2
	一晩	27.6	1.9	1.1
560 SAL 1	3hr	28.8	8.4	3.9
	一晩	36.1	6.2	1.2
203 SAL2	3hr	16.1	0.6	2.2
	一晩	40.4	1.9	1.4
451 SAL4	3hr	1.1	0	0
	一晩	12.9	0	0
206 SAL5	3hr	8.8	1.3	1
	一晩	33.5	7.7	0.9
397 SAL6	3hr	28.9	7.9	0.3
	一晩	62.1	40.0	1.0
49 Europe	3hr	7.3	1.2	0
	一晩	11.3	5.7	0
189 Japan	3hr	11.0	0	0
	一晩	15.7	0	0
203 Singapore	3hr	22.1	3.3	0.1
	一晩	15.4	2.5	0.2
4046 USA	3hr	27.7	2.5	1.3
	一晩	23.5	1.2	0.3
Newman ClfA::emr	3hr	0.2	0.3	0.2
	一晩	1.4	0.8	0.9
Newman Spa::kan	3hr	18.6	4.9	0
	一晩	23.9	9.2	0



陽性活性を示す

10

20

30

40

このデータは、C1fA分子上、すなわちフィブリノゲンの結合部位の機能的エピトープを認識することができる抗-C1fA抗体(12-9など)を選択することの重要性を強調する。

【0121】

S.aureus 分離株の他のセット、すなわち疾病の原因に不均衡に共通と同定された、11の異なるクローニの遺伝子型複合体(clonal genotype complex)の表示、はマルチローカスシークエンスティング(multi-locus sequencing)に由来した(Day, et al., 2000)

50

1. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 292: 114-116。各株を、上記のフローサイトメトリーによって 12-9 に対する反応性について試験した。

【0122】

【表10】

表VII. *S.aureus* アイソレートとの 12-9 反応性

<i>S.aureus</i> 株記号	配列タイプ	クローン複合体	12-9 反応性
16	25	8	+
96	47	10	+
117	12	4	+
138	30	9	+
150	9	14	+
160	34	7	+
207	15	5	+
252	36	9	+
315	8	3	+
364	39	9	+
396	30	9	+
433	5	2	+
434	8	3	+
451	5	2	+
456	45	10	+
458	15	5	+
476	1	1	+
481	47	10	+
512	1	1	+
597	25	8	+
720	22	7	+
730	45	10	+
837	12	4	+
863	20	11	+
888	39	9	+
959	34	9	+

10

20

30

さらに、この反応性は、*S.aureus* の分離株にわたって (across) C1fA 上の 12-9 エピトープの保存を表し、C1fA - フィブリノゲン結合が機能的に保存されているということを示唆する。

実施例 12. 全細胞 *S.aureus* 結合を阻害する抗 - C1fA 抗体における可変領域の相同性

40

フィブリノゲンへの C1fA 結合を阻害する能力に基づく抗 - C1fA 抗体の選択からの予想外の結果は、軽および重可変鎖領域の相補性決定領域 (CDR) アミノ酸配列における類似性である。これをプロファイルするために、抗 - C1fA 抗体を、以下の工程を使用するフィブリゲン - コーティングしたプレートへの結合の全細胞 *S.aureus* 阻害に基づいて選択した：対象の抗体を、アッセイ緩衝溶液中に 4 μg / ml の濃度から始め、連続的に希釈した。同時に (concurrently)、*S.aureus* (Newman spa:kan) の一晩の培養を洗浄、ウサギ IgG でブロックし、その後 SYTO 13 細胞浸透性蛍光 DNA 染色 (cell permeable fluorescent DNA stain) で染色し、そして 10 分間インキュベートした。等量の染

50

色細胞および希釈抗体を混合し、そして30分間4にてインキュベートし、その後、ヒトフィブリノゲンコーティングした／プロックしたマイクロタイタープレートの2重のウェルを各サンプルに加えた。プレートを1時間4にてインキュベートし、洗浄し、各ウェルに緩衝溶液を加え、そして蛍光プレートリーダー(fluorescent plate reader)において読み取った。

【0123】

CRL1771(非-特異的コントロール)と同様に、抗-C1fAモノクローナル、12-9、13-2、35-006および35-220の可変軽鎖および重鎖をクローニングし、そして予想されたアミノ酸配列を導くために以下の方針において配列決定をした：簡潔には、10%FBSを含むDMEM-10培地中で培養した 1.4×10^8 ハイブリ

ドーマ細胞をPBSで洗浄し、遠心分離によってペレット化した後、Protein/RNase Degraderを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース

上でのアフィニティ精製によって、PolyA⁺mRNAを単離した。第一鎖cDNA合成は、5mgのmRNAおよび各可変重および可変軽鎖に対する、20pmolの3'オリゴヌクレオチドマウス-特異的プライマー(Novagen; cat#69796および69812)を含む、cDNA合成キット(Novagen; cat#69001-3)中の逆転写酵素を使用することによって達成された。PCR Reagent System(Life Technologies; cat#10198-018)ならびにマウス可変重および軽鎖特異的プライマーセット(Novagen; cat#70081-3、各5pmol)を使用する30サイクル(94°C ホットスタートの後、94°C

1分間、50°C 1分間そして72°C 1分間のサイクル)のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、cDNAの一部(5から50ng)を増幅した。PCR産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の1%超純粋アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムプロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングするPCR断片をそのゲルから切り出し、そしてpCR2.1-TOPO(Invitrogen)プラスミドへのライゲーションのためにBIO101 Gene cleanスピンカラム(cat#1101-400)を使用して精製し、続いてコンピテントTOP10 E.coli(Invitrogen; cat#K4500)への形質転換を行った。QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN; cat#27106)を使用してプラスミドDNAを単離した後、インサートを含む陽性クローナンを制限エンドヌクレアーゼ消化およびアガロースゲル電気泳動によって同定し、続いてM13フォワードおよびM13リバースプライマーを使用してABI自動シーケンサー上で配列決定した。

図7に示されるように、このデータは、フィブリノゲンへのS.aureus結合の阻害と共に、抗-C1fAモノクローナルに対する結合特異性を規定する免疫グロブリン鎖の最も可変な部分の中に、かなりの保存があるということを示す。この相同性は、3つの異なるハイブリドーマ-生成融合物(fusions)(12、13および35)から表される；C1f-A抗原の作成のように変わりやすい条件下における、融合の前の免疫の方法およびシーケンス。特に、このデータは、本発明の抗体の可変軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3領域における保存領域と同様に、C1fAに結合するモノクローナル抗体の可変重鎖のCDR1およびCDR2領域におけるコンセンサス(consensus)保存領域を明らかにした。このデータは、したがって、保存配列を有する抗体の調製は、同一の結合特性を有すべきであることを示し、したがって本発明の範囲に含まれる。

【0124】

したがって、本発明によれば、C1fAに結合する抗体を、図8のコンセンサス中に示される、同一の主要なCDR領域を有する可変軽または重鎖を使用して調製することができる。特に、これらの抗体は、配列RYSVHを含むCDR1領域、および／または配列MIWG G G N T D Y N S A L K Sを含むCDR2領域である可変重鎖を有し、ならびに配列K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L Aを含むCDR1領域、配列W A S T R E Sを含むCDR2領域、および／または配列H Q Y L S S Y Tを含むCDR3領域を有する可変軽鎖を含むものを包含する。

10

20

30

40

50

実施例 13 . 前 - 臨床および臨床使用のためのヒト化 12 - 9 の発現

重および軽免疫グロブリンポリペプチド鎖の同時発現のため、2つの遺伝子を、別々の h CMV - MIE プロモーターの制御下にある各遺伝子を有する単独プラスミド中にクローニングした。この二重遺伝子ベクターは、単独のトランスフェクションイベントにおいて、宿主細胞中への導入のための GS 選択マーカー (Lonza ; S though, UK) の単独コピーを保持する。細胞を、製造業者によって示される条件下で、Fugene - 6 (Roche) を使用してトランスフェクションした。上清を、一時的 (transient) または安定的 (stable) 由来の細胞系から試験し、そしてマウスおよびキメラ由来 12 - 9 と比較した。

【0125】

本実施例は、ヒト化 12 - 9 を、ヒト化し、クローニングし、そして商業的な規模の質および純度を產生することができ、単独発現力セットを発現し得るということを示す。

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図 1】図 1 は、ウサギ抗 - マウス Fc (RAM - Fc) 抗体を用いて、本発明に従うモノクローナル抗体 13 - 1 または 13 - 2 がチップへ結合される場合の C1fA 結合およびそれに続くフィブリノゲンの結合 / 阻害を測定するために使用されるビアコア分析 (biacore analysis) のグラフである。

【図 2】図 2 は、本発明に従うキメラモノクローナル抗体 12 - 9 のビアコア分析のグラフである。

【図 3】図 3 は、S. aureus (Strain Newman) への結合を示すモノクローナル抗体キメラ 12 - 9 のフローサイトメトリー分析のグラフである。

【図 4】図 4 は、本発明に従うキメラおよびヒト化モノクローナル抗体 12 - 9 の C1fA に対する結合親和性を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、Staphylococcus aureus マウス致死チャレンジモデルに対する保護を示すグラフである。

【図 6】本発明のモノクローナル抗体を用いて、固定化フィブリノゲンへの S. aureus 付着の細胞全体の阻害を示すグラフである。

【図 7】本発明に従う 12 - 9 マウス、12 - 9 キメラ、および 12 - 9 ヒト化モノクローナル抗体を用いる S. aureus の比較結合を示すグラフである。

【図 8】CDR1、CDR2 および CDR3 領域において保存配列を示す本発明のモノクローナル抗体の可変重鎖および可変軽鎖配列の図である。

10

20

30

【図1】

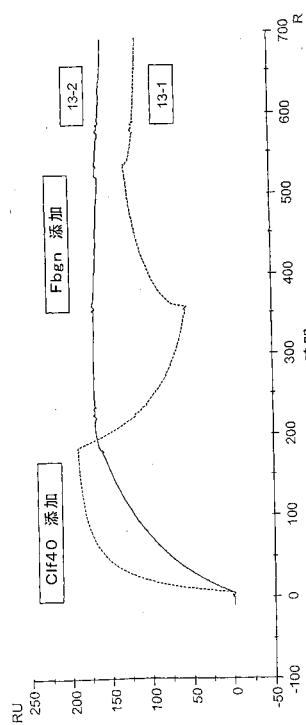


FIG. 1

【図2】

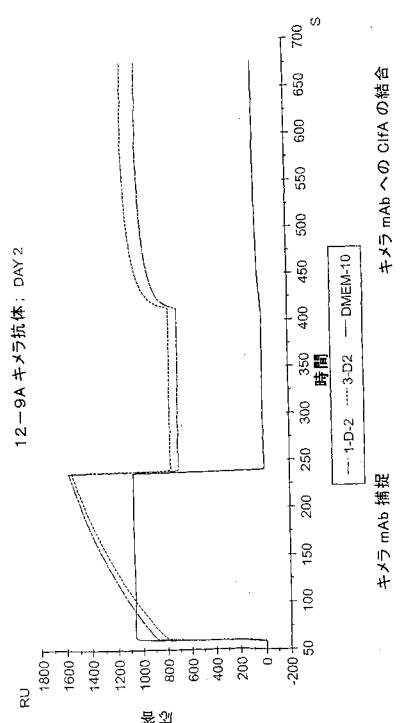


FIG. 2

【図3】

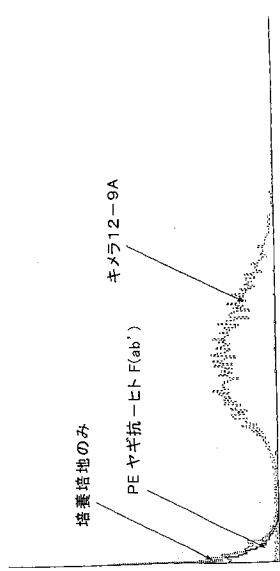


FIG. 3

【図4】

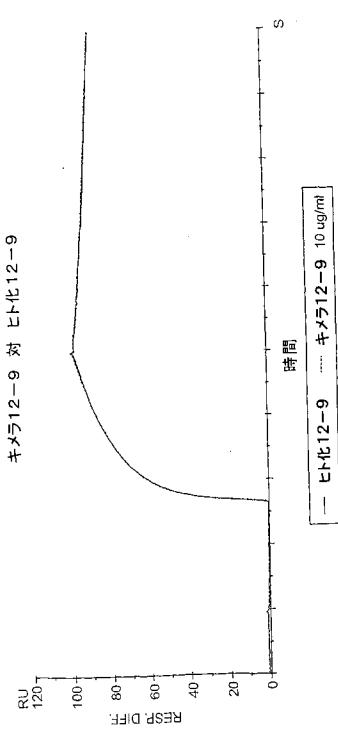


FIG. 4

【図5】

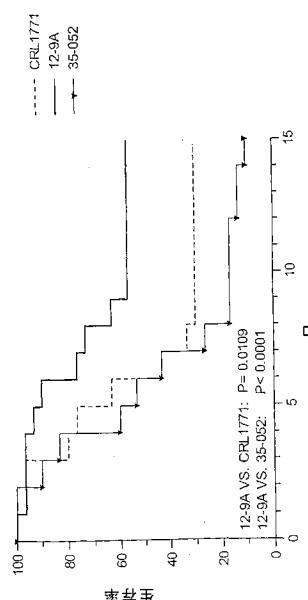


FIG. 5

【図6】

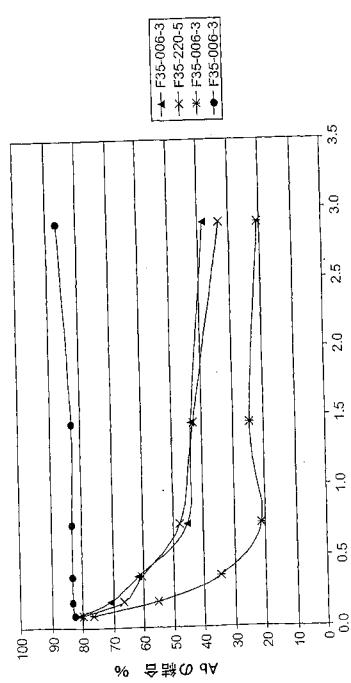


FIG. 6

【図7】

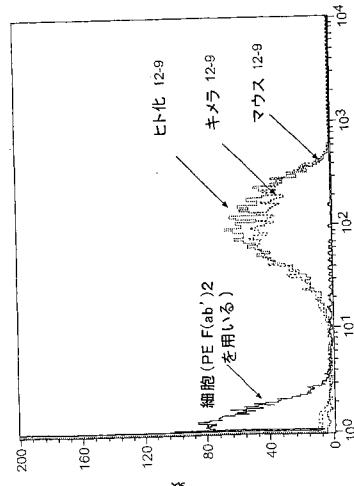


FIG. 7

【図8】

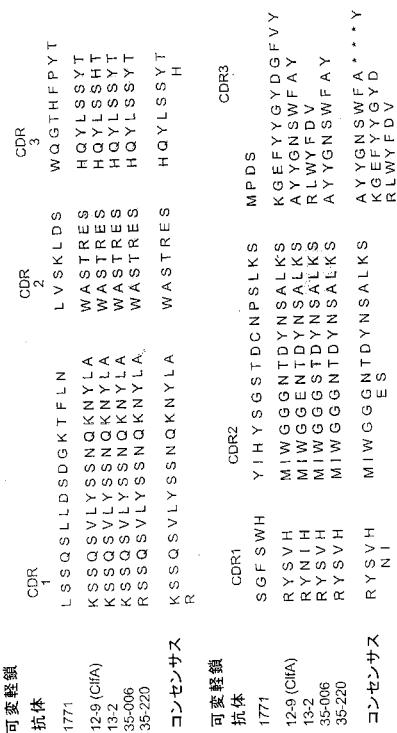


FIG. 8

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072600 A2

(51) International Patent Classification: C07K (74) Agent: SCHULMAN, Aaron, B.; Larson & Taylor, PLC, 1199 North Fairfax Street, Suite 900, Alexandria, VA 22314 (US)

(21) International Application Number: PCT/US02/02296

(22) International Filing Date: 28 January 2002 (28.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,072 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/274,611 12 March 2001 (12.03.2001) US
60/298,413 18 June 2001 (18.06.2001) US
60/308,116 30 July 2001 (30.07.2001) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AU, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, Tl, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) Applicant: INHIBITEX, INC. [US/US]; 8995 Westside Parkway, Alpharetta, GA 30004 (US).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/072600 A2

(54) Title: MONOClonal ANTIBODIES TO THE C1FA PROTEIN AND METHOD OF USE IN TREATING OR PREVENTING INFECTIONS

(57) Abstract: Monoclonal antibodies which can bind to the C1FA protein and which are generated from binding subdomains or active fragments of the C1FA protein from *Staphylococcus aureus*, including the active fragments proteins from its fibrinogen binding domain such as C1F40 protein, the C1B3 protein, or C1FA N3, are provided which can be useful in the treatment and protection against infection from staphylococcal bacteria such as *Staphylococcus aureus*. In addition, medical instruments can be treated using the monoclonal antibodies of the invention in order to reduce or eliminate the possibility of their becoming infected or further spreading the infection. In particular, the antibodies of the present invention are advantageous because they can prevent adherence of the bacteria to host cells by impairing or inhibiting the ability of *S. aureus* C1FA to bind to fibrinogen or fibrin, and thus can be utilized in methods of treating or preventing staphylococcal infections.

WO 02/072600

PCT/US02/02296

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

Cross Reference to Related Applications

- The present application claims the benefit of U.S. provisional applications
5 Ser. No. 60/308,116, filed July 30, 2001, Ser. No. 60/298,413, filed June 18, 2001,
Ser. No. 60/274,611, filed March 12, 2001, and Ser. No. 60/264,072, filed January
26, 2001.

Field of the Invention

- 10 The present invention relates in general to antibodies that have been
generated against clumping factor A (or ClfA), a surface localized protein expressed
in *Staphylococcus aureus* and other staphylococcus bacteria, and in particular to
monoclonal antibodies against the ClfA protein and its active fragments or proteins
from its fibrinogen binding domain such as Clf40, Clf33, or ClfA N3, and their use in
15 inhibiting the binding of the ClfA protein to fibrinogen or fibrin and treating or
preventing *S. aureus* infections.

Background of the Invention

- The successful colonization of the host is a process required for most
20 microorganisms to cause infections in animals and humans. Microbial adhesion is
the first crucial step in a series of events that can eventually lead to disease.
Pathogenic microorganisms colonize the host by attaching to host tissues or serum
conditioned implanted biomaterials, such as catheters, artificial joints, and vascular
grafts, through specific adhesins present on the surface of the bacteria.
25 MSCRAMM™s (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix
Molecules) are a family of cell surface adhesins that recognize and specifically bind
to distinct components in the host's extracellular matrix. Once the bacteria have
successfully adhered and colonized host tissues, their physiology is dramatically
altered and damaging components such as toxins and proteolytic enzymes are
30 secreted. Moreover, adherent bacteria often produce a biofilm and quickly become
more resistant to the killing effect of most antibiotics.

S. aureus causes a spectrum of infections that range from cutaneous lesions such as wound infections, impetigo, and furuncles to life-threatening conditions that include pneumonia, septic arthritis, sepsis, endocarditis, and biomaterial related infections. *S. aureus* is known to express a repertoire of different MSCRAMMs that

5 can act individually or in concert to facilitate microbial adhesion to specific host tissue components. MSCRAMMs provide an excellent target for immunological attack by antibodies, in particular monoclonal antibodies. The presence of the appropriate anti-MSCRAMM high affinity antibodies can have a double-edged attack, first the antibodies can prevent microbial adherence and second the

10 increased levels of MSCRAMM antibodies facilitate a rapid clearance of the organism from the body through opsonophagocytic killing.

However, it has still remained a problem to identify and utilize the information concerning MSCRAMM™s from *S. aureus* such as the ClfA protein to generate effective monoclonal antibodies because of the variability in the binding properties

15 of the different MSCRAMM™s and their role in infectivity and spread of bacterial infections. In particular, it has been a problem to develop monoclonal antibodies which can bind to ClfA and which can be used to inhibit or impair the binding of staphylococcal ClfA to fibrinogen or fibrin and thus be useful in methods of preventing or treating staphylococcal infections. It has thus remained a highly

20 desirable goal in the field of infectious diseases to develop monoclonal antibodies and other compositions which are successful in treating and preventing a wide variety of staph infections, particularly by inhibiting or impairing the bacteria's ability to bind to fibrinogen or fibrin.

25

Summary of the Invention

Accordingly, it is an object of the present invention to provide monoclonal antibodies that can bind to the *S. aureus* ClfA protein and thus be useful in methods to treat or prevent staphylococcal infections.

It is also an object of the present invention to provide monoclonal antibodies which are able to bind ClfA, and which are generated from the binding subdomains of the *S. aureus* ClfA protein, including the Clf40, Clf33 and ClfA N3 proteins, or active portions thereof, to be utilized in methods of treating or protecting against 5 staphylococcal infections.

It is also an object of the present invention to provide a monoclonal antibodies to the Clf40, Clf33 and ClfA N3 proteins which can be useful in preventing adherence of Staphylococcal bacteria by inhibiting or impairing the binding of the ClfA protein to fibrinogen or fibrin.

10 It is a further object of the present invention to provide antibodies and antisera which can recognize the fibrinogen binding A domain of the ClfA protein and which can thus be useful in methods of treating, preventing, identifying or diagnosing staphylococcal infections.

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

It is still further an object of the present invention to provide a monoclonal antibody to ClfA which is protective against infection from *S. aureus*, and which can achieve cross-reactivity against other types of staph infection.

20 These and other objects are provided by virtue of the present invention which comprises the isolation and use of monoclonal antibodies to the ClfA protein and/or its binding subdomains, including the proteins Clf40, Clf33, and ClfA N3, for the prevention and treatment of *Staphylococcus* infections. The present application thus describes the discovery, production, characterization, and in vivo evaluation of 25 monoclonal antibodies against ClfA, a surface localized protein expressed by virtually every *S. aureus* strain. Data presented here clearly demonstrate that monoclonal antibodies against ClfA and its active subdomains such as Clf40, Clf33 and N3 can be used to treat or protect against *S. aureus* infections.

25 The discovery and isolation of anti-ClfA monoclonal antibodies in accordance 30 with the present invention can thus be used to impair or inhibit binding of the ClfA

protein to fibrinogen or fibrin and thus be useful in methods or treating or preventing staph infections. In accordance with the invention, suitable compositions and vaccines based on the isolated ClfA protein subdomains and antibodies raised thereto, as well as methods for their use, are also contemplated.

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

10

Brief Description of the Drawing Figures

Figure 1 is a graph of a biacore analysis used to measure ClfA binding and subsequent binding/inhibition of fibrinogen when monoclonal antibodies 13-1 or 13-2 in accordance with the present invention are bound to a chip using rabbit anti-

15 mouse Fc (RAM-Fc) antibody.

Figure 2 is a graph of a biacore analysis of the Chimeric monoclonal antibody 12-9 in accordance with the present invention.

Figure 3 is a graph of a flow cytometric analysis of monoclonal antibody Chimeric 12-9 showing binding to *S. aureus* (Strain Newman).

20 Figure 4 is a graph showing binding affinity to ClfA of Chimeric and Humanized monoclonal antibody 12-9 in accordance with the invention.

Figure 5 is a graph showing the protection against *Staphylococcus aureus* murine lethal challenge model.

25 Figure 6 is a graph showing the whole cell inhibition of *S. aureus* adherence to immobilized fibrinogen using the monoclonal antibodies of the present invention.

Figure 7 is a graph showing the comparative binding of *S. aureus* using the 12-9 murine, 12-9 chimeric, and 12-9 humanized monoclonal antibodies in accordance with the present invention.

Figure 8 is a depiction of the variable heavy chain and variable light sequences of the monoclonal antibodies of the present invention showing the conserved sequences in the CDR1, CDR2 and CDR3 regions.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

In accordance with the present invention, there are provided monoclonal antibodies which can bind to the ClfA protein of *S. aureus*, and these monoclonal antibodies have been raised against active binding subdomain proteins including 10 Clf40, Clf33, and the ClfA N3 regions which have been isolated and purified by the present inventors. The monoclonal antibodies in accordance with the invention have been shown to treat or protect against *S. aureus* infections.

Previously, McDevitt et al (McDevitt et al, 1994, Mol. Microbiol. 11, 237-248) identified a 92 kDa surface protein, from *S. aureus* strain Newman, demonstrated to 15 be responsible for the fibrinogen-dependent clumping of bacteria, and this is now disclosed in U.S. Pat. No. 6,177,084, incorporated herein by reference. The gene, designated ClfA, was cloned and sequenced, and this is disclosed in U.S. Pat. No. 6,008,341, also incorporated by reference, and this region, representing a 896 amino acid protein as predicted from the DNA sequence, mediates adherence of 20 bacteria to fibrinogen-coated surfaces, thereby identifying ClfA as a MSCRAMM™. The ClfA gene consists of a cytoplasmic domain, a transmembrane domain, an anchoring domain to the cell wall and a region (designated R) that connects the cell anchoring domains with the NH₂-terminal region A (composed of a unique 520 residue segment). The fibrinogen-binding domain of this MSCRAMM has been 25 localized to a 218-residue segment within region A. McDevitt et al (McDevitt et al, 1995, Mol. Microbiol. 16, 895-907) has shown that region A of ClfA is sufficient for the clumping phenotype.

However, previously, no one has been able to generate monoclonal antibodies to the *S. aureus* ClfA protein. Accordingly, the present invention relates 30 to an isolated and/or purified monoclonal antibody which can bind to the ClfA protein or its binding subdomains, including the Clf40, Clf33 and ClfA N3 proteins,

and which thus can be useful in methods of preventing and treating staphylococcal infection when used in amounts effective to prevent or treat such infections. These monoclonal antibodies may be produced using, e.g., the method of Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975), or other suitable ways known in the field, and 5 in addition can be prepared as chimeric, humanized, or human monoclonal antibodies in ways that would be well known in this field. Still further, monoclonal antibodies may be prepared from a single chain, such as the light or heavy chains, and in addition may be prepared from active fragments of an antibody which retain the binding characteristics (e.g., specificity and/or affinity) of the whole antibody. By 10 active fragments is meant an antibody fragment which has the same binding specificity as a complete antibody which binds to the ClfA protein, and the term "antibody" as used herein is meant to include said fragments. Additionally, antisera prepared using monoclonal or polyclonal antibodies in accordance with the invention are also contemplated and may be prepared in a number of suitable ways 15 as would be recognized by one skilled in the art.

As indicated above, antibodies to ClfA may be prepared in a number of suitable ways that would be well known in the art, such as the well-established Kohler and Milstein method described above which can be utilized to generate monoclonal antibodies. In one such method, mice are injected intraperitoneally 20 once a week for a prolonged period with a purified recombinant ClfA protein, or isolated subdomain protein such as Clf40, Clf33, or ClfA N3, or an active portion thereof, followed by a test of blood obtained from the immunized mice to determine reactivity to the purified ClfA. Following identification of mice reactive to ClfA, lymphocytes isolated from mouse spleens are fused to mouse myeloma cells to 25 produce hybridomas positive for the antibodies against ClfA which are then isolated and cultured, following purification and isotyping.

In order to generate monoclonal antibodies in accordance with the invention, it is thus preferred that these be generated using recombinantly prepared ClfA, Clf40, Clf33 or N3 proteins using conventional methods well known in the art. For

example, one such method employs the use of *E. coli* expression vector pQE-30 as an expression vector for cloning and expressing recombinant proteins and peptides.

Using PCR, the A domain of *CifA* (*Cif40* representing AA 40-559 or *Cif33* representing AA 221-550) was amplified from *S. aureus* Newman genomic DNA and subcloned into the *E. coli* expression vector pQE-30 (Qiagen), which allows for the expression of a recombinant fusion protein containing six histidine residues. This vector was subsequently transformed into the *E. coli* strain ATCC 55151, grown in a 15-liter fermentor to an optical density (OD_{600}) of 0.7 and induced with 0.2 mM isopropyl-1-beta-D galactoside (IPTG) for 4 hours. The cells were harvested using an AG Technologies hollow-fiber assembly (pore size of 0.45 μ m) and the cell paste frozen at -80° C. Cells were lysed in 1X PBS (10mL of buffer/1 g of cell paste) using 2 passes through the French Press @ 1100psi. Lysed cells were spun down at 17,000rpm for 30 minutes to remove cell debris. Supernatant was passed over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M $NiCl_2$. After loading, the column was washed with 5 column volumes of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl (Buffer A). Protein was eluted using a 0-100% gradient of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 200mM imidazole (Buffer B) over 30 column volumes. *Cif40* or *Cif33* eluted at ~13% Buffer B (~26mM imidazole). Absorbance at 280nm was monitored. Fractions containing *Cif40* or *Cif33* were dialyzed in 1x PBS.

The protein was then put through an endotoxin removal protocol. Buffers used during this protocol were made endotoxin free by passing over a 5-mL Mono-Q sepharose (Pharmacia) column. Protein was divided evenly between 4x 15mL tubes. The volume of each tube was brought to 9mL with Buffer A. 1mL of 10% Triton X-114 was added to each tube and incubated with rotation for 1 hour at 4°C.

Tubes were placed in a 37°C water bath to separate phases. Tubes were spun down at 2,000rpm for 10 minutes and the upper aqueous phase from each tube was collected and the detergent extraction repeated. Aqueous phases from the 2nd extraction were combined and passed over a 5-mL IDA chelating (Sigma) column, charged with 0.1M $NiCl_2$ to remove remaining detergent. The column was washed with 9 column volumes of Buffer A before the protein was eluted with 3 column

volumes of Buffer B. The eluant was passed over a 5-mL Detoxigel (Sigma) column and the flow-through collected and reapplied to the column. The flow-through from the second pass was collected and dialyzed in 1x PBS. The purified product was analyzed for concentration, purity and endotoxin level before administration into the 5 mice.

The amino acid sequence for Clf40 obtained in this manner is shown herein as SEQ ID NO:2, and is encoded by nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO:1, or degenerates thereof. In addition, the amino acid sequence for Clf33 obtained in this manner is shown herein as SEQ ID NO:4, and is encoded by 10 nucleic acids having the sequence as set forth in SEQ ID NO:3, or degenerates thereof.

In accordance with the invention, following isolation of the ClfA protein or its active subdomains such as Clf40, Clf33 or ClfA N3, monoclonal antibodies to these proteins can be produced by a number of suitable ways. For example, in one 15 preferred method, the purified Clf40 and Clf33 proteins were used to generate a panel of murine monoclonal antibodies. Briefly, a group of Balb/C mice received a series of subcutaneous immunizations of 50 g of Clf40 or Clf33 protein in solution or mixed with adjuvant as described below:

Injection	Day	Amount (μg)	Route	Adjuvant
20 Primary	0	50	Subcutaneous	Freund's Complete
Boost #1	14	5(Clf40) 10(Clf33)	Intravenous	PBS

Three days after the final boost, the spleens were removed, teased into a 25 single cell suspension and the lymphocytes harvested. The lymphocytes were then fused to a SP2/0-Ag14 myeloma cell line (ATCC #1581). Cell fusion, subsequent plating and feeding were performed according to the Production of Monoclonal Antibodies protocol from Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2.).

Any clones that were generated from the fusion were then screened for 30 specific anti-Clf40 antibody production using a standard ELISA assay. Positive

clones were expanded and tested further. Fifteen positive clones were originally identified and cloned by limiting dilution for further characterization. Single cell clones were tested for activity in a direct binding ELISA, a modified ELISA to measure inhibition of fibrinogen binding to CLF40, whole bacterial cell binding by flow cytometry and affinity for Clf40 binding by Biacore analysis.

5 *S. aureus* bacterial samples (strains Barnett, 67-0, ATCC#25923 and ATCC#49230) were collected, washed and incubated with Mab 13-2, 12-9, 13-1 or PBS alone (control) at a concentration of 2 mg/ml after blocking protein A sites with rabbit IgG (50 mg/ml). Following incubation with antibody, bacterial cells were 10 incubated with Goat-F_{(ab')2}-Anti-Mouse-F_{(ab')2}-FITC which served as the detection antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through the FACScaliber flow cytometer to analyze fluorescence emission (excitation: 488, emission: 570). For each bacterial strain, 10,000 events were collected and measured.

15 High binding 96 well plates were coated with 1 mg/ml solution of Clf40 in PBS (pH 7.4), covered, and incubated at room temperature for 2 hours. Plates were then washed with PBS, 0.05% Tween 20 and blocked with 1% BSA solution for 1 hour at room temperature. Following washing, monoclonal antibody supernatant was added and plates were incubated for 1 hour at room temperature.

20 Plates were then washed and 0.1 mg/ml human fibrinogen solution was added to each well. Plates were incubated for 1 hour at room temperature and washed. Sheep anti-fibrinogen AP conjugate was added at a 1:750 dilution in PBS, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. Plates were then washed and pNPP (developing solution) was added at a final 25 concentration of 1 mg/ml. Plates were incubated 15-30 minutes at 37 °C and results were read at 405 nm and analyzed using Perkin Elmer HTS 7000 Bio-Assay reader.

Kinetic analysis was performed on a Biacore 3000 using the Ligand capture 30 method included in the software. A rabbit anti-mouse-Fc antibody (Biacore) was amine coupled to a CM5 chip. The monoclonal antibody being analyzed was then

passed over the chip, allowing binding to the Fc portion. Varying concentrations of the Clf40 or Clf33 protein were then passed over the chip surface and data collected. Using the Biacore provided Evaluation software (Version 3.1), k_{on} and k_{off} were measured and K_A and K_D were calculated.

5 As shown in data below, immunizations to generate monoclonal antibodies in accordance with the present invention directed to Clf40 or active portions of Clf40 (N2N3 or N3 regions) have yielded monoclonal antibodies with different and diverse reactivity and cross-reactivity profiles.

10 Although production of antibodies using recombinant forms of the ClfA protein is preferred, antibodies may be generated from natural isolated and purified ClfA proteins or regions as well, and monoclonal or polyclonal antibodies can be generated using the natural ClfA proteins or active regions in the same manner as described above to obtain such antibodies. Still other conventional ways are available to generate the ClfA antibodies of the present invention using recombinant 15 or natural purified ClfA proteins or its active regions, as would be recognized by one skilled in the art.

15 As would be recognized by one skilled in the art, the antibodies of the present invention may also be formed into suitable pharmaceutical compositions for administration to a human or animal patient in order to treat or prevent an infection 20 caused by staphylococcal bacteria. Pharmaceutical compositions containing the antibodies of the present invention, or effective fragments thereof, may be formulated in combination with any suitable pharmaceutical vehicle, excipient or carrier that would commonly be used in this art, including such as saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, other therapeutic compounds, and combinations thereof. 25 As one skilled in this art would recognize, the particular vehicle, excipient or carrier used will vary depending on the patient and the patient's condition, and a variety of modes of administration would be suitable for the compositions of the invention, as would be recognized by one of ordinary skill in this art. Suitable methods of administration of any pharmaceutical composition disclosed in this application 30 include, but are not limited to, topical, oral, anal, vaginal, intravenous,

intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal and intradermal administration.

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

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

15 The antibody compositions of the present invention which are generated against the ClfA protein or its effective subdomains such as Clf40, Clf33 or N3 may also be administered with a suitable adjuvant in an amount effective to enhance the immunogenic response against the conjugate. For example, suitable adjuvants may include alum (aluminum phosphate or aluminum hydroxide), which is used 20 widely in humans, and other adjuvants such as saponin and its purified component Quil A, Freund's complete adjuvant, RIBBI adjuvant, and other adjuvants used in research and veterinary applications. Still other chemically defined preparations such as muramyl dipeptide, monophosphoryl lipid A, phospholipid conjugates such as those described by Goodman-Snitkoff *et al.* *J. Immunol.* 147:410-415 (1991) and 25 incorporated by reference herein, encapsulation of the conjugate within a proteoliposome as described by Miller *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1739-1744 (1992) and incorporated by reference herein, and encapsulation of the protein in lipid vesicles such as Novasome™ lipid vesicles (Micro Vascular Systems, Inc., Nashua, NH) may also be useful.

In any event, the antibody compositions of the present invention will thus be useful for interfering with, modulating, inhibiting binding interactions between ClfA on staphylococcal bacteria and fibrinogen on host cells and tissues, or in displacing staphylococcal bacteria which has become bound to fibrinogen associated with host 5 cells and tissues. Accordingly, the present invention will have particular applicability in developing compositions and methods of preventing or treating staphylococcal infection, and in inhibiting binding of staphylococcal bacteria to host tissue and/or cells.

In accordance with the present invention, methods are provided for 10 preventing or treating a staphylococcal infection which comprise administering an effective amount of an antibody to the ClfA protein or its active subregions such as Clf40, Clf33 or N3 as described above in amounts effective to treat or prevent the infection. In addition, these monoclonal antibodies have been shown to be useful in impairing the binding of staphylococcal bacteria to fibrinogen or fibrin, and have 15 thus proved effective in treating or preventing infection from staph bacteria such as *S. aureus*. Even further, the antibodies in accordance with the invention are doubly effective in that they have been shown to be cross-reactive across a wide variety of *S. aureus* strains which will thus improve the effectiveness and efficiency of compositions based on the monoclonals of the present invention.

Accordingly, in accordance with the invention, administration of the 20 antibodies of the present invention in any of the conventional ways described above (e.g., topical, parenteral, intramuscular, etc.), and will thus provide an extremely useful method of treating or preventing staphylococcal infections in human or animal patients. By effective amount is meant that level of use, such as of an 25 antibody titer, that will be sufficient to either prevent adherence of the bacteria, to inhibit binding of staph bacteria to host cells and thus be useful in the treatment or prevention of a staph infection. As would be recognized by one of ordinary skill in this art, the level of antibody titer needed to be effective in treating or preventing staphylococcal infection will vary depending on the nature and condition of the 30 patient, and/or the severity of the pre-existing staphylococcal infection.

In addition to the use of antibodies to the CifA protein and the regions in the A domain of that protein to treat or prevent *S. aureus* infection as described above, the present invention contemplates the use of these antibodies in a variety of ways, including the detection of the presence of *S. aureus* to diagnose a staph infection, 5 whether in a patient or on medical equipment which may also become infected. In accordance with the invention, a preferred method of detecting the presence of staph infections involves the steps of obtaining a sample suspected of being infected by one or more staphylococcal bacteria species or strains, such as a sample taken from an individual, for example, from one's blood, saliva, tissues, 10 bone, muscle, cartilage, or skin. The cells can then be lysed, and the DNA extracted, precipitated and amplified. Following isolation of the sample, diagnostic assays utilizing the antibodies of the present invention may be carried out to detect the presence of *S. aureus*, and such assay techniques for determining such presence in a sample are well known to those skilled in the art and include methods 15 such as radioimmunoassay, Western blot analysis and ELISA assays. In general, in accordance with the invention, a method of diagnosing an *S. aureus* infection is contemplated wherein a sample suspected of being infected with *S. aureus* infection has added to it a CifA protein antibody in accordance with the present invention, and *S. aureus* is indicated by antibody binding to the CifA proteins in the 20 sample.

Accordingly, antibodies in accordance with the invention may be used for the specific detection of staphylococcal map proteins, for the prevention of infection from staph bacteria, for the treatment of an ongoing infection, or for use as research tools. The term "antibodies" as used herein includes monoclonal, polyclonal, 25 chimeric, single chain, bispecific, simianized, and humanized or primatized antibodies as well as Fab fragments, such as those fragments which maintain the binding specificity of the antibodies to the CifA proteins, including the products of an Fab immunoglobulin expression library. Accordingly, the invention contemplates the use of single chains such as the variable heavy and light chains of the 30 antibodies as will be set forth below. Generation of any of these types of antibodies

or antibody fragments is well known to those skilled in the art. In the present case, monoclonal antibodies to ClfA proteins have been generated and isolated and shown to protect against staphylococcal infection.

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

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

Antibodies to ClfA as described above may also be used in production facilities or laboratories to isolate additional quantities of the proteins, such as by affinity chromatography. For example, the antibodies of the invention may also be utilized to isolate additional amounts of the ClfA protein or its active fragments.

The isolated antibodies of the present invention, or active fragments thereof, may also be utilized in the development of vaccines for passive immunization against staph infections. Further, when administered as pharmaceutical composition to a wound or used to coat medical devices or polymeric biomaterials *in vitro* and *in vivo*, the antibodies of the present invention, may be useful in those cases where there is a previous staph infection because of the ability of this antibody to further restrict and inhibit *S. aureus* binding to fibrinogen or fibrin and thus limit the extent and spread of the infection. In addition, the antibody may be

modified as necessary so that, in certain instances, it is less immunogenic in the patient to whom it is administered. For example, if the patient is a human, the antibody may be "humanized" by transplanting the *complimentarity determining regions* of the hybridoma-derived antibody into a human monoclonal antibody as described, e.g., by Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986) or Tempest *et al.* *Biotechnology* 9:266-273 (1991) or "veneered" by changing the surface exposed murine framework residues in the immunoglobulin variable regions to mimic a homologous human framework counterpart as described, e.g., by Padlan, *Molecular Imm.* 28:489-498 (1991), these references incorporated herein by reference. Even further, when so desired, the monoclonal antibodies of the present invention may be administered in conjunction with a suitable antibiotic to further enhance the ability of the present compositions to fight bacterial infections.

Medical devices or polymeric biomaterials to be coated with the antibodies, proteins and active fragments described herein include, but are not limited to, staples, sutures, replacement heart valves, cardiac assist devices, hard and soft contact lenses, intraocular lens implants (anterior chamber or posterior chamber), other implants such as corneal inlays, kerato-prostheses, vascular stents, epikeratophalia devices, glaucoma shunts, retinal staples, scleral buckles, dental prostheses, thyroplastic devices, laryngoplastastic devices, vascular grafts, soft and hard tissue prostheses including, but not limited to, pumps, electrical devices including stimulators and recorders, auditory prostheses, pacemakers, artificial larynx, dental implants, mammary implants, penile implants, crano/facial tendons, artificial joints, tendons, ligaments, menisci, and disks, artificial bones, artificial organs including artificial pancreas, artificial hearts, artificial limbs, and heart valves; stents, wires, guide wires, intravenous and central venous catheters, laser and balloon angioplasty devices, vascular and heart devices (tubes, catheters, balloons), ventricular assists, blood dialysis components, blood oxygenators, urethral/ureteral/urinary devices (Foley catheters, stents, tubes and balloons), airway catheters (endotracheal and tracheostomy tubes and cuffs), enteral feeding tubes (including nasogastric, intragastric and jejunal tubes), wound drainage tubes,

tubes used to drain the body cavities such as the pleural, peritoneal, cranial, and pericardial cavities, blood bags, test tubes, blood collection tubes, vacutainers, syringes, needles, pipettes, pipette tips, and blood tubing.

It will be understood by those skilled in the art that the term "coated" or 5 "coating", as used herein, means to apply the antibody or active fragment, or pharmaceutical composition derived therefrom, to a surface of the device, preferably an outer surface that would be exposed to streptococcal bacterial infection. The surface of the device need not be entirely covered by the protein, antibody or active fragment.

10 In a preferred embodiment, the antibodies may also be used as a passive vaccine which will be useful in providing suitable antibodies to treat or prevent a staphylococcal infection. As would be recognized by one skilled in this art, a vaccine may be packaged for administration in a number of suitable ways, such as by parenteral (i.e., intramuscular, intradermal or subcutaneous) administration or 15 nasopharyngeal (i.e., intranasal) administration. One such mode is where the vaccine is injected intramuscularly, e.g., into the deltoid muscle, however, the particular mode of administration will depend on the nature of the bacterial infection to be dealt with and the condition of the patient. The vaccine is preferably combined with a pharmaceutically acceptable carrier to facilitate administration, and 20 the carrier is usually water or a buffered saline, with or without a preservative. The vaccine may be lyophilized for resuspension at the time of administration or in solution.

The preferred dose for administration of an antibody composition in accordance with the present invention is that amount will be effective in preventing 25 of treating a staphylococcal infection, and one would readily recognize that this amount will vary greatly depending on the nature of the infection and the condition of a patient. As indicated above, an "effective amount" of antibody or pharmaceutical agent to be used in accordance with the invention is intended to mean a nontoxic but sufficient amount of the agent, such that the desired 30 prophylactic or therapeutic effect is produced. As will be pointed out below, the

exact amount of the antibody or a particular agent that is required will vary from subject to subject, depending on the species, age, and general condition of the subject, the severity of the condition being treated, the particular carrier or adjuvant being used and its mode of administration, and the like. Accordingly, the "effective amount" of any particular antibody composition will vary based on the particular circumstances, and an appropriate effective amount may be determined in each case of application by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation. The dose should be adjusted to suit the individual to whom the composition is administered and will vary with age, weight and metabolism of the individual. The compositions may additionally contain stabilizers or pharmaceutically acceptable preservatives, such as thimerosal (ethyl(2-mercaptopbenzoate-S)mercury sodium salt) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

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

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

phycocyanin, rhodamine, and Texas Red. The fluorogens are generally detected by a fluorescence detector.

The location of a ligand in cells can be determined by labeling an antibody as described above and detecting the label in accordance with methods well known to 5 those skilled in the art, such as immunofluorescence microscopy using procedures such as those described by Warren and Nelson (*Mol. Cell. Biol.*, 7: 1326-1337, 1987).

As indicated above, the monoclonal antibodies of the present invention, or active portions or fragments thereof, are particularly useful for interfering with the 10 initial physical interaction between a staphylococcal pathogen responsible for infection and a mammalian host, such as the adhesion of the bacteria to mammalian extracellular matrix proteins such as fibrinogen, and this interference with the physical interaction may be useful both in treating patients and in preventing or reducing bacteria infection on in-dwelling medical devices to make 15 them safer for use.

In another embodiment of the present invention, a kit which may be useful in isolating and identifying staphylococcal bacteria and infection is provided which comprises the antibodies of the present invention in a suitable form, such as lyophilized in a single vessel which then becomes active by addition of an aqueous 20 sample suspected of containing the staphylococcal bacteria. Such a kit will typically include a suitable container for housing the antibodies in a suitable form along with a suitable immunodetection reagent which will allow identification of complexes binding to the ClfA antibodies of the invention. For example, the immunodetection reagent may comprise a suitable detectable signal or label, such as a biotin or 25 enzyme that produces a detectable color, etc., which normally may be linked to the antibody or which can be utilized in other suitable ways so as to provide a detectable result when the antibody binds to the antigen.

In short, the antibodies of the present invention which bind to the ClfA protein or active fragments thereof are thus extremely useful in treating or preventing 30 staphylococcal infections in human and animal patients and in medical or other in-

dwelling devices. Accordingly, the present invention relates to methods of identifying and isolating antibodies which can bind to ClfA and which can be used in methods of treatment of staph infections which involve opsonophagocytic killing of the bacteria. Antibodies which are identified and/or isolated using the present 5 method, such as the ClfA antibody which can bind the ClfA protein and which can prevent or treat a staph infection thus is part of the present invention

EXAMPLES

The following examples are provided which exemplify aspects of the 10 preferred embodiments of the present invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its 15 practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

Example 1. Isolation and Sequencing of Clf40 and Clf33

20 Using PCR, the A domain of ClfA (Clf40 representing AA 40-559 or Clf33 representing AA 221-550) was amplified from *S. aureus* Newman genomic DNA and subcloned into the *E. coli* expression vector PQE-30 (Qiagen), which allows for the expression of a recombinant fusion protein containing six histidine residues. This vector was subsequently transformed into the *E. coli* strain ATCC 55151, 25 grown in a 15-liter fermentor to an optical density (OD₆₀₀) of 0.7 and induced with 0.2 mM isopropyl-1-beta-D galactoside (IPTG) for 4 hours. The cells were harvested using an AG Technologies hollow-fiber assembly (pore size of 0.45 μm) and the cell paste frozen at -80° C. Cells were lysed in 1X PBS (10mL of buffer/1 g of cell paste) using 2 passes through the French Press @ 1100psi. Lysed cells were spun 30 down at 17,000rpm for 30 minutes to remove cell debris. Supernatant was passed

over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M NiCl₂. After loading, the column was washed with 5 column volumes of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl (Buffer A). Protein was eluted using a 0-100% gradient of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 200mM imidazole (Buffer B) over 30 column volumes. Clf40 5 or Clf33 eluted at ~13% Buffer B (~26mM imidazole). Absorbance at 280nm was monitored. Fractions containing Clf40 or Clf33 were dialyzed in 1x PBS.

The protein was then put through an endotoxin removal protocol. Buffers used during this protocol were made endotoxin free by passing over a 5-mL Mono-Q sepharose (Pharmacia) column. Protein was divided evenly between 4x 15mL 10 tubes. The volume of each tube was brought to 9mL with Buffer A. 1mL of 10% Triton X-114 was added to each tube and incubated with rotation for 1 hour at 4°C. Tubes were placed in a 37°C water bath to separate phases. Tubes were spun down at 2,000rpm for 10 minutes and the upper aqueous phase from each tube 15 was collected and the detergent extraction repeated. Aqueous phases from the 2nd extraction were combined and passed over a 5-mL IDA chelating (Sigma) column, charged with 0.1M NiCl₂ to remove remaining detergent. The column was washed with 9 column volumes of Buffer A before the protein was eluted with 3 column 20 volumes of Buffer B. The eluant was passed over a 5-mL Detoxigel (Sigma) column and the flow-through collected and reappplied to the column. The flow-through from the second pass was collected and dialyzed in 1x PBS. The purified product was analyzed for concentration, purity and endotoxin level before administration into the mice.

The protein and nucleic acid sequences are included below. The Clf40 amino acid sequence is included below as SEQ ID NO:2, and this is coded for by 25 the nucleic acid sequence SEQ ID NO:1, and would also be coded by degenerates thereto. The Clf33 amino acid sequence is included below as SEQ ID NO:4, and this is coded for by the nucleic acid sequence SEQ ID NO:3, and would also be coded by degenerates thereto.

Example 2. Monoclonal Antibody Production Using Clf40 and Clf33

The purified Clf40 or Clf33 protein was used to generate a panel of murine monoclonal antibodies. Briefly, a group of Balb/C mice received a series of subcutaneous immunizations of 50 µg of Clf40 or Clf33 protein in solution or mixed 5 with adjuvant as described below in Table I:

Table I:

Injection	Day	Amount (µg)	Route	Adjuvant
Primary	0	50	Subcutaneous	Freund's Complete
10 Boost #1	14	5(Clf40) 10(Clf33)	Intravenous	PBS

Three days after the final boost, the spleens were removed, teased into a single cell suspension and the lymphocytes harvested. The lymphocytes were then 15 fused to a SP2/0-Ag14 myeloma cell line (ATCC #1581). Cell fusion, subsequent plating and feeding were performed according to the Production of Monoclonal Antibodies protocol from Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2.).

Any clones that were generated from the fusion were then screened for 20 specific anti-Clf40 antibody production using a standard ELISA assay. Positive clones were expanded and tested further. Fifteen positive clones were originally identified and cloned by limiting dilution for further characterization. Single cell clones were tested for activity in a direct binding ELISA, a modified ELISA to measure inhibition of fibrinogen binding to CLF40, whole bacterial cell binding by flow cytometry and affinity for Clf40 binding by Biacore analysis. Test results are 25 include in Table II below:

Table II:

CIFA Mono- clonal Antibody	Binding Kinetics	Inhibition of Fbg binding	Binding to <i>S. aureus</i> Barnett	Binding to <i>S. aureus</i> 67-0	Binding to <i>S. aureus</i> ATCC #25923	Binding to <i>S. aureus</i> ATCC #49230
F12-9	$k_{on} 7.74 \times 10^5$ $k_{off} 4.46 \times 10^{-4}$ $K_D 5.76 \times 10^{-10}$	50-70%	72%	62%	60%	94%
F13-1	$k_{on} 1.11 \times 10^6$ $k_{off} 6.13 \times 10^{-3}$ $K_D 5.51 \times 10^{-8}$	0-15%	-	-	-	9%
F13-2	$k_{on} 1.19 \times 10^5$ $k_{off} 2.81 \times 10^{-4}$ $K_D 2.35 \times 10^{-9}$	40-60%	59%	65%	55%	93%

5 **Binding to Whole Bacteria**

S. aureus bacterial samples (strains Barnett, 67-0, ATCC#25923 and ATCC#49230) were collected, washed and incubated with Mab 13-2, 12-9, 13-1 or PBS alone (control) at a concentration of 2 mg/ml after blocking protein A sites with rabbit IgG (50 mg/ml). Following incubation with antibody, bacterial cells were 10 incubated with Goat-F_{(ab')2}-Anti-Mouse-F_{(ab')2}-FITC which served as the detection antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through the FACScaliber flow cytometer to analyze fluorescence emission (excitation: 488, emission: 570). For each bacterial strain, 10,000 events were collected and measured.

15

Inhibition (ELISA)

High binding 96 well plates were coated with 1 μ g/ml solution of Clf40 in PBS (pH 7.4), covered, and incubated at room temperature for 2 hours. Plates were 20 then washed with PBS, 0.05% Tween 20 and blocked with 1% BSA solution for 1 hour at room temperature. Following washing, monoclonal antibody supernatant

was added and plates were incubated for 1 hour at room temperature. Plates were then washed and 0.1 mg/ml human fibrinogen solution was added to each well. Plates were incubated for 1 hour at room temperature and washed. Sheep anti-fibrinogen AP conjugate was added at a 1:750 dilution in PBS, 0.05% Tween 20, 5 0.1% BSA and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. Plates were then washed and pNPP (developing solution) was added at a final concentration of 1 mg/ml. Plates were incubated 15-30 minutes at 37 °C and results were read at 405 nm and analyzed using Perkin Elmer HTS 7000 Bio-Assay reader.

10 **Kinetic Analysis**

Kinetic analysis was performed on a Biacore 3000 using the Ligand capture method included in the software. A rabbit anti-mouse-Fc antibody (Biacore) was amine coupled to a CM5 chip. The monoclonal antibody being analyzed was then passed over the chip, allowing binding to the Fc portion. Varying concentrations of 15 the Clf40 or Clf33 protein were then passed over the chip surface and data collected. Using the Biacore provided Evaluation software (Version 3.1), k_{on} and k_{off} were measured and K_A and K_D were calculated.

Example 3. Additional Studies of Clf40 and Clf33

20 Using PCR, the A domain of *ClfA* (Clf40 representing AA 40-559, Clf33-
N2N3 domain representing AA 221-550 or Clf-N3 domain representing AA370-559)
was amplified from *S. aureus* Newman genomic DNA and subcloned into the *E. coli*
expression vector PQE-30 (Qiagen), which allows for the expression of a
25 recombinant fusion protein containing six histidine residues. This vector was
subsequently transformed into the *E. coli* strain ATCC 55151, grown in a 15-liter
fermentor to an optical density (OD_{600}) of 0.7 and induced with 0.2 mM isopropyl-1-
beta-D galactoside (IPTG) for 4 hours. The cells were harvested using an AG
Technologies hollow-fiber assembly (pore size of 0.45 mm) and the cell paste
frozen at -80° C. Cells were lysed in 1X PBS (10mL of buffer/1 g of cell paste) using
30 2 passes through the French Press @ 1100psi. Lysed cells were spun down at

17,000rpm for 30 minutes to remove cell debris. Supernatant was passed over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M NiCl₂. After loading, the column was washed with 5 column volumes of 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl (Buffer A). Protein was eluted using a 0-100% gradient of 10mM Tris, pH 8.0, 5 100mM NaCl, 200mM imidazole (Buffer B) over 30 column volumes. Clf protein was eluted at ~13% Buffer B (~26mM imidazole). Absorbance at 280nm was monitored. Fractions containing Clf40 or Clf33 were dialyzed in 1x PBS.

The protein was then put through an endotoxin removal protocol. Buffers used during this protocol were made endotoxin free by passing over a 5-mL Mono-10 Q sepharose (Pharmacia) column. Protein was divided evenly between 4x 15mL tubes. The volume of each tube was brought to 9mL with Buffer A. 1mL of 10% Triton X-114 was added to each tube and incubated with rotation for 1 hour at 4°C. Tubes were placed in a 37°C water bath to separate phases. Tubes were spun down at 2,000rpm for 10 minutes and the upper aqueous phase from each tube 15 was collected and the detergent extraction repeated. Aqueous phases from the 2nd extraction were combined and passed over a 5-mL IDA chelating (Sigma) column, charged with 0.1M NiCl₂ to remove remaining detergent. The column was washed with 9 column volumes of Buffer A before the protein was eluted with 3 column volumes of Buffer B. The eluant was passed over a 5-mL Detoxigel (Sigma) column 20 and the flow-through collected and reapplied to the column. The flow-through from the second pass was collected and dialyzed in 1x PBS. The purified product was analyzed for concentration, purity and endotoxin level before administration into the mice.

25 **Monoclonal Antibody Production**

The purified Clf40, Clf33 or N3 protein was used to generate a panel of murine monoclonal antibodies. Briefly, a group of Balb/C or SJL mice received a series of subcutaneous immunizations of 1-10 mg of protein in solution or mixed 30 with adjuvant as described below in Table III:

Table III:

RIMMS Injection		Day	Amount (mg)	Route	Adjuvant
5	#1	0	5	Subcutaneous	FCA/RIBI
	#2	2	1	Subcutaneous	FCA/RIBI
	#3	4	1	Subcutaneous	FCA/RIBI
	#4	7	1	Subcutaneous	FCA/RIBI
	#5	9	1	Subcutaneous	FCA/RIBI
10 Conventional Injection		Day	Amount (mg)	Route	Adjuvant
15	Primary	0	5	Subcutaneous	FCA
	Boost #1	14	1	Intraperitoneal	RIBI
	Boost #2	28	1	Intraperitoneal	RIBI
	Boost #3	42	1	Intraperitoneal	RIBI

At the time of sacrifice (RIMMS) or seven days after a boost (conventional)
20 serum was collected and titrated in ELISA assays against MSCRAMMs or on whole
cells (*S. aureus* and *S. epidermidis*). Three days after the final boost, the spleens
or lymph nodes were removed, teased into a single cell suspension and the
lymphocytes harvested. The lymphocytes were then fused to a SP2/0-Ag14
25 myeloma cell line (ATCC #1581). Cell fusion, subsequent plating and feeding were
performed according to the Production of Monoclonal Antibodies protocol from
Current Protocols in Immunology (Chapter 2, Unit 2.).

Any clones that were generated from the fusion were then screened for
specific anti-ClfA0, SdrG or FnbpA antibody production using a standard ELISA
assay. Positive clones were expanded and tested further. Candidates were further
30 tested for activity in a direct binding ELISA, a modified ELISA to measure inhibition
of fibrinogen binding to CLF40, whole bacterial cell binding by flow cytometry and
ClfA0 binding / inhibition of fibrinogen-ClfA0 binding by Biacore analysis.

Biacore Analysis

35 Throughout the analysis, the flow rate remained constant at 10 ml/min. Prior
to the ClfA 40 injection, test antibody was adsorbed to the chip via RAM-Fc binding.

At time 0, ClfA 40 at a concentration of 30 mg/ml was injected over the chip for 3 min followed by 2 minutes of dissociation. This phase of the analysis measured the relative association and disassociation kinetics of the Mab / ClfA interaction. In the second phase of the analysis, the ability of the Mab bound ClfA to interact and bind 5 fibrinogen was measured. Fibrinogen at a concentration of 100 mg/ml was injected over the chip and after 3 minutes a report point is taken.

Binding to Whole Bacteria

10 Bacterial samples (Newman) were collected, washed and incubated with Mab or PBS alone (control) at a concentration of 2 mg/ml after blocking protein A sites with rabbit IgG (50 mg/ml). Following incubation with antibody, bacterial cells were incubated with Goat-F_{(ab')2}-Anti-Mouse-F_{(ab')2}-FITC which served as the detection antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through 15 the FACScaliber flow cytometer to analyze fluorescence emission (excitation: 488, emission: 570). For each bacterial strain, 10,000 events were collected and measured.

Inhibition (ELISA)

20 High binding 96 well plates were coated with 1 ug/ml solution of Clf40 in PBS (pH 7.4), covered, and incubated at room temperature for 2 hours. Plates were then washed with PBS, 0.05% Tween 20 and blocked with 1% BSA solution for 1 hour at room temperature. Following washing, monoclonal antibody supernatant 25 was added and plates were incubated for 1 hour at room temperature. Plates were then washed and 0.1 mg/ml human fibrinogen solution was added to each well. Plates were incubated for 1 hour at room temperature and washed. Sheep anti-fibrinogen AP conjugate was added at a 1:750 dilution in PBS, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. Plates were 30 then washed and pNPP (developing solution) was added at a final concentration of 1 mg/ml. Plates were incubated 15-30 minutes at 37 ° C and results were read at 405 nm and analyzed using Perkin Elmer HTS 7000 Bio-Assay reader.

Example 4. Immunization with all or portions of Clf40 generate monoclonal antibodies with different reactivity patterns.

5 Table IV below shows the results of immunization tests with the active regions of the present invention, including Clf40, Clf33 (which constitutes the N2N3 region of the ClfA A domain), and the ClfA N3 region alone.

Table IV

Reagent	Fusion	Monoclonal	Reactivity					
			EU/USA	SurG	FabpA	Blotcore	Flow Cytometry	Inhibition
1fA N3	RIMMS	F29-19	C140	Y	N	N	N	nt
includes following: 29 F30 F31 F32 34 F36		F29-71		Y	N	N	N	nt
		F29-92		Y	N	N	N	nt
		F21-20		Y	N	N	N	nt
		F31-36		Y	N	N	N	nt
		F31-100		Y	N	N	N	nt
		F31-195		Y	N	N	N	nt
		F32-22		Y	N	N	N	nt
		F34-45		Y	N	N	N	nt
		F36-77		Y	N	N	N	nt
		F36-197		Y	N	N	N	nt
1fA N2N3 (Clf33) includes following: 11 F12 F17 F18	Conventional	INH-A010001		Y	N	Y	Y	Y
		F12-3		Y	nt	Y	nt	Y
		F12-1		Y	nt	Y	nt	Y
		F12-5		Y	nt	Y	nt	Y
		F12-10		Y	nt	Y	nt	Y
1fA N2N3 (Clf33) includes following: 33 F25 F38 F40	RIMMS	F33-7		Y	N	Y	Y	nt
		F35-279		Y	N	Y	Y	nt
		F35-177		Y	N	Y	Y	nt
		F40-7		Y	N	Y	Y	nt
		F40-2		Y	N	Y	Y	nt
		F38-300		Y	N	Y	Y	nt
		F35-129		Y	N	Y	Y	nt
1f40	Conventional	INH-M000030		Y	nt	Y	Y	Y
includes following: 13 F14 F15 F16		INH-M000004		Y	nt	Y	Y	Y
		INH-M000033		Y	nt	Y	Y	Y
		F13-6		Y	nt	Y	Y	Y

N = a negative result

Y = a positive result

N = not tested

The results displayed in this table show that immunizations to generate monoclonal antibodies with Clf40 or portions of Clf40 (N2N3 or N3) yield 5 monoclonal antibodies with broad and diverse reactivity profiles and which exhibit substantial cross-reactivity across a wide variety of staphylococcal strains.

10 **Example 5: Use of the Biacore to select high affinity Mabs that block ClfA binding to Fibrinogen.**

Biacore Analysis

Throughout the experiment represented in Figure 1, the flow rate remained 15 constant at 10 ml/min. Prior to the ClfA 40 injection, 946 RU of Mab 13-1 and 768 RU of Mab 13-2 were adsorbed to the chip via RAM-Fc binding. At time 0 on the graph, ClfA 40 at a concentration of 30 mg/ml was injected over the chip for 3 min followed by 2 minutes of dissociation. The 13-1 Mab bound 58 RU of ClfA and the 20 13-2 Mab bound 168 RU of ClfA at the end of the ClfA injection time. This phase of the experiment measured the relative association and dissociation kinetics of the Mab / ClfA interaction. In the second phase of the experiment measures the ability of the Mab bound ClfA to interact and bind fibrinogen. Fibrinogen at a 25 concentration of 100 mg/ml was injected over the chip and after 3 minutes 64 RU of fibrinogen bound to the ClfA bound to Mab 13-1 but 0 RUs of fibrinogen bound to the ClfA bound to Mab 13-2.

30 **Example 6. Comparison of Mab 13.2 against *S. aureus* strain Barnett and *S. aureus* ATCC 25923**

Antibody Scale-up and Purification

Hybridoma cells were grown in RPMI/DMEM, 1X Nutridoma-SP media 35 containing 2mM sodium pyruvate, 4mM L-glutamine and 2X penicillin-streptomycin to 2-3 liter culture volumes. Hybridoma supernatants were then harvested by centrifugation. The supernatants were filtered through 0.45 μ M filters and the IgG was affinity purified using protein G chromatography. The monoclonal antibodies

were eluted using 0.1M glycine, pH 2.7 and immediately neutralized with one-tenth volume of 2M Tris, pH 8.0. The purified IgG was then dialyzed against 1X D-phosphate buffered saline, pH 7.4. If needed, the purified antibody was concentrated and aliquots frozen.

5

Staphylococcus aureus strains

S. aureus cells were taken from a frozen glycerol stock and were inoculated onto a single blood agar plate and grown for 24 hours at 37°C. Single colonies were then transferred to new blood agar plates. Eighty plates were inoculated to 10 prepare 50 mls of final frozen stock. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. Following incubation, the colonies were scraped off the surface of each plate into four 50 ml tubes containing 10 mls of 1X PBS (20 plates per tube) while gently vortexing to remove the bacteria from the scraper. An additional 10 mls of 1X PBS was then added to the 10 mls of bacterial suspension, while vigorously vortexing to 15 facilitate separation of any agar debris from the bacteria. The suspension was pelleted by centrifugation, 3500xg at 4°C for 10 minutes. The bacteria was washed in D-PBS and resuspended in 50 mls of freezing media. The bacterial stock was placed into 1 ml aliquots by snap freezing in an ethanol/dry ice bath and placed in a -80°C freezer. The concentration (CFU/ml) of the frozen stock was determined by 20 thawing 1 ml aliquot of stock, and preparing serial dilutions from 10⁻⁵ to 10⁻¹¹. Dilutions were plated in duplicate on blood agar plates and incubated for 37°C for 16-18 hours. The CFU/ml was determined (CFU/ml=(average # colonies X dilution factor)/0.050 mls) and averaged for each dilution to determine the average CFU/ml. On the day of injection, aliquots of each strain were thawed, combined into one tube 25 per strain, and vortexed.

Animal, Sex, Species, Number, Age and Source

Female Balb/C mice (5-6 weeks of age) were purchased from Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY). Animals 30 were allowed to acclimate for at least 14 days prior to initiation of treatment. Upon

arrival, the mice were examined, group housed (5 / cage) in polycarbonate shoe box cages with absorbent bedding. All mice were placed on a 12 hour light-dark cycle under the required husbandry standards found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

5

Identification and Randomization

All animals were uniquely identified using tail tattoos prior to dosing. Prior to initiation of treatment, the animals were individually weighed and their health was evaluated. Mice were randomized and assigned to treatment groups using stratified 10 body weights.

10

ClfA Specific Monoclonal Antibodies (Mab), Isotype

ClfA specific murine monoclonal antibodies were isotype using Becton Dickinson Cytometric Bead Array for Murine Isotyping. Isotype was determined 15

using flow cytometry according to the manufacturers protocol.

13.1 Clf40 Mab, IgG₁

13.2 Clf40 Mab, IgG₁

12.9 Clf33 Mab, IgG₁

20

Controls

ATTC 1771, IgG₁

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

25

Experimental Design

Table V.

Group #	No. of	TREATMENT					CHALLENGE		
		Anti-body	Dose	Route	Frequency	Time Point	Bacteria	Stock Dilution	Volume/

	Mice						tion.	Route
1	12	13-2	36 mg/kg	i.p.	Once	-18 hr.	ATCC 25923	1:20 0.1 ml/IV
2	15	CRL17 71	36 mg/kg				ATCC 25923	1:20
3	15	D-PBS	N/A				ATCC 25923	1:20
4	12	13-2	36 mg/kg				Barnett	1:20
5	15	CRL17 71	36 mg/kg				Barnett	1:20
6	15	D-PBS	N/A				Barnett	1:20

In vivo animal data

- 5 Mice were treated by intraperitoneal (IP; 0.5ml) injection with 0.5 mg of monoclonal antibody 13-2, isotype control monoclonal antibody CRL-1771, or PBS. Eighteen hours after IgG administration, the mice were challenged with a single intravenous (IV) injection of *S. aureus* strain Barnett or *S. aureus* ATCC 25923. The mice were followed for 12 days at which point all remaining mice were 10 sacrificed. Significant differences in the relative survival times between treatment groups were detected. Eighty-three percent (10/12) of the mice that received Mab 13-2, 13% (2/15) of the animals receiving CRL-1771, and 0% (0/15) that received PBS survived the bacterial challenge with *S. aureus* Barnett (13-2 vs. PBS, p<0.0001; 13-2 vs. CRL-1771, p = 0.0009). Statistical analysis of the animal data 15 was conducted using Kaplan-Meier Survival Analysis with a Mantel-Cox (logrank) test. In the experiment where *S. aureus* ATCC 25923 was the bacterial challenge, 67% (8/12) of the mice that were administered Mab 13-2 survived, 27% (4/12) survived in the CRL-1771 treated group, and only 7% (1/15) survived in the PBS group (13-2 vs. CRL-1771, p=0.02; 13-2 vs. PBS, 0.0002). These results clearly

indicate that MSCRAMM specific monoclonal antibodies provide a significant level of protection against lethal infection with *S. aureus* strains.

Example 7. Isolation and Sequencing of Variable Region Sequences.

A. Monoclonal Antibody 13-2.

Messenger RNA was isolated from ClfA 13-2 hybridoma cells using the Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly, 1.4x10⁸ hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degrader. PolyA⁺ mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first strand cDNA was accomplished using 5µg of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) containing 20 pmol of 3' oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; cat# 69796 and 69812) for each variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 50 ng) of the cDNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the PCR Reagent System (Life Technologies; cat#10198-018) and a mouse variable heavy and light chain specific primer set (Novagen; cat# 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure agarose gel in sodium acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101 GeneClean spin columns (cat #1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E. coli. (Invitrogen; cat# K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; cat# 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

30 The resulting sequences were as follows:

13-2VLA-1 (variable light sequence)

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTGGCTGTCTGCAGGAGAAA
 GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGT~~TTT~~TACAGTCAAATCAGAA
 5 GAACTACTTGGCCTGGTACCCAGAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTACTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAACTGTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTTTACTTACCATCAACAGTGTACAAGCTGAAGACCTG
 GCAGTTTACTGTCAATACCTCTCGCACACGTTGGAGGGGGAC
 CAAGCTGGAAATAAAAA
 10 NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMCKSSQSVLYSSNQKNYLWYQQKPGQSPKLIY
 WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSHTFGGGTKLE
 IK

- 15 • Amino acids representing a CDR are underlined

13-2VHC-3 (variable heavy sequence)

CAGGTGCATCTGAAGGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
 20 TGTCCATCACATGCACTGTCTGGATTCTCATTATCAGATATAATACACTG
 GGTTGCCAGCCTCCAGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATGGGGT
 GGTGAAAACACAGACTATAATTCAAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCCATCACAA
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTAAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
 25 CACAGCCATGACTACTGTGCCAGGCCACTATTGTAACTCCTGGTTGCTTA
 CTGGGGCAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCA

QVHLKESGPGLVAPSQSLSICTVSGFSLSRYNIHWRQPPGKGLEWLGMIWGG
 30 NTDYNSALKSRLSIKNSQVFLKMNSLQTDDAMYYCASAYGGNSWFAYWG
 QGTLVTVSA

- 30 • Amino acids representing a CDR are underlined

B. Monoclonal Antibody 12-9.

35 Messenger RNA was isolated from Clfa 12-9 hybridoma cells using the Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly, 1.4×10^8 hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degrader. PolyA⁺ mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first
 40 strand cDNA was accomplished using 5 μ g of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) containing 20 pmol of 3'

oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; cat# 69796 and 69812) for each variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 60 ng) of the cDNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the PCR Reagent System (Life Technologies; cat#10198-018) and a mouse variable heavy and light chain specific primer set (Novagen; cat# 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure agarose gel in sodium acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101 GeneClean spin columns (cat #1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E. coli. (Invitrogen; cat# K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; cat# 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

The resulting sequences were as follows:

12-9VLA-1 (variable light sequence)

20 AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTCAAAATCAGAA
GAACATCTGGCCTGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCTAAACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGTTGTCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
25 GGACTCTGGGACAGATTTACTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTAACTGTCAATACCTCTCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAATAAAA

30 NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTM**SKSSQS**VLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDFRTGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYC**HOY**LSSTFGGGTKLEIK

- Amino acids representing a CDR are underlined

35 **12-9VHC-1 (variable heavy sequence)**

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCATCACATGCGCTATCTGGTTCTATTATCCAGATATAGTGTACACT

5 GGGTTGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
 GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTAAAAATGAACAGTCTGCAAACGTGATGA
 CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
 GGTTGTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTGCA

10 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCAISGFSLSRYSVHIVRQPPGKGLEWLGMWGG
 GNTDYNSALSRSLSSKDNSSKQVFLKMMNSLQTDTAMYCAKGEFYYGDFV
 YWGQGTLVTVSA

- 15 • Amino acids representing a CDR are underlined

C. **Monoclonal Antibody 35-220.**

15 **Isolation and Sequencing of Variable Region Sequences:**
 Messenger RNA was isolated from Clfa 35-220 hybridoma cells using the
 Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly, 1.4x10⁶ hybridoma cells cultured
 in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by
20 centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degrader. PolyA⁺
 mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first
 strand cDNA was accomplished using 5mg of mRNA and reverse transcriptase in a
 cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) containing 20 pmol of 3'
25 oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; cat# 69796 and 69812) for each
 variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 50 ng) of the cDNA was
 amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the PCR Reagent System
 (Life Technologies; cat#10198-018) and a mouse variable heavy and light chain
 specific primer set (Novagen; cat# 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot
 start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products
30 were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure agarose gel in sodium
 acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments
 matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101
 GeneClean spin columns (cat #1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO
 (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E.coli.
35 (Invitrogen; cat# K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep Spin Miniprep

Kit (QIAGEN; cat# 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

5 The resulting sequences were as follows:

35-220VLD-4 (variable light sequence DNA)

10 AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
 GGTCACTATGAGCTGAGGTCCAGTCAAAGTGTGTTATACAGTTCAAATCAGAA
 GAACTACTGGGCTCTGGTACCCAGCAGAAACCGAGGAGTCTCTACACTGCTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAACTCTGGTGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGATTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
 GGCAGTTTATTACTGTCAATACCTCTCCTCGTACACGTTGGAGGGGGGA
 15 CCAAGCTGGAAATAAAA

35-220VLD-4 (variable light sequence)

20 N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C R S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P T L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K

25 Amino acids representing a CDR are underlined

35-220VHC-1 (variable heavy sequence DNA)

30 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
 TGTCATCACATGACTGTCTGGTTCTATTATCCAGATAATGTAACACT
 GGGITCGCCAGCCTCCAGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATGGGG
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAAGCTCAAATCCAGACTGAGCATACCAA
 GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTCTAAATGAACAGTCTGCAAACGTGATGA
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCACTATGGTAACTCCTGGTTCTTA
 35 CTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTG

35-220VHC-1 (variable heavy sequence)

40 Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G N T D Y N
S A L K S R L S I T K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
M Y Y C A T A Y Y G N S W F A Y W G Q G T L V T V S A

Amino acids representing a CDR are underlined

D. Monoclonal Antibody 35-006.

5 Isolation and Sequencing of Variable Region Sequences:

Messenger RNA was isolated from C1FA 35-006 hybridoma cells using the Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly, 1.4×10^6 hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degrader. PolyA* 10 mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first strand cDNA was accomplished using 5mg of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) containing 20 pmol of 3' oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; cat# 69796 and 69812) for each variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 50 ng) of the cDNA was 15 amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the PCR Reagent System (Life Technologies; cat#10198-018) and a mouse variable heavy and light chain specific primer set (Novagen; cat# 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure agarose gel in sodium 20 acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101 GeneClean spin columns (cat #1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E.coli. (Invitrogen; cat# K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep Spin Miniprep 25 Kit (QIAGEN; cat# 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

The resulting sequences were as follows:

30 **35-006VLD-1 (variable light sequence DNA)**

5 AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
 GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTTACAGTTCAAATCAGAA
 GAACTACTGGCCTGGTACCCAGAGAAACCCAGGGCAGTCTCTAAACTGCTGA
 TCTACTGGGCATC CACTAGGGAAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 5 GGATCTGGGACAGATTACTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
 GGCA GTTTATTCGCTGTCAATACCTCTCCGTACACGTTGGAGGGGGGA
 CCGAGCTGGAAATAAAA

35-006VLD-1 (variable light sequence)

10 N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
 15 V Y C C H Q Y L S S Y T F G G G T E L E I K

15 Amino acids representing a CDR are underlined

35-006VHC-1 (variable heavy sequence DNA)

20 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCACAGAGCC
 TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTTACAGATATACTGTACACT
 GGGTCGCCAGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGCTGGAAATGATATGGGG
 25 TGGTGAAGCACAGACTATAATTAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA
 GGACA ACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAGAATGAAACAGTCTGCAAACGTGATGA
 CACAGCCATGACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCTGGGCG
 CAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCA

35-006VHC-1 (variable heavy sequence)

30 Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G S T D Y N
S A L K S R L N I S K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
 35 M Y Y C A R R L W Y F D V W G A G T T V T V S S

35 Amino acids representing a CDR are underlined

Example 8. Generation of Chimeric 12-9 With Equivalence in Binding Kinetics
40 and Whole Cell Reactivity to Murine 12-9.

Chimeric 12-9 was generated using human constant regions (light chain: kappa; heavy chain: G1, 3 or 4) isolated from whole blood of human volunteers (selection of Poly A RNA and PCR amplification of first strand cDNA). For

expression in mammalian cells, a unique restriction site Bsm 1 was added to the 5' end of both the heavy and light chain variable region sequences. At the 3' end (the splice junction to the respective constant region) a Bsiw1 site was added to the light chain variable region and an Apa1 site was added to the heavy chain variable 5 region. This was accomplished through the design of oligonucleotide primers and PCR amplification of the appropriate 12-9 DNA template followed by confirmatory DNA sequencing.

Expression of chimeric versions of 12-9 protein was accomplished using the pCEP4 (Invitrogen, cat# V044-50) mammalian expression vector containing a 10 human immunoglobulin leader secretion sequence (Bsm1 as the cloning site) with a kappa constant region for light chain expression or gamma (1,3 or 4) constant region for heavy chain expression. The mammalian expression plasmid was designed for expression of both heavy and light chains with separate hCMV promoters on the same plasmid or the expression of the light and heavy chains on 15 separate pCEP4 plasmids via co-transfection. Functional chimeric 12-9 was expressed after transfection of plasmid DNA containing the heavy and light chains of 12-9 into HEK293 EBNA cells with Fugene (Roche Diagnostic, cat# 1814443) under hygromycin selection (300 μ g/ml). Supernatants were harvested and analyzed by Biacore for binding kinetics and flow cytometry for binding to *S. aureus* 20 cells.

The results represented in Figures 2 and 3 with recombinant chimeric 12-9 confirm that the sequence of the heavy and light chains of 12-9 replicates the binding kinetics and specificity of the original 12-9 characterized as a hybridoma supernatant.

25

Example 9. Humanization of the Heavy and Light Chain Variable Regions of 12-9

30 This process of humanization focuses on changing only the solvent exposed residues of the mouse variable regions that are not involved in the molecule's specificity and affinity for the Cifa target antigen. The information for these

determinations utilized solvent availability determinations published by Padlan (A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand binding properties. *Molecular Immunology*, 28(4); 489-498, 1991), and molecular modeling *in silico* or algorithms to determine T-cell epitopes were not used to make these determinations.

The approach represents a process by which the mouse variable region residues of the light and heavy chain are changed by site directed mutagenesis to reflect the surface exposed architecture of the most homologous human variable region from the public database. Specifically, the amino acids defining the variable 10 heavy and light chains were assigned a Kabat position number and "exposure" designation based on Padlan, allowing the alignment of the amino acids from each human framework sub-group (I-III for the heavy chain and I-IV for the light chain). To support this analysis, a BLAST search was carried out on the human 15 immunoglobulin database as well as the entire protein database where the variable region with the highest homology to the mouse sequence (both germ-line and mature) were chosen and aligned with the murine sequence of interest. Once aligned, the human subgroup with the highest homology to the mouse sequence was identified. The exposed mouse amino acid residues were mutated to mimic the most homologous human subgroup. In cases where there was more than one amino 20 acid found in the subgroup at that position, the amino acid represented in the human germ line sequence with the highest homology to the 12-9 was used. These changes were accomplished with mutagenic oligonucleotides via PCR followed by conformational DNA sequencing.

25 **12-9VL-Hu (humanized variable light sequence DNA)**

GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTGGCTGTGCTCTGGGAGAAAG
GGTCACTATGAACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTATACAGTCAAATCAGAA
GAACACTTGGGCTGGTACCGAGAAACCCAGGGCAGTCTCTAAACTGCTGA
30 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAACTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTACTCTTACCATCAGCAGTGACAAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTACTGTCAATACCTCTCCTGACACGTTGGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA

12-9VL-Hu (humanized variable light sequence)

5 **DIVMTQSPD~~SLAV~~SLGERVTMNCKSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLE
IK**

10 Amino acids representing a CDR are underlined, amino acids in bold represent
humanization changes

12-9VH-Hu (humanized variable heavy sequence DNA)

15 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGAAGCCCTCACAGACCC
TGTCATCACATGCACCATCTGGTTCTATTATCCAGATATAGTGTACACT
GGTTGCCCAGCCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
TGGTGGAAACACAGACTATAATTTCAGCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
20 AGACAACTCCAAAGCAAGTTTCTAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA
CACAGCCGTTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
GGTTGTTACTTGGGCCAAGGGACTCTGTCACTGTCTTTCC

12-9VH-Hu (humanized variable heavy sequence)

25 QVQLKESGPGLVKPSQLSITCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG
**GNTDYNSALSRLSISKDNSKQFLKMNSLTAADTAVYYCARKGEFYYYDGFV
YWGQGTLVTVSS**

30 Amino acids representing a CDR are underlined, amino acids in bold represent
humanization changes

35 **Example 10. Comparison of the CifA monoclonal antibodies, 12-9A (INH-M010001) and 35-052.1 (INH-M01016), with the isotype matched control CRL1771 antibody, INH-M000029, in a mouse sepsis model using Methicillin Resistant *S. aureus* Strain 67-0 (MRSA).**

40 The purpose of this example is to characterize the protective effects of the CifA monoclonal antibodies, 12-9A (INH-M010001) and 35-052.1 (INH-M01016) compared with the isotype-matched control CRL1771 antibody (INH-M000029) using a 0.3 mg dose of antibody and *S. aureus* strain 67-0 in a mouse sepsis model.

Species	Strain	Sex	Number	Age*	Weight*	Source
Mice	Balb/C	Female	90	4-5 weeks	12-16 grams	Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)

*Estimated range at initiation of study.

- 5 Dosing was performed by the administration of an intraperitoneal (i.p.) injection of monoclonal antibody to the appropriate animals (see below). Administration of the antibody was performed approximately 18 hours prior to the intravenous (i.v.) injection of *S. aureus*. Systemic infection was measured using a single parameter (mortality).

10

Group #	No. of Mice	TREATMENT				CHALLENGE			
		Antibody	Dose	Route	Frequency	Time Point*	Bacteria	CFU	Volume/Route
1	30	12-9A	0.3 mg.	i.p.	Once	-18 hr.	<i>S. aureus</i> 67-0	$\sim 10^3$	0.1 ml. i.v.
2	30	35-052	0.3 mg.						
3	30	CRL1771	0.3 mg.						

*Time points reflect hours post bacterial challenge.

Preparation, Storage and Handling:

15

Staphylococcus aureus

- MRSA strain 67-0 cells were taken from a frozen glycerol stock and were inoculated onto a single blood agar plate and grown for 24 hours at 37°C. Single colonies were then transferred to new blood agar plates. Eighty plates were inoculated to prepare 50 mls of final frozen stock. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. Following incubation, the colonies were scraped off the surface of each plate into four 50 ml tubes containing 10 mls of 1X PBS (20 plates per tube) while gently vortexing to remove the bacteria from the scraper. An additional 10 mls of 1X PBS was then added to the 10 mls of bacterial suspension, while vigorously vortexing to facilitate separation of any agar debris from the bacteria. The suspension was pelleted by centrifugation, 3500xg at 4°C for 10 minutes. The bacteria was

20

25

washed in D-PBS and resuspended in 50 mls of freezing media. The bacterial stock was placed into 1 ml aliquots by snap freezing in an ethanol/dry ice bath and placed in an -80°C freezer. The concentration (CFU/ml) of the frozen stock was determined by thawing 1 ml aliquot of stock, and preparing serial dilutions from 10^{-3} to 10^{-11} . Dilutions were plated in duplicate on blood agar plates and incubated for 37°C for 16-18 hours. The CFU/ml was determined (CFU/ml=(average # colonies X dilution factor)/0.050 mls) and averaged for each dilution to determine the average CFU/ml. On the day of injection, aliquots of each strain will be thawed, combined into one tube and vortexed. Dilutions of each stock will then be prepared.

CIfA 12-9A Monoclonal Antibody, INH-M010001 (LN: IAA2E1354)

The 12-9A monoclonal antibody (IgG, subtype) was purified from serum free hybridoma culture medium using protein G affinity chromatography. The material was reported to be at a concentration of 7.0 mg/ml with an endotoxin concentration of 1.0 EU/mg of protein. The material was stored refrigerated at 4°C. On the day of injection, the material will be diluted to 0.6 mg/ml and 0.5 ml will be administered via an intraperitoneal injection to the appropriate group of animals. The final dose that will be administered will be 0.3 mg of IgG.

CIfA 35-052.1 Monoclonal Antibody, INH-M01016 (LN: IAA2H1422)

The 35-052 monoclonal antibody (IgG, subtype) was purified from serum free hybridoma culture medium using protein G affinity chromatography. The material was reported to be at a concentration of 4.2 mg/ml with an endotoxin concentration of 1.0 EU/mg of protein. The material was stored refrigerated at 4°C. On the day of injection, the material will be diluted to 0.6 mg/ml and 0.5 ml will be administered via an intraperitoneal injection to the

appropriate group of animals. The final dose that will be administered will be 0.3 mg of IgG.

Control CRL 1771 Monoclonal Antibody (INH-M000029, LN: IAA2E1337)

5 The CRL 1771 monoclonal antibody (IgG, subtype) was purified from serum free hybridoma culture medium using protein G affinity chromatography. The material was reported to be at a concentration of 5.0 mg/ml with an endotoxin concentration of 0.2 EU/mg of protein. The material was stored refrigerated at 4°C. On the day of injection, the material will be diluted 0.6
10 mg/ml and 0.5 ml will be administered via an intraperitoneal injection. The final dose that will be administered will be 0.3 mg of IgG.

Housing, Food, Water and Environment:

15 Upon receipt, all animals were examined and group housed (5/cage) in polycarbonate shoebox style cages with absorbent bed-a-cobb bedding. All animals have free access to feed (Harlan Teklad Mouse Pelleted Diet #7012) and tap water with a 12-hour light-dark cycle. All aspects of the animal care and the required husbandry conditions will be in accordance with
20 the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Identification and Randomization:

25 All mice were uniquely identified by tail tattoo before treatment. Prior to treatment, the mice were individually weighed and their health re-evaluated. Mice were assigned to treatment groups based on randomization by stratified body weights.

30 The data demonstrate the therapeutic value of an anti-CifA antibody such as 12-9 that interferes with CifA – fibrinogen adhesion compared with a non CifA specific isotype control (CRL 1771) as well as a specific control (35-052) that recognizes CifA at a site independent of CifA – fibrinogen binding.

Example 11. *S. aureus* Strain recognition of 12-9 and 35-052 Compared to Isotype Control (CRL 1771)

S. aureus bacterial samples (strains Newman -WT, 67-0, 560 Sal 1, 203 Sal 2, 451 Sal 4, 206 Sal5, 397 Sal 6, 49, 189, 203 and 4046) were collected at 3 hr and overnight, washed and incubated with Mab 12-9, 35-52 or 1771 alone (control) at a concentration of 2 mg/ml after blocking protein A sites with rabbit IgG (50 mg/ml). The *S. aureus* strains containing a Sal designation represent 5 distinct lineages accounting for 65.68% of all clinical isolates (Booth, et al., *Infect. Immun.* 10: 69, 345-353, 2001). As well, Newman ClfA::emr (ClfA knockout) and NewmanSpa::kan (Protein A knockout) were analyzed in the same manner as specificity controls. Following incubation with antibody, bacterial cells were incubated with Goat-F_{(ab)2}-Anti-Mouse-F_{(ab)2}-FITC which served as the detection antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through the FACScaliber flow cytometer to analyze fluorescence emission (excitation: 488, emission: 570). For each bacterial strain, 10,000 events were collected and measured.

Table VI. *S. aureus* Strain Reactivity

		Fluorescence Intensity (Geometric Mean)		
<i>S. aureus</i> Strain	Culture Time	12-9	35-052	CRL 1771
NewmanWT	3hr	30.8	11.1	0.5
	overnight	44.3	30	0.9
67-0	3hr	11.2	4.2	2
	overnight	27.6	1.9	1.1
560 SAL 1	3hr	28.8	8.4	3.9
	overnight	36.1	6.2	1.2
203 SAL2	3hr	16.1	0.6	2.2
	overnight	40.4	1.9	1.4
451 SAL4	3hr	1.1	0	0
	overnight	12.9	0	0
206 SAL5	3hr	8.8	1.3	1
	overnight	33.5	7.7	0.9
397 SAL6	3hr	28.9	7.9	0.3
	overnight	62.1	40.0	1.0
49 Europe	3hr	7.3	1.2	0
	overnight	11.3	5.7	0
189 Japan	3hr	11.0	0	0
	overnight	15.7	0	0
203 Singapore	3hr	22.1	3.3	0.1
	overnight	15.4	2.5	0.2
4046 USA	3hr	27.7	2.5	1.3
	overnight	23.5	1.2	0.3
Newman ClfA:emr	3hr	0.2	0.3	0.2
	overnight	1.4	0.8	0.9
Newman Spa::kan	3hr	18.6	4.9	0
	Overnight	23.9	9.2	0

Indicates positive activity

This data highlights the importance of selecting an anti-ClfA antibody (such as 12-9) that is capable of recognizing a functional epitope on the ClfA molecule: i.e. the binding site for fibrinogen.

Another set of *S. aureus* isolates, a representation of 11 different clonal genotype complexes identified as disproportionately common as causes of disease, derived via multi-locus sequence typing (Day, et al. 2001. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*.

- 5 *Science*, 292:114-116). Each strain was tested for reactivity against 12-9 by flow cytometry as described above.

Table VII. 12-9 Reactivity with *S. aureus* isolates.

<i>S. aureus</i> Strain Designation	Sequence Type	Clonal Complex	12-9 Reactivity
16	25	8	+
96	47	10	+
117	12	4	+
138	30	9	+
150	9	14	+
160	34	7	+
207	15	5	+
252	36	9	+
315	8	3	+
364	39	9	+
396	30	9	+
433	5	2	+
434	8	3	+
451	5	2	+
456	45	10	+
458	15	5	+
476	1	1	+
481	47	10	+
512	1	1	+
597	25	8	+
720	22	7	+
730	45	10	+
837	12	4	+
863	20	11	+
888	39	9	+
959	34	9	+

This reactivity further demonstrates the conservation of the 12-9 epitope on ClfA across isolated strains of *S. aureus*, suggesting that ClfA – fibrinogen binding is functionally conserved.

5 **Example 12. Variable Region Homology in Anti-ClfA Antibodies That Inhibit Whole Cell *S. aureus* Binding.**

An unexpected result from the selection of anti-ClfA antibodies based on their ability to inhibit ClfA binding to fibrinogen was the similarity in the 10 complementary determining region (CDR) amino acid sequences of the light and heavy variable chain regions. To profile this, anti-ClfA antibodies were selected on the basis of whole cell *S. aureus* inhibition of binding to fibrinogen-coated plates using the following procedure: Antibodies of interest were diluted serially starting at 4 μ g/ml in assay buffer. Concurrently, an overnight culture of *S. aureus* (Newman 15 spa::kan) was washed, blocked with rabbit IgG then stained with Syto 13 cell permeable fluorescent DNA stain and incubated for 10 min. Equal volumes of stained cells and diluted antibody were mixed and incubated at 4°C for 30min then each sample added to duplicate wells of a human fibrinogen coated/blocked microtiter plate. Plates were incubated at 4°C for one hour, washed, buffer added 20 to each well and read in a fluorescent plate reader.

The variable light and heavy chains of the anti-ClfA monoclonals, 12-9, 13-2, 35-006 and 35-220 as well as CRL 1771 (non-specific control) were cloned and sequenced to derive a predicted amino acid sequence in the following manner: 25 Briefly, 1.4x10⁶ hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degrader. PolyA⁺ mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first strand cDNA was accomplished using 5mg of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) 30 containing 20 pmol of 3' oligonucleotide mouse-specific primers (Novagen; cat# 69796 and 69812) for each variable heavy and variable light chain. A portion (5 to 50 ng) of the cDNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the

PCR Reagent System (Life Technologies; cat#10198-018) and a mouse variable heavy and light chain specific primer set (Novagen; cat# 70081-3, 5 pmol each) for 30 cycles (94 C hot start then cycles of 94 C for 1 min, 50 C for 1min and 72 C for 1min). PCR products were fractionated electrophoretically in a 1% ultra pure 5 agarose gel in sodium acetate buffer and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments matching the predicted size were excised from the gel and purified using BIO 101 GeneClean spin columns (cat #1101-400) for ligation into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen) plasmid, followed by transformation into competent TOP10 E. coli. (Invitrogen;cat# K4500). After isolating plasmid DNA using QIAprep 10 Spin Miniprep Kit (QIAGEN; cat# 27106), positive clones with inserts were identified by restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis, followed by sequencing on an ABI automated sequencer using M13 Forward and M13 Reverse primers.

As shown in Figure 7, the data shows that there is considerable conservation 15 in the most variable portion of the immunoglobulin chains that define the binding specificity for anti-ClfA monoclonals with inhibition of *S. aureus* binding to fibrinogen. This homology is represented from three different hybridoma-generating fusions (12,13 and 35); under variable conditions such as the make-up of the Clf-A 20 antigen, the method and sequence of the immunizations prior to fusion. In particular, this data revealed consensus conserved regions in the CDR1 and CDR2 25 regions of the variable heavy chain of monoclonal antibodies binding to ClfA as well as conserved regions in the CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the variable light chains of the antibodies of the present invention. This data thus shows that preparation of antibodies with the conserved sequences should have the same binding properties and thus will fall within the scope of the present invention.

Accordingly, in accordance with the present invention, antibodies which will 30 bind to ClfA can be prepared using variable light or heavy chains which have the same key CDR regions as indicated in the consensus of Figure 8. In particular, these antibodies will include those which have a variable heavy chain wherein the CDR1 region includes the sequence RYSVH, and/or a CDR2 region that includes the

sequence MIWGGGNTDYNSALKS, and a variable light chain that has a CDR1 region that includes the sequence KSSQSVLYSSNQKNYLA, a CDR2 region that includes the sequence WASTRES, and/or a CDR3 region that includes the sequence HQYLSSYT.

5

Example 13. Expression of humanized 12-9 For Pre-clinical and Clinical Use.

For simultaneous expression of the heavy and light immunoglobulin 10 polypeptide chains, the two genes were cloned into a single plasmid with each gene under the control of a separate hCMV-MIE promoter. This double gene vector holds a single copy of the GS selectable marker (Lonza; Slough, UK) for introduction into the host cell in a single transfection event. Cells were transfected 15 using Fugene-6 (Roche) under conditions suggested by the manufacturer. Supernatants were tested from transient or stably derived cell lines and compared with murine and chimeric derived 12-9.

This example demonstrates that humanized 12-9 can be humanized, cloned and expressed a single expression cassette capable of yields to support commercial scale quality and purity.

What Is Claimed Is:

1. A monoclonal antibody which binds to the ClfA protein from *S. aureus*
2. An antibody according to Claim 1 wherein the monoclonal antibody is raised against a protein selected from the group consisting of *S. aureus* Clf40 protein, the *S. aureus* Clf33 protein, and the *S. aureus* ClfA N3 protein.
3. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody treats or prevents *S. aureus* infection in a human or animal.
4. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody inhibits binding of staphylococcal bacteria to fibrinogen or fibrin.
5. An antibody according to Claim 1, wherein said antibody is suitable for parenteral, oral, intranasal, subcutaneous, aerosolized or intravenous administration in a human or animal.
6. An antibody according to Claim 1 wherein the monoclonal antibody is of a type selected from the group consisting of murine, chimeric, humanized and human monoclonal antibodies.
7. An antibody according to Claim 1 wherein the antibody is a single chain monoclonal antibody.
8. An antibody according to Claim 1 which comprises an antibody fragment having the same binding specificity of an antibody which binds to the *S. aureus* ClfA protein.

9. An antibody according to Claim 1 that is raised against a protein having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

10. An antibody according to Claim 9 wherein the protein has an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or degenerates thereof.

11. An antibody according to Claim 1 having a variable light chain having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:18.

12. An antibody according to Claim 1 having a variable light sequence encoded by a nucleic acid sequence according to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:17, and degenerates thereof.

13. An antibody according to Claim 1 having a variable heavy chain having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16, and SEQ ID NO:20.

14. An antibody according to Claim 1 having a variable heavy chain encoded by a nucleic acid having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:19, and degenerates thereof.

15. Isolated antisera containing an antibody according to Claim 1.

16. A diagnostic kit comprising an antibody according to Claim 1 and means for detecting binding by that antibody.

17. A diagnostic kit according to Claim 16 wherein said means for detecting binding comprises a detectable label that is linked to said antibody.
18. A method of diagnosing an infection of *S. aureus* comprising adding an antibody according to Claim 1 to a sample suspected of being infected with *S. aureus*, and determining if antibodies have bound to the sample.
19. A pharmaceutical composition for treating or preventing an infection of *S. aureus* comprising an effective amount of the antibody of Claim 1 and a pharmaceutically acceptable vehicle, carrier or excipient.
20. A method of treating or preventing an infection of *S. aureus* comprising administering to a human or animal patient an effective amount of an antibody according to Claim 1.
21. A method of inducing an immunological response comprising administering to a human or animal an immunogenic amount of an isolated ClfA protein from *S. aureus* selected from the group consisting of the *S. aureus* Clf40 protein, *S. aureus* Clf33 protein, and the *S. aureus* N3 protein.
22. A method of identifying monoclonal antibodies to the ClfA protein comprising adding an isolated protein selected from the group consisting of *S. aureus* Clf40, Clf33 and ClfA N3 to a sample suspected of containing anti-ClfA antibodies, and determining if antibodies have bound to the isolated protein added to the sample.
23. An isolated antibody according to Claim 1 that has the ability to bind to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

24. An isolated antibody according to Claim 1 that has the ability to bind to an amino acid sequence coded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or degenerates thereof.
25. An isolated active fragment from the A domain of the ClfA protein from *S. aureus* selected from the group consisting of the Clf40 protein, the Clf33 protein and the ClfA N3 region.
26. An isolated antibody according to Claim 1 further comprising a physiologically acceptable antibiotic.
27. An antibody according to Claim 1 wherein the variable heavy chain has a CDR1 region that includes the sequence RYSVH.
28. An antibody according to Claim 1 wherein the variable heavy chain has a CDR2 region that includes the sequence MIWGGGNTDYNALKS.
29. An antibody according to Claim 1 wherein the variable heavy chain has a CDR1 region that includes the sequence KSSQSVLYSSNQKNYLA.
30. An antibody according to Claim 1 wherein the variable light chain has a CDR2 region that includes the sequence WASTRES.
31. An antibody according to Claim 1 wherein the variable light chain has a CDR3 region that includes the sequence HQYLSSYT.
32. An isolated antibody according to Claim 1 that is cross-reactive to multiple strains of *S. aureus*.

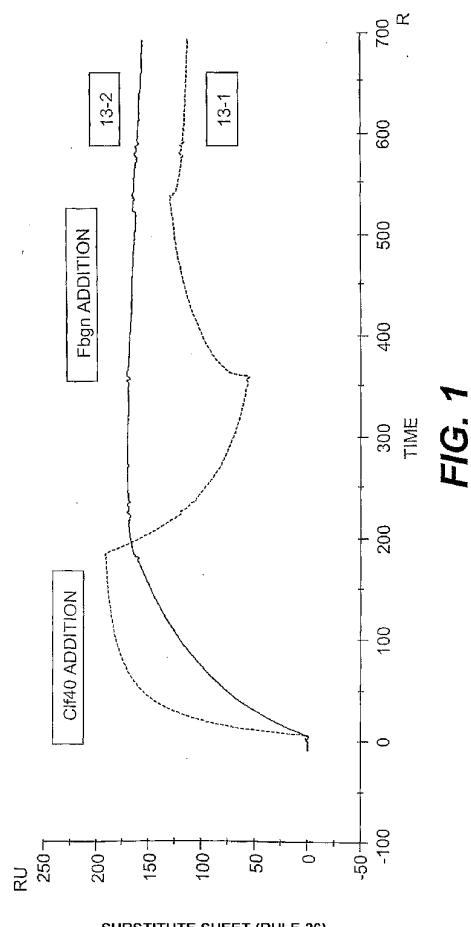
33. A humanized antibody according to Claim 6 wherein the variable light chain has the amino acid sequence according to SEQ ID NO:18.

34. A humanized antibody according to Claim 6 wherein the variable light chain is encoded by a nucleic acid having the sequence according to SEQ ID NO:17 or degenerates thereof.

35. A humanized antibody according to Claim 6 wherein the variable heavy chain has the amino acid sequence according to SEQ ID NO:20.

36. A humanized antibody according to Claim 6 wherein the variable heavy chain is encoded by a nucleic acid having the sequence according to SEQ ID NO:19 or degenerates thereof.

37. A monoclonal antibody according to Claim 1 which recognizes the A domain of *S. aureus* ClfA protein.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

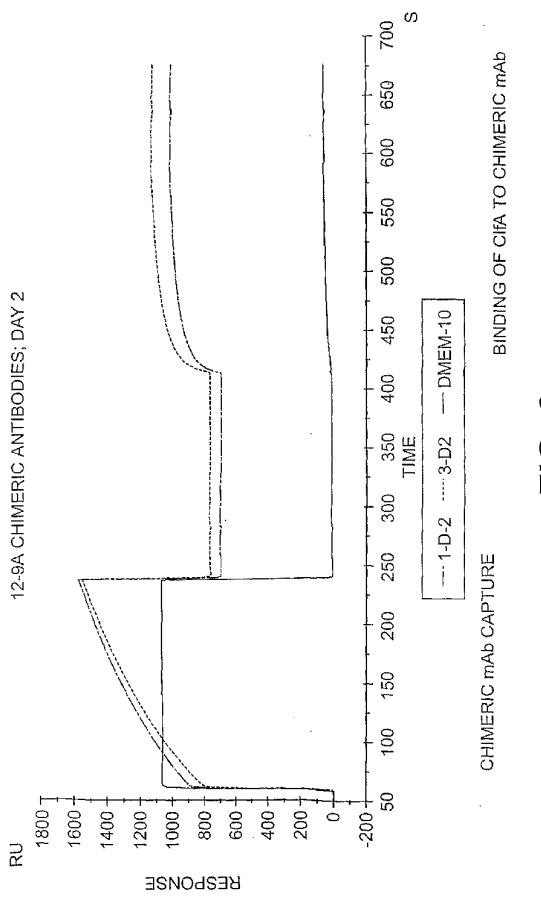


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

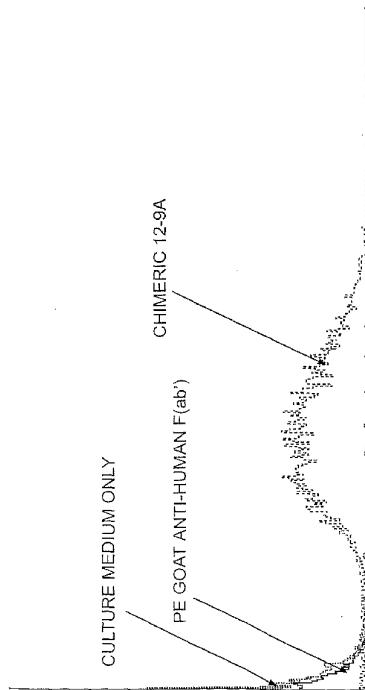


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

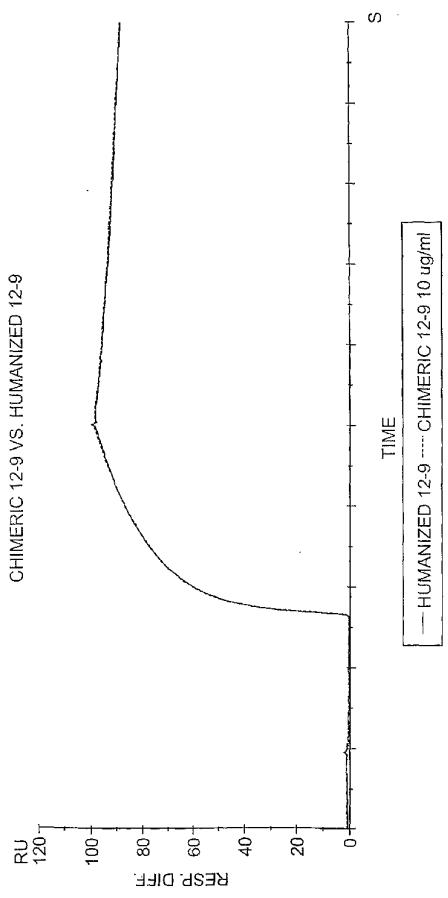


FIG. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

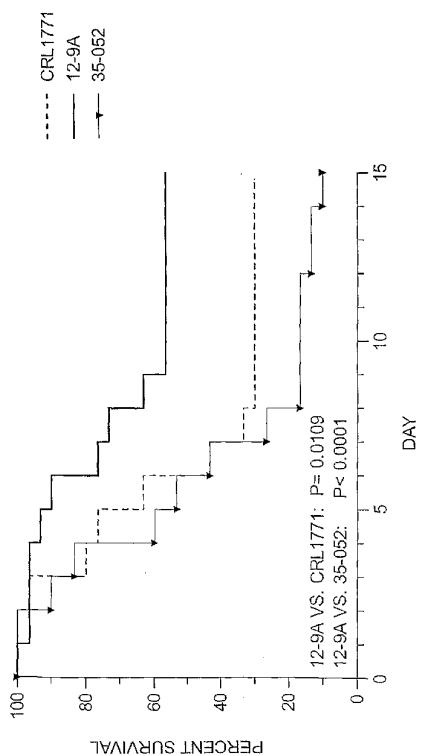


FIG. 5

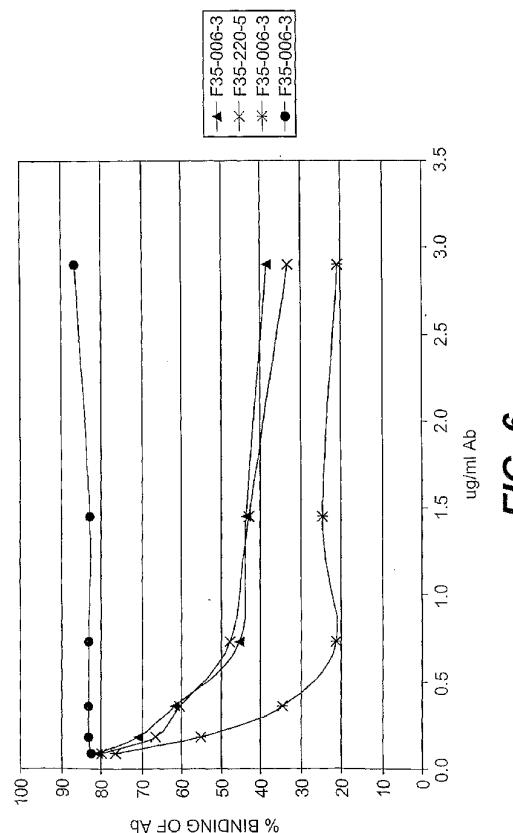
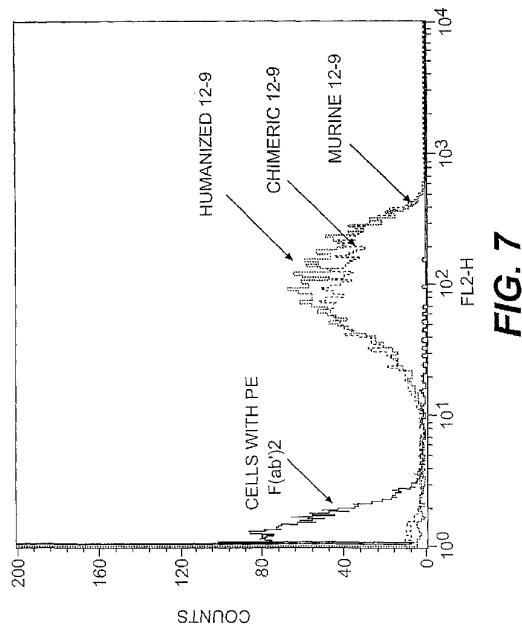


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

**FIG. 7**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

VARIABLE LIGHT CHAIN		CDR ₁	CDR ₂	CDR ₃
ANTIBODY				
1771	L S S Q S L L D S D G K T F L N		L V S K L D S	W Q G T H F P Y T
12-9 (CfA)	K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A		W A S T R E S	H Q Y L S S Y T
13-2	K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A		W A S T R E S	H Q Y L S S H T
35-006	K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A		W A S T R E S	H Q Y L S S Y T
35-220	R S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A		W A S T R E S	H Q Y L S S Y T
CONSENSUS	K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A		W A S T R E S	H Q Y L S S Y T
	R		H	

VARIABLE LIGHT CHAIN		CDR1	CDR2	CDR3
ANTIBODY				
1771	S G F S W H	Y I H Y S G S T D C N P S L K S		M P D S
12-9 (CfA)	R Y S V H	M I W G G G N T D Y N S A L K S		K G E F Y Y G Y D G F V Y
13-2	R Y N I H	M I W G G G N T D Y N S A L K S		A Y Y G N S W F A Y
35-006	R Y S V H	M I W G G G S T D Y N S A L K S		R L W Y F D V
35-220	R Y S V H	M I W G G G N T D Y N S A L K S		A Y Y G N S W F A Y
CONSENSUS	R Y S V H	M I W G G G N T D Y N S A L K S	A Y Y G N S W F A * * Y	
	N I	E S	K G E F Y Y G Y D	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 8

WO 02/072600

PCT/US02/02296

1/15

SEQUENCE LISTING

<110> PATTI, Joseph M
HUTCHINS, Jeff T
DOMANSKI, Paul
PATEL, Pratiksha
HALL, Andrea

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE CLFA PROTEIN . . .

<130> P07069US04/BAS

<150> 60/308,116
<151> 2001-07-30

<150> 60/298,413
<151> 2001-06-18

<150> 60/274,611
<151> 2001-03-12

<150> 60/264,072
<151> 2001-01-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1560
<212> DNA
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 1
agtgaaaata gtgttacgca atctgtatgc gcaagtaacg aaagcaaaag taatgattca 60
agttagcggtta gtgctgcacc taaaacagac gacacaacac tgagtgtatc taaaacatcg 120
tcaasacacta ataatggcga aacgagtgtg ggcacaaaatc cagcacaaca ggaaacgaca 180
caatcatcat caacaatgc aactacggaa gaaacgcgg taactggtga agctactact 240
acgacaacgca atcaagctaa tacaccggca acaactcaat caagcaatac aatgcggag 300
gaatttagtga atcaaacaag taatgaaaacg acttttaatg atactaatac agtatcatct 360
gttaatttcac ctcaaaatcc tacaatgcg gaaaatgtt caacaaacgca agatacttca 420
actgaagcaaa caccatccaa caatgaatca gctccacaga gtacagatgc aagtaataaa 480
gtatgtatgtta atcaagcggtt taatacaagt ggcgcctagaa tgagagcatt tagtttageg 540
gcagtagctg cagatgcacc ggcagctggc acagatattt cgaatcgtt gacaaatgtg 600
acagttggta ttgactctgg tacgactgtg tatecgcacc aagcagggtt tgtaaaactg 660
aattatgggtt ttccatgtcc taattctgtt gttaaagggtt acacattcaa aataactgtt 720

WO 02/072600

PCT/US02/02296

2/15

cctaaagaat taaaacttaaa tgggtgtaact tcaactgcta aagtgcacc aattatggct 780
 ggagatcaag tattggcaaa tgggtgtaatc gatagtgatg gtaatgttat ttatacattt 840
 acagactatg taaatactaa agatgatgta aaagcaactt tgaccatgcc cgcttatatt 900
 gaccctgaaa atgttaaaaa gacaggataat gtgacattgg ctactggcat aggtgtacaa 960
 acagcaaaaca aaacagtatt agtagattt gaaaaatatg gtaagttta taacttatct 1020
 attaaaggta caatttgacca aatcgataaa acaaataata ctatctgtca gacaatttat 1080
 gtcaatccaa gtggagataa cggttattgcg ccggtttaa caggttaattt aaaaaccaaat 1140
 acggatagta atgcattaaat agatcagcaa aatacaagta ttaaagtata taaagtagat 1200
 aatgcagctg atttatctga aagttacttt gtgaatccag aaaactttga ggatgtcact 1260
 aatagtgtga atattacatt cccaaatcca aatcaatata aagtagagtt taatacgcct 1320
 gatgatcaaa ttacaacacc gtatataatg gttgttaatg gtcataattga tccgaatago 1380
 aaagggtatt tagctttacg ttcaacttta tatgggtata actcgaatat aatttggcgc 1440
 tctatgtcat gggacaacgc agtagcattt aataacggat caggttctgg tgacgggtatc 1500
 gataaaccag ttgttctgta acaacctgtat gagoctgggtg aaattgaacc aattccagag 1560

<210> 2
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 2

Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Asn Asp Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr
 35 40 45

Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser
 50 55 60

Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr
 65 70 75 80

WO 02/072600

PCT/US02/02296

3/15

Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe
 100 105 110

Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr
 115 120 125

Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr
 130 135 140

Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys
 145 150 155 160

Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala
 165 170 175

Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp
 180 185 190

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr
 195 200 205

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
 210 215 220

Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
 225 230 235 240

Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro
 245 250 255

Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
 275 280 285

Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300

WO 02/072600

PCT/US02/02296

4/15

Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320

Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335

Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350

Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365

Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380

Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400

Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415

Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430

Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445

Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460

Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480

Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495

Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

WO 02/072600

PCT/US02/02296

5/15

<210> 3
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <400> 3
 gtagctgcag atgcacccgc agctggaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 60
 gttggattt actctggta cactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 120
 tatgggttt cagtgcttaa ttctgtgtt aaaggtgaca catcääaat aactgtaccc 180
 aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 240
 gatcaatgt tggcaaatgg tgtaatcgat agtgcgttata atgttattta tacatttaca 300
 gactatgtaa atactaaaga tgaatgtaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 360
 cctgaaatgg ttaaaaagac aggtaatgtg acatggctt ctggcatagg tagtacaaca 420
 gcaaaacaaa cagttatgt agattatgaa aaatatggta agttttataa ctatctatt 480
 aaaggtaaaaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgat atcgtcagac aattttatgtc 540
 aatccaaatgg gagataaacgt tattgcgcgg gttttacacg gtatattaaa accaaatacg 600
 gatagtaatgg cattaaataga tcagcaaat acaagtatataa aagtatataa agtagataat 660
 gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtt aatccagaaa acttttgggaa tgcactaat 720
 agtgcgtata ttacattccc aaatccaaat caatataaa tagatgtttaa tacgcctgat 780
 gatcaattta caacacccgtt atatgtatgtt gttatggtc atattgtcc gaatagcggaa 840
 ggtgatggat ctttacgttc aactttatgggtataact cgaatataa ttggcgctct 900
 atgtcatggg acaacgaatg agcatttaat aacggatcg gttctggtaa cggatcgat 960
 aaaccatgg ttccgttacca aactgtatgg 990

<210> 4
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <400> 4
 Met Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro
 20 25 30

WO 02/072600

PCT/US02/02296

6/15

His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn
 35 40 45

Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu
 50 55 60

Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala
 65 70 75 80

Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val
 85 90 95

Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala
 100 105 110

Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr
 115 120 125

Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys
 130 135 140

Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser
 145 150 155 160

Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg
 165 170 175

Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val
 180 185 190

Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp
 195 200 205

Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp
 210 215 220

Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr
 225 230 235 240

Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu
 245 250 255

WO 02/072600

PCT/US02/02296

7/15

Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val
 260 265 270

Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser
 275 280 285

Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp
 290 295 300

Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile
 305 310 315 320

Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu
 325 330

<210> 5
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 5
 aacattatgt tgacacatgc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggctact 60
 atgagctgtg aatccatgtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttgcc 120
 tggtaccaggc agaaaccaggc gcagtctccct aaactactga tctactggc atccactagg 180
 gaatctggcg tccctgtatcg ctccacaggc aatggatctg ggacagatgg 240
 atcaacatgtg tacaaggctga agacctggca gtttattact gtcataataa cctctccctcg 300
 cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 6

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

WO 02/072600

PCT/US02/02296

8/15

35

40

45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 7
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 7
 caggtagcata tgaaggagtc aggacctggc ctgggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcactg tctctggatt ctcatatcc agatataata tacactgggt tgcgcggct 120
 ccagggaaagg gtcgtggatg gctggaaatg atatgggtg gtgaaaaacac agactataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaaatgaaaca gtcgtcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag cgccctat 300
 ggtaactctt ggtttgccta ctggggccag gggactctgg tcactgtctc tgc 354

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 8

Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

WO 02/072600

PCT/US02/02296

9/15

Gly Met Ile Trp Gly Gly Glu Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 9
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 9
 aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtaact 60
 atgagctgtta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc 120
 tggtaccagg agaaaccagg gcagtcctctaaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagatctt tactcttacc 240
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcatcaata cctcttcctcg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 10
 Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

WO 02/072600

PCT/US02/02296

10/15

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 11
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 11
 caggtgcgc tgaaggagtc aggacctggc ctgggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcgccta tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcggcagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctggaaatg atatggggtg gtgaaacac agactataat 180
 tcagccctca aatccagact gaggatcago aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaaatgaaaca gtctgaaacac tggatgacaca gccatgttatt actgtgccag aaaaggggaa 300
 ttctatctatg gttacgacgg gtttggttac tggggccaaag ggactctgggt cactgtctct 360
 gca

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 12
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Ile Thr Cys Ala Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30

WO 02/072600

PCT/US02/02296

11/15

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Lys Gly Glu Phe Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 13
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 13
 aacatatatga tgacacagtc gcoatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60
 atgagctgtca ggtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc 120
 tggtaccaggc agaaaccagg gcagtcctct acactgtcga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactttacc 240
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcatcaata cctctctcg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 14

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

WO 02/072600

PCT/US02/02296

12/15

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser
20				25						30					

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
35				40					45						

Ser	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
50				55					60						

Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65				70				75		80					

Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln
85				90					95						

Tyr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100				105				110							

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 15

caggtcagc	tgaaggagtc	aggacctggc	ctgggtggcac	cctcacagag	cctgtccatc	60
acatgcactg	tctctgggtt	ctcattatcc	agatatagttg	tacactgggt	tcggcagcct	120
ccagggaaagg	gtctggaggta	gttggaaatg	atatggggtg	gtggaaacac	agactataat	180
tcaagctctca	aatccagact	gagccatcacc	aaggacaact	ccaagagccs	agtttttotta	240
aaaatgaaaca	gtctgcaaac	tgatgacaca	gccatgtact	actgtgccac	cgccctactat	300
ggtaactctt	ggtttgccta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgttctc	tgcac	354

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 16

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln
1				5				10			15				

Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr
20				25				30							

WO 02/072600

PCT/US02/02296

13/15

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 17
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 17
 gacattgtga tgacacagtc gccagactct ctggctgtgt ctctggaga aagggtca 60
 atgaaactgtatc agtccagtc aagtgtttta tacagtcaa atcagaagaa ctactggcc 120
 tggtaaccagg agaaaccagg gcagtctctt aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctggtg tccctgatcg cttcagcgcc agtggatctg ggacagatcc tactcttacc 240
 atcagcgttg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcatcaata cttcttctcg 300
 tacacgttccg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

WO 02/072600

PCT/US02/02296

14/15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 19
 cagggtcagc tgaaggagtc aggacctggc cttggtaaagc cctcacagac cctgtccatc 60
 acatgcacca tctctgggtt ctcattatcc agatatagtc tacactgggt tcggcagcct 120
 ccaggaaaagg gtcgtggatg gctggaaatg atatggggtg gtggaaacac agactataat 180
 tcagtcctca aatcccgact gaggatcagc aaagacaact ccaagaacca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtcgtgaccgc cgctgacaca gccgtgtatt actgtgccag aaaaggggaa 300
 ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctgggt cactgtctct 360
 tcc 363

<210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 20
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

WO 02/072600

PCT/US02/02296

15/15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Glu Phe Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072600 A3(51) International Patent Classification⁵: A61K 39/395,
38/00, C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/US02/02296

(22) International Filing Date: 28 January 2002 (28.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,072 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/274,611 12 March 2001 (12.03.2001) US
60/298,413 18 June 2001 (18.06.2001) US
60/308,116 30 July 2001 (30.07.2001) US(74) Agent: SCHULMAN, Aaron, B.; Larson & Taylor, PLLC,
1199 North Fairfax Street, Suite 900, Alexandria, VA
22314 (US).(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GII, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).(71) Applicant: INHIBITEX, INC. [US/US]; 8995 Westside
Parkway, Alpharetta, GA 30004 (US).(37) Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
6 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/072600 A3

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

(55) Abstract: Monoclonal antibodies which can bind to the CIIA protein and which are generated from binding subdomains or active fragments of the CIIA protein from *Staphylococcus aureus*, including the active fragments proteins from its fibrinogen binding domain such as CIIA protein, the CII33 protein, or CIIA N3, are provided which can be useful in the treatment and protection against infection from staphylococcal bacteria such as *Staphylococcus aureus*. In addition, medical instruments can be treated using the monoclonal antibodies of the invention in order to reduce or eliminate the possibility of their becoming infected or further spreading the infection. In particular, the antibodies of the present invention are advantageous because they can prevent adherence of the bacteria to host cells by impairing or inhibiting the ability of *S. aureus* CIIA to bind to fibrinogen or fibrin, and thus can be utilized in methods or treating or preventing staphylococcal infections.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/02296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/395, 38/00; C07K 16/00 US CL : 530/350,387,1,388.1, 388.2, 388.4 <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> U.S. : 530/350,387,1,388.1, 388.2, 388.4		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet</small>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/12132 A1 (INHIBITEX, INC.) 09 March 2000 (09.03.2000), see entire document.	1-8, 19 and 26
X	TILLMAN et al. Both IgM and IgG Anti-DNA Antibodies Are the Product of Clonally Selective B Cell Stimulation in (NZB x NZWF ¹) Mice. Journal of Experimental Medicine. September 1992, Vol. 176, pages 761-779. See entire document.	29 and 31
X	KLOBECK et al. Subgroup IV of human immunoglobulin K light chains is encoded by a single germline gene. Nucleic Acids Research. 1985, Vol. 13 No. 18, pages 6515-6529. See entire document.	30
X	WO 00/26871 A1 (CONNEX GMBH) 11 May 2000 (11.05.2000), see entire document	27
X	WO 94/05690 A1 (SMITHKLINE BEECHHAM CORPORATION) 17 March 1994 (17.03.1994), see entire document.	30
X	EP 0 520 499 A1 (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 30 December 1992 (30.12.1992), see entire document.	30
X	WO 94/10332 A1 (MEDAREX INC.) 11 May 1994 (11.05.1994), see entire document.	29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* Special category of cited document: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (in specificity) "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 </small>		
<small>*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</small>		
<small>*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</small>		
<small>*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</small>		
<small>*Z* document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search 19 November 2002 (19.11.2002)		Date of mailing of the international search report 15 APR 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box 9000 Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized Officer Robert A. Zeman Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/02296
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database GENCORE on STIN, AN 538559, MONESTIER et al. EMBL Data Library, September 1993, see attached STIC search result.	27
X	Database GENCORE on STIN, AN 538559, MONESTIER et al. EMBL Data Library, September 1993, see attached STIC search result.	28

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/02296
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
<p>This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 9-14,23,24 and 33-36 (in-part) 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: Said claims contain sequences and no computer readable form of the sequence listing was furnished. 3. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input checked="" type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-14, 19, 23-24, 26-31 and 33-36 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
<p>Remark on Protest <input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/02296
BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING	
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.	
Group 1, claim(s) 1-8 and 19, drawn to monoclonal antibodies raised against the clt40 protein of <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Group 2, claim(s) 1-8, drawn to monoclonal antibodies raised against the clt33 protein of <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Group 3, claim(s) 1-8, drawn to monoclonal antibodies raised against the cltA N3 protein of <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Group 4, claim(s) 1, 9 and 23, drawn to a monoclonal antibody raised against a protein with the amino acid sequence of SEQ NO:2.	
Group 5, claim(s) 1 and 9, drawn to a monoclonal antibody raised against a protein with the amino acid sequence of SEQ NO:4.	
Group 6, claim(s) 1, 10 and 24, drawn to a monoclonal antibody raised against a protein with the nucleic acid sequence of SEQ NO:1.	
Group 7, claim(s) 1 and 10, drawn to a monoclonal antibody raised against a protein with the nucleic acid sequence of SEQ NO:3.	
Group 8, claim(s) 1 and 11, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.	
Group 9, claim(s) 1 and 11, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:10.	
Group 10, claim(s) 1 and 11, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:14.	
Group 11, claim(s) 1, 11 and 33, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:18.	
Group 12, claim(s) 1 and 12, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:5.	
Group 13, claim(s) 1 and 12, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:9.	
Group 14, claim(s) 1 and 12, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:13.	
Group 15, claim(s) 1, 12 and 34, drawn to a monoclonal antibody having a variable light chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:17.	
Group 16, claim(s) 1 and 13, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.	
Group 17, claim(s) 1 and 13, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:12.	
Group 18, claim(s) 1 and 13, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.	

Form 1
Second sheet (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/02296
<p>Group 19, claim(s) 1, 13 and 35 drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:20.</p> <p>Group 20, claim(s) 1 and 14, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:7.</p> <p>Group 21, claim(s) 1 and 14, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:11.</p> <p>Group 22, claim(s) 1 and 14, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:15.</p> <p>Group 23, claim(s) 1, 14 and 36, drawn to a monoclonal antibody having a variable heavy chain having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:19.</p> <p>Group 24, claim(s) 15, drawn to isolated antisera.</p> <p>Group 25, claim(s) 1, 16 and 17, drawn to kits comprising a monoclonal antibody and a label.</p> <p>Group 26, claim(s) 18, drawn to a method of diagnosing a <i>Staphylococcus aureus</i> infection.</p> <p>Group 27, claim(s) 19-20, drawn to a method of treating or preventing a <i>Staphylococcus aureus</i> infection utilizing antibodies.</p> <p>Group 28, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the <i>Staphylococcus aureus</i> clf40 protein.</p> <p>Group 29, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the <i>Staphylococcus aureus</i> clf33 protein.</p> <p>Group 30, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the <i>Staphylococcus aureus</i> N3 protein.</p> <p>Group 31, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the <i>Staphylococcus aureus</i> clf40 protein.</p> <p>Group 32, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the <i>Staphylococcus aureus</i> clf33 protein.</p> <p>Group 33, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the <i>Staphylococcus aureus</i> N3 protein.</p> <p>Group 34, claim(s) 25, drawn to an isolated <i>Staphylococcus aureus</i> clf40 protein.</p> <p>Group 35, claim(s) 25, drawn to an isolated <i>Staphylococcus aureus</i> clf33 protein.</p> <p>Group 36, claim(s) 25, drawn to an isolated N3 region of the <i>Staphylococcus aureus</i> clfA protein.</p> <p>Group 37, claim(s) 26, drawn to a composition comprising a monoclonal antibody against the <i>Staphylococcus aureus</i> clfA protein and an antibiotic.</p> <p>Group 38, claim(s) 1 and 27, drawn to a monoclonal antibody wherein the variable heavy chain has a CDR1 region that includes the sequence RYSVH.</p> <p>Group 39, claim(s) 1 and 28, drawn to a monoclonal antibody wherein the variable heavy chain has a CDR2 region that includes the sequence MIWGGGNTDYN SALKS.</p> <p>Group 40, claim(s) 1 and 29, drawn to a monoclonal antibody wherein the variable heavy chain has a CDR1 region that includes the sequence KSSSQVLYSSNQKNYLA.</p> <p>Group 41, claim(s) 1 and 30, drawn to a monoclonal antibody wherein the variable heavy chain has a CDR2 region that includes the sequence WASTRES.</p> <p>Group 42, claim(s) 1 and 31, drawn to a monoclonal antibody wherein the variable heavy chain has a CDR3 region that includes the sequence HQYLSSYT.</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/02296
<p>Group 43, claim(s) 1 and 32, drawn to an isolated monoclonal antibody that is cross-reactive to multiple strains of <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Group 44, claim(s) 1 and 37, drawn to a monoclonal antibody that recognizes the A domain of the <i>Staphylococcus aureus</i> ClfA protein.</p> <p>The inventions listed as Groups 1-44 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 listed as Groups 1-44 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: Pursuant to 37 C.F.R. 1.475(d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group 1) comprises the first-recited product, monoclonal antibodies raised against the <i>Staphylococcus aureus</i> clf40 protein. Further pursuant to 37 C.F.R. 1.475(d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.</p>	
<p>Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: EAST, STIC sequence databases, Medline, Capus</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>, S. aureus, clfA, clf40, clf33, antibody, treatment, monoclonal, RYSVH, MIWGGGNTDYNNSALKS, KSSQSLYSSNQKNYLA, WASTRES, HQVLSSYT</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/31	C 0 7 K 14/31	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/532	G 0 1 N 33/53	L
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/532	A
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 60/308,116

(32)優先日 平成13年7月30日(2001.7.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100099911

弁理士 関 仁士

(74)代理人 100108084

弁理士 中野 瞳子

(72)発明者 パッティ ジョセフ エム.

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

(72)発明者 ヒュッチンス ジエフ ティー.

アメリカ合衆国 3 0 0 0 4 ジョージア州 アルファレッタ ウエストサイド パークウェイ
8 9 9 5 シー/オー インヒビットекс インコーポレーテッド

(72)発明者 ドマンスキ ポール

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

(72)発明者 パテル プラティスクシャ

アメリカ合衆国 3 0 0 2 4 ジョージア州 スワニー ヨセミテ ドライブ 8 9 5

(72)発明者 ホール アンドレア

アメリカ合衆国 3 0 0 0 4 ジョージア州 アルファレッタ ウエストサイド パークウェイ
8 9 9 5 シー/オー インヒビットекс インコーポレーテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA50 BA61 BA80 CA04 CA07 DA01 DA02 DA05

DA11 DA12 GA03 GA11 GA18 HA03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13

4C076 AA24 AA93 BB01 BB13 BB16 BB25 CC31 FF68

4C085 AA12 AA14 BA13 CC07

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 CA40 DA75 DA76

DA86 EA29 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	抗CLFA蛋白的单克隆抗体和用于治疗或预防感染的方法		
公开(公告)号	JP2004534000A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002571513	申请日	2002-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	英希比泰克斯公司		
申请(专利权)人(译)	特克斯抑制公司		
[标]发明人	パッティ ジョセフ エム ヒュッチャンス ジエフ ティー ¹ ドマンスキ ポール パテル プラティスク シャ ホール アンドレア		
发明人	パッティ ジョセフ エム. ヒュッチャンス ジエフ ティー. ドマンスキ ポール パテル プラティスク シャ ホール アンドレア		
IPC分类号	G01N33/53 A61K9/12 A61K9/72 A61K39/395 A61P31/04 C07K14/31 C07K16/12 C07K19/00 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/532 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/04 C07K16/1271 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/12.ZNA A61K9/12 A61K9/72 A61K39/395.R A61P31/04 C07K14/31 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/53.L G01N33/532.A G01N33/577.B C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA24 4C076/AA93 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076/CC31 4C076/FF68 4C085/AA12 4C085/AA14 4C085/BA13 4C085/CC07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	武大原 斋藤健治 藤井 淳 仁关 睦野		
优先权	60/264072 2001-01-26 US 60/274611 2001-03-12 US 60/298413 2001-06-18 US 60/308116 2001-07-30 US		
其他公开文献	JP4171816B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

可以结合ClfA蛋白的单克隆抗体，是由金黄色葡萄球菌的ClfA蛋白的结合亚域或活性片段产生的，包括来自其纤维蛋白原结合域的活性片段蛋白，例如Clf40蛋白，Clf33蛋白或ClfA N3，提供了可用于治疗和保护免受葡萄球菌细菌如金黄色葡萄球菌感染的药物。另外，可以使用本发明的单克隆抗体治疗医疗器械，以减少或消除其被感染或进一步传播感染的可能性。特别地，本发明的

抗体是有利的，因为它们可以通过损害或抑制金黄色葡萄球菌CifA结合纤维蛋白原或纤维蛋白的能力来防止细菌粘附至宿主细胞，因此可以用于方法或治疗或治疗中。预防葡萄球菌的发明。

51) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C07K 16/12	C07K 16/12	ZNA 4B024
A61K 9/12	A61K 9/12	4B064
A61K 9/72	A61K 9/72	4C076
A61K 39/395	A61K 39/395	R 4C085
A61P 31/04	A61P 31/04	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 127 頁) 最終

21) 出願番号	特願2002-571513 (P2002-571513)	(71) 出願人	502334308
36) (22) 出願日	平成14年1月28日 (2002. 1. 28)	インヒビテックス インコーポレー	
35) 翻訳文提出日	平成15年7月23日 (2003. 7. 23)	アメリカ合衆国 ジョージア州 ア	
36) 國際出願番号	PCT/US2002/002296	レッタ ウエストサイド パークウ	
37) 國際公開番号	W02002/072600	8995	
37) 國際公開日	平成14年9月19日 (2002. 9. 19)	(74) 代理人	100065215
31) 優先権主張番号	60/264,072	弁理士 三枝 英二	
32) 優先日	平成13年1月26日 (2001. 1. 26)	(74) 代理人	100076510
33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 岩瀬 悠路	
31) 優先権主張番号	60/274,611	(74) 代理人	100085427
32) 優先日	平成13年3月12日 (2001. 3. 12)	弁理士 小原 健志	
33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100099988
31) 優先権主張番号	60/298,413	弁理士 斎藤 健治	
32) 優先日	平成13年6月18日 (2001. 6. 18)	(74) 代理人	100105821
33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 藤井 淳	