

(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. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/12</b>	C07K 16/12 ZNA	4B024
<b>A61K 9/12</b>	A61K 9/12	4B064
<b>A61K 9/72</b>	A61K 9/72	4C076
<b>A61K 39/395</b>	A61K 39/395 R	4C085
<b>A61P 31/04</b>	A61P 31/04	4H045
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
(86) (22) 出願日	平成14年1月28日 (2002.1.28)		インビテックス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月23日 (2003.7.23)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アルファ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/002296		レッタ ウェストサイド パークウェイ
(87) 国際公開番号	W02002/072600		8995
(87) 国際公開日	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 掛樋 悠路
(31) 優先権主張番号	60/274,611	(74) 代理人	100086427
(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
最終頁に続く			

(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ンへ結合する能力を弱めるまたは妨げることによって、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 . a u r e u s 由来の C l f A 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 . a u r e u s C l f 4 0 タンパク質、S . a u r e u s C l f 3 3 タンパク質、および S . a u r e u s C l f A N 3 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 . a u r e u s 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 ( f i b r i n o g e n ) またはフィブリン ( f i b r i n ) へのブドウ球菌属細菌 ( s t a p h y l o c o c c a l b a c t e r i a ) 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 ( a e r o s o l i z e d ) または静脈内投与に適している、請求項 1 に記載の抗体。

## 【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。

20

## 【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 . a u r e u s C l f A 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ル (vehicle)、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* Clf40 タンパク質、*S. aureus* Clf33 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 ClfA 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* Clf40、Clf33 および ClfA N3 からなる群より選択される単離タンパク質を、抗-ClfA 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、ClfA 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。 20

## 【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】

Clf40 タンパク質、Clf33 タンパク質および ClfA N3 領域からなる群より選択される *S. aureus* 由来 ClfA タンパク質の A ドメインからの単離活性フラグメント。 30

## 【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 RYSVH を含む CDR1 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 MIWGGGNTDYNSALKS を含む CDR2 領域を有する、請求項 1 に記載の抗体。 40

## 【請求項 29】

可変重鎖が配列 KSSQS VLYSSNQKNYLA を含む CDR1 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 WASTRES を含む CDR2 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 HQYLS SYT を含む CDR3 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。 50

## 【請求項 3 3】

可変軽鎖が配列番号 1 8 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 1 7 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 2 0 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 1 9 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。

10

## 【請求項 3 7】

*S. aureus* ClfA 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。

20

## 【0002】

発明の分野

本発明は、概して、凝集因子 A (clumping factor A) (または ClfA) 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、ClfA 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 (Clf40、Clf33 または ClfA 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 ClfA 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。

30

## 【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<sup>TM</sup>s (Microbial Surface Component 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。

40

## 【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

50

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 . a u r e u s は、特定の宿主組織成分への微生物付着を促進するように、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(d o u b l e - e d g e d a t t a c k)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(o p s o n o p h a g o c y t i c k i l l i n g)を介して、体からの微生物の迅速な除去を促進する。

#### 【0005】

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 . a u r e u s 由来のM S C R A M M<sup>TM</sup>(C l 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 M<sup>TM</sup>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(s p r e a d)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 l 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 l f Aの結合を阻害するまたは弱める(i m p a i r)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。

#### 【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 . a u r e u s C l 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】

本発明の目的はまた、C l f Aを結合することができ、またS . a u r e u s C l f Aタンパク質の結合サブドメイン(C l f 4 0、C l f 3 3およびC l 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 l 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 l f 4 0、C l f 3 3およびC l 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】

本発明のさらなる目的は、C l 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 . a u r e u s 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 l 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】

10

20

30

40

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C1fA N3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C1fA N3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、MSCRAMM<sup>TM</sup>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NH<sub>2</sub>-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。

30

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 l f 4 0、C l f 3 3 および C l 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 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 l 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。

#### 【0018】

上記に示されるように、C l 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 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 l f A タンパク質、または単離サブドメインタンパク質 (C l f 4 0、C l f 3 3 および C l 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 l 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 l 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 l 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 l f A、C l f 4 0、C l 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。

#### 【0019】

P C R を用いて、C l f A の A ドメイン (C l f 4 0 では A A 4 0 - 5 5 9 を意味し、またはC l 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DNA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、15 - リットル発酵槽中で光学密度 (O D<sub>600</sub>) 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系アッセンブリー (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 分間スピンドウンし、細胞片を除いた。0 . 1 M N i C l<sub>2</sub> 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、p H 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、p H 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)

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 l f 4 0 または C l f 3 3 は ~ 13 % B u f f e r B ( ~ 26 m M 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 l f 4 0 または C l f 3 3 を含む画分を 1 x P B S 中で透析した。

#### 【 0 0 2 0 】

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 - m L M o n o - Q セファロース ( P h a r m a c i a ) 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 m L 管の間で均等に分けた。B u f f e r A を用いて、それぞれの管の容量を 9 m L にした。1 m L の 10 % T r i t o n 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 r p m で 10 分間スピンドウンし、そしてそれぞれの管の上部水相を回収し、さらに界面活性剤抽出を繰り返した。二度目の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 N i C l<sub>2</sub> でチャージした 5 - m L I D A c h e l a t i n g ( S i g m a ) カラム上を通過させた。3 カラム容量の B u f f e r 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 B u f f e r A で洗浄した。この溶出物は、5 - m L D e t o x i g e l ( S i g m a ) カラム上を通され、そしてその通過液 ( f l o w - t h r o u g h ) を回収し、そしてカラムに再アプライ ( r e a p p l y ) した。二度目の通過からの通過液を回収し、1 x P B S 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 2 1 】

この方法において得られる C l f 4 0 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 C l f 3 3 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。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明に従って、C l f A タンパク質またはその活性サブドメイン ( C l f 4 0 、 C l f 3 3 または C l f A N 3 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 C l f 4 0 または C l f 3 3 タンパク質を使用した。簡単には、B a l b / 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 C l f 4 0 または C l f 3 3 タンパク質の一連の皮下免疫を受けた

#### 【 0 0 2 3 】

##### 【表 1】

注射	日	量 ( μ g )	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(Cl f40) 10(Cl f33)	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 ( t e a s e d ) 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 S P 2 / 0 - A g 14 骨髓腫細胞株 ( A T C C # 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 ( f e e d i n g ) は、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y ( C h a p t e r 2 , U n i t 2 . ) からの t h e P r o d u c t i o n o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s p r o t o c o l に従って行った。



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(scr e e n e d)。陽性のクローンを拡大し(e x p a n d e d)、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(l i m i t t i n g d i l u t i o n)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(C1F40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、そしてピアコア(B i a c o r e)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 . a u r e u s 細菌サンプル(B a r n e t t 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M a b 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<sub>(ab')</sub><sub>2</sub>-抗-マウス-F<sub>(ab')</sub><sub>2</sub>-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、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アスピレーションされた(a s p i r a t e d)。各細菌株について、10,000の事象(e v e n t)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(h i g h b i n d i n g 96 w e l l p l a t e s)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(b l o c k e d)。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(d e v e l o p i n g s o l u t i o n))を1mg/mlの最終濃度で添加した。プレート15-30分間37℃でインキュベートし、そして結果を、P e r k i n E l m e r H T S 7000 B i o - A s s a y r e a d e r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ー法(L i g a n d c a p t u r e m e t h o d)を用いて、B i a c o r e 3000にて行った。ウサギ抗-マウス-Fc抗体(B i a c o r e)をCM5チップにアミン結合させた(a m i n e c o u p l e d)。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。B i a c o r e p r o v i d e d E v a l u a t i o n s o f t w a r e (バージョン3.1)を用いて、K<sub>on</sub>およびK<sub>off</sub>を測定し、K<sub>A</sub>およびK<sub>D</sub>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(i m m u n i z a t i o n)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 C l f A 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 C l f A タンパク質またはその活性領域を用いて本発明の C l f A 抗体を生成するのに使用可能である。

#### 【0029】

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。

10

#### 【0030】

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

20

#### 【0031】

抗体組成物のさらなる形態、および他の M S C R A M M<sup>TM</sup> 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、C l f A M S C R A M M<sup>TM</sup> 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 (Hookら) (本明細書中で参考として援用される) に開示される。

#### 【0032】

C l f A タンパク質またはその有効なサブドメイン (C l f 40、C l f 33 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 Q u i l 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 - Snitkoffら、J. Immunol. 147: 410 - 415 (1991)) によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるもののような)、プロテオリポソーム内での複合体のカプセル化 (Millerら、J. Exp. Med. 176: 1739 - 1744 (1992)) によって記載され且つ本明細書中で参考として援用されるような)、および脂質小胞 (Novasome<sup>TM</sup> 脂質小胞 (Micro Vesicular 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。

30

40

#### 【0033】

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 C l f A 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 (displacing) 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

50

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。

10

#### 【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。

20

#### 【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、患者中が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、ウェスタンブロット分析およびELISA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。

30

#### 【0037】

従って、本発明に従う抗体は、ブドウ球菌のmapタンパク質の特異的検出のために、ブドウ球菌からの感染を予防するために、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(bispecific)、サル化(simianized)、およびヒト化または霊長類化(primatized)抗体、ならびにFabイムノグロブリン発現ライブラリーの産物を含むFab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そ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

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（colloidal gold）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ClfA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、アフィニティー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ClfA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）、または相同的な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 Imm. 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（intraocular 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

s t e n t s )、エピケラトファリア ( e p i k e r a t o p h a l i a ) デバイス、緑内障シャント ( g l u c o m a s h u n t s )、網膜ステープル ( r e t i n a l s t a p l e s )、強膜バックル ( s c l e r a l b u c k l e s )、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 ( t h y r o p l a s t i c ) 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 ( c r a n i o / f a c i a l t e n d o n s )、人工関節、腱、靱帯、半月および盤 ( d i s c s )、人工骨、人工臓器 (人工脾臓、人工心臓、人工四肢、および心臓弁; ステント、ワイヤー、ガイドワイヤー、静脈内および中心静脈カテーテル、レーザーおよびバルーン血管形成術用デバイス、血管および心臓デバイス (チューブ、カテーテル、バルーン)、心室補助材、血液透析コンポーネント、血液酸素供給器、尿道/尿管/泌尿器デバイス (フォーリーカテーテル、ステント、チューブおよびバルーン)、気道カテーテル (気管内および気管開口チューブおよびカフ)、経腸栄養チューブ (経鼻胃、胃内および空腸チューブを含む)、創傷ドレーナッジチューブ (体腔 (胸膜、腹膜、頭蓋、および心膜の腔のような) を除液する ( d r a i n ) 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、ヴァキュエーター ( v a c u t a i n e r s )、シリンジ、ニードル、ピペット、ピペットチップ、および血液チュー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 ( s t r e p t o c o c c a l ) 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つのこのような形態では、ワクチンが筋肉内的に (例えば、三角筋へ) 注射されるが、しかしながら投与の特定の形態は、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) ( S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y , S t . L o u i s , M O ) 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） $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、または $^{131}\text{I}$ （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お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ClfA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、ClfA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、ClfA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。ClfA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ClfA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. Clf40およびClf33の単離ならびに配列決定

PCRを使用し、ClfAのAドメイン(AA40-599を表すClf40またはAA221-550を表すClf33)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(OD<sub>600</sub>)0.7まで増殖させ、そして0.2mM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系アッセンブリ(AG Technologies hollow-fiber assembly)(孔サイズ0.45μm)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 @1100psi.による2回の通過を用い、細胞を1xPBS(10mLの緩衝溶液/1g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17,000rpmにて30分間スピンドウンした。0.1M NiCl<sub>2</sub>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10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl(Buffer A)で洗浄した。30カラム容量以上の10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl、200mM 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。Clf40またはClf33は、~13% Buffer B(~26mMイミダゾール)にて溶出された。280nmにおける吸光度をモニターした。Clf40またはClf33を含む画分を、1xPBS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、4x15mL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9mLにした。1mL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2,000rpm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、0.1M NiCl<sub>2</sub>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、1xPBS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。C l f 4 0 アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 2 として以下に含まれ、そしてこれは核酸配列 S E Q I D N O : 1 によってコードされ、またそれらへの縮重物 ( d e g e n e r a t e s ) によって同様にコードされる。C l f 3 3 アミノ酸配列は、S E Q I D N O : 4 として以下に含まれ、そしてこれは核酸配列 S E Q I D N O : 3 によってコードされ、またそれらへの縮重物 ( d e g e n e r a t e s ) によって同様にコードされる。

【 0 0 5 6 】

実施例 2 . C l f 4 0 および C l f 3 3 を使用したモノクローナル抗体の生産  
この精製された C l f 4 0 または C l f 3 3 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 ( p a n e l ) を生成した。簡潔には、B a l b / 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 5 0  $\mu$  g の C l f 4 0 または C l f 3 3 タンパク質の一連の皮下免疫を受けた：

10

【 0 0 5 7 】

【表 2】

表 I :

注射	日	量 ( $\mu$ g)	経路	アジュバンド
初回	0	50	皮下	フロイント完全
ブースト # 1	14	5(Clf40) 10(Clf33)	静脈	PBS

20

最終ブーストの三日後、脾臓を除き、細かく切って ( t e a s e d ) 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 S P 2 / 0 - A g 1 4 骨髓腫細胞株 ( A T C C # 1 5 8 1 ) 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 ( f e e d i n g ) は、C u r r e n t P r o t o c o l i n I m m u n o l o g y ( C h a p t e r 2 , U n i t 2 . ) からの t h e P r o d u c t i o n o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s p r o t o c o l に従って行った。

【 0 0 5 8 】

その後、標準的な E L I S A 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 - C l f 4 0 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 ( e x p a n d e d ) 、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釈によってクローニングした ( c l o n e d ) 。C L F 4 0 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 B i a c o r e 解析による C l f 4 0 結合への親和性を測定するために改良された E L I S A である、直接結合 E L I S A において、単一細胞クローンを、活性について試験した。試験結果は、以下の表 I I 中に挙げられる：

30

【 0 0 5 9 】

【表 3】



表 II:

ClfA モノクロー 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%

10

## 全細菌への結合

20

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<sub>(ab')</sub><sub>2</sub>-抗-マウス-F<sub>(ab')</sub><sub>2</sub>-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 FACS caliber 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】

30

## 阻害 (Inhibition) (ELISA)

高結合 96 ウェルプレートに、PBS (pH 7.4) 中に 1 µg/ml の ClfA 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 AP 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 °C 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 HTS 7000 Bio-Assay reader を使用して解析した。

40

## 【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 ClfA また

50

はC1f33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。Biacore 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。

#### 【0062】

実施例3. C1f40およびC1f33の追加研究

PCRを使用し、C1fAのAドメイン(AA40-599を表すC1f40、AA221-550を表すC1f33-N2N3ドメインまたはAA370-559を表すC1f-N3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-Lリットル発酵槽中で光学密度( $OD_{600}$ )0.7まで増殖させ、そして0.2mMイソプロピル- $\beta$ -Dガラクトシド(IPTG)と共に4時間誘導した。AGテクノロジー中空系アセンブリ(AG Technologies hollow-fiber assembly)(孔サイズ0.45mm)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 @1100psi.による2回の通過を用い、細胞を1xPBS(10mLの緩衝溶液/1g細胞ペースト)中で溶解した。溶解させた細胞を17,000rpmにて30分間スピンドウンし、細胞片を除去した。0.1M  $NiCl_2$ 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10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl (Buffer A)で洗浄した。30カラム容量以上の10mM Tris、pH8.0、100mM NaCl、200mM 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。C1fタンパク質を、~13% Buffer B(~26mM イミダゾール)にて溶出した。280nmにおける吸光度をモニターした。C1f40およびC1f33を含む画分を、1xPBS中で透析した。

#### 【0063】

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、4x15mL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9mLにした。1mL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2,000rpm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、0.1M  $NiCl_2$ 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、1xPBS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。

#### 【0064】

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C1f40、C1f33またはN3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IIIに示すアジュバントと混合したタンパク質1-10mgの一連の皮下免疫を受けた：

#### 【0065】

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

10

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 MSCRAMMs 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*) について力価を測定した (tittered)。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 骨髓腫細胞株 (ATCC # 1581) へ融合した。細胞融合、続くプレティングおよび栄養補給 (feeding) は、Current Protocol in Immunology (Chapter 2, Unit 2.) からの the Production of Monoclonal Antibodies protocol に従って行った。

20

## 【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 - Clf40、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、CLF40 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 - Clf40 結合の Clf40 結合 / 阻害を測定した。

30

## 【0067】

## Biacore 解析

この解析を通し、流速を常に 10 ml/min に保った。ClfA40 注入の前に、RAM - 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 Clf40 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/ClfA 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 ClfA 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。

40

## 【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 サイトをブロックした後、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、

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FACS caliber 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（P B S（p H 7 . 4）中に1  $\mu$  g / m l のC l f 4 0 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P B S、0 . 0 5 % T w e e n 2 0で洗浄し、そして1 % B S A 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 m g / m l 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A P 複合体を、P B S、0 . 0 5 % T w e e n 2 0、0 . 1 % B S A 中に1 : 7 5 0 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、p N P P（現像溶液）を1 m g / m l 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P e r k i n E l m e r H T S 7 0 0 0 B i o - A s s a y r e a d e rを使用して解析した。

10

#### 【0070】

実施例4 . 異なる反応パターンを有するC l f 4 0 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

20

以下の表IVは、C l f 4 0、C l f 3 3（C l f AドメインのN2N3領域を構成する）、およびC l f A N 3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					FYI
			ELISA	Biacore	フローサイトメトリー	阻害	阻害	
C1fA N3 以下を含む: F29 F30 F31 F32 F34 F36	RIMMS	F29-19	Y	N	N	nt	nt	12-9
		F29-71	Y	N	N	nt	nt	
		F29-92	Y	N	N	nt	nt	
		F31-20	Y	N	N	nt	nt	
		F31-36	Y	N	N	nt	nt	
		F31-100	Y	N	N	nt	nt	
		F31-195	Y	N	N	nt	nt	
		F32-22	Y	N	N	nt	nt	
		F34-15	Y	N	N	nt	nt	
		F36-77	Y	N	N	nt	nt	
C1fA N2N3 (C1f33) 以下を含む: F11 F12 F17 F18	コンベンショナル	F36-197	Y	N	N	nt	nt	
		INH-M010001	Y	Y	Y	Y	Y	
		F12-3	Y	Y	Y	nt	nt	
		F12-1	Y	Y	Y	nt	nt	
		F12-5	Y	Y	Y	nt	nt	
		F12-10	Y	Y	Y	nt	nt	
C1fA N2N3 (C1f33) 以下を含む: F33 F35 F38 F40	RIMMS	F33-7	Y	N	N	Y	Y	13-2 15-EC6 13-1
		F35-279	Y	Y	Y	Y	Y	
		F35-177	Y	N	N	Y	Y	
		F40-7	Y	N	N	Y	Y	
		F38-300	Y	N	N	Y	Y	
		F35-129	Y	N	N	Y	Y	
C1f40 以下を含む: F13 F14 F15 F16	コンベンショナル	INH-M000030	Y	nt	nt	Y	Y	Nt=試験せず
		INH-M010004	Y	nt	nt	Y	Y	
		INH-M010003	Y	nt	nt	Y	Y	
		F13-6	Y	nt	nt	Y	Y	

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、C1f40またはC1f40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C1fA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10ml/minに保った。C1fA40注入の前に、RAM-Fc結合を通して、Mab13-1の946RUおよびMab13-2の768RUを前記チップに吸着した。グラフ上の時間0にて、30mg/mlの濃度でのC1fA40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。C1fA注入時間の終わりにおいて、13-1MabはC1fAの58RUに結合し、また13-2MabはC1fAの168RUに結合した。該実験

のこの段階は、M a b / C l f A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C l f Aに結合するM a b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、C l f Aに結合するフィブリノゲンの64RUはM a b 13-1に結合したが、C l f Aに結合するフィブリノゲンの0RUがM a b 13-2に結合した。

#### 【0073】

実施例6. S . a u r e u s 株 B a r n e t t および S . a u r e u s A T C C 2 5 9 2 3 に対する M a b 1 3 . 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、R P M I / D M E M、2-3リットル培養容量に対し2mM ビルビン酸ナトリウム、4mM L-グルタミンおよび2xペニシリン-ストレプトマイシンを含む1xN u t r i d o m a - S P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 T r i s、pH8.0で中和した。次いでこの精製したIgGを、1xD-リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4に対して透析した。必要であれば、この精製抗体を濃縮し、アリコートで凍結した。

#### 【0074】

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

S . a u r e u s 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 ( s c r a p e r ) 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1xPBSを含む4つの50ml管 (1管あたり20プレート) へ掻き取った。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1xPBSを10mlsの細菌懸濁液に加えた。この懸濁液を10分間、3500xg、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 ( C F U / m l ) を、ストックの1mlアリコートを解凍し、10<sup>-5</sup>から10<sup>-11</sup>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C F U / m lを測定し ( C F U / m l = (コロニー平均 # x 希釈ファクター) / 0.050mls ) そして平均C F U / m l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

T a c o n i c Q u a l i t y L a b o r a t o r y A n i m a l s a n d S e r v i c e s f o r R e s e a r c h ( G e r m a n t o w n , N Y ) より雌のB a l b / 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 N I H G u i d e f o r t h e C a r e a n d U s e o f L a b o r a t o r y A n i m a l s 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

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。

C1 f A 特異的モノクローナル抗体 (M a b)、アイソタイプ

C1 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 C1 f 4 0 M a b , I g G<sub>1</sub>

1 3 . 2 C1 f 4 0 M a b , I g G<sub>1</sub>

1 2 . 9 C1 f 3 3 M a b , I g G<sub>1</sub>

コントロール

A T T C 1 7 7 1 , I g G<sub>1</sub>

リン酸緩衝食塩水、pH 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.

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	CRL1771	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	CRL1771	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。12 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

／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、C1fA13-2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培地中で培養した $1.4 \times 10^8$ 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 Degradерを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース上でのアフィニティ精製によって、PolyA<sup>+</sup>mRNAを単離した。第一鎖(first strand)cDNA合成は、5μg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(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、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングする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 GeneClean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。

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  
 GGTCATATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTACTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTACAAGCTGAAGACCTG  
 GCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGCACACGTTCCGAGGGGGGAC  
 CAAGCTGGAAATAAAA

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
WASTRESGVPRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSTIFGGGTKLE  
 IK

10

・ 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  
 GGTTCCGACGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGT  
 GGTGAAAACACAGACTATAATTACAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA  
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA  
 CTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

20

QVHLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRYNHWRQPPGKGLEWLGMIWGGGE  
NTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD<sup>2</sup>DTAMY<sup>2</sup>YCASAYY<sup>2</sup>GN<sup>2</sup>SWFAYWG  
 QGTLVTVSA

・ C D Rを表すアミノ酸には下線が引かれる。

30

【 0 0 8 1 】

B.モノクローナル抗体 1 2 - 9

Fast Track 2.0キット (Invitrogen; cat # K4500) を使用して、ClfA 12 - 9ハイブリドーマ細胞からメッセンジャーRNAを単離した。簡潔には、10% FBSを含むDMEM - 10培地中で培養した $1.4 \times 10^8$ 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 Degradерを含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ-dTセルロース上でのアフィニティ精製によって、PolyA<sup>+</sup> 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 (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50 ng)を増幅した。PCR産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の1%超純粋アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングするPCR断片をそのゲルから切り出し、そしてpCR2.1-TOPO (In

40

50

vitrogen) プラスミドへのライゲーションのために BIO101 GeneClean 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 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。

【0082】

得られた配列は以下のとおりである：

10

12 - 9 V L A - 1 (可変軽配列)

【0083】

【化3】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA  
CCAAGCTGGAAATAAAA

20

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
WASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEI  
K

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【0084】

12 - 9 V H C - 1 (可変重配列)

【0085】

【化4】

30

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC  
TGTCCATCACATGCGCTATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTA  
GGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA  
CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG  
GGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCAISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG  
GNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARKGEFYGYDGFV  
YWGGQGLTVTVSA

40

・ C D R を表すアミノ酸には下線が引かれる。

【0086】

C. モノクローナル抗体 35 - 220

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、C1fA35 - 220 ハイブリドーマ細胞からメッセンジャー RNA を単離した。簡潔には、10% FBS を含む DMEM - 10 培地中で培養した  $1.4 \times 10^8$  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、Protei

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<sup>+</sup> 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 m g の m R N A および各可変重および可変  
 軽鎖に対する、20 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 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 p m o l ) 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 10  
 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 % 超純粋アガロースゲル中  
 で電気泳動的に分別し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイ  
 ズにマッチングする 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tent TOP 10 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 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 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  
 ークエンサー上で配列決定した。 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 】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
 GGTCACTATGAGCTGTAGGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTACACTGCTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
 GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA  
 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 I 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  
 TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT  
 GGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAA  
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA  
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA  
 CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

35 - 220 VHC - 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】

D.モノクローナル抗体35 - 006

20

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培地中で培養した $1.4 \times 10^8$ 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 Degradator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<sup>+</sup> 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%超純粋アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングする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 Geneclean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。

30

40

【0094】

得られた配列は以下のとおりである：

35 - 006 VLD - 1 (可変軽配列DNA)

【0095】

50

## 【化 9】

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
 GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
 GGCAGTTTATTGCTGTCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA  
 CCGAGCTGGAAATAAAA

35 - 006 V L D - 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

C D Rを表すアミノ酸には下線が引かれる

35 - 006 V H C - 1 ( 可変重配列 D N A )

20

【0097】

【化11】

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC  
 TGTCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT  
 GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAAAGCACAGACTATAATTACAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA  
 GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGA  
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCG  
 CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

30

35 - 006 V H C - 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

C D R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変領域 ( 軽鎖 : カッパ ; 重鎖 : G 1、3 または 4 )  
 ) を使用して、キメラ 12 - 9 を生成した ( P o l y A R N A の選択および第一鎖 c  
 D N A の P C R 増幅 ) 。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 B s m 1 を加えた。3 ' 末端 ( それぞれの不変領域に対  
 するスプライス部位 ) では、B s i w 1 部位を軽鎖可変領域に加え、また重鎖可変領域に  
 は A p a 1 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 1  
 2 - 9 D N A テンプレートの P C R 増幅に続く確認 D N A 配列決定 ( c o n f i r m a t  
 o r y D N A s e q u e n c i n g ) 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プ不変領域または重鎖発現のためのガンマ(1、3または4)不変領域を含む、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)へのトランスフェクション後、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。

10

## 【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ClfA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、Pdlan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。

20

## 【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-III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Pdlan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(aliened)。ひとたび並べられると(aliened)、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アルD NA配列決定で達成された。

30

40

## 【0104】

12-9 VL-Hu(ヒト化可変軽配列DNA)

## 【0105】

## 【化13】

50

GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAAAG  
 GGTCACTATGAACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
 GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCGGAGGGGGGA  
 CCAAGCTGGAATAAAA

1 2 - 9 V L - H u ( ヒト化可変軽配列 )

【 0 1 0 6 】

10

【 化 1 4 】

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLE  
 IK

C D R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。

【 0 1 0 7 】

1 2 - 9 V H - H u ( ヒト化可変重配列 D N A )

【 0 1 0 8 】

20

【 化 1 5 】

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCACAGACCC  
 TGTCCATCACATGCACCATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT  
 GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
 AGACAACCTCCAAGAACCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA  
 CACAGCCGTGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG  
 GGTGTTGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC

1 2 - 9 V H - H u ( ヒト化可変重配列 )

30

【 0 1 0 9 】

【 化 1 6 】

QVQLKESGPGLVKPSQTLSITCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG  
GNTDYNSALKSRLSISKDNSKNQVFLKMNSLTAADTAVYYCARKGEFYYGYDGFV  
YWGQGTLVTVSS

C D R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。

【 0 1 1 0 】

実施例 10 . メチシリン耐性 *S . aureus* 株 67-0 ( M R S A ) 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 ( I N H - M 0 1 0 0 0 1 ) および 35-052 . 1 ( I N H - M 0 1 0 1 6 ) のアイソタイプ適合コントロール C R L 1771 抗体、I N H - M 0 0 0 0 2 9 との比較。

40

【 0 1 1 1 】

本実施例の目的は、マウス敗血症モデルにおいて 0 . 3 m g 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 C R L 1771 抗体 ( I N H - M 0 0 0 0 2 9 ) と比較した C1fAモノクローナル抗体、12-9A ( I N H - M 0 1 0 0 0 1 ) および 35-052 . 1 ( I N H - M 0 1 0 1 6 ) の防御効果の特徴付けることである。

【 0 1 1 2 】

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 <sup>8</sup>	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：

#### Staphylococcus aureus

MRSA株67-0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、50mls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10mlsの1×PBSを含む4つの50ml管（1管あたり20プレート）へ掻き取った。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/ml）を、ストックの1mlアリコートを解凍し、10<sup>-5</sup>から10<sup>-11</sup>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/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】

C1fA12-9Aモノクローナル抗体、INH-M010001（LN：IAA2E1354）

12-9Aモノクローナル抗体（IgG<sub>1</sub>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1.0EU/mgタンパク質を有する7.0mg/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、0.6mg/mlまで希釈し、そして0.5ml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 Ig G 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<sub>1</sub>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 Ig G 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<sub>1</sub>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 Ig G 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, 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部位をブロックした後、2 mg/mlの濃度にてMab12-9、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')<sub>2</sub>-

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
	一晚	44.3	30	0.9
67-0	3hr	11.2	4.2	2
	一晚	27.6	1.9	1.1
560 SAL 1	3hr	28.8	8.4	3.9
	一晚	36.1	6.2	1.2
203 SAL2	3hr	16.1	0.6	2.2
	一晚	40.4	1.9	1.4
451 SAL4	3hr	1.1	0	0
	一晚	12.9	0	0
206 SAL5	3hr	8.8	1.3	1
	一晚	33.5	7.7	0.9
397 SAL6	3hr	28.9	7.9	0.3
	一晚	62.1	40.0	1.0
49 Europe	3hr	7.3	1.2	0
	一晚	11.3	5.7	0
189 Japan	3hr	11.0	0	0
	一晚	15.7	0	0
203 Singapore	3hr	22.1	3.3	0.1
	一晚	15.4	2.5	0.2
4046 USA	3hr	27.7	2.5	1.3
	一晚	23.5	1.2	0.3
Newman ClfA::emr	3hr	0.2	0.3	0.2
	一晚	1.4	0.8	0.9
Newman Spa::kan	3hr	18.6	4.9	0
	一晚	23.9	9.2	0

☐ 陽性活性を示す

このデータは、ClfA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 - ClfA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の異なるクローンの遺伝子型複合体（clonal genotype complexes）の表示、はマルチローカスシーケンスタイピング（multi-locus sequence typing）に由来した（Day, et al., 200

10

20

30

40

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

S.aureus 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) ClfA 上の 12-9 エピトープの保存を表し、ClfA-フィブリノゲン結合が機能的に保存されていることを示唆する。

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

フィブリノゲンへの ClfA 結合を阻害する能力に基づく抗-ClfA 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-ClfA 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  $4 \mu\text{g/ml}$  の濃度から始め、連続的に希釈した。同時に (cocurrently)、*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

40

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ノブ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 ( f l u o r e s c e n t p l a t e r e a d e r ) 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 - C l f A 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法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  $1.4 \times 10^8$  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 Degradation を含む界面活性剤中に溶解させた。オリゴ - dT セルコース上でのアフィニティ精製によって、PolyA<sup>+</sup> mRNA を単離した。第一鎖 cDNA 合成は、5 mg 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 (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 50 ng) を増幅した。PCR 産物を酢酸ナトリウム緩衝液中の 1% 超純粋アガロースゲル中で電気泳動的に分別し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。予想されたサイズにマッチングする 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 GeneClean 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 - C l f A 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 ( f u s i o n s ) (12、13 および 35) から表される；C l f - 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、C l f A 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 ( c o n s e n s u s ) 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、C l f A 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 MIWGGGNTDYNSALKS を含む CDR2 領域である可変重鎖を有し、ならびに配列 KSSQS VLYSSNQKNYLA を含む CDR1 領域、配列 WASTRES を含む CDR2 領域、および / または配列 HQYLSSTY 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 C M V - M I E 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 G S 選択マーカー ( L o n z a ; S l o u g h , U K ) 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、F u g e n e - 6 ( R o c h e ) を使用してトランスフェクションした。上清を、一時的 ( t r a n s i e n t ) または安定的 ( s t a b l y ) 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。

【 0 1 2 5 】

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産生することができ、単独発現カ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】

【 0 1 2 6 】

【図 1】図 1 は、ウサギ抗 - マウス F c ( R A M - F c ) 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 C 1 f A 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ピアコア分析 ( b i a c o r e a n a l y s i s ) 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 のピアコア分析のグラフである。

【図 3】図 3 は、S . a u r e u s ( S t r a i n N e w m a n ) 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 C 1 f A に対する結合親和性を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 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 . a u r e u s 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 . a u r e u s の比較結合を示すグラフである。

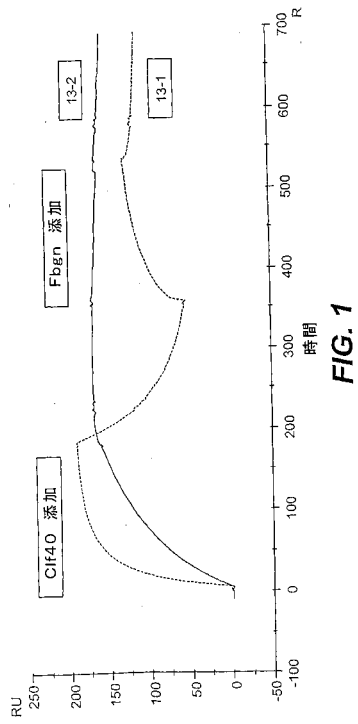
【図 8】C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域において保存配列を示す本発明のモノクローナル抗体の可変重鎖および可変軽鎖配列の図である。

10

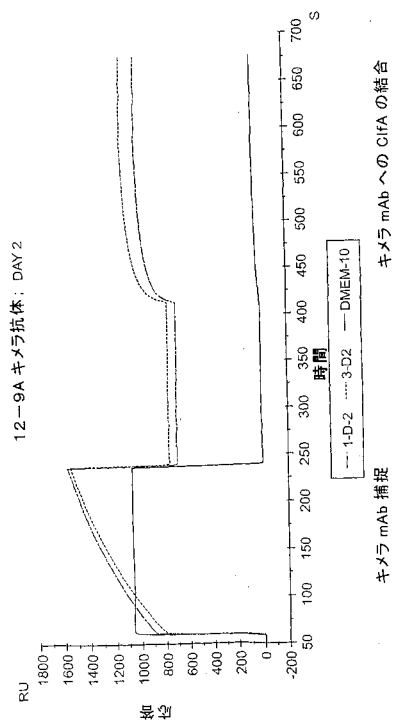
20

30

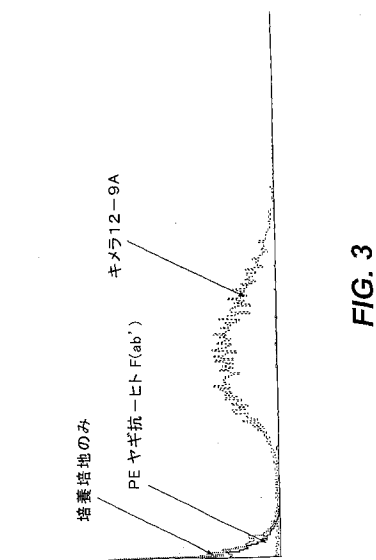
【 図 1 】



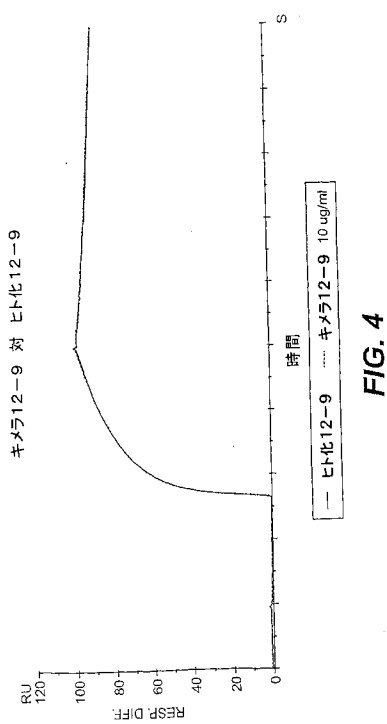
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【図 5】

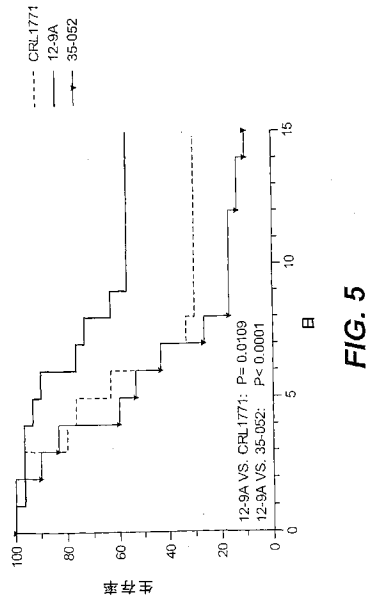


FIG. 5

【図 7】

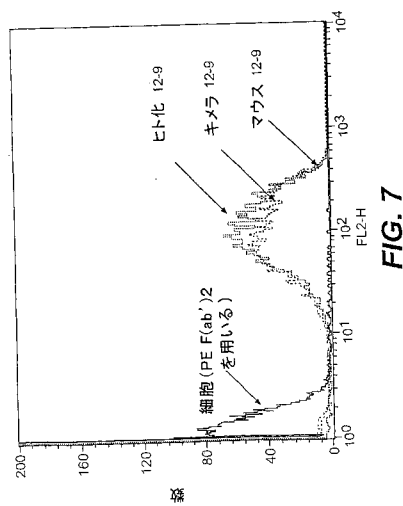


FIG. 7

【図 6】

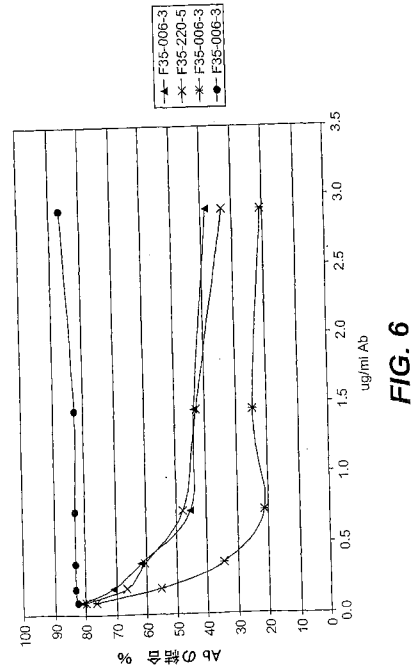


FIG. 6

【図 8】

可変軽鎖 抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1771	LSSQSLLDSDGKTFN	LVSKLDS	WQGTTFPYT
12-9 (ChA)	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
13-2	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
35-006	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
35-220	RSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
コンセンサス	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT H
可変軽鎖 抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1771	SGFSWH	YIHYSGSTDCNP SLKS	MPDS
12-9 (ChA)	RYSVH	MIWGGNTDYN SALKS	KGEFYGYDGFVY
13-2	RYSVH	MIWGGNTDYN SALKS	AYYGN SFWFAY
35-006	RYSVH	MIWGGNTDYN SALKS	RLWYFDV
35-220	RYSVH	MIWGGNTDYN SALKS	AYYGN SFWFAY
コンセンサス	RYSVH NI	MIWGGNTDYN SALKS ES	AYYGN SFWFAY KGEFYGYD RLWYFDV

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, P.C.,  
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) (81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, GH, GI, 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, SI, SG, SK,  
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/266,072 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
- (71) Applicant: INHIBITEX, INC. [US/US]; 8995 Westside  
Parkway, Alpharetta, GA 30004 (US).
- (72) Inventors: PATTI, Joseph, M.; 6680 Stradford Place,  
Cummings, GA 30040 (US); HUTCHINS, Jeff, T.; c/o  
Inhibitex, Inc., 8995 Westside Parkway, Alpharetta, GA  
30004 (US); DOMANSKI, Paul; 2655 N. Thompson  
Road, Atlanta, GA 30319 (US); PATEL, Pratishtha;  
895 Yosemite Drive, Suwanee, GA 30024 (US); HALL,  
Andrea; c/o Inhibitex, Inc., 8995 Westside Parkway,  
Alpharetta, GA 30004 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KL, 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).
- 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 ClfA PROTEIN AND METHOD OF USE IN TREATING OR PREVENTING INFECTIONS

(57) Abstract: Monoclonal antibodies which can bind to the ClfA protein and which are generated from binding subdomains or active fragments of the ClfA protein from *Staphylococcus aureus*, including the active fragments proteins from its fibrinogen binding domain such as ClfB protein, the Clf33 protein, or ClfA 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* ClfA 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<sup>TM</sup>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.

WO 02/072600

2

PCT/US02/02296

*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 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 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<sup>TM</sup>s from *S. aureus* such as the ClfA protein to generate effective monoclonal antibodies because of the variability in the binding properties of the different MSCRAMM<sup>TM</sup>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 use 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 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.

WO 02/072600

3

PCT/US02/02296

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 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.

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.

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.

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 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.

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

WO 02/072600

4

PCT/US02/02296

protein to fibrinogen or fibrin and thus be useful in methods of 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-mouse Fc (RAM-Fc) antibody.

15

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.

WO 02/072600

5

PCT/US02/02296

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 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 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 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 NH<sub>2</sub>-terminal region A (composed of a unique 520 residue segment). The fibrinogen-binding domain of this MSCRAMM has been 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 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,

WO 02/072600

6

PCT/US02/02296

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 by 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

WO 02/072600

7

PCT/US02/02296

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 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, 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  $\mu$ m) and the cell paste frozen at  $-80^{\circ}$  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. Clf40 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 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  $4^{\circ}$ C. Tubes were placed in a  $37^{\circ}$ 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

WO 02/072600

8

PCT/US02/02296

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 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 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 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
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 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 specific anti-Clf40 antibody production using a standard ELISA assay. Positive



WO 02/072600

9

PCT/US02/02296

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.

*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 incubated with Goat-F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-Anti-Mouse-F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-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.

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. 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 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 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

WO 02/072600

10

PCT/US02/02296

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.

Although production of antibodies using recombinant forms of the ClfA  
10 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.

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,

WO 02/072600

11

PCT/US02/02296

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.

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.

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 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 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.

WO 02/072600

12

PCT/US02/02296

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 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 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 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 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 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 patient, and/or the severity of the pre-existing staphylococcal infection.

WO 02/072600

13

PCT/US02/02296

In addition to the use of antibodies to the ClfA 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, whether in a patient or on medical equipment which may also become infected. In accordance with the invention, a preferred method of detecting the presence of staph infections involves the steps of obtaining a sample suspected of being infected by one or more staphylococcal bacteria species or strains, such as a sample taken from an individual, for example, from one's blood, saliva, tissues, bone, muscle, cartilage, or skin. The cells can then be lysed, and the DNA extracted, precipitated and amplified. Following isolation of the sample, diagnostic assays utilizing the 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 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 ClfA protein antibody in accordance with the present invention, and *S. aureus* is indicated by antibody binding to the ClfA proteins in the 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, 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 ClfA 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 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 complementarity determining regions of the hybridoma-derived antibody into a human monoclonal antibody as described, e.g., by Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986) or Tempest *et al.*  
5 *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  
10 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,  
15 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-protheses, vascular stents, epikeratophalia devices, glaucoma shunts, retinal staples, scleral buckles, dental protheses, thyroplastic devices, laryngoplastic devices, vascular grafts, soft and  
20 hard tissue protheses including, but not limited to, pumps, electrical devices including stimulators and recorders, auditory protheses, pacemakers, artificial larynx, dental implants, mammary implants, penile implants, cranio/facial tendons, artificial joints, tendons, ligaments, menisci, and disks, artificial bones, artificial organs including artificial pancreas, artificial hearts, artificial limbs, and heart valves;  
25 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  
30 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 "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.

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

The preferred dose for administration of an antibody composition in accordance with the present invention is that amount will be effective in preventing 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 prophylactic or therapeutic effect is produced. As will be pointed out below, the



WO 02/072600

17

PCT/US02/02296

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

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,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ , or  $^{131}\text{I}$ . Detection of a label can be by methods such as scintillation counting, gamma ray spectrometry or autoradiography. Bioluminescent labels, such as derivatives of firefly luciferin, are also useful. The bioluminescent substance is covalently bound to the protein by conventional methods, and the labeled protein is detected when an enzyme, such as luciferase, catalyzes a reaction with ATP causing the bioluminescent molecule to emit photons of light. Fluorogens may also be used to label proteins. Examples of fluorogens include fluorescein and derivatives, phycoerythrin, allo-phycoyanin,

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 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 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 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 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 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 staphylococcal infections in human and animal patients and in medical or other in-

WO 02/072600

19

PCT/US02/02296

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

##### Example 1. Isolation and Sequencing of Clf40 and Clf33

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, 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  $\mu$ m) and the cell paste frozen at  $-80^{\circ}$  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

WO 02/072600

20

PCT/US02/02296

over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M  $\text{NiCl}_2$ . 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. Clf40 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 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  $\text{NiCl}_2$  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 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 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.

30

**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  $\mu$ g of Clf40 or Clf33 protein in solution or mixed with adjuvant as described below in Table I:

Table I:

Injection	Day	Amount ( $\mu$ g)	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 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 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 include in Table II below:

WO 02/072600

22

PCT/US02/02296

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	$k_{on}$ $1.11 \times 10^{-5}$ $k_{off}$ $6.13 \times 10^{-3}$ $K_D$ $5.51 \times 10^{-8}$	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%

#### 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 µg/ml after blocking protein A sites with rabbit IgG (50 µg/ml). Following incubation with antibody, bacterial cells were incubated with Goat-F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-Anti-Mouse-F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-FITC which served as the detection antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through the FACS caliber 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 µg/ml solution of Cif40 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

20

WO 02/072600

23

PCT/US02/02296

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 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 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

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 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 2 passes through the French Press @ 1100psi. Lysed cells were spun down at

WO 02/072600

24

PCT/US02/02296

17,000rpm for 30 minutes to remove cell debris. Supernatant was passed over a 5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia) column charged with 0.1M  $\text{NiCl}_2$ . 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. 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-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  $\text{NiCl}_2$  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 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 with adjuvant as described below in Table III:



WO 02/072600

25

PCT/US02/02296

Table III:

RIMMS				
Injection	Day	Amount (mg)	Route	Adjuvant
#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
Conventional				
Injection	Day	Amount (mg)	Route	Adjuvant
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) serum was collected and titered 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 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-Clf40, SdrG or FnbA antibody production using a standard ELISA assay. Positive clones were expanded and tested further. Candidates were further 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 Clf40 binding / inhibition of fibrinogen-Clf40 binding by Biacore analysis.

#### Biacore Analysis

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.

WO 02/072600

26

PCT/US02/02296

At time 0, CifA 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 / CifA interaction. In the second phase of the analysis, the ability of the Mab bound CifA to interact and bind 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<sub>(ab)<sup>2</sup></sub>-Anti-Mouse-F<sub>(ab)<sup>2</sup></sub>-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 Cif40 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.

WO 02/072600

PCT/US02/02296

28

Table IV

Antigen	Fusion	Monoclonal	Reactivity					Flow Cytometry	Inhibition	F <sub>Y</sub>
			ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA			
			Cl40	S4RG	FhbpA	Blacore	Blacore			
						Binding	Inhibition			
1FA N3	Fusion	F29-19	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
includes following:	RIMMS	F29-71	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
29 F30 F31 F32		F29-92	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
34 F36		F31-20	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F31-36	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F31-100	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F31-195	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F32-22	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F34-15	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F36-77	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
		F36-197	Y	N	N	N	N	nt	nt	nt
1FA N2N3 (C133)	Conventional	INH-HM010001	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	12-9
includes following:		F12-3	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	N
11 F12 F17 F18		F12-1	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	N
		F12-5	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	N
		F12-10	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	Y
		F33-7	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
1FA N2N3 (C133)	RIMMS	F35-279	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
includes following:		F35-177	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
33 F35 F36 F40		F40-7	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
		F36-300	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
		F35-129	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	nt
1FA40	Conventional	INH-HM00030	Y	nt	nt	Y	N	Y	Y	13-2
includes following:		INH-HM010004	Y	nt	nt	Y	N	Y	Y	13-EC6
13 F14 F15 F16		INH-HM010003	Y	nt	nt	Y	N	Y	Y	13-1
		F13-6	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y	Y

Y = a positive result

N = a negative result

NI = not tested

WO 02/072600

PCT/US02/02296

29

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 disassociation 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 concentration of 100 mg/ml was injected over the chip and after 3 minutes 64 RU of  
25 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 containing 2mM sodium pyruvate, 4mM L-glutamine and 2X penicillin-streptomycin  
35 to 2-3 liter culture volumes. Hybridoma supernatants were then harvested by centrifugation. The supernatants were filtered through 0.45 µm filters and the IgG was affinity purified using protein G chromatography. The monoclonal antibodies

WO 02/072600

30

PCT/US02/02296

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 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 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 thawing 1 ml aliquot of stock, and preparing serial dilutions from  $10^{-6}$  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 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 were allowed to acclimate for at least 14 days prior to initiation of treatment. Upon

WO 02/072600

31

PCT/US02/02296

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 body weights.

10

**C1FA Specific Monoclonal Antibodies (Mab), Isotype**

C1FA specific murine monoclonal antibodies were isotyped using Becton Dickinson Cytometric Bead Array for Murine Isotyping. Isotype was determined using flow cytometry according to the manufacturers protocol.

15

13.1 Cf40 Mab, IgG<sub>1</sub>13.2 Cf40 Mab, IgG<sub>1</sub>12.9 Cf33 Mab, IgG<sub>1</sub>

20

**Controls**ATTC 1771, IgG<sub>1</sub>

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.

		TREATMENT					CHALLENGE		
Gro up #	No. of	Anti- body	Dose	Route	Fre- quency	Time Point	Bacteria	Stock Dilu-	Vol- ume/

WO 02/072600

32

PCT/US02/02296

	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,  $1.4 \times 10^8$  hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degradar. PolyA<sup>+</sup> mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first strand cDNA was accomplished using 5 µg of mRNA and reverse transcriptase in a cDNA synthesis kit (Novagen; cat #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.

The resulting sequences were as follows:

**13-2VLA-1 (variable light sequence)**

WO 02/072600

34

PCT/US02/02296

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
 GGTCACATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 5 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTACTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTACAAGCTGAAGACCTG  
 GCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGCACACGTTGGAGGGGGGAC  
 CAAGCTGGAATAAAA

10 NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
 WASTRESGVPRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSTIFGGGKLE  
 IK

- Amino acids representing a CDR are underlined

15

#### 13-2VHC-3 (variable heavy sequence)

CAGGTGCATCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCTCACAGAGCC  
 20 TGTCATCACATGCACTGTCTCTGGATTCTCATTATCCAGATATAATACACTG  
 GGTTCCGCGAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGT  
 GGTGAAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
 GGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACATGATGA  
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA  
 25 CTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVHLKESGPGVLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRYNHWWRPQPGKLEWLGMIWGGGE  
 NTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCASAYYGN\$WFAYWG  
 30 QGTLVTVSA

- Amino acids representing a CDR are underlined

#### B. Monoclonal Antibody 12-9.

35 Messenger RNA was isolated from C1A 12-9 hybridoma cells using the Fast  
 Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly,  $1.4 \times 10^8$  hybridoma cells cultured in  
 DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by  
 centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degradar. PolyA<sup>+</sup>  
 mRNA was isolated by affinity purification on oligo-dT cellulose. Synthesis of first  
 40 strand cDNA was accomplished using 5 $\mu$ g of mRNA and reverse transcriptase in a  
 cDNA synthesis kit (Novagen; cat #69001-3) containing 20 pmol of 3'

WO 02/072600

35

PCT/US02/02296

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.

The resulting sequences were as follows:

**12-9VLA-1 (variable light sequence)**

20 AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTATATACAGTTCAAATCAGAA  
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGA  
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
25 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTTCGGAGGGGGA  
CCAAGCTGGAAATAAAA  
  
NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
30 WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEI  
K

- Amino acids representing a CDR are underlined

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

35 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC  
TGTCATCACATGCGCTATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGACACT

WO 02/072600

36

PCT/US02/02296

GGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACATGATGA  
 5 CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG  
 GGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGGAAGTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCAISGFSLRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG  
 GNTDYNSALKSRISISKDNSQVFLKMNSLQDDTAMYCYCARKGEFYGYDGFV  
 10 YWGQGTSLVTVSA

- 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 C1a 35-220 hybridoma cells using the  
 Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly,  $1.4 \times 10^6$  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 Degradar. PolyA<sup>+</sup>  
 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  
 25 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

WO 02/072600

37

PCT/US02/02296

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  
GGTCACTATGAGCTGTAGGTCCAGTCAAAGTGTATACAGTTCAAATCAGAA  
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCTACACTGCTGA  
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGACAAGCTGAAGACCT  
15 GGCAGTTTATTACTGTATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA  
CCAAGCTGGAATAAAA

**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 I F G G G T K L E I K

Amino acids representing a CDR are underlined

25

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

30 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC  
TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGACACT  
GGGTTCCGCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
TGGTGGAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAA  
GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA  
35 CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCTACTATGGTAACCTCTGGTTGCTTA  
CTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

**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 ClfA 35-006 hybridoma cells using the Fast Track 2.0 kit (Invitrogen; cat #K4500). Briefly,  $1.4 \times 10^6$  hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degradar. PolyA<sup>+</sup> 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 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:

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

WO 02/072600

39

PCT/US02/02296

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA  
 GGTCACATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
 GAACCTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 5 GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT  
 GGCAGTTTATTGCTGTGCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA  
 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

Amino acids representing a CDR are underlined

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

20 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCAGAGGCC  
 TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTATTATCCAGATATAGTGTACACT  
 GGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAAAGCACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA  
 25 GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGA  
 CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCG  
 CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

**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

Amino acids representing a CDR are underlined

**Example 8. Generation of Chimeric 12-9 With Equivalence in Binding Kinetics 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 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 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 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  $\mu$ g/ml). Supernatants were harvested and analyzed by Biacore for binding kinetics and flow cytometry for binding to *S. aureus* 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.

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

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 ClfA 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 heavy and light chains were assigned a Kabot 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 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 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)**

GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAAAG  
GGTCACTATGAACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTGTTTATACAGTTCAAATCAGAA  
30 GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA  
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT  
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTAAGCTGAAGACCT  
GGCAGTTTATTACTGTCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGGAGGGGGGA  
CCAAGCTGGAATAAAA

WO 02/072600

42

PCT/US02/02296

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

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNC**KSSQSVLYSSNQKNY**LAWYQQKPGQSPKLLIY  
WASTRESGV**PDRFSG**SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEIK

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

10 humanization changes

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

15 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCACAGACCC  
 TGCCATCACATGCACCATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTA  
 CACTGGGTTCCGCGAGCTCCAGGAAAGGCTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG  
 TGGTGGAACACAGACTATAATTCACTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA  
 AGACAACCTCCAAGAACCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA  
 20 CACAGCCGTGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG  
 GGTGTTGTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTC

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

25 QVQLKESGPGLVKPSQTLTITCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKLEWLGMIWGG  
 GNTDYN**S**ALKSRISISKD**NS**KNQVFLKMNSL**TA**ADTAVYYCARKGEFYGYDGFV  
 YWGQGTLVTV**S**

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

30 humanization changes

**Example 10. Comparison of the C1fA 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).**

The purpose of this example is to characterize the protective effects of the C1fA 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.

WO 02/072600

43

PCT/US02/02296

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	~10 <sup>8</sup>	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

WO 02/072600

44

PCT/US02/02296

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  $10^{-8}$  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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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

WO 02/072600

45

PCT/US02/02296

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:**

Upon receipt, all animals were examined and group housed (5/cage) in  
15 polycarbonate shoebox style cages with absorbent bed-o-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 the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

20

**Identification and Randomization:**

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  
25 body weights.

The data demonstrate the therapeutic value of an anti-ClfA antibody such as 12-9  
that interferes with ClfA – fibrinogen adhesion compared with a non ClfA specific  
isotype control (CRL 1771) as well as a specific control (35-052) that recognizes  
30 ClfA at a site independent of ClfA – 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  
5 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<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-Anti-Mouse-F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>-FITC which served as the detection  
antibody. After antibody labeling, bacterial cells were aspirated through the  
15 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

<i>S. aureus</i> Strain	Culture Time	Fluorescence Intensity (Geometric Mean)		
		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 C1FA::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-C1fA antibody (such as 12-9) that is capable of recognizing a functional epitope on the C1fA 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*. *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	+



WO 02/072600

49

PCT/US02/02296

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 4µg/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,  $1.4 \times 10^8$  hybridoma cells cultured in DMEM-10 medium with 10 % FBS were washed with PBS, pelleted by centrifugation then lysed in detergent containing Protein/RNase Degradar. PolyA<sup>+</sup> 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 antigen, the method and sequence of the immunizations prior to fusion. In  
20 particular, this data revealed consensus conserved regions in the CDR1 and CDR2 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  
25 binding properties and thus will fall within the scope of the present invention.

Accordingly, in accordance with the present invention, antibodies which will 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  
30 CDR1 region includes the sequence RYSVH, and/or a CDR2 region that includes the

sequence MIWGGGNTDYN SALKS, 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 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 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.

WO 02/072600

53

PCT/US02/02296

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.

WO 02/072600

54

PCT/US02/02296

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.

WO 02/072600

55

PCT/US02/02296

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 MIWGGGNTDYN SALKS.
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*.

WO 02/072600

56

PCT/US02/02296

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.



WO 02/072600

1/8

PCT/US02/02296

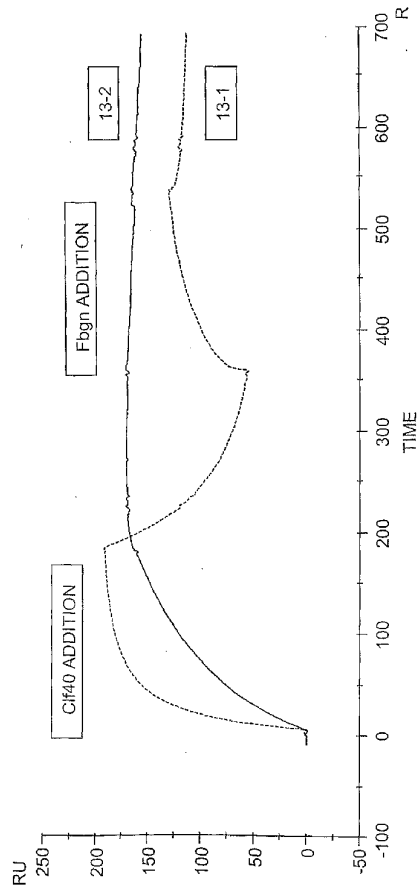


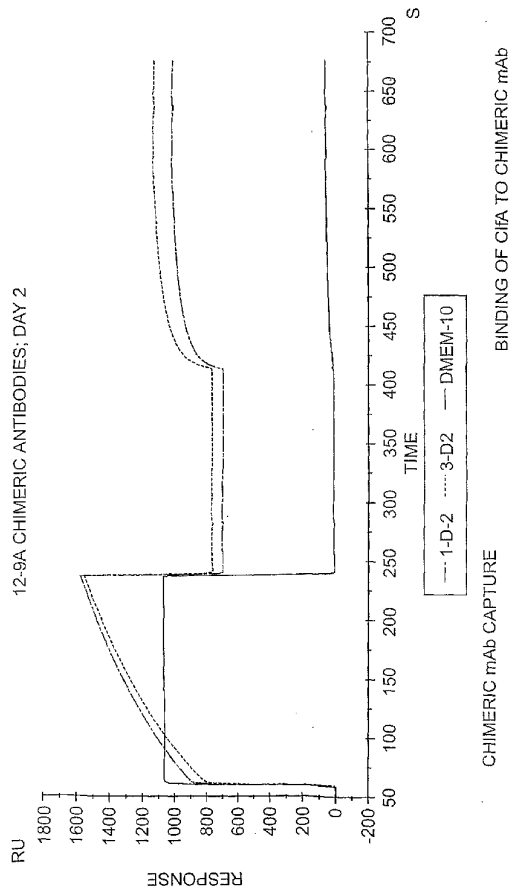
FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072600

2/8

PCT/US02/02296



**FIG. 2**

WO 02/072600

3/8

PCT/US02/02296

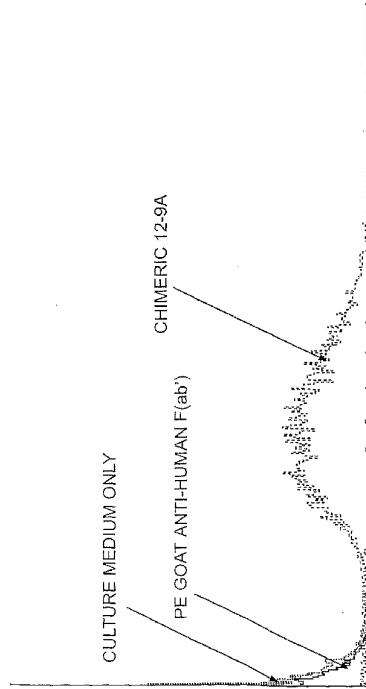
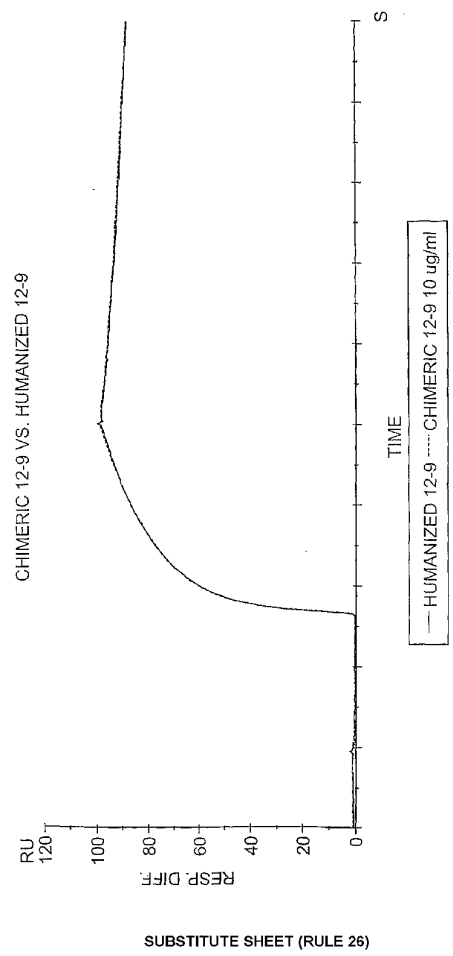


FIG. 3

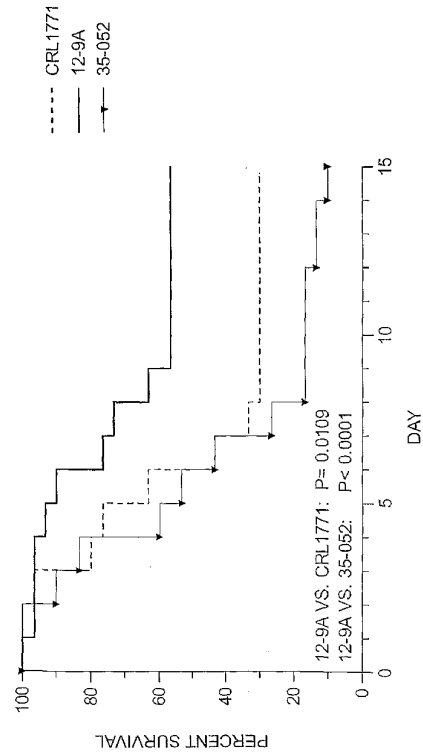


**FIG. 4**

WO 02/072600

5/8

PCT/US02/02296

**FIG. 5**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

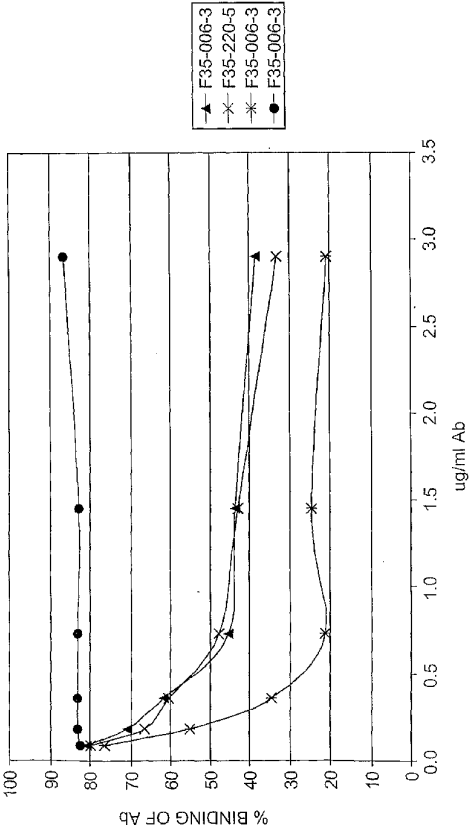
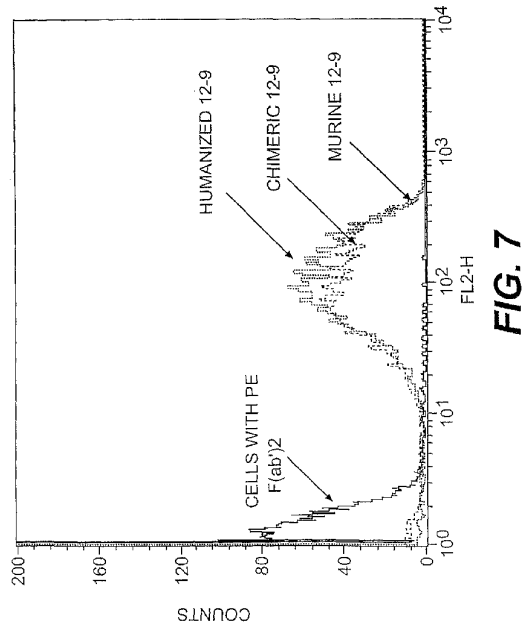


FIG. 6

WO 02/072600

7/8

PCT/US02/02296



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072600

8/8

PCT/US02/02296

VARIABLE LIGHT CHAIN			
ANTIBODY	CDR <sub>1</sub>	CDR <sub>2</sub>	CDR <sub>3</sub>
1771	LSSQSLLDSDGKTFLN	LVSKLDS	WQGTDFPYT
12-9 (C1A)	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
13-2	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSHT
35-006	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
35-220	RSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
CONSENSUS	KSSQSVLYSSNQKNYLA <sub>R</sub>	WASTRES	HQYLSSYT <sub>H</sub>
VARIABLE LIGHT CHAIN			
ANTIBODY	CDR <sub>1</sub>	CDR <sub>2</sub>	CDR <sub>3</sub>
1771	SGFSWH	YIHYSGSTDCNP SLKS	MPDS
12-9 (C1A)	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	KGEFY YGYDGFVY
13-2	RYNIH	MIWGGGNTDYN SALKS	AYYGN SWFAY
35-006	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	RLWYFDV
35-220	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	AYYGN SWFAY
CONSENSUS	RYSVH <sub>NI</sub>	MIWGGGNTDYN SALKS <sub>ES</sub>	AYYGN SWFA * * * Y KGEFY YGYD RLWYFDV

FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/072600

1/15

PCT/US02/02296

## SEQUENCE LISTING

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

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE CLPA 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 gtgttaacga atctgatagc gcaagtaacg aaagcaaaag taatgattca 60  
 agtagcgtta gtgctgcacc taaaacagac gacacaaacy tgagtatac taaaacatcg 120  
 tcaaacacta ataattggcga aacgagtggt gcgcnaaate cagcacaaca ggaaacgaca 180  
 caatcatcat caacaaatgc aactacggaa gaaacgcggg taactggtga agctactact 240  
 acgacaacga atcaagctaa tacaccggca acaactcaat caagcaatac aaatgcggag 300  
 gaattagtga atcaacaag taatgaaacy acttttaagt atactaatac agtatcatct 360  
 gtaaattcac ctcaaaattc tacaaatgcy gaaaatgttt caacaacgca agatacttca 420  
 actgaagcaa caccctcaa caatgaatca gctccacaga gtacagatgc aagtaataaa 480  
 gatgtagtta atcaagcggg taatacaagt gcgcctagaa tgagagcatt tagtttagcg 540  
 gcagtagctg cagatgcacc ggcagctggc acagatatta cgaatcagtt gacgaatgtg 600  
 acagttggta ttgactctgg tacgactgtg tatcgcacc aagcaggtta tgtcaactg 660  
 aattatgggt tttcagtgcc taattctgct gttaaagggt acacattcaa aataactgta 720

WO 02/072600

2/15

PCT/US02/02296

```

octaaagaat taaacttaaa tgggtgaact tcaactgcta aagtgcaccc aattatggct 780
ggagatcaag tattggcaaa tgggtgaato gatagtgatg gtaatgttat ttatacattt 840
acagactatg taaatactaa agatgatgta aaagcaactt tgaccatgcc cgcttatatt 900
gacccctgaaa atgttaaaaa gacaggtaat gtgacattgg ctactggcat aggtagtaca 960
acagcaaaaca aaacagtatt agtagattat gaaaaatatg gtaagtttta taaattatct 1020
attaagggtg caattgacca aatcgataaa acaataataa cgtatcgta gacaatttat 1080
gtcaatccaa gtggagataa cgttattgct cgggttttaa caggtaatat aaaaccaaat 1140
acggatagta atgcattaat agatcagcaa aatacaagta ttaaagtata taaagtatag 1200
aatgcagctg atttatctga aagttacttt gtgaatccag aaaactttga ggatgtcact 1260
aatagtgtga atattacatt cccaaatcca aatcaatata aagtagagtt taatacgctt 1320
gatgatcaaa ttacaacacc gtatatagta gttgttaaat gtcataattg tccgaatagc 1380
aaaggtgatt tagctttacg ttcaacttta tatgggtata actcgaatat aatttggcgc 1440
tctatgtcat gggacaacga agtagcattt aataacggat caggttctgg tgacgggtac 1500
gataaaccag ttgttctctg acaacctgat gagcctggtg 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 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

3/15

PCT/US02/02296

Thr 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

4/15

PCT/US02/02296

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

5/15

PCT/US02/02296

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

<400> 3  
 gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 60  
 gttgggtattg actctggtao gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 120  
 tatgggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaagggtgaca cattcaaat aactgtacct 180  
 aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgcacccaat tatggctgga 240  
 gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 300  
 gactatgtaa atactaaaga tgaigtataa gcaactttga ccatgccgcg ttatatggac 360  
 cctgaaatag ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 420  
 gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 480  
 aaagggtacaa tggccaatcg cgataaaaca aataatacgt atgtcagac aatttatgtc 540  
 aatccaagtg gagataacgt tattgcgcgc gttttaacag gtaattttaa accaaatacg 600  
 gatagtaatg cattaataga tcagcaaat acaagtatta agtatataa agtagataat 660  
 gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgcactaat 720  
 agtgtaata ttacattccc aaatccaat caatataag tagagtttaa tacgcctgat 780  
 gatcaaatga caacacgta tatagtagtt gttaatggte atattgatcc gaatagcaaa 840  
 ggtgatthag ctttacgttc aactttatat ggggtataact cgaatataat ttggcgctct 900  
 atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctgggtg cggtatcgat 960  
 aaaccagttg ttctgaaca acctgatgag 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

6/15

PCT/US02/02296

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

7/15

PCT/US02/02296

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  
 aacatttatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60  
 atgagctgta agtcagtc aagtgttita tacagttcaa atcagaagaa ctacttgccc 120  
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctctt aaactactga tctactgggc atccactagg 180  
 gaatctgggtg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240  
 atcaacagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacaaata cctctctctg 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

8/15

PCT/US02/02296

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 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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

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

<400> 7  
 cagggtgcatc tgaaggagtc aggaactggc ctgggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60  
 acatgcactg tctctggatt ctcattatcc agatataata tacaactgggt tgcgcagcct 120  
 ccaggaaagg gctctggagt gctgggaatg atatgggggtg gtgaaaaacac agactataat 180  
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240  
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag cgcctactat 300  
 ggtaactcct ggtttgctta ctggggccag gggactctgg tcactgtctc tgca 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

9/15

PCT/US02/02296

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 aaaggtcact 60  
 atgagctgta agtcacgtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttgccc 120  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctctt aaactgctga tctactgggc atccactagg 180  
 gaactcgttg toctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240  
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtoatcaata cctctctctg 300  
 tacacgttctg 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

10/15

PCT/US02/02296

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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100                      105                      110

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

<400> 11  
 cagggtgcagc tgaaggagtc aggcacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60  
 acatgcgcta tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120  
 ccaggaaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaacac agactataat 180  
 tcagctctca aatccagact gacatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240  
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtatt actgtgccag aaaaggggaa 300  
 ttctactatg gtlacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360  
 gca 363

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

WO 02/072600

11/15

PCT/US02/02296

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 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  
 aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcaact 60  
 atgagctgta ggtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc 120  
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct acactgctga totactgggc atccactagg 180  
 gaatctgggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactctttacc 240  
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataata cctctctctcg 300  
 tacacgttctg 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

12/15

PCT/US02/02296

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

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

<400> 15  
 cagggtgcagc tgaaggagtc aggaacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60  
 acatgcactg tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120  
 ccaggaaagg gctctggagt gctgggaatg atatggggtg gtggaaacac agactataat 180  
 tcagctctca aatccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240  
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccac cgcctactat 300  
 ggtaactcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 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

13/15

PCT/US02/02296

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 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 ctggtgtgt ctctgggaga aagggtcact 60  
 atgaactgta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttgccc 120  
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180  
 gaatctggtg tccctgatcg cttcagcggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240  
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataata cctctctctg 300  
 tacacgttcg 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

14/15

PCT/US02/02296

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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
           100                  105                  110

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 19

cagggtgcagc tgaaggagtc aggaacctggc ctggtgaagc cctcacagac cctgtccatc 60

acatgcacca tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120

ccaggaangg gctctggagtg gctgggaatg atatgggggtg gtggaacac agactataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaagacaact ocaagaacca agttttotta 240

aaaatgaaca gtctgaccgc cgctgacaca gccgtgtatt actgtgccag aaaaggggaa 300

ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360

tcc 363

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; FRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 20

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

WO 02/072600

15/15

PCT/US02/02296

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 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 Classification: A61K 39/395,  
38/00, C07K 16/00(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

(81) Designated States (national): All, 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.

(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(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, 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).Published:  
— with international search report(72) Inventors: PATTI, Joseph, M.; 6680 Stradford Place,  
Cummings, GA 30040 (US); HUTCHINS, Jeff, T.; c/o  
Inhibitex, Inc., 8995 Westside Parkway, Alpharetta, GA  
30004 (US); DOMANSKI, Paul; 2655 N. Thompson  
Road, Atlanta, GA 30319 (US); PATEL, Pratikscha;  
895 Yosemite Drive, Suwanee, GA 30024 (US); HALL,  
Andrea; c/o Inhibitex, Inc., 8995 Westside Parkway,  
Alpharetta, GA 30004 (US).(88) Date of publication of the international search report:  
6 November 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/072600 A3

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE ClfA PROTEIN AND METHOD OF USE IN TREATING OR PREVENT-  
ING INFECTIONS(57) Abstract: Monoclonal antibodies which can bind to the ClfA protein and which are generated from binding subdomains or  
active fragments of the ClfA protein from *Staphylococcus aureus*, including the active fragments proteins from its fibrinogen binding  
domain such as ClfA0 protein, the ClfA3 protein, or ClfA 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* ClfA 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																								
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(C) : A61K 39/395, 38/00, C07K 16/00 US CL : 530/350, 387.1, 388.1, 388.2, 388.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 387.1, 388.1, 388.2, 388.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 00/12132 A1 (INHIBITEX, INC.) 09 March 2000 (09.03.2000), see entire document.</td> <td>1-8, 19 and 26</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>TILLMAN et al. Both IgM and IgG Anti-DNA Antibodies Are the Product of Clonally Selective B Cell Stimulation in (NZB x NZW)F<sub>1</sub> Mice. Journal of Experimental Medicine. September 1992, Vol. 176, pages 761-779. See entire document.</td> <td>29 and 31</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>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.</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 00/26671 A1 (CONNEX GMBH) 11 May 2000 (11.05.2000), see entire document</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 94/05690 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 17 March 1994 (17.03.1994), see entire document.</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>EP 0 520 499 A1 (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 30 December 1992 (30.12.1992), see entire document.</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 94/10332 A1 (MEDAREX INC.) 11 May 1994 (11.05.1994), see entire document.</td> <td>29</td> </tr> </tbody> </table>			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 NZW)F <sub>1</sub> 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 00/26671 A1 (CONNEX GMBH) 11 May 2000 (11.05.2000), see entire document	27	X	WO 94/05690 A1 (SMITHKLINE BEECHAM 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
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 NZW)F <sub>1</sub> 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 00/26671 A1 (CONNEX GMBH) 11 May 2000 (11.05.2000), see entire document	27																								
X	WO 94/05690 A1 (SMITHKLINE BEECHAM 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.																										
* Special categories of cited documents: "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 doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other specific reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																										
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 PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorizing 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 STN, AN S38559, MONESTIER et al. EMBL Data Library, September 1993, see attached STIC search result.	27
X	Database GENCORE on STN, AN S38559, MONESTIER et al. EMBL Data Library, September 1993, see attached STIC search result.	28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/02296
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	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).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
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.:
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.

## 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 *clf40* protein of *Staphylococcus aureus*.

Group 2, claim(s) 1-8, drawn to monoclonal antibodies raised against the *clf33* protein of *Staphylococcus aureus*.

Group 3, claim(s) 1-8, drawn to monoclonal antibodies raised against the *clfA* N3 protein of *Staphylococcus aureus*.

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:8.

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

and sheet (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/02296

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.

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.

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.

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.

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.

Group 24, claim(s) 15, drawn to isolated antisera.

Group 25, claim(s) 1, 16 and 17, drawn to kits comprising a monoclonal antibody and a label.

Group 26, claim(s) 18, drawn to a method of diagnosing a *Staphylococcus aureus* infection.

Group 27, claim(s) 19-20, drawn to a method of treating or preventing a *Staphylococcus aureus* infection utilizing antibodies.

Group 28, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the *Staphylococcus aureus* clf40 protein.

Group 29, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the *Staphylococcus aureus* clf33 protein.

Group 30, claim(s) 21, drawn to a method of inducing an immunological response using the *Staphylococcus aureus* N3 protein.

Group 31, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the *Staphylococcus aureus* clf40 protein.

Group 32, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the *Staphylococcus aureus* clf33 protein.

Group 33, claim(s) 22, drawn to a method of identifying monoclonal antibodies using the *Staphylococcus aureus* N3 protein.

Group 34, claim(s) 25, drawn to an isolated *Staphylococcus aureus* clf40 protein.

Group 35, claim(s) 25, drawn to an isolated *Staphylococcus aureus* clf33 protein.

Group 36, claim(s) 25, drawn to an isolated N3 region of the *Staphylococcus aureus* clfA protein.

Group 37, claim(s) 26, drawn to a composition comprising a monoclonal antibody against the *Staphylococcus aureus* clfA protein and an antibiotic.

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 RYSVEH.

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 MIWGGGNTDYNALKS.

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 KSSQSVLYSSNQKNYLA.

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.

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 HQYLSST.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/02296

Group 43, claim(s) 1 and 32, drawn to an isolated monoclonal antibody that is cross-reactive to multiple strains of *Staphylococcus aureus*.

Group 44, claim(s) 1 and 37, drawn to a monoclonal antibody that recognizes the A domain of the *Staphylococcus aureus* ClfA protein.

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 *Staphylococcus aureus* 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.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

EAST, STIC sequence databases, Medline, CAPHUS

*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, clfa, clf40, clf33, antibody, treatment, monoclonal, RYSVH, MIWGGGNTDYNALKS, KSSQSLYSSNQKNYLA, WASTRES, HQYLSSYT

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	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,P T,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 睦子

(72)発明者 パッティ ジョセフ エム.

アメリカ合衆国 3 0 0 4 0 ジョージア州 カミングス 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 ジェフ 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 ウェストサイド パークウェイ 8 9 9 5 シーノオー インビッテクス 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 ウェストサイド パークウェイ 8 9 9 5 シーノオー インビッテクス 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	<a href="#">JP2004534000A</a>	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 ヒュッチンスジェフティー ドマンスキポール パテルプラテイスクシャ ホールアンドレア		
发明人	パッティ ジョセフ エム. ヒュッチンス ジェフ ティー. ドマンスキ ポール パテル プラテイスクシャ 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	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 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。

特許出願の明細書									
5) Int. Cl. 7		F 1		C 0 7 K 1 6 / 1 2		Z N A		テーマコード (参考)	
C 0 7 K 1 6 / 1 2		C 0 7 K 1 6 / 1 2		A 6 1 K 9 / 1 2				4 B 0 2 4	
A 6 1 K 9 / 1 2		A 6 1 K 9 / 1 2		A 6 1 K 9 / 7 2				4 B 0 6 4	
A 6 1 K 9 / 7 2		A 6 1 K 9 / 7 2		A 6 1 K 3 9 / 3 9 5		R		4 C 0 7 6	
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5		A 6 1 K 3 9 / 3 9 5		A 6 1 P 3 1 / 0 4				4 C 0 8 5	
A 6 1 P 3 1 / 0 4		A 6 1 P 3 1 / 0 4						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	
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) 国際出願番号		PCT/US2002/002286				レッタ ウェストサイド パークウ			
37) 国際公開番号		W02002/072600				8 9 9 5			
37) 国際公開日		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 掛橋 悠路			
31) 優先権主張番号		60/274, 611		(74) 代理人		100086427			
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			