

(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2017-502002

(P2017-502002A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46 Z N A	4 B O 5 O
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C12N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C12N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 190 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-538020 (P2016-538020)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月9日 (2014.12.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月5日 (2016.8.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/069347
 (87) 国際公開番号 W02015/089073
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
 (31) 優先権主張番号 61/913,714
 (32) 優先日 平成25年12月9日 (2013.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511060836
 ニューヨーク・ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー
 ヨーク ワシントン スクエア サウス
 70
 (71) 出願人 510315135
 ヤンセン・バイオテック・インコーポレイ
 テッド
 Janssen Biotech, Inc.
 アメリカ合衆国19044ペンシルベニア
 州ホーシャム、リッジビュー・ドライブ8
 00番
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ブドウ球菌剤の食細胞送達用組成物及び方法

(57) 【要約】

本明細書は、概して、複数の細菌毒性因子に結合する多特異的結合分子、これらの結合分子の作製方法、及び細菌感染の治療を行うためのこれらの結合分子の使用に関する。特に、結合分子は、好ましくは抗体または抗体断片及び代替的足場など、少なくとも2つの結合ドメインを含む。第1の結合ドメインは、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質、好ましくはSDR含有タンパク質に結合可能である。第2の結合ドメインは、ブドウ球菌ロイコトキシン、好ましくはLukAB、LukD、またはLukEに結合可能である。これらの多特異的結合化合物は、ブドウ球菌に対して殺菌活性を有し、従って、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌などのブドウ球菌感染の治療、及び/または改善に使用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合可能である第 1 の結合ドメインと、ブドウ球菌ロイコトキシンに結合可能である第 2 の結合ドメインとを含む、結合分子。

【請求項 2】

グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質が、グリコシル化セリン - アスパラギン酸ジペプチド繰り返し (SDR) 含有タンパク質である、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 3】

グリコシル化 SDR 含有タンパク質が、ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、SdrE、SdrF、SdrG、または SdrH である、請求項 2 に記載の結合分子。

10

【請求項 4】

第 1 の結合ドメインが、全長抗体または抗体断片である、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 5】

全長抗体または抗体断片が、野生型 IgG1 を切断するブドウ球菌プロテアーゼによるタンパク質分解に耐性がある、請求項 4 に記載の結合分子。

【請求項 6】

ブドウ球菌プロテアーゼが、配列番号 60 内の残基 222 ~ 237 (EU 番号付け) 間、または配列番号 60 内の残基 222 ~ 237 (EU 番号付け) で野生型 IgG1 を切断する、請求項 5 に記載の結合分子。

20

【請求項 7】

ブドウ球菌プロテアーゼが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) V8 プロテアーゼである、請求項 6 に記載の結合分子。

【請求項 8】

全長抗体または抗体断片が、ヒト FcRI に特異的結合することができない、請求項 4 に記載の結合分子。

【請求項 9】

全長抗体または抗体断片が、ヒト、ヒト化、若しくはキメラ抗体、または抗体断片である、請求項 4 に記載の結合分子。

【請求項 10】

全長抗体または抗体断片が、プロテイン A に特異的結合することができない、請求項 4 に記載の結合分子。

30

【請求項 11】

全長抗体または抗体断片が、Sbi に特異的結合することができない、請求項 4 に記載の結合分子。

【請求項 12】

全長抗体または抗体断片が、FcRn に特異的結合することができる、請求項 4 に記載の結合分子。

【請求項 13】

第 2 の結合ドメインが、代替的足場である、請求項 1 に記載の結合分子。

40

【請求項 14】

代替的足場が、フィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインを含む、請求項 13 に記載の結合分子。

【請求項 15】

FN3 ドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する LukA、配列番号 11 のアミノ酸配列を有する LukB、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する LukD、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する LukE、またはこれらの任意の組み合わせに結合する、請求項 14 に記載の結合分子。

【請求項 16】

FN3 ドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する LukA 及び配列番号 11 の

50

アミノ酸配列を有する L u k B を含む L u k A B 複合体に結合する、請求項 1 4 に記載の結合分子。

【請求項 1 7】

F N 3 ドメインが、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する L u k E 及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する L u k D を含む L u k E D 複合体に結合する、請求項 1 4 に記載の結合分子。

【請求項 1 8】

第 2 の結合ドメインが、(i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する L u k A、(i i) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する L u k B、(i i i) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する L u k D、または (i v) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する L u k E に結合するために、配列番号 1 4 ~ 5 9 または配列番号 1 1 3 ~ 6 6 6 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを有する F N 3 ドメインと競合する、請求項 1 に記載の結合分子。

10

【請求項 1 9】

F N 3 ドメインが、配列番号 1 4 ~ 5 9 及び配列番号 1 1 3 ~ 6 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の結合分子。

【請求項 2 0】

F N 3 ドメインが、配列番号 1 4 または配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の結合分子。

【請求項 2 1】

ブドウ球菌ロイコトキシンが、ロイコトキシン A (L u k A)、ロイコトキシン B (L u k B)、ロイコトキシン A B (L u k A B)、ロイコトキシン D (L u k D)、ロイコトキシン E (L u k E)、ロイコトキシン E D (L u k E D)、パントン - バレンタインロイコシジン S (L u k S - P V)、パントン - バレンタインロイコシジン F (L u k F - P V)、パントン - バレンタインロイコシジン (L u k S F / P V L)、ヘモリシン A (H l g A)、ヘモリシン C (H l g C)、ヘモリシン B (H l g B)、ヘモリシン A B (H l g A B)、及び - ヘモリシン B C (H l g B C) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の結合分子。

20

【請求項 2 2】

ブドウ球菌ロイコトキシンが、L u k A B、L u k D、または L u k E である、請求項 2 1 に記載の結合分子。

30

【請求項 2 3】

第 1 及び第 2 の結合ドメインが、リンカーペプチドを介して連結される、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 2 4】

第 1 の結合ドメインが、配列番号 6 0、6 2、6 4、または 6 6 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖可変 (V H) 領域を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 2 5】

第 1 の結合ドメインが、配列番号 6 1、6 3、6 5、または 6 7 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖可変 (V L) 領域を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

40

【請求項 2 6】

第 1 の結合ドメインが、
配列番号 6 0、6 2、6 4、または 6 6 のアミノ酸配列を有する V H 領域；及び
配列番号 6 1、6 3、6 5、または 6 7 のアミノ酸配列を有する V L 領域
を含む、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 2 7】

第 1 の結合ドメインが、
(1) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有する V H 領域、及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有する V L 領域；
(2) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を有する V H 領域、及び配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有する V L 領域；

50

(3) 配列番号64のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号65のアミノ酸配列を有するVL領域；

(4) 配列番号66のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号67のアミノ酸配列を有するVL領域；

(5) 配列番号68のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号69のアミノ酸配列を有するVL領域；

(6) 配列番号70のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号71のアミノ酸配列を有するVL領域；

(7) 配列番号72のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号73のアミノ酸配列を有するVL領域；

(8) 配列番号74のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号75のアミノ酸配列を有するVL領域；

(9) 配列番号76のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号77のアミノ酸配列を有するVL領域；または

(10) 配列番号78のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号79のアミノ酸配列を有するVL領域

を含む、請求項1に記載の結合分子。

【請求項28】

第1の結合ドメインが、(i)配列番号60、62、64、または66のアミノ酸配列を有するVH領域、及び(ii)配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有するVL領域を含み、

第2の結合ドメインが、配列番号14～59または配列番号113～666のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の結合分子。

【請求項29】

1つ以上の追加の結合ドメインを更に含み、該追加の結合ドメインが、(i)第1の結合ドメインによって結合されるものとは異なるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質と結合すること、及び/または(ii)第2の結合ドメインによって結合されるものとは異なるブドウ球菌ロイコトキシンと結合することが可能である、請求項1に記載の結合分子。

【請求項30】

請求項1～29のいずれか一項に記載の結合分子をコードする、核酸配列。

【請求項31】

請求項30に記載の核酸配列を含む、ベクター。

【請求項32】

請求項31に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項33】

結合分子の発現を可能にする条件下で、請求項32に記載の宿主細胞を培養する段階と、

結合分子を培養物から回収する段階と

を含む、結合分子の製造のための方法。

【請求項34】

請求項1～29のいずれか一項に記載の結合分子または請求項33に記載の方法に従って作製された結合分子と、

薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

【請求項35】

ブドウ球菌感染の治療または改善において使用するための、請求項1～29のいずれか一項に記載の結合分子または請求項33に記載の方法に従って作製された結合分子。

【請求項36】

ブドウ球菌感染の治療、予防、または改善のための方法であって、

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 33 に記載の方法に従って作製された結合分子を、ブドウ球菌感染の治療、予防、または改善に有効な条件下で、その必要のある対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 37】

黄色ブドウ球菌に感染したかまたは黄色ブドウ球菌に感染する危険がある対象を選択する段階を更に含み、結合分子が、選択された対象に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

黄色ブドウ球菌が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌またはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記投与を繰り返す段階を更に含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

結合分子と共に、抗感染症剤、抗生物質、及び抗菌剤からなる群から選択される 1 つ以上の剤を投与する段階を更に含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

対象におけるブドウ球菌感染を診断するための方法であって、

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 33 に記載の方法に従って作製された結合分子と、対象由来のサンプルとを接触させる段階；

該接触させる段階に基づいて、該サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出する段階；及び
該検出する段階に基づいて、対象におけるブドウ球菌感染を診断する段階

を含む、方法。

【請求項 42】

サンプルにおけるブドウ球菌を検出するための方法であって、

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 33 に記載の方法に従って作製された結合分子と、サンプルとを接触させる段階；及び

該接触させる段階に基づいて、該サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出する段階

を含み；これによって、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在により、サンプルにおけるブドウ球菌の存在が示される、方法。

【請求項 43】

対象におけるブドウ球菌感染を予防するための方法であって、

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 33 に記載の方法に従って作製された結合分子と、対象由来のサンプルとを接触させる段階；

該接触させる段階に基づいて、該サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンを検出する段階；及び

該検出する段階に基づいて、ブドウ球菌感染の予防に好適である剤を対象に投与する段階

を含む、方法。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の結合分子を含む、キット。

【請求項 45】

請求項 30 に記載の核酸分子、請求項 31 に記載のベクター、及び/または請求項 32 に記載の宿主細胞を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、その全体が参照により本明細書に援用される、2013年12月9日出願の米国特許仮出願第 61 / 913 , 714 号の優先権の恩典を主張する。

10

20

30

40

50

【0002】

発明の分野

本発明は概して、少なくとも2つの異なる細菌毒性因子を標的にする多特異的結合分子に関する。特に、この結合分子は、異なるブドウ球菌タンパク質に特異的に結合する少なくとも2つの結合ドメインを含む(すなわち、分子は少なくとも二重特異性である)。第1の結合ドメインは、好ましくは、抗体またはこれらの断片であり、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質、好ましくはグリコシル化セリン-アスパラギン酸ジペプチド繰り返し(SDR)含有タンパク質に結合可能である。第2の結合ドメイン、好ましくは、代替的足場は、ブドウ球菌ロイコトキシン、好ましくはLukAB、LukDまたはLukEに結合可能である。これらの多特異的結合化合物は、ブドウ球菌に対して殺菌活性を有し、従って、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症などの黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)感染の予防、治療、及び/または改善に使用可能である。

10

【背景技術】

【0003】

背景

ブドウ球菌によって生じる細菌感染(すなわち、「ブドウ球菌感染症」)は、一般集団において非常によくみられる。個人の約25%は、一般に、皮膚または鼻中にブドウ球菌を保持している。大抵の場合、これらの細菌による問題が発生しないか、または比較的わずかな皮膚感染が発生する。しかし、ブドウ球菌感染症は、細菌が個々の身体のより深部に浸潤した場合(例えば、血流、関節、骨、肺または心臓に入るなど)、より致命的になり得る。これまでに、致命的なブドウ球菌感染が、入院中のヒト、または慢性疾患を有するヒト、または免疫系が低下しているヒトにおいて発生したこともある。現在では、ますます、さもなければ健常な個人にとっても、致死的なブドウ球菌感染が発生することは一般的になっている。重要なのは、多くのブドウ球菌感染は、よく使用される抗生物質にもはや応答しなくなっているということである。

20

【0004】

黄色ブドウ球菌は、多くの場合、「staph」、「Staph. aureus」、または「S. aureus」とも称される主要なヒト病原体であり、表層病巣から中毒症にわたるいくつかの種類(例えば、心内膜炎、骨髄炎、肺炎、髄膜炎、及び敗血症を引き起こし得る、多数の毒性因子を生成する(Miller and Cho, 「Immunity Against Staphylococcus aureus Cutaneous Infections」 Nat. Rev. Immunol. 11: 505~518 (2011) (非特許文献1)にて検討された)。ほとんどの個人は、出生直後に黄色ブドウ球菌に遭遇し(Holtfreter et al., 「Towards the Immune Proteome of Staphylococcus aureus - The Anti-S. aureus Antibody Response」 Int. J. Med. Microbiol. 300: 176~192 (2010) (非特許文献2))、感染後には、黄色ブドウ球菌に対する抗体、及び抗黄色ブドウ球菌抗体価が増大する能力の両方を有すが、これらの抗体は、多くの場合、再発性の黄色ブドウ球菌感染を防ぐものではない(Foster TJ, 「Immune Evasion by Staphylococci」 Nat. Rev. Microbiol. 3: 948~958 (2005) (非特許文献3))。米国単独で、20,000件を超える年間死亡者数がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)によるものであり、インフルエンザ、ウイルス性肝炎、及びHIV/AIDSによる死亡を超えている(Foster, TJ., 「Immune Evasion by Staphylococci」 Nat. Rev. Microbiol. 3: 948~958 (2005) (非特許文献3); Klevens et al., 「The Impact of Antimicrobial-Resistant, Health Care-Associated Infections on Mortality in

30

40

50

the United States, 「Clin. Infect. Dis. 47: 927~930 (2008) (非特許文献4)」。病原体は、ヒト宿主内で、あるいはヒト宿主上で生存するのをおそらく容易にする、種々の分子を産生する。

【0005】

二成分性ポア形成ロイコトキシンは、黄色ブドウ球菌により生成された分泌毒性因子に含まれる。これらの毒素は、オリゴマーを形成する水溶性モノマーとして分泌可能であり、次いでポアを形質膜に挿入し、その後、細胞浸透圧の平衡及び膜電位を破壊して、標的細胞（とりわけ、多形核白血球（PMN）及び単核性食細胞）を死に至らせる（Bischogberger et al., 「Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response」Cell Host Microbe 12(3): 266~275 (2012) (非特許文献5)、これらは、その全体が参照によって援用される）。ロイコトキシンED（LukED）の場合、宿主食細胞の標的化、結合、及び死滅は、食細胞の表面上に位置する細胞標的CCR5、CXCR1、及びCXCR2を介して発生する（Alonzo III et al., 「Staphylococcus aureus Leukocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo」Mol. Microbiol. 83: 423~435 (2012) (非特許文献6)；Alonzo III et al., 「CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED」Nature 493(7430) 51~55 (2012) (非特許文献7)；及びReyes-Robles et al., 「Staphylococcus aureus Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection」Cell Host & Microbe 14: 453~459 (2013) (非特許文献8)）。実際、LukEDの細胞標的であるCCR5が宿主免疫細胞に存在しない場合、宿主動物は、さもなければ致命的である黄色ブドウ球菌感染に耐性がある（Alonzo III et al., 「CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED」Nature 493(7430): 51~55 (2012) (非特許文献7)）。ロイコトキシンAB（LukAB）も、宿主食細胞を死滅させることができ、微生物が宿主細胞に貪食された後、細胞の外側及び内側の双方からその細胞溶解活性を発揮することができる（Dumont et al., 「Staphylococcus aureus LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1」PNAS 110(26): 10794~10799 (2013) (非特許文献9)）。これらのロイコトキシンが病因となることにより、ロイコトキシンは、決定的な黄色ブドウ球菌毒性因子であると考えられてきた（Alonzo III and Torres, 「Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the Staphylococcus aureus Leukotoxins」PLoS Path 9(2): e1003143 (2013) (非特許文献10)）。

【0006】

黄色ブドウ球菌の病原性遷移の別の決定因子は、その表面タンパク質の性質に依存する（Clarke et al., 「Surface Adhesins of Staphylococcus aureus」Adv. Microb. Physiol. 51: 187~224 (2006) (非特許文献11)、Patti et al., 「MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues」Annu. Rev. Microbiol. 48

10

20

30

40

50

: 585 ~ 617 (1994) (非特許文献12); 及び Patti et al., 「Microbial Adhesins Recognizing Extracellular Matrix Macromolecules」Curr. Opin. Cell Biol. 6: 752 ~ 758 (1994) (非特許文献13)。

【0007】

黄色ブドウ球菌は、宿主組織に接着しコロニーを形成するために、接着性マトリックス分子(MSCRAMM)を認識する微生物表面成分を活用する。MSCRAMMは、コラーゲン、ヘパリン関連多糖、フィブリノーゲン、及び/またはフィブロネクチンを認識することができる。黄色ブドウ球菌は、クランピング因子A(ClfA)、クランピング因子B(ClfB)、SdrC、SdrD、及びSdrEなどを含むMSCRAMMのサブセットを発現し、これはいずれも、セリン-アスパラギン酸ジペプチド繰り返し(SDR)ドメインを含む(Becherelli et al., 「Protective Activity of the CnaBE3 Domain Conserved Among Staphylococcus aureus Sdr Proteins」PLoS One 8(9): e74718 (2013) (非特許文献14))。また、表皮ブドウ球菌(S. epidermidis)もこのファミリーの3つのメンバー、SdrF、SdrG、及びSdrH(McCrea et al., 「The Serine-Aspartate Repeat(Sdr) Protein Family in Staphylococcus Epidermidis」Microbiology 146: 1535 ~ 1546 (2000) (非特許文献15))を発現する。これらのタンパク質は、いずれも、N末端のリガンド結合Aドメイン、続いてSDRドメイン、を含む類似の構造体を共有し、25 ~ 275のセリン-アスパラギン酸ジペプチド繰り返しを有し得る。これらのタンパク質のC末端部分は、LPXTGモチーフを含み、これにより、トランスペプチダーゼsortase Aによる細胞壁への付着が促進される。SDR含有タンパク質中のセリン-アスパラギン酸ジペプチド領域は、2つのグリコシルトランスフェラーゼによりグリカンを連続的に付加することにより修飾される。まず、SdgBは、セリン-アスパラギン酸ジペプチド領域内のセリン残基上でN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を付加し、次いで、糖タンパク質のSdgA修飾が行われ、その結果、二糖類部分となる。このグリコシル化により、SDR含有ブドウ球菌タンパク質をカテプシンG媒介性の分解から保護することができる(Hazenbos et al., 「Novel Staphylococcal Glycosyltransferases SdgA and SdgB Mediate Immunogenicity and Protection of Virulence-Associated Cell Wall Proteins」, PLoS Pathog 9(10): e1003653 (2013) (非特許文献16))。

【0008】

更に、黄色ブドウ球菌表面上に位置するプロテインAも、宿主IgGのFcドメイン並びにIgG及びIgMのVH3クランのFabドメインを捕捉することにより、ブドウ球菌が防御免疫応答から逃れることに寄与する(Sjodahl et al., 「Repetitive Sequences in Protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of Five Regions Within the Protein, Four Being Highly Homologous and Fc-Binding」Eur. J. Biochem. 73: 343 ~ 351 (1997) (非特許文献17); 及びCary et al., 「The Murine Clan V(H) III Related 7183, J606 and S107 and DNA4 Families Commonly Encode for Binding to a Bacterial B cell Superantigen」Mol. Immunol. 36: 769 ~ 776 (1999) (非特許文献18))。

【0009】

10

20

30

40

50

更には、黄色ブドウ球菌は、免疫グロブリン用の第2の結合タンパク質(Sbi)と称される、第2免疫グロブリン結合タンパク質を発現し(Zhang et al., 「A Second IgG-Binding Protein in Staphylococcus aureus」*Microbiology* 144:985~991(1998)(非特許文献19)及びAtkins et al., 「S. aureus IgG-binding Proteins SpA and Sbi: Host Specificity and mechanisms of Immune Complex Formation」*Mol. Immunol.* 45:1600~1611(2008)(非特許文献20)、Sbiは、分泌されているか、あるいは細胞エンベロープと会合しており(Smith et al., 「The Sbi Protein is a Multifunctional Immune Evasion Factor of Staphylococcus aureus」*Infection & Immunity* 79:3801~3809(2011)(非特許文献21)及びSmith et al., 「The Immune Evasion Protein Sbi of Staphylococcus aureus Occurs both Extracellularly and Anchored to the Cell Envelope by Binding to Lipoteichoic Acid」*Mol. Microbiol.* 83:789~804(2012)(非特許文献22)、IgGタンパク質のFc領域への結合に関するプロテインAと、一对の保存的らせん体を共有する(Atkins et al., 「S. aureus IgG-binding Proteins SpA and Sbi: Host Specificity and mechanisms of Immune Complex Formation」*Mol. Immunol.* 45:1600~1611(2008)(非特許文献20))。

【0010】

更に、黄色ブドウ球菌は、免疫回避に関与しているいくつかのプロテアーゼを分泌する。Roosjakkarsらは、スタフィロキナーゼ、プラスミンアクチベータータンパク質の黄色ブドウ球菌分泌により、表面-結合IgG及び補体C3bをいずれも切断するプラスミンが活性化され、最終的に免疫媒介性の、黄色ブドウ球菌の破壊が減少することを示した(Roosjakkars et al., 「Anti-Opsonic Properties of Staphylokinase」*Microbes and Infection* 7:476~484(2005)(非特許文献23))。黄色ブドウ球菌は、また、E233とL234(EU番号付け)との間の下部ヒンジ領域において、直接ヒトIgG1を切断することができるセリンプロテアーゼグルタミルエンドペプチダーゼV8(GluV8)を分泌する(Edelman et al., 「The Covalent Structure of an Entire GammaG Immunoglobulin Molecule」*PNAS* 63:78~85(1969)(非特許文献24)、Brezski et al., 「Human Anti-IgG1 Hinge Autoantibodies Reconstitute the Effector Functions of Proteolytically Inactivated IgGs」*J. Immunol.* 181:3183~3192(2008)(非特許文献25))。また、近年では、ヒトの抗黄色ブドウ球菌IgGは、黄色ブドウ球菌表面に結合すると迅速に切断されることが明らかになった(Fernandez Falcon et al., 「Protease Inhibitors Decrease IgG Shedding From Staphylococcus aureus, Increasing Complement Activation and Phagocytosis Efficiency」*J. Med. Microbiol.* 60:1415~1422(2011)(非特許文献26))。

【0011】

まとめると、これらの研究では、黄色ブドウ球菌は、直接mAbを切断すること、プロテインAの結合によりmAbが分離されることが、または治療的有効性に必要なエフェクタ

一細胞そのものを死滅させることのいずれかにより、標準的なIgG1系モノクローナル抗体(mAb)治療に悪影響を与える可能性があるいくつかのメカニズムを利用することが示されている。このため、当然のことながら、現在、ヒトへの使用が最終的に承認されている黄色ブドウ球菌を標的にするいかなるmAb系治療も存在していない。したがって、(i)プロテインAとSbiとの結合を回避し、(ii)ブドウ球菌が誘導するタンパク質分解を回避し、(iii)ロイコトキシンを中和可能にし、かつ(iv)黄色ブドウ球菌をオプソニン化し、食細胞に運搬することができるような、ブドウ球菌感染を治療可能な方法及び組成物が依然として必要である。本明細書では、こうしたニーズ及び他のニーズに適合する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Miller and Cho, 「Immunity Against Staphylococcus aureus Cutaneous Infections」 Nat. Rev. Immunol. 11: 505~518 (2011)

【非特許文献2】Holtfreter et al., 「Towards the Immune Proteome of Staphylococcus aureus - The Anti-S. aureus Antibody Response」 Int. J. Med. Microbiol. 300: 176~192 (2010)

【非特許文献3】Foster TJ, 「Immune Evasion by Staphylococci」 Nat. Rev. Microbiol. 3: 948~958 (2005)

【非特許文献4】Klevens et al., 「The Impact of Antimicrobial-Resistant, Health Care-Associated Infections on Mortality in the United States」 Clin. Infect. Dis. 47: 927~930 (2008)

【非特許文献5】Bischogberger et al., 「Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response」 Cell Host Microbe 12(3): 266~275 (2012)

【非特許文献6】Alonzo III et al., 「Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo」 Mol. Microbiol. 83: 423~435 (2012)

【非特許文献7】Alonzo III et al. 「CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED」 Nature 493(7430) 51~55 (2012)

【非特許文献8】Reyes-Robles et al., 「Staphylococcus aureus Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection」 Cell Host & Microbe 14: 453~459 (2013)

【非特許文献9】Dumont et al., 「Staphylococcus aureus LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1」 PNAS 110(26): 10794~10799 (2013)

【非特許文献10】Alonzo III and Torres, 「Bacteria

10

20

30

40

50

- l Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the Staphylococcus aureus Leukotoxins」PLOS Path 9(2):e1003143 (2013)
- 【非特許文献11】Clarke et al., 「Surface Adhesins of Staphylococcus aureus」Adv. Microb. Physiol. 51:187~224 (2006)
- 【非特許文献12】Patti et al., 「MSCRAMM - Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues」Annu. Rev. Microbiol. 48:585~617 (1994) 10
- 【非特許文献13】Patti et al., 「Microbial Adhesins Recognizing Extracellular Matrix Macromolecules」Curr. Opin. Cell Biol. 6:752~758 (1994)
- 【非特許文献14】Becherelli et al., Protective Activity of the CnaBE3 Domain Conserved Among Staphylococcus aureus Sdr Proteins」PLOS One 8(9):e74718 (2013)
- 【非特許文献15】McCrea et al., 「The Serine - Aspartate Repeat (Sdr) Protein Family in Staphylococcus Epidermidis」Microbiology 146:1535~1546 (2000) 20
- 【非特許文献16】Hazebos et al., 「Novel Staphylococcal Glycosyltransferases SdgA and SdgB Mediate Immunogenicity and Protection of Virulence - Associated Cell Wall Proteins」PLOS Pathog 9(10):e1003653 (2013)
- 【非特許文献17】Sjodahl et al., 「Repetitive Sequences in Protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of Five Regions Within the Protein, Four Being Highly Homologous and Fc - Binding」Eur. J. Biochem. 73:343~351 (1997) 30
- 【非特許文献18】Cary et al., 「The Murine Clan V (H) III Related 7183, J606 and S107 and DNA4 Families Commonly Encode for Binding to a Bacterial B cell Superantigen」Mol. Immunol. 36:769~776 (1999)
- 【非特許文献19】Zhang et al., 「A Second IgG - Binding Protein in Staphylococcus aureus」Microbiology 144:985~991 (1998) 40
- 【非特許文献20】Atkins et al., 「S. aureus IgG - binding Proteins SpA and Sbi: Host Specificity and mechanisms of Immune Complex Formation」Mol. Immunol. 45:1600~1611 (2008)
- 【非特許文献21】Smith et al., 「The Sbi Protein is a Multifunctional Immune Evasion Factor of Staphylococcus aureus」Infection & Immunity 79:3801~3809 (2011)
- 【非特許文献22】Smith et al., The Immune Evasion 50

Protein Sbi of Staphylococcus aureus Occurs both Extracellularly and Anchored to the Cell Envelope by Binding to Lipoteichoic Acid」Mol. Microbiol. 83: 789~804 (2012)

【非特許文献23】Roosjakkars et al., 「Anti-Opsonic Properties of Staphylokinase」Microbes and Infection 7: 476~484 (2005)

【非特許文献24】Edelman et al., 「The Covalent Structure of an Entire GammaG Immunoglobulin Molecule」PNAS 63: 78~85 (1969)

【非特許文献25】Brezski et al., 「Human Anti-IgG1 Hinge Autoantibodies Reconstitute the Effector Functions of Proteolytically Inactivated IgGs,」J. Immunol. 181: 3183~3192 (2008)

【非特許文献26】Fernandez Falcon et al., 「Protease Inhibitors Decrease IgG Shedding From Staphylococcus aureus, Increasing Complement Activation and Phagocytosis Efficiency」J. Med. Microbiol. 60: 1415~1422 (2011)

【発明の概要】

【0013】

概要

本開示は、少なくとも第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインを含む多特異的結合分子を提供し、そのそれぞれは、異なる細菌由来毒性因子、特に、異なるブドウ球菌毒性因子に特異的に結合する。第1及び第2の結合ドメインは、任意で、リンカーペプチドを介して連結される。

【0014】

第1の結合ドメインは、ブドウ球菌SDR含有タンパク質などの、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合可能である。一態様では、ブドウ球菌SDR含有タンパク質は、ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、SdrE、SdrF、SdrG、及びSdrHである。好ましくは、ブドウ球菌SDR含有タンパク質は、ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、またはSdrEである。

【0015】

一態様では、第1の結合ドメインは、全長抗体または抗体断片である。好ましくは、全長抗体または抗体断片は、野生型IgG1を切断するブドウ球菌プロテアーゼ（例えば、配列番号60内の残基222~237（EU番号付け）の間またはそれらの残基上で野生型IgG1を切断する、黄色ブドウ球菌V8プロテアーゼなどのブドウ球菌プロテアーゼ）によるタンパク質分解に耐性がある。別の態様では、全長抗体または抗体断片は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、または抗体断片である。

【0016】

一態様では、結合分子は、ヒトFcRIへの特異的結合が不可能であり、プロテインAへの特異的結合が不可能であり、かつ、Sbiへの特異的結合が不可能である。一態様では、結合分子は、FcRnへの特異的結合が可能である。

【0017】

一態様では、第1の結合ドメインは、配列番号60、62、64、または66の重鎖可変（VH）領域アミノ酸配列の群から選択されるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖可変（VH）領域を含む。別の態様では、第1の結合ドメインは、配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖可変（VL）領域を含む

。代替的には、第1の結合ドメインは、(a)配列番号60、62、64、または66のアミノ酸配列を有するVH領域、(b)配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有するVL領域を含む。一態様では、第1の結合ドメインは、(1)配列番号60を有するアミノ酸配列のVH領域及び配列番号61を有するアミノ酸配列のVL領域；(2)配列番号62のアミノ酸配列を有するVH領域及び配列番号63のアミノ酸配列を有するVL領域；(3)配列番号64のアミノ酸配列を有するVH領域及び配列番号65のアミノ酸配列を有するVL領域；(4)配列番号66のアミノ酸配列を有するVH領域及び配列番号67のアミノ酸配列を有するVL領域；(5)配列番号68のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号69のアミノ酸配列を有するVL領域；(6)配列番号70のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号71のアミノ酸配列を有するVL領域；(7)配列番号72のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号73のアミノ酸配列を有するVL領域；(8)配列番号74のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号75のアミノ酸配列を有するVL領域；(9)配列番号76のアミノ酸配列を有するVH領域及び配列番号77のアミノ酸配列を有するVL領域；または(10)配列番号78のアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号79のアミノ酸配列を有するVL領域を含む。

10

【0018】

更に別の態様では、結合分子は、(a)(i)配列番号60、62、64、または66のアミノ酸配列を有するVH領域；及び(ii)配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有するVL領域を含む第1の結合ドメイン；並びに、(b)配列番号14~59または配列番号113~666の任意の一つのアミノ酸配列を含む第2の結合ドメイン、を含む。一態様では、第2の結合ドメインは、配列番号14または配列番号22のアミノ酸配列を含む。

20

【0019】

第2の結合ドメインは、ブドウ球菌ロイコトキシンに結合可能である。一態様では、ブドウ球菌ロイコトキシンは、ロイコトキシンA(LukA)、ロイコトキシンB(LukB)、ロイコトキシンAB(LukAB)、ロイコトキシンD(LukD)、ロイコトキシンE(LukE)、ロイコトキシンED(LukED)、パントン-パレンタインロイコシジンS(LukS-PV)、パントン-パレンタインロイコシジンF(LukF-PV)、パントン-パレンタインロイコシジン(LukSF/PVL)、ヘモリシンA(HlgA)、ヘモリシンC(HlgC)、ヘモリシンB(HlgB)、ヘモリシンAB(HlgAB)、及びヘモリシンBC(HlgBC)からなる群から選択される。一態様では、ブドウ球菌ロイコトキシンは、LukAB、LukDまたはLukEである。

30

【0020】

一態様では、第2の結合ドメインは代替的足場である。一態様では、代替的足場は、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む。一態様では、FN3ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を有するLukA、配列番号11のアミノ酸配列を有するLukB、配列番号12のアミノ酸配列を有するLukD、配列番号13のアミノ酸配列を有するLukEに結合する。代替的には、FN3ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を有するLukA及び配列番号11のアミノ酸配列を有するLukBを含むLukAB複合体、及び/または、配列番号13のアミノ酸配列を有するLukE及び配列番号12のアミノ酸配列を有するLukDを含むLukED複合体に結合する。

40

【0021】

一態様では、結合分子の第2の結合ドメインは、次のものと結合するために、アミノ酸配列番号14~59または配列番号113~666のいずれか1つのアミノ酸配列を有するFN3ドメインと競合する；(i)配列番号10のアミノ酸配列を有するLukA、(ii)配列番号11のアミノ酸配列を有するLukB、(iii)配列番号12のアミノ酸配列を有するLukD、及び/または(iv)配列番号13のアミノ酸配列を有するLukE。

50

【0022】

一態様では、第2の結合ドメインは配列番号14～59及び配列番号113～666からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むFN3ドメインである。一態様では、第2の結合ドメインは、配列番号14または配列番号22のアミノ酸配列を含むFN3ドメインである。

【0023】

一態様では、結合分子は、1つ以上の追加の結合ドメインを更に含み、1つ以上の追加の結合ドメインは、以下が可能である；(i)第1の結合ドメインによって結合されるものとは異なるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質と結合すること、及び/または(ii)第2の結合ドメインによって結合されるものとは異なるブドウ球菌ロイコトキシンと結合すること。

10

【0024】

本開示はまた、上記の結合分子をコードする核酸配列、並びに核酸配列(複数可)を含むベクターを提供する。追加的には、本発明は、これらのベクターを含む宿主細胞を意図する。

【0025】

さらに、本開示は上記の結合分子の製造方法を提供し、その方法は以下を含む；(a)本発明の結合分子をコードする核酸配列(複数可)を含むベクターを含む宿主細胞を培養することと、(b)結合分子を培養物から回収すること。

【0026】

更には、本開示は、本明細書に記載されるように、結合分子を含む医薬組成物を提供する。

20

【0027】

本明細書に提供される結合分子は、ブドウ球菌感染の治療、予防、または改善において使用され得る。一態様では、ブドウ球菌感染は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)及びメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)などの黄色ブドウ球菌が原因である。したがって、本開示は、ブドウ球菌感染の治療、予防、改善のための方法を提供し、(a)本明細書に記載されるように、結合分子をその必要のある対象に投与することを含む。ブドウ球菌感染の治療、予防、改善のための方法は、本明細書に記載されるように、結合分子の反復投与、または、抗感染薬、抗生物質、及び/または抗菌剤など1つ以上の他の薬剤と結合分子との併用投与を伴ってもよい。

30

【0028】

また、本明細書に提供される結合分子は、対象におけるブドウ球菌感染を診断するための方法で使用され得る。一態様では、ブドウ球菌感染の診断方法は、本明細書に記載されるように、結合分子と対象由来のサンプルとを接触させることと、接触に基づいて、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出することと、を含む。本方法は、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの検出に基づいて、対象におけるブドウ球菌感染を診断することを更に含む。

【0029】

サンプルにおけるブドウ球菌を検出するために、類似した方法を用いることができる。特に、サンプルにおけるブドウ球菌の検出方法は、本明細書に記載されるように、結合分子とサンプルとが接触することと、接触に基づいて、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出することと、を含み、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在により、サンプルにおけるブドウ球菌の存在が示される。

40

【0030】

さらに、本発明の結合分子は、ブドウ球菌感染の予防に使用することができる。一態様では、ブドウ球菌感染を予防するための方法は、本明細書に記載された結合分子と対象からのサンプルとを接触させることと、接触の結果として、サンプルにおけるグリコシル化

50

ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンを検出することと、を含む。本方法は、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの検出に基づいて、対象にブドウ球菌感染の予防に好適な薬剤を投与することを更に含む。

【0031】

また、本開示によって意図されるものは、本明細書に記載されるとおり、結合分子を含むキット、ならびに、提供される結合分子をコードする核酸分子、提供される結合分子をコードする核酸分子（複数可）を含むベクター、及び/またはこのようなベクターを含む宿主細胞を含むキットである。

【図面の簡単な説明】

10

【0032】

【図1】図1のA及びBは、抗LukD FN3ドメインの特徴を示す。hPMNと混合する前に、LukED (75 nM) を、示される増加濃度でのFN3ドメインと共に、30分間混合した。細胞は1時間、毒素と接触させた。データは、少なくとも3名の独立した血液提供者から求め、エラーバーは、中央値±SEMを示す。図1Aは、Cell Titer測定（細胞代謝）から入手したデータを示す。図1Bは、LDH測定（膜損傷）から入手した。

【図2】図2A及び図2Bは、抗LukAB FN3ドメインの特徴を示す。hPMNと混合する前に、LukAB (18.8 nM) を、示される増加濃度でのFN3ドメインと共に、30分間混合した。細胞は1時間、毒素と接触させた。データは、少なくとも3名の独立した血液提供者から求め、エラーバーは、中央値±SEMを示す。図2Aは、臭化エチジウム透過性アッセイ (EtBr) (ポア形成/膜透過性) から得たデータを示す。図2Bは、LDH測定（膜損傷）から得られたデータを示す。

20

【図3】抗LukE FN3ドメインの特徴を示す。hPMNと混合する前に、LukED (75 nM) を、示される増加濃度でのFN3ドメインと共に、30分間混合した。細胞は1時間、毒素と接触させた。データは、LDH測定（膜損傷）から得た。データは、少なくとも3名の独立した血液提供者から求め、エラーバーは、中央値±SEMを示す。

【図4A】ロイコトキシン中和ドメインに結合した、ブドウ球菌抗原を標的にする抗体可変領域を含む、代表的多特異性結合タンパク質を示す。図4Aは、単一特異性、二価の抗ブドウ球菌mAb可変ドメイン、及び重鎖C末端に結合したLukAB、LukD、またはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

30

【図4B】図4Bは、単一特異性、二価の抗ブドウ球菌mAb可変ドメイン、及び軽鎖C末端に結合したLukAB、LukD、またはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

【図4C】図4Cは、単一特異性、二価の抗ブドウ球菌mAb可変ドメイン、及び軽鎖C末端に結合したLukAB、LukD、またはLukE中和ドメイン、及び重鎖C末端に結合したLukAB、LukD、またはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

【図4D】図4Dは、単一特異性、二価の抗ブドウ球菌mAb可変ドメイン、及びタンデムにC末端に結合したLukAB、LukD、またはLukEを伴う、重鎖C末端に結合したLukAB、LukD、またはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

40

【図4E】図4Eは、二重特異性抗ブドウ球菌mAb可変ドメイン、重鎖C末端に結合したLukAB中和ドメイン、重鎖C末端に結合したLukAB中和ドメイン、重鎖C末端に結合したLukDまたはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

【図4F】図4Fは、単一特異性、二価の抗ブドウ球菌mAb、及び重鎖C末端に結合したLukAB中和ドメイン、及び重鎖C末端に結合したLukDまたはLukE中和ドメイン、を含む代表的多特異性結合タンパク質を示す。

【図5】mAb 5133が、黄色ブドウ球菌のSdgB - グリコシル化SDRタンパク質

50

を認識することを示す。異なる黄色ブドウ球菌株からの溶解産物のウェスタンブロッティングにより評価されたとおり、mAb5133により、黄色ブドウ球菌のsdgB突然変異株で高分子量バンドが検出されることはない。

【図6】Gluv8消化への耐性の増大が行われる下部ヒンジ領域IgG1の突然変異を示す。重鎖のC末端上のFN3ドメイン(それぞれ、構造体4及び構造体6)の有無にかかわらず、突然変異下部ヒンジ領域を有するPRASA構造体は、野生型(wt)ヒトIgG1下部ヒンジ領域(IgG1アイソタイプ対照及び構造体3)を含む構造体と比較して、黄色ブドウ球菌プロテアーゼGluv8によるタンパク質分解に耐性がある。

【図7A】図7のA~Dは、FN3ドメインの付加が、ヒトFcRに結合するPRASA変異体に影響を及ぼすものではないことを示す。競合ALPHASCREEN(登録商標)アッセイを用いて、FcRと結合する抗ブドウ球菌標的構造体の能力を評価した。図7Aのグラフに示すとおり、PRASA構造体(構造体4~7)は、FcRIとの検出可能な結合を示さない。

【図7B】いずれの構造体(IgG1アイソタイプ対照及び構造体3~7)も、図7Bに示すようにヒトFcRIIa(R131)に対し同様の結合を示す。

【図7C】図7Cのグラフは、PRASA構造体(構造体4~7)を示し、IgG1及びA6構造体(それぞれ、IgG1アイソタイプ対照及び構造体3)と比較して、ヒトFcRIIbへの結合が減少している。

【図7D】図7Dのグラフに示すとおり、いずれの構造体(IgG1アイソタイプ対照及び構造体3~7)も、ヒトFcRIIa(V158)に対し同様の結合を示す。

【図8】プロテインAの直接ELISAアッセイを用いて判定するとおり、CH3突然変異H435R/Y436Fは、プロテインA結合を減少させる、及び/または失わせる。プレート型ELISAアッセイにおいてPRASA A6変異体(構造体4~7)は、プロテインAとの検出可能な結合を示さず、ヒトIgG1(IgG1アイソタイプ対照)は、プロテインAに結合する。

【図9】mAb-FN3ドメイン結合コンジュゲートは、フローサイトメトリー系結合アッセイにおいて、黄色ブドウ球菌(Newman株)に結合することが可能である。

【図10】図10のA~Bは、mAb-FN3ドメインコンジュゲートの特徴を示す。LDH測定(膜損傷)は、少なくとも3名の独立した血液提供者から求め、エラーバーは、中央値±SEMを示す。図10Aのグラフは、細胞曝露前に30分間、示された増加濃度でのmAbまたはFN3ドメイン-mAbコンジュゲートと混合したLukED(75nM)に曝露後、LDHがhPMNから放出されたことがわかる。細胞は1時間、毒素と接触させた。図10Bのグラフは、hPMNと混合前に30分間、示された増加濃度でのmAbまたはmAb-FN3ドメインコンジュゲートと混合したLukAB(18.8nM)に曝露後、LDHがhPMNから放出されることがわかる。細胞は1時間、毒素と接触させた。

【図11】ブドウ球菌LukAB媒介性細胞傷害後のファゴサイトーシスは、mAb-FN3ドメインコンジュゲートにより中和することができることを示す。初代ヒトPMNに、以前に異なるmAb5133抗体によりオプソニン化したまたは抗体を使用せずにオプソニン化したブドウ球菌を、感染させた。オプソニン化細菌を使用して、臭化エチジウムの存在下、MOI=10で、hPMNに感染させた。膜損傷を誘導するブドウ球菌の能力は、2時間にわたり臭化エチジウムの浸透を測定することによって評価した。データは、少なくとも3名の独立した血液提供者から求め、エラーバーは、中央値±SEMを示す。

【図12】抗LukAB FN3ドメインを担持するmAb-FN3ドメイン融合タンパク質は、ロイコトキシンLukABを中和し、かつ、ヒト多形核白血球(PMN)が媒介する黄色ブドウ球菌の増殖制限を促進する。これらの実験では、緑色蛍光タンパク質(gfp)を発現するプラスミドを有する黄色ブドウ球菌株Newmanの変異体を用いた。新たに増殖させたGFP標識細菌を 1×10^7 CFU/mLに標準化し、1mLアリコート

10

20

30

40

50

タンパク質 1.5 mg/mL、または PBS (非オプソニン化) に再懸濁した。サンプルを RPMI - HH で最大 1 mL とし、その後、オプソニン化のために 20 分間、37 °C でインキュベートした。その後、約 10 対 1 (細菌対 hPMN) の感染効率 (MOI) で、オプソニン化細菌を、新たに分離した初代 hPMN 2×10^5 と混合した。細菌及び細胞は、7 分間、1500 RPM で遠心分離により同調させ、37 °C、5% CO₂ インキュベーターに入れた。細菌増殖の指標として、感染 5 時間後、GFP 蛍光を測定した。図 12 で示すように、これらの実験により、IgG1 アイソタイプコントロールと比較して、A6 構造体 3 及び PRASA A6 構造体 4 の両者とも、hPMN 媒介性の黄色ブドウ球菌増殖制限を促進することを示す。これは、5133 mAb のオプソニン能力と一致する。重要なことに、LukAB FN3 ドメイン - mAb 5133 コンジュゲート (PRASA A6 HC - AB 構造体 6 及び PRASA A6 LC - D HC - AB 構造体 7) により、PRASA A6 親 mAb (構造体 4) と比較して、PMN 媒介性の増殖制限が改善された。CR5133 / 抗 LukD FN3 ドメイン - mAb (PRASA A6 LC - D 構造体 5) により増殖制限が強化されない点は、エクスピボ感染モデル中、LukED 生成物が最小であるこれまでの所見と一致する。

【図 13】セリン - アスパラギン酸 (SDR) 要素を担持する組換え体タンパク質 (SdrC4) の SdgB 媒介グリコシル化によって、mAb 5133 によって認識される特定のエピトープが作製されることを示す。黄色ブドウ球菌株 JE2 から調製した細胞溶解産物と共に樹脂結合 SdrC4 タンパク質をインキュベートしたもの (図 13、パネル B、レーン 2 及び 6)、及び、さもなければ同質遺伝子型の SdgA 突然変異誘導体と共に樹脂結合 SdrC4 タンパク質をインキュベートしたもの (図 13、パネル B、レーン 3 及び 7) は、mAb 5133 を用いるウェスタンブロットによって特定の約 95 kDa 種が検出される。対照的に、SdgB グリコシルトランスフェラーゼを発現していない、黄色ブドウ球菌株 JE2 の SdgB 突然変異誘導体から調製された溶解産物 (図 13、パネル B、レーン 4 及び 8)、または、対照 PBS サンプル (図 13、パネル B、レーン 1 及び 5) 中で、樹脂結合 SdrC4 タンパク質をインキュベートした後は、mAb 5133 によるこうしたタンパク質バンドは検出されなかった。図 13、パネル A には、図 13 B のプロットに相当するゲルのコロイドブルー染色を示し、本質的に等価量の組換え型 SdrC4 タンパク質を、レーン 1 ~ 4 及びレーン 5 ~ 8 に入れたことを示す。

【図 14 A】図 14 の A ~ C は、一連のウェスタンブロットは、セリン - アスパラギン酸繰り返し (SDR) 要素を担持する組換え型タンパク質の、精製組み換え型 SdgB グリコシルトランスフェラーゼタンパク質でのインビトログリコシル化により、mAb 5133 により認識されたエピトープが発生することを示す。ポリヒスチジン (His)₆ アフィニティタグを担持する組換え型 SDR タンパク質 (SdrC4 及び SdrC5) を、バッファ単独、バッファプラスウリジンニリン酸 N - アセチルグルコサミン (UDP - GlcNac)、またはバッファプラス UDP - GlcNac プラス黄色ブドウ球菌 SdgB グリコシルトランスフェラーゼの組換え型とインキュベートした。反応生成物を SDS - PAGE により分離し、PVDf 膜に移し、得られたウェスタンブロットは、次のいずれかによりプローブする; (i) 一次抗体としての mAb 5133、及び検出用 HRP - コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG (H + L) 二次抗体を用いる検出 (図 14 A、図 14 B、及び図 14 C の、パネル A)、または (ii) ポリヒスチジン、(His)₆ アフィニティタグ特異的 HPR - コンジュゲート mAb (図 14 A、図 14 B、及び図 14 C の、パネル B)。

【図 14 B】図 14 の続きである。

【図 14 C】図 14 の続きである。

【図 15】mAb 5133 は、SdgB - グリコシル化 SdrC4 タンパク質 (図 15、パネル A) には結合するが、精製黄色ブドウ球菌 LTA (図 15、パネル B) には結合しないことを示す。これに反して、よく特徴付けられた抗 LTA mAb である pagiba x imab は、精製黄色ブドウ球菌 LTA (パネル B) には結合するが、SdgB - グリコシル化 SdrC4 タンパク質 (パネル A) には結合しない。ELISA 形式アッセイ

10

20

30

40

50

では、プレートに固定した、組換え型 S d g B - グリコシル化 S d r C 4 タンパク質または精製黄色ブドウ球菌 L T A、及び一次抗体 m A b 5 1 3 3、p a g i b a x i m a b、または一方の抗原の結合に関する陰性対照として呼吸器合胞体ウイルス F (R S V - F) に特異的な m A b を用いた。

【図 1 6】m A b 5 1 3 3、並びにヒンジ領域内における G l u V 8 媒介プロテアーゼ切断を消失させる突然変異 (P R A S A) 及び / またはプロテイン A 結合突然変異 (A 6) を担持する変異体は、ヒト (図 1 6、パネル A) 及びマウス (図 1 6、パネル B) の F c R n 受容体の、両者への結合を保持することを示す。E L I S A 形式競合アッセイでは、銅コーティングプレート上で結合されたヒトまたはマウス F c R n 受容体のポリヒスチジン標識組換え型及び競合 m A b として、呼吸器合胞体ウイルス F (R S V - F) 糖タンパク質を標的としているヒト I g G 1 抗体 (C N T O 3 9 2 9) を使用した。

【図 1 7】ヒンジ領域内における G l u V 8 媒介プロテアーゼ切断を消失させる突然変異 (P R A S A) 及び / またはプロテイン A 結合突然変異 (A 6) を担持している m A b - F N 3 ドメイン融合タンパク質、は、ヒト F c R n 受容体の両者への結合を保持することがわかる。E L I S A 形式競合アッセイでは、銅コーティングプレート上で結合されたヒト F c R n 受容体のポリヒスチジン標識組換え型及び競合 m A b として、呼吸器合胞体ウイルス F (R S V - F) 糖タンパク質を標的としているヒト I g G 1 抗体 (C N T O 3 9 2 9) を使用した。

【図 1 8 A】図 1 8 の A ~ 1 8 B は、プロテイン A 結合を消失させる突然変異 (A 6) を担持する m A b 1 5 3 3 の変異体が、黄色ブドウ球菌 I g G 結合タンパク質、プロテイン A または S b i に関与することはできないことを示す。細胞溶解産物は、S D S - P A G E によって単離され、P V D F 膜に移した、黄色ブドウ球菌株 J E 2 (プロテイン A 及び S b i の両者を発現する野生型)、及び誘導體 N E 2 8 6 (プロテイン A が欠失している、J E 2 の s p a 突然変異体)、N E 4 5 3 (S b i タンパク質の発現が失われている、J E 2 の s b i 突然変異体) 及び W o o d 4 6 (プロテイン A の発現が認められないことが既知の株)。得られたウェスタンブロットを以下 (i) ~ (i i i) のいずれかでプローブし、二次抗体 (ヤギ抗ヒト I g G (H + L)) を介して二次検出した ; (i) m A b 5 1 3 3 (図 1 8、パネル A)、(i i) プロテイン A 結合を消失させる A 6 突然変異を担持する m A b 1 5 3 3 変異体 (図 1 8 A、パネル B)、または (i i i) A 6 突然変異、及び G l u V 8 媒介プロテアーゼ切断を消失させるヒンジ領域突然変異 (P R A S A) (図 1 8 B、パネル C) の両者を担持する m A b 1 5 3 3 変異体。

【図 1 8 B】図 1 8 の続きである。

【図 1 9】代表的 F N 3 ドメインタンパク質 L u k 1 5 1 及び L u k 1 2 9 による - ヘモリン H l g A B の異なる結合及び中和を示す。F N 3 ドメインの精製組換え型 H l g A への結合は、E L I S A によって判定した。ロイコトキシン中和研究に関して、F N 3 ドメイン被験物質を、精製組換え型 H l g A B とインキュベートし、その後、新たに単離した初代ヒト好中球を添加し、1 時間、3 7 でインキュベートした。損傷膜を有する細胞からの、乳酸脱水素酵素 (L D H) の放出を測定することによって、残留好中球の生存度を判定した。図 1 9 に示すとおり、F N 3 ドメイン変異体 L u k 1 5 1 は、H l g A サブユニットとの結合を示すが、H l g A B ロイコトキシンの細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、L u k 1 2 9 は H l g A サブユニットへの結合を示し、L D H 放出の完全な阻害により例示されるように H l g A B ロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【図 2 0】代表的 F N 3 ドメインタンパク質 L u k 3 5 7 及び L u k 1 8 8 による - ヘモリン H l g C B の異なる結合及び中和を示す。F N 3 ドメインの精製組換え型 H l g C への結合は、E L I S A によって判定した。ロイコトキシン中和研究に関して、F N 3 ドメイン被験物質を、精製組換え型 H l g C B とインキュベートし、その後、新たに単離した初代ヒト好中球を添加し、1 時間、3 7 でインキュベートした。損傷膜を有する細胞からの、乳酸脱水素酵素 (L D H) の放出を測定することによって、残留好中球の生存度を判定した。図 2 0 に示すとおり、F N 3 ドメイン変異体 L u k 3 5 7 は、H l g C サブ

10

20

30

40

50

ユニットとの結合を示すが、HlgCBロイコトキシンの細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、Luk188はHlgCサブユニットへの結合を示し、LDH放出の完全な阻害により例示されるようにHlgCBロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【図21】代表的FN3ドメインタンパク質Luk540及びLuk647によるパントン-バレンタインロイコシジン(PVL)の異なる結合及び中和を示す。FN3ドメインの精製組換え型LukS-PVへの結合は、ELISAによって判定した。ロイコシジン中和試験では、FN3ドメイン被験物質を精製組換え型PVLロイコシジンと共にインキュベートし、その後、新たに単離した初代ヒト好中球を添加し、1時間、37℃でインキュベートした。損傷膜を有する細胞からの、乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を測定することによって、残留好中球の生存度を判定した。図21に示すとおり、FN3ドメイン変異体Luk540は、PVLロイコトキシンのLukS-PVサブユニットとの結合を示すが、PVLの細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、Luk647はPVLロイコトキシンのLukS-PVサブユニットへの結合を示し、LDH放出の完全な阻害により例示されるようにPVLロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【発明を実施するための形態】

【0033】

詳細な説明

本発明は、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質と結合可能な第1の結合ドメイン及びブドウ球菌ロイコトキシンと結合可能な第2の結合ドメインを含む結合分子を提供する。したがって、結合分子は、少なくとも2個の異なるブドウ球菌毒性因子に特異的に結合可能である、少なくとも二重特異性である。結合分子はヒトの結合分子であることが好ましい。

【0034】

一実施形態では、結合分子の第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインは、抗体(若しくはそれらの断片)、代替的足場、またはこれらを組み合わせたものを含む(例えば、結合分子は、抗体(若しくはそれらの断片)及び代替的足場を含み、そのそれぞれが異なる細菌由来毒性因子と結合する)。これらの結合分子の製造方法も提供される。

【0035】

好ましくは、これらの多特異的結合分子は、ブドウ球菌に対して殺菌性を示し、従って、MRSA及びMSSA感染症などのブドウ球菌感染の予防、治療、検出、診断、及び/または改善に使用可能である。

【0036】

本発明を詳細に開示する前に、次の定義を提供する。別様に定義されていない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、本開示が属する技術分野における当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0037】

用語「結合分子」は、本開示の意味では、2つ以上の異なる抗原または標的に特異的に結合可能であるか、2つ以上の異なる抗原または標的と相互作用可能であるか、または2つ以上の異なる抗原または標的を認識可能であることを示す。この意味では、本発明の結合分子は、少なくとも「二重特異性」であり、本明細書で使用するとき、この用語は、1つの抗原または標的に結合可能である少なくとも第1の結合ドメインと、別の抗原または標的に結合可能である第2の結合ドメインと、を含む分子を意味する。特に、本発明の結合分子は、ブドウ球菌ロイコトキシン及びグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合可能である、ブドウ球菌ロイコトキシン及びグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質と相互作用可能である、及び/またはブドウ球菌ロイコトキシン及びグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質を認識可能である。本発明の結合分子は、これらに限定されないが3つの結合ドメインを有する三重特異性結合分子、4つの結合ドメインを有する四重特異性分子など、2つ以上の抗原と同時に結合可能な多特異性結合分子を更に含む。多特異性結合分子の各結合ドメインは、例えば、異なるブドウ球菌抗原またはタンパク質など、異なる抗

10

20

30

40

50

原または細菌由来のタンパク質との結合が可能である。

【0038】

本発明によると、代表的結合分子はポリペプチドである。このようなポリペプチドとしては、タンパク質性部分及び非タンパク質性部分（例えば、化学的リンカーまたは化学的架橋剤）を挙げることもできる。

【0039】

用語「結合ドメイン」は、本開示に関連して、結合分子のドメインを特徴付け、例えば、ブドウ球菌ロイコトキシン（例えば、LukAB、LukD、及び/またはLukE）、及び/またはグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質（例えば、SdgB - グリコシル化ブドウ球菌SDR含有タンパク質）など、標的分子上で所定の標的エピトープまたは所定の標的部位に特異的に結合する/相互作用することが可能である。

【0040】

結合ドメインは、例えば、抗体、プロテインA、Immunoglobulin E（免疫タンパク質）、BPTI/APPI（Kunitzドメイン）、Ras結合タンパク質AF-6（PDZドメイン）、カリブドトキシン（サソリ毒素）、CTLA-4、Min-23（ノットイン（knottin））、リポカリン（アンチカリン）、ネオカルジノスタチン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサス繰り返しドメインまたはチオレドキシンなどの結合ドメインドナーから誘導することができる（Skerra, A., 「Alternative Non-Antibody Scaffolds for Molecular Recognition」Curr. Opin. Biotechnol. 18: 295~304 (2005); Hosse et al., 「A New Generation of Protein Display Scaffolds for Molecular Recognition」Protein Sci. 15: 14~27 (2006); Nicaise et al., 「Affinity transfer by CDR grafting on a Nonimmunoglobulin Scaffold」Protein Sci. 13: 1882~1891 (2004); Nygren and Uhlen, 「Scaffolds for Engineering Novel Binding Sites in Proteins」Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 463~469 (1997)、これらはすべて、参照によってその全体が援用される。）本発明の結合ドメインは、標的分子上で所定の標的エピトープまたは所定の標的部位への結合/相互作用に必要である上述の結合ドメインの任意の少なくとも上記部分を含むことが想定される。

【0041】

上述の結合ドメインドナーの結合ドメインは、対応する標的の結合を担うこれらのドナーのその部分によって特徴付けられ、すなわち、その部分が結合ドメインドナーから除去されるとき、該ドナーは、その結合能力を消失することが予測される。「消失する」とは、結合ドナーと比較したときに、結合能力が少なくとも50%低減することを意味する。これらの結合部位をマッピングする方法は、当該技術分野において既知であり、従って、結合ドメインドナーの結合部位を配置/マッピングすること、及び、それによって、対応する結合ドメインドナーから該結合ドメインを「誘導する」ことは当業者の標準的な知識内である。

【0042】

結合分子の第1の及び/または第2の結合ドメインは、免疫グロブリン、例えば抗体、その断片またはその誘導体を含んでもよい。結合分子の第1の結合ドメイン及び/または第2の結合ドメインは、代替的に、代替足場を含んでもよい。一実施形態では、結合分子は、1つ以上の免疫グロブリン結合ドメイン及び1つ以上の代替的足場結合ドメインを含んでもよい。

【0043】

本明細書で使用するとき、用語「代替的足場」とは、典型的には、挿入、欠失、または他の置換が可能な、高コンフォメーション耐性の可変ドメインに関連した高度に構築され

たコアを含む、低減した寸法（例えば、約200アミノ酸未満）の、単鎖のポリペプチドフレームワークを意味する。これらの足場は、従来のIg主鎖をベースとするか、または完全に関連の無いタンパク質から誘導される。これらの可変ドメインを修飾して、任意の標的タンパク質に向かって新規結合面を作製することができる。例えば、こうした足場は、プロテインA、特にそれらのZ-ドメイン（*affibodies*）、ImE7（免疫タンパク質）、BPTI/APPI（Kunitzドメイン）、Ras結合タンパク質AF-6（PDZ-ドメイン）、カリブドトキシ（サソリ毒素）、CTLA-4、Min-23（ノッティン（*knottin*）、リポカリン（アンチカリン）、ネオカルジノスタチン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサス繰り返しドメインまたはチオレドキシから誘導することができる（Skerra, A., 「Alternative Non-Antibody Scaffolds for Molecular Recognition」*Curr. Opin. Biotechnol.* 18:295~304 (2005); Hosse et al., 「A New Generation of Protein Display Scaffolds for Molecular Recognition」*Protein Sci.* 15:14~27 (2006); Nicaise et al., 「Affinity Transfer by CDR Grafting on a Nonimmunoglobulin Scaffold」*Protein Sci.* 13:1882~1891 (2004); Nygren and Uhlen, 「Scaffolds for Engineering Novel Binding Sites in Proteins」*Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:463~469 (1997)、これらはすべて、参照によってその全体が援用される）。代替的足場の構造体は変化するが、好ましくは、治療用として開発されたヒト起源のものである。

【0044】

非Ig系足場は、これらに限定されないが、リポカリン（「アンチカリン」中にて使用される）、アンキリン繰り返し（AR）タンパク質類（「設計ARタンパク質」または「DARPin」中にて使用される）、フィブロネクチンドメイン誘導體（「アドネクチン」中にて使用される）、及びアビディティ多量体（「アビマー」としても知られている）が挙げられる。

【0045】

リポカリン主鎖を含む、遺伝子操作を受けたタンパク質足場であるアンチカリンは、本発明の結合分子にて使用するための好適な非Ig系代替的足場である。例えばステロイド、ピリン、レチノイド、及び脂質などの小型疎水性分子を移送するタンパク質ファミリーであるリポカリンは、アンチカリンの親タンパク質構造体である。リポカリンは、限られた配列相同性を有するが、8つの逆平行 β -バレルをベースとした、共通の三次構造の構造様式を共有している。これらのタンパク質は、強固な β -バレル構造体上に形成された4つの露出ループを含む。代表的なリポカリンは、約160アミノ酸~約180アミノ酸のドメインサイズを有し、4つの露出ループ内に、16のアクセス可能なアミノ酸のランダム化を含むように開発されてきた。

【0046】

アンキリン繰り返し（AR）タンパク質を含むタンパク質は、本発明の結合分子にて使用するための、別の好適な非Ig系代替的足場である。ARタンパク質は、ループによって分離された2つの α -ヘリックスからなる33のアミノ酸タンパク質モチーフを含み、繰り返しは、タンパク質-タンパク質相互作用を仲介する。設計されたアンキリン繰り返しタンパク質（DARPin）は、ヒトARタンパク質をベースにした合理的な設計ストラテジー（例えば、複数の配列アライメント及び統計分析）に由来する、遺伝子操作を受けたタンパク質足場を含む。DARPinは、7つのランダム化位置を有する33のアミノ酸ARモチーフをベースにして構築された組み合わせARライブラリーを使用して作製することができる。DARPinライブラリーは、リボソームディスプレイを使用して、優先的にスクリーニングされ、ライブラリーメンバーは、典型的には、大腸菌中で十分に産

生され、凝集されることはなく、高い熱力学的安定性を示す。好ましくは、DARPinは、N末端及びC末端のキャッピングモチーフを有するモチーフを2つ～4つ含んでおり、疎水性領域が遮蔽され、溶解度の増大が可能である。

【0047】

フィブロネクチンIII (FN3) ドメインから誘導されるタンパク質を使用して、好適な非Ig系代替的足場を作製することもできる。例えば、ヒトフィブロネクチンの10番目のフィブロネクチンIIIドメイン (FN10) は、7つのストランド及び3つの結合ループを有するサンドイッチに対応し、ジスルフィドブリッジを有さずにIgドメインと構造的相同性を示す。一態様では、FN10の結合ループ (それぞれ、長さ約15～21のアミノ酸) は、ランダム化することができ、ドメインは、ファージ及び酵母菌の双方にディスプレイされ、望ましい特性を有する足場用に選択される。アドネクチン (Adnexus、現Bristol-Myers-Squibb) は、この方法でランダム化され、ディスプレイされた10番目のFN3ドメインを用いて作製された代表的な足場である。FN3ドメインを含む代替的な代表的足場は、セントリン (商標) である。セントリン (商標) は、ヒトテネイシンC (TNC) のFN3ドメインのコンセンサス配列を含む。セントリン (商標) 足場は、抗体可変ドメイン (すなわち、CDR1、CDR2、及びCDR3) に対して構造的相同性を有するループ (すなわち、DE、BC、及びFG) を有し、システイン、ジスルフィド、またはグリコシル化残留物非含有の、小さく (約10kDa)、単一であり、かつ高安定性である1つのドメインタンパク質である。これらの分子は、最良の生物物理学的性質 (例えば、発現が100mg/mL超、溶解度が170mg/mL超、溶融温度が82超、予測される低免疫原性、及び1カ月を超える期間の血清中での安定性) を有し、安定性の向上のために遺伝子操作され得る。このため、セントリン (商標) は、本発明の結合分子中で使用するために、FNドメインから誘導される好適な代替的足場である。

10

20

【0048】

一実施形態では、本明細書に記載されるように、結合分子は、セントリン (商標) または配列番号14～59または配列番号113～666のいずれか1つのアミノ酸配列を含むFN3ドメインを含む。本明細書に記載の結合分子の代表的なFN3ドメイン配列としては、Luk17及びLuk12 (それぞれ、配列番号14及び配列番号22) が挙げられる。

30

【0049】

タンパク質主鎖としてアビマー構造体を利用して、好適な非Ig系代替的足場を作製することもできる。アビマー足場は、低密度リポタンパク質 (LRL) 細胞表面レセプター由来のAドメインのオリゴマー化をベースにしている。好ましくは、アビマー足場は、全域に保存されるAドメインの残基を含み、長さ約35アミノ酸であり、3つのジスルフィドブリッジを有する4つのループを含む。

【0050】

加えて、本発明は、また、例えば、ナノボディ、ドメイン抗体 (dAb)、BiTE (bispecific T cell engager)、DART (dual affinity retargeting protein) 及びTandAb (Tetavalent tANDem Antibodies) から選択される、Ig様足場を含む結合分子を意図する (例えば、Wurch et al., 「Novel Protein Scaffolds as Emerging Therapeutic Proteins: From Discovery to Clinical Proof-of-Concept,」 Trends in Biotechnology 30 (11) : 575～582 (2012) を参照されたい、これらはその全体が、参照によって援用される)。

40

【0051】

結合分子は、代替的足場に結合された抗体、それらの断片、または誘導体を含む融合タンパク質でもあってもよい。一実施形態では、結合分子は、抗体、フィブロネクチンドメ

50

イン、または抗体フィブロネクチンドメイン融合タンパク質を含む。例えば、一態様では、本発明の結合分子は、例えば、S d g B - グリコシル化 S D R 含有タンパク質などグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合可能な全長抗体または抗体断片を含み、更に、L u k A B、L u k D、またはL u k Eなどのブドウ球菌ロイコトキシンに結合可能である代替的足場を含む。ブドウ球菌の臨床的分離株は、異なる株種間で異なる配列を有し得ると理解されている。このため、一態様では、代替的足場は、配列番号10との80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するL u k A、配列番号11との80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するL u k B、配列番号12との80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するL u k D、または配列番号13との80%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するL u k Eに結合可能なF N 3ドメインを含む。一態様では、結合分子の代替的足場は、配列番号10のアミノ酸配列を有するL u k A、配列番号11のアミノ酸配列を有するL u k B、配列番号12のアミノ酸配列を有するL u k D、配列番号13のアミノ酸配列を有するL u k Eに結合可能なF N 3ドメインを含む。別の態様では、結合分子の代替的足場は、配列番号10のアミノ酸配列を有するL u k A及び配列番号11のアミノ酸配列を有するL u k Bを含むL u k A B複合体を結合可能なF N 3ドメインを含む。別の態様では、結合分子の代替的足場は、配列番号12のアミノ酸配列を有するL u k D及び配列番号13のアミノ酸配列を有するL u k Eを含むL u k E D複合体を結合可能なF N 3ドメインを含む。

10

20

【0052】

結合分子は、ファージディスプレイまたはライブラリースクリーニング法により作製される（または入手可能である）と予測される。別の方法としては、結合分子は、既存の（モノクローナル）抗体から足場、例えば、本明細書にて開示したような足場へのグラフト化CDR配列により作製される。

【0053】

用語「に結合可能である」、「結合する」、「特異的に認識する」、「に配向する」及び「と反応する」は、本発明により、結合ドメインは、エピトープの1つ以上のアミノ酸と特異的に相互作用可能であることを意味する。

【0054】

用語「特異的に結合できない」は、本発明の結合ドメインが、試験条件下で例えば、非標的タンパク質などの別のタンパク質または抗原に結合しないことを意味する。例えば、本開示では、プロテインAの結合は、実施例に明記された条件下で、プレート系直接ELISAアッセイを用いて測定したが、CH3突然変異H435R/Y436F（例えば、構造体3~7）を含む分子の結合に関して、プロテインAへの相当量の結合が検出されることはなかった。しかし、100~1000倍超のタンパク質を用いて同一の実験を実施した場合は、いくらかのプロテインAの結合（非特異的）が検出されることもある。この一般的な原理は、本明細書に記載された条件下でのヒトFcRI結合（またはそれらを欠く場合）及びSbi結合（またはそれらを欠く場合）にも適用される。

30

【0055】

「タンパク質」（それらの断片、好ましくは生物学的活性断片、及びペプチドなど、通常、30未満のアミノ酸を有する）は、ペプチド共有結合を介して互いに連結される1つ以上のアミノ酸を含む（アミノ酸鎖となる）。本明細書で使用するとき、用語「ポリペプチド」は、共に結合される30超のアミノ酸鎖である。ポリペプチドは、二量体、三量体及び高オリゴマー（すなわち、2つ以上のポリペプチド分子からなる）などの多量体を形成してもよい。こうした二量体、三量体などを形成するポリペプチド分子形状は、同一であっても、または同一でなくてもよい。こうした多量体の対応する高次構造体は、その結果として、ホモ二量体またはヘテロ二量体、ホモ三量体またはヘテロ三量体などと称される。ヘテロ多量体の例は抗体分子であり、その自然発生形態において、2つの同一の軽ポリペプチド鎖及び2つの同一の重ポリペプチド鎖からなる。

40

50

【0056】

また、用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」とは、修飾が、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化反応などの翻訳後修飾により行われる天然修飾ポリペプチド/タンパク質を意味する。本明細書で称されるとき、「ポリペプチド」は、PEG化など化学修飾されていてもよい。こうした修飾は当業者に周知である。

【0057】

アラニン (Ala、またはA) ; アルギニン (Arg、またはR) ; アスパラギン (Asn、またはN) ; アスパラギン酸 (Asp、またはD) ; システイン (Cys、またはC) ; グルタミン (Gln、またはQ) ; グルタミン酸 (Glu、またはE) ; グリシン (Gly、またはG) ; ヒスチジン (His、またはH) ; イソロイシン (Ile、またはI) ; ロイシン (Leu、またはL) ; リジン (Lys、またはK) ; メチオニン (Met、またはM) ; フェニルアラニン (Phe、またはF) ; プロリン (Pro、またはP) ; セリン (Ser、またはS) ; スレオニン (Thr、またはT) ; トリプトファン (Trp、またはW) ; チロシン (Tyr、またはY) ; 及びバリン (Val、またはV) からなる群から選択されるアミノ酸など、用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」は、典型的には、当該技術認識された定義を有するアミノ酸を意味する。概して、アミノ酸は、非極性側鎖 (例えば、Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val) ; 負電荷側鎖 (例えば、Asp、Glu) ; 正電荷側鎖 (Arg、His、Lys) ; または非荷電極性側鎖 (Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp及びTyrなど) を有するものとしてグループ化され得る。

10

20

【0058】

本明細書で使用するとき、用語「毒性因子」とは、細菌が、宿主内の微小環境で定着 (細胞への接着を含む) 、免疫回避 (すなわち、宿主の免疫応答の回避) 、免疫抑制 (すなわち、宿主の免疫応答の阻害) を達成できるようにし、細胞への進入及び細胞からの脱出を可能にし (病原体が細胞内のものである場合) 、及び/または宿主から栄養を得ることができるようにする、細菌によって発現される分子を意味する。毒性因子は、バクテリオファージなどの可動遺伝子上でコードされてもよく、また遺伝子水平伝播を介して容易に拡散され得る。黄色ブドウ球菌毒性因子の非限定的例としては、ヒアルロニダーゼ、プロテアーゼ、コアグララーゼ、リパーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エンテロトキシン、及び他の毒素 (例えば、LukAB、LukD、またはLukEなどの細胞膜に作用する毒素) が挙げられる。本発明の目的のため、SDR含有タンパク質などのブドウ球菌表面タンパク質 (例えば、ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、SdrE、SdrF、SdrG、及びSdrH) もまた、毒性因子と考えられる。

30

40

50

【0059】

用語「抗体」の定義としては、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体などの実施形態が挙げられる。全長抗体に加えて、この定義には、抗体誘導体類及び抗体断片、とりわけFab断片なども含まれる。抗体断片または誘導体は更に、ドメイン抗体またはナノボディなどのF(ab)₂、Fv、scFv断片、または単一ドメイン抗体、単に1つの可変ドメインを含む単一可変ドメイン抗体、または免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、これらはVHH、VHまたはVLであってもよく、他のV領域またはドメインから独立して抗原またはエピトープに特異的に結合する (例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988) ; Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999) ; Kontermann and Dubel, ANTI-BODY ENGINEERING, Springer, 2nd ed. 2010 ; 及びLittle, RECOMBINANT ANTIBODIES FOR IMMUNOTHERAPY, Cambridge University Press 2009を参照されたい (これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)) 。また、該用語は、ダ

イアボディ (diabody) または Dual - Affinity Re - Targeting (DART) を更に含む。更に、(二重特異性) 単鎖ダイアボディ、タンデムダイアボディ (Tandab)、**「ミニボディ (minibody) 」** ((VH - VL - CH3)₂、(scFv - CH3)₂、または (scFv - CH3 - scFv)₂ などの構造体によって例示される)、**「Fc DART」** 及び **「IgG DART」**、トリアボディ (triabody) などのマルチボディ (multibody) であるが予測される。

【0060】

免疫グロブリンの単一可変ドメインは、単離抗体の単一可変ドメインポリペプチドのみでなく、抗体単一可変ドメインポリペプチド配列の1つ以上のモノマーを包含する、より大きいポリペプチドを含む。

【0061】

さまざまな手技が当技術分野において既知であり、こうした抗体及び/または断片の製造に使用され得る。したがって、(抗体) 誘導体は、ペプチド模倣体により生成することができる。更に、単鎖抗体のために記載された技術(とりわけ、米国特許第4,946,778号(Ladner et al., Kontermann and Dubel)、ANTIBODY ENGINEERING Springer, 2nd ed. 2010, and Little, RECOMBINANT ANTIBODIES FOR IMMUNOTHERAPY, Cambridge University Press, 2009を参照されたい(そのそれぞれ全体が、参照によって本明細書に援用される))を適合させて、選択されたポリペプチド(複数可)に特異的な単鎖抗体を作製することができる。また、トランスジェニック動物を使用して、本発明のポリペプチド及び融合タンパク質に特異的なヒト化抗体を発現させることができる。モノクローナル抗体の調製のため、連続細胞株培養により作製された抗体を提供することができる、任意の技術を使用できる。こうした技術の例としては、ハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, 「Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, Nature 256:495~497(1975)、その全体が参照によって援用される)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor et al., 「The Production of Monoclonal Antibodies From Human Lymphocytes」Immunology Today 4:72~79(1983)(これらはその全体が、参照によって援用される))、ヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBVハイブリドーマ法(Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp.77~96(1985)(その全体が、参照によって本明細書に援用される))。BIAcore systemで使用するため、表面プラズモン共鳴を使用して、CD3エプシロンなどの標的ポリペプチドのエピトープに結合しているファージ抗体の効率を増大させることができる(Schier et al., 「Efficient In Vitro Affinity Maturation of Phage Antibodies Using BIAcore Guided Selections」Human Antibodies Hybridomas 7:97~105(1996); Malmborg et al., 「BIAcore as a Tool in Antibody Engineering」J. Immunol. Methods 183:7~13(1995)、(これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)。本発明の文脈において、用語「抗体」は、抗体構造体を含むことが予測され、とりわけウイルスまたはプラスミドベクターを介してトランスフェクトされ得る、及び/または形質導入され得る抗体構造体などの宿主中で発現し得る。

【0062】

更に、本明細書内で用いられるとき、用語「抗体」は、記載された抗体と同一特異性を示す、本明細書に記載の抗体の誘導体または変異体に関する。「抗体変異体」の例として

10

20

30

40

50

は、非ヒト抗体のヒト化変異体、「アフィニティ成熟」抗体（例えば、Hawkins et al., 「Selection of Phage Antibodies by Binding Affinity. Mimicking Affinity Maturation」 J. Mol. Biol. 254: 889~896 (1992) 及び Lowman et al., 「Selecting High-Affinity Binding Proteins by Monovalent Phage Display」 Biochemistry 30: 10832~10837 (1991) を参照されたい（そのそれぞれが、全体に参照によって援用される））及び修飾されたエフェクター官能基（複数可）を有する抗体変異体（例えば、米国特許第5,648,260号（Winter et al., Kontermann and Dubel）、ANTIBODY ENGINEERING, Springer, 2nd ed. 2010, and Little, RECOMBINANT ANTIBODIES FOR IMMUNOTHERAPY, Cambridge University Press, 2009を参照されたい）（これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される））が挙げられる。

10

【0063】

1つの代表的抗体作製方法としては、例えば、ファージまたはリボソームディスプレイライブラリーなどのスクリーニングタンパク質の発現ライブラリーが挙げられる。ファージディスプレイは、例えば、米国特許第5,223,409号（Ladner et al.）Smith, 「Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface」 Science 228: 1315~1317 (1985); Clackson et al., 「Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries」 Nature 352: 624~628 (1991)に記載され、これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される。

20

【0064】

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、特定の抗原を使用して、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、マウス、ハムスターまたはラット）の免疫化を行うことができる。例えば、ヒトIg遺伝子座の大型断片を有するが、マウス抗体の産生が行われないマウス株を、遺伝子操作することが可能である。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する遺伝子由来の抗原特異的モノクローナル抗体を作製し、選択することができる。例えば、XENOMOUSE（商標）、Green et al., 「Antigen-Specific Human Monoclonal Antibodies From Mice Engineered With Human Ig Heavy and Light Chain YACs」 Nature Genetics 7: 13~21 (2004)、米国特許第2003-0070185号（Jakobovits et al.,）WO96/34096（Kucherlapati et al.,）及びWO96/33735（Kucherlapati et al.,）を参照されたい（これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される）。

30

40

【0065】

抗体またはこれらの断片も、ヒトT細胞エピトープの特定の欠失により、またはWO98/52976（Carr et al.）及びWO00/34317（Carr et al.）（参照としてそれらの全体が本明細書に援用される）に開示されている方法による「脱免疫化」により修飾されてもよい。要約すると、MHCクラスIIに結合するペプチドに関して、抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインを分析することができ、これらのペプチドは、潜在的T細胞エピトープを示す。（WO98/52976（Carr et al.）及びWO00/34317（Carr et al.,）に定義されるとおり（そのいずれも、その全体が参照として本明細書に援用される））。潜在的T細胞エピトープの検出には、「ペプチドスレッディング」と称されるコンピュータによるモデル化法を適用す

50

ることができ、加えて、VH及びVL配列に存在するモチーフについては、(WO98/52976 (Carr et al.)及びWO00/34317 (Carr et al.))に記述されているとおり(そのいずれも、その全体が参照として本明細書に援用される)、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを検索することができる。これらのモチーフは、18種類の初代MHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、このため、潜在的T細胞エペトープを構成する。検出される潜在的T細胞エペトープは、可変ドメイン中の少ない数のアミノ酸残基の置換、または好ましくは単一のアミノ酸置換基により消失させることができる。典型的には、保存的置換が行われる。多くの場合、排他的ではないが、ヒト生殖系列抗体配列中の任意の位置に共通のアミノ酸を使用してもよい。ヒト生殖系列配列は、例えば、Tomlinson et al., 「The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals About Fifty Groups of VH Segments With Different Hypervariable Loops,」 J. Mol. Biol. 227:776~798 (1992); Cook et al., 「The Human Immunoglobulin VH Repertoire」 Immunol. Today 16(5):237~242 (1995);及びTomlinson et al., 「The Structural Repertoire of the Human V Kappa Domain」 EMBO J. 14:14:4628~4638 (1995)、(これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)に開示されている。VBASEディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的ディレクトリを提供する(Tomlinson, L A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UKにより編集)。これらの配列は、例えば、フレームワーク領域及びCDRのヒト配列源として使用することが可能である。例えば、米国特許第6,300,064号(Knappik et al.,)に記載されているように、コンセンサスヒトフレームワーク領域も使用することができる(これらはその全体が、参照によって援用される)。VH及びVLを共にペアリングすることにより、単一の抗原結合部位が形成される。VHに最も近位である重鎖定常(CH)ドメインは、CH1として示される。各L鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によりH鎖に連結され、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに依存して、1つ以上のジスルフィド結合により互いに連結する。VH及びVLドメインは、フレームワーク領域(FR1、FR2、FR3、及びFR4)と称される比較的保存された配列である4つの領域で構成され、高頻度可変配列の3つの領域の足場が形成される(相補的決定領域CDR)。CDRは、抗体と抗原との特異的相互作用を担う残基の大部分を含む。CDRは、CDR1、CDR2、及びCDR3として称される。したがって、重鎖上のCDR構成要素は、H1、H2、及びH3と称され、軽鎖上のCDR構成要素は、L1、L2、及びL3と称される。

【0066】

用語「可変」とは、それらの配列において可変性を示し、かつ特定の抗体(すなわち、「可変ドメイン(複数可)または「V領域」)の特異性及び結合アフィニティの決定に関与する、免疫グロブリンドメインの部分と称する。可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均等に分配されるものではなく、それぞれの重鎖及び軽鎖可変領域のサブドメイン内に集中している。

【0067】

これらのサブドメインは、「高頻度可変」領域または「相補的決定領域(CDR)と称される。可変ドメインの、より保存される(すなわち、非高頻度可変)部分は、「フレームワーク領域(FRM)」と称される。自然発生重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、4つのFRM領域を含み、大きくシート構造を取り、3つの高頻度可変領域により連結され、これは結合するループを形成し、場合によっては、シート構造体の一部を形成する。各鎖における高頻度可変領域は、FRMによって近位に接近して一緒に保持され、他の鎖からの高頻度可変領域とともに、抗原結合部位の形成に寄与している。(Wu

10

20

30

40

50

and Kabat, 「An Analysis of the Sequences of the Variable Regions of Bence Jones Proteins and Myeloma Light Chains and their Implications for Antibody Complementarity」J. Exp. Med. 132: 211~250 (1970)を参照されたい(その全体が、参照によって本明細書に援用される)。定常ドメインは、抗原結合には直接関与していないが、例えば、抗体依存性細胞傷害及び相補的活性化など、さまざまなエフェクター機能を示す。

【0068】

本明細書で使用されるとき、用語「高頻度可変領域」(「相補的決定領域」またはCDRとしても公知である)は、(通常は、極端な配列可変性がある3つまたは4つの短い領域であり)抗原結合部位を形成する免疫グロブリンのV領域ドメイン内であり、かつ、抗原特異性の主要決定因子である抗体のアミノ酸残基を指す。CDR残基の同定には少なくとも2つの方法がある:(1)異種間の配列可変性に基づく手法(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991)(これらはその全体が、参照によって援用される);及び(2)抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法(Chothia et al., 「Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins」J. Mol. Biol. 196: 901~917 (1987)(これらはその全体が、参照によって援用される)。しかし、同一の領域ではないが、2つの残基を同定する技術が重なり合った領域を確定する程度にまで組み合わせ、ハイブリッドCDRを確定することができる。しかし、概して、CDR残基は、Kabat(番号付け)システムに従って同定されることが好ましい。

【0069】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合ドメイン」、「抗原結合断片」及び「抗体結合領域」は、抗体と抗原との間の特異的結合を担うアミノ酸を含む抗体分子の一部を称する。本明細書内の上記に記載されるように、特異的に認識され、抗体により結合される抗原の一部は、「エピトープ」と称される。上述のように、抗原結合ドメインは、典型的には、抗体軽鎖可変領域(VL)及び抗体重鎖可変領域(VH)を含み得るが、その両方を含む必要はない。Fd断片は、例えば、2つのVH領域を有し、多くの場合、無傷の抗原結合ドメインのうちいくつかの抗原結合機能を保持する。抗体の抗原結合断片の例としては、次のものがあげられる;(1)VL、VH、軽鎖定常(CL)及びCH1ドメインを有する一価の断片であるFab断片;(2)ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより連結されている2つのFab断片を有する二価の断片である、F(ab)₂断片;(3)2つのVH及びCH1ドメインを有するFd断片;(4)抗体の一群のVLドメイン及びVHドメインを有するFvフラグメント;(5)VHドメインを有するdAb断片(Ward et al., 「Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli」Nature 341: 544~546 (1989)(これらはその全体が、参照によって援用される)、(6)分離された相補的決定領域(CDR);及び(7)例えばscFVライブラリーから誘導される単鎖Fv(scFv)。Fv断片の2つのドメインVL及びVHは、単離された遺伝子によってコードされ、組換え方法を用いて、VL及びVH領域が対になり一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作成し得る合成リンカーによりそれらを結合することができる(単鎖Fv(scFv)として公知である(例えば、Houston et al., 「Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single

10

20

30

40

50

- Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883(1988)を参照されたい)(これにより、その全体が、参照によって援用される)。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を使用して得られ、この断片の機能を無傷抗体と同じ方法で評価する。

【0070】

本明細書で使用するとき、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質の抗体集団から入手した抗体を意味する(すなわち、集団を構成する個々の抗体は、考えられる自然発生突然変異及び/または少量存在し得る翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)を除き、同一である)。モノクローナル抗体は、非常に特異性が高く、単一の抗原部位に対して配向される。更に、典型的には、異なる抗原決定基(エピトープ)に対して指向される、異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体の調製と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上で単一抗原決定基に対して指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物により合成され、他の免疫グロブリンにより汚染されていないという点で有利である。

10

【0071】

修飾語「モノクローナル」とは、抗体の実質的に同質な集団から得られる場合の抗体の特徴を示し、任意の特定の方法で抗体の産生に必要であるものとして解釈されるものではない。例えば、本発明によって使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler et al., (「Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity」Nature 256:495(1975))によって記述されたハイブリドーマ法により作製されてもよく、または組換えDNA法によって作製されてもよい(例えば、米国特許第4,816,567号(Cabilly et al.)を参照されたい(これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される))。

20

【0072】

また、Clackson et al., 「Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries,」Nature 352:624~628(1991)及びMarks et al., 「By-Passing Immunization. Human Antibodies From V-gene Libraries Displayed on Phage,」J. Mol. Biol. 222:581~597(1991)(これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)に記載されている技術を用いて、「モノクローナル抗体」をファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

30

【0073】

本発明のモノクローナル抗体は、特定の種から誘導される抗体または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体において、重鎖及び/または軽鎖の一部が、対応する配列と同一であるか、または相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を特異的に含み、所望の生物活性を示す限り、別の種から誘導される抗体または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する別の抗体、並びにこうした抗体の断片において、鎖(複数可)の残部は、対応する配列と同一であるか、または相同である(米国特許第4,816,567号(Cabilly et al.; Morrison et al.))「Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains With Human Constant Region Domains」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851~6855(1984)、これらはいずれも、参照によってその全体が援用される)。本明細書で目的とするキメラ抗体としては、非ヒト霊長類から誘導される可変ドメイン抗原結合配列(例えば、旧世界ザル、類人猿など)及びヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体が挙げられる。

40

【0074】

50

モノクローナル抗体は、非ヒト動物から得ることができ、次に、修飾し（例えば、ヒト化、脱免疫化、キメラ化など）、当該技術分野において公知の組換えDNA技術を使用して産生することができる。キメラ抗体を作製するための種々の方法が記述されてきた。例えば、Morrisson et al., 「Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains With Human Constant Region Domains,」 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851 (1985); Takeda et al., 「Construction of Chimeric Processed Immunoglobulin Genes Containing Mouse Variable and Human Constant Region Sequences」 Nature 314: 452 (1985); 米国特許第4,816,567号 (Cabilly et al.), 米国特許第4,816,397号 (Boss et al.), EP 0171496 (Tanaguchi et al.); EP 0173494 (Morrisson et al.), GB 2177096 (Neuberger et al.), を参照されたい。これらはいずれも、参照によってその全体が援用される。

【0075】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、ほとんどの場合、ヒト配列のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片（Fv、Fab、Fab₂、F(ab)₂、または抗体の他の抗原結合サブ配列など）であり、非ヒト免疫グロブリンから誘導される最少の配列を含有する。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、受容体の高頻度可変領域（CDRも）由来の残基が、所望の特異性、アフィニティ、及び能力を有する、マウス、ラット、またはウサギなどの、非ヒト種の高頻度可変領域由来の残基（供与体抗体）によって置換されるヒト免疫グロブリン（受容体抗体）である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、本明細書で使用する時、「ヒト化抗体」は、受容体抗体もしくは供与体抗体のいずれにも見出されることのない残基もまた含み得る。これらの修飾を行って更に抗体性能を洗練させ、最適化させる。また、ヒト化抗体は、任意で少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部も含む。更なる詳細については、Jones et al., 「Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody With Those From a Mouse」 Nature 321: 522~525 (1986)、及び Reichmann et al., 「Reshaping Human Antibodies for Therapy」 Nature 332: 323~329 (1988)（それぞれその全体が、参照によって本明細書に援用される）を参照されたい。

【0076】

また、例えば、ヒト化抗体は、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現するが、内因性マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないトランスジェニックマウスを用いて作製されてもよい。Winterは、本明細書に記載のヒト化抗体を調整するために使用され得る例示的CDRグラフト法について記載する（米国特許第5,225,539号 (Winter et al.)）（これらはその全体が、参照によって援用される）。特定のヒト抗体のCDRはすべて、非ヒトCDRの少なくとも一部で置換されてもよく、またはわずかにいくつかのCDRが、非ヒトCDRにより置換されてもよい。ヒト化抗体の所定の抗原への結合に必要とされるCDRの数を置き換えることだけが必要である。

【0077】

ヒト化抗体またはこれらの断片は、例えば、抗原の結合に直接関与していないFv可変ドメインの配列とヒトFv可変ドメイン由来の等価の配列との置換によって生成され得る。ヒト化抗体またはこれらの断片を産生する代表的な方法は、Morrisson, S.L.

, 「Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies」Science 229:1202~1207(1985); 米国特許第5,585,089号(Queen et al.); 米国特許第5,693,761号(Queen et al.); 米国特許第5,693,762号(Queen et al.); 及び米国特許第5,859,205号); 及び米国特許第6,407,213号(Carter et al.,) (これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)により提供される。これらの方法としては、少なくとも1つの重鎖または軽鎖由来の、全部または一部の免疫グロブリンFv可変ドメインをコードする核酸配列を単離すること、操作すること、及び発現することが挙げられる。上記のように、並びに他の供給源から、所定の標的に対する抗体を産生するハイブリドーマからこのような核酸を得ることができる。その後、ヒト化抗体分子をコードする組換えDNAが、適切な発現ベクターにクローニングされ得る。

【0078】

ヒト化抗体は、保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖系列置換、及び/または復帰突然変異の導入により最適化され得る。こうした変化免疫グロブリン分子は、当該技術分野において公知のいくつかの技術により作製することができ(例えば、Teng et al., 「Construction and Testing of Mouse-Human Heteromyelomas for Human Monoclonal Antibody Production」Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7308~7312(1983); Kozbor et al., 「The Production of Monoclonal Antibodies from Human Lymphocytes」Immunology Today 4:72~79(1983); Olsson et al., 「Human-Human Monoclonal Antibody-Producing Hybridomas: Technical Aspects」Meth. Enzymol. 92:3~16(1982) (これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)、EP239400(Winter)の教示により作製され得る(これらはその全体が、参照によって援用される)。

【0079】

用語「ヒト抗体」としては、例えば、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No.91-3242(1991)によって記述されているもの(これらはその全体が、参照によって援用される)など、当該技術分野において公知のヒト生殖系列免疫グロブリン配列に実質的に対応する可変領域及び定常領域を有する抗体が挙げられる。本発明のヒト抗体としては、例えば、CDR、特にCDR3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を挙げることできる(例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的突然変異誘発により、またはインビボでの体細胞突然変異により導入される突然変異)。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基で置換した、少なくとも1つの、2つの、3つの、4つの、5つの、またはそれを超える位置を有してもよい。

【0080】

「二重特異性」または「二機能性」抗体または免疫グロブリンは、2つの異なる重鎖/軽鎖対及び2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体または免疫グロブリンである。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結など、様々な方法によって作製することができる(例えば、Songsivilai & Lachmann「Bispecific Antibody: A Tool for Diagnosis and Treatment of Disease」Clin. Exp. Immunol. 79:315~321(1990)を参照されたい(これらはその全体が、参照によって援用される))。抗体またはそれらの抗原結合断片を得るため

に当業者に既知の多数の方法が利用可能である。例えば、組換えDNA法を用いて作製することができる（米国特許第4,816,567号（Cabilly）（その全体が参照によって本明細書に援用される））。既知の方法に従って、モノクローナル抗体もハイブリドーマの作製によって生成することができる（例えばKohler et al., 「Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity,」 Nature 256:495 (1975)を参照されたい（その全体が、参照によって本明細書に援用される））。その後、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及び表面プラズモン共鳴（BIACORE（商標））分析などの標準方法を用いて、この方法で形成されたハイブリドーマのスクリーニングを行い、特定の抗原と特異的に結合する抗体を産生する1つ以上のハイブリドーマを同定する。免疫原として、例えば、組換え型抗原、自然発生型、任意の変異体またはこれらの断片、並びにそれらの抗原ペプチドなど、特定の抗原の任意の形態を使用してもよい。

10

【0081】

用語「CDR」及びその複数形「CDRs」とは、相補的決定領域（CDR）を意味し、そのうちの3つは、軽鎖可変領域（CDRL1、CDRL2、及びCDRL3）の結合特性を構成し、かつ3つは、重鎖可変領域（CDRH1、CDRH2、及びCDRH3）の結合特性を構成する。CDRは、抗体分子の機能的活性に寄与し、足場またはフレームワーク領域を含むアミノ酸配列により分離される。正確な定義的CDR境界及び長さを、異なる分類及び番号付け方式に供する。このため、CDRは、Kabata, Chothia、コンタクトまたは他の任意の境界定義法によって言及される場合もある。異なる境界にかかわらず、これらの系はそれぞれ、可変配列内にいわゆる「高頻度可変領域」を構成する若干の重なりを有する。このため、これらの系によるCDR定義は、隣接するフレームワーク領域に関して、長さ及び境界区域が異なってもよい。例えば、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., 「Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins」 J. Mol. Biol. 196:901 (1987); 及びMacCallum et al., 「Antibody - Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography,」 J. Mol. Biol. 262:732 (1996)（これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される）を参照されたい。

20

30

【0082】

典型的には、CDRは、カノニカル（限られた）構造体に分類され得る、ループ構造体を形成する。用語「カノニカル構造体」とは、抗原結合（CDR）ループにより採択される主鎖コンフォメーションを意味する。比較構造的な研究から、6つの抗原結合ループのうち5つが、入手可能なコンフォメーションの制限されたレパートリーのみを有することが見出された。各カノニカル構造体は、ポリペプチド主鎖のねじれ角によって特性を決定することができる。このため、抗体間の対応するループは、ループのほとんどの部分における高アミノ酸配列可変性にもかかわらず、非常に類似している三次元構造を有し得る（Chothia et al., 「Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,」 J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., 「Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions」 Nature 342:877 (1989); Martin and Thornton, 「Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling

40

50

and Application to Antibodies」 J. Mol. Biol. 263:800 (1996) (これらはそれぞれ、その全体が、参照によって援用される)。更に、採択されたループ構造体とそれを取り囲むアミノ酸配列との間に任意の関係がある。特定のカノニカルクラスのコンプォメーションは、ループの長さと、ループ内並びに保存フレームワーク内(すなわちループの外側)の主要な位置に常在するアミノ酸残基と、によって決定される。このため、特定のカノニカルクラスへの割当ては、これらの主要アミノ酸残基の存在に基づいて行うことができる。

【0083】

用語「カノニカル構造体」には、例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)によりカタログに登録されているように、抗体の線状配列に関する考察も含み得る。Kabat付番スキーム(系)は、一貫した方法において抗体可変ドメインのアミノ酸残基の番号付けに関して広く採択されている標準であり、かつ、本明細書の他の場所にて言及するように、本発明において好ましいスキームである。

10

【0084】

抗体のカノニカル構造体抗体を決定するために、追加の構造的考察を使用することもできる。例えば、Kabat番号付けによっては完全に反映されない差異を、Chothiaらの番号付け方式により記述することができ、及び/または、例えば、結晶学及び二次元または三次元コンピューターモデリングなどの他の技術により明らかにすることができる。

20

【0085】

したがって、所定の抗体配列をカノニカルクラスとしてもよく、特に(例えば、種々のカノニカル構造体をライブラリー内に含むものとする要求に基づいて)、適したシャーシ(chassis)配列を同定することが可能になる。Chothia et al., 「Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins」 J. Mol. Biol. 196:901 (1987) (これらはその全体が、参照によって援用される)により記述されているような抗体アミノ酸配列のKabat番号付け及び構造的考察並びに抗体構造体のカノニカル態様の構成に関するこれらの示唆は、文献に記載されている。

30

【0086】

CDR3は、典型的には、抗体結合部位内で分子多様性の最も大きい供給源である。H3は、例えば、2つのアミノ酸残基ほどの長さであってもよく、または26アミノ酸を超えてもよい。免疫グロブリンの異なる分類のサブユニット構造及び三次元構造は、当該技術分野において公知である。抗体構造体の総説については、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988 (その全体が、参照によって援用される)を参照されたい。当業者であれば、例えば、CH、VH、CL、VL、CDR、FR構造などそれぞれのサブユニット構造体が抗原に結合する(すなわち、抗原結合断片)、または、例えばFc受容体及び/または補体に結合する及び/またはそれを活性化するCHサブユニットの一部に結合する、例えばVH、VL、またはCDRサブユニットの一部などの活性断片を含むことを理解するであろう。CDRは、典型的には、Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al., (その全体が、参照によって援用される)に記載されているようなKabatCDRを指す。

40

【0087】

50

抗原結合部位の特性を決定する別の標準は、Chothiaにより記述されているように高頻度可変性ループに言及するものである（例えば、Chothia et al., 「Structural Repertoire of the Human VH Segments」 J. Mol. Biol. 227: 799~817 (1987); 及び Tomlinson et al., 「The Structural Repertoire of the Human V Kappa Domain,」 EMBO J. 14: 4628~4638 (1995) (そのすべての内容全体を参照によって援用される)。更に別の標準は、MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアに用いられるAbM定義である。概して、例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual, Duebel and Kontermann (eds.), Springer-Verlag (その全体が、参照によって本明細書に援用される)を参照されたい。) Kabat CDRに関して記述した実施形態は、Chothiaの高頻度可変性ループまたはAbM定義ループに対して記載された類似の關係を用いて代替的に実施することができる。組立後及び体細胞突然変異後の抗体遺伝子の配列は、大きく変化し、変動遺伝子は、 10^{10} の異なる抗体分子をコードすると推定される (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, 1995 (その全体が、参照によって本明細書に援用される))。したがって、免疫系は、免疫グロブリンのレパートリーを提供する。

【0088】

用語「レパートリー」とは、少なくとも1つの免疫グロブリンをコードする少なくとも1つの配列から完全にまたは部分的に誘導される、少なくとも1つのヌクレオチド配列を意味する。配列(複数可)は、重鎖のV、D、及びJセグメント、及び軽鎖のV及びJセグメントを、インピボで再配置することにより生成し得る。あるいは、配列(複数可)は、例えばインピボ刺激などの再配置が生じた場合に対応して、細胞から生成され得る。あるいは、DNAスプライシング、ヌクレオチド合成、突然変異誘発、及び他の方法により配列(複数可)の一部またはすべてを得てもよく、米国特許第5,565,332号(Hoogenboom et al.,) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)を参照されたい。レパートリーとしては、1つの配列のみを挙げることができ、または遺伝学的に多様なコレクションにおける配列など、複数の配列を挙げることもできる。

【0089】

用語「フレームワーク領域」とは、当分野で従来認識されている、更に多岐にわたる(すなわち、高頻度可変性)CDR間に存在する抗体可変領域の部分を指す。このようなフレームワーク領域は、典型的には、フレームワーク1~4(FR1、FR2、FR3、及びFR4)と称され、三次元空間内に6つのCDR(3つは重鎖からであり、3つは軽鎖からである)を提示するための足場を提供し、抗原結合面を形成する。

【0090】

本明細書で使用するとき、用語「フィブロネクチンIII型(FN3)ドメイン」(FN3ドメイン)とは、フィブロネクチン、テネイシン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体及び原核細胞の酵素などのタンパク質内において高頻度で発生するドメインを指す(Bork and Doolittle 「Proposed Acquisition of an Animal Protein Domain by Bacteria」 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 8990~8994 (1992); Meinke et al., 「Cellulose-Binding Polypeptides From Cellulomonas fimi: Endoglucanase D (CenD), a Family A beta-1,4-Glucanase」 J. Bacteriol. 175: 1910~1918 (1993); Watanabe et al., 「Gene Cloning of

Chitinase A1 From *Bacillus circulans* WL-12 Revealed its Evolutionary Relationship to *Serratia chitinase* and to the Type III Homology Units of Fibronectin」J. Biol. Chem. 265:15659~15665 (1990) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)。例えば、米国特許公開第2010/0216708号 (Jacobs et al.,) (その全体が、参照によって本明細書に援用される) に記載されているとおり、代表的FN3ドメインは、ヒトテネインC中に存在する15の異なるFN3ドメイン、ヒトフィブロネクチン(FN)中に存在する15の異なるFN3ドメイン、及び非天然合成FN3ドメインである。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号及びタンパク質名によって、例えば、テネインの第3FN3ドメイン(TN3)、またはフィブロネクチンの第10FN3ドメイン(FN10)と称される。

10

【0091】

本明細書で用いられる用語「置換する」若しくは「置換される」、または「変異する」若しくは「変異させられる」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列における1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを、変更、欠失、挿入し、その配列の変異体を生成することを指す。

【0092】

本明細書で用いられる用語「ランダム化する」若しくは「ランダム化される」、または「多様化される」若しくは「多様化する」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列において少なくとも1つの、置換、挿入、または欠失を行うことを指す。

20

【0093】

本明細書で用いられる用語「Tencon」は、配列番号1に示され、米国特許公開第2010/0216708号 (Jacobs et al.,) (その全体が、参照によって本明細書に援用される。) に記述されている配列を有する合成フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを指す。

【0094】

用語「ライブラリー」は、変異体のコレクションを指す。ライブラリーは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド変異体で構成されてもよい。

【0095】

用語「ベクター」は、生物学的系内で複製することができる、またはこうした系の間で移動可能である、ポリヌクレオチドを意味する。ベクターポリヌクレオチドは、典型的には、生物学的系におけるこれらのポリヌクレオチドの複製または維持のために機能する複製開始点、ポリアデニル化シグナルまたは選択マーカなどの要素を含有する。このような生物学的系の例としては、細胞、ウイルス、動物、植物、及びベクターを複製することができる生物学的成分を利用して再構成された生物系を挙げることができる。ベクターを構成するポリヌクレオチドは、DNA若しくはRNA分子またはこれらのハイブリッド分子であってもよい。

30

【0096】

発現ベクターは、生物学的系、または再構成された生物学的系において、そのベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドの翻訳を指示するために使用することができるベクターを意味する。したがって、本明細書で使用するとき、「ベクター」は、原核生物、酵母菌、真菌、植物、昆虫類、または哺乳類細胞などの任意の細胞において、本発明の核酸配列を、インビトロまたはインビトロで、構成的または誘導性に発現させるための組換え型発現系を広く指す。用語としては、線状または環状の発現系が挙げられる。この用語としては、エピソームのままであるか、または宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現系が挙げられる。発現系は、すなわち、細胞内の一過性の発現のみを行うなど、自己複製能力を有しても有していなくてもよい。この用語としては、組換え型核酸の転写に必要とされる最小の要素のみを含む組換え型発現カセットが挙げられる。

40

50

【0097】

本明細書は、概して、少なくとも2つの異なる細菌毒性因子に結合する多特異的結合分子、これらの結合分子の作製方法、及び細菌感染の検出または診断、予防、及び/または治療を行うためのこれらの結合分子の使用方法に関する。特に、結合分子は、例えば抗体または抗体断片及び代替的足場など、少なくとも2つの結合ドメインを含む。第1の結合ドメインは、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質、好ましくはSdgBグリコシル化SDR含有タンパク質に結合可能である。第2の結合ドメインは、ブドウ球菌ロイコトキシン、好ましくはLukAB、LukD、またはLukEに結合可能である。これらの多特異的結合分子は、結合するタンパク質抗原に対して中和活性を有し、すなわち、結合分子がその標的ブドウ球菌タンパク質に結合すると、これらのタンパク質の活性は実質的にまたは完全に取り除かれる。従って、多特異的結合分子も、ブドウ球菌自体に対して中和活性または殺菌活性を有し、メチシリン耐性及びメチシリン感受性黄色ブドウ球菌などのブドウ球菌感染の治療、及び/または改善に使用可能である。

10

【0098】

本明細書の結合分子は、とりわけ、ブドウ球菌由来の1つ以上のタンパク質及び/または(ポリ)ペプチド、あるいは、1つ以上の、組換えにより作製したブドウ球菌タンパク質及び/またはポリペプチド調製物などの、1つ以上のブドウ球菌(及び他のグラム陽性菌及び/またはグラム陰性菌)の断片への特異的結合もまた可能である。ブドウ球菌感染の治療方法及び/また予防方法については、結合分子は、ブドウ球菌のアクセス可能な表面タンパク質に特異的に結合できることが好ましい。ブドウ球菌の表面タンパク質としては、これらに限定されないが、クランピング因子(Clf)A及びClfB、SDRタンパク質(例えば、SdrC、SdrD、SdrE、SrdF、SdrG、及びSdrH)、プロテインA、Sbi、フィブロネクチン結合タンパク質(FnbA)、及び血小板のセリンリッチ付着因子(SraP)が挙げられる。黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌では、すべてのSDR含有タンパク質のSDRドメインは、少なくとも2つのグリコシルトランスフェラーゼ、SdgA及びSdgBにより高グリコシル化され、宿主プロテアーゼによるこれらのタンパク質の分解を防止し、これによって、細菌由来の宿主組織相互作用が保存される。これらの糖修飾も主要な抗体エピトープである。結合分子は、グリコシル化表面ブドウ球菌タンパク質、特に、SdgBグリコシル化SDRタンパク質に結合することが好ましい(Hazenbos et al., 「Novel Staphylococcal Glycosyltransferases SdgA and SdgB Mediate Immunogenicity and Protection of Virulence-Associated Cell Wall Proteins」 PLoS Pathog. 9(10): e1003653 (2013)、(これらはその全体が、参照によって援用される))。

20

30

【0099】

本明細書に記載されるように、本明細書の結合分子は、例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体または抗原結合断片などの無傷の免疫グロブリン分子を含むことができ、これらに限定されないが、Fab、F(ab)、F(ab)₂、Fv、dAb、Fd、補体決定領域(CDR)断片、単鎖抗体(scFv)、二価の単鎖抗体、単鎖ファージ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ(tetrabody)、及びブドウ球菌またはその断片に結合する特異的抗原を付与する十分な少なくとも1つの免疫グロブリン断片を含む(ポリ)ペプチドが挙げられる。ある実施形態では、本明細書の結合分子は、ヒトモノクローナル抗体である。

40

【0100】

一態様では、第1の結合ドメインは、全長抗体または抗体断片である。全長抗体または抗体断片は、野生型IgG1を切断する、ブドウ球菌プロテアーゼ(配列番号60内の残基222~237の間または残基222~237(EU番号付け)で野生型IgG1を切断するブドウ球菌プロテアーゼである、黄色ブドウ球菌V8プロテアーゼなど)によるタンパク質分解に耐性があることが好ましい。別の態様では、全長抗体または抗体断片は、

50

ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、または抗体断片である。

【0101】

一態様では、第1の結合ドメインは、配列番号60、62、64、または66のVH領域アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖可変(VH)領域を含む。別の態様では、第1の結合ドメインは、配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖可変(VL)領域を含む。代替的には、第1の結合ドメインは、(a)配列番号60、62、64、または66のアミノ酸配列を有するVH領域、(b)配列番号61、63、65、または67のアミノ酸配列を有するVL領域を含む。一実施形態では、第1の結合ドメインは、(1)アミノ酸配列番号60を有するVH領域及びアミノ酸配列番号61を有するVL領域；(2)アミノ酸配列番号62を有するVH領域及びアミノ酸配列番号63を有するVL領域；(3)アミノ酸配列番号64を有するVH領域及びアミノ酸配列番号65を有するVL領域；(4)アミノ酸配列番号66を有するVH領域及びアミノ酸配列番号67を有するVL領域；(5)アミノ酸配列番号68を有するVH領域、及びアミノ酸配列番号69を有するVL領域；(6)アミノ酸配列番号70を有するVH領域、及びアミノ酸配列番号71を有するVL領域；(7)アミノ酸配列番号72を有するVH領域、及びアミノ酸配列番号73を有するVL領域；(8)アミノ酸配列番号74を有するVH領域、及びアミノ酸配列番号75を有するVL領域；(9)アミノ酸配列番号76を有するVH領域及びアミノ酸配列番号77を有するVL領域；または(10)アミノ酸配列番号78を有するVH領域、及びアミノ酸配列番号79を有するVL領域を含む。

10

20

【0102】

本明細書に記載の結合分子は、例えば、二成分毒素など、他のブドウ球菌の分子に特異的に結合可能な第2の結合ドメインを含む。PVL(ロイコシジンS/F-PVまたはLukSF-PVとして公知である)、 α -ヘモリシン(HlgAB及びHlgCB)に加えて、黄色ブドウ球菌により産生された二成分ロイコトキシンのレパートリーは、ロイコシジンE/D(「LukED」)、ロイコシジンA/B(「LukAB」)及びロイコシジンM/F(「LukMF」)を含むことが公知である。したがって、これらの二成分ロイコシジンのS-クラスサブユニットとしては、HlgA、HlgC、LukE、LukS-PV、LukA、及びLukMが挙げられ、F-クラスサブユニットとしては、HlgB、LukD、LukF-PV、LukB、及びLukF'-PVが挙げられる。黄色ブドウ球菌のS-及びF-サブユニットは、ロイコシジン特異的ではない。すなわち、他の二成分組み合わせが白血球において機能的ポアとなり、ロイコトキシンのレパートリーを大きく増加させるように、これらには互換性がある(Meyer et al., 「Analysis of the Specificity of Pantone-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin F Component Binding」 Infect. Immun. 77(1): 266-273 (2009)) (本開示は、その全体が、参照によって援用される)。

30

【0103】

一実施形態では、本発明の結合分子は、ロイコトキシンA(LukA)、ロイコトキシンB(LukB)、ロイコトキシンAB(LukAB)、ロイコトキシンド(LukD)、ロイコトキシンE(LukE)、ロイコトキシンED(LukED)、パントン-パレンタインロイコシジンS(LukS-PV)、パントン-パレンタインロイコシジンF(LukF-PV)、パントン-パレンタインロイコシジン(LukSF/PVL)、 α -ヘモリシンA(HlgA)、 α -ヘモリシンA(HlgC)、 β -ヘモリシンB(HlgB)、 β -ヘモリシンAB(HlgAB)、及び γ -ヘモリシンBC(HlgBC)からなる群から選択される1つ以上のブドウ球菌ロイコトキシンに結合される。一実施形態では、結合分子は、LukAB、LukD、またはLukEから選択される1つ以上のブドウ球菌ロイコトキシンに結合する。別の実施形態では、本明細書の結合分子は、上記タンパク質の断片に特異的に結合することができ、その断片は、少なくとも、本明細書の結合分子によって認識される抗原決定基を含む。本明細書で使用する時、「抗原決定基」は、検出可能な

40

50

抗原結合分子複合体を形成するために十分に高いアフィニティを有する、本明細書の結合分子への結合可能な部分である。別の実施形態では、本明細書の結合分子は、中和エピトープを含有する上記ブドウ球菌ロイコトキシンタンパク質の断片に特異的に結合することができる。ロイコトキシンタンパク質の中和エピトープへの結合により、タンパク質の活性が無くなる、または実質的に無くなる。

【0104】

一態様では、ブドウ球菌ロイコトキシンに結合可能な第2の結合ドメインは代替的足場である。第2の結合ドメインは、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含み、例えば、単離組換え型及び/またはフィブロネクチンIII型(FN3)繰り返しタンパク質のコンセンサス配列をベースにした合成タンパク質足場を含むことが好ましい。本発明のFN3足場により、局所投与、経口投与、または血液脳関門を越えて投与する能力、哺乳細胞発現に対する供給源の機能として、タンパク質の増加した発現を可能にする大腸菌内での発現能力、複数の標的または同一の標的の複数のエピトープに結合する二重特異性分子へと遺伝子操作する能力、薬物、ポリマー、及びプローブに結合する能力、高濃度に配合する能力、こうした分子を効果的に病変組織に透過させる能力など、従来の治療法に優る利点をもたらされる。

10

【0105】

更に、FN3足場は、抗体の可変領域を模倣する折りたたみ(fold)に関して、抗体の多くの性質を有する。例えば、FN3ドメインの配向により、FN3ループを抗体補体決定領域(CDR)と同様に露出させることができる。ループ領域は、細胞標的に結合することができ、かつ、アフィニティ成熟などによって修飾して、特定の結合または関連した性質を改善することができる。

20

【0106】

一実施形態では、本明細書に記載の結合分子は1つ以上のFN3ドメインを含む。一態様では、結合分子のFN3ドメインは、Tencon(配列番号1)の非自然発生的FNドメインから誘導される。Tenconは、他のFN3ドメインと同様に、A、B、C、D、E、F、及びGと称される7つのストランドを有し、AB、BC、CD、DE、EF、及びFGループと称される6つのループによって連結されるサンドウィッチ構造体を有する(Bork and Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8990~8992(1992)及び米国特許第No. 6,673,901号(Koide et al.,)(その全体が、本明細書により参照によって援用される)。6つのループのうち3つ(すなわち、BC、DE及びFGループ)は、FN3ドメインの頂部にあり、3つのループ(すなわち、AB、CD及びEFループ)は、FN3ドメインの底部にある。これらのループは、配列番号1のアミノ酸残基13~16、22~28、38~43、51~54、60~64、及び75~81の範囲であるか、おおよその範囲である。ループ領域は、結合特異性及びアフィニティに関して、本明細書に記載の結合分子内で、配列番号1の残基22~28、51~54、及び75~81で、またはおおよその範囲で変更することが好ましい。一態様では、結合分子としては、少なくとも1つの、少なくとも2つの、または3つすべてのループを配列番号1の残基13~16、22~28、38~43、51~54、60~64、及び/または75~81において、またはおおよその範囲で含む、代替的足場を含む1つ以上の結合ドメインが挙げられる。一態様では、本明細書に記載の結合分子としては、少なくとも1つの、少なくとも2つの、または3つすべてのループ領域を、配列番号1の残基22~28、51~54、及び75~81で、またはおおよその範囲で含む、代替的足場を含む1つ以上の結合ドメインが挙げられる。主鎖部分としてそれらの配列を保持しライブラリーを生成する他のループ領域及び/または他のストランドにより、これらのループ領域の1つ以上がランダム化され、特定のタンパク質標的に対する強力なバインダーを、高アフィニティを有するライブラリーから選択することができる。1つ以上のループ領域は、タンパク質との抗体CDRの相互作用と同様に、標的タンパク質と相互作用し得る。

30

40

【0107】

50

上述のように、FN3ドメインは、分子の反対面に2つのCDR様ループセットを含む（すなわち、BC、DE、及びFGループ、並びにAB、CD、及びEFループ）。2つのループセットは、FN3構造体の中央を形成するストランドによって分離されている。ループと同様に、これらのストランドを変更して、結合特異性及びアフィニティを向上させてもよい。ストランド内のいくつかのまたはすべての表面露出残基が、足場固有の安定性に影響を及ぼすことなく（または最小限の影響を及ぼす）、ランダム化されることが好ましい。1つ以上のストランドは、標的タンパク質と相互作用し得る。足場内のストランドにより、これらの標的タンパク質上で、標的タンパク質または特定のエピトープに影響を及ぼす、（隣接するループを含むタンパク質足場内に見出される湾曲した結合表面と比較して）平坦な結合表面が提供され、足場により効果的に結合され得る。一態様では、本発明の結合分子としては、例えば、ブドウ球菌ロイコトキシンなど細菌由来毒性因子に結合する、1つ以上のストランドを含む代替的足場を含む結合ドメインが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0108】

一態様では、結合分子の第2の結合ドメインは、アミノ酸配列番号10を有するLukA、アミノ酸配列番号11を有するLukB、アミノ酸配列番号12を有するLukD、アミノ酸配列番号13を有するLukEに結合する、FN3ドメインを含む。代替的には、結合分子の第2の結合ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列を有するLukA及び番号11のアミノ酸配列を有するLukBを含むLukAB複合体、及び/または、配列番号13のアミノ酸配列を有するLukE及び配列番号12のアミノ酸配列を有するLukDを含むLukED複合体に結合するFN3ドメインを含む。

【0109】

一態様では、結合分子の第2の結合ドメインは、(i)配列番号10のアミノ酸配列を有するLukA、(ii)配列番号11のアミノ酸配列を有するLukB、(iii)配列番号12のアミノ酸配列を有するLukD、及び/または(iv)配列番号13のアミノ酸配列を有するLukEに結合するために、配列番号14~59または配列番号113~666のアミノ酸配列のいずれか1つを有するFN3ドメインと競合する。

【0110】

更に別の態様では、結合分子は、(a)次を含む第1の結合ドメイン；(i)アミノ酸配列番号60、62、64、または66を有するVH領域；及び(ii)アミノ酸配列番号61、63、65、または67を有するVL領域；並びに(b)アミノ酸配列番号14~59または配列番号113~666の任意の一つのアミノ酸配列を含む第2の結合ドメインを含む。一実施形態では、第2の結合ドメインは、配列番号14または配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【0111】

別の態様では、結合分子は、1つ以上の追加の結合ドメイン（例えば、第3、第4、第5などの結合ドメイン）を含む。追加の結合ドメイン（複数可）は、結合分子の第1の結合ドメインが結合するものとは異なるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合することができ、かつ結合分子の第2の結合ドメインが結合するものとは異なるブドウ球菌ロイコトキシンに結合可能である。換言すれば、結合分子の各結合ドメインは、固有の抗原に結合する。結合分子の追加の結合ドメインは、免疫グロブリンドメイン、代替的足場ドメイン、またはこれらの組み合わせであってもよい。

【0112】

一態様では、結合分子は、他のブドウ球菌タンパク質抗原または宿主（ヒト）タンパク質抗原への非特異的結合を示すことはない。例えば、一態様では、結合分子は、ブドウ球菌プロテインAまたは免疫グロブリン用の第2の結合タンパク質（Sbi）への特異的結合が可能である。別の態様では、結合分子は、FcRI、特にヒトFcRIへの特異的結合が可能ではない。

【0113】

別の態様では、結合分子は、FcRnへの特異的結合能力を保持する。

【0114】

本開示の結合分子は、例えば、共有結合相互作用を介して他のサブユニットに取り込まれてもよい。抗体定常領域のすべてまたは一部を、結合分子と結合させて、抗体様の性質（例えば、補体活性（CDC）、半減期など）を付与する。例えば、C1q結合及び/またはFcR結合を修飾することにより、かつ、それによって補体依存性細胞傷害（CDC）及び/または抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を変更することにより、例えば、エフェクター機能を提供し、及び/または制御することができる。

【0115】

「エフェクター機能」は、生物活性（例えば、対象において）の活性化または減少に関与している。エフェクター機能の例としては、これらに限定されないが、C1q結合；CDC；Fc受容体結合；ADCC；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどが挙げられる。このようなエフェクター機能のために、Fc領域を結合ドメイン（例えば、タンパク質足場ループ）、と混合させる必要がある可能性があり、かつ、さまざまなアッセイ（例えば、Fc結合アッセイ、ADCCアッセイ、CDCアッセイなど）を用いて評価し得る。追加的に、毒素コンジュゲート、アルブミンまたはアルブミンバインダー、ポリエチレングリコール（PEG）分子は、所望の特性のために、結合分子に結合させてもよい。標準技術により、例えば、公的に利用可能な遺伝子配列を用いて、構築された組換え型融合遺伝子から結合分子を発現することによって、これらの融合をいずれも発生させ得る。

10

【0116】

本開示の結合分子は、モノマー形状で単一特異性として、または、多量体形状で二重特異性または多特異性として使用することが可能である（同一タンパク質標的上の、異なるタンパク質標的またはエピトープに対して）。この付着は、共有結合または非共有結合であり得る。例えば、二量体の二重特異性結合分子は、第1の標的タンパク質またはエピトープに対して特異性を有する1つのサブユニット、及び第2の標的タンパク質またはエピトープに対して特異性を有する第2のサブユニットを有する。結合分子サブユニットは、価数及びこうした抗原結合のアビディティが増大し得る種々のコンフォメーションで結合してもよい。

20

【0117】

また、本開示の結合分子は、リンカーペプチドを含んでもよく、該リンカーペプチドが、タンパク質またはポリペプチドドメインを生物学的活性ペプチドに結合させて融合タンパク質を生成することは、当技術分野において公知である。リンカーペプチドは、2つの関連がないタンパク質から、両方のタンパク質の活性を保持する機能的融合タンパク質を作製するために使用することができる。例えば、ロイコトキシンに特異的に結合するFN3ドメインは、ブドウ球菌表面タンパク質に結合して、ブドウ球菌表面タンパク質に結合しかつ有害なロイコトキシン作用を中和する融合タンパク質を形成することができる抗体、抗体断片、scFvまたはペプチドリガンドに、リンカーを用いて融合することができる。融合タンパク質は、先行技術により認識されているクローニング技術により生成することができる。例えば、リンカーペプチドをコードするオリゴヌクレオチドは、目的とするドメインをコードする遺伝子間でライゲートされて、単鎖タンパク質全体をコードする1つの融合遺伝子を形成する。リンカーオリゴヌクレオチドの5'末端部は、第1の遺伝子の3'末端部に融合され、リンカーの3'末端部は、第2の遺伝子の5'末端部に融合される。融合遺伝子全体を、適切な発現ベクターを用いて、宿主細胞にトランスフェクションすることができる。

30

40

【0118】

本発明のリンカーペプチドは、長さ及びアミノ酸組成物を変えることができる。例えば、本発明のリンカーペプチドは、長さ約2～約50アミノ酸、長さ約20～約45アミノ酸、長さ約25～約40アミノ酸、長さ約30～約35アミノ酸、長さ約24～約27アミノ酸、または長さ約20アミノ酸であってもよい。

【0119】

50

ほとんどのリンカーペプチドは、1つ以上のアミノ酸グリシン及びセリンの反復モジュールで構成される。例示的リンカーペプチドとしては、例えば、 $(Gly - Gly)_n$ 、 $(Gly - Ser)_n$ 、及び $(Gly_3 - Ser)_n$ （式中、 n は1~25の整数である）が挙げられる。リンカーの長さは、ポリペプチドの機能に影響を及ぼさない限りは、適切に調整され得る。標準的な15アミノ酸リンカーペプチド $(Gly_4 - Ser)_3$ は、（例えば、抗体単鎖Fv(scFv)ドメインの文脈内で）良く特徴付けられており、構造化されない可撓性コンフォメーションをとることが明らかにされている。加えて、このリンカーペプチドはそれが連結しているドメインのアセンブリ及び結合活性を妨げない（Freund et al., 「Characterization of the Linker Peptide of the Single-Chain Fv Fragment of an Antibody by NMR Spectroscopy」FEBS 320:97(1993)（本開示では、その全体が、参照によって本明細書に援用される）。したがって、二機能性融合タンパク質を形成するにあたって特に効果的なリンカーは、Gly-Serリンカーを含む。一態様では、リンカーペプチドは、次のアミノ酸配列を含む：（配列番号2）：

-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-S-

【0120】

しかし、本発明のリンカーペプチドは、このリンカーペプチドの変異体形態もまた企図され、1つ以上のアミノ酸置換、追加、または欠失が、リンカーペプチドに導入されることによって作製されるように、1つ以上のヌクレオチドの置換、追加、または欠失を、リンカーペプチドをコードするヌクレオチド配列に導入することによって作製され得る。例えば、突然変異は、例えば、部位特異的突然変異誘発、及びPCR媒介突然変異誘発などの標準技術により導入されてもよい。リンカーペプチドの能力が変化しないように、1つ以上の非必須アミノ酸残基で、保存的アミノ酸置換が行われることが好ましい。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、無極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）など、類似側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーが当該技術において定義されている。このため、gly-Serモチーフ（例えば、 $(Gly - Gly)_n$ 、 $(Gly - Ser)_n$ 、及び $(Gly_3 - Ser)_n$ ）を含むペプチドリンカーの文脈での保存的アミノ酸置換は、別の非荷電極性側鎖（すなわち、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）でGly及び/またはSerを置換することが挙げられる。

【0121】

本発明の結合分子は、「単離」結合分子であることが好ましい。本明細書にて開示された結合分子を記述するために使用するとき、「単離」は、その生成環境の成分から、同定され、単離され、及び/または回収された結合分子を意味する。単離結合分子は、その作製環境からの他のすべての成分との会合を含まないことが好ましい。例えば、組換え型トランスフェクト細胞に起因する成分など、その作製環境の夾雑成分は、典型的には、ポリペプチドの診断用途または治療用途を妨げる材料であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク様溶質または非タンパク様溶質を挙げることもできる。好ましい実施形態では、結合分子は、（1）スピニング-カップ配列決定機器を使用して、N末端の少なくとも15残基または内部アミノ酸配列を得るために十分な程度まで、または（2）非還元条件または還元条件下で、クマシーブリアントブルー、または好ましくはシルバーステインを用いて、SDS-PAGEにより均質になるまで、精製される。しかし、通常、単離結合分子

は、少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0122】

本明細書に記載の結合分子のアミノ酸配列の修飾が考えられる。例えば、抗体の結合アフィニティ及び/または他の生物学的性質を向上させることが望ましい場合もある。結合分子のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチドの変化を結合分子核酸に導入すること、またはペプチド合成により調製される。このような修飾としては、例えば、結合分子アミノ酸配列内の残基からの欠失及び残基への挿入、残基の置換が挙げられる。プロテインA結合及びFcRI結合の消滅、またはプロテアーゼ耐性など、最終構造体が所望の特徴を有するように、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが行われ、最終作成物に到達する。

10

【0123】

その後、置換に対して機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位で、または置換部位に対して、更なるまたは他の変異体を導入することにより洗練される。したがって、アミノ酸配列の変化形態を導入する部位はあらかじめ決定されるが、突然変異のその性質は、それ自体、あらかじめ決定している必要はない。例えば、所定部位での突然変異の成果を分析するにあたって、Alaスキャニングまたはランダム突然変異誘発が標的コドンまたは領域で行われ、所望の活性に関して、発現した結合分子変異体のスクリーニングが行われる。好ましくは、アミノ酸配列の挿入としては、長さ1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの範囲の、アミノ末端及び/またはカルボキシ末端での融合、並びに、単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。

20

【0124】

本明細書では、結合分子の他の修飾が考えられる。例えば、結合分子は、種々の非タンパク質様ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールのコポリマーなど）のうちの1つに連結していてもよい。結合分子は、また、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）またはマクロエマルジョン中で、例えば、コアセルベーション法または界面重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）により調製したマイクロカプセルに取り込まれてもよい。こうした技術は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示され、その全体が、参照によって本明細書に援用される。

30

【0125】

治療用途として、本明細書に記載の結合分子は、薬学的に許容可能な担体中、活性成分として有効量の結合分子を含有する医薬組成物として調製してもよい。用語「担体」は、活性化合物と共に投与する希釈剤、補助剤、賦形剤またはビヒクルを意味する。こうしたビヒクルは、落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等の、石油、動物、植物、または合成物由来のものを含む、水及び油等の液体であってよい。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを使用することもできる。これらの溶液は、滅菌され、概ね、粒子状物質を含まない。これらは、従来 of 既知の滅菌技術（例えば、ろ過）により滅菌され得る。この組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる、薬学的に許容される補助物質、例えばpH調整剤及び緩衝剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤、及び着色剤等を含むことができる。こうした製剤処方中の本発明の剤の濃度は、広い範囲（すなわち、約0.5重量%未満、通常、約1%、または少なくとも約1%から15重量%または20重量%まで）で変化してもよく、選択された特定の投与方法により、主に投与量、流体体積、粘度などに基づいて、選択される。好適なビヒクル及び製剤（他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む）は、例えば、REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21ST Edition, Troy

40

50

, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691~1092 691~1092に記載され、特にPP. 958~989を参照されたい(その全体が、参照によって本明細書に援用される)。

【0126】

本明細書に記載の結合分子は、非単離形態または単離形態で使用可能である。更に、本明細書の結合分子は、単独で、または本明細書の少なくとも1つの結合分子を含む混合物中で、使用可能である。換言すれば、結合分子は、例えば、本明細書の2つ以上の結合分子、これらの変異体または断片を含む医薬組成物として、組み合わせ使用可能である。例えば、単一の治療法中で、異なるが、相補的である活性を有する結合分子を組み合わせ、所望の治療的効果を達成することができるが、代替的に、単一の治療法中で、同一の活性を有する結合分子も組み合わせ、所望の予防的、治療的、治療用または診断的効果を達成することができる。任意で、本混合物は、少なくとも1つの他の治療薬を更に含む。一態様では、他の治療薬は、抗感染剤、抗生物質、及び/またはブドウ球菌感染の予防及び/または治療において有用な抗菌剤であってもよい。別の態様では、他の治療薬は、ブドウ球菌感染関連の状態の予防及び/または治療に有用な薬剤であってもよい。

10

【0127】

本明細書の結合分子の作製方法は、本開示の追加的部分である。このような方法は、次の段階を含む；(a)この結合分子をコードする核酸配列(複数可)を含むベクターを含む宿主細胞を、結合分子の作製に好適な条件下で培養することと、(b)結合分子を培養物から回収すること。宿主細胞は、哺乳類宿主細胞、例えば、非ヒト哺乳類宿主細胞であることが好ましい。したがって、別の態様は、結合分子(またはこれらの断片)をコードする核酸分子に関する。これらの核酸分子は、ベクター(すなわち、発現ベクター)に挿入されてもよく、その後適切な宿主細胞にトランスフェクトされ、及び/またはトランスジェニック動物内で発現されてもよい。こうして発現した結合分子(これらの断片)は、その後、当該技術分野において公知の方法により単離してもよい。例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)を参照されたい。

20

30

【0128】

本発明の組換え体ベクターは、宿主細胞中、核酸の発現に好適な形態で本発明の核酸を備える。これは、組換え型発現ベクターが、発現に使用される宿主細胞を基準にして選択された1つ以上の制御配列を含み、この配列が、発現される核酸配列に操作可能に連結されることを意味する。組換え型発現ベクター内で「操作可能に連結される」とは、ヌクレオチド配列の発現が可能な方法で、目的とするヌクレオチド配列が制御配列に連結されていることを意味することを意図している(例えば、インビトロ転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入されるときには、宿主細胞において)。

【0129】

用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現抑制因子(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを目的としている。このような制御配列は、例えばGoeddel GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press (1990)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)に記載されている。制御配列としては、多くの種類の宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、及び特定の宿主細胞内のみでヌクレオチド配列の発現を指示するもの(例えば、組織特異的制御配列)が挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択肢や、所望のタンパク質の発現レベル、といった因子に依存し得ることが、当業者によって理解されよう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入し、それによって、本明細書に記載されるように、融合タンパク質またはペプチドなど、核酸によりコードされるタ

40

50

ンパク質またはペプチドを作製することができる。

【0130】

宿主細胞は、本明細書に記載されるように、2つ以上の発現ベクターにより共にトランスフェクトされてもよい；オペロン及び第1の結合ドメインをコードするDNAを含む第1の発現ベクター（例えば、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質に結合する抗体または抗体断片）、並びにオペロン及び第2の結合ドメインをコードするDNAを含有する第2のベクター（例えば、ブドウ球菌ロイコトキシンに結合するFN3などの代替的足場）。2つのベクターは、異なる選択性マーカーを含むが、好ましくは、第1の結合ドメインポリペプチド及び第2の結合ドメインポリペプチドの、実質的に同一の発現が得られる。代替的には、単一のベクターを使用してもよく、このベクターは、第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインの両者をコードするDNAを含む。第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインのコード配列は、cDNA、ゲノムDNA、またはその両方を含んでもよい。

10

【0131】

本発明の組換え型発現ベクターは、原核細胞または真核細胞において、結合分子を産生するために設計されてもよい。例えば、本発明の結合分子は、例えば、大腸菌、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母菌または哺乳類細胞など、細菌由来の細胞中で発現させることができる。好適な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press (1990)（その全体が、参照によって本明細書に援用される）で更に議論されている。あるいは、組換え型発現ベクターは、T7プロモーター制御配列及びT7ポリメラーゼを使用するなどして、インビトロで転写され、かつ翻訳され得る。

20

【0132】

原核生物におけるタンパク質の発現は、もっとも多くの場合、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれか一方の発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含むベクターにより大腸菌内で行われる。融合ベクターは、いくつかのアミノ酸を、その中でコードされたタンパク質に、組換え型タンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に加える。このような融合ベクターは、典型的には、次の3つの目的を果たす：(i)組換え型タンパク質の発現を増大させること；(ii)組換え型タンパク質の溶解度を増大させること；及び(iii)アフィニティ精製中のリガンドとして作用することにより、組換え型タンパク質の精製を補助すること。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位は、融合部分と組換え型タンパク質の結合部に導入され、融合タンパク質の精製後、融合部分からの組換え型タンパク質の単離が可能になる。このような酵素及びそれらの同族認識配列としては、因子Xa、トロンピン、PreScission、TEV、及びエンテロキナーゼが挙げられる。典型的な融合発現ベクターとしては、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 「Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in Escherichia coli as Fusions With Glutathione S-Transferase」Gene 67:31~40 (1988)（その全体が、参照によって本明細書に援用される））、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.)及びpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ、標的組換え体タンパク質に融合する。

30

40

【0133】

組換え型哺乳類発現ベクターは、特定の細胞種において、核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的制御要素を使用して、核酸を発現させる）。組織特異的制御要素は、当技術分野において既知である。本明細書に記載の結合分子を効果的に産生するためには、所望の宿主における発現のために最適化した発現制御配列の制御下で、結合分

50

子をコードするヌクレオチド配列を配置することが好ましい。例えば、この配列としては、最適化された転写及び/または翻訳制御配列（例えば、修飾コザック配列）が挙げられる。

【0134】

大腸菌において組換え型タンパク質の発現を最大化させる1つの戦略は、組換え型タンパク質を、タンパク質分解により切断させる、正常でない能力を有する宿主細菌内でタンパク質を発現させることである（例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY Academic Press 185:119~128 (1990)（その全体が、参照によって本明細書に援用される）を参照されたい）。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンが優先的に大腸菌に利用されるコドンであるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである（例えば、Wada et al., 「Codon Usage Tabulated From the GenBank Genetic Sequence Data」Nucl. Acids Res. 20:2111~2118 (1992)（その全体が、参照によって本明細書に援用される）を参照されたい）。核酸配列のこのような変更は、標準DNA合成技術により実施することができる。コドンバイアスを解決する別の戦略は、BL21コドンに加えて、細菌由来株（Invitrogen）またはRosetta細菌由来株（Novagen）を使用するものであり、これらの株は、まれな大腸菌tRNA遺伝子の複製を余分に含む。

10

【0135】

本明細書に記載の結合分子をコードする発現ベクターは、酵母菌発現ベクターであってもよい。酵母菌サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）に発現させるためのベクター例としては、pYepSec1（Baldari et al., 「A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 beta in *Saccharomyces cerevisiae*」EMBO J. 6:229~234 (1987)（その全体が、参照によって本明細書に援用される））、pMFa（Kurjan and Herskowitz, 「Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF alpha): a Putative Alpha-Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of Mature Alpha-Factor」Cell 30:933~943 (1982)（その全体が、参照によって本明細書に援用される））、pJRY88（Schultz et al., 「Expression and Secretion in Yeast of a 400-kDa Envelope Glycoprotein Derived From Epstein-Barr Virus」Gene 54:113~123 (1987)（その全体が、参照によって本明細書に援用される））、及びpYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, CA.）、及びpicZ（Invitrogen Corp, San Diego, CA.）が挙げられる。

20

30

40

【0136】

あるいは、本明細書に記載の結合分子は、バキュロウイルスを用いて昆虫細胞中で産生され得る。培養した昆虫細胞（例えば、SF9細胞）におけるタンパク質の発現に利用可能バキュロウイルスベクターとして、pAcシリーズ（Smith et al., 「Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With a Baculovirus Expression Vector」Mol. Cell. Biol. 3:2156~2165 (1993)（その全体が、参照によって本明細書に援用される））及びpVLシリーズ（Luckow et al., 「High Level Expression of Nonfused Foreign Genes With Auto

50

grapha californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors,」Virology 170:31~39(1989)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)が挙げられる。更に別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して、哺乳類細胞内に発現させる。哺乳類発現ベクターの例としては、pCDM8(Seed, B.,「An LFA-3 cDNA Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2」Nature 329:840(1987)(その全体が、参照によって本明細書に援用される))、及びpMT2PC(Kaufman et al.,「Translational Efficiency of Polycistronic mRNAs and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells」EMBOJ. 6:187~193(1987)(その全体が、参照によって本明細書に援用される。))、pIRESpuro(Clontech)、pUB6(Invitrogen)、pCEP4(Invitrogen)、pREP4(Invitrogen)、pcDNA3(Invitrogen)が挙げられる。哺乳類細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス性調節要素により提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、ラウス肉腫ウイルス、及びサルウイルス40から誘導される。原核細胞及び真核細胞の双方の、他の好適な発現系としては、例えば、Sambrook, et al. (Eds.) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(3rd Ed.)、Cold Spring Harbor Laboratory(2001)を参照されたい(これらはその全体が、参照によって援用される)。

【0137】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、本発明の結合分子は、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母菌、植物、または哺乳類細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、COS、HEK293細胞)中で産生され得る。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0138】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核細胞または真核細胞内に導入することができる。本明細書で使用するとき、用語「形質転換」及び「トランスフェクション」は、外部の核酸(例えば、DNA)を宿主細胞に導入するための、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈降、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、または電気穿孔法など、従来から当技術分野で認識されているさまざまな方法を示すことが意図される。宿主細胞の好適な形質転換方法またはトランスフェクション方法は、Sambrook, et al. [Eds.] MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory and other laboratory manuals(2001)に見出すことができ、その全体が、参照によって本明細書に援用される。

【0139】

公知の外部のヌクレオチド配列の宿主細胞への導入手法のいずれをも、使用してもよい。これらとしては、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリプレソ、原形質融合、電気穿孔法、リボソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウイルスベクター、及びクローニングゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外部の遺伝物質を宿主細胞に導入するための他の公知の方法が挙げられる。例えば、Sambrook, et al. (Eds.) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory(2001) and Walker & Papley MOLE

CULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (5th Ed.) Royal Society of Chemistry (2009) (その全体が参照として本明細書に援用される)を参照されたい。使用される特定の遺伝工学手法が、少なくとも1つの核酸分子を、目的とするある結合分子または複数の結合分子の発現が可能である宿主細胞に確実に導入することができることのみが、必要である。

【0140】

哺乳類細胞の安定的トランスフェクションのために、使用する発現ベクター及びトランスフェクション技術に依存して、ごく一部の細胞は、外部DNAをそれらのゲノムに組み込み得ることが公知である。これらの成分を同定し、選択するために、選択性マーカー(例えば、抗生物質への耐性)をコードする遺伝子が、概して、目的とする遺伝子と共に宿主細胞内に導入される。さまざまな選択性マーカーとしては、例えば、G418、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、及びメトトレキサートなど、薬物に耐性を付与するものが挙げられる。選択性マーカーをコードする核酸は、本明細書に記載されるように、ある結合分子または複数の結合分子をコードするベクターと同一のベクター上で宿主細胞内に導入することができるか、または、別々のベクター上で導入することができる。導入された核酸により安定してトランスフェクトされた細胞は、薬物選択により同定することができる(例えば、他の細胞が死滅しても、選択性マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存している)。

10

【0141】

培養物中の原核細胞宿主または真核細胞宿主などの本発明の宿主細胞を使用して、本発明の結合分子を産生する(すなわち、発現させる)ことができる。したがって、本発明は、更に、本発明の宿主細胞を使用する本発明の結合分子の作製方法を提供する。一実施形態では、本方法は、好適な培地内で、本発明の結合分子または複数の結合分子が産生されるように、本発明の宿主細胞を培養する(本明細書に記載されるように、結合分子をコードする組換え型発現ベクターを取り込む)ことを含む。別の実施形態では、本方法は、本発明の結合分子を培養液または宿主細胞から単離することを更に含む。

20

【0142】

発現ベクターを細胞に導入後、目的とする結合分子または複数の結合分子の発現が好ましい条件下で、トランスフェクトした細胞を培養し、その後、標準技術を使用して培養物を回収した。こうした技術の例は、当該技術分野において公知である(例えば、W000/06593(Zucker et al.,)) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)を参照されたい。

30

【0143】

更に、本発明の結合分子は、ブドウ球菌感染の治療、予防、または改善のために使用することができる。ブドウ球菌感染は、どのようなブドウ球菌種によっても引き起こされ得る。一態様では、ブドウ球菌感染は、黄色ブドウ球菌のMRSA株及びMSSA株などの黄色ブドウ球菌が原因である。したがって、本開示は、本明細書に記載されるように、結合分子をその必要のある対象に投与することに伴う、ブドウ球菌感染の治療、予防、改善のための方法を提供する。

【0144】

この態様によれば、標的である「対象」は、任意の動物、例えばヒトなどの哺乳類を包含する。対象において、ブドウ球菌感染を予防することを目的とする本発明の組成物を投与する文脈において、標的対象は、ブドウ球菌に感染したか、ブドウ球菌に感染しつつあるか、またはブドウ球菌感染が進行している可能性がある、任意の対象を含む。感染しやすい対象としては、小児、若年、並びに、免疫不全の、若年、成人、及び高齢者が挙げられる。しかし、本明細書記載の方法によって、ブドウ球菌感染が発症している可能性がある任意の小児、若年、成人、若しくは高齢者、または免疫不全の個人の治療を行うこともできる。対象において、ブドウ球菌感染の治療を行うことを目的とする本発明の組成物を投与する文脈において、標的対象集団は、ブドウ球菌に感染した任意の対象を含む。特に好適な対象としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)若しくはメチシリン感

40

50

受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) に感染する可能性のある対象または感染した対象が挙げられる。他の好適な対象としては、例えば、皮膚の創傷及び感染症、組織膿瘍、毛囊炎、骨髓炎、肺炎、熱傷様皮膚症候群、敗血症、敗血症性関節炎、心筋炎、心内膜炎、及び毒素性ショック症候群など、ブドウ球菌に起因する状態 (すなわち、ブドウ球菌関連状態) が起こる危険を有する可能性があるか、またはその状態にあるこれらの対象が挙げられる。

【0145】

一実施形態では、本明細書に記載の結合分子は、ブドウ球菌感染または付随する状態が起こる可能性がある対象において、予防的に投与され、ブドウ球菌感染の発症の予防、遅延、または阻害が行われる。一態様では、本明細書に記載の1つ以上の結合分子の予防的投与は、個々において黄色ブドウ球菌感染の完全な予防に有効である。他の実施形態では、予防的投与は、さもなければ、こうした投与をせずに発症する感染の全範囲の予防に有効である (すなわち、個々において、実質的に、ブドウ球菌感染を予防する、阻害する、または最小限に抑える)。

10

【0146】

別の実施形態では、本明細書に記載の結合分子は、感染の進行及び更なる発症を阻害するために (すなわち、個体において、他の細胞への感染の拡散を阻害する及び/または予防するために、感染を減少させるために、及び感染症の1つ以上の症状を治療するまたは軽減するために)、ブドウ球菌感染を有する個体に治療的投与する。

20

【0147】

本明細書に記載の結合分子の治療的有効量は、標準的な手順によって決定することができ、例えば、医薬組成物中の結合分子濃度、投与様式及び頻度、治療される (または予防される) ブドウ球菌感染症の重症度、及び対象の詳細 (例えば、年齢、体重、及び全身の健康状態及び免疫状態) など多数の因子を考慮に入れる。一般的なガイダンスは、例えば、International Conference on Harmonization of the Publication and REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990) (その全体が、参照によって本明細書に援用される) に見出される。臨床医は、単回投与において、または複数回投与プロトコルによって、所望のまたは必要とする予防的効果または治療的効果をもたらす用量に到達するまで、本明細書に記載の結合分子を含む組成物を投与してもよい。この療法の進行は、従来のアッセイにより容易にモニターすることができる。予防的用途では、長期間にわたり比較的低頻度の間隔で、比較的少ない用量が投与される。治療的用途では、疾患の進行が低減するまたは終結するまで、好ましくは、対象が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短時間の間隔で比較的多い用量が必要とされる場合もある。

30

【0148】

本発明の治療的組成物は、治療されるブドウ球菌感染の性質に依存して、単独で、または併用療法の一部として1つ以上の他の活性剤と連動して、投与され得る。このような追加の活性剤としては、当該技術分野において公知である抗感染症薬、抗生物質、及び抗菌剤が挙げられる。

40

【0149】

本明細書に記載の結合分子の投与態様は、結合分子 (複数可) を宿主に送達する、以下の非経口的投与など、任意の好適な経路であってもよい; 例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、または皮下、肺内; 経粘膜 (経口、鼻孔内、腔内、直腸内); 錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子中の配合を用いること; 及び注射器、埋込みデバイス、浸透圧性ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプに収容すること; または当業者に理解され、当該技術分野において公知である他の手段。部位特異的投与は、例えば、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、子宮頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸郭内、子宮内、血管内、膀胱内、病巣内、腔内、直腸

50

、口腔内、舌下、鼻腔内、または経皮送達によって達成され得る。

【0150】

また、本明細書に提供される結合分子は、対象においてブドウ球菌感染の診断方法に使用され得る。一態様では、ブドウ球菌感染の診断方法は、本明細書に記載されるように、結合分子と、診断される対象からのサンプルとを接触させること、及びサンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンを検出すること、すなわち、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出することと、を含む。ブドウ球菌感染は、対象において、こうした検出に基づいて診断される。換言すれば、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンが検出されることにより、ブドウ球菌感染の陽性診断が示される。

10

【0151】

この態様によれば、対象由来サンプルは、血液、組織、細胞、血清、または他の生体サンプルを含んでいてもよい。

【0152】

別の態様は、サンプル中でのブドウ球菌感染の検出方法に関する。本方法は、本明細書に記載されるように、結合分子をサンプルと接触させることと、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの存在または非存在を検出することと、を含む。グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンが検出されることにより、サンプルにおけるブドウ球菌の存在が示される。この態様に従って、サンプルは、環境、動物、またはヒトから入手した任意の生体サンプルであってもよい。

20

【0153】

対象由来のサンプルまたは別のサンプルにおける、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンの検出を含む本明細書に記載の方法は、検出可能に標識されている結合分子の使用を含む。したがって、一態様では、本明細書に記載されるように、結合分子は検出可能な標識に連結されてもよい。好適な検出可能な標識としては当該技術分野において公知であり、検出可能なタグ（例えば、ポリヒスチジン、(His₆-)タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-)タグ、またはマルトース結合タンパク質(MBP-)タグ)；放射性標識（例えば、炭素(¹⁴C)またはリン(³²P)）；蛍光標識（例えば、フルオレセイン及びその誘導体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン及びその誘導体、ジクロロトリアジニルアミン、フルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリン)；発光標識（例えば、ルミノール)；生物発光標識（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン)；または酵素標識（例えば、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋わさびペルオキシターゼ）、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素グルコース）、複素環式オキシダーゼ（例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシターゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼが挙げられる。あるいは、結合分子は、検出可能な標識により、結合され得る。例えば、検出可能な標識を含む二次抗体によって結合され得る。

30

40

【0154】

サンプルにおいて、グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンに結合される標識された結合分子を検出するための検出アッセイは、当該技術分野において公知であり、例えば、免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または蛍光活性化細胞選別法(FACS)が挙げられる。

【0155】

更に、本発明の結合分子は、ブドウ球菌感染の予防に使用することができる。本明細書

50

に記載されるように、本方法は、結合分子を対象由来のサンプルに接触させることと、接触の結果として、サンプルにおけるグリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンを検出することを含む。グリコシル化ブドウ球菌表面タンパク質及び/またはブドウ球菌ロイコトキシンが対象サンプル中で検出された場合、ブドウ球菌感染の予防に好適である薬剤を対象に投与する。代表的な予防剤としては、これらに限定されないが、本明細書に記載の結合分子、1つ以上の抗生物質（例えば、ムピロシン、ナフシリン、セファゾリン、ジクロキサシリン、クリンダマイシン、バンコマイシン、リネゾリド、リファンピン、スルファメトキサゾール - トリメトプリム）、及び/またはブドウ球菌感染に対して効果的である他の抗感染薬が挙げられる。

【実施例】

【0156】

本発明を示すために実施例を提供する。これらの実施例は、本発明を任意の特定の用途または操作理論に制約することを意味するものではない。

【0157】

実施例1 ロイコトキシンに結合し、中和する、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインの構築及び選択

Tencon(配列番号1)は免疫グロブリン様足場である、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインであり、ヒトネイシンC由来の15のFN3ドメインのコンセンサス配列から設計されている(Jacobs et al., 「Design of Novel FN3 Domains With High Stability by a Consensus Sequence Approach」 Protein Engineering, Design, and Selection 25:107~117(2012)、(本開示は、その全体が、参照によって本明細書に援用される))。Tenconの結晶構造は、7つのストランドを接続させる6つの表面露出ループを示す。LukAB、LukD、またはLukEと結合する新規分子の選択に使用できるフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインのライブラリーを構築するために、これらのループ、または各ループ内の選択された残基を、ランダム化できる。

Tencon:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAINLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT(配列番号1)

【0158】

手順

TCL7(TCL18)及びTCL9(TCL17)ライブラリーの構築。TenconのF:Gループ、TCL9(TCL17)、またはBC及びFGループを組み合わせたもの、TCL7(TCL18)のみをランダム化するために設計されたライブラリーは、cisディスプレイ系で使用するために構築された(Odegrip et al., 「CIS Display: In Vitro Selection of Peptides From Libraries of Protein-DNA Complexes」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2806~2810(2004)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)。この系では、Tacプロモーター、Tenconライブラリーコード配列、RepAコード配列、cisエレメント及びoriエレメントの配列が組み込まれた線状二本鎖DNAが作製される。インビトロ転写/翻訳系での発現時に、コードされるDNAにcisで結合するFN3ドメイン-RepA融合タンパク質の複合体が形成される。次に、後述のように、標的分子に結合する複合体は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により単離され、増幅される。

【0159】

Slonomics technology(Sloning Biotechnology GmbH)を用いて、ランダム化BCまたはFGループ配列を伴うTencon

10

20

30

40

50

遺伝子配列をコードするDNA断片を合成して、ライブラリーのアミノ酸分布を制御し、かつ停止コドン除去した。BCループまたはFGループのいずれかをランダム化する2つの異なるDNA分子セットを独立して合成し、その後、ループ長さの異なる組み合わせを有するライブラリーを作製するように、後述のように混ぜ合わせた。下の表1は、これらのTenconループライブラリーの設計特性についてまとめている。

【0160】

(表1)TCL7(TCL18)及びTCL9(TCL17)ライブラリーのBC及びFGループの設計されたアミノ酸配列。比較のために、ランダム化していないTenconBC及びFGループの配列を示す。Xは、システイン及びメチオニンを欠く18のアミノ酸の混合物を示す。

10

<u>ライブラリー</u>	<u>B:Cループ設計</u>	<u>F:Gループ設計</u>
Tencon	TAPDAA(配列番号3)	KGGHRSN(配列番号4)
TCL7 (TCL18)	X ₆₋₉	X ₇₋₁₀ SN
TCL9 (TCL17)	TAPDAA(配列番号3)	X ₇₋₁₂ SN

20

【0161】

FGループライブラリー(TCL9(TCL17))の作製。FGループ中のランダム化コドンを除き、5'Tacプロモーター、続いてTenconの完全遺伝子配列から構成される合成DNA分子セットを作製した(米国特許公開第2013/0079243号(Diemetal.)),その全体が、参照によって本明細書に援用される。)。FGループのランダム化に関しては、システイン及びメチオニン以外、すべてのアミノ酸が同じ割合でコードされていた。多様化部分の長さは、FGループ中で7、8、9、10、11、または12のアミノ酸に関してコードするようになっている。それぞれの長さの変化形態のサブライブラリーを、2µgのスケールで個々に合成し、その後、オリゴSloning-FOR及びSloning-Revを使用して、PCRにより増幅させた。

30

【0162】

ライブラリーの3'断片は、PspOMI制限部位、repA遺伝子のコード領域、及びcis及びoriエレメントを含むディスプレイのためのエレメントを含む、定常DNA配列である。プラスミド(pCR4Blunt)(Invitrogen)を用いてPCR反応を実施し、M13フォワード及びM13リバースプライマーでこの断片を増幅した。得られたPCR産物は、PspOMIにより一晩消化し、ゲル精製した。ライブラリーDNAの5'部位を、repA遺伝子を含む3'DNAにライゲートするために、5'DNA 2pmol(約540ng~560ng)を、NotI及びPspOMI酵素、並びにT4リガーゼの存在下、37°Cで一晩、同じモル量(約1.25µg)の3'repA DNAにライゲートさせた。ライゲートされたライブラリー産物を、オリゴPOP2250(配列番号6)及びDigLiGRev(配列番号7)により、PCR12サイクルを用いて増幅させた。各サブライブラリーについて、12のPCR反応由来の得られたDNAを混合して、Qiagenスピンカラムにより精製した。TCL9(TCL17)の各サブライブラリーの収率は、32~34µgの範囲であった。

40

【0163】

TCL7(TCL18)ライブラリー構造体。TCL7(TCL18)ライブラリーは、ランダム化TenconBC及びFGループを有するライブラリーを提供する。このライブラリーにおいて、長さ6~9のアミノ酸のBCループを長さ7~12アミノ酸のランダ

50

ム化FGグループと組み合わせて混合した。合成Tenccon断片BC6、BC7、BC8、及びBC9（それぞれ、配列番号80～83）を作製して、BCグループが6、7、8、または9のランダム化アミノ酸のいずれかに置換えられるように、残基VXまでのタンパク質のN末端部をコードするTenccon遺伝子を含む。L17A、N46V、及びE86I突然変異（CEN5243）を発見する前にこれらの断片を合成したが、これらの突然変異は、後述の分子生物学工程に取り込まれた。この断片と、ランダム化FGグループをコードする断片と、を混合するために、次の工程を行った。

【0164】

まず、Tacプロモーターと、アミノ酸A17（130mer-L17A）（配列番号84）をコードするヌクレオチドまでのTencconの5'配列と、をコードするDNA断片を、オリゴPOP2222ext（配列番号85）及びLS1114（配列番号86）を用いて、PCRにより作製した。これは、ライブラリー内にL17A突然変異を含めて行った。次に、ランダム化BCグループを含むTenccon残基R18-V74をコードするDNA断片は、BC6、BC7、BC8、またはBC9を鋳型として使用し、オリゴLS1115（配列番号87）及びLS1117（配列番号88）を使用してPCRにより増幅させた。このPCR工程により、3'末端部にBsaI部位を導入した。その後、オーバーラップPCRにより、オリゴPOP2222ext及びLS1117をプライマーとして使用して、これらのDNA断片を結合させた。得られたPCR生成物240bpを貯留して、QiagenPCR精製キットにより精製した。BsaI-HFにより精製されたDNAを消化し、ゲル精製した。

10

20

【0165】

FGグループをコードする断片は、オリゴヌクレオチドSDG10（配列番号89）及びSDG24（配列番号90）と共に、FG7、FG8、FG9、FG10、FG11、及びFG12を鋳型として使用しPCRにより増幅させて、BsaI制限酵素部位及びN46V及びE86I変異体を組み入れた。

【0166】

2つのBCグループ長さ2つのFGグループ長さを組み合わせて4つのライゲーション反応として、16の可能な組み合わせにおいて、消化したBC断片及びFG断片を共にライゲートさせた。いずれのライゲーションも約300ngの全BC断片及び300ngのFG断片を含めた。その後、オリゴPOP2222（配列番号5）及びSDG28（配列番号91）を用いて、PCRによりこれらの4ライゲーションプールを増幅させた。その後、各反応生成物7.5μgをNot1により消化し、QiagenPCR精製カラムにより精製した。このDNA5.2ugを、PspOMIにより消化した等モル量のRepA DNA断片（約14ug）にライゲートし、オリゴPOP2222を使用して、生成物をPCRにより増幅させた。

30

【0167】

TCL19、TCL21、TCL23及びTCL24ライブラリーの設計。特定のライブラリー設計におけるランダム化させる残基の選択は、作製される相互作用表面の全体形状を左右する。BC、DE、及びFGグループをランダム化したライブラリーから、マルチ結合タンパク質（MBP）に結合するように選択された足場タンパク質を含むFN3ドメインのX線結晶学的分析により、MBP活性部位に適合する大きく湾曲した境界面を有することが明らかになった（Koide et al., 「High-Affinity Single-Domain Binding Proteins With a Binary-Code Interface」Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104: 6632～6637（2007）（その全体が、参照によって本明細書に援用される））。その一方で、MBPに結合するように選択されたアンキリン繰り返し足場タンパク質は、更に多くの平面相互作用表面を有し、かつ、活性部位から遠いMBPの外側表面に結合することが明らかになった（Binz et al., 「High-Affinity Binders Selected From Designed Ankyrin Repeat Protein Libraries」Nat.

40

50

B i o t e c h n o l . 2 2 : 5 7 5 ~ 8 2 (2 0 0 4) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)) 。これらの結果から、足場分子の結合表面の形状 (曲線対水平) は、どの標的タンパク質またはこれらの標的タンパク質の特定のエピトープが、足場により効果的に結合され得るかを示し得ることが示唆される。タンパク質結合のための、FN3ドメインを含む遺伝子操作タンパク質足場関連で公表されている試みは、標的結合のために遺伝子操作されている隣接ループに依存しており、従って曲線状の結合表面が作製される。この方法では、こうした足場によって入手可能な標的及びエピトープの数が制限され得る。

【 0 1 6 8 】

T e n c o n 及び他の FN3ドメインは、分子の反対面に以下の2つのCDR様ループセットを含む ; B C、D E、及び F G ループによって形成される第1のセット、及び A B、C D、及び E F ループによって形成される第2のセット。2つのループセットは、FN3構造体の中央を形成するストランドによって分離されている。わずかに窪んでいる面は、C D 及び F G ループ、並びに2つの逆平行ストランド、C 及び F ストランドにより形成され、本明細書では、C - C D - F - F G 表面と称する。C - C D - F - F G 表面は、表面を形成する残基のサブセットをランダム化することによって、タンパク質足場相互作用表面のライブラリーを設計するために、鋳型として使用可能である。ストランドは、タンパク質表面に露出された他の全ての残基の側鎖を有する繰り返し構造体を有する。したがって、ストランド内で表面に露出された若干のまたはすべての残基をランダム化することにより、ライブラリーを作製することができる。ストランドにおいて、適切な残基を選択することにより、T e n c o n 足場の固有の安定性が損なわれることを最小限にし、他のタンパク質との相互作用に向けた固有の足場表面を提供する。この前提条件に基づいて構築されたライブラリーは、T C L 1 4 と称され、米国特許第 2 0 1 3 / 0 0 7 9 2 4 3 A 1 号 (D i e m e t a l) に記述されている (その全体が、参照によって本明細書に援用される) 。その後、T C L 1 4 のものと非常に類似した設計下で新規ライブラリーを作製した。使用された T C L 1 4 により、N N S コドンが縮重され、T e n c o n 足場が多様化した。ライブラリーのアミノ酸分布を制御しかつ停止コドンを除去するために、S l o n o m i c s t e c h n o l o g y (S l o n i n g B i o t e c h n o l o g y G m b H) を用いて合成した T e n c o n 遺伝子をコードする DNA 断片を用いて、T C L 1 9 (配列番号 8 6) を産生した。したがって、「X」以下で示した各位置を同じ 1 8 のアミノ酸の混合物で置換した (システインまたはメチオニンなし)

TCL19:

LPAPKLNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYEXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSAIFTT (配列番号 92)

;ここで「X」は、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし) 。

【 0 1 6 9 】

(表 2)

10

20

30

40

領域	アミノ酸位置	アミノ酸配列	配列番号
	(配列番号92中)		
Cストランド	29-37	DSFXIXYXE	93
Fストランド	65-74	TEYXVXIXGV	94
Cストランド+ CDループ	29-43	DSFXIXYEXXXXGE	95
Fストランド+ FGループ	65-81	TEYXVXIXGVKGGXXSX	96
Aストランド+ ABループ+ Bストランド+ BCループ	1-28	LPAPKXLXVXXVXXXXAXL XWXAPDAAF	97
Eストランド	55-59	XYXLT	98

10

【0170】

類似の設計の、2つの追加のTenconライブラリーを作製した。これらの2つのライブラリー、TCL21及びTCL23は、TCL14と同一位置でランダム化される(米国特許第2013/0079243A1号(Diem et al.,)) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)が、これらの位置で生じるアミノ酸の分布は変化する(以下の表3)。TCL21は、システイン及びメチオニンのみを除いて、各位置で18の天然アミノ酸の等しい分布を含むように設計された(それぞれ5.55%)。TCL23は、表3に示すとおり、各ランダム化された位置が、機能的抗体のCDR-H3ループに見られるアミノ酸分布に近づくように設計した(Birtalan et al., 「The Intrinsic Contributions of Tyrosine, Serine, Glycine and Arginine to the Affinity and Specificity of Antibodies」Journal of Molecular Biology 377:1518~1528 (2008)) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)。TCL21ライブラリーと同様に、システイン及びメチオニンは除外した。

20

【0171】

第3の追加のライブラリーを構築して、TCL21ライブラリーの、可能性のある標的結合表面を拡大した。このライブラリーTCL24では、ライブラリーTCL14、TCL21、及びTCL23と比較して、4つの追加のTencon位置をランダム化した。これらの位置としては、DストランドからのN46及びT48、及びGストランドからのS84及びI86が挙げられる。これらの残基の側鎖は、ストランドD及びGから表面に露出されており、構造上、Cストランド及びFストランドのランダム化部分に近接しているため、位置46、48、84、及び86を特に選択し、これによって、標的タンパク質のアクセス可能な表面積が増大する。TCL24に関して各位置で使用されたアミノ酸分布は、記載されたTCL21及び表3で記述されたものと一致する。

30

TCL24:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYEXXXXGEAIXLXVPGSERS

YDLTGLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLXAXFTT (配列番号 667)

40

;ここで「X」は、18の天然アミノ酸の均等な混合物であることを示す。

【0172】

(表3)TCL21、TCL23、及びTCL24の、各ランダム化位置でのアミノ酸頻度(%)

アミノ酸	TCL21	TCL23	TCL24
Ala	5.6	6.0	5.6
Arg	5.6	6.0	5.6
Asn	5.6	3.9	5.6
Asp	5.6	7.5	5.6
Cys	0.0	0.0	0.0
Gln	5.6	1.5	5.6
Glu	5.6	2.5	5.6
Gly	5.6	15.0	5.6
His	5.6	2.3	5.6
Ile	5.6	2.5	5.6
Leu	5.6	5.0	5.6
Lys	5.6	1.5	5.6
Met	0.0	0.0	0.0
Phe	5.6	2.5	5.6
Pro	5.6	4.0	5.6
Ser	5.6	10.0	5.6
Thr	5.6	4.5	5.6
Trp	5.6	4.0	5.6
Tyr	5.6	17.3	5.6
Val	5.6	4.0	5.6

10

20

【0173】

TCL21、TCL23、及びTCL24ライブラリーの作製。アミノ酸分布を制御するために、Colibra library technology (Isogenic a) を用いて、TCL21ライブラリーを作製した。TCL23及びTCL24遺伝子断片は、Slonomics technology (Morphosys) を使用して作製し、アミノ酸分布を制御した。従来記載されていたとおり、CISディスプレイ系を用いた選択に使用するために、初期合成後、PCRを使用して各ライブラリーを増幅し、次いでRepAの遺伝子にライゲーションした(Odegrip et al., 「CIS Display: In Vitro Selection of Peptides From Libraries of Protein-DNA Complexes」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2806~2810 (2004) (その全体が、参照によって本明細書に援用される))。

30

【0174】

ライブラリーのスクリーニング。Cisディスプレイを使用して、TCL17、TCL18、及びTCL19ライブラリーから、ロイコトキシン結合ドメインを選択した。組換え型LukA'Bトキソイド複合体(配列番号10及び11)、LukD(配列番号12)、及びLukE(配列番号13)ロイコトキシンは、標準方法を使用して、ビオチン化し、パニングのために使用した。本発明の実施例においてパニングのために修飾LukA'Bトキソイド複合体を使用した。未修飾LukA'Bトキシンの結合及び/または中和が確認された。インビトロ転写及び翻訳(ITT)については、ライブラリーDNA 2~6 µgを、全量100 µL中、0.1 mM完全アミノ酸、1X S30プレミックス成分、及びS30抽出物(Promega) 30 µLとインキュベートし、30 でインキュベートした。1時間後、ブロッキング溶液450 µL(PBS pH7.4に、2%ウシ血清アルブミン、100 µg/mLニシン精子DNA、及び1 mg/mLヘパリンを補充)を添加し、反応物を氷上で15分間インキュベートした。結合させるために、ブロッキングされたITT反応生成物500 µLをビオチン化ロイコトキシン100 µLと混合し、室温で1時間インキュベートした。その後、結合した複合体は、磁性を有するneutravidinまたはストレプトアビジンビーズ(Promega and Invitrogen)によりプルダウンした。非結合ライブラリーメンバーは、PBST及びPBS

40

50

の連続洗浄により除去した。5、7、及び9ラウンドの洗浄後、DNAを、10分間、65℃まで加熱することによって、結合した複合体から溶出させ、PCRにより増幅させ、制限酵素消化、及び更なるパニングラウンドのためのライゲーションにより、RepAをコードするDNA断片に付着させた（この工程は、repAがライブラリーに取り込まれたときは任意である）。高親和性結合剤は、連続的に標的ロイコトキシン濃度を低下させることによって、各ラウンド400nM～2.5nMで、洗浄の厳密性を増大させて単離した。パニングは、（LukEの場合）7つの、及び（LukA及びLukD）9つの連続ラウンドを介して行われた。

【0175】

パニング後、オリゴMDD40（配列番号8）及びMDD62（配列番号9）を用いて、選択されたFN3ドメインをPCRにより増幅させ、リガーゼ処理不要なクローニング部位を含むよう修飾されたpETベクターにサブクローニングし、標準的分子生物学技術を使用して、大腸菌での可溶性発現のために、BL21-GOLD（DE3）（Stratagene）細胞を形質転換した。精製及び検出が可能になるように、C末端ポリヒスチジンタグをコードする遺伝子配列を、各FN3ドメインに付加した。培養物は、100µg/mLカルベニシリン/1mLを補充した2YT培地中、1mLの96ウェルブロックで、37℃にて光学密度0.6～0.8となるまで増殖させ、IPTGを1mMまで添加し、温度を30℃まで低下させた。細胞は、約16時間後、遠心分離によって採取され、-20℃で凍結した。BugBuster（登録商標）HT溶解緩衝液（Novagen EMD Biosciences）0.6mL中で各ペレットを室温で45分間振盪させてインキュベートすることによって、細胞溶解を行った。ニッケル精製FN3ドメインの抗原結合は、ELISAにより確認した。

【0176】

結果

各毒素/トキソイド分子のcisディスプレイパニング後、LukA'B（トキソイド）、LukD、及びLukEに結合させたFN3ドメインを、ELISAにより同定した。バインダーのDNA配列を同定し、固有の配列を単離した。これらの配列から発現させたモノマータンパク質を同定し、予想分子量を確認した。抗原結合配列識別番号及びモノマーFN3ドメインを表4に示す。

【0177】

（表4）LukA、LukD、及びLukEに結合するFN3ドメインの特性決定

配列番号	内容	多様性領域	標的
14	Luk17	C, CD, F, FG	LukA'B
15	Luk19	BC, FG	LukA'B
16	Luk20	BC, FG	LukA'B
17	Luk24	C, CD, F, FG	LukA'B
18	Luk8	BC, FG	LukD
19	Luk9	BC, FG	LukD
20	Luk10	BC, FG	LukD
21	Luk11	BC, FG	LukD
22	Luk12	BC, FG	LukD

10

20

30

40

50

配列番号	内容	多様性領域	標的
23	Luk21	BC, FG	LukD
24	Luk22	BC, FG	LukD
25	Luk26	C, CD, F, FG	LukE
26	Luk27	C, CD, F, FG	LukE
27	Luk28	C, CD, F, FG	LukE
28	Luk29	BC, FG	LukE
29	Luk30	BC, FG	LukE
30	Luk31	BC, FG	LukE
31	Luk32	BC, FG	LukE
32	Luk33	FG	LukE
33	Luk34	FG	LukE
34	Luk35	FG	LukE
35	Luk36	FG	LukE
36	Luk37	FG	LukE
37	Luk38	FG	LukE
38	Luk39	FG	LukE
39	Luk40	FG	LukE
40	Luk41	FG	LukE
41	Luk42	FG	LukE
42	Luk43	FG	LukE
43	Luk44	FG	LukE
44	Luk45	FG	LukE
45	Luk46	C, CD, F, FG	LukE

10

20

30

40

配列番号	内容	多様性領域	標的
46	Luk47	C, CD, F, FG	LukE
47	Luk48	C, CD, F, FG	LukE
48	Luk49	C, CD, F, FG	LukE
49	Luk50	C, CD, F, FG	LukE
50	Luk51	C, CD, F, FG	LukE
51	Luk52	C, CD, F, FG	LukE
52	Luk53	C, CD, F, FG	LukE
53	Luk54	C, CD, F, FG	LukE
54	Luk55	C, CD, F, FG	LukE
55	Luk56	C, CD, F, FG	LukE
56	Luk57	C, CD, F, FG	LukE
57	Luk58	C, CD, F, FG	LukE
58	Luk59	C, CD, F, FG	LukE
59	Luk60	C, CD, F, FG	LukE

10

20

30

40

50

【0178】

LukAB、LukD、及びLukEを結合する追加のFN3ドメインが、以下に配列番号113～666として表6に開示される。

【0179】

まとめ

ELISAにより検出されたとおり、LukA'B(4)、LukD(7)及びLukE(35)を標的とする、配列が固有のモノマーブドウ球菌ロイコトキシン結合FN3ドメインが、Cisディスプレイパニングによって上手く同定された。

【0180】

実施例2 抗LukD FN3ドメインによる、ロイコトキシン媒介免疫細胞死滅の中和
単離した抗LukDFN3ドメインの機能性を評価するために、細胞系細胞傷害中和アッセイを開発した。3つの種類のFN3ドメイン(リンカーを有さないFN3ドメイン、GSを有するFN3ドメイン、またはGSMリンカーを有するFN3ドメイン)を使用した。

【0181】

手順

中和活性に関して、抗LukD FN3ドメインのスクリーニングを行うために、LukED 75 nM(細胞を100%死滅させるための必要投与量、つまりLD₁₀₀)を、最終体積30 μl中、増加濃度での異なるFN3ドメインと共に、30分間、氷上でインキュベートした。次いで、新たに単離した初代ヒト好中球(hPMN)、2 × 10⁵細胞/RPMI 70 μl + 10 mM HEPES + 0.1% HASを、毒素-FN3ドメイン混合物に添加した。37 °C、5% CO₂インキュベータで1時間インキュベートした後、10 μl Cell Titer AQ ONE Solution(Prome

g a) を細胞に添加し、1時間インキュベートした。Cell Titer は、細胞代謝活性を観察することにより細胞生存度を評価する比色分析法である。比色分析反応を、Perkin Elmer Envision Multilabel Reader を使用して 492 nm で測定した。生存細胞率は、次式を使用して算出した：生存率 (%) = $100 \times [(A_{b_{492}} \text{ サンプル} - A_{b_{492}} \text{ Triton X 100}) / (A_{b_{492}} \text{ 組織培地})]$ 。

【0182】

インキュベーションの1時間後、乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出を観察することにより、膜損傷も測定した。上澄み 50 μ l を取り出して、50 μ l LDH 試薬 (Cytotoxicity - ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega) の入ったウェルに添加し、更に30分間、室温にてインキュベートした。LDH 活性は、Perkin Elmer Envision Multilabel Reader を使用して測定し (励起 555 nm、発光 590 nm)、データは、0.1% v/v Triton - X 100 により誘導された 100% の PMN 細胞溶解に対して正規化した。

【0183】

結果

図 1 に示すように、ヒト PMN に対する LukED の細胞傷害活性を中和する、選択された抗 LukD FN3 ドメインの能力を評価した。3つの選択された抗 LukD FN3 ドメイン (Luk10、Luk12、及び Luk22) は、LukED が媒介する hPMN の死滅を阻止することが明らかになった。こうした阻害は、細胞代謝 (Cell Titer) 並びに膜損傷 (LDH) を測定するときに観察された。抗 LukD FN3 ドメインとは対照的に、TENCON 対照 FN3 ドメインでは、中和は観察されなかった。

【0184】

まとめ

予想通り、TENCON 分子は、LukED の細胞傷害能を阻止することはできなかった。対照的に、選択された抗 LukD FN3 ドメインは、リンカーへの融合にかかわらず、LukED を中和した。抗 LukD FN3 ドメインにより、用量依存的に、LukED 媒介細胞傷害を阻止した。例示的目的として、mAb - FN3 ドメインコンジュゲートの生成のために、Luk12 抗 LukD FN3 ドメインを選択した。

【0185】

実施例 3 抗 LukAB FN3 ドメインによる、ロイコトキシン媒介免疫細胞死滅の中和

単離した抗 LukA'B FN3 ドメインの機能性を評価するために、細胞系細胞傷害中和アッセイを開発して、活用した。3つの種類の FN3 ドメイン (リンカーを有さない FN3 ドメイン、GS を有する FN3 ドメインまたは GSM リンカーを有する FN3 ドメイン) を使用した。

【0186】

手順

中和活性に関して、抗 LukA'B FN3 ドメインのスクリーニングを行うために、活性 LukAB 毒素 18.75 nM (LD_{100}) を、30分間氷上で、増加濃度での異なる FN3 ドメイン Luk17 (+/- リンカー) のバージョンと共に、96 ウェルのブラックウェル透明底組織培養処理プレートでインキュベートした。次に、フェノールレッド非含有 RPMI + 10 mM HEPES + 0.1% HSA 中、新たに単離した 2×10^5 の初代 hPMN を、毒素 - FN3 ドメイン複合体に添加し、サンプルは、1時間、37、5% CO_2 インキュベーターでインキュベートした。膜損傷は、2つのアッセイ、臭化エチジウム透過性及び乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出によって評価した。臭化エチジウム透過性は、Perkin Elmer Envision Multilabel Reader を使用して測定した (励起 530 nm、発光 590 nm)。インキュベーションの1時間後に、培養物上澄みへの LDH 放出も測定した。上澄み 50 μ l を取り出して、

50 μ l LDH試薬 (Cytotoxicity Assay, Promega) の入ったウェルに添加し、更に30分、室温でインキュベートした。LDH活性は、Perkin Elmer Envision Multilabel Readerを使用して測定し(励起555nm、発光590nm)、データは、0.1% v/v Triton-X100により誘導された100%のPMN細胞溶解に対して正規化した。

【0187】

結果

図2に示すように、ヒトPMNに対するLukABの細胞傷害活性を中和する、Luk17抗LukAB FN3ドメインの能力を評価した。エチジウム透過性及びLDH溶出により評価するとき、抗LukAB FN3ドメインは、LukABが媒介するhPMNの死滅を阻止することが明らかになった。対照的に、対照FN3ドメイン分子では、中和は観察されなかった。

10

【0188】

まとめ

予想通り、TENCON分子は、LukABの細胞傷害能を阻止することはできなかった。対照的に、抗LukAB FN3ドメインは、リンカーへの融合にかかわらず、LukAB細胞傷害性を中和した。抗LukAB FN3ドメインにより、用量依存的に、LukAB媒介細胞傷害を阻止した。例示的目的として、mAb-FN3ドメインコンジュゲートの生成のために、Luk17抗LukAB FN3ドメインを選択した。

20

【0189】

実施例4：抗LukE FN3ドメインによる、ロイコトキシン媒介免疫細胞死滅の中和
単離した抗LukE FN3ドメインの機能性を評価するために、抗LukD FN3ドメインの評価に関して記載された同一細胞系細胞傷害中和アッセイを用いた。例示的目的として、5つの抗LukE FN3ドメインを使用した(リンカーを有さないFN3ドメイン)。

【0190】

手順

中和活性に関して、抗LukE FN3ドメインのスクリーニングを行うために、75nM LukED(細胞を100%の死滅させるための必要投与量、つまりLD₁₀₀)を、最終体積30 μ l中、増加濃度での異なるFN3ドメインと共に、30分間、氷上でインキュベートした。次いで、新たに単離した初代hPMN、 2×10^5 細胞/RPMI 70 μ l + 10mM HEPES + 0.1% HASを、毒素-FN3ドメイン混合物に添加した。37、5% CO₂インキュベータで1時間インキュベートした後、乳酸脱水素酵素(LDH)放出を介して、細胞膜の不安定化を観察した。1時間のインキュベーション後、培養物上澄みへのLDH放出を測定した。上澄み50 μ lを取り出して、50 μ l LDH試薬(Cytotoxicity Assay, Promega)の入ったウェルに添加し、更に30分間、室温にてインキュベートした。LDH活性は、Perkin Elmer Envision Multilabel Readerを使用して測定し(励起555nm、発光590nm)、データは、0.1% v/v Triton-X100により誘導された100%のPMN細胞溶解に対して正規化した。

30

40

【0191】

結果

ヒトPMNに対するLukEDの細胞傷害活性を中和する、選択された抗LukE FN3ドメインの能力を評価した。試験対象の抗LukE FN3ドメインはすべて、LukEDが媒介する死滅を阻止することが明らかになった(図3)。

【0192】

まとめ

抗LukE FN3ドメインによるLukED中和は投与量依存性であった。試験対照

50

の FN3 ドメインでは、抗 LukE FN3 ドメインである Luk26、Luk27、及び Luk38 が最も高い中和の活性を示した。

【0193】

実施例5 融合タンパク質の構造体

構造体は、mAb5133（配列番号60及び61）を利用して設計した。米国特許第8,460,666号（Throsby et al.,）（その全体が、参照によって本明細書に援用される）に記述され、Fab V領域を介してブドウ球菌抗原と係合し、軽鎖のC末端または重鎖のC末端の一方にロイコトキシン中和構造体を結合することを目的にしている。表5は、設計された融合タンパク質構造体についてまとめている。

【0194】

図4Aの左側の構造体は、各重鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。図4Aの右側の構造体は、各重鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。

【0195】

図4Bの左側の構造体は、各軽鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。図4Bの右側の構造体は、各軽鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体を有する、単一特異性二価のmAbを示す。

【0196】

図4Cの左側の構造体は、各軽鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体及び各重鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。図4Cの右側の構造体は、各軽鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体及び各重鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。

【0197】

図4Dの左側の構造体は、各重鎖のC末端に結合したタンデムLukAB中和構造体及びLukAB中和構造体のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。図4Dの右側の構造体は、各重鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体及びLukDまたはLukE中和構造体のC末端に結合したLukAB中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。

【0198】

図4Eは、ブドウ球菌抗原2を認識する重鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体、及びブドウ球菌抗原1を認識する重鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体を有する、二重特異性、二価のmAbを示す。

【0199】

図4Fは、1つの重鎖のC末端に結合したLukAB中和構造体及び反対側の重鎖のC末端に結合したLukDまたはLukE中和構造体を有する、単一特異性、二価のmAbを示す。

【0200】

（表5）融合タンパク質構造体の設計

10

20

30

構造体 番号	配列 番号	内容	V領域	重鎖	重鎖FN3 ドメイン	軽鎖FN3 ドメイン
1	60 HC 61 LC	CR5133	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	IgG1 wt	なし	なし
2	62 HC 63 LC	CR5133 PRASA	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A	なし	なし

10

20

構造体 番号	配列 番号	内容	V領域	重鎖	重鎖FN3 ドメイン	軽鎖FN3 ドメイン
3	64 HC 65 LC	CR5133 A6	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	H435R/ Y436F	なし	なし
4	66 HC 67 LC	CR5133 PRASA A6	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	なし	なし
5	68 HC 69 LC	CR5133 PRASA A6 LC-D	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	なし	抗-LukD

10

20

30

40

構造体 番号	配列 番号	内容	V領域	重鎖	重鎖FN3 ドメイン	軽鎖FN3 ドメイン
6	70 HC 71 LC	CR5133 PRASA A6 HC-AB	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	抗-LukAB	なし
7	72 HC 73 LC	CR5133 PRASA A6 LC-D HC- AB	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	抗-LukAB	抗-LukD
8	74 HC 75 LC	CR5133 PRASA A6 HC-D	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	抗-LukD	なし

10

20

30

40

構造体 番号	配列 番号	内容	V領域	重鎖	重鎖FN3 ドメイン	軽鎖FN3 ドメイン
9	76 HC 77 LC	CR5133 PRASA A6 HC AB-D	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	抗-LukAB 抗-LukD	なし
10	78 HC 79 LC	CR5133 PRASA A6 HC D-AB	抗 グリコシル化 SDR含有 タンパク質	E223P/ L234V/ L235A (G236- 欠失) S239D/ K326A/ E333A/ H435R/ Y436F	抗-LukD 抗-LukAB	なし

10

20

30

【0201】

実施例6 MA b 5 1 3 3は、黄色ブドウ球菌の異なる株に強く結合するが s d g B 突然変異株には結合しない

m A b 5 1 3 3は、黄色ブドウ球菌の異なる株に結合し、オプソニン活性を有することがこれまでにわかった(米国特許第8,460,666号(Throsby et al.,)) (その全体が、参照によって援用される)。m A b 5 1 3 3の特異性を更に評価するために、黄色ブドウ球菌の異なる株、並びに特定の遺伝子が、配列が確定しているトランスポゾン突然変異体を用いて破壊されたUSA300親JE2株由来の亜株を用いて、ウェスタンブロッティング実験を実施し(Fey et al., 「A Genetic Resource for Rapid and Comprehensive Phenotype Screening of Nonessential Staphylococcus aureus Genes,」 mBio 4(1): e00537-12(2013) (これらはその全体が、参照によって援用される))、これらは、Network on Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus (NARSA) から入手した。

40

【0202】

手順

50

細胞溶解液の調製には、Brady et al., の「Identification of Staphylococcus aureus Proteins Recognized by the Antibody-Mediated Immune Response to a Biofilm Infection」*Infect. Immun.* 74:3415~3426 (2006) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)の調整方法を用いた。黄色ブドウ球菌株を、37、190 rpmで、一晚、トリブチックソイブロス中で培養した。トランスポゾン挿入を行う株については、10 µg/mL エリスロマイシンを培養培地中に含めた。培養液は、新鮮培地で1:100に希釈し、5~6時間培養して、約1.2のOD₆₀₀とした。各株については、培養物4.5 mLを遠心分離し、細胞ペレットを75 µLの溶解バッファ(50 mM Tris-HCl、20 mM MgCl₂及び10 µg/mL リソスタフィン)で再懸濁した。20分間、37 でインキュベーション後、細胞溶解を完了した。その後、溶解産物を6,000 rpm、4 で、20分間遠心分離にかけて、上澄みを新しいチューブに移動させた。ウェスタンブロッティング分析については、各溶解産物12 µLを70 で10分間加熱し(LDSサンプルバッファ及び50 mM DTT)、MOPSバッファ中、150ボルトで2時間、10%ピス-トリスゲル(Novex NuPage, Life Technologies)で電気泳動させた。ゲルは、iBlot instrument (Life Technologies)を使用して、PVDF膜でブロッティングし、FemtoMax kit (Rockland)を用いてCR5133でプローブした。

10

20

30

40

50

【0203】

結果

図5に示すように、溶解液中、高分子量バンド(すなわち、50 kDa超)で検出されたmAb 5133は、黄色ブドウ球菌株ATCC 29213及び親USA 300株JE2から産生した。タンパク質SdrC、SdrD、及びSdrEを含むセリン-アスパラギン酸繰り返し(SDR)を欠失しているNARSA株(レーン3 NE432 (sdrC突然変異体)、レーン4 NE1289 (sdrD突然変異体)、レーン5 NE98 (sdrE突然変異体))では、高分子量バンドもまた検出された。Sortase突然変異体(レーン8 NE1787 (srtA突然変異体)及びプロテインA突然変異体(レーン9 NE286 (プロテインA突然変異体))では不鮮明なバンドが検出された。グリコシルトランスフェラーゼsdgB突然変異体(レーン7 NE105 (sdgB突然変異体))内では、高分子量バンドは検出されなかったが、グリコシルトランスフェラーゼsdgA突然変異体(レーン6 NE381 (sdgA突然変異体))では検出された。

【0204】

まとめ

SDRドメイン内のセリンは、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の連続的添加(最初にsdgB、続いてsdgA)により修飾される。(Hazenbos et al., 「Novel Staphylococcal Glycosyltransferases SdgA and SdgB Mediate Immunogenicity and Protection of Virulence-Associated Cell Wall Proteins」*PLoS Pathog.* 9(10):e1003653 (2013) (その全体が、参照によって本明細書に援用される))。溶解産物中、sdgB変異体から、mAb 5133を有する高分子量バンドが検出されないことは、sdgBによりグリコシル化されたSDRエピトープを認識する5133と一致している。

【0205】

実施例7 融合タンパク質のV8タンパク分解

ヒトIgG1は、下部ヒンジ領域において切断されやすく、この切断により、インビロ及びインビボの両者においてFc媒介エフェクター機能が喪失し得る(Brezski et al., 「Tumor-Associated and Microbial

Proteases Compromise Host IgG Effector Functions by a Single Cleavage Proximal to the Hinge」 PNAS 106:17864~17869(2009)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)。黄色ブドウ球菌プロテアーゼである GluV8 は、下部ヒンジ領域においてアミノ酸 E233 と L234 との間でヒト IgG1 を切断し、この切断により、ADCC 及び CDC 機能の双方を抑止することがこれまでに明らかになっている (Brezski et al., 「Human Anti-IgG1 Hinge Autoantibodies Reconstitute the Effector Functions of Proteolytically Inactivated IgGs」 J. Immunol. 181:3183~3192(2008)(その全体が、参照によって本明細書に援用される)。mAb/FN3 ドメイン構造体を効率良く機能させるためには、双方とも、黄色ブドウ球菌関連抗原に結合可能である必要があり、また、免疫細胞 Fc R または補体に付着させて、ファゴサイトーシスが容易になるようにする。タンパク質分解による切断により、mAb の能力をなくして、免疫エフェクター細胞によるファゴサイトーシスを容易にする。従って、ヒンジ領域を操作して、GluV8 によるタンパク質分解への耐性を増大させた。

【0206】

手順

黄色ブドウ球菌プロテアーゼ GluV8 (cat. E-006) は、BioCentrum から入手した。抗体濃度は、PBS 中 3.3 μM に固定し、反応は 0.66 μM で GluV8 を添加することにより開始し、GluV8 についてはモル比 20% を達成した。消化は、pH 7.5、37 °C で、24 時間実施した。サンプルは、変性条件下で調製し、Agilent 2100 microfluidic 系 Bioanalyzer を用いて分析した。無処置 IgG の割合は、キャピラリー電気泳動による電気泳動図のプロファイルに基づいて、プロテアーゼ消化サンプル中に残存する無処置 IgG の割合をプロテアーゼ非含有対照サンプル中に残存する無処置 IgG の割合で割ることによって、算出した (Agilent Technologies)。データを解析して、GraphPad Prism を使用してプロットした。

【0207】

結果

図 6 に示すように、構造体 IgG1 (IgG1 アイソタイプ対照) 及びヒト IgG1 野生型 (E233/L234/L235/G236) の下部ヒンジを含む A6 (表 5 の構造体 3) は、GluV8 による 24 時間の消化の後でも、15~25% の範囲の無処置 IgG が残存した。構造体 PRASA A6 (表 5 の構造体 4)、及び突然変異を有する下部ヒンジ (G236 欠失を有し、E233P/L234V/L235A) を有する PRASA A6 HC-AB (表 5 の構造体 6) は、24 時間の GluV8 消化の後、70% を超えて、無処置の IgG が残存し、GluV8 に対する耐性の増大を示した。

【0208】

まとめ

これらの結果から、下部ヒンジ領域 IgG1 の突然変異により、GluV8 消化への耐性が増大したことがわかる。更に、重鎖の C 末端で抗 LukAB FN3 ドメインを含んでも、GluV8 切断の感受性に影響を及ぼさなかった。FN3 ドメインを含まない下部ヒンジ突然変異構造体、PRASA A6 (構造体 4) の無処置 IgG の総量は、FN3 ドメインを含有する下部ヒンジ突然変異構造体である PRASA A6 HC-AB (構造体 6) と同様の、無処置の IgG の残存割合を有した。

【0209】

実施例 8 AlphaScreen (登録商標) 競合結合アッセイを使用した Fc 受容体結合測定

抗ブドウ球菌標的構造体が Fc R と結合する能力を評価するために、競合 ALPHA SCREEN (登録商標) アッセイを用いた。構造体は、元々、ヒト Fc R に結合する

ように設計したため、構造体の、ヒト活性化Fc R : Fc RI、Fc RIIa (R131)、及びFc RIIa (V158)、並びに阻害受容体Fc RIIbへの結合能力に関して、構造体の試験を行った。

【0210】

手順

アッセイバッファ(PBS、0.05%BSA、0.01%Tween-20)の入った半量ウェルの96ウェル不透明プレート(Corning)で、pH7.4で競合結合試験を実施した。固定濃度のビオチン化IgG1野生型(1IgG:2ビオチン、EZ Link(登録商標)NHS-LC-biotin(Pierce))を使用して、競合IgG1野生型及び抗ブドウ球菌構造体を連続3倍希釈で、すべての競合試験を実施した。アッセイ中Fc R最終濃度は、0.2µg/mlであった。ビオチン化IgG1(最終0.2µg/ml)並びにIgG1野生型及び抗ブドウ球菌構造体(10µl)を連続して、96ウェルプレートの各列に繰り返して添加した。その後、指定されたFc Rを添加し、その後、1/50希釈ニッケルキレート剤(Ni)受容体ビーズ、及び1/50希釈ストレプトアビジン(SA)供与体ビーズ、それぞれ10µlを連続添加した。不透明プレートは、アルミニウムシールで覆い、遮光条件を維持し、オービタルシェーカーで30分間振盪した。その後、シールを取り外し、AlphaScreen(登録商標)の適切なフィルターセットを装備したENVISION(商標)プレートリーダー(PerkinElmer)で励起/発光スペクトルの蛍光を読み取った。生データをGraphPad PRISM(登録商標)ソフトウェアに移して、最大シグナルに対して正規化し、非線形回帰曲線-フィッティングソフトウェアを使用して、競合曲線をプロットした。競合結合曲線は、次の式を使用して作成した: 最大シグナル(%) = (Exp - Min) / (Max - Min) x 100(%)。式中、試験品mAbの最高濃度の存在下で検出されたシグナルによって最小値(Min)を求め、最大値(Max)は、抗ブドウ球菌構造体のいずれも含まずに、ビオチン化IgG1、Fc R、ニッケルキレート(Ni)受容体ビーズ、及びストレプトアビジン(SA)供与体ビーズのみ含むウェル中で検出されたシグナルによって求めた。

10

20

【0211】

結果

ヒトIgG1野生型を有する受容体の、ヒトFcファミリーへの結合に関する、いくつかの構造体の競合能力を評価した。ビオチン化IgG1野生型により産生された最大シグナルを低減させる構造体の能力を、図7A~図7Dに示す。図7Aに示すとおり、IgG1(IgG1アイソタイプ対照)及びA6(構造体3)は、強固にヒトFc RIを結合した。構造体PRASA A6(構造体4)、PRASA A6 LC-D(構造体5)、PRASA A6 HC-AB(構造体6)、及びPRASA A6 LC-D HC-AB(構造体7)は、任意の試験濃度で、ヒトFc RIに結合を示さなかった。構造体IgG1(IgG1アイソタイプ対照)、A6(構造体3)、PRASA A6(構造体4)、PRASA A6 LC-D(構造体5)、PRASA A6 HC-AB(構造体6)及びPRASA A6 LC-D HC-AB(構造体7)はすべて、ヒトFc RIIa(R131)への類似した結合を示した(図7B)。構造体IgG1(IgG1アイソタイプ対照)及びA6(構造体3)は、阻害性ヒトFc RIIbに対して最も高い結合を示し、構造体PRASA A6(構造体4)、PRASA A6 LC-D(構造体5)、PRASA A6 HC-AB(構造体6)、及びPRASA A6 LC-D HC-AB(構造体7)は、低検出から未検出の結合を示した(図7C)。構造体IgG1(IgG1アイソタイプ対照)、A6(構造体3)、PRASA A6(構造体4)、PRASA A6 LC-D(構造体5)、PRASA A6 HC-AB(構造体6)、及びPRASA A6 LC-D HC-AB(構造体7)はすべて、ヒトFc RIIa(V158)への類似した結合を示した(図7D)。

30

40

【0212】

まとめ

50

下部ヒンジ突然変異 (G 2 3 6 欠失を有し、E 2 3 3 P、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A) を有するいずれの構造体も、ヒト Fc R I への結合を示さず (米国特許公開第 2 0 1 3 / 0 0 1 1 3 8 6 (A 1) 号参照)、重鎖または軽鎖のいずれかの C 末端に FN 3 ドメインのいずれかを含めても、結合に影響を与えなかった。いずれの構造体も、活性化ヒト Fc R I I a (R 1 3 1) と Fc R I I I a (V 1 5 8) へ類似した結合を示し、FN 3 ドメインを含めてもこれらの受容体の結合に影響を及ぼさないことが明らかになった。構造体 P R A S A A 6 (4)、P R A S A A 6 L C - D (5)、P R A S A A 6 H C - A B (6)、及び P R A S A A 6 L C - D H C - A B (7) は、阻害受容体 Fc R I I b への、低検出から未検出の結合を示した。ヒト Fc R I I b との低結合並びに活性化受容体 Fc R I I a 及び Fc R I I I a との正常な結合により、目的の細胞傷害の作用機序を有する m A b s の有効性の増大と考えられる性質である、阻害 (I) に対する活性化 (A) 指数が増大するため、これは利点となり得る (Nimmerjahn and Ravetch 「Divergent Immunoglobulin Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding」 Science 310: 1510 ~ 1512 (2005) (その全体が、参照によって本明細書に援用される))。

10

【0213】

実施例 9 プロテイン A 結合の測定

E L I S A プレート上にコーティングされたプロテイン A への構造体の結合を評価するために、プレート系 E L I S A アッセイを用いた。プロテイン A は、ブドウ球菌毒性因子であり、ヒト I g G 1 野生型抗体は、I g G 1 野生型 Fc への結合を介して、ブドウ球菌の表面上に隔離される。本方法は、抗ブドウ球菌 m A b が抗体 V 領域を介して表面決定基に結合する能力をなくし、かつ同時に宿主免疫系の液性及び細胞性成分と Fc との相互作用を阻止すると考えられる。プロテイン A 結合を除去する意図で、このブドウ球菌毒性因子を回避するために、構造体の遺伝子操作を行った。

20

【0214】

手順

透明 9 6 ウェルプレート (Nunc) で、E L I S A ブロッキングバッファ (3% ウシ血清アルブミン / P B S) において、プロテイン A 結合の直接 E L I S A を実施した。P B S 中、ビオチン化プロテイン A を 2 μ g / ml で、9 6 ウェルプレートに、1 時間室温にてコーティングし、E L I S A 洗浄バッファ (0.02% Tween - 20 / 0.15 M NaCl) で 3 回洗浄した。次にプレートを 1 時間室温で E L I S A ブロッキングバッファを用いてブロックした。次いで、プレートを E L I S A 洗浄バッファで 3 回洗浄した。構造体は、出発濃度 10 μ g / ml でプレートに入れて、次に、プレートで連続して 3 倍に希釈し、1 時間室温でインキュベートした。プレートは、E L I S A 洗浄バッファで 3 回洗浄した。E L I S A ブロッキングバッファで 1 : 15, 000 に希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合させたヤギ抗ヒトカッパ軽鎖抗体 (Millipore) を用いて構造体を検出し、サンプルは 30 分間室温にてインキュベートした。プレートは、E L I S A 洗浄バッファで 5 回洗浄した。本アッセイにおける HRP の基質は TMB (Fitzgerald) であり、ウェルが青色になるまでプレートをインキュベートした。等体積の 0.5 M HCl を TMB に添加することによって反応を停止させて、プレートは、450 nm で読み取った。データは、非線形回帰曲線フィットを用いた Graph Pad Prism ソフトウェアで分析した。

30

40

【0215】

結果

ヒト I g G 1 野生型構造体 (構造体 1) は、プロテイン A との検出可能な結合を示した。CH 3 の突然変異 H 4 3 5 R / Y 4 3 6 F (すなわち、A 6 (構造体 3)、P R A S A A 6 (構造体 4)、P R A S A A 6 L C - D (構造体 5)、P R A S A A 6 H C - A B (構造体 6) 及び、P R A S A A 6 L C - D H C - A B (構造体 7) を含むすべての構造体は、いずれの試験濃度でもプロテイン A への検出可能な結合を示さな

50

った(図8)。

【0216】

まとめ

CH3の突然変異H435R/Y436Fでは、このアッセイで評価したとおり、プロテインA結合が上手く除去された。重鎖または軽鎖のC末端のいずれか一方にFN3ドメインを含めても、プロテインA結合に影響を及ぼすことはなかった。

【0217】

実施例10 フローサイトメトリーによる測定時の全細菌への結合

mAb及びFN3ドメイン-mAbコンジュゲートの黄色ブドウ球菌のNewman株表面への結合は、フローサイトメトリー解析を使用して評価した。黄色ブドウ球菌毒性因子プロテインAは、抗体のFc部分を介してIgG1に結合することができ、分析が混同する可能性もあるため、H435R/Y436F突然変異を有するA6と称す抗体を使用して、ブドウ球菌表面上に発現したプロテインAに対するmAbのFc領域の非特異的結合を取り除いた(実施例9を参照されたい)。このため、A6(構造体3)、PRASA A6(構造体4)及びmAb-FN3ドメインコンジュゲート(それぞれH435R/Y436F突然変異を含む)を比較した。選択された黄色ブドウ球菌株に関して、構造体の結合が少ない/陰性であったため、E233P/L234V/L235A(G236欠失)H435R/Y436F(「PRASA A6アイソタイプ対照」と称される)の定常領域突然変異を含むリポテイコ酸(LTA)特異的V領域を有する構造体を、陰性対照として使用した。

【0218】

手順

黄色ブドウ球菌Newman株は、培養液が、OD600nm約0.5に到達するまで、ブレインハートインヒュージョン(BHI)モディファイド培地中、37、225rpmで振盪して、増殖させた。10%グリセロール(最終)の入った凍結保存バイアルでアリコートをして凍結させた。バイアル瓶を解凍して、連続希釈及びBHI寒天プレート上での増殖によるコロニー形成単位の測定に使用した。フローサイトメトリー分析では、Newman株を 5×10^6 コロニー形成単位/ウェルで播種させて、mAb5133構造体を指示された連続希釈で、30分間、室温にて、FACSバッファ中で、インキュベートした。構造体を検出するためにAlexa647を結合したF(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG(重鎖及び軽鎖)20µg/mlで染色する前に、サンプルをFACSバッファで2回洗浄した。BD Fortessa及びFlowjo softwareを使用してサンプルを分析した。これらの実験は、2回繰り返され、類似した結果となった。

【0219】

結果

図9に示すように、フローサイトメトリー結合により評価するとき、構造体A6(構造体3)、PRASA A6(構造体4)、及びPRASA A6HC-AB(構造体6)は、黄色ブドウ球菌Newman株へ同様に結合した。抗LukD-FN3ドメインを軽鎖に添加することにより、FN3ドメインコンジュゲートを含まない同一の抗体と比較して、構造体PRASA A6 LC-D(構造体5)及びPRASA A6 LC-D HC-AB(構造体7)の結合は、約2~3倍減少した(EC50試験、mAb/EC50 PRASA A6(構造体4)により算出)。

【0220】

まとめ

抗LukABを重鎖に付加することによって黄色ブドウ球菌への抗体の結合に影響を及ぼすことはなかったが、抗LukD-FN3ドメインを軽鎖のC末端に付加することにより、黄色ブドウ球菌Newman株への結合の検出がわずかに減少した(2つの独立した実験においてEC50が2~3倍変動)。

【0221】

実施例11 mAb-FN3ドメインコンジュゲートによる、ロイコトキシン媒介免疫細

胞死滅の中和

mAb - FN3ドメイン5133コンジュゲートの機能性を評価するために、LukED及びLukABの中和の評価に関して記載された、細胞系細胞傷害中和アッセイを用いた。

【0222】

手順

LukED及びLukAB中和活性に関して、mAb - FN3ドメイン5133コンジュゲートをスクリーニングするにあたって、75 nMのLukED及び18.75のnM活性LukAB毒素を、別々に、最終体積30 µl中、増加濃度での、異なるmAb変異体 (IgG1アイソタイプ対照; A6構造体3、PRASA A6構造体4); PRASA A6 LC - D構造体5; PRASA A6 HC - D構造体8; PRASA A6 HC - AB構造体6; PRASA A6 LC - D HC - AB構造体7; PRASA A6 HC AB - D構造体9; 及びPRASA A6 HC D - AB構造体10)と、30分間、氷上でインキュベートした。その後、新たに単離した初代ヒト好中球 (hPMN)、 2×10^5 細胞/RPMI 70 µl + 10 mM HEPES + 0.1% HASを毒素 - mAb混合物に添加し、1時間、37、5% CO₂のインキュベーターでインキュベートした。インキュベーションの1時間後、乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出を観察することにより、膜損傷を測定した。上澄み50 µlを取り出して、50 µlのLDH試薬 (Cytotox - ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega) の入ったウェルに添加し、更に30分間、室温にてインキュベートした。LDH活性は、Perkin Elmer Envision Multilabel Readerを使用して測定し (励起555 nm、発光590 nm)、データは、0.1% v/v Triton - X100により誘導された100%のPMN細胞溶解液に対して正規化した。

【0223】

結果

異なるmAb 5133及びmAb - FN3ドメイン5133コンジュゲートが、LukED及びLukABのヒトPMNに対する細胞傷害活性を中和する能力を評価した。これらの試験から、LukD (PRASA A6 LC - D構造体5及びPRASA A6 HC - D構造体8) または抗LukAB FN3ドメイン (PRASA A6 HC - AB構造体6) を有するFN3ドメイン - mAbコンジュゲートは、FN3ドメインを軽鎖または重鎖に付加するかどうかに関係なく (PRASA A6 LC - D構造体5 対 PRASA A6 HC - D構造体8) (図10A)、それぞれの毒素を中和することができることが判明した。さらに、LukD及びLukAB FN3ドメインの両者のmAb 5133への同時コンジュゲートも (PRASA A6 LC - D HC - AB構造体7、PRASA A6 HC AB - D構造体9、及びPRASA A6 HC D - AB構造体10) (図10A ~ 10B)、それぞれの毒素の強力な中和をもたらした。

【0224】

まとめ

これらの試験から、FN3ドメイン - mAbコンジュゲートのみが、LukED及びLukABによる初代hPMNの死滅を阻止することができるが、IgG1アイソタイプ対照、A6構造体3、またはPRASA A6構造体4 mAbは、これを阻止することはできないことがわかる。まとめると、これらのデータにより、mAb - FN3ドメインコンジュゲートが機能的であり、かつ、強力なブドウ球菌毒素の細胞傷害活性を阻止することができることが確認される。

【0225】

実施例12 ファゴサイトーシス後の、ヒト好中球の黄色ブドウ球菌 - 媒介死滅モデルにおけるmAb - FN3ドメインコンジュゲートの中和効果

ブドウ球菌より産生される二成分毒素のうちLukABは、生きている細菌によるエクスピボ感染中のヒト好中球 (hPMN) の死滅に関与している。ブドウ球菌が産生するL

10

20

30

40

50

ukABは、形質膜またはファゴソーム膜を標的にすることにより、ファゴサイトーシス後にhPMNを死滅させる。mAb-FN3ドメインコンジュゲートが、ファゴサイトーシス後の生存ブドウ球菌のLukABが媒介する死滅からhPMNを保護しているかどうかを評価するために、エクスピボ感染モデルを開発した。

【0226】

手順

ブドウ球菌株Newman(高毒性メチシリン感受性株)を、5時間、1:100/RPMI+CASで継代培養し、10mM HEPES及び0.1% HSAを補充したRPMI(RPMI-HH)中で 1×10^7 CFU/mLに標準化した。標準化した細菌の1mLアリコートは遠心分離によりペレット化し、300 μ lの、異なるmAb5133またはmAb-FN3ドメインコンジュゲート1.5mg/mL、またはPBS(非オプソニン化)に再懸濁した。サンプルをRPMI-HHで最大1mLとし、その後、オプソニン化のために20分間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後、約10:1(細菌:hPMN)の感染効率(MOI)で、EtBrを補充したRPMI-HH中、オプソニン化細菌を、新たに単離した初代hPMN 2×10^5 と混合した。細菌及び細胞は、7分間、1500RPMで遠心分離により同調させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターに入れた。hPMN膜透過性の指標として、2時間感染中、臭化エチジウム蛍光を測定した。

【0227】

結果

異なるmAb5133及びmAb-FN3ドメイン5133コンジュゲートの、ブドウ球菌ファゴサイトーシス後に、hPMNを保護しLukABの細胞傷害活性を中和する能力を評価した。これらの実験により、PBS処理済み細菌(mAbではなく)と比較して、A6構造体3及びPRASA A6構造体4mAbは、黄色ブドウ球菌が媒介する死滅からのhPMNの保護は最小限であることを実証する。その一方で、試験対象のmAb-FN3ドメインコンジュゲート、PRASA A6HC-AB構造体6及びPRASA A6LC-D AB構造体7の両者により、hPMNはファゴサイトーシス後のLukAB媒介膜損傷から保護された。抗LukAB及び抗LukDFN3ドメインを両方含有するコンジュゲートと比較して、抗LukAB-FN3ドメインのみを含有するmAb-FN3ドメインコンジュゲート間で、著しい差異は観察されなかった(図11)。これらの所見は、エクスピボ感染モデルにおいて、LukEDの産生を欠いている点と一致する(DuMont et al., 「Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis」Mol. Microbiol. 79:814~825(2011); Alonzo et al., 「Staphylococcus aureus Leukocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo」Mol. Microbiol. 83:423~435(2012); DuMont et al., 「Staphylococcus aureus Elaborates Leukocidin AB to Mediate Escape From Within Human Neutrophils」, Infect. Immun. 81:1830~1841(2013)(これらはすべて、参照によってその全体が援用される)。

【0228】

まとめ

これらの実験は、ファゴサイトーシス後の、ブドウ球菌LukAB媒介細胞傷害が、mAb-FN3ドメインコンジュゲートにより細胞内から中和されることができていることを確認する。

【0229】

実施例13 黄色ブドウ球菌の好中球-媒介死滅モデルにおけるmAb-FN3ドメイン

コンジュゲートの中和効果

LukABは、ファゴサイトーシス後、hPMNを死滅させ、ブドウ球菌のエスケープ及び増殖を促進する(DuMont et al., 「Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis」Mol. Microbiol. 79:814~825(2011); DuMont et al., 「Staphylococcus aureus Elaborates Leukocidin AB to Mediate Escape From Within Human Neutrophils」, Infect. Immun. 81:1830~1841(2013)、DuMont et al., 「Staphylococcus aureus LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:10794~10799(2013)、(これらはすべて、参照によってその全体が援用される))。LukABを欠失している同質遺伝子型の欠失変異株によるhPMNの感染は、エキスビポOPKアッセイにおいて、LukAB活性を阻止することによって細菌増殖が減少することを示唆した(DuMont et al., 「Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis」Mol. Microbiol. 79:814~825(2011); DuMont et al., 「Staphylococcus aureus Elaborates Leukocidin AB to Mediate Escape From Within Human Neutrophils」, Infect. Immun. 81:1830~1841(2013)、DuMont et al., 「Staphylococcus aureus LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:10794~10799(2013)、(これらはすべて、参照によってその全体が援用される))。LukAB mA b-FN3ドメインコンジュゲートが黄色ブドウ球菌増殖のhPMN媒介制御を促進するかどうかを調査するために、OPKアッセイを実施し、GFP蛍光を測定することによって細菌増殖を観察した。

【0230】

手順

これらの実験では、sarAプロモーターを用いることによって、構成的に緑色蛍光タンパク質(gfp)を発現するプラスミドを含むブドウ球菌株Newman(MSSA)を用いた。GFP標識細菌は、5時間、クロラムフェニコールを補充したRPMI+CASにおいて1:100で継代培養し、10mM HEPES及び0.1%HSAを補充したRPMI(RPMI-HH)中、 1×10^7 CFU/mLに標準化した。標準化したバクテリアの1mLアリコートは遠心分離によりペレット化し、300 μ lの、異なるmA bまたはmA b-FN3ドメインコンジュゲート1.5mg/ml、またはPBS(非オプソニン化)に再懸濁した。サンプルをRPMI-HHで最大1mLとし、その後、オプソニン化のために20分間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後、約10:1(細菌:hPMN)の感染効率(MOI)にて、RPMI-HH中、オプソニン化細菌を、新たに単離した初代hPMN 2×10^5 と混合した。細菌及び細胞は、7分間、1500RPMで遠心分離により同調させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターに入れた。細菌増殖の指標として、感染の5時間後、GFP蛍光を測定した。

【0231】

結果

異なるmA b 5133及びmA b-FN3ドメイン5133コンジュゲートの、hPM

Nが媒介するブドウ球菌の増殖制限を促進する能力を評価した。これらの実験により、IgG1アイソタイプ対照と比較して、A6構造体3及びPRASA A6構造体4の両者が、hPMNが媒介する黄色ブドウ球菌増殖の制限を促進することを示す(図12)。これは、5133mAbのオプソニン能力と一致する。重要なことに、PRASA A6親mAb(構造体4)と比較して、LukAB FN3ドメイン-mAb5133コンジュゲート(PRASA A6 HC-AB構造体6及びPRASA A6 LC-D HC-AB構造体7)により、PMNが媒介する増殖制限が改善された(図12)。CR5133/抗LukD FN3ドメイン-mAb(PRASA A6 LC-D構造体5)により増殖制限が強化されない点は、エキスビオ感染モデル中、LukED生成物が最小であるこれまでの所見と一致する(DuMont et al., 「Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to Staphylococcus aureus Pathogenesis」Mol. Microbiol. 79:814~825(2011); Alonzo et al., 「Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo」Mol. Microbiol. 83:423~435(2012); DuMont et al., 「Staphylococcus aureus Elaborates Leukocidin AB to Mediate Escape From Within Human Neutrophils」, Infect. Immun. 81:1830~1841(2013)(これらはすべて、参照によってその全体が援用される)。

【0232】

まとめ

これらの実験は、抗LukAB mAb-FN3ドメインコンジュゲートが、LukABを中和し、hPMNが媒介するブドウ球菌の増殖制限を促進することを確証する。

【0233】

実施例14:黄色ブドウ球菌細胞溶解液による、Ni-NTA樹脂-結合SdrC4タンパク質のインビトログリコシル化により、mAb5133によって認識されるエピトープとなる

SDR含有タンパク質のSdgB媒介グリコシル化によって、mAb5133によって認識される特異的エピトープの産生がもたらされることを更に確認するために、異なる黄色ブドウ球菌株から調製された細胞溶解液及びSDS-PAGEによって単離され、ウェスタンブロッティング分析により分析された反応生成物を使用して、代表的SDRタンパク質(大腸菌から精製された組換え型SdrC4タンパク質)のインビトログリコシル化が行われた。これらの試験には、sdgAまたはsdgBグリコシルトランスフェラーゼのいずれかを不活性化するトランスポゾンの挿入と共に、USA300親JE2黄色ブドウ球菌株及び突然変異体を使用し(Fey et al., 「A Genetic Resource for Rapid and Comprehensive Phenotype Screening of Nonessential Staphylococcus aureus Genes」, mBio 4(1):e00537~12(2013))(これらはその全体が、参照によって援用される)、これらは、Network on Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus(NARSA)から入手した。

【0234】

手順

溶解産物は、黄色ブドウ球菌株JE2、NE381(JE2のsdgAトランスポゾン突然変異体)及びNE105(JE2のsdgBトランスポゾン突然変異体)から調製した。これらの菌株の25mL培養液をトリプチックソイブロス(TSB)中、37、200rpmで増殖させ、OD₆₀₀ 0.4~0.6の時点で、細胞を遠心分離(6,0

00rpm10分間)により採取した。細胞ペレットは、200 μ gリソスタフィン及びUniversalヌクレアーゼ(Pierce88700)250ユニットを含有する1mL PBS(Sigma L9043)で再懸濁した。細胞は、37 $^{\circ}$ Cで45分間インキュベートし、その後13,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで、10分間遠心分離した。上澄み750 μ Lを別のチューブに入れ、氷上に置いた。大腸菌から精製された組換え型SdrC4タンパク質を、Ni-NTAアガロース(Qiagen 1018244)に結合させた。具体的には、Ni-NTAアガロース100 μ Lをマイクロチューブに入れ、遠心分離して、プロテアーゼインヒビター(Roche、完全にEDTA非含有)を含有する500 μ LのPBSで1回洗浄した。その後、樹脂を、約300 μ gのタンパク質と再懸濁し、ロッキングプラットフォーム上で、4 $^{\circ}$ Cで1.5時間、インキュベートした。その後、樹脂を12,000rpmで1分間遠心分離して、500 μ Lの洗浄バッファ(50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、10mM イミダゾール、pH8.0、ブラス、プロテアーゼインヒビター)で1回洗浄した。その後、樹脂を、300 μ LのPBSまたは黄色ブドウ球菌溶解産物のいずれかで再懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。1時間後、サンプルを遠心分離して、500 μ Lの洗浄バッファで3回洗浄し、結合したタンパク質を150 μ L溶出バッファ(250mMイミダゾール含有洗浄バッファ)で、5分間、室温にて溶出した。

10

【0235】

ウェスタンブロットング分析については、溶出したタンパク質を、100mM DTT含有1xLDSサンプルバッファ(Life Technologies NP0007)中、70 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、その後、MOPSバッファ中、150ボルトで、1時間40分、2つの10%ビス-トリスNuPAGEゲルで電気泳動させた。電気泳動後、1つのゲルをコロイドブルー(Life Technologies 46-7015及び46-7016)で染色し、他のゲルは、iBlot instrumentを使用して、PVDF膜(Life Technologies IB401002)にブロットングした。PVDFブロットを、1:500希釈したmAb5133でプローブし、その後、FemtoMax kit(Rockland Immunochemicals KCA001)を使用して検出した。

20

【0236】

結果

図13に示すとおり、黄色ブドウ球菌株JE2から調製した溶解産物と共に樹脂結合SdrC4タンパク質をインキュベートしたもの(パネルB、レーン2及び6)、及びさなければ同質遺伝子型のsdgA突然変異誘導体(パネルB、レーン3及び7)により、mAb5133を用いるウェスタンブロットによって特定の約95kDa種が検出された。対照的に、樹脂結合SdrC4タンパク質を、黄色ブドウ球菌株JE2のsdgB変異誘導体から調製された溶解産物とインキュベーションしたもの(パネルB、レーン4及び8)、または細胞可溶化物がPBSに置換された対照サンプル(パネルB、レーン1及び5)では、mAb5133によるこうしたタンパク質バンドはいずれも検出されていない。図13、パネルAに示されたコロイドブルー染色から、本質的に等価量の組換え型SdrC4タンパク質がレーン1~4及びレーン5~8に入ったことがわかる。

30

40

【0237】

まとめ

JE2株のsdgB突然変異体から調製した溶解産物によるカラム結合SdrC4タンパク質のインキュベート後、mAb5133により約95kDaタンパク質バンドが検出されないということは、sdgBがSdrCタンパク質に関して特異的なグリコシルトランスフェラーゼであり、mAb5133のエピトープの作製に必要であるという主張を更に裏付ける。

【0238】

実施例15:精製sdgBグリコシルトランスフェラーゼタンパク質によるSdrC4またはSdrC5タンパク質のインビトログリコシル化により、mAb5133により認識

50

されるエピトープが発生する

S d g B が媒介する S D R 含有タンパク質のグリコシル化により、m A b 5 1 3 3 により認識される特定のエピトープが作製されることを更に確認するために、黄色ブドウ球菌 S d g B グリコシルトランスフェラーゼの組換え形態、および S D S - P A G E によって分離しウェスタンブロットング分析により分析した反応生成物を使用して、代表的 S D R タンパク質 (S d r C 4 または S d r C 5) のインビトログリコシル化を行った。

【 0 2 3 9 】

手順

C 末端にポリヒスチジン (H i s)₆ アフィニティタグ (配列番号 9 9) を担持する黄色ブドウ球菌 S d g B グリコシルトランスフェラーゼの組換え形態を、大腸菌中で発現させ、N i - N T A アフィニティークロマトグラフィーを介して精製した。インビトログリコシル化反応に関しては、組換え型 S d r C 4 (配列番号 1 0 0) または S d r C 5 (配列番号 1 0 1) タンパク質 1 0 0 μ g を、ウリジンニリン酸 N - アセチルグルコサミン (U D P - G l c N a c) + / - 3 0 μ g 、組換え型 S d g B + / - 4 μ g と、最終体積 1 0 0 μ l の 1 0 0 m M トリス p H 7 . 5 、または 1 0 0 μ l の 1 0 0 m M トリス p H 7 . 5 、プラス、1 0 % グリセロールで、3 7 ° C にて 1 時間でインキュベートした。ウェスタンブロットング分析では、まず、反応生成物を S D S - P A G E によって分け、ここでは、1 μ g タンパク質 / レーンを、Nu P A G E 4 ~ 1 2 % ビス - トリスゲル (N P 0 3 3 5 B O X) で、ダイフロンがゲル底部に到達するまで 2 0 0 V の定電圧で分離した。その後、Invitrogen i B l o t を用いて、P V D F 膜にタンパク質 (T r a n s f e r i B l o t G e l T r a n s f e r S t a c k s P V D F I B 4 0 1 0 0 2) に移動させた。

【 0 2 4 0 】

図 1 4 A 、パネル A では、一次抗体は、P B S + 3 % B S A 中の、2 μ g / m l の構造体 3 (m A b 5 1 3 3 A 6 、配列番号 6 4 H C 及び 6 5 L C) であり、二次検出抗体は、P B S + 3 % B S A で 1 : 1 0 , 0 0 0 希釈した、H R P - コンジュゲートヤギ抗ヒト I g G (H + L) (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h (1 0 9 - 0 3 6 - 0 8 8 ロット 1 0 1 4 2 1)) を用いるウェスタンブロットングであった。H R P 化学発光基質検出溶液 (P i e r c e E C L P l u s) 中でインキュベート後、プロットを X 線フィルムに曝露した。図 1 4 A 、パネル B では、抗 H i s タグ検出用の一次抗体は、P B S + 3 % B S A 中、1 : 2 0 0 0 希釈された H R P コンジュゲート抗 6 x ヒスチジン m A b (M A B 0 5 0 H l o t E G E 0 6 0 8 0 4 1 , R & D S y s t e m s) であり、その後、X 線フィルムを介して検出された。

【 0 2 4 1 】

図 1 4 B 、パネル A では、一次抗体は、P B S + 3 % B S A 中の、2 μ g / m l の構造体 3 (m A b 5 1 3 3 A 6 、配列番号 6 4 H C 及び 6 5 L C) であり、二次検出抗体は、P B S + 3 % B S A で 1 : 1 0 , 0 0 0 希釈した、H R P - コンジュゲートヤギ抗ヒト I g G (H + L) (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h (1 0 9 - 0 3 6 - 0 8 8 ロット 1 0 1 4 2 1)) を用いるウェスタンブロットングであった。H R P 化学発光基質検出溶液 (P i e r c e E C L P l u s) 中でインキュベート後、プロットを X 線フィルムに曝露した。プロットは、その後、T h e r m o S c i e n t i f i c R e s t o r e W e s t e r n s t r i p p i n g b u f f e r を用いてストリッピングし、その後、抗 - H i s 検出は、P B S + 3 % B S A 中、1 : 2 0 0 0 希釈された H R P コンジュゲート抗 6 x ヒスチジン m A b (M A B 0 5 0 H l o t E G E 0 6 0 8 0 4 1 , R & D S y s t e m s) を用いて行い、その後、X 線フィルムを介して検出した (図 1 4 B 、パネル B) 。

【 0 2 4 2 】

図 1 4 C 、パネル A では、一次抗体は、R o c k l a n d f l u o r e s c e n t w e s t e r n b l o c k i n g b u f f e r (M B - 0 7 0) 中の、2 μ g / m l の構造体 1 (m A b 5 1 3 3 、配列番号 6 0 H C 及び 6 1 L C) であった。二次検出は

、IRDye 800CWヤギ抗ヒトIgG (H+L) Li-cor 926-32232を用いて、Odyssey InfraRed imagerで検出した。図14C、パネルBでは、抗-His検出は、PBS+3%BSA中、1:2000希釈されたHRPコンジュゲート抗6xヒスチジンmAb (MAB050H lot EGE0608041, R&D Systems)を用いて行い、その後、X線フィルムを介して検出した。

【0243】

結果

図14A、14B、及び14Cに示すとおり、SdgB及びUDP-GlcNAcの両者の存在下での、大腸菌から精製された組換え型SdrC4またはSdrC5タンパク質のインキュベーションにより、構造体1 (mAb5133、配列番号60HC及び61LC) 及び構造体3 (mAb5133 A6、配列番号64HC及び65LC) によって検出される種が作製される。すべてのレーン中でのSdrC4及びSdrC5構造体の(His)₆エピトープの検出により、ほぼ等量のタンパク質が存在することが確認される。

【0244】

まとめ

これらの結果により、SdgBが媒介するグリコシル化の後、mAb5133のみが、SDRファミリータンパク質を検出するという、これまでの観測結果が更に実証される。

【0245】

実施例16:mAb5133は、黄色ブドウ球菌リポテイコ酸(LTA)に特異的に結合しない

黄色ブドウ球菌のリポテイコ酸(LTA)は、これまで、mAb5133の細胞標的として同定されてきた(米国特許第8,460,666号(Throsby et al.,)) (その全体が、参照によって援用される)。これが本当であるかを判断するために、mAb5133の、黄色ブドウ球菌表面結合LTA、及び組換え型SdgB-グリコシル化SdrC4タンパク質への相対的な結合を、平行ELISA形式のアッセイで判定した。LTA結合の陽性対照として、pagibaximab(配列番号102HC+配列番号103LC)、よく特性決定された抗LTA mAb(Ginsburg I., 「Role of Lipoteichoic Acid in Infection and Inflammation,」 Lancet Infect. Dis. 2(3):171~9(2002); Weisman et al., 「Safety and Pharmacokinetics of a Chimerized Anti-Lipoteichoic Acid Monoclonal Antibody in Healthy Adults」 International Immunopharmacol. 9:639~644(2009) (その全体が、参照として本明細書に援用される)が挙げられる。SdgB-グリコシル化SdrC4タンパク質およびLTAの両者の結合に関する陰性対照として、呼吸器合胞体ウイルスF(RSV-F)糖タンパク質を特異的に標的にするmAbであるCNT03930(配列番号104HC+配列番号105LC)もまた挙げられる。

【0246】

手順

高結合96ウェルELISAプレート(Nunc)を、SdgB-グリコシル化組換え型SdrC4タンパク質または黄色ブドウ球菌リポテイコ酸(LTA)(L2515、Sigma)のいずれかで、PBS中5µg/mLでコーティングし、一晚、4℃でインキュベートした。プレートは、ELISA洗浄バッファ(0.15M NaCl、0.02% Tween-20)で3回洗浄し、ブロッキングバッファ(Superblock Thermo 37515)で、1時間、周囲温度にてブロックした。別の希釈用プレートで、3%BSA-PBSブロッキングバッファ中、抗体を、10µg/mLで開始して連続して3倍希釈した。ELISAプレートは、ELISA洗浄バッファで3回洗浄し、抗体希釈物は、希釈プレートからELISAプレートに移動させて、1時間、周囲温度に

10

20

30

40

50

てインキュベートした。ELISAプレートを、ELISA洗浄バッファで3回洗浄し、二次ヤギ抗ヒトFc 特異的HRP (Jackson ImmunoResearch 109-035-098) をブロッキングバッファ中1:15,000で希釈してプレートに添加した。プレートは、1時間、周囲温度にて二次抗体でインキュベートし、その後、ELISA洗浄バッファで5回洗浄した。次に、TMB基質 (Fitzgerald) をプレートに添加し、約4分発色させて、その後、0.5M HClを添加して反応を停止させた。吸光度は、450nmにてSpectraMax M5 Microplate Readerで読み取った。データは、GraphPad Prismを使用して解析した。値を、ログスケールに変換して、非線形回帰S字用量反応式を用いてフィットさせ、各抗原に対する各抗体に関して、11の点を有する曲線がもたらされる。

10

【0247】

結果

図15、パネルAに示すように、mAb5133は、SdgB-グリコシル化SdrC4タンパク質への強力な及び濃度依存性結合を示す。対照的に、SdgB-グリコシル化SdrC4タンパク質への結合は、pagibaximabまたはCNTO3930のどちらでも、検出されていない。図15、パネルBでは、各被験物質と精製黄色ブドウ球菌LTAとの相対的な結合を示し、予想されたとおり、pagibaximabは強力かつ濃縮依存性結合を示した。対照的に、CNTO3930またはmAb5133ではそれぞれ、LTAへの結合が検出されないか、または非常に弱い結合が検出される。mAb5133の黄色ブドウ球菌LTAへの明らかに弱い結合は、未変性SDRタンパク質のLTA調製物への混入が原因となる可能性があり、LTAの調製物には、多くの場合、宿主タンパク質が混入していることが周知である (Silvestri et al., 「Purification of lipoteichoic acids by using phosphatidyl choline vesicles」 *Infection and Immunity* 22(1):107~118 (1978) (その全体が、参照によって本明細書に援用される))。

20

【0248】

まとめ

これらの結果から、mAb5133は、SdgB-グリコシル化SDRファミリータンパク質を認識し、LTAを認識しないことが示唆される。

30

【0249】

実施例17: mAb5133、並びにPRASA及び/またはA6の突然変異担持変異体は、ヒト及びマウスFcRn受容体への結合を保持する

PRASA及びA6の突然変異が、抗体のインビボ半減期の決定において重要な役割を担うFcRn受容体との結合を著しく妨げないことを示すために (Kuo & Aveson, 「Neonatal Fc Receptor and IgG-Based Therapeutics」 *mAbs* 3(5):422~30 (2011) (その全体が、参照によって本明細書に援用される))、ELISA型競合結合アッセイでの、精製したヒト及び/またはマウスFcRn受容体への結合に関して、mAb5133、並びにPRASA及び/またはA6の突然変異を担持する変異体の試験を行った (Kinder et al., 「Engineered Protease-Resistant Antibodies With Selectable Cell-Killing Functions」 *J. Biol. Chem.* 288:30843~30854 (2013)、(すべての目的において、その全体が、参照によって援用される))。

40

【0250】

手順

使用した被験物質は、mAb5133 (配列番号60HC及び61LC)、mAb5133 PRASA (配列番号62HC及び63LC)、mAb5133 A6 (配列番号64HC及び65LC)、及びmAb5133 PRASA A6 (配列番号66HC及び67LC)であった。競合mAbとして、CNTO3929 (配列番号106 HC

50

及び107 LC)、ヒトIgG1抗体標的呼吸器合胞体ウイルスF(RSV-F)糖タンパク質を用いた。競合的結合アッセイを使用して、ヒトまたはマウスFcRn-His₆の組換え形態に対する異なる被験物質の相対的なアフィニティを評価した(FcRnの膜貫通及び細胞質ドメインは、ポリヒスチジンアフィニティタグにより置き換えられた)。これらのアッセイで使用する前に、被験物質及びCNTO 3929は、MESバッファ(0.05M MES、pH6.0)で、一晚、4で透析した。96ウェルの銅コーティングプレート(Thermo Scientific)を使用して、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中、5µg/mLでFcRn-His₆を捕捉し、そのプレートを0.15M NaCl、0.02% Tween 20、pH約5で洗浄し、その後、ブロッキング試薬(0.05M MES、0.025% BSA、0.001% Tween 20、pH 6.0、プラス、10% ChemiBLOCKER (Millipore))でインキュベートした。プレートは、前述のとおり洗浄し、その後、ブロッキング試薬中で競合試験抗体を連続希釈し、固定濃度1µg/mLのCNTO 3929のビオチン化調製物の存在下で、プレートに添加した。プレートを室温で、1時間インキュベートし、前述のとおり3回洗浄し、その後、1:10,000希釈ストレプトアビジン-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories)で、室温にて、30分間インキュベートした。プレートは、上記のとおり5回洗浄し、結合ストレプトアビジン-HRPは、3,3,5,5-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質を添加することにより、Stable Stop (Fitzgerald Industries International)で検出し、4分間インキュベートした。発色は、0.5M HClを添加することにより停止させた。光学密度は、SpectraMax Plus 384 plate reader (Molecular Devices)を用いて波長450nmで測定した。データは、GraphPad Prism v5を用いて、S字用量応答曲線にフィッティングした。

【0251】

結果

図16(パネルA)に示すように、PRASA及びノまたはA6に突然変異を担持するmAb5133は、このインビトロ競合的結合アッセイ(pH6.0で実施)において用いられる条件下にて、ヒトFcRn受容体への区別不能な結合を示す。同様に、図16(パネルB)に示すとおり、PRASA及びA6の両方に突然変異を担持するmAb5133変異体は、このインビトロ競合的結合アッセイにおいて用いられる条件下にて、mAb5133のものとはほぼ同一であるマウスFcRn受容体への結合を示す。

【0252】

まとめ

PRASA及びA6の突然変異を、単独でまたは組合わせて導入した場合、mAb5133変異体の、インビトロでのヒトまたはマウスFcRn受容体に対するアフィニティへの影響は、検出されずとも最小である。

【0253】

実施例18: PRASA及びノまたはA6に突然変異を担持する融合タンパク質は、ヒトFcRn受容体への結合を保持する

mAb-FN3ドメイン融合タンパク質の文脈において、PRASA及びA6変異体が、FcRn受容体の結合を有意に妨げないことを示すために、一連の、PRASA及びノまたはA6に突然変異を担持する融合タンパク質について、ELISA型競合結合アッセイで、精製ヒトFcRn受容体への結合に関して、試験を行った(Kinder et al., 「Engineered Protease-Resistant Antibodies With Selectable Cell-Killing Functions」J. Biol. Chem. 288:30843-30854(2013)(その全体が、参照によって本明細書に援用される))。

【0254】

手順

10

20

30

40

50

使用した被験物質は、mAb5133 PRASA A6 (配列番号66 HC及び67 LC)、mAb5133 PRASA A6 HC LukAB (配列番号70 HC及び71 LC)、mAb5133 PRASA A6 HC LukD (配列番号74 HC及び75 LC)、mAb5133 PRASA A6 HC LukD HC LukAB (配列番号78 HC及び79 LC)及びmAb5133 PRASA A6 HC LukAB HC LukD (配列番号76 HC及び77 LC)であった。競合mAbとして、CNT03929 (配列番号106 HC及び107 LC)、ヒトIgG1抗体標的呼吸器合胞体ウイルスF (RSV-F)糖タンパク質を用いた。競合的結合アッセイを使用して、組換え形態であるヒトFcRn-His₆ (FcRnの膜貫通及び細胞質ドメインが、ポリヒスチジンアフィニティタグにより置き換えられたもの)に対する、異なる被験物質の相対的なアフィニティを評価した。これらのアッセイで使用する前に、被験物質は、MESバッファ(0.05M MES、pH6.0)で、一晚、4で透析した。96ウェルの銅コーティングプレート(Thermo Scientific)を使用して、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中、5µg/mLでFcRn-His₆を捕捉し、その後、プレートを0.15M NaCl、0.02% Tween 20、pH約5で洗浄し、その後、ブロッキング試薬(0.05M MES、0.025% BSA、0.001% Tween 20、pH6.0、プラス、10% ChemiBLOCKER (Millipore))でインキュベートした。プレートは、前述のとおり洗浄し、その後、ブロッキング試薬中で競合試験抗体を連続希釈し、固定濃度1µg/mLのCNT03929のビオチン化調製物の存在下で、プレートに添加した。プレートを室温で、1時間インキュベートし、前述のとおり3回洗浄し、その後、1:10,000希釈ストレプトアビジン-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories)で、室温にて、30分間インキュベートした。プレートは、上記のとおり5回洗浄し、結合ストレプトアビジン-HRPは、3,3,5,5-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質を添加することにより、Stable Stop (Fitzgerald Industries International)で検出し、4分間インキュベートした。発色は、0.5M HClを添加することにより停止した。光学密度は、SpectraMax Plus 384 plate reader (Molecular Devices)を用いて波長450nmで測定した。データは、GraphPad Prism v5を用いて、S字用量応答曲線に対してフィッティングした。

【0255】

結果

図17に示すように、抗LukD及び/または抗LukAB FN3ドメインが重鎖に結合したmAb5133 PRASA A6系融合タンパク質は、ヒトFcRn受容体への結合を示すが、このインビトロ競合的結合アッセイ(pH6.0にて実施)において用いられる条件下では、親mAb(mAb5133 PRASA A6)と比較して、融合タンパク質に関しては若干弱い結合が観察された。

【0256】

まとめ

PRASA及びA6突然変異の導入は、インビトロでのヒトFcRn受容体に対するmAb5133系融合タンパク質のアフィニティに最小の影響を有する。

【0257】

実施例19: A6突然変異を担持するmAb1533の変異体は、黄色ブドウ球菌IgG結合タンパク質、プロテインA、またはSbiのいずれにも関与することはできない

黄色ブドウ球菌は、2つの公知の免疫グロブリン結合タンパク質である、プロテインA (Foster T. J., 「Immune Evasion by Staphylococci」Nature Reviews Microbiology 3: 948~958 (2005)を参照されたい(その全体が、参照によって本明細書に援用される))、及び免疫グロブリンの第2の結合タンパク質(Sbi) (Zhang et al

10

20

30

40

50

、 「A Second IgG-Binding Protein in Staphylococcus aureus」 *Microbiology* 144:985~991 (1998) (その全体が、参照によって本明細書に援用される) を発現し、これらは、それぞれ、細胞表面に固定された形態または分泌形態で提示され (Smith et al., 「The Immune Evasion Protein Sbi of Staphylococcus aureus Occurs Both Extracellularly and Anchored to the Cell Envelope by Binding to Lipoteichoic Acid」 *Mol. Microbiol.* 83:789~804 (2012); Becker et al., 「Release of Protein A From the Cell Wall of Staphylococcus aureus」 *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 111(4):1574~9 (2014) (これによって、その全体が参照によって援用される))、IgGタンパク質のFc領域への結合に關与する保存らせん体の対を共有する (Atkins et al., 「S. aureus IgG-binding Proteins SpA and Sbi: Host Specificity and mechanisms of Immune Complex Formation」 *Mol. Immunol.* 45:1600~1611 (2008) (これによって、その全体が参考として本明細書に援用される))。A6突然変異を担持するmAb5133変異体が、黄色ブドウ球菌免疫グロブリン結合タンパク質のいずれか一方に關与することはできないことを更に示すために、プロテインA及びSbiの両者のうちいずれか一方を発現する、またはこれらの2つのタンパク質のうち一方のみを発現する、一連の株から調製された溶解産物のウェスタンブロットティング分析。

【0258】

手順

ウェスタン分析に使用した被験物質は、mAb5133 (配列番号60HC及び61LC)、mAb5133 A6 (配列番号64HC及び65LC) 及びmAb5133 PRASA A6 (配列番号66HC及び67LC) であった。溶解産物は、黄色ブドウ球菌JE2株 (Fey et al., 「A Genetic Resource for Rapid and Comprehensive Phenotype Screening of Nonessential Staphylococcus aureus Genes」 *MBio.* 4:e00537~12 (2013) (その全体が、参照によって本明細書に援用される)) 及びNewman株 (Baba et al., 「Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands」 *J. Bacteriol.* 190(1):300~10 (2008) (これらはその全体が、参照によって援用される)) (なおこれらは両株とも、プロテインA及びSbiの両者の発現に関して野生型である) 、JE2から誘導されたNE286株 (JE2の、spaトランスポゾン挿入突然変異体) 、およびNE453株 (JE2の、sbiトランスポゾン挿入突然変異体) 、並びにWood 46 (プロテインAの発現のないことが公知の株 (Forsgen et al., 「Lymphocyte Stimulation by Protein A of Staphylococcus aureus」 *Eur. J. Immunol.* 6:207 (1976); Ringden et al., 「Activation of Human B and T Lymphocytes by Protein A of Staphylococcus aureus」 *Eur. J. Immunol.* 8:47 (1978) (これによって、その全体が参照によって援用される)) から調製された。要約すると、これらの株の培養物をTryptic Soy Broth (TSB) 中、37、200rpmで増

殖させ、1 mL 培養液を一晩増殖させた後、6,000 rpmで10分間遠心分離し、細胞を採取した。細胞ペレットを1 mL リソスタフィンバッファ(50 mM Tris、pH 8.0、20 mM MgCl₂、1 μg/mL リソスタフィン(Sigma L-9043))に再懸濁した。ウェスタン分析では、各サンプル約30 μlを約10 μlの4x NuPAGE LDS サンプルバッファ(Invitrogen NP0007)と混合し、4~12%勾配のNuPAGEゲルで電気泳動した。ゲルをPVDF膜に移動させて、その後、PBS/3%ミルク溶液で1時間ブロックした。ウェスタンで検出する被験物質は、Rockland 蛍光ウェスタンブロッキングバッファ中2 μg/mLで、プロットとインキュベートし、室温にて(2時間以上)穏やかに攪拌し、1XPBS 0.5%(各洗浄10分)で4回洗浄した。その後、プロットを1時間、室温にて二次抗体(ヤギ抗ヒトIgG(H+L)Li-co-IRDye(1:10,000))でインキュベートし、その後、1XPBS 0.5%中で4回洗浄した(各洗浄10分)。洗浄後、Odyssey Infraread imagerを使用して、ウェスタンプロットング膜を画像化した。

10

【0259】

結果

図18A、パネルAに示すとおり、mAb 5133は、すべての試験対照の株において、セリン-アスパラギン酸繰り返し(SDR)タンパク質族メンバーのグリコシル化形態に相当する一連のタンパク質(標識C)を検出する。株JE2(レーン1)については、約55 kDa及び48 kDaで移動しているバンドは、それぞれ、プロテインA及びSbiタンパク質に対応するmAb 5133により検出される。予想通り、約48 kDa Sbiタンパク質のみが、プロテインAの発現を欠く2つの株(JE2NE286(レーン2)及びWood 46株(レーン4))から調製した溶解産物中、mAb 5133により検出される。対照的に、約55 kDa プロテインAバンドは、Sbiタンパク質(NE453(レーン3))の発現を欠く株から調製した溶解産物中、mAb 5133により検出される。図18B、パネルBに示すように、プロテインAまたはSbiタンパク質のいずれか一方に対応するバンドは、これらの同じ溶解産物中ではmAb 5133 A6被験物質によって検出されることはなく、A6突然変異により、双方のタンパク質への結合が消失するとの概念を裏付けている。同様に、図18B、パネルCに示すとおり、mAb 5133 PRASA A6被験物質は、黄色ブドウ球菌株Newmanまたはこれらのタンパク質の両方を発現するJE2から調製された溶解産物中で、プロテインAまたはSbiタンパク質のいずれも検出することができない。

20

30

【0260】

まとめ

これらの結果から、A6突然変異を担持するmAb 5133変異体は、黄色ブドウ球菌の免疫グロブリン結合タンパク質、プロテインA、またはSbiのいずれにも関与することはできないことが示され、一連の、A6突然変異を担持する被験物質に関して、プロテインAへの結合が検出されないという、ELISA型アッセイによるこれまでの観察結果(実施例9、図8)を裏付けた。

40

【0261】

実施例20: FN3ドメインによる、-ヘモリシンHlgAB及びHlgCB及びパントン-バレンタインロイコチジン(PVL)の結合及び中和

FN3ドメインのサブセットが、複数のロイコトキシンへの結合または複数のロイコトキシンの中和を示すことができることを示すために、-ヘモリシンHlgAB及びHlgCB及びパントン-バレンタインロイコチジン(PVL)を用いて、一連の試験を行った。

【0262】

手順

これらの試験に含まれる被験物質としては、Luk129(配列番号151)、Luk151(配列番号163)、Luk188(配列番号185)、Luk357(配列番号

50

339)、Luk540(配列番号424)及び、Luk647(配列番号526)の組換え型精製ポリヒスチジン標識型が挙げられる。FN3ドメインの精製組換え型ロイコトキシンへの結合は、ELISAによって判定した。要約すると、5 μ g/mLストレプトアビジン/PBS溶液100 μ lを、96ウェルWhite Maxisorp plate(Nunc-cat#436110)の各ウェルに入れ、一晚、4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後、ウェルをTBST(50 mM Tris HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、0.1% Tween 20)で3回洗浄して、Starting Block T20(Pierce cat# 37543)を用いて300 μ L/ウェルでブロックし、45分~60分、室温(RT)でインキュベートした。その後、プレートをTBSTで3回洗浄し、ロイコトキシン標的抗原(100 μ L中)のビオチン化型0.2 μ gを各試験ウェルに入れ、プレートは、45~60分、室温にて、穏やかに振盪させてインキュベートした。その後、プレートをTBSTで3回洗浄した。被験物質は、Starting Block T20中1 μ Mに希釈して、100 μ Lを試験ウェルに入れ、プレートは、45~60分、室温にて、穏やかに振盪させてインキュベートした。その後、プレートをTBSTで3回洗浄した。結合した被験物質の検出に関しては、Starting block T20中、1:5000希釈ポリクローナル抗FN3-HRP抗体100 μ L/ウェルを入れ、プレートは、45~60分間、室温にて穏やかに振盪しながらインキュベートした。その後、プレートをTBSTで3回洗浄した。結合した抗FN3-HRP抗体を検出するにあたって、プレートを読取る直前に、POD化学発光基質(Roche-cat# 11582950001)を100 μ l/ウェル入れ、基質を加えて15分以内に、ParadigmまたはEnvision readerを使用してプレートの読取りを行った。

【0263】

ロイコトキシン中和試験では、Fn3ドメイン被験物質(ウェルあたり4 μ g/400 μ g/mLを、10 μ l)は、精製組換え型ロイコトキシンと、30分間、4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。新たに単離した初代ヒト好中球(hPMN、200,000細胞/RPMI+10mM HEPES+0.1% HSA)を、毒素及びFN3ドメインタンパク質の混合物に添加して、最終体積100 μ lとした。その後、臭化エチジウムを最終希釈1:2000にて細胞に添加し、毒素添加後、30~60分、プレートの読取りを行った。CO₂インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで1時間、毒素と接触させた後、プレートを1500RPMで10分間遠心沈殿させた後に、上澄み25 μ lを注意深く新しいプレートに移した。Cell Titer 試薬(Promega)を残存細胞に添加し、1.5時間インキュベートした。上澄み25 μ lは、損傷膜を有する細胞からの乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を迅速に測定するための同量のCytotox-ONE(登録商標)Assay試薬(Promega)と混合した。培養培地へのLDHの放出を、レザズリンが変化して蛍光レゾルフィン生成物となる10分連結酵素アッセイで測定した。中和実験については、精製組換え型ロイコトキシンの次の濃度を使用した: HlgAB 1.25 μ g/mL、HlgCB 0.63 μ g/mL及びPVL 0.31 μ g/mL。

【0264】

結果

図19に示すとおり、Fn3ドメイン変異体Luk151は、HlgAサブユニットへの結合を示すが、HlgABロイコトキシンの細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、Luk129は、HlgAサブユニットへの結合を示し、LDH放出の完全な阻害により例示されるとおり、HlgABロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【0265】

図20に示すとおり、FN3ドメイン変異体Luk357は、HlgCサブユニットへの結合を示すが、HlgCBロイコトキシンの細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、Luk188は、HlgCサブユニットへの結合を示し、LDH放出の完全な阻害により例示されるとおり、HlgCBロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【0266】

図 2 1 に示すとおり、F n 3 ドメイン変異体 L u k 5 4 0 は、P V L ロイコトキシンの L u k S - P V サブユニットとの結合を示すが、P V L の細胞溶解活性を中和するものではない。対照的に、L u k 6 4 7 は、P V L ロイコトキシンの L u k S - P V サブユニットへの結合を示し、L D H 放出の完全な阻害により例示されるとおり、P V L ロイコトキシンの細胞溶解活性を中和する。

【 0 2 6 7 】

まとめ

F N 3 ドメインは、 - ヘモリシン H 1 g A B 及び H 1 g C B 及びパントン - バレンタインロイコチジン (P V L) への結合及び / またはそれらの中和を示すことが認識された。

【 0 2 6 8 】

(表 6) 本開示の核酸及びアミノ酸配列

配列 番号	型	種	内容	配列
1	PRT	人工	Tencon	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLI QYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTE YTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	PRT	人工	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

10

20

配列 番号	型	種	内容	配列
3	PRT	人工	Tencon BC ループ	TAPDAA
4	PRT	人工	Tencon FG ループ	KGGHRSN
5	DNA	人工	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	DNA	人工	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
7	DNA	人工	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
8	DNA	人工	MDD40	AGCCGCCGCCACCGGTTAATGGTGATGGTG ATGGTGACCACCGGTGGTGAAGATCGCAGA CAG
9	DNA	人工	MDD62	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGCGGCC GAAAAACCTGGTTGTTTCTCGTGTTACC
10	PRT	黄色ブドウ球菌	LukA	HHHHHHNSAHKDSQDQNKKEHVDKSQQKD KRNVTNKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVY DEKTNILQNLQDFIDDPYDKNVLLVKKQGS IHSNLKFESHKEEKNSNLKYPSEYHVDFQV KRN RKTEILDQLPKNKISTAKVDSTFSYSSGG KFDSTKGIGRTSSNSYSKTISYNQQNYDTIASG KNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNRNDELL FYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFN PEFLTYLSNEKSNEKTQFEVYTRNQDILKNR PGIHYAPPILEKNKDGQRLIVTYEVDWKNKTV KVVDKYSDDNKPYKAG
11	PRT	黄色ブドウ球菌	LukB	KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQK NITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGL RILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNN TNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSI NRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLDDQS TSHKGVGWKVEAHLINMGHDHTRQLTNS DNRTKSEIFSLTRNGNLWAKDNFTPKDKMPV

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				TVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYK RSMDEFKIDWNRHGFWGYWSGENHVDKKEE KLSALYEVDWKTHNVKFKVLNDNEKK
12	PRT	黄色ブドウ球菌	LukD	MGSSHHHHHHSSGLVPAGSHMLAQHITPVSE KKVDDKITLYKTTATSDNDKLNISQILTFNFIK DKSYDKDTLVLKAAGNINSGYKKPNPKDYN YSQFYWGGKYNVSVSSESNDAVNVDYAPK NQNEEFVQQTTLGYSYGGDINISNGLSGGLN GSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWG VEAHKIMNNGWGPYGRDSYDPTYGNELFLG GRQSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPEFIS VLCHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWN RLHWVGNKYKNQNTVFTSTYEVDWQNHTV KLIGTDSKETNPGV
13	PRT	黄色ブドウ球菌	LukE	MGSSHHHHHHSSGLVPAGSHMLNTNIENIGD GAEVIKRTEDVSSKKWGVTVQNVQDFVFKDK KYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKSGSYELT KRMIWPFQYNIGLTTKDPNVSLINYLPKNKIE TTDVGQTLGYNIGGNFQSAPSIGGNGSFNYSK TISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVKANEFV TPDGKKSADRYLFLVQSPNGPTGSAREYFAP DNQLPPLVQSGFNPSFITTLSEKGSSTSEFEI SYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRN FVVRYEVNWKTHEIKVKGHN
14	PRT	人工	Luk17	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WITYEEKFYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYKVVWIVGVKGGQGSWPLSAIFTT
15	PRT	人工	Luk19	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYHAIHRLNHF

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				DSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLAG LKPGTEYTVSIYGVLPDAFVSSNPLSAIFTT
16	PRT	人工	Luk20	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYHAIHRLNHF DSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVLPDAFVSSNPLSAIFTT
17	PRT	人工	Luk24	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE QIGYFELWPNGEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYEVFIRGVKGGLYSYPLSAIFTT
18	PRT	人工	Luk8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRKPWAPIFDS FLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVWDHAGPKYEIESNPLSAIFTT
19	PRT	人工	Luk9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDRTYSLNRYF DSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVGGQHPTYESNPLSAIFTT
20	PRT	人工	Luk10	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAASENAFVFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVGGKLNQFEWLSNPLSAIFT T
21	PRT	人工	Luk11	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRAKPWAPKFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVSAIKPGHTSNPLSAIFTT
22	PRT	人工	Luk12	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRAKPWAPKFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVKASEKFIESNPLSAIFTT

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
23	PRT	人工	Luk21	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVTKPWAEYFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLK PGTEYTVSIYGVWDHAGPKYEIESNPLSAIFTT
24	PRT	人工	Luk22	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRAKPWAPKFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLK PGTEYAVSIYGVKASEKFIESNPLSAIFTT
25	PRT	人工	Luk26	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIEYAEPVWVGAEIVLTPGSESYDLTGLKP GTEYVFIGGVKGGHNSTPLSAIFTT
26	PRT	人工	Luk27	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFP IVYQEWQFYGEAIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYLVDIYGVKGGWSYPLSAIFTT
27	PRT	人工	Luk28	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIQYWEWWPPGEAIVLTPGSESYDLTGLK PGTEYGVILGVKGGWYSNPLSAIFTT
28	PRT	人工	Luk29	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDEQFVSNFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKP GTEYTVSIYGVFVPWDGFSEINYSNPLSAIFTT
29	PRT	人工	Luk30	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAFNWNFYAFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVALNTGNKKSPLSAIFTT
30	PRT	人工	Luk31	LPAPNNLVVSRVTEDSARLSWDWDKYYTNR FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVLRDYIRAAEWYSNPLSA IFTT
31	PRT	人工	Luk32	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYHENAYLLFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVYDLTPEKRSSNPLSAIFTT
32	PRT	人工	Luk33	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFL

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVAFIPDEIEFSNPLSAIFTT
33	PRT	人工	Luk34	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVVPHEFEFSNPLSAIFTT
34	PRT	人工	Luk35	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVAHIPWFEFEWSKPLSAIFTT
35	PRT	人工	Luk36	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVADVPDEYEFNSNPLSAIFTT
36	PRT	人工	Luk37	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVGVWPLFIQSNPLSAIFTT
37	PRT	人工	Luk38	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVELIYHGWLDFVFSNPLSAIFTT
38	PRT	人工	Luk39	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVRFYFVSVEPTWFSNPLSAIFTT
39	PRT	人工	Luk40	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVSYAGEPLLWIYSNPLSAIFTT
40	PRT	人工	Luk41	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVSEVPYSEYWFSNPLSAIFTT
41	PRT	人工	Luk42	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDLSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVWGYRLTTEHSNPLSAIFTT

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
42	PRT	人工	Luk43	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVNSFGRPTLNLFNPLSAIFTT
43	PRT	人工	Luk44	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVEWLQYYGETLFSNPLSAIFTT
44	PRT	人工	Luk45	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVAWLTNAYEWEFSNPLSAIFTT
45	PRT	人工	Luk46	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIHYEESTWAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVVIVGVKGGGLKSHPLSAIFTT
46	PRT	人工	Luk47	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIQYFETTESGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVFISGVKGGPLSWPLSAIFTT
47	PRT	人工	Luk48	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIEYGEWWPTGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGV LIVGVKGGFRSSPLSAIFTT
48	PRT	人工	Luk49	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIVYAEHWPAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYNVTIPGVKGGKYS DPLSAIFTT
49	PRT	人工	Luk50	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIPYSEWWPVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVYIVGVKGGTWSAPLSAIFTT
50	PRT	人工	Luk51	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIHYFESEPGGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVFIIIGVKGGWSSLPLSAIFTT
51	PRT	人工	Luk52	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIQYGEAQEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				GTEYIVFITGVKGGNKSYP LSAIFTT
52	PRT	人工	Luk53	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDST IQYFEAEANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVFIVGVKGGHSSLPLSAIFTT
53	PRT	人工	Luk54	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAVFDSE RIEYSEWWPIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYGVVIAGVKGGGYSVPLSAIFTT
54	PRT	人工	Luk55	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE WIQYFESAGEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVFIVGVKGGVPSYPLSAIFTT
55	PRT	人工	Luk56	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE YIQYIELEIGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTE YGVFISGVKGGWNSYPLSAIFTT
56	PRT	人工	Luk57	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFNSF YIEYFEWFPAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYAVIIHGVKGGQRSTPLSAIFTT
57	PRT	人工	Luk58	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE DIEYDESAHFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYIVFIYGVKGGYASIP LSAIFTT
58	PRT	人工	Luk59	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE DISYNEFAWSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYVVYIHGVKGGPTSYPLSAIFTT
59	PRT	人工	Luk60	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSE DIQYWEWWPFGAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYGVIIHGVKGGFRSTPLSAIFTT
60	PRT	ヒト	CR5133 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY YMTWIRQAPGKGPVWVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYYVWHWGPGLTVTVSSASTK

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
61	PRT	ヒト	CR5133 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCYCQYGSPLTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	PRT	ヒト	CR5133 PRASA 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY YMTWIRQAPGKGPVWVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYWVHWGPGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPDVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNALPAPIAKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
63	PRT	ヒト	CR5133 PRASA 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTF GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
64	PRT	ヒト	CR5133 A6 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY YMTWIRQAPGKGPVWVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYYVHWGPGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKSLSLSPGK
65	PRT	ヒト	CR5133 A6 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTF GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNAALPAPIAKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKLSLSLSPGK
69	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 LC-D 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSLPAPKNLVSRVTEDSARLSW RAKPWAPKFDNFLIQYQESEKVGAEIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKASEKFIEN PLSAIFTT
70	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 HC-AB 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY YMTWIRQAPGKGPVWVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYYVHWGPGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPDVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNAALPAPIAKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFT

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWITYEEKFYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYKVVIVGVKGGQGSWPLSAIFTT
71	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 HC-AB 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 LC-D HC-AB 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY YMTWIRQAPGKGPVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYYVHWGPGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPDVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNALPAPIAKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNRFT QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS FWITYEEKFYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYKVVIVGVKGGQGSWPLSAIFTT
73	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 LC-D HC-AB	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL GWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列
				VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 HC AB-D 重鎖	EVQLVETGGGLVKPGGSLRLSCSASRFSFRDY DYMTWIRQAPGKGPWVSHISGSGSTIYYADS VRGRFTISRDNKSSLYLQMDSLQADDTAVY YCARGGRATSYYWVHWGPGTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPDVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNALPAPIAKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDS FWITYEEKFYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYKVVIVGVKGGQGSWPLSAIFTTGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRTED SARLSWRAKPWAPKFDSEFLIQYQESKVGAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKAS EKFIESNPLSAIFTT
77	PRT	人工	CR5133 PRASA A6 HC AB-D 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSGYL DQWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFLTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYKHKVYA

10

20

30

40

配列 番号	型	種	内容	配列	
				TAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAAT TAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC CTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTC TGCGTCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNN NNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGA ATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCT GACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGAC CTGACCGGTCTGAAACCGGTACCGAATAC ACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCT TCCCAAAGGC	10
81	DNA	人工	BC7	GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAAT TAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAAT TAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC CTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTC TGCGTCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCA GGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAA CCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTAC GACCTGACCGGTCTGAAACCGGTACCGAA TACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAA GCTTCCCAAAGGC	20 30
82	DNA	人工	BC8	GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAAT TAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAAT TAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC CTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTC	40

配列 番号	型	種	内容	配列	
				TGCGTCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGT ACCAGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGA TCAACCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCT TTACGACCTGACCGGTCTGAAACCGGGTAC CGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTT AGAAGCTTCCCAAAGGC	10
83	DNA	人工	BC9	GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAAT TAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAAT TAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACA GGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC CTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTC TGCGTCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCC AGTACCAGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAG CGATCAACCTGACCGTTCGGGTTCTGAAC GTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAACCGG GTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGT TCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC	20
84	DNA	人工	130mer-L17A	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC ATAACCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCA TCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTCACACAGGAAACAGGATC TACCATGCTG	30
85	DNA	人工	POP2222ext	CGG CGG TTA GAA CGC GGC TAC AAT TAA TAC	
86	DNA	人工	LS1114	CCA AGA CAG ACG GGC AGA GTC TTC GGT AAC GCG AGA AAC AAC CAG GTT TTT CGG CGC CGG CAG CAT GGT AGA TCC TGT TTC	40

配列番号	型	種	内容	配列
87	DNA	人工	LS1115	CCG AAG ACT CTG CCC GTC TGT CTT GG
88	DNA	人工	LS1117	CAG TGG TCT CAC GGA TTC CTG GTA CTG GAT CAG GAA AGA GTC GAA
89	DNA	人工	SDG10	CATGCGGTCTCTCCGAAAAAGTTGGTGAA GCGATCGTCCTGACCGTTCCGGGT
90	DNA	人工	SDG24	GGTGGTGAAGATCGCAGACAGCGGGTTAG
91	DNA	人工	SDG28	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACC GCTGCCACCGCCGGTGGTGAAGATCGCAGA C
92	PRT	人工	TCL19	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFXI XYXEXXX XGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTE YXVXIXGVKGGX XS XPLSAIFTT; Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
93	PRT	人工	TCL19 C ストランド	DSFXIXYE, Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
94	PRT	人工	TCL19 F ストランド	TEYXVXIXGV, Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
95	PRT	人工	TCL19 C ストランド + CD ループ	DSFXIXYEXXXGE, Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
96	PRT	人工	TCL19 F ストランド + FG ループ	TEYXVXIXGVKGGX XS , Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
97	PRT	人工	TCL19 A ストランド +AB ループ+ B ストランド+BCループ	LPAPKXLXVXXVXXXXXAXLWXAPDAAF, Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。
98	PRT	人工	TCL19 E ストランド	XYXLT, Xは、18のアミノ酸の均等な混合物である (システインまたはメチオニンなし)。

10

20

30

40

99	PRT	黄色ブドウ球菌	SdgB	<p>MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMAM NYFVGNSLGVNLTGIEKAIINRLNLFKEMGRP AQCVFLSWNRYLRYRNAQNYITSSDYINMYDF FQEATYLERNEPFDWLSYWTDECHYTLKHV ENSHDFRIYDQERFLMYAHFQDPKYRILDYV NHFDSQRRKVKRDFYDVRGFLSCSRILVDKQ QTLCEFFYNPEDDTKLEKYFSYKDGKPEVQKI IVYYANKQYFFNNETELGAFFIKQLYQHGD FFSDRNVYTAPIFNLTPEVIPVAVLHSTHIKNI DALDSSPFKNVYKAMFENLSRYRAIIVSTEQQ KLDVEKRINHTIPVVNIPVGYSETIDTPVQTL QRSVKLISVARYSPEKQLHQQIELIKRLVSYV PKIELHMYGFGSESKKLNELIQKYGLENHVV LRGFLSNLDQEYSDAYLSLITSNMEGFLALL ESLAHGVPVISYDIKYGPNELITSDFNGYLITK NDEDALFDKVKYVIDHPEVQQRSLKGLAKA QQYSKASLIKQWDQFVRLILEHHHHH</p>
----	-----	---------	------	---

10

20

104	PRT	ヒト	CNTO3930 重鎖	<p>QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSG MGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTAT YYCARLYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKCV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>
105	PRT	ヒト	CNTO3930 軽鎖	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSV DYN GISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNPEGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQII EDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

10

20

106	PRT	ヒト	CNT03929 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSG MGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAT YYCARLYGFTYGFAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKA EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	10
107	PRT	ヒト	CNT03929 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSV DYN GISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNPE SGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQII EDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC	20
108	PRT	黄色ブドウ球菌	HlgA	NSAHHHHHHGSENKIEDIGQGA EIIRKRTQDITS KRLAITQNIQDFVVDKDKKYNKDALVVKMQG FISSRTTYSDLKKYPYIKRMIWPFQYNISLTKT DSNVDLINYL PKNKIDSADVSQKLGYNIGGNF QSAPSIGGSGSFNYSKTISYNQKNYVTEVESQ NSKGVKVGKANSFVTPNGQVSAYDQYLFA QDPTGPAARDYFVPDNQLPPLIQSGFNPSFITT LSHERGKGDKSEFEITYGRNMDATYAYVTRH RLAVDRKHDAFKNRNVTVKYEVNWKTHEV KIKSITPK	30
					40

112	PRT	黄色 ブドウ球菌	LukS-PV	NSAHHHHHHGSDNNIENIGDGAEVVKRTEDT SSDKWGVQTQNIQDFVKDKKYNKDALILKM QGFINSKTTYNYKNTDHIKAMRWPQYNI LKTNDPNVDLINYLPKNKIDSVNVSQTLGYNI GGNFNSGPSTGGNGSFNYSKTISYNQQNYISE VERQNSKSVQWGIKANSFITS LGKMSGHDPN LFVGYKPYSONPRDYFVPDNEPLPVHSGFN PSFIATVSHEKSGSDTSEFEITYGRNMDVTHA TRRTTHYGNSYLEGSRIHNAFVNRNYTVKYE VNWKTHEIKVKGHN	10
113	PRT	人工	Luk82	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSNRAITTFDSF LIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVEYRFRPKYTGSNPLSAIFTT	
114	PRT	人工	Luk83	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFRPSEDISSFD SFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVAFPPTDAKSNPLSAIFTT	20
115	PRT	人工	Luk85	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HINYNEEALVGEAIVLTVPGSERSCDLTGLKP GTEYGVEIEGVKGGPWSWPLSAIFTT	
116	PRT	人工	Luk86	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIRYNEIDLHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYQVPIAGVKVCIISKPLSAIFTT	30
117	PRT	人工	Luk87	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWANTEPSYFAF DSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVWVTWGKSNPLSAIFTT	
118	PRT	人工	Luk88	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTLEWSLIFDSF LIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVQRSVAWYFLLLASNPLSAIFT T	
119	PRT	人工	Luk90	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRTYPTLFDSFL IQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVWPRNIQPWSNPLSAIFTT	40

120	PRT	人工	Luk92	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRVK WVS YQ FDSFLIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVASIDETVGVSNPLSAIFT T
121	PRT	人工	Luk93	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRRISRFD SFL IQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGV DREVYDEWSSNPLSAIFTT
122	PRT	人工	Luk94	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYRRFLLFIFFD SFLIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVGEQWGEASDLSNPLSAIFT T
123	PRT	人工	Luk95	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQHSQYFV LFD SFLIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVLYRQWRDSNPLSAIFTT
124	PRT	人工	Luk96	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGV EHWPSWWHLNFSNPLSAIFTT
125	PRT	人工	Luk97	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGV IDIIHINSWHDHNSNPLSAIFTT
126	PRT	人工	Luk98	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNRHSHEFDSF LIQYQESEKVG EAI VLT VPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGV RIWVLKLNESNPLSAIFTT
127	PRT	人工	Luk99	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIIYYERHDNGEAI VLT VPGSERSYDLTGLKP GTEYLVWIPGVKGG LTSWPLSAIFTT
128	PRT	人工	Luk100	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PITYGEYRSVGEAI VLT VPGSERSYDLTGLKP GTEYIVDIYGVKGG LFSYPLSAIFTT

10

20

30

40

129	PRT	人工	Luk101	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDTEPEWFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVQRVEIRALYRSYSNPLSAIFTT	
130	PRT	人工	Luk102	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVSHRFWKHVYFYASNPLSAIFTT	
131	PRT	人工	Luk103	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIIGLSRFDSFLI QYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVDFAHQDFFRGYASNPLSAIFTT	10
132	PRT	人工	Luk104	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVQWWVAFHHAPSNPLSAIFT T	
133	PRT	人工	Luk106	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVAWIFTKVLNASNPLSAIFTT	20
134	PRT	人工	Luk107	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKGPNSPPSQF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWKRTRAHSNPLSAIFTT	
135	PRT	人工	Luk108	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFYYYYLGKFGF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVNRWWPDDSNPLSAIF TT	30
136	PRT	人工	Luk109	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVIIINRFWAWYLASSNPLSAIFTT	
137	PRT	人工	Luk110	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVGFPTFLNYWQFGSNPLSAIFT T	40

138	PRT	人工	Luk112	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHYYEFRHHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYAFWIYGVKGGGSSWPLSAIFTT
139	PRT	人工	Luk113	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIEYHEEYETGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWIAGVKGGKWSWPLSAIFTT
140	PRT	人工	Luk114	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHQYQELPQKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWIWGVKGGGLTSDPLSAIFTT
141	PRT	人工	Luk116	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHQYQEPAFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVWWIWGVKGGWTSWPLSAIFTT
142	PRT	人工	Luk117	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHQYQETISVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVWVLIWGVKGGGAASDPLSAIFTT
143	PRT	人工	Luk119	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIDYFEEYQKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWIFGVKGGIRSWPLSAIFTT
144	PRT	人工	Luk120	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EINYWEAYIHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWIHGVKGGGNSYPLSAIFTT
145	PRT	人工	Luk122	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHYYEFAIKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYAVWIYGVKGGNSSWPLSAIFTT
146	PRT	人工	Luk123	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIDYFEEYSHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWINGVKGGIYSYPLSAIFTT
147	PRT	人工	Luk124	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIDYVESYALGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWWIWGVKGGSLSYPMASIFTT

10

20

30

40

148	PRT	人工	Luk125	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIIYYEHHNFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYAVPIPGVKGGWQSLPLSAIFTT
149	PRT	人工	Luk126	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIDYQEWPSVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYSVFIHGVKGGWLSKPLSAIFTT
150	PRT	人工	Luk128	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DIQYFEEYAIGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVWISGVKGGNFSKPLSAIFTT
151	PRT	人工	Luk129	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NINYPEEFHGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYEVWIWGVKGGSSNPLSAIFTT
152	PRT	人工	Luk130	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIHYLEWEVNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYIVEIWGVKGGYSSWPLSAIFTT
153	PRT	人工	Luk132	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIEYWEWDPVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG PGTEYPVFISGVKGGYPSVPLSAIFTT
154	PRT	人工	Luk133	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IHYGEGPEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYSVHIPGVKGGWLSWPLSAIFTT
155	PRT	人工	Luk134	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIVYLEWVVLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYIVDIYGVKGGWTSRPLSAIFTT
156	PRT	人工	Luk136	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIDYFEEYVVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYWVCIVGVKGGTPSPPLSAIFTT
157	PRT	人工	Luk138	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIWYQEFEVERGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYDVEIWGVKGGSHSWTLSAIFTT

10

20

30

40

158	PRT	人工	Luk139	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFNSF EIHYGWEYGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVWIYGVKGGDSSWPLSAIFTT
159	PRT	人工	Luk140	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHYQETKKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVLIWGVKGGTASNPLSAIFTT
160	PRT	人工	Luk143	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DIQYDERTEEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVTIPGVKGGWYSWPLSAIFTT
161	PRT	人工	Luk144	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIDYFEEWVNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYWVWIQGVKGGVHSPPLSAIFTT
162	PRT	人工	Luk148	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHYQELNRVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVLIWGVKGGDSSEPLSAIFTT
163	PRT	人工	Luk151	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GITYTEVYWWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVTIPGVKGGWISAPLSAIFTT
164	PRT	人工	Luk155	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIRYFEFIKPGEAIWLVGVPGSERSYDLTGLKPG TEYHVQIRGVKGGRESYPLWADFTT
165	PRT	人工	Luk156	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIQYHETRYSGEAIWLWVPGSERSYDLTGLK PGTEYSVYIPGVKGGNVSFPLKAHFTT
166	PRT	人工	Luk158	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AISYKESGRIGEAI SLVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVYINGVKGGITSFPLNAWFTT
167	PRT	人工	Luk159	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIDYKETGYTGEAIELEVPGESEHSYDLTGLKP GTEYFVTIGGVKGGYSSWPLVALFTT

10

20

30

40

168	PRT	人工	Luk160	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIWYTENPSLGEAIKLSVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVEIWGVKGGGRGSVPLFAIFTT
169	PRT	人工	Luk163	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIEYWEPTSDGEAIALNVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVEIWGVKGGPRSPPLSAWFTT
170	PRT	人工	Luk164	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DIEYGEPEKIGEAIWLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVFIYGVKGGALSRLTATSTT
171	PRT	人工	Luk166	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIQYFEIQPWGEAILLDVPGSERSYDLTGLKP GTEYSVIIWGVKGGPKSQPLYAWFTT
172	PRT	人工	Luk167	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIIYSEDTPGEAIVLWVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVQIEGVKGGHESFPLVANFTT
173	PRT	人工	Luk174	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DIEYGEPEKIGEAIWLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVFIYGVKGGALSRLTATFTT
174	PRT	人工	Luk176	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIYYHEFPYGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYYVRILGVKGGGLSYPLSAIFTT
175	PRT	人工	Luk177	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIYYREWGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVITGVKGGNPSYPLSAIFTT
176	PRT	人工	Luk178	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIHYFEAYAGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVWIFGVKGGLYSYPLSAIFTT
177	PRT	人工	Luk179	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EINYFEAWDGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVWISGVKGGGRYSYPLSAIFTT

10

20

30

40

178	PRT	人工	Luk180	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EIHYYEPIYVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVWIYGVKGGYSSWPLSAIFTT
179	PRT	人工	Luk182	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YILYIENDWQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVVIHGVKGGWISPPLSAIFTT
180	PRT	人工	Luk183	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIWYWEFLHNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVEIYGVKGGSVSVPLSAIFTT
181	PRT	人工	Luk184	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYHELNTAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVIIHGVKGGPISSPLSAIFTT
182	PRT	人工	Luk185	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIVYREWFHYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYYVVIHGVKGGYISKPLSAIFTT
183	PRT	人工	Luk186	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HITYTEYSFVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVEIYGVKGGFISSPLSAIFTT
184	PRT	人工	Luk187	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RILYFEYKRLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIHGVKGGYISRPLSAIFTT
185	PRT	人工	Luk188	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIHYWEPNPAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIHGVKGGGISWPLSAIFTT
186	PRT	人工	Luk189	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSL KIFYFEFIYLGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYHVTIHGVKGGTISLPLSAIFTT
187	PRT	人工	Luk190	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYEFSNYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIHGVKGGQISVPLSAIFTT

10

20

30

40

188	PRT	人工	Luk191	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYWEWYHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYNVVIHGVKGGYISLPLSAIFTT
189	PRT	人工	Luk192	LPAPKNLDVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYEYEEKPIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVEIYGVKGGYISNPLSAIFTT
190	PRT	人工	Luk193	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYHETRPLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVAIYGVKGGYISLPLSAIFTT
191	PRT	人工	Luk194	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYWEFSDNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVGIYGVKGGQISQPLSAIFTT
192	PRT	人工	Luk195	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIIYYEYPAGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVIIHGVKGGFVSVPLSAIFTT
193	PRT	人工	Luk196	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIIYIENPYWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVIIHGVKGGYISEPLSAIFTT
194	PRT	人工	Luk197	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYWEVQANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVGIIYGVKGGYISLPLSAIFTT
195	PRT	人工	Luk198	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYTEEKTWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVWIHGVKGGWISAPLSAIFTT
196	PRT	人工	Luk199	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYAEHSNKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGFISWPLSAIFTT
197	PRT	人工	Luk201	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYLEHNDEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVAIHGVKGGYISQPLSAIFTT

10

20

30

40

198	PRT	人工	Luk202	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIWYHETWRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYPVVIHGVKGGFISTPLSAIFTT
199	PRT	人工	Luk203	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIYVEYETWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVAIHGVKGGYISIPLSAIFTT
200	PRT	人工	Luk204	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIIYWELWSIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVEIYGVKGGTISTPLSAIFTT
201	PRT	人工	Luk205	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SILYWEWVANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVEIYGVKGGWLSLPLSAIFTT
202	PRT	人工	Luk206	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYFEQFSRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIHGVKGGFVSRPLSAIFTT
203	PRT	人工	Luk208	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIWYWEWYHLGEAIVLTVPGSELSYDLTGLK PGTEYWVEIYGVKGGFISQPLSAIFTT
204	PRT	人工	Luk210	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYFEYLGNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIHGVKGGVISTPLSAIFTT
205	PRT	人工	Luk211	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIFYFEWKRLGEAIVPTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVGIIYGVKGGPISVPLSAIFTT
206	PRT	人工	Luk212	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYTEREFYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVGIIYGVKGGNISEPLSAIFTT
207	PRT	人工	Luk213	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYHETDAYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGFISSPLSAIFTT

10

20

30

40

208	PRT	人工	Luk214	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIHYWEYDANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYLVAIYGVKGGGLISVPLSAIFTT
209	PRT	人工	Luk215	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYHESVTNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVGIYGVKGGYISDPLSAIFTT
210	PRT	人工	Luk216	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIHYFEESITGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIYGVKGGISISDPLSAIFTT
211	PRT	人工	Luk218	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIIYWEYRWQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVPIHGVKGGEISPPLSAIFTT
212	PRT	人工	Luk219	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIWYVWYRTSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVAIHGVKGGEISVPLSAIFTT
213	PRT	人工	Luk220	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYWEESPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVAIYGVKGGYISLPLSAIFTT
214	PRT	人工	Luk221	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYHELEHHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGQISWPLSAIFTT
215	PRT	人工	Luk222	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SILYWEEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIHGVKGGYISRPLSAIFTT
216	PRT	人工	Luk223	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VILYWEENQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGHISEPLSAIFTT
217	PRT	人工	Luk224	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYTEHGVSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWPIHGVKGGTISQPLSAIFTT

10

20

30

40

218	PRT	人工	Luk225	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYHEFLTIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVAIYGVKGGQISDPLSAIFTT
219	PRT	人工	Luk226	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYAEWHLGDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGYISEPLSAIFTT
220	PRT	人工	Luk227	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIYYHEWQATGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHGVKGGWISSPLSAIFTT
221	PRT	人工	Luk228	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIPYYEYAVFGEATVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVIIHGVKGGYISLPLSAIFTT
222	PRT	人工	Luk229	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIFYLEWNQIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGFISDPLSAIFTT
223	PRT	人工	Luk230	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IFYTESHFYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWVAIYGVKGGGFSFPLSAIFTT
224	PRT	人工	Luk231	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RILYWEYVTAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGYISIPLSAIFTT
225	PRT	人工	Luk233	LPAPKNLVVSRVTEDSACLSWTAPDAAFDSF AIQYWEYSGIGEAIVLTVPGSERSYGLTGLKP GTEYFVGIAGVKGGWISLPLSAIFTT
226	PRT	人工	Luk235	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIIYHEWDKNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGYISRPLSAIFTT
227	PRT	人工	Luk236	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYWEYILPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVVIHGVKGGHISDPLSAIFTT

10

20

30

40

228	PRT	人工	Luk237	MLPPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDS FQIIYWEYAETGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYIVIIHG VKGGEISRPLSAIFTT
229	PRT	人工	Luk238	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYHETVKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHG VKRGQISEPLSAIFTT
230	PRT	人工	Luk239	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HISYWEYAVYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGWISSPLSAIFTT
231	PRT	人工	Luk240	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYDEEAHNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHG VKGGTISIPLSAIFTT
232	PRT	人工	Luk241	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIYYFESYAVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGWISWPLSAIFTT
233	PRT	人工	Luk242	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYHETEVDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVIIHG VKGGFISYPLSAIFTT
234	PRT	人工	Luk243	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIMYFEFQALGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVLIHG VKGGLISPPLSAIFTT
235	PRT	人工	Luk244	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIYYWEFLENGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHG VKGGFISWPLSAIFTT
236	PRT	人工	Luk245	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYWEFRPGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIFGVKGG SISVPLSAIFTT
237	PRT	人工	Luk246	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIHYFEASPPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVVIYGVKGGYISPPLSAIFTT

10

20

30

40

238	PRT	人工	Luk247	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYHEYVQVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGQISDPLSAIFTT
239	PRT	人工	Luk248	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIIYWEYVDVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVPIYGVKGGLISEPLSAIFTT
240	PRT	人工	Luk249	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIVYWEQKFYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGFISLPLSAIFTT
241	PRT	人工	Luk250	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYDEWRGVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIQGKGGYVSDPLSAIFTT
242	PRT	人工	Luk251	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIHYHEYQQIGEIVLTVPGSERSYDLIGLKP TEYFVAIYGVKGGFISQPLSAIFTT
243	PRT	人工	Luk252	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYLEWPAKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGWISPPLSAIFTT
244	PRT	人工	Luk253	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIVYWEYNPVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGNISKPLSAIFTT
245	PRT	人工	Luk254	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIFYLEHDWRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHGVKGGSSIVPLSAIFTT
246	PRT	人工	Luk255	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYWEYEQQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGEISQPLSAIFTT
247	PRT	人工	Luk257	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYIEHVDWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVEIYGVKGGKISAPLSAIFTT

10

20

30

40

248	PRT	人工	Luk258	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIYYFESVDWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYYVYIYGVKGGWISVPLSAIFTT
249	PRT	人工	Luk259	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIIYWESQYWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVVIHGVKGGGSDPLSAIFTT
250	PRT	人工	Luk260	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIIYYEWESAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGFISFPLSAIFTT
251	PRT	人工	Luk261	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYWEFQKKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVIIYGVKGGFISPLSAIFTT
252	PRT	人工	Luk262	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYLEKTNYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHGVKGGPISGPLSAIFTT
253	PRT	人工	Luk263	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIWYWEYVRNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVPIYGVKGGDTSPLSAIFTT
254	PRT	人工	Luk264	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYHEYFTVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGGLISAPLSAIFTT
255	PRT	人工	Luk265	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIIYFENEYGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIYGVKGGYLSVPLSAIFTT
256	PRT	人工	Luk266	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIGYLENPWDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVFIYGVKGGHISNPLSAIFTT
257	PRT	人工	Luk267	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IHIFYEYPPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYFVGIYGVKGGWVSEPLSAIFTT

10

20

30

40

258	PRT	人工	Luk268	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYPEYSARGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVVIHGVKGGFVSEPLSAIFTT
259	PRT	人工	Luk269	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIIYWEYEVAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVSIQGVKGGAISPLSAIFTT
260	PRT	人工	Luk270	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIVYFEHPSYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIYGVKGGEISAPLSAIFTT
261	PRT	人工	Luk271	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIVYFEWAANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIYGVKGGAISLPLSAIFTT
262	PRT	人工	Luk272	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYWEDTLKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYVVAIHGVKGGTISHPLSAIFTT
263	PRT	人工	Luk273	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VINYWEFQPAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVAIHGVKGGQISKPLSAIFTT
264	PRT	人工	Luk274	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYWELVWNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYCVPIHGVKGGGLISPLSAIFTT
265	PRT	人工	Luk275	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYEEWQVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVAIYGVKGGAISQPLSAIFTT
266	PRT	人工	Luk276	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIHIFYEYAIRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVSIYGVKGGGLISSPLSAIFTT
267	PRT	人工	Luk277	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYLEYDQGGAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVTIHGVKGGYISEPLSAIFTT

10

20

30

40

268	PRT	人工	Luk278	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYWEFAVSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYSVVIHGVKGGVISEPLSAIFTT
269	PRT	人工	Luk279	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIIYFEFFIGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYFVVIHGVKGGDLSAPLSAIFTT
270	PRT	人工	Luk280	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIIYWEFASNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIYGVKGGEISNPLSAIFTT
271	PRT	人工	Luk281	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYFEFQTHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVPITGVKGGWYSDPLSAIFTT
272	PRT	人工	Luk282	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IYWEYRTCGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVEIYGVKGGNTSPPLSAIFTT
273	PRT	人工	Luk283	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSIT IHYPHTGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVPIYGVKGGYISQPLSAIFTT
274	PRT	人工	Luk285	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PILYWENITTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVVIHGVKGGFISGPLSAIFTT
275	PRT	人工	Luk286	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYWEFQAAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVEIYGVKGGWTSFPLSAIFTT
276	PRT	人工	Luk287	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIVYWEWQCNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVFIHGVKGGITSAPLSAIFTT
277	PRT	人工	Luk288	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIHYWEPQGIGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIHGVKGGWISFPLSAIFTT

10

20

30

40

278	PRT	人工	Luk289	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IPYWEYQYAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVGIYGVKGGISEPLSAIFTT
279	PRT	人工	Luk290	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYIEPQFEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVVIHGVKGGYISKPLSAIFTT
280	PRT	人工	Luk291	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIIYWEYDPHGAEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYIVSIYGVKGGYISPPLSAIFTT
281	PRT	人工	Luk292	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIEYWEWIDKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIYGVKGGYISWPLSAIFTT
282	PRT	人工	Luk293	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SILYHEWSGWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVFIHGVKGGYISPPLSAIFTT
283	PRT	人工	Luk294	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QILYWETAKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVEIYGVKGGWISWPLSAIFTT
284	PRT	人工	Luk296	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYYEFKYQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVVIHGVKGGFISPPLSAIFTT
285	PRT	人工	Luk298	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYLEGNWSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVSIYGVKGGFISEPLSAIFTT
286	PRT	人工	Luk299	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF KIFYWEWPHSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVAIHGVKGGWISKPLSAIFTT
287	PRT	人工	Luk300	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TISYWEYAGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVGIHGVKGGWISKPLSAIFTT

10

20

30

40

288	PRT	人工	Luk301	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HISYWEYYARGEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGVISPLSAIFTT
289	PRT	人工	Luk302	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF KIWYLETGFRGEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIYGVKGGYISQPLSAIFTT
290	PRT	人工	Luk303	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIQYWEWNLGGIAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVAIYGVKGGAISDPLSAIFTT
291	PRT	人工	Luk304	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYTELYEFGEAISLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYSVAIAGVKGGAYSHPLHALFTT
292	PRT	人工	Luk305	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIKYAEHVWVWGEAIDLLVPGSERSYDLTGLK PGTEYEYVGIAGVKGGTVSVPLSARFTT
293	PRT	人工	Luk306	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI ILYDEIWPSGEAISLGVPGSERSYDLTGLKPGT EYFVAIHGVKGGNISDPLDAKFTT
294	PRT	人工	Luk307	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYTESRYYGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVRIISGVKGGAFSTPLWAAATT
295	PRT	人工	Luk308	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYGERLRFGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVGISGVKGGWFSNPLRAIFTT
296	PRT	人工	Luk309	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF KIFYLESDWEGEAIALWVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVFIHGVKGGYISIPHLANFTT
297	PRT	人工	Luk310	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYTETAKWGEAITLLVPGSERSYDLTGLK PGTEYRVGIGGVKGGGWSWPLDAIFTT

10

20

30

40

298	PRT	人工	Luk311	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WISYVEPDDGEAIELLVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVQIDGVKGGTTSVPLNARFTT
299	PRT	人工	Luk312	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYSEYPEYGEAIDLVPVPGSERSYDLTGLKPG GTEYRVGITGVKGGWISKPLNATFTT
300	PRT	人工	Luk313	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYNEIGKWGEAIDLIVPGSERSYDLTGLKPG GTEYAVGIDGVKGGSSISEPLPASFTT
301	PRT	人工	Luk314	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYTEFNFKGEAIPLDVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVSIHGVKGGGEISPPLEALFTT
302	PRT	人工	Luk315	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WISYQEPDEIGEAIELIVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVQIDGVKGGTWSIPLNAYFTT
303	PRT	人工	Luk317	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHEFPTWGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKPG GTEYQVRISGVKGGTTSQPLQAAAT
304	PRT	人工	Luk318	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHETVGFGEAIALLVPGSERSYDLTGLKPG GTEYAVAIDGVKGGWFSHPLVAYFTT
305	PRT	人工	Luk319	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYFERFNWGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKPG GTEYQVQIDGVKGGDISIPLSARFTT
306	PRT	人工	Luk320	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYSEWEQLGEAIDLIVPGSERSYDLTGLKPG GTEYQVGIAGVKGGSSSFPLGAEFTT
307	PRT	人工	Luk321	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYQEAATWGEAIDLSVPGSERSYDLTGLK PGTEYHVGIVGVKGGGVSTPLVAPFTT

10

20

30

40

308	PRT	人工	Luk322	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYYESHARGGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVGITGVKGGTISYPLHAIFTT
309	PRT	人工	Luk323	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTEPDAAFDSF WIAYPEPGFQGEAISLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYEVQIAGVKGGHVSWPLVATFTT
310	PRT	人工	Luk324	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAYEEVRAEGEAIELLVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVGIDGVKGGGFSSPLVAHFTT
311	PRT	人工	Luk326	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAYYERTQQGEAIELLVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIDGVKGGEVSQLKAHFTT
312	PRT	人工	Luk327	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYLEWLYHGAEIKLYVPGSERSYDLTGLKP GTEYYVVIHGVKGGFVSTPLFATFTT
313	PRT	人工	Luk329	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYWEGIGYGEAITLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYNVGIDGVKGGDFSTPLWARFTT
314	PRT	人工	Luk330	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHEFSTYGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVKIAGVKGGATSVPLVATFTT
315	PRT	人工	Luk331	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYFEDDERGEAIVLNVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVIIHGVKGGQISSPLYATFTT
316	PRT	人工	Luk332	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAYGEWEYPGEAIELLVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVGIDGVKGGRVSYPLRAQFTT
317	PRT	人工	Luk333	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIHYWEGLFVGEAIVLSVPGSERSYDLTGLKP GTEYAVPIYGVKGG SISKPLYALFTT

10

20

30

40

318	PRT	人工	Luk334	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIGYHEAEGFGGEAIALLVPGSERSYDLTGLKP GTEYPVGISGVKGGFVSFPLWARFTT
319	PRT	人工	Luk335	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYNEIVNHGEAIDLVPVPGSERSYDLTGLKP GTEYRVSIGGVKGGHWSVPLWARFTT
320	PRT	人工	Luk336	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHEWIGPGEAISLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIAGVKGGWSSRPLSATFTT
321	PRT	人工	Luk337	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYEEPLYFGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYRVHIGGVKGGRVSIPLAEFTT
322	PRT	人工	Luk338	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIA YEEDNAQGEAIELLVPGSERSYDLTGLKP GTEYDVKIDGVKGGRVSTPLVARFTT
323	PRT	人工	Luk339	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYWEGQWNGEAILLDVPGSERSYDLTGLK PGTEYIVPIHGVKGGWISLPLVATFTT
324	PRT	人工	Luk340	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHESPYAGEAIDLVPVPGSERSYDLTGLKP GTEYAVGIAGVKGGGYSIPLRAIFTT
325	PRT	人工	Luk342	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYSEPTIYGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGITGVKGGWNSRPLSAIFTT
326	PRT	人工	Luk343	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYTETHWFGGEAINLPVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVIIHGVKGGYISDPLWAAFTT
327	PRT	人工	Luk344	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WISYVEPVFSGEAIELLVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVGIGGVKGGGWSIPLEAHFTT

10

20

30

40

328	PRT	人工	Luk345	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIFYIEAKFRGEAIRLGVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVWIHG VKGGEISDPLEAPFTT
329	PRT	人工	Luk346	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAYYEIVGWGEAITLLVPGSERSYDLTGLKP GTKYVV LIDGVKGGLLSQPLHAEFAT
330	PRT	人工	Luk347	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHETTRFGEAIDLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVAIQGVKGGHVSQPLRAPFTT
331	PRT	人工	Luk348	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIIYLEASFRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVSIYGVKGGHFSPLDAIFTT
332	PRT	人工	Luk349	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYREWIQWGEAISLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYRVGITGVNNGVTSVPLHAKFTT
333	PRT	人工	Luk350	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAYHEGLSWGEAIDLLVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIDGVKGGYTSEPLRASFTT
334	PRT	人工	Luk351	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYDETLTYGEAITLLVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVGIDGVKGGRNSVPLKATFTT
335	PRT	人工	Luk353	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYHEPRAWGEAIDLLVPGSERSYDLTGLK PGTEYLVGIGGVKGGKQSKPLVAKFTT
336	PRT	人工	Luk354	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYTEQKNHGEAIDLLVPGSERSYDLTGLK PGTEYEVNIAGVKGGGWSIPLNAWFTT
337	PRT	人工	Luk355	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF KIVYVEIHYRGEAIIHLSVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVVIHG VKGGGISLPLDAPFTT

10

20

30

40

338	PRT	人工	Luk356	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDATFDSF WIGYSEDQRTGEAIDLVPGSERSYDLTGLKP GTEYRVAIAGVKGGYISQPLSANFTT
339	PRT	人工	Luk357	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYFESLLTGEAISLVVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVPIYGVKGGFISQPLIAIFTT
340	PRT	人工	Luk358	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AINYYEYYPAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGYISPPLSAIFTT
341	PRT	人工	Luk361	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIYYYEYYANGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGYVSDPLSAIFTT
342	PRT	人工	Luk362	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIYYLEYSFTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYAVYIYGVKGGWISDPLSAIFTT
343	PRT	人工	Luk363	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIYYYEWASYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGHISRPLSAIFTT
344	PRT	人工	Luk364	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYHEYSYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHSVKGGSVSSPLSAIFTT
345	PRT	人工	Luk365	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIYYYEYWYGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYWVGIYGVKGGYISSPLSAIFTT
346	PRT	人工	Luk366	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYEFNWGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIYGVKGGYISYPLSAIFTT
347	PRT	人工	Luk368	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIYYFESINLGDAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVYIYGVKGGYISYPLSAIFTT

10

20

30

40

348	PRT	人工	Luk369	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYEYGGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVGIYGVKGGYISPLSAIFTT
349	PRT	人工	Luk370	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIYYFEYWTYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVYIYGVKGGYISDPLSAIFTT
350	PRT	人工	Luk371	LPAPKNLVVSRVIEDSARLSWTAPDAAFDSFT IFYEYDSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVAIYGVKGGYISAPLSAIFTT
351	PRT	人工	Luk372	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIGYEEYANAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVFIYGVKGGYYSYPLSAIFTT
352	PRT	人工	Luk373	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIYYFEYINLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVYIHGVKGGFVSDPLSAIFTT
353	PRT	人工	Luk374	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIEYWEYRLAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGAVSLPLSAIFTT
354	PRT	人工	Luk375	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIDYWEYVFLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVSITGVKGGRYSYPLSAIFTT
355	PRT	人工	Luk376	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIPYYEYWWSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIYGVKGGYISSPLSAIFTT
356	PRT	人工	Luk377	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WINYWEYYPHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVGIYGVKGGSYSHPLSAIFTT
357	PRT	人工	Luk378	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYHEDAYTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGFLSRPLSAIFTT

10

20

30

40

358	PRT	人工	Luk379	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YILYHEYEYSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGGLYSAPLSAIFTT
359	PRT	人工	Luk380	LPAPKNLVVSRVNEDSARLSWTAPDAAFDSF DIVYGVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEY YVPIAGVKGGGVSWPLSAIFTT
360	PRT	人工	Luk381	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIYYYEYKYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGEISDPLSAIFTT
361	PRT	人工	Luk382	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIIYDETAQYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVPIHGVKGGTISYPLSAIFTT
362	PRT	人工	Luk390	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTYIHHGFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVVWGYWNPTQYSNPLSAIFTT
363	PRT	人工	Luk394	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDQYRLNFDSE LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVNWGYFLAPEISNPLSAIFTT
364	PRT	人工	Luk399	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPGQTRKFNIFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVGIFLTFGSNPLSAIFTT
365	PRT	人工	Luk409	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKYTLYQHIFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVLAWWSFGSNPLSAIFTT
366	PRT	人工	Luk412	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIGYLEYPWYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVDIYGVKGGWWSYPLSAIFTT
367	PRT	人工	Luk414	LPAPNLLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIDIETYYYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVDIYGVKGGWYSLPLSAIFTT

10

20

30

40

368	PRT	人工	Luk415	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF EISYTEYGISGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVDIYGVKGGYLSYPLSAIFTT
369	PRT	人工	Luk417	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIDYFEYYEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVDIYGVKGGSWSLPLSAIFTT
370	PRT	人工	Luk420	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWLGRFNFDSE LIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVKQWIISEESLSNPLSAIFTT
371	PRT	人工	Luk428	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGIKEETIIFDSF LIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVNIIELHLWSNPLSAIFTT
372	PRT	人工	Luk438	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWRKPKRWRH FDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVAPDTPVVIISNPLSAIFT T
373	PRT	人工	Luk445	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEVNTKTSNKF DSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVGYWLTVLNVLASNPLSAIFT TT
374	PRT	人工	Luk447	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGIDDYFVHFF DSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVSIHFETTYSRSNPLSAIFT T
375	PRT	人工	Luk449	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DISYDEYPEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVDIIGVKGGEISLPLSAIFTT
376	PRT	人工	Luk452	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIHYAEYPDFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYIVDIWGVKGGGLGSWPLSAIFTT

10

20

30

40

377	PRT	人工	Luk460	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIWGGESFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVGQIGFIYRPEGSNPLSAIFTT	
378	PRT	人工	Luk461	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLGPATVFDSD FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVWVSLHHRFSNPLSAIFTT	
379	PRT	人工	Luk462	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWHPIWVDFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVVRGDGFEVILHSNPLSAIFTT	10
380	PRT	人工	Luk463	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKWFKTTAFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVHASEIHQWESSNPLSAIFTT	
381	PRT	人工	Luk464	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWWVAPVDFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVGAINVYVYFPTWSNPLSAIFTT	20
382	PRT	人工	Luk465	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVTDPGTNFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVWSVWHSRYSNPLSAIFTT	
383	PRT	人工	Luk467	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPWLQYPPFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVGYLDWHIFQLASNPLSAIFT T	30
384	PRT	人工	Luk468	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQPSHGFEFANF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVQPWYRGGHIYDFSNPLSA IFTT	
385	PRT	人工	Luk470	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWINYSDPDDFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVYHWWYRGTPVVSNPLSAIF TT	40

386	PRT	人工	Luk473	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLEGFFPQPLFD SFLIQYLESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVPWYHHRWWFASNPLSAIFT T
387	PRT	人工	Luk475	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKQHTNTHYQF DSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPVSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVRWIDNHLKFNVHSNPLS AIFTT
388	PRT	人工	Luk476	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLEGFFPQPLFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVPWYHHRWWFASNPLSAIF TT
389	PRT	人工	Luk478	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLEGFFPQPLFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVASRWHSFPVTTSNPLSAIFT T
390	PRT	人工	Luk479	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLEGFFPQPLFD SFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYGLTGL KPGTEYTVSIYGVPWYHHRWWFASNPLSAIF TT
391	PRT	人工	Luk483	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYERFTWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYPVHIWGVKGGIDSRPLSAIFTT
392	PRT	人工	Luk486	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIRYGEETVHGEAIALIVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVAIAGVKGGTWSIPLSAIFTT
393	PRT	人工	Luk487	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIHYLEFHYAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVVIYGVKGDLISGPLSAIFTT
394	PRT	人工	Luk498	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLPGFRRFDSF LIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVNHEWYHAFSNPLSAIFTT

10

20

30

40

395	PRT	人工	Luk499	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIGRELIWFDSF LIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVTHEWRSEFSNPLSAIFTT
396	PRT	人工	Luk500	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKKPSYYIFDSF LIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVNHEWYHAFSNPLSAIFTT
397	PRT	人工	Luk505	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQQAARWFDSF LIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVTREWFHFSNPLSAIFTT
398	PRT	人工	Luk507	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQHGGFRLFDS FLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVFHEWFHEFSNPLSAIFTT
399	PRT	人工	Luk510	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDEYSVTTWW FDSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVNELYRPWVASNPLSAIF TT
400	PRT	人工	Luk513	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWTGGWRRNP FDSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVQLHRTIAGESNPLSAIF TT
401	PRT	人工	Luk516	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVGANSRHWF DSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVAVSEWFHFSNPLSAIFTT
402	PRT	人工	Luk517	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVNHLEGEAW FDSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVQTHEWWHKFSNPLSAI FTT
403	PRT	人工	Luk519	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDLEHHNYHYF DSFLIQQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWFLQPAIHPPSNPLSAIFT T

10

20

30

40

404	PRT	人工	Luk520	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYEYWSNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIIHGVKGGGLISHPLSAIFTT
405	PRT	人工	Luk521	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI ITYEEATLNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVGITGVKGGGLGSYPLSAIFTT
406	PRT	人工	Luk522	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYLEQRFQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYAVIIHGVKGGWISFPLSAIFTT
407	PRT	人工	Luk523	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIPYLERQLYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVTIGGVKGGAPSRPLSAIFTT
408	PRT	人工	Luk524	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF FIFYLEYAHPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYHVIIHGVKGGGLISEPLSAIFTT
409	PRT	人工	Luk525	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIFYWESVTGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVIIHGVKGGGLISDPLSAIFTT
410	PRT	人工	Luk526	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYDEHHQWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVAIYGVKGGYYSSPLSAIFTT
411	PRT	人工	Luk527	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYWEPNEVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVEIYGVKGGGEISYPLSAIFTT
412	PRT	人工	Luk528	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIDYREETPKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVILGVKGGGDSFPLSAIFTT
413	PRT	人工	Luk529	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIYYGEWNPKGAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVIISGVKGGPQSIPLSAIFTT

10

20

30

40

414	PRT	人工	Luk530	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIFYHEIEENGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIHGVKGGVISTPLSAIFTT
415	PRT	人工	Luk531	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYYELYHAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIHGKGGQISLPLSAIFTT
416	PRT	人工	Luk532	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYLELESSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYNVIIHGKGGFISSPLSAIFTT
417	PRT	人工	Luk533	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYVELRNPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYHVVIHGKGGFISHPLSAIFTT
418	PRT	人工	Luk534	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYTEWNEFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIHGKGGQISVPLSAIFTT
419	PRT	人工	Luk535	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYLEPTTQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVIIHGKGGPVSGPLSAIFTT
420	PRT	人工	Luk536	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIAIYIETDGWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVPIHGKGGYISQPLSAIFTT
421	PRT	人工	Luk537	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYHEHKIRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVIIHGKGGYISLPLSAIFTT
422	PRT	人工	Luk538	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYLERANRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIHGKGGTISDPLSAIFTT
423	PRT	人工	Luk539	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYLETLYHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVVIHGKGGIISPLSAIFTT

10

20

30

40

424	PRT	人工	Luk540	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIEYPEDTEQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYNVHITGVKGGKSAPLSAIFTT
425	PRT	人工	Luk541	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NILYTETEQSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYIVIIHGVKGGFISGPLSAIFTT
426	PRT	人工	Luk542	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYPEFRGDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYGVIIHGVKGGGDSNPLSAIFTT
427	PRT	人工	Luk543	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYTETFHYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHGVKGGDISAPLSAIFTT
428	PRT	人工	Luk544	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYLEEFWLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGFISVPLSAIFTT
429	PRT	人工	Luk545	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIAYIEERWSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVLIHGVKGGFISNPLSAIFTT
430	PRT	人工	Luk546	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIYYGEWPHGGEAIVLTVPGSERSYDLTSLKP GTEYFVLIIGVKGGQLSHPLSAIFTT
431	PRT	人工	Luk547	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYLESSGTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVIIHGVKGGGRISNPLSAIFTT
432	PRT	人工	Luk548	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIYYGEWHPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVFILGVKGGQNSQPLSAIFTT
433	PRT	人工	Luk549	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYAESGNWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVFIWGVKGGHESHPLSAIFTT

10

20

30

40

434	PRT	人工	Luk550	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYAETDTKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHGVKGGISISVPLSAIFTT
435	PRT	人工	Luk551	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYQEYSNHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIYGVKGGFISRPLSAIFTT
436	PRT	人工	Luk552	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYDENLWLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGFISQPLSAIFTT
437	PRT	人工	Luk553	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYAEHEKWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVAIHGVKGGHISRPLSAIFTT
438	PRT	人工	Luk554	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIFYLETFRRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVIIHGVKGGYVSDPLSAIFTT
439	PRT	人工	Luk555	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIFYPETNYQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHGVKGGYISDPLSAIFTT
440	PRT	人工	Luk556	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYIEEETNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYQVIIHGVKGGFISLPLSAIFTT
441	PRT	人工	Luk557	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYPEVNRFRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHGVKGGYISTPLSAIFTT
442	PRT	人工	Luk558	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYHEWWKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYHVVIHGVKGGHISTPLSAIFTT
443	PRT	人工	Luk559	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYPETRPTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVVIYGVKGGWISPPPLSAIFTT

10

20

30

40

444	PRT	人工	Luk560	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYIEHVQVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVIIHGVKGGIISPPLSAIFTT
445	PRT	人工	Luk561	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYYPELYFHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHGVKGGFISPPLSAIFTT
446	PRT	人工	Luk562	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYKEYTHGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVIIHSVKGGISISYPLSAIFTT
447	PRT	人工	Luk563	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYPEHYQDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHGVKGGWISSPLSAIFTT
448	PRT	人工	Luk564	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYIEFRYPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIHGVKGGYISDPLSAIFTT
449	PRT	人工	Luk565	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYLETWGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGLISSPLSAIFTT
450	PRT	人工	Luk566	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYEYHADAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVIIHGVKGGYISKPLSAIFTT
451	PRT	人工	Luk567	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYQEDSDHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGTISKPLSAIFTT
452	PRT	人工	Luk568	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYIEEHDVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVIIHGVKGGYISDPLSAIFTT
453	PRT	人工	Luk569	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYPETQTIGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVGIHGVKGGIISDPLSAIFTT

10

20

30

40

454	PRT	人工	Luk570	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IYYGEWREHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVLIQGVKGGQTSGPLSAIFTT
455	PRT	人工	Luk571	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF KIFYLEPKENGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIITGVKGGFISEPLSAIFTT
456	PRT	人工	Luk572	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIHYDEWENGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYWVIIIGVKGGVRSNPLSAIFTT
457	PRT	人工	Luk575	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PIFYVEIPQPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVIIHGVKGGGSDPLSAIFTT
458	PRT	人工	Luk576	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VILYHEYWASGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVVIHGVKGGFLSDPLSAIFTT
459	PRT	人工	Luk577	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYCEHWTSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVAIHGVKGGGEISAPLSAIFTT
460	PRT	人工	Luk578	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYQEHLGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYVVVIHGVKGGWISSPLSAIFTT
461	PRT	人工	Luk579	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYEETANGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVVIHGVKGGHISSPLSAIFTT
462	PRT	人工	Luk580	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYPETQKYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVVIHGVKGGFISSPLSAIFTT
463	PRT	人工	Luk581	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYGEYENGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIVGVKGGFDSKPLSAIFTT

10

20

30

40

464	PRT	人工	Luk582	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYHETVDKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVVSGVKGGYISDPLSAIFTT
465	PRT	人工	Luk583	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYREESKYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIHGVKGGEISDPLSAIFTT
466	PRT	人工	Luk584	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYQEVVEWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGWISDPLSAIFTT
467	PRT	人工	Luk585	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYPETWIAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVVIHGVKGGIISWPLSAIFTT
468	PRT	人工	Luk587	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIPYQEYLGWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIVGKGGFISPLSAIFTT
469	PRT	人工	Luk588	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYEHQVAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGWISSPLSAIFTT
470	PRT	人工	Luk589	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIYAEEQRNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVVIHGVKGGFISPLSAIFTT
471	PRT	人工	Luk590	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIFYLEERLTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVVIHGVKGGVISDPLSAIFTT
472	PRT	人工	Luk592	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYEAVHQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGNISVPLSAIFTT
473	PRT	人工	Luk593	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYVELVWKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGYISDPLSAIFTT

10

20

30

40

474	PRT	人工	Luk594	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIHYGEYENGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGFISDPLSAIFTT
475	PRT	人工	Luk595	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIIYFETKAYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYWVIIHGVKGGYISVPLSAIFTT
476	PRT	人工	Luk596	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYDEEWSKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYAVFIYGVKGGGAISEPLSAIFTT
477	PRT	人工	Luk597	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIHYLETDPGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVSIYGVKGGWISPPPLSAIFTT
478	PRT	人工	Luk598	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYDEDPRQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGYLSIPLSAIFTT
479	PRT	人工	Luk599	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIFYREETPHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVLILGVKGGGISEPLSAIFTT
480	PRT	人工	Luk601	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYIEDNKVGEAIVLTVPGSVRSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGIISEPLSAIFTT
481	PRT	人工	Luk602	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYQELNRDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVIIHGVKGGFISPPPLSAIFTT
482	PRT	人工	Luk603	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYLEFWYRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYNVIIHGVKGGWISEPLSAIFTT
483	PRT	人工	Luk604	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYGEWPQEGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVILGVKGGQASPPLSAIFTT

10

20

30

40

484	PRT	人工	Luk605	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIHYLEHAARGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGYISFPLSAIFTT
485	PRT	人工	Luk606	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYLESYPRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIYGVKGGYLSPLSAIFTT
486	PRT	人工	Luk607	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYHEWVPWGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYFVVIHGVKGGTISFPLSAIFTT
487	PRT	人工	Luk608	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYGEYENGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVFIIGVKGGPDSLPLSAIFTT
488	PRT	人工	Luk609	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF DIRYWEGPGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYRVRIVGVKGGKRSEPLSAIFTT
489	PRT	人工	Luk610	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF FIYYGEYDPVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVIIQGVKGGQASGPLSAIFTT
490	PRT	人工	Luk611	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIAYAEFWRYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVWNIAGVKGGGEWSKPLSAIFTT
491	PRT	人工	Luk612	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYQEESKYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHGVKGGAISQPLSAIFTT
492	PRT	人工	Luk613	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF NIFYIETDKPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVAIHGVKGGFISEPLSAIFTT
493	PRT	人工	Luk614	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIFYTEPVGHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVAIHGVKGGTISPPLSAIFTT

10

20

30

40

494	PRT	人工	Luk615	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYIEHRLQGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYLVLIHG VKGGFISPLSAIFTT
495	PRT	人工	Luk616	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIFYHEGLKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHG VKGGTISNPLSAIFTT
496	PRT	人工	Luk617	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYHETRVTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHG VKGGYISEPLSAIFTT
497	PRT	人工	Luk618	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIFYQEAVEGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIHG VKGGWISQPLSAIFTT
498	PRT	人工	Luk619	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QILYVEEFTRGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVIHG VKGGYISKPLSAIFTT
499	PRT	人工	Luk620	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TYIEALGFGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYFVAIYG VKGGYISEPLSAIFTT
500	PRT	人工	Luk621	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIFYLEHWNPGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVPIHG VKGG SISPLSAIFTT
501	PRT	人工	Luk622	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIFYVEWEVVG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVVIHG VKGGVISNPLSAIFTT
502	PRT	人工	Luk623	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYLEESKNGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYQVVIHG VKGGVISPLSAIFTT
503	PRT	人工	Luk624	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYNEDHKSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVVIHG VKGGYISKPLSAIFTT

10

20

30

40

504	PRT	人工	Luk625	LPAPKNLVVSRVPEDSARLSWTAPDAAFDSF LIDYQEWHEGEAIHLLVPGSERSYDLTGLKPG TEYAVIIVGVKGGKGSHPLSAIFTT
505	PRT	人工	Luk626	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPYAAFDSF WIGYYETTIPGEAIDLVPVPGSERSYDLTGLKPG GTEYGVGIDGVKGGRYSHPLSAIFTT
506	PRT	人工	Luk627	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIFYKEEAIPGEAIALIVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVPIHGVKGGYISTPLSAIFTT
507	PRT	人工	Luk628	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIDYTELHNWGEAIHLFVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVLIVGVKGGTGSIPLSAIFTT
508	PRT	人工	Luk629	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YITYEEEEWWTGEAIFLDVPGSERSYDLTGLKPG GTEYLVTIKGVKGGPWSQPLSAIFTT
509	PRT	人工	Luk630	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF AIWYHEWGPVGEAILLYVPGSERSYDLTGLKPG PGTEYPVAIHGVKGGGTSHPLSAIFTT
510	PRT	人工	Luk631	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYEELRYKGEAIWLFVPGSERSYDLTGLKPG GTEYHVHIWGVKGGYFSRPLSAIFTT
511	PRT	人工	Luk632	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IDYWEQWNTGEAIHLYVPGSERSYDLTGLKPG GTEYSVYIVGVKGGYASWPLSAIFTT
512	PRT	人工	Luk633	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYDENHLYGEAIDLVPVPGSERSYDLTGLKPG PGTEYTVSIAGVKGGLESFPLSAIFTT
513	PRT	人工	Luk634	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPEAAFDSF HISYWEFPLGGEAIGLWVPGSERSYDLTGLKPG GTEYFVIIAGVKGGEFNSNPLSAIFTT

10

20

30

40

514	PRT	人工	Luk635	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFI IEYHEWFAKGEAIGLVVPGSERSYDLTGLKPG TEYSVIIVGVKGGAYSFPLSAIFTT
515	PRT	人工	Luk636	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LIDYWEGEFDGEAIHLFVPGSERSYDLTGLKP GTEYDVFIVGVKGGHGS DPLSAIFTT
516	PRT	人工	Luk637	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF QIPYYELDSVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVGIYGVKGGYISPLSAIFTT
517	PRT	人工	Luk638	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIGYGEYDPTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVLISGVKGGYYS DPLSAIFTT
518	PRT	人工	Luk639	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIYYLESVARGEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVPIYGVKGGYISYPLSAIFTT
519	PRT	人工	Luk640	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIPYWESYYSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYVVAIYGVKGGYISSPLSAIFTT
520	PRT	人工	Luk641	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIYYGEYHSGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVLIDGVKGGLYSGPLSAIFTT
521	PRT	人工	Luk642	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIVYAEYYWYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYYVYIAGVKGGYGS DPLSAIFTT
522	PRT	人工	Luk643	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIPYYESNLGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIYGVKGGHISSPLSAIFTT
523	PRT	人工	Luk644	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TILYYELIDSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYFVGIYGVKGGYISLPLSAIFTT

10

20

30

40

524	PRT	人工	Luk645	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WISYGEYWPSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYFVLIRGVKGGDYSNPLSAIFTT
525	PRT	人工	Luk646	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF RIFYGEYDGGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVYIYGVKGGYISQPLSAIFTT
526	PRT	人工	Luk647	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SIYYGEWDPTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVLIVGVKGGSTSAPLSAIFTT
527	PRT	人工	Luk648	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIGYEEYYLVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYLVWIKGVKGGYVGRPLSAIFTT
528	PRT	人工	Luk649	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIAYSERVRYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGISGVKGGPYSEPLSAIFTT
529	PRT	人工	Luk650	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF TIHYYESYTVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYWVGIYGVKGGYISEPLSAIFTT
530	PRT	人工	Luk651	LPAPKNLVLSRVTEDESARLSWAQATYYQFDS FLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVLEVIPKLRKYVYSNPLSAIFT T
531	PRT	人工	Luk652	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSEVEDIPFDSF LIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVLEHYNRGQHPWHSNPLSAIFTT
532	PRT	人工	Luk653	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNLEVAFYFDS FLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVLEHLDEVWWTANLSNPLSAIF TT

10

20

30

40

533	PRT	人工	Luk654	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSHFPNDWFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVHYWQFDIQSNPLSAIFTT
534	PRT	人工	Luk655	LPAPKNLVVCRVTEDSARLSWRTYTSDAGFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVHEHAHIQYWHWSNPLSAI FTT
535	PRT	人工	Luk656	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKREQWANYF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWEHLYKELWSYTSNPLS AIFTT
536	PRT	人工	Luk657	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSELEARTHFD SFLIQYQESEKVSEAIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVAQQLVAWRGSNPLSAIFTT
537	PRT	人工	Luk658	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRARLDLPFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVDAWIPTVGSNPLSAIFTT
538	PRT	人工	Luk659	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWINYWVLNYFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVWPQDHEWIDSNPLSAIF TT
539	PRT	人工	Luk660	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYREVDFTTFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVSSYYILHSNPLSAIFTT
540	PRT	人工	Luk661	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF LITYREQIFAGEVIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYPVCIYGVKGGPISDPLSAIFTT
541	PRT	人工	Luk662	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VINYREVINEGEAILHVPGSERSYRPERSETG YRIHRHHSWC

10

20

30

40

542	PRT	人工	Luk663	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVHNHLAFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVPEYVYAQYESNPLSAIFTT	
543	PRT	人工	Luk664	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRKSGAPFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVHGWDPGSDSNPLSAIFTT	
544	PRT	人工	Luk665	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVHVRGHDFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVWLPTTDSNPLSAIFTT	10
545	PRT	人工	Luk666	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSPDRARFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVWSWDNDDASNPLSAIFTT	
546	PRT	人工	Luk667	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFAGLQLFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGV DWTVEEQSYHLWSNPLSAIFT T	20
547	PRT	人工	Luk668	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTIPHYTFDSFLI QYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVPGKYIEPRWHFSNPLSAIFTT	
548	PRT	人工	Luk669	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRYSWLFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVLTWDPNDPSNPLSAIFTT	30
549	PRT	人工	Luk670	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKTIVTTIFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGV DHRGFPFWQYWSSNPLSAIFT T	
550	PRT	人工	Luk671	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYARRIYFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVETPNPYDSDSNPLSAIFTT	40

551	PRT	人工	Luk672	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNLEQSTFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVTTYRITVPVRDHSNPLSAIFTT	
552	PRT	人工	Luk673	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRAAGTGFDSEF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVNWQPDYWTWPSNPLSAIFTT	
553	PRT	人工	Luk674	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPISHLSFDSFLI QYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVWHQTVGRWFSNPLSAIFTT	10
554	PRT	人工	Luk675	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVRKKVNRFDSE FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVRNWKPNPNSNPLSAIFTT	
555	PRT	人工	Luk676	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVSATQHPFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVNDWDPTDPSNPLSAIFTT	20
556	PRT	人工	Luk677	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPIALRDFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVISWDPTDPSNPLSAIFTT	
557	PRT	人工	Luk678	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDAEWFAPH FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVGLLKWPNYAVLSNPLS AIFTT	30
558	PRT	人工	Luk679	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPNNQRYYPF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVLSWNP HHWSNPLSAIFTT	
559	PRT	人工	Luk680	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYDARVTDEFF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVDDLLTNHLLAISNPLSAIF TT	40

560	PRT	人工	Luk681	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKKRNTLKIFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVETWDPNDWSNPLSAIFTT
561	PRT	人工	Luk682	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLNVRKPNDFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVITWHPGHWSNPLSAIFTT
562	PRT	人工	Luk683	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLTVRFTKFEF DSFLIQYQESEKVGAEIVLIVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVRSSKPRASNPLSAIFTT
563	PRT	人工	Luk684	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPNYRKVVSVF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVHTWHPGHYSNPLSAIFTT
564	PRT	人工	Luk685	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGNRQQVRSF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVGWHPNHPSNPLSAIFTT
565	PRT	人工	Luk686	LPARKTWLFLVLPKTLRVCLGPRRTRRSTLFG LRTQRLLSGGKRLACWCRVLNVLTT
566	PRT	人工	Luk687	LPARKTWLFLVLPKTLRVCLGPRRTRRSTLSG LHTQRRHPGVKRSA
567	PRT	人工	Luk688	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIEGGEYYYVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVPIGGVKGGPNSHPLSAIFTT
568	PRT	人工	Luk689	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWFYLTSWFAF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVKVDPHVRSNPLSAIFTT
569	PRT	人工	Luk690	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYHVNFQFFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVYEDYPVIIFNNRSNPLSAIFT T

10

20

30

40

570	PRT	人工	Luk691	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEDIKNKRFDSE LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVRGLANPFRVSNPLSAIFTT
571	PRT	人工	Luk692	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWRYGPWFHF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVRTHVRPPQWVSNPLSAIF TT
572	PRT	人工	Luk693	LPAPKAAVVSRVTEDSARLSWWRYGPWFHF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVRTHVRPPQWVSNPLSAIF TT
573	PRT	人工	Luk694	LPAPKNLGCFCYRRLCPSVLD
574	PRT	人工	Luk695	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLNWEQYITFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGWIIIRDRSHWLNPSNPLSAIF TT
575	PRT	人工	Luk696	LPAPKNLWLFLVLPKTLPVCLGGVMARGSTS TLS
576	PRT	人工	Luk697	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWERFGPWFFHD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVKTQPEQEFKSNPLSAIFTT
577	PRT	人工	Luk698	LPAPKNPGFCFCYRRLCPSVLVALWPVVPLR LFPDPVPGIRKSW
578	PRT	人工	Luk699	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWRYGPWFHF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVKQHSLFHSNPLSAIFTT

10

20

30

40

579	PRT	人工	Luk700	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWNQQLNYQYF DSFLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWYRWWSGSNPLSAIFTT
580	PRT	人工	Luk701	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSW WRYGPWFHF DSFLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGV RTHNNQPGHYTSNPLSAI FTT
581	PRT	人工	Luk702	LPAPTKNGCFSCYRRLCPSVLVALWPVVPLR LFPDPVPGIRKSW
582	PRT	人工	Luk703	LPAPKALVVS RVTEDSARLSW WRYGPWFHF DSFLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGV RTHVRPPQWVSNPLSAIF TT
583	PRT	人工	Luk704	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PILYQERWWKGEAI VLTVP GSERSYDLTGLK PGTEYGVPI TGVKGGV SFPLSAIFTT
584	PRT	人工	Luk705	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HIWYRESWYFGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKP GTEYYVVIRGVKGG SLSWPLSAIFTT
585	PRT	人工	Luk706	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF PISYYEQPRRGEAI WLFVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVYITGVKGG TWSFPLTATFTT
586	PRT	人工	Luk707	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSF GIEYYETKTKGEAI NLFVPGSERSYDLTGLKP GTEYYVIILGVKGG EPSSPLVAPFTT
587	PRT	人工	Luk708	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWKDVGEWKFD SFLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGV HQLTITYSPTS NPLSAIFTT
588	PRT	人工	Luk709	LPAPKNLVVS RVTEDSARLSWKRSYHPNFDS FLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGV IDVPTVYHPGRSNPLSAIFTT

10

20

30

40

589	PRT	人工	Luk710	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWLKKVSKFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVGEFPDRIYWGASNPLSAIFTT
590	PRT	人工	Luk711	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYYWVQTIFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVGNLDPDIFYKLPNPLSAIFTT
591	PRT	人工	Luk712	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSKKLENFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVYHHLIFSNPLSAIFTT
592	PRT	人工	Luk713	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWHDLTIWPFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVVIEFEAWSNPLSAIFTT
593	PRT	人工	Luk714	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFPWTEWSAFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVENWLVLATATWSNPLSAIF TT
594	PRT	人工	Luk715	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVEWWIRPIEF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWQQLYVEILISNPLSAIFT T
595	PRT	人工	Luk716	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSSQRTLPREFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVHVIIHSGSSNPLSAIFTT
596	PRT	人工	Luk717	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTSRLEDWFWD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVGSEVYFRYYEHWSNPLSAI FTT
597	PRT	人工	Luk718	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQVNRNAQFHF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVHPKLVWFAPPSNPLSAI FTT

10

20

30

40

598	PRT	人工	Luk719	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTFLEKWFIFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVKHHDHDPEYPSNPLSAIFT T
599	PRT	人工	Luk720	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRHPRIQGGHF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVHHPFWWSPSNPLSAIFTT
600	PRT	人工	Luk721	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNAKKITPFF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVYPEVQHTTSNPLSAIFTT
601	PRT	人工	Luk722	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTEPWQEFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVILPTLHKS NPLSAIFTT
602	PRT	人工	Luk723	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYRFPRIHFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVHTNIDLHNYNLSNPLSAIFT T
603	PRT	人工	Luk724	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAERHPWFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVLRQNIQDTNYSNPLSAIFTT
604	PRT	人工	Luk725	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPWWEGWTFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVKIRTLKASRSNPLSAIFTT
605	PRT	人工	Luk726	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAANFIDFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVYSPKLRWDLNYSNPLSAIFTT
606	PRT	人工	Luk727	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFKQEFEFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYTVSIYGVYYPEYYPREPWPSNPLSAIFTT

10

20

30

40

607	PRT	人工	Luk728	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEDEGTQFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVHWYWYQRSNPLSAIFTT
608	PRT	人工	Luk729	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFGNQTGARSF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVYYQFRRTVRNSNPLSAIF TT
609	PRT	人工	Luk730	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGENRFVLSFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVLYHARHTWWLQQSNPLSAI FTT
610	PRT	人工	Luk731	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEKQQLKKWSF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTGTYTVSIYGVVHSNTRKRHSNPLSAIFT T
611	PRT	人工	Luk732	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKINDNSGYFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVAHRYENNPTLWSNPLSAIF TT
612	PRT	人工	Luk733	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPAFRWQPPGF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVGGFLYPWNYPTSNPLSAI FTT
613	PRT	人工	Luk734	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWISEKPTTSLFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVWPRAIHAYWFNSNPLSAI FTT
614	PRT	人工	Luk735	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQKSFQLTPFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVVEYKWAATNPSNPLSAIFT T

10

20

30

40

615	PRT	人工	Luk736	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNASLNANHFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVTSESNYGSNPLSAIFTT
616	PRT	人工	Luk737	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTNTARLNKFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVAITHSHHHHSSNPLSAIFTT
617	PRT	人工	Luk738	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF HILYWEPTPIGEAILLNVPGSERSYDLTGLKPG TEYNVEIDGVKGGNPSDPLSAIFTT
618	PRT	人工	Luk739	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF SISYREGGQHGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYSVYILGVKGGDESEPLSAIFTT
619	PRT	人工	Luk740	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPWWNKHFD FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVIQWKKKPFNSPLSAIFTT
620	PRT	人工	Luk741	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPWWNKHFD FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVGEHDWYLLNYAESNPLSAIF TT
621	PRT	人工	Luk742	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWAFSYLQFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVEVRENSWNHSSNPLSAIFT T
622	PRT	人工	Luk743	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRETHNPQFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVIQWKKKPFNSPLSAIFTT
623	PRT	人工	Luk744	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTRVDEFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG GTEYTVSIYGVKWYNWKKNVNTESNPLSAIF TT

10

20

30

40

624	PRT	人工	Luk745	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSQKDINFFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVLWYNWKKKNWDNSNPLSAIFT T
625	PRT	人工	Luk746	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWFTTNNHWFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVIQWKKKPFNSNPLSAIFTT
626	PRT	人工	Luk747	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGRAREPASFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVLTVLFIDSSNPLSAIFTT
627	PRT	人工	Luk748	LPAPKNLVVSRVTEDSVRLSWYNWKKKRLK FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVPNLWDIWNWVLSNPLS AIFTT
628	PRT	人工	Luk749	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGTFNLEVYIFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVSANWHGHSNPLSAIFTT
629	PRT	人工	Luk750	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPQIFNELWEF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWWYNRKKKRQSNPLSAI FTT
630	PRT	人工	Luk751	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNEQKKPINF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVWWYNRKKKRQSNPLSAI FTT
631	PRT	人工	Luk752	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRGKYSVVDFFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVPWYNWKKKYVISNPLSAIF TT

10

20

30

40

632	PRT	人工	Luk753	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNTKKNPVFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGWVLIKSLNAWFSNPLSAIFT T
633	PRT	人工	Luk754	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF VIIIEEVQWRGEAIRLFVPGSERSYDLTGLKP GTEYDVNIRGVKGGSSAPLSAIFTT
634	PRT	人工	Luk755	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNWKKKPGY FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVVHYHEWLASNPLSAIFT T
635	PRT	人工	Luk756	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYTVKKKPKQKF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVLDAYPIAEWPAQSNPLSA IFTT
636	PRT	人工	Luk757	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNTKKKPKQFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVNEFILRWEGSNPLSAIFTT
637	PRT	人工	Luk758	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF YIGYYELIGAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYGVGIQGVKGGSYSAPLSAIFTT
638	PRT	人工	Luk759	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYDRKVEFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVGVGDGWGYLLLVSNSPLSAIFTT
639	PRT	人工	Luk760	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIVPRTFHDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVWSQYITHWLPKSNPLSAIFTT
640	PRT	人工	Luk761	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNYRVATFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVSVELLSSNPLSAIFTT

10

20

30

40

641	PRT	人工	Luk762	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQPHRYEFYQF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVADFEFELHSNPLSAIFTT
642	PRT	人工	Luk763	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIPSYHLFAFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVNDAEQRYHHSNPLSAIFTT
643	PRT	人工	Luk764	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPINKTTSPFDS FLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGTEYTVSIYGVVEAHYDAFISNPLSAIFTT
644	PRT	人工	Luk765	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRKKLWEAEFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVILPDSFHVHHCNPLSAIFTT
645	PRT	人工	Luk766	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRQWRRLFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVGVNWPASVSSNPLSAIFTT
646	PRT	人工	Luk767	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIWDAIGPHFFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVSWFIRITASNPLSAIFTT
647	PRT	人工	Luk768	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRGLEPRWGF SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVWPWYEHLRILNATSNPLSAIF TT
648	PRT	人工	Luk769	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDWWSNPIKFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVINWHWYQTHRTSNPLSAIF TT
649	PRT	人工	Luk770	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEQWHAGVNP FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVSYVVRVLQFALFSNPLS AIFTT

10

20

30

40

650	PRT	人工	Luk771	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAQVETQIHFD SFLIQYQESEKVGESDLLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVSHYRRHVPRHSNPLSAIFT T
651	PRT	人工	Luk772	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIAYYYGQTFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVWHENYAKWPDPNSPLSAI FTT
652	PRT	人工	Luk773	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWHWLTHHFF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVFFRWQDPLHDLISNPLSAI FTT
653	PRT	人工	Luk774	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKYKEHFQIFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVVERIWWQYRSNPLSAIFTT
654	PRT	人工	Luk775	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVGDAYFNHLF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVVEARPKPRLSNPLSAIFTT
655	PRT	人工	Luk776	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNKRVPNFDSF LIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYTVSIYGVIQWKKKPFNSPLSAIFTT
656	PRT	人工	Luk777	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNEQKRSFF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVPIRRSGWDVRSNPLSAIFT T
657	PRT	人工	Luk778	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNTKKKPVFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVKVDDWPDYWQSNPLSAIF TT

10

20

30

40

658	PRT	人工	Luk779	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNVKKTFQFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVAADVWYTPNTQSNPLSAIFT T
659	PRT	人工	Luk780	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNSKKKVQFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGVIESHWWQLKWPSNPLSAIF TT
660	PRT	人工	Luk781	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNTKKKTAF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVDEVGYLHIETSNPLSAIFT T
661	PRT	人工	Luk782	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNEKKIFQFD SFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGTEYTVSIYGAKGPNFPSQNDPSSNPLSAIF TT
662	PRT	人工	Luk783	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYNWKKKRLK FDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYTVSIYGVASPVYTGLYLGSNPLSA IFTT
663	PRT	人工	Luk784	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYTVKKKPQKF DSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVSIYGVGDQLEIGRTGSNPLSAIF TT
664	PRT	人工	Luk785	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF FIGYREVPFLGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYIVLIWGVKGGIPSQPLSAIFTT
665	PRT	人工	Luk786	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF FIPYREEAPLGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYDVIIWGVKGGYPSKPLSAIFTT

10

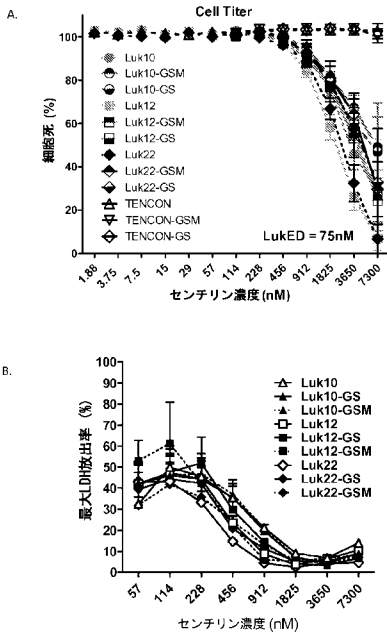
20

30

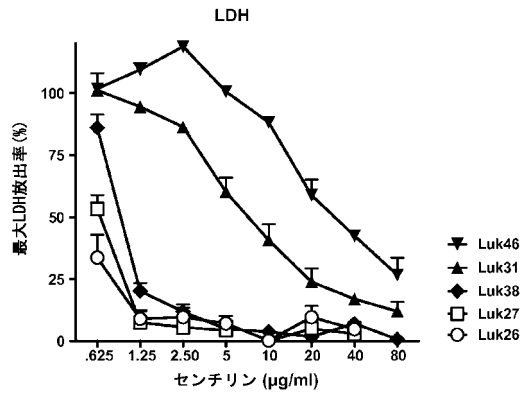
40

666	PRT	人工	Luk787	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIVYHELVHSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP GTEYPPVFIIVGVKGGWYSPPLSAIFTT
667	PRT	人工	TCL24	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFXIXYEXXXXGEAIXLVPGSERSYD LTGLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLXA XFTT

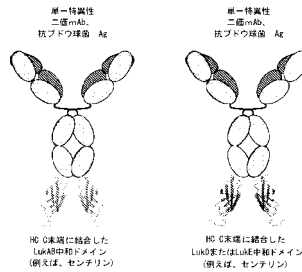
【 図 1 】



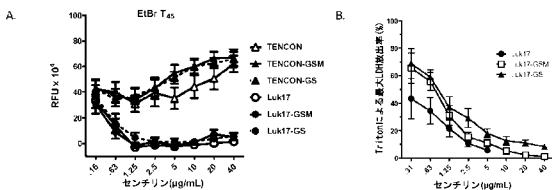
【 図 3 】



【 図 4 A 】

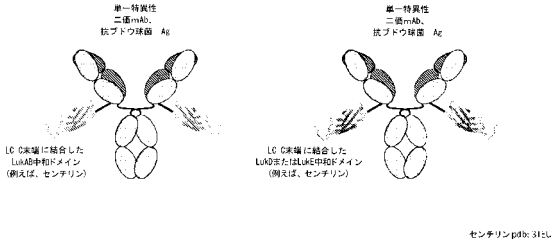


【 図 2 】

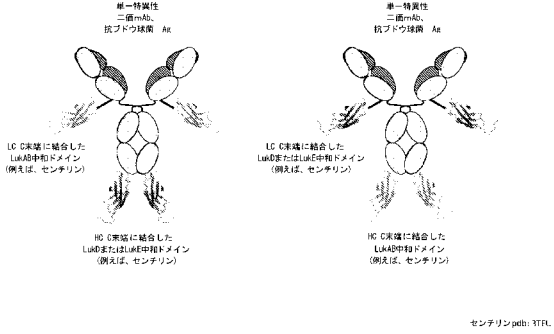


センチリンpH: 3TEU

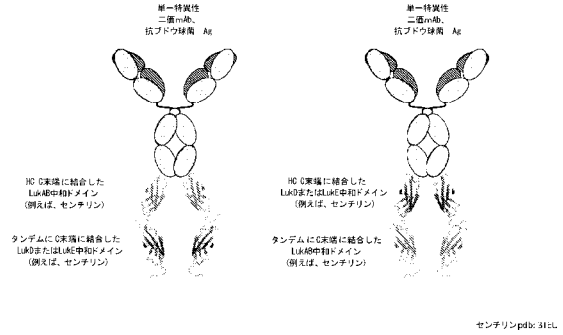
【図 4 B】



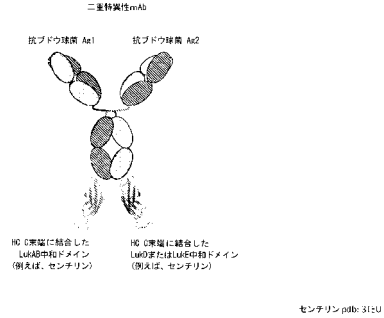
【図 4 C】



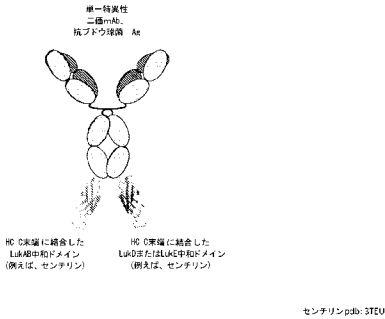
【図 4 D】



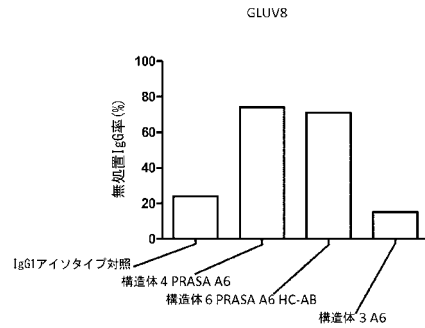
【図 4 E】



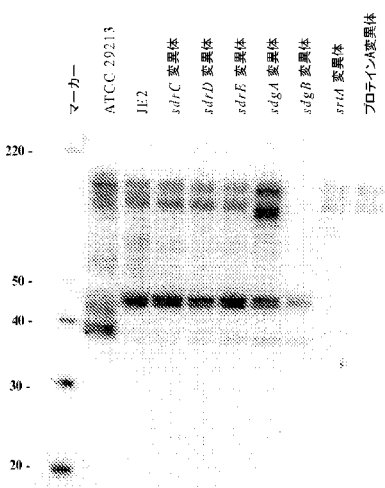
【図 4 F】



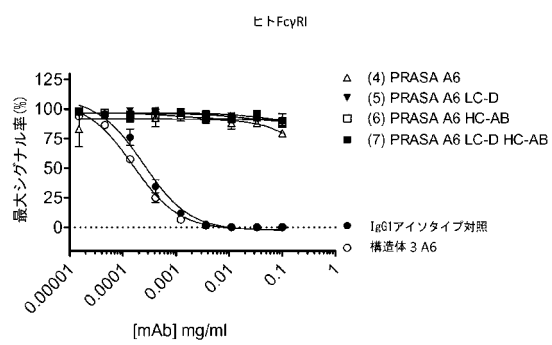
【図 6】



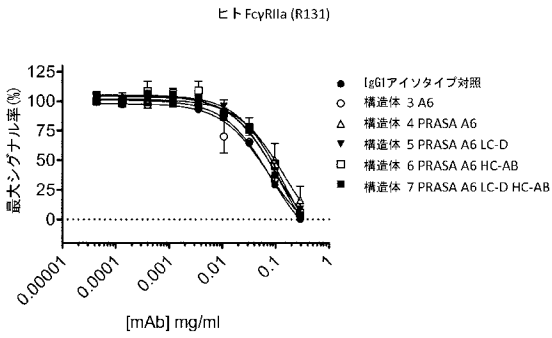
【図 5】



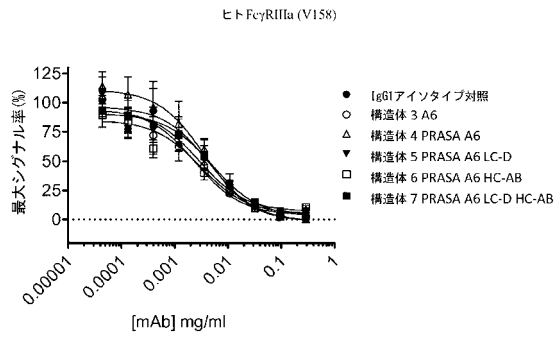
【図 7 A】



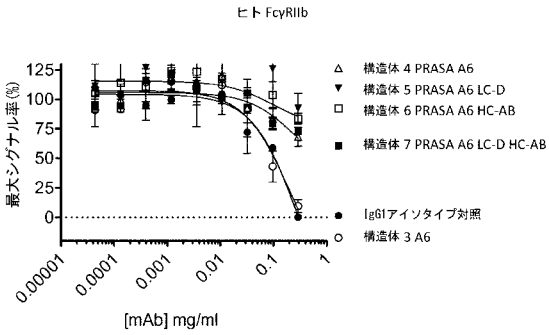
【 図 7 B 】



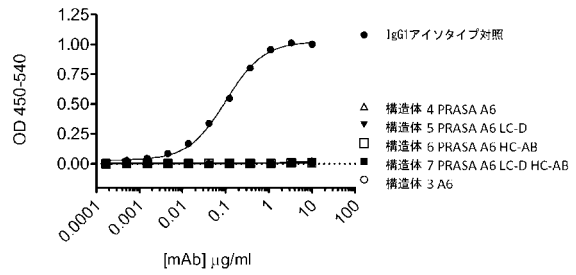
【 図 7 D 】



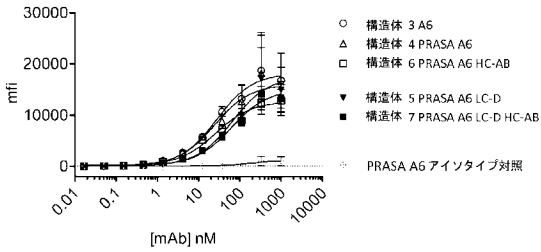
【 図 7 C 】



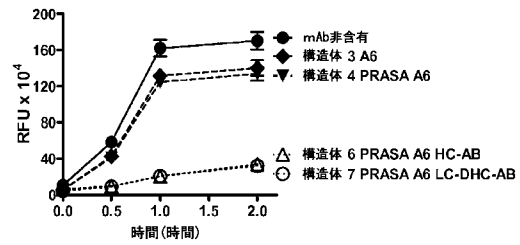
【 図 8 】



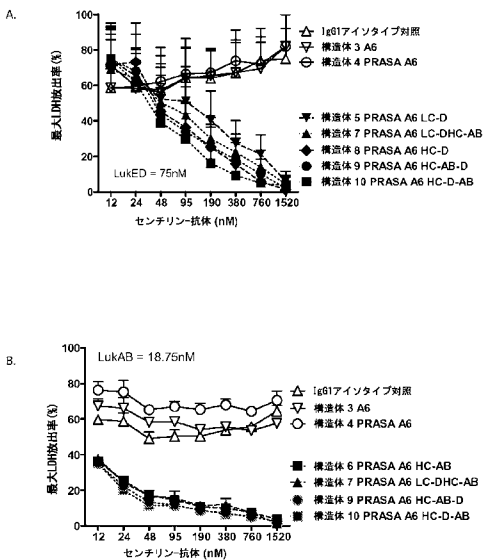
【 図 9 】



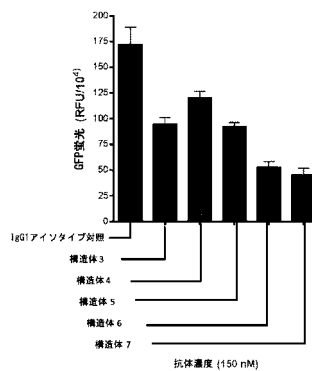
【 図 11 】



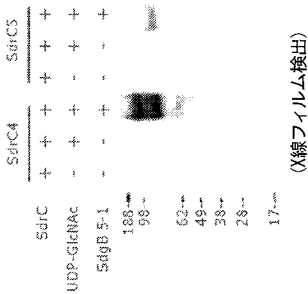
【 図 10 】



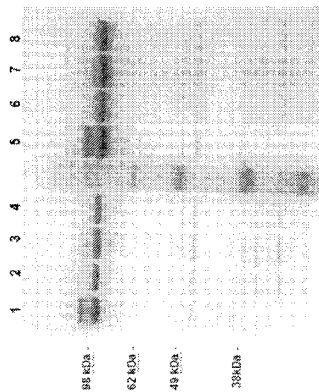
【 図 12 】



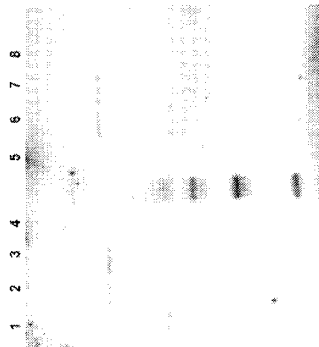
パネルA: ウェスタンブロット (mAb 5133)



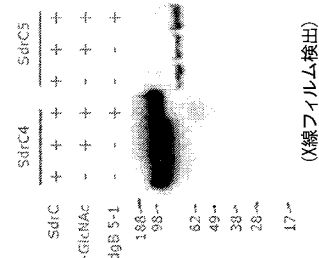
パネルA: コロイドブルー染色ゲル



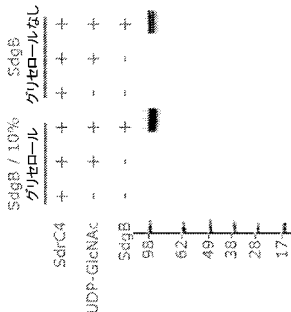
パネルB: mAb 5133 ウェスタンブロット



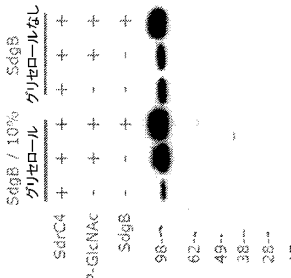
パネルB: ウェスタンブロット (抗His)



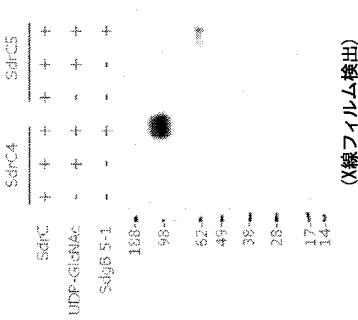
ウェスタンブロット: mAb 5133



ウェスタンブロット 抗His



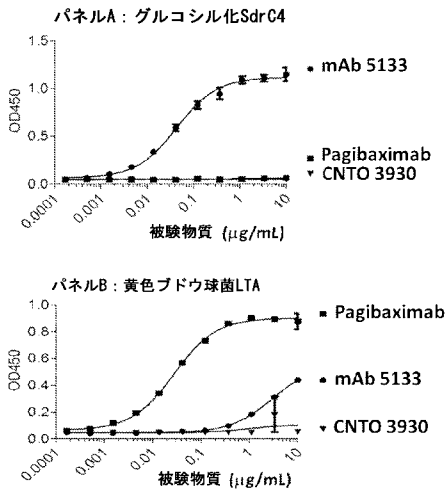
パネルA: ウェスタンブロット (mAb 5133)



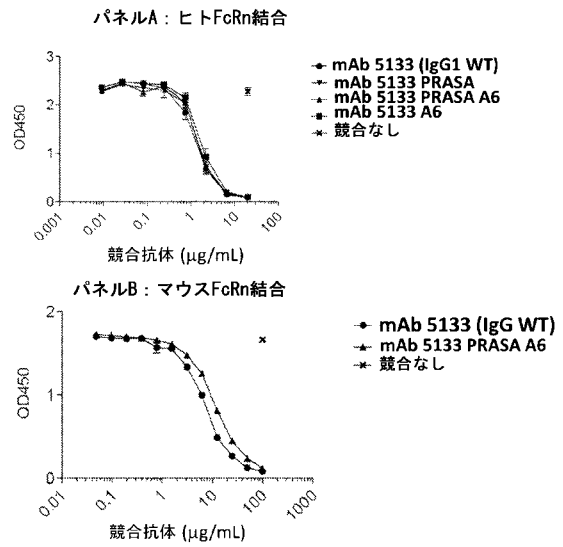
パネルB: ウェスタンブロット (抗His)



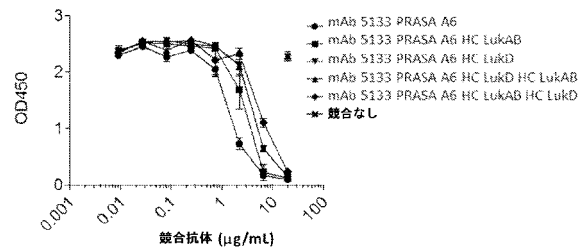
【 図 1 5 】



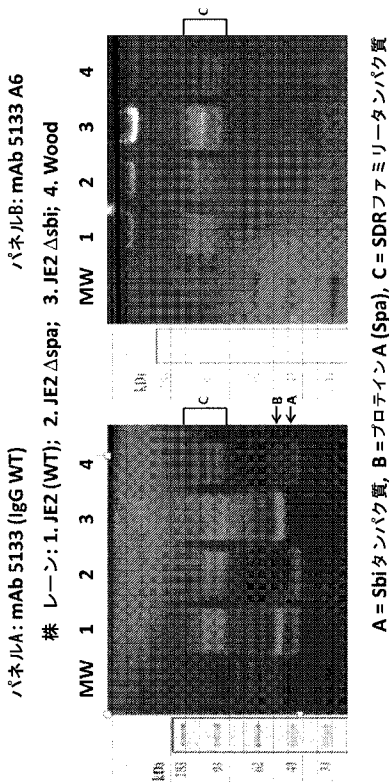
【 図 1 6 】



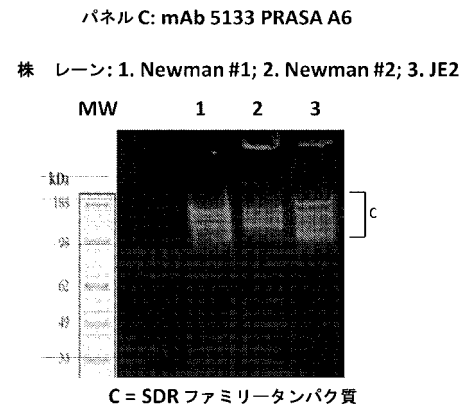
【 図 1 7 】



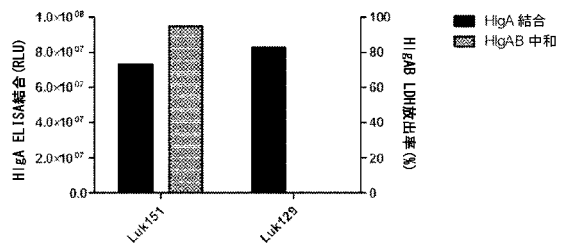
【 図 1 8 A 】



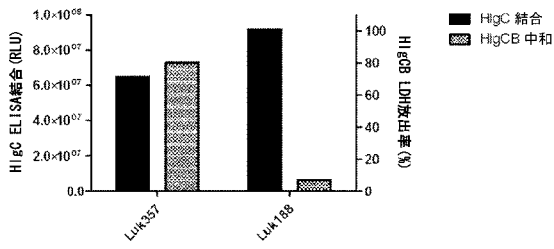
【 図 1 8 B 】



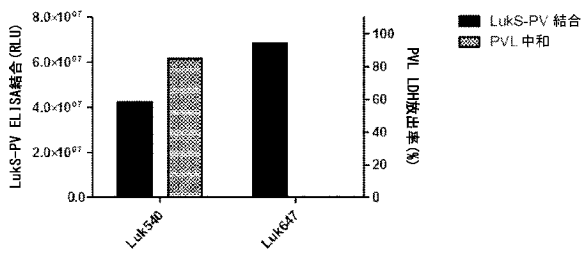
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成28年8月18日 (2016.8.18)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2017502002000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C07K 16/00, 16/12; G01N 33/569 (2015.01) CPC - C07K 16/1271, 8/1214 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B): C07K 16/00, 16/12; G01N 33/569; A61K 39/40, 39/00; C07K 16/00; C12P 21/08 (2015.01) CPC: A61K 38/00, 39/00, 2039/505; C07K 16/1271, 2317/24, 16/1214; USPC: 530/387.1, 387.3, 386, 380, 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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data) Google; Google Scholar; EBSCO; Dialog ProQuest; 'Binding molecule,' antibody, immunoglobulin, 'glycosylated staphylococcal surface protein,' 'SDR,' 'clumping factor,' 'serine-aspartate dipeptide repeat,' 'staphylococcal leukotoxin'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2013/096948 A1 (LYDON, NB) June 27, 2013; entire document	1-5, 9-11, 21-23, 29, 30/1-30/5, 30/9-30/11, 30/21-30/23, 30/29, 31/30/1-31/30/5, 31/30/9-31/30/11, 31/30/21-31/30/23, 31/30/29, 32/31/30/1-32/31/30/5, 32/31/30/9-32/31/30/11, 32/31/30/21-32/31/30/23, 32/31/30/29, 33/32/31/30/1-33/32/31/3 0/5, 33/32/31/30/9-33/32/31/3 0/11, 33/32/31/30/21-33/32/31/ 30/23, 33/32/31/30/29, 34/1-34/5, 34/9-34/11, 34/21-34/23, 34/29, 34/33/32/31/30/1-34/33/3 2/31/30/5, 34/33/32/31/30/9-34/33/3 2/31/30/11, 34/33/32/31/30/21-34/33/ 32/31/30/23, 34/33/32/31/30/29, 35/1-35/5, 35/9-35/11,
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 July 2015 (10.07.2015)		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

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

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

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

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

- 3. Claims Nos.: 45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

.-***-Please See Supplemental Page-***-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Groups I+: Claims 1-14, 15 (in-part), 16, 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21-23, 24 (in-part), 25 (in-part), 26 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part), 29-44 + SEQ ID NOs: 10, 11, 14, 60, 61

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		35/21-35/23, 35/29, 35/33/32/31/30/1-35/33/3 2/31/30/4, 35/33/32/31/30/9-35/33/3 2/31/30/11, 35/33/32/31/30/21-35/33/ 32/31/30/23, 35/33/32/31/30/29, 36/1-36/4, 36/9-36/11, 36/21-36/23, 36/29, 36/33/32/31/30/1-36/33/3 2/31/30/4, 36/33/32/31/30/9-36/33/3 2/31/30/11, 36/33/32/31/30/21-36/33/ 32/31/30/23, 36/33/32/31/30/29, 37/36/1-37/36/4, 37/36/9-37/36/11, 37/36/21-37/36/23, 37/36/29, 37/36/33/32/31/30/1-37/3 3/32/31/30/4, 37/33/32/31/30/9-37/33/3 2/31/30/11, 37/33/32/31/30/21-37/33/ 32/31/30/23, 37/33/32/31/30/29, 38/37/36/1-38/37/36/4, 38/37/36/9-38/37/36/11, 38/37/36/21-38/37/36/23, 38/37/36/29, 38/37/36/33/32/31/30/1-3 8/37/33/32/31/30/4, 38/37/33/32/31/30/9-38/3 7/33/32/31/30/11, 38/37/33/32/31/30/21-38/ 37/33/32/31/30/23, 38/37/33/32/31/30/29, 39/36/1-39/36/4, 39/36/9-39/36/11, 39/36/21-39/36/23, 39/36/29, 39/36/33/32/31/30/1-39/3 3/32/31/30/4, 39/33/32/31/30/9-39/33/3 2/31/30/11, 39/33/32/31/30/21-39/33/ 32/31/30/23, 39/33/32/31/30/29, 40/36/1-40/36/4, 40/36/9-40/36/11, 40/36/21-40/36/23, 40/36/29, 40/36/33/32/31/30/1-40/3 3/32/31/30/4, 40/33/32/31/30/9-40/33/3 2/31/30/11, 40/33/32/31/30/21-40/33/ 32/31/30/23, 40/33/32/31/30/29 ----- 8, 12-15, 18, 30/8, 30/12-30/15, 30/18, 31/30/8, 31/30/12-31/30/15, 31/30/18, 32/31/30/8, 32/31/30/12-32/31/30/15, 32/31/30/18, 33/32/31/30/8,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		33/32/31/30/12-33/32/31/30/15, 33/32/31/30/18, 34/8, 34/12-34/15, 34/18, 34/33/32/31/30/8, 34/33/32/31/30/12-34/33/32/31/30/15, 34/33/32/31/30/18, 35/8, 35/12-35/15, 35/18, 35/33/32/31/30/8, 35/33/32/31/30/12-35/33/32/31/30/15, 35/33/32/31/30/18, 36/8, 36/12-36/15, 36/18, 36/33/32/31/30/8, 36/33/32/31/30/12-36/33/32/31/30/15, 36/33/32/31/30/18, 37/36/8, 37/36/12-37/36/15, 37/36/18, 37/36/33/32/31/30/8, 37/36/33/32/31/30/12-37/36/33/32/31/30/15, 37/36/33/32/31/30/18, 38/37/36/8, 38/37/36/12-38/37/36/15, 38/37/36/18, 38/37/36/33/32/31/30/8, 38/37/36/33/32/31/30/12-38/37/36/33/32/31/30/15, 38/37/36/33/32/31/30/18, 39/36/8, 39/36/12-39/36/15, 39/36/18, 39/36/33/32/31/30/8, 39/36/33/32/31/30/12-39/36/33/32/31/30/15, 39/36/33/32/31/30/18, 40/36/8, 40/36/12-40/36/15, 40/36/18, 40/36/33/32/31/30/8, 40/36/33/32/31/30/12-40/36/33/32/31/30/15, 41/8, 41/12-41/15, 41/18, 42/8, 42/12-42/15, 42/18, 43/8, 43/12-43/15, 43/18, 44/8, 44/12-44/15, 44/18 ----- 6, 7, 30/6, 30/7, 31/30/6, 31/30/7, 32/30/6, 32/30/7, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 34/6, 34/7,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		34/33/32/31/30/6, 34/33/32/31/30/7, 35/6, 35/7, 35/33/32/31/30/6, 35/33/32/31/30/7, 36/6, 36/7, 36/33/32/31/30/6, 36/33/32/31/30/7, 37/36/6, 37/36/7, 37/36/33/32/31/30/6, 37/36/33/32/31/30/7, 38/37/36/6, 38/37/36/7, 38/37/36/33/32/31/30/6, 38/37/36/33/32/31/30/7, 39/36/6, 39/36/7, 39/36/33/32/31/30/6, 39/36/33/32/31/30/7, 40/36/6, 40/36/7, 40/36/33/32/31/30/6, 40/36/33/32/31/30/7, 41/6, 41/7, 41/33/32/31/30/6, 41/33/32/31/30/7, 41/33/3
Y	US 7364738 B2 (PATTI, JM et al.) April 29, 2008; column 2, lines 30-34; column 8, line 46 - column 9, line 5	41-44
Y — A	BREZSKI, RJ et al. Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge. PNAS. 20 October 2009, Vol. 106, No. 42, pp 17864-17869; page 17864, second column, second paragraph; page 17865, first column, first paragraph; figure 1. DOI: 10.1073/pnas.0904174106.	5, 30/5, 31/30/5, 32/31/30/5, 33/32/31/30/5, 34/5, 34/33/32/31/30/5, 35/5, 35/33/32/31/30/5, 36/5, 36/33/32/31/30/5, 37/36/5, 37/36/33/32/31/30/5, 38/37/36/5, 38/37/36/33/32/31/30/5, 39/36/5, 39/36/33/32/31/30/5, 40/36/5 40/36/33/32/31/30/5, 41/5, 41/33/32/31/30/5, 42/5, 42/33/32/31/30/5, 43/5, 43/33/32/31/30/5, 44/5 ----- 6, 7, 30/6, 30/7, 31/30/6, 31/30/7, 32/30/6, 32/30/7, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 34/6, 34/7, 34/33/32/31/30/6, 34/33/32/31/30/7, 35/6, 35/7, 35/33/32/31/30/6, 35/33/32/31/30/7, 36/6, 36/7, 36/33/32/31/30/6, 36/33/32/31/30/7, 37/36/6, 37/36/7, 37/36/33/32/31/30/6, 37/36/33/32/31/30/7, 38/37/36/6, 38/37/36/7, 38/37/36/33/32/31/30/6, 38/37/36/33/32/31/30/7, 39/36/6, 39/36/7, 39/36/33/32/31/30/6, 39/36/33/32/31/30/7, 40/36/6, 40/36/7, 40/36/33/32/31/30/6, 40/36/33/32/31/30/7, 41/6, 41/7, 41/33/32/31/30/6, 41/33/32/31/30/7, 42/6, 42/7, 42/33/32/31/30/6,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/156534 A1 (ARSANIS BIOSCIENCES GMBH) October 24, 2013; page 18, lines 18-24	42/33/32/31/30/7, 43/6, 43/7, 43/33/32/31/30/8, 43/33/32/31/30/7, 44/6 44/7 8, 30/8, 31/30/8, 32/31/30/8, 33/32/31/30/8, 34/8, 34/33/32/31/30/8, 35/8, 35/33/32/31/30/8, 36/8, 36/33/32/31/30/8, 37/36/8, 37/36/33/32/31/30/8, 38/37/36/8, 38/37/36/33/32/31/30/8, 39/36/8, 39/36/33/32/31/30/8, 40/36/8, 40/36/33/32/31/30/8, 41/8, 41/33/32/31/30/8, 42/8, 42/33/32/31/30/8, 43/8, 43/33/32/31/30/8, 44/8
Y	KUO, TT et al. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. mAbs. 2011, Vol. 3, No. 5, pp 422-430; page 425, first column, second paragraph. DOI: 10.4161/mabs.3.5.16983.	12, 30/12, 31/30/12, 32/31/30/12, 33/32/31/30/12, 34/12, 34/33/32/31/30/12, 35/12, 35/33/32/31/30/12, 36/12, 36/33/32/31/30/12, 37/36/12, 37/36/33/32/31/30/12, 38/37/36/12, 38/37/36/33/32/31/30/12, 39/36/12, 39/36/33/32/31/30/12, 40/36/12, 40/36/33/32/31/30/12, 41/12, 41/33/32/31/30/12, 42/12, 42/33/32/31/30/12, 43/12, 43/33/32/31/30/12, 44/12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/049275 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) April 4, 2013; abstract	13-15, 30/13-30/15, 31/30/15-31/30/15, 32/31/30/15-32/31/30/15, 33/32/31/30/13-33/32/31/ 30/15, 34/13-34/15, 34/33/32/31/30/13-34/33/ 32/31/30/15, 35/13-35/15, 35/33/32/31/30/13-35/33/ 32/31/30/15, 36/13-36/15, 36/33/32/31/30/13-36/33/ 32/31/30/15, 37/36/13-37/36/15, 37/36/33/32/31/30/13-37/ 36/33/32/31/30/15, 38/37/36/13-38/37/36/15, 38/37/36/33/32/31/30/13- 38/37/36/33/32/31/30/15, 39/36/13-39/36/15, 39/36/33/32/31/30/13-39/ 36/33/32/31/30/15, 40/36/13-40/36/15, 40/36/33/32/31/30/13-40/ 36/33/32/31/30/15, 41/13-41/15, 41/33/32/31/30/13-41/33/ 32/31/30/15, 42/13-42/15, 42/33/32/31/30/13-42/33/ 32/31/30/15, 43/13-43/15, 43/33/32/31/30/13-43/33/ 32/31/30/15, 44/13-44/15
Y	US 2011/0274693 A1 (TORRES, VJ et al.) November 10, 2011; Claim 1	15, 18, 30/15, 30/18, 31/30/15, 31/30/18, 32/31/30/15, 32/31/30/18, 33/32/31/30/15, 33/32/31/30/18, 34/15, 34/18, 34/33/32/31/30/15, 34/33/32/31/30/18, 35/15, 35/18, 35/33/32/31/30/15, 35/33/32/31/30/18, 36/15, 36/18, 36/33/32/31/30/15, 36/33/32/31/30/18, 37/36/15, 37/36/18, 37/36/33/32/31/30/15, 37/36/33/32/31/30/18, 38/37/36/15, 38/37/36/18, 38/37/36/33/32/31/30/15, 38/37/36/33/32/31/30/18, 39/36/15, 39/36/18, 39/36/33/32/31/30/15, 39/36/33/32/31/30/18, 40/36/15, 40/36/18, 40/36/33/32/ 40/36/33/32/31/30/18, 41/15, 41/18, 41/33/32/31/30/15, 41/33/32/31/30/18, 42/15, 42/18, 42/33/32/31/30/15, 42/33/32/31/30/18, 43/15, 43/18, 43/33/32/31/30/15, 43/33/32/31/30/18, 44/15, 44/18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		16, 30/16, 31/30/16, 32/30/16, 33/32/31/30/16, 34/16, 34/33/32/31/30/16, 35/16, 35/33/32/31/30/16, 36/16, 36/33/32/31/30/16, 37/36/16, 37/36/33/32/31/30/16, 38/37/36/16, 38/37/36/33/32/31/30/16, 39/36/16, 39/36/33/32/31/30/16, 40/36/16, 40/36/33/32/31/30/16, 41/16, 41/33/32/31/30/16, 42/16, 42/33/32/31/30/16, 43/16, 43/33/32/31/30/16, 44/16
Y	US 2013/0245238 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) September 19, 2013; paragraph [0265]	18, 30/18, 31/30/18, 32/31/30/18, 33/32/31/30/18, 34/18, 34/33/32/31/30/18, 35/18, 35/33/32/31/30/18, 36/18, 36/33/32/31/30/18, 37/36/18, 37/36/33/32/31/30/18, 38/37/36/18, 38/37/36/33/32/31/30/18, 39/36/18, 39/36/33/32/31/30/18, 40/36/18, 40/36/33/32/31/30/18, 41/18, 41/33/32/31/30/18, 42/18, 42/33/32/31/30/18, 43/18, 43/33/32/31/30/18, 44/18
A	WO 2007/141274 A2 (CRUCCELL HOLLAND B.V.) December 13, 2007; Figure 5B; Claim 1	6, 7, 24-28, 30/6, 30/7, 30/24-30/28, 31/30/6, 31/30/7, 31/30/24-30/28, 32/30/6, 32/30/7, 32/30/24-28, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 33/32/31/30/24-33/32/31/ 30/28, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 33/32/31/30/24-33/32/31/ 30/28, 34/6, 34/7, 34/24-34/28, 34/33/32/31/30/6, 34/33/32/31/30/7, 34/33/32/31/30/24-34/33/ 32/31/30/28, 35/6, 35/7, 35/24-35/28, 35/33/32/31/30/6, 35/33/32/31/30/7, 35/33/32/31/30/24-35/33/ 32/31/30/28, 36/6, 36/7, 36/24-36/28, 36/33/32/31/30/6, 36/33/32/31/30/7, 36/33/32/31/30/24-36/33/ 32/31/30/28, 37/36/6, 37/36/7, 37/36/24-37/36/28, 37/36/33/32/31/30/6,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2500035 A1 (ICON GENETICS GMBH) September 19, 2012; abstract; Claim 1	<p>37/36/33/32/31/30/7, 37/36/33/32/31/30/24-37/ 36/33/32/31/30/28, 38/37/36/6, 38/37/36/7, . 38/37/36/24-38/37/36/28, 38/37/36/33/32/31/30/6, 38/37/36/33/32/31/30/7, 38/37/36/33/32/31/30/24- 38/37/36/33/32/31/30/28, 39/36/6, 39/36/7, 39/36/24-39/36/28, 39/36/33/32/31/30/6, 39/36/33/32/31/30/7, 39/36/33/32/31/30/24-39/ 36/33/32/31/30/28, 40/36/6, 40/36/7, 40/24-40/28, 40/36/33/32/31/30/6, 40/36/33/32/31/30/7, 40/36/33/32/31/30/24-40/ 36/33/32/31/30/28, 41/6, 41/7, 41/24-41/28, 41/33/32/31/30/6, 41/33/32/31/30/7, 41/33/32/31/30/24-41/33/ 32/31/30/28, 42/6, 42/7, 42/24-42/28, 42/33/32/31/30/6, 42/33/32/31/30/7, 42/33/32/31/30/24-42/33/ 32/31/30/28, 43/6, 43/7, 43/24-43/28, 43/33/32/31/30/6, 43/33/32/31/30/7, 43/33/32/31/30/24-43/33/ 32/31/30/28, 44/6 44/7, 44/24-44/28</p> <p>6, 7, 24-28, 30/6, 30/7, 30/24, 30/26-30/28, 31/30/6, 31/30/7, 31/30/24, 31/30/26-31/30/28, 32/30/6, 32/30/7, 32/30/24, 32/30/26-32/30/28, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 33/32/31/30/24, 33/32/31/30/26, 33/32/31/30/28, 33/32/31/30/6, 33/32/31/30/7, 33/32/31/30/24, 33/32/31/30/25-33/32/31/ 30/28, 34/6, 34/7, 34/24, 34/26-34/28, 34/33/32/31/30/6, 34/33/32/31/30/7, 34/33/32/31/30/24, 34/33/32/31/30/26-34/33/ 32/31/30/28, 35/6, 35/7, 35/24, 35/26-35/28, 35/33/32/31/30/6, 35/33/32/31/30/7, 35/33/32/31/30/24, 35/33/32/31/30/26-35/33/ 32/31/30/28, 36/6, 36/7, 36/24, 36/26-36/28, 36/33/32/31/30/6, 36/33/32/31/30/7</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		36/33/32/31/30/24, 36/33/32/31/30/26-36/33/ 32/31/30/28, 37/36/6, 37/36/7, 37/36/24, 37/36/26-37/36/28, 37/36/33/32/31/30/6, 37/36/33/32/31/30/7, 37/36/33/32/31/30/24, 37/36/33/32/31/30/26-37/ 36/33/32/31/30/28, 38/37/36/6, 38/37/36/7, . 38/37/36/24, 38/37/36/26-38/37/36/28, 38/37/36/33/32/31/30/6, 38/37/36/33/32/31/30/7, 38/37/36/33/32/31/30/24, 38/37/36/33/32/31/30/26- 38/37/36/33/32/31/30/28, 39/36/6, 39/36/7, 39/36/24, 39/36/26-39/36/28, 39/36/33/32/31/30/6, 39/36/33/32/31/30/7, 39/36/33/32/31/30/24, 39/36/33/32/31/30/26-39/ 36/33/32/31/30/28, 40/36/6, 40/36/7, 40/24, 40/16-40/28, 40/36/33/32/31/30/6, 40/36/33/32/31/30/7, 40/36/33/32/31/30/24, 40/36/33/32/31/30/26-40/ 36/33/32/31/30/28, 41/6, 41/7, 41/24, 41/26-41/28, 41/33/32/31/30/6, 41/33/32/31/30/7, 41/33/32/31/30/24, 41/33/32/31/30/26-41/33/ 32/31/30/28, 42/6, 42/7, 42/24, 42/26-42/28, 42/33/32/31/30/6, 42/33/32/31/30/7, 42/33/32/31/30/24, 42/33/32/31/30/26-42/33/ 32/31/30/28, 43/6, 43/7, 43/24, 43/26-43/28, 43/33/32/31/30/6, 43/33/32/31/30/7, 43/33/32/31/30/24, 43/33/32/31/30/26-43/33/ 32/31/30/28, 44/6 44/7, 44/24, 44/26-44/28
A	WO 2007/016240 A2 (NOVARTIS AG et al.) February 8, 2007; Page 26, lines 16-26; Claim 1	30/16, 31/30/16, 32/30/16, 33/32/31/30/16, 34/16, 34/33/32/31/30/16, 35/16, 35/33/32/31/30/16, 36/16, 36/33/32/31/30/16, 37/36/16, 37/36/33/32/31/30/16, 38/37/36/16, 38/37/36/33/32/31/30/16, 39/36/16, 39/36/33/32/31/30/16, 40/36/16, 40/36/33/32/31/30/16, 41/16, 41/33/32/31/30/16, 42/16, 42/33/32/31/30/16, 43/16, 43/33/32/31/30/16, 44/16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8569227 B2 (JACOBS, S) October 29, 2013; column 26, lines 56-67; column 27, lines 7-9	20, 32/30/19, 32/30/20, 33/32/31/30/19, 33/32/31/30/20, 34/19, 34/20, 34/33/32/31/30/19, 34/33/32/31/30/20, 35/19, 35/20, 35/33/32/31/30/19, 35/33/32/31/30/20, 36/19, 36/20, 36/33/32/31/30/19, 36/33/32/31/30/20, 37/36/19, 37/36/20, 37/36/33/32/31/30/19, 37/36/33/32/31/30/20, 38/37/36/19, 38/37/36/20, 38/37/36/33/32/31/30/19, 38/37/36/33/32/31/30/20, 39/36/19, 39/36/20, 39/36/33/32/31/30/19, 39/36/33/32/31/30/20, 40/36/19, 40/36/20, 40/36/33/32/31/30/19, 40/36/33/32/31/30/20, 41/19, 41/20, 41/33/32/31/30/19, 41/33/32/31/30/20, 42/19, 42/20, 42/33/32/31/30/19, 42/33/32/31/30/20, 43/19, 43/20, 43/33/32/31/30/19, 43/33/32/31/30/20, 44/19, 44/20
A	US 2013/0274145 A1 (JACOBS, S et al.) October 17, 2013; Claim 1	20, 32/30/19, 32/30/20, 33/32/31/30/19, 33/32/31/30/20, 34/19, 34/20, 34/33/32/31/30/19, 34/33/32/31/30/20, 35/19, 35/20, 35/33/32/31/30/19, 35/33/32/31/30/20, 36/19, 36/20, 36/33/32/31/30/19, 36/33/32/31/30/20, 37/36/19, 37/36/20, 37/36/33/32/31/30/19, 37/36/33/32/31/30/20, 38/37/36/19, 38/37/36/20, 38/37/36/33/32/31/30/19, 38/37/36/33/32/31/30/20, 39/36/19, 39/36/20, 39/36/33/32/31/30/19, 39/36/33/32/31/30/20, 40/36/19, 40/36/20, 40/36/33/32/31/30/19, 40/36/33/32/31/30/20, 41/19, 41/20, 41/33/32/31/30/19, 41/33/32/31/30/20, 42/19, 42/20, 42/33/32/31/30/19, 42/33/32/31/30/20, 43/19, 43/20, 43/33/32/31/30/19, 43/33/32/31/30/20, 44/19, 44/20
A	US 2011/0135657 A1 (HU, SFS et al.) June 9, 2011; Table 1A	30/25-30/28, 31/30/25-31/30/28, 32/30/25-32/30/28, 33/32/31/30/25-33/32/31/30/28, 34/25-34/28, 34/33/32/31/30/25-34/33/32/31/30/28, 35/25-35/28, 35/33/32/31/30/25-35/33/32/31/30/28, 36/25-36/28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/69347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		36/33/32/31/30/25-36/33/32/31/30/28, 37/36/25-37/36/28, 37/36/33/32/31/30/25-37/36/33/32/31/30/28, 38/37/36/25-38/37/36/28, 38/37/36/33/32/31/30/25-38/37/36/33/32/31/30/28, 39/36/25-39/36/28, 39/36/33/32/31/30/25-39/36/33/32/31/30/28, 40/36/25-40/36/28, 40/36/33/32/31/30/25-40/36/33/32/31/30/28, 41/25-41/28, 41/33/32/31/30/25-41/33/32/31/30/28, 42/25-42/28, 42/33/32/31/30/25-42/33/32/31/30/28, 43/25-43/28, 43/33/32/31/30/25-43/33/32/31/30/28,44/25-44/28
A	GB 2405873 A (WARNER-LAMBERT COMPANY LLC) March 16, 2005; paragraph [0080]	24, 30/24, 31/30/24, 32/30/24, 33/32/31/30/24, 34/24, 34/33/32/31/30/24, 35/24, 35/33/32/31/30/24, 36/24, 36/33/32/31/30/24, 37/36/24, 37/36/33/32/31/30/24, 38/37/36/24, 38/37/36/33/32/31/30/24, 39/36/24, 39/36/33/32/31/30/24, 40/36/24, 40/36/33/32/31/30/24, 41/24, 41/33/32/31/30/24, 42/24, 42/33/32/31/30/24, 43/24, 43/33/32/31/30/24, 44/24
A	WO 2008/079246 A2 (MEDAREX, INC.) July 3, 2008; Claim 12	25, 30/25, 31/30/25, 32/30/25, 33/32/31/30/25, 34/25, 34/33/32/31/30/25, 35/25, 35/33/32/31/30/25, 36/25, 36/33/32/31/30/25, 37/36/25, 37/36/33/32/31/30/25, 38/37/36/25, 38/37/36/33/32/31/30/25, 39/36/25, 39/36/33/32/31/30/25, 40/36/25, 40/36/33/32/31/30/25, 41/25, 41/33/32/31/30/25, 42/25, 42/33/32/31/30/25, 43/25, 43/33/32/31/30/25, 44/25
P, X	WO 2015/089073 A2 (NEW YORK UNIVERSITY et al.) June 18, 2015; entire document	1-16,18-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US14/69347

***Continuation of Box No. III : 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.

Groups I+: Claims 1-44 are directed toward a binding molecule comprising: a first binding domain capable of binding to a glycosylated staphylococcal surface protein and a second binding domain capable of binding to a staphylococcal leukotoxin.

The binding molecule, a nucleic acid encoding the binding molecule; a vector comprising the nucleic acid; a host cell comprising the vector; a process for the production of a binding molecule; a pharmaceutical composition comprising the binding molecule; a kit comprising the binding molecule; and methods of a method for the treatment, prevention, amelioration, diagnosis or detection of a staphylococcal infection will be searched to the extent that the binding molecule is susceptible or resistant to protease cleavage within SEQ ID NO: 60 (Homo sapiens wild-type IgG1 amino acid sequence); wherein the second binding domain binds to LukA encompassing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (S. aureus LukA amino acid sequence) and LukB encompassing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (S. aureus LukB amino acid sequence); the second binding domain competes with or comprises an FN3 domain having an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 14 (FN3 Luk17 domain amino acid sequence); and the first binding domain comprises a heavy chain variable region encompassing SEQ ID NO: 60 (Homo sapiens wild-type IgG1 amino acid sequence) and a light chain variable region encompassing SEQ ID NO: 61 (Homo sapiens immunoglobulin light chain variable (VL) region amino acid sequence). It is believed that Claims 1-14, 15 (in-part), 16, 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21-23, 24 (in-part), 25 (in-part), 26 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part) and 29-44 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 10 (S. aureus LukA amino acid sequence), 11 (S. aureus LukB amino acid sequence), 14 (FN3 Luk17 domain amino acid sequence), 60 (Homo sapiens wild-type IgG1 amino acid sequence), 61 (Homo sapiens immunoglobulin light chain variable (VL) region amino acid sequence). Additional target, second binding domain and/or first binding domain heavy and light chain variable region sequence(s) will searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: a sequence comprising the second binding domain/competed with for binding to the second binding domain, wherein the sequence encompasses SEQ ID NO: 15 (FN3 Luk19 domain amino acid sequence).

Continued on Next Supplemental Page

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Groups I+ share the technical features including a binding molecule comprising: a first binding domain capable of binding to a glycosylated staphylococcal surface protein and a second binding domain capable of binding to a staphylococcal leukotoxin; a nucleic acid encoding the binding molecule; a vector comprising the nucleic acid; a host cell comprising the vector; a process for the production of a binding molecule, comprising: culturing the host cell under conditions allowing the expression of the binding molecule, and recovering the binding molecule from the culture; a pharmaceutical composition comprising: the binding molecule produced according to the process and a pharmaceutically acceptable carrier; a binding molecule produced according to the process, for use in the treatment or amelioration of a staphylococcal infection; a method for the treatment, prevention, or amelioration of a staphylococcal infection, comprising: administering to a subject in need thereof the binding molecule produced according to the process under conditions effective to treat, prevent or ameliorate the staphylococcal infection; a method for diagnosing a staphylococcal infection in a subject comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with a sample from a subject; detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting; and diagnosing the staphylococcal infection in the subject based on said detecting; a method for the detection of staphylococcus in a sample, comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with the sample; detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcus surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting, whereby the presence of the glycosylated staphylococcus surface protein and/or staphylococcal leukotoxin indicates the presence of staphylococcus in the sample; a method for the prevention of a staphylococcal infection in a subject, comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with a sample from the subject; detecting a glycosylated staphylococcal surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting; and administering an agent suitable for preventing staphylococcal infection to the subject based on said detecting; and a kit comprising the binding molecule.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2013/096948 A1 (LYDON) in view of US 7,364,738 B2 to Patti, et al. (hereinafter "Patti").

Lydon discloses a binding molecule (an antibody, including a bispecific antibody (a binding molecule); abstract, paragraph [00257]) comprising: a first binding domain (a bivalent fragment that includes two linked scFv dimers (a first binding domain); paragraph [00308]) capable of binding to a glycosylated staphylococcal surface protein (capable of binding to a virulence factor of *S. aureus* including clumping factor A C1A (capable of binding to a glycosylated staphylococcal surface protein); paragraph [0096]) and a second binding domain (a bivalent fragment that includes two linked scFv dimers (a second binding domain); paragraph [00308]) capable of binding to a staphylococcal leukotoxin (capable of binding to leucocidin (capable of binding to a staphylococcal leukotoxin); paragraph [0096]); a nucleic acid encoding the binding molecule (a nucleic acid encoding the binding molecule; paragraph [00279]); a vector comprising the nucleic acid (a vector comprising the nucleic acid; paragraph [00279]); a host cell comprising the vector (a host cell transformed with (comprising) the vector; paragraph [00279]); a process for the production of a binding molecule ((a process for) the production of a binding molecule; paragraph [0279]), comprising: culturing the host cell under conditions allowing the expression of the binding molecule (culturing the host cell under conditions allowing the expression of the binding molecule; paragraph [00279]), and recovering the binding molecule from the culture (and purifying the antibodies produced by antibody-secreting cells (recovering the binding molecule from the culture); paragraphs [00280], [00381]); a pharmaceutical composition (a pharmaceutical composition; paragraphs [00199], [00291], [00295]) comprising: the binding molecule (comprising the binding molecule; paragraphs [00291], [00295]) produced according to the process (produced according to the process; paragraphs [00279], [00280]) and a pharmaceutically acceptable carrier (and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraph [00295]); a binding molecule (an antibody, including a bispecific antibody (a binding molecule); abstract, paragraph [00257]) produced according to the process (produced according to the process; paragraphs [00279], [00280]), for use in the treatment or amelioration of a staphylococcal infection (for use in treatment of a microbial infection, including *S. aureus* (staphylococcal) infections; paragraphs [0006], [00290]); a method for the treatment, prevention, or amelioration of a staphylococcal infection (a method for the treatment, prevention, or amelioration of a staphylococcal infection; paragraphs [00290], [00291]), comprising: administering to a subject in need thereof (administering to a patient after the onset of an infection or prophylactically (administering to a subject in need thereof); paragraph [00291]) the binding molecule (the binding molecule; abstract, paragraphs [00257], [00291]) produced according to the process (produced according to the process; paragraphs [00279], [00280]) under conditions effective to treat, prevent or ameliorate the staphylococcal infection (in a therapeutically effective amount (under conditions effective to treat, prevent or ameliorate the staphylococcal infection; paragraph [00291]); a method for diagnosing (a method for diagnosing; paragraphs [00199], [00290]) a staphylococcal infection in a subject (a staphylococcal infection in a subject; paragraph [00290]).

Lydon does not disclose: comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with a sample from a subject; detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting; and diagnosing the staphylococcal infection in the subject based on said detecting; a method for the detection of staphylococcus in a sample, comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with the sample; detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcus surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting, whereby the presence of the glycosylated staphylococcus surface protein and/or staphylococcal leukotoxin indicates the presence of staphylococcus in the sample; and a method for the prevention of a staphylococcal infection in a subject, comprising: contacting the binding molecule produced according to the process with a sample from the subject; detecting a glycosylated staphylococcal surface protein and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting; and administering an agent suitable for preventing staphylococcal infection to the subject based on said detecting; and a kit comprising the molecule.

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/69347

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Pattl discloses a method of diagnosing a staphylococcal infection in a subject (a method of diagnosing a staphylococcal infection in a subject; column 2, lines 30-34; column 8, line 46 - column 9, line 5), comprising contacting a binding molecule (comprising adding an antibody (comprising contacting a binding molecule); column 8, line 46 - column 9, line 5) with a sample from a subject (to a sample suspected of being infected with *S. aureus* (with a sample from a subject); column 8, line 46 - column 9, line 5); detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein (detecting the presence of *S. aureus* C1fA protein (detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein); column 8, line 46 - column 9, line 5) and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting (in the sample, based on said antibody addition (based on said contacting); column 8, line 46 - column 9, line 5); and diagnosing the staphylococcal infection in the subject based on said detecting (diagnosing the staphylococcal infection in the subject based on said detecting; column 8, line 46 - column 9, line 5); a method for the detection of staphylococcus in a sample (a method for the detection of *S. aureus* (staphylococcus) in a sample; column 8, line 46 - column 9, line 5), comprising: contacting a binding molecule with the sample (comprising adding an antibody to a sample suspected of being infected with *S. aureus* (comprising contacting a binding molecule); column 8, line 66 - column 9, line 5); detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein (detecting the presence of *S. aureus* C1fA protein (detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein); column 8, line 46 - column 9, line 5) and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting (in the sample, based on said antibody addition (based on said contacting); column 8, line 46 - column 9, line 5), whereby the presence of the glycosylated staphylococcus surface protein (whereby the presence of the C1fA (glycosylated staphylococcus surface protein); column 8, line 46 - column 9, line 5) and/or staphylococcal leukotoxin indicates the presence of staphylococcus in the sample (indicates the presence of *S. aureus* (staphylococcus) in the sample; column 8, line 46 - column 9, line 5); and a method for the prevention of a staphylococcal infection in a subject (a method for the prevention of a staphylococcal infection in a subject; column 8, lines 5-15), comprising: contacting a binding molecule comprising adding an antibody (comprising contacting a binding molecule); column 8, line 46 - column 9, line 5) with a sample from a subject (to a sample suspected of being infected with *S. aureus* (with a sample from a subject); column 8, line 46 - column 9, line 5); detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein (detecting the presence of *S. aureus* C1fA protein (detecting presence or absence of a glycosylated staphylococcal surface protein); column 8, line 46 - column 9, line 5) and/or a staphylococcal leukotoxin in the sample based on said contacting (in the sample, based on said antibody addition (based on said contacting); column 8, line 46 - column 9, line 5); and administering an agent suitable for preventing staphylococcal infection to the subject (administering an effective amount of an antibody to the C1fA protein to the subject (administering an agent suitable for preventing staphylococcal infection to the subject); column 8, lines 16-21) based on said detecting (based on said detecting; column 8, line 46 - column 9, line 5); and a kit comprising the molecule (a kit comprising the antibody (the molecule); column 11, lines 62-65).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Lydon, for integrating the diagnostic, detection and prevention methods previously disclosed by Pattl, by utilizing the binding molecules produced by the process previously disclosed by Lydon, for the detection of staphylococcus in a sample from a subject, for enabling positive diagnosis of an infection in the subject, for providing treatment only to a subject having positive detection of the presence of a staphylococcal infection, thereby avoiding the excessive cost and side-effects produced by unnecessary treatment of a person merely suspected of being infected. Furthermore, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Lydon, for providing the binding molecules in a kit form, as previously disclosed by Pattl, for enabling use as reagents for diagnosis and detection of *S. aureus* infection, and for effective treatment of the infections.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Lydon and Pattl references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	E
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 9/48 (2006.01)	C 1 2 N 9/48	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

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

(74) 代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74) 代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74) 代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 トーレス ビクター ジェイ .

アメリカ合衆国 1 0 0 1 6 ニューヨーク州 ニューヨーク ファースト アベニュー 5 6 4
 アpartment 2 3 イー

(72) 発明者 プレズスキ ランドール ジェイ .

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキーロード 1
 4 0 0

- (72)発明者 リンチ アンソニー
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 ストロール ウィリアム
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 ウィテカー ブライアン
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 チウ マーク
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 バックリー ピーター ティー .
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 ソリング ケリー
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400
- (72)発明者 キンダー ミッシェル
 アメリカ合衆国 19477 ペンシルバニア州 スプリング ハウス マッキー ード 1
 400

F ターム(参考) 4B050 CC06 DD02

4B064 AG26 AG27 CC24 DA01

4B065 AA53X AA53Y AC20 CA41 CA44

4C084 AA19 NA14 ZB352

4C085 AA14 DD62 DD63 EE01 GG01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 DA50 DA75 DA76 EA20 EA22

EA52 FA74

专利名称(译)	用于吞噬细胞递送抗葡萄球菌剂的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2017502002A	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2016538020	申请日	2014-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	纽约大学 扬森生物技术公司 詹森生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	纽约大学 扬森生物技术公司		
[标]发明人	トーレスビクタージェイ ブレズスキランドールジェイ リンチアンソニー ストロールウィリアム ウイテカーブライアン チウマーク バックリーピーターティー ソリングケリー キンダーミッシェル		
发明人	トーレス ビクター ジェイ. ブレズスキ ランドール ジェイ. リンチ アンソニー ストロール ウィリアム ウイテカー ブライアン チウ マーク バックリー ピーター ティー. ソリング ケリー キンダー ミッシェル		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P31/04 A61K45/00 G01N33/569 G01N33/53 C12N9/48 C07K14/705		
CPC分类号	A61P31/04 C07K16/1271 C07K2317/30 C07K2318/00 G01N33/56938 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K2317/31 G01N2469/10 C07K14/78 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2319/70		
FI分类号	C07K16/46.ZNA C07K16/28 C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395.N A61P31/04 A61K45/00 G01N33/569.E G01N33/53.D C12N9/48 C07K14/705		
F-TERM分类号	4B050/CC06 4B050/DD02 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA53X 4B065 /AA53Y 4B065/AC20 4B065/CA41 4B065/CA44 4C084/AA19 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/913714 2013-12-09 US		

摘要(译)

技术领域本文件通常涉及结合多种细菌毒力因子的多特异性结合分子，制备这些结合分子的方法，以及这些结合分子用于治疗细菌感染的用途。特别地，结合分子优选包含至少两个结合结构域，例如抗体或抗体片段和替代性支架。第一结合结构域能够结合糖基化的葡萄球菌表面蛋白，优选含有SDR的蛋白。第二结合结构域可以结合葡萄球菌白细胞毒素，优选LukAB，LukD或LukE。这些多特异性结合化合物具有对金黄色葡萄球菌的杀菌活性，因此，可以在金黄色葡萄球菌感染，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的治疗中使用的，和/或改进。

(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2017-502002 (P2017-502002A)
		(43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46 Z N A	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 190 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2016-538020 (P2016-538020)	(71) 出願人 511060836	
(22) 出願日 平成26年12月9日 (2014.12.9)	ニューヨーク・ユニバーシティ	
(85) 翻訳文提出日 平成28年8月5日 (2016.8.5)	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー	
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/069347	ヨーク ワシントン スクエア サウス	
(87) 国際公開番号 W02015/089073	7 0	
(87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)	(71) 出願人 510315135	
(31) 優先権主張番号 61/913,714	ヤンセン・バイオテック・インコーポレイ	
(32) 優先日 平成25年12月9日 (2013.12.9)	テッド	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	Janssen Biotech, In	
	c.	
	アメリカ合衆国 1 9 0 4 4 ペンシルベニア	
	州ホーシャム、リッジビュー・ドライブ 8	
	0 0 番	
	(74) 代理人 100102978	
	弁理士 清水 初志	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 抗ブドウ球菌類の食細胞送達用組成物及び方法		