

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-535224

(P2015-535224A)

(43) 公表日 平成27年12月10日(2015.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4H045
A61P 31/04 (2006.01)	A61K 39/395 N	
G01N 33/53 (2006.01)	A61P 31/04 171	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-538223 (P2015-538223)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月24日 (2013.10.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月22日 (2015.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2013/050806
 (87) 国際公開番号 W02014/063253
 (87) 国際公開日 平成26年5月1日 (2014.5.1)
 (31) 優先権主張番号 61/718,062
 (32) 優先日 平成24年10月24日 (2012.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595006223
 ナショナル リサーチ カウンシル オブ
 カナダ
 カナダ国, オンタリオ ケー1エー Oア
 ール6, オタワ, モントリオール ロード
 1200
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗カンピロバクター・ジェジュニ (CAMPYLOBACTER JEJUNI) 抗体及びその使用

(57) 【要約】

カンピロバクター・ジェジュニは、急性下痢から神経疾患に及ぶヒトにおける細菌性食品媒介性疾患の主な原因である。C・ジェジュニに特異的な単離又は精製された抗体又はその断片が記載されている。抗体又はその断片は、鞭毛タンパク質と結合し、C・ジェジュニの運動性を低下させる。抗体又はその断片は、C・ジェジュニ鞭毛タンパク質を用いて免疫処置したラクダ科動物の重鎖 IgG 可変ドメイン断片 (V_HH) に由来している。抗体又はその断片の多価形態並びにファージ形式が記載されている。動物又は動物環境におけるC・ジェジュニの存在を低減する方法、C・ジェジュニ感染を治療するための方法及び製剤並びにC・ジェジュニを検出する方法も記載される。

【選択図】 なし

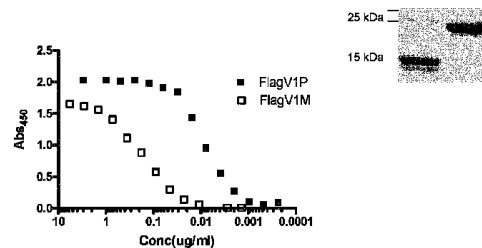


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C . ジェジュニ鞭毛と特異的に結合する単離又は精製された抗体又はその断片であって、

配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) 又は V S T F S I N A L G (配列番号 4) を含む相補性決定領域 (C D R) 1 と、

配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) 又は I G S D G T V (配列番号 5) を含む C D R 2 と、

配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) 又は N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) を含む C D R 3 と

を含む、抗体又はその断片。

10

【請求項 2】

配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) の C D R 1 と、配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) の C D R 2 と、配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) の C D R 3 とを含む、請求項 1 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 3】

配列

Q V X ₁ L X ₂ E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V X ₃ A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T X ₄ T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 7)

20

[式中、X ₁ = K 又は Q であり、X ₂ = E 又は V であり、X ₃ = A 又は C であり、X ₄ = I 又は C である] 又はそれと実質的に同一の配列を含む、請求項 2 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 4】

配列

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 8)、

30

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 9) ;

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 10) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 11) ;

40

又はそれらと実質的に同一の配列を含む、請求項 2 又は 3 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 5】

配列 V S T F S I N A L G (配列番号 4) の C D R 1 と、配列 I G S D G T V (配列番号 5) の C D R 2 と、配列 N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) の C D R 3 とを含む、請求項 1 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 6】

配列

50

Q V X₁ L X₂ E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R
 Q A P G K A R E L V X₃ A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T X₄ S R D N A K N
 T V S L Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G
 S W G Q G T Q V T V S S (配列番号12)、

[式中、X₁ = K又はQであり、X₂ = E又はVであり、X₃ = A又はCであり、X₄ = I又はCである]又はそれと実質的に同一の配列を含む、請求項5に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項7】

配列

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号13)、

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号14) ;

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号15) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号16) ;

又はそれらと実質的に同一の配列を含む、請求項5又は6に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項8】

フラジェリンと特異的に結合する、請求項1～7のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項9】

フラジェリンのFla A成分と特異的に結合する、請求項1～8のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項10】

単ドメイン抗体(s d A b)である、請求項1～9のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項11】

s d A bが、ラクダ科動物起源のものである、請求項10に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項12】

多価提示である、請求項1～11のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項13】

ベロ毒素Bサブユニットとの融合タンパク質として発現される、請求項12に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項14】

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

10

20

30

40

50

VGDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR (配列番号19);

QVQLVESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQVAGKEREVVA AISWSRDRQYYPDPVKGRFTITRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR (配列番号20);

QVKLEESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQVAGKEREVVCAISWSRDRQYYPDPVKGRFTCTRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR (配列番号34);

QVQLVESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQVAGKEREVVCAISWSRDRQYYPDPVKGRFTCTRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR (配列番号35);

QVKLEESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQAPGKARELVAAIGSDGTVYYTDSVKGRFTISRDNNAKNTVSLQMS SLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWF AVASFGSWGQGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGFSEVIFR (配列番号21);

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQAPGKARELVAAIGSDGTVYYTDSVKGRFTISRDNNAKNTVSLQMS SLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWF AVASFGSWGQGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGFSEVIFR (配列番号22);

QVKLEESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQAPGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDNNAKNTVSLQMS SLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWF AVASFGSWGQGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGFSEVIFR (配列番号36);

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQAPGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDNNAKNTVSLQMS SLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWF AVASFGSWGQGTQVTVSSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

GDKELFTNRLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGFSEVIFR (配列番号16);

又はそれらと実質的に同一の配列からなる群から選択される1種又は複数の配列を含む、請求項13に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項15】

請求項1~14のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片をコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項16】

10

20

30

40

50

請求項 15 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 17】

検出可能な標識と連結している、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 18】

動物又は動物環境における C . ジェジュニの存在を低減する方法であって、動物に、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 19】

単離又は精製された抗体又はその断片が経口投与される、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

単離又は精製された抗体又はその断片が、酵母発現系中に含まれる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

動物に、抗生物質、バクテリオシン又は C . ジェジュニに対して有効であるその他の植物若しくは動物由来化合物を投与するステップをさらに含む、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

プロバイオティック系において、任意選択で同時発現されるか、又は同時に含有される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片と一緒に、動物に競合微生物を投与するステップをさらに含む、請求項 18 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

動物環境への C . ジェジュニの導入を低減する方法であって、動物環境に新入動物を入れる前に、新入動物に、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び賦形剤を含む、C . ジェジュニワクチン。

【請求項 25】

経口送達用である、請求項 24 に記載のワクチン。

30

【請求項 26】

C . ジェジュニに感染した対象を治療する方法であって、対象に、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 27】

対象に C . ジェジュニに対して有効な抗生物質を投与するステップをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

対象が、ニワトリ、ウシ及びヒツジからなる群から選択される家畜動物である、請求項 26 又は 27 に記載の方法。

40

【請求項 29】

対象がヒトである、請求項 26 又は 27 に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び賦形剤を含む、C . ジェジュニ感染の治療に使用するための製剤。

【請求項 31】

それを必要とする対象において C . ジェジュニ感染を治療するための医薬を調製するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片の使用。

50

【請求項 3 2】

それを必要とする対象において C . ジェジュニ感染を治療するための、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片の使用。

【請求項 3 3】

サンプル中の C . ジェジュニを検出する方法であって、サンプルを、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片と接触させるステップ及び結合している単離又は精製された抗体又はその断片の存在を検出するステップを含む、方法。

【請求項 3 4】

サンプルが、体液又は糞便物質を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

サンプルが、食品又は食品から得た表面スワブを含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び C . ジェジュニの検出に使用するための説明書を含む、請求項 3 3 に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び適した担体を含む、サンプル中の C . ジェジュニを検出するための検出試薬。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を含む、単離された抗 C . ジェジュニ抗体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001]本開示内容は、一般には、抗体、その断片及びこのようなタンパク質の誘導体及び適用に関する。記載される抗体及び断片は、C . ジェジュニ (j e j u n i) の鞭毛タンパク質に向けられる。

【背景技術】

【0002】

[0002]カンピロバクター (C a m p y l o b a c t e r) 属は、多数の形態学的に多様な群 (らせん状の、湾曲した又は桿状の形状の) 細菌を包含し、35種を超える種及び亜種が報告されており、そのうち20種が、ヒトにとって病原性であり腸及び腸外の疾病を引き起こすか、又はヒトにおいて多様な数の部位にコロニーを形成する (M a n , 2 0 1 1 年) 。

30

【0003】

[0003]カンピロバクター・ジェジュニ (C a m p y l o b a c t e r j e j u n i) 、グラム陰性菌のらせん状細菌は、世界中で、現在、最も流行している食品媒介病原菌の1種であり、ヒトにおける細菌性胃腸炎の主な原因である。北アメリカでは、カンピロバクター症は、組み合わせた、サルモネラ菌 (S a l m o n e l l a) 、赤痢菌 (S h i g e l l a) 、リステリア (L i s t e r i a) 及び大腸菌 (E . c o l i) によって引き起こされた疾病の報告症例を数で上回る (S t e r n & R o b a c h , 2 0 0 3 年 ; N e w e l l ら , 2 0 0 3 年 ; B l a s e r , 1 9 9 7 年) 。カンピロバクター感染は、比較的軽度の下痢性疾患にもかかわらず、ギラン・バレー症候群 (G B S) 、ポリオの根絶以来の麻痺の主な原因 ; 非麻痺性変異型のミラーフィッシャー症候群 (H u m p h e r y ら 2 0 0 7 年 ; H a r i h a r a n ら 2 0 0 4 ; B l a s e r ら 1 9 8 6 年) ; 反応性関節炎 (R e A) ; 及び炎症性腸疾患 (I B D) (R a u t e l i n ら 2 0 0 0 年 ; G e l l y n c k ら 2 0 0 8 年) を含めた重症の長期の合併症を伴ってきた。

40

【0004】

[0004]ヒトカンピロバクター症の症例の50 ~ 80 % が、ニワトリの消費に起因し得る

50

と推測され、従って、プロイラーの食肉は、病原体をヒトに感染させる第一媒介物と考えられる (EFSA Journal 2011年; Hermansら2011年)。家禽、特に、ニワトリにおけるカンピロバクターレベルの制御及び低下は、家禽製品の安全性を改善し、カンピロバクター誘発性胃腸炎の発生率を低減し得る。従って、ヒトにおける長期の合併症が低減され、その結果、世界中で入院及びその他の関連費用が何百億ドルも節約され得る (EFSA report, 2011年; Nyachuba, 2010年; Buzbyら1997年)。

【0005】

[0005] C. ジェジュニ及びその他のあまり頻繁ではない株 (例えば、C. コリ (coli) 及びC. ラリ (lari)) に対する現在の介入戦略は、家禽繁殖 (一次介入) の間、食肉製造の間及び/又は食肉加工の間を含めた製造の種々の段階で適用される。最も受け入れられている戦略は、衛生バリア及びフライスクリーンを取り付けることによってカンピロバクター種が群れに侵入することを防ぐこと、高品質水の使用、食肉処理齢の低下及び間引きの中止である (Newell & Wagenaar, 2000年; Wagenaarら, 2006年, 2008年; Lin 2009年; EFSA report, 2011年)。しかし、C. ジェジュニによる感染に対するニワトリの感受性及び環境におけるその偏在性が、これらのバイオセキュリティアプローチの成功に負に影響を及ぼしており、細菌感染が制御又は排除され得る代替アプローチの必要性が強調される。飼料添加物又は獣医用医薬品としてのニワトリへのバクテリオファージの投与について、 $0.5 \sim 5 \log_{10} \text{CFU/g}$ の盲腸カンピロバクターレベルの低下が報告されている (El-Shibinyら, 2009年; Carrilloら, 2005年; Wagenaarら, 2005年)。

10

20

【0006】

[0006] より効率的に、家禽の飲用水へ添加されたバクテリオシンを用いる処置は、症例の90%において病原体を完全に排除するか、又は 10^6 倍以上そのレベルを低下させた (Svetochら, 2010年)。プロバイオティクス (Santiniら, 2010年; Willisら, 2008年) 及び植物生物活性化合物 (Castilloら, 2011年; Kureckciら, 2012年) などのその他の生物学的試薬も、食物又は水添加物として使用されており、ニワトリ糞便中のカンピロバクター含量を大幅に低減するとわかった。C. ジェジュニに対する乳酸菌 (LAB) などのプロバイオティック株の殺菌効果は、有機酸、バクテリオシン又はバクテリオシン様物質の製造に起因していた (Santiniら, 2010年; Messaoudiら, 2011年)。これらのアプローチの多くは、有効性、安全性、毒性、製造及び精製のスケールアップ並びにカンピロバクター耐性の発生などの問題のために、当技術分野では広く採用されていない。

30

【0007】

[0007] フルオロキノロン及びマクロライドなどの抗生物質は、家禽及びヒトの両方においてカンピロバクター種の治療のために承認されている。しかし、ヒト及び動物の健康におけるその長期の使用は、世界中の多くの国において耐性カンピロバクター株の急速な増大につながり、動物飼料ストックでは、その使用は、もはや推奨されない (Smithら, 2010年; Luangtongkumら, 2009年; Alfredsonら, 2007年; Silvaら, 2011年)。中鎖脂肪酸 (例えば、カプリル酸) 及びモノアシलगリセロールは、抗生物質の代替物であり、ニワトリにおいてカンピロバクター含量を制御又は排除するための食物及び水添加物として使用されてきた (de los Santosら, 2009年; Hermansら, 2010年, Molatovaら, 2010年)。それにもかかわらず、化合物を用いる処置の際のカンピロバクターの数及び有病率に関するデータは、一貫性がなく、その有効性に関する明確な結論を下すことができない (The EFSA Journal, 2011年)。家禽において感染の供給源を低減若しくは排除するための、又はヒト感染を治療するための、バージニアマイシン、エリスロマイシン、ネオマイシン又はシプロフロキサシンの使用を含めた抗生物質治療は、有用なツールである。しかし、動物製造における抗生物質治療の広範な使用に関する増大する

40

50

問題は、耐性カンピロバクター株の発生及びニワトリ由来の抗生物質耐性カンピロバクターが、ヒトにおいて抗生物質耐性感染を引き起こし得るという事実である。

【0008】

[0008]多数の感染性疾患に対するワクチン接種は、商業的に飼育されたニワトリにおいて広く使用されている(Clarkら、2012年)。カンピロバクター種コロニー形成に対する保護のための家禽のワクチン接種も広く研究されてきた。しかし、短期間(3~4週間)にわたる迅速で強力な免疫応答を誘発できる交差反応性ワクチン標的の同定は、新規アジュバントの必要性和相まって、克服されるべき課題の一部である(de Zoeteら、2007年; Laytonら、2011年; Zengら、2010年; Clarkら、2012年)。結果的に、C.ジェジュニに対する市販のワクチンは、現在入手可能ではない。

10

【0009】

[0009]Nurmi及びRantala(1973)によって最初に記載された競合排除(CE)アプローチは、カンピロバクターがその特定の微小環境、とりわけ、盲腸を占有することを防ぐための、健全なニワトリの腸から得られた定義された又は未定義の微生物を使用する保護的腸内フローラの確立に基づいている(Zhangら、2007年; Chen、2001年; Stern、2001年)。CEアプローチを適用することの困難さとして、CE製品における複合種の同定における標準化がないこと並びにカンピロバクター感染の低減における、限定された、可変の成功率が挙げられる(Lin、2009年; EFSA Journal 2011年)。

20

【0010】

[0010]最後に、カンピロバクター種に対するニワトリの感受性又は耐性は、宿主の遺伝子系に応じて変わり、非免疫及び免疫機構の両方を含むことが示唆されている(Kaiserら、2009年)。従って、選択的育種は、遺伝的に受け継がれる耐性ニワトリ系統を拡大するための選択方法であろう。この関連で、4種の近交系ニワトリ系統間でカンピロバクター種コロニー形成における10~100倍の相違が観察され、受け継がれる耐性パターンは、単一の常染色体優性遺伝子座と一致した(Boydら、2005年)。しかし、食肉又は卵製造及び品質を保ちながらの耐性ニワトリ系統の確立は、時間のかかるプロセスであり、予測できない結果を伴う。今日までに、上記の実験的介入のうち、モデル化されたものはなく、現場レベルで適用されたものはなく、従って、商業的に成功していない。

30

【0011】

[0011]抗体は、最初は、1890年代の初期にBehring及びKitasatoによって有効な抗菌試薬として認識され(Behring & Kitasato、1890年; Casadevallら、2004年)、それから、血清治療が、多数の感染性疾患と闘うための有効な戦略となった。血清又は腸分泌物中の特異的抗体の存在は、C.ジェジュニによるコロニー形成に対するウサギ(Burrら、1988年; Pavlovskisら、1991年; Rollwagenら、1993年)及びマウス(Dolby & Newell 1986年; Rollwagenら、1993年)の耐性と関連していた。若いニワトリ(2~3週齢未満)では、カンピロバクター種に対する移行抗体の存在が、コロニー形成の開始を遅延し、群れにおけるC.ジェジュニの水平伝播の速度を低下させ(Sahinら、2003年)、これは、抗カンピロバクター種抗体を使用する受動免疫療法が、ニワトリにおいて細菌コロニー形成を干渉するための魅力的なアプローチであり得ることを示唆する。実際、抗鞭毛モノクローナル抗体を用いる受動免疫は、マウスにおいてC.ジェジュニコロニー形成を低減すると既に示されている(Uekiら、1987年)。同様に、過免疫抗C.ジェジュニウサギ血清又は抗C.ジェジュニ抗体の使用は、ニワトリにおいてC.ジェジュニコロニー形成を減少させるのに有効であるようである(Sternら、1990年)。これと一致して、他の人が、血液中に高力価のカンピロバクター種特異的IgG循環を有する家禽食肉処理場作業員は、稀にしか、カンピロバクター症にかからないことを示した(Cawthrawら、2000年)。すべてのこ

40

50

これらの知見にもかかわらず、カンピロバクター含量を低減するための薬剤としての抗体は、高い製造費用、GI管プロテアーゼに対する従来の抗体の感受性、有効なGI管送達系がないこと及びカンピロバクターの種々の株を標的とするために複数の抗体調製物を必要とするカンピロバクター種間の高い抗原性変異のために市場の注目を大きく浴びることはなかった。

【0012】

[0012]米国特許第8,173,130号(Salzmanら)、米国特許出願公開第2009/0208506号(Rachamimら)及び米国特許出願公開第2010/0239583号(Murthyら)には、細菌感染を阻止し、並びに炎症性腸疾患を含めた疾患を治療又は予防するために使用され得る、カンピロバクターを含めた種々のグラム陰性菌由来のフラジェリンに対するモノクローナル抗体が記載されている。これらの抗体は、エンジニアリングの困難性、製造の困難性及び費用並びに*in vivo*で使用された場合の遅い組織浸透を含めたこのような分子の共通の不利点を共有する。さらに、mAb及びその断片(例えば、scFv及びFab)は、GI管プロテアーゼに対して極めて感受性であり、これは、経口投与が望まれる場合に不都合である。

10

【0013】

[0013]ウサギ及びマウスの血清又は腸分泌物中の特異的抗体の存在は、C.ジェジュニによる胃腸管コロニー形成に対する耐性と関連している。ニワトリにおける研究もまた、能動免疫は、C.ジェジュニによる腸管感染のレベルを低減し得ると示唆するが、ニワトリの早期食肉処理に先立って十分な免疫応答を得るための時間枠並びに費用及び実現可能性が、このアプローチを実現困難にしている。

20

【0014】

[0014]供給源、特に、家禽飼育場内でのカンピロバクターの管理は、病原体に対するヒト曝露の危険を低減し、食品の安全性及び公衆衛生に対して相当な影響を与えるであろう。より安全な食品を提供することで、供給業者が費用のかかる操業停止及び製品の回収を避けることを可能にすることは有利である。環境曝露を低減すること、バイオセキュリティを改善すること、競合排除、ワクチン接種、宿主遺伝学的特徴の選択並びにバクテリオファージ治療及びバクテリオシン治療を含めた抗菌物質又は抗生物質戦略が有益であるが、食品供給においてC.ジェジュニを低減するための改善された戦略が依然として必要である。カンピロバクター・ジェジュニによって示される課題に対する革新的なアプローチは、公衆にとって有益となる。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

[0015]従って、食品供給においてC.ジェジュニを低減する費用効率の高い方法に対して、当技術分野で必要性が残っており、また、高親和性を有するが、IgG及びその変異体の欠点を克服できる抗体に対して、当技術分野で必要性が残っている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

[0016]本開示内容は、一般には、抗体、その断片及びこのようなタンパク質の誘導體及び適用に関する。記載される抗体及び断片は、C.ジェジュニの鞭毛タンパク質に向けられる。

40

【0017】

[0017]単離又は精製された抗体又はその断片は、ペンタボディなどの多量体形態を含めたその改変体と共に本明細書において記載されるとおりである。C.ジェジュニ鞭毛に対する抗体又はその断片の親和性特異性が示されている。抗体は、例えば、経口投与された場合のニワトリにおけるC.ジェジュニコロニー形成レベルの低下において有効性を示す。開示される抗体は、細菌鞭毛に対して特異的結合を示す。本明細書に記載される抗体及び多量体はC.ジェジュニの運動性を低減する。さらに、有利な生物物理学的特性を有する変異体が記載されている。特異的パニングの試み及びジスルフィド結合エンジニアリン

50

グ戦略によって、良好な熱的安定性及びプロテアーゼ耐性 (t o l e r a n c e) 又は耐性を示す抗体が記載されている。優れた熱的安定性及び主要な胃腸 (G I) プロテアーゼに対する耐性を有する高安定化抗体又はその断片も記載されている。

【 0 0 1 8 】

[0018] 従って、本開示内容は、

配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) 又は V S T F S I N A L G (配列番号 4) を含む相補性決定領域 (C D R) 1 と ;

配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) 又は I G S D G T V (配列番号 5) を含む C D R 2 と ;

配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) 又は N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) を含む C D R 3 と

を含む、C . ジェジュニ鞭毛と特異的に結合する、単離又は精製された抗体又はその断片を提供する。

【 0 0 1 9 】

[0019] 上記で記載されるような単離又は精製された抗体又はその断片は、配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) の C D R 1 と、配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) の C D R 2 と、配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) の C D R 3 とを含み得る。より詳しくは、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列 :

Q V X ₁ L X ₂ E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V X ₃ A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T X ₄ T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 7)

[式中、X ₁ = K 又は Q であり ; X ₂ = E 又は V であり ; X ₃ = A 又は C であり ; X ₄ = I 又は C である] 又はそれと実質的に同一の配列を含み得る。特定の限定されない例では、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列 :

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 8) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 9) ;

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 10) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 11) ;

又はそれらと実質的に同一の配列を含み得る。

【 0 0 2 0 】

[0020] 或いは、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列 V S T F S I N A L G (配列番号 4) の C D R 1 と、配列 I G S D G T V (配列番号 5) の C D R 2 と、配列 N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) の C D R 3 とを含み得る。より詳しくは、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列 :

Q V X ₁ L X ₂ E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A P G K A R E L V X ₃ A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T X ₄ S R D N A K N

TVSLQMSSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFG
SWGQGTQVTVSS (配列番号12)

[式中、X₁ = K又はQであり；X₂ = E又はVであり；X₃ = A又はCであり；X₄ = I又はCである]又はそれと実質的に同一の配列を含み得る。特定の限定されない例では、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列：

QVKLEESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQA
PGKARELVAAIGSDGTVYYTDSVKGRFTISRDN AKNTVSL
QMSSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSS (配列番号13)；

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQA
PGKARELVAAIGSDGTVYYTDSVKGRFTISRDN AKNTVSL
QMSSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSS (配列番号14)；

10

QVKLEESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQA
PGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDN AKNTVSL
QMSSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSS (配列番号15)；

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTF SINALGWYRQA
PGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDN AKNTVSL
QMSSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSS (配列番号16)；

20

又はそれらと実質的に同一の配列を含み得る。

【0021】

[0021]本明細書において記載されるような単離又は精製された抗体又はその断片は、フラジェリンと特異的に結合し得る；より詳しくは、単離又は精製された抗体又はその断片は、フラジェリンのFlaA成分と特異的に結合し得る。

【0022】

[0022]上記で記載されるような単離又は精製された抗体又はその断片は、単ドメイン抗体(sdAb)であり得る。sdAbは、ラクダ科動物起源のものであり得る。

【0023】

[0023]単離又は精製された抗体又はその断片は、多価提示で提供され得る。例えば、単離又は精製された抗体又はその断片は、ペロ毒素Bサブユニットとの融合タンパク質として発現され得る。融合タンパク質は、ペンタポディにアSEMBルし得る。特定の限定されない例では、多量体は、

QVKLEESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVAAISWSRDRQYYPDPVKGRFTITRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGQGTQ
VTVSSSGPGGSGGGGSGTTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV
GDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFS
EVI FR (配列番号19)；

40

QVQLVESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVAAISWSRDRQYYPDPVKGRFTITRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGQGTQ
VTVSSSGPGGSGGGGSGTTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV
GDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFS
EVI FR (配列番号20)；

QVKLEESGGGLVQAGGSRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVCAISWSRDRQYYPDPVKGRFTCTRDN AKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGQGTQ
VTVSSSGPGGSGGGGSGTTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKV

50

G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号 3 4) ;

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

G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号 3 5) ;

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

V K V G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G
G F S E V I F R (配列番号 2 1) ;

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

V K V G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G
G F S E V I F R (配列番号 2 2) ;

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

V K V G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G
G F S E V I F R (配列番号 3 6) ;

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

V K V G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G
G F S E V I F R (配列番号 1 6) ;

又はそれらと実質的に同一の配列
から選択される1種又は複数の融合タンパク質を含み得る。

【0024】

[0024]本開示内容はまた、本明細書において記載される単離又は精製された抗体又はその断片をコードする核酸配列を提供する。ここで記載された核酸分子を含むベクターも提供される。

【0025】

[0025]本開示内容の単離又は精製された抗体又はその断片は、検出可能な標識と連結され得る。

【0026】

[0026]本開示内容は、動物又は動物環境におけるC. ジェジュニの存在を低減する方法をさらに提供する。本方法は、動物に、本開示内容の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む。単離又は精製された抗体又はその断片は、経口投与され得る。単離又は精製された抗体又はその断片は、酵母発現系に含まれ得る。記載されるような方法では、抗生物質、バクテリオシン又はC. ジェジュニに対して有効であるその他の植物若しくは動物由来化合物が、動物にさらに投与され得る；或いは、プロバイオティック系において、任意選択で、同時発現されるか、若しくは同時に含有される競合微生物が、動物にさらに投与されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

[0027]本開示内容はまた、動物環境へのC．ジェジュニの導入を低減する方法も提供する。単離又は精製された抗体又はその断片は、動物環境に新入動物を入れる前に、新入動物に投与される。

【 0 0 2 8 】

[0028]本開示内容は、本明細書において記載されるような単離又は精製された抗体又はその断片及び賦形剤を含むC．ジェジュニワクチン又は製剤をさらに提供する。ワクチンは、経口送達用であり得る。

【 0 0 2 9 】

[0029]C．ジェジュニに感染した対象を治療する方法もまた提供され；対象は、本明細書において記載されるような単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップによって治療される。任意選択で、方法はまた、C．ジェジュニに対して有効な抗生物質を投与するステップを含み得る。ここで記載されるような方法では、対象は、ニワトリ、ウシ及びヒツジからなる群から選択される家畜動物であり得る；或いは、対象は、ヒトであり得る。

10

【 0 0 3 0 】

[0030]本開示内容は、それを必要とする対象においてC．ジェジュニ感染を治療するための、又は治療するための医薬を調製するための、本明細書において記載される単離又は精製された抗体又はその断片の使用をさらに提供する。

【 0 0 3 1 】

[0031]サンプル中のC．ジェジュニを検出する方法も提供される。サンプルを、本明細書において記載される単離又は精製された抗体又はその断片と接触させ、次いで、結合している抗体の存在が検出される。サンプルは、体液又は糞便物質を含み得る；或いは、サンプルは、食品又は食品から得た表面スワブを含み得る。

20

【 0 0 3 2 】

[0032]本開示内容はまた、サンプル中のC．ジェジュニを検出するためのキットを提供する。キットは、本開示内容の単離又は精製された抗体又はその断片及びC．ジェジュニの検出に使用するための説明書を含み得る。本明細書において記載される単離又は精製された抗体又はその断片及び適した担体を含む、サンプル中のC．ジェジュニを検出するための検出試薬もまた提供される。

30

【 0 0 3 3 】

[0033]本開示内容のその他の態様及び特徴は、添付の図とともに、以下の特定の実施形態の説明を再検討すると当業者には明らかとなる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 4 】

本開示内容の実施形態は、単に例として、添付の図を参照してここで記載される。

【 図 1 】本明細書において調製されるV_HH単量体及び五量体の配列を示す図である。

【 図 2 】単量体及び五量体V_HHのC．ジェジュニ表面抗原との結合のELISA分析並びにクマシー染色された精製された単量体及び五量体抗体の像を示す図である。種々の濃度(10~0.0001μg/mlの範囲)の鞭毛特異的抗体(V_HH)の単量体(FlaV1M)及び五量体(FlaV1P)形態をELISAに使用した。吸光度データを、単量体及び五量体形式のV_HH分子の実際の数に対して標準化した。中黒の四角は、ペンタポディV_HHを表し、中白の四角は、単量体V_HHを示す。クマシー染色された精製された単量体及び五量体V_HHの代表的な像は、ELISA分析の上に示されている。

40

【 図 3 】単量体V_HH FlaV1M及びFlaV6MのC．ジェジュニ鞭毛との結合のSPR分析を示す図である。センサーグラムは、28、42、56、70、140及び190nMのFlaV1M(図3A)又はFlaV6M(図3B)の、SAセンサーチップ上に捕獲された700RUのビオチン化フラジェリンとの結合を示す。中白丸は、データ点であり、湾曲した線は、データの1:1相互作用モデルへのフィッティングである。図3Cは、機能的親和性(結合力)の増大を示す五量体FlaV1PのSPRセン

50

サーグラムであり；これによって、図2に示されるELISA結果が確認される。

【図4】ウエスタンブロットにおけるFlag V1 PペンタボディによるフラジェリンのFla A成分の検出を例示する。C. ジェジュニのFla A突然変異体（レーン1）、Fla B突然変異体（レーン2）及び野生型81-176（レーン3）株から調製された鞭毛を、ニトロセルロースメンブレン上にブロットし、Flag V1 Pと反応させた。抗His A Pコンジュゲート（レーン1～3）によってフラジェリン成分を検出した。

【図5】Flag V1 M及びFlag V6 MのSPR同時注入実験の結果を示すセンサーグラムである。各V_HHを固定化された鞭毛上に注入した。第2の注入でシグナルがおよそ2倍になったので、Flag V1 M及びFlag V6 Mは、別個の、非重複エピトープと結合すると思われた。

【図6】C. ジェジュニ（株81176）（パネルa、b）又は対照としてC. ディフィシル（difficile）菌（パネルc、d）及びC. ジェジュニ（株1293）（パネルe、f）のいずれかとハイブリダイズした蛍光標識されたFlag V1 Pを示す写真を示す。C. ジェジュニ株（a、b）は、FITC標識五量体によって特異的に検出され、画像（a、b）において白で示されており、対照株は、同抗体によって染色されない（暗い又は灰色のバックグラウンドとして示される；c、d、e及びf）。

【図7】種々のC. ジェジュニ株81-176、81-176 fla A - fla B -、又はC. ジェジュニ株11168鞭毛と結合しているFlag V1 P（横列A）及びFlag V6 P（横列B）を示す蛍光顕微鏡像の収集物を示す図である。横列Cは、3種の株の各々と結合しているウサギポリクローナル抗81-176鞭毛抗体を示す蛍光顕微鏡像である。5 μmバーによって示されるような同倍率ですべての像の代表的な視野が示されている。FITC標識ペンタボディの結合は、横列A（左パネル）；横列B（左及び右パネル）；及び横列C（左及び右パネル）の像において白色として現れた。Flag V1 Pは、C. ジェジュニ株1168を標識しなかった（横列A、右パネル）；Flag V1 P及びFlag V6 Pは両方とも、81-176 fla A - fla B - 突然変異体（横列A、B及びC、中央パネル）を標識しなかった。

【図8】Flag V1 P及びFlag V6 Pの、C. ジェジュニの9種の異なる株から得た鞭毛単離物との結合のELISA結果を示す棒グラフである。吸光度値は、2回の独立した実験の平均を示す。

【図9】Flag V1 Pの不在下又は存在下でのC. ジェジュニの運動性アッセイの結果を示す。写真は、53時間インキュベートした後に撮られた。パネルA：対照としてバッファーとともにインキュベートしたC. ジェジュニ菌；パネルB：非関連ペンタボディとともにインキュベートした細菌；パネルC：Flag V1 Mとともにインキュベートした細菌；及びパネルD：Flag V1 Pとともにインキュベートした細菌。

【図10】細菌がペンタボディ及び抗生物質の組合せを用いて処理された場合の、C. ジェジュニの運動性アッセイの結果を表す図である。上の横列は、対照バッファーを用いて処理された場合の細菌成長を示し、下の横列は、Flag V1 P（1 μg/mlの濃度）を用いて処理された細菌を表す。漸増濃度のテトラサイクリンを使用した：0 μg/ml（縦列A）、4 μg/ml（縦列B）、16 μg/ml（縦列C）及び64 μg/ml（縦列D）。写真は24時間インキュベートした後に撮られた。

【図11】Flag V6 PのC. コリとの交差反応性を示すが、サルモネラ・チフィムリウム（Salmonella typhimurium）とは示さない運動性アッセイの結果を示す。C. コリ株VC167（図11A）及びS. エンテリカ（enterica）血清型チフィムリウム（図11B）の細菌成長を種々の時点で測定した。1 μg/μlの濃度で抗体を使用した。

【図12】10⁸個C. ジェジュニ細胞を接種されたニワトリのカンピロバクター・ジェジュニコロニー形成のレベルに対するFlag V1 P及びFlag V1 F23 Pの経口投与の効果を示す。C. ジェジュニを用いる抗原投与後、ニワトリにFlag V1 P（標識されたFlag V1 P2R5）又はFlag V1 F23 P（標識されたF23 P）を与えた。非感染陰性対照群も含めた。図12Aは、個々の盲腸における細菌負荷の散布図を示

10

20

30

40

50

し、平均盲腸細菌負荷は、水平線によって表されている。図12Bは、PBS（中白バー）、FlagV1P（中黒バー）又はFlagV1F23P（斜線のバー）を用いて処理されたニワトリの盲腸における細菌負荷（平均+SEM）*** $p < 0.001$ 、一元配置分散分析と、それに続く、ボンフェローニ多重比較検定を示す。

【図13】ニワトリ体重に対するFlagV1P（1mg）の投与の効果を示す図である。C.ジェジュニ単独を用いる抗原投与又は抗原投与とそれに続くペンタボディ投与の1日後及び4日後にニワトリの体重を量った。PBSを対照として使用し、1日目及び4日目に体重（グラムで）を測定した。各群について、28の反復から得られた値の平均体重±標準偏差が示されている。群間に有意差は見られなかった。

【図14】ニワトリ腸管の種々の部分におけるFlagV1Pの検出の結果を示す棒グラフを示す図である。ニワトリに、FlagV1Pを用いて胃管栄養を施し、腸液を、盲腸、回腸、空腸及び十二指腸から採取した。2倍段階希釈を調製し、ELISAに付した。グラフの結果は、ペンタボディは、盲腸及び回腸液抽出物において最も検出されたことを示す。

【図15】プロテアーゼ耐性V_HH FlagV1M変異体を単離するための方法論を示す図である。図15Aは、ファージミドベクターpMED6の多重クロニング部位を示す。His₆/HAタグをコードするDNAを、3SfiI部位（太字及びイタリック体）とアンバー停止コドン（下線が引かれている）の間の配列から除去した。図15Bは、FlagV1M V_HHエラープローンPCRライブラリーの構築、ファージのプロテアーゼ処理及びパニングスキームを強調するワークフロー図を示す。図15Cは、V1エラープローンPCRライブラリーから得られたプロテアーゼ処理したファージのパニングから単離された9種のV_HHのファージELISA結果を示す棒グラフである。アスタリスクは、FlagV1Mに対して同等のシグナルを示したクローンを表す。

【図16】FlagV1由来抗体の生物物理学的を提供する図である。V1 = FlagV1M；F23 = FlagV1F23M；V1-DSB = FlagV1MDSB；F23-DSB = FlagV1F23MDSB。図16Aは、種々のV_HHの分離を示す非還元SDS-PAGEゲルであり；可溶性細菌発現は、最大23mg/LのV_HHを生じさせた。すべてはその予測された分子量に移動した。図16Bは、種々のV_HHのシングルサイクルカイネティックSPRセンサーグラムを示す。V_HHは、固定化されたC.ジェジュニ鞭毛との高親和性結合を保持し、1：1結合モデルとフィットする。各V_HHのK_Dがセンサーグラム上に示されている。図16Cは、種々のV_HHのSuperdex75（商標）サイズ排除クロマトグラフィープロファイルを示し、すべてが非凝集単量体であり、すべてのサンプルが100%の単量体ピークに近似することを実証する。

【図17】中性pH（7.3）及び酸性pH（2.0）での、FlagV1M及びFlagV1F23M V_HH並びにそれらのジスルフィド結合変異体の熱的アンフォールディング曲線を示す図である。中点アンフォールディング温度（融点、T_m）を算出した。pH2.0では、25の出発温度で、V1は、十分に変性し、FlagV1F23Mは部分的に変性した。pH2.0で、FlagV1MDSBは、部分的に変性したが、FlagV1F23MDSBは、十分にフォールディングしており、V_HH熱的安定性に対するFlagV1F23M及び追加のジスルフィド結合の相加作用を実証した。中白丸は、反復1を表し；中黒丸は、反復2を表す。V1 = FlagV1M；F23 = FlagV1F23M；V1-DSB = FlagV1MDSB；F23-DSB = FlagV1F23MDSB

【図18】FlagV1M及びFlagV1F23M V_HH並びにそれらのジスルフィド結合変異体の、主要な胃腸プロテアーゼに対するプロテアーゼ感受性を示す図である。V_HHを、ペプシン、トリプシン及びキモトリプシンを用いて消化し、対照実験では、酵素の不在下でV_HHをインキュベートした。消化されたV_HH及び対照を、SDS-PAGEによって分離した。棒グラフは、SDS-PAGEゲルの濃度測定分析によって生じたプロテアーゼ耐性プロファイルを要約するものである。各V_HH及び各プロテアーゼについて、合計3回の独立した消化を実施した。エラーバーは、平均プロテアーゼ耐性±S

10

20

30

40

50

EMを表す。V1 = Flag V1M ; F23 = Flag V1F23M ; V1 - DS B = Flag V1MDSB ; F23 - DS B = Flag V1F23MDSB

【図19】複数のプロテアーゼに曝露されたV_HHによるC・ジェジュニ運動性の低下を示す図である。図19Aは、ペプシンと、それに続いてトリプシン及びキモトリプシンを用いるV_HHの連続消化を示す模式図である。図19Bは、連続消化の還元SDS-PAGEゲル分析である。図19Cは、運動性アッセイの棒グラフ概要である。バーは、3回の独立した実験から得られた、バッファー対照、V_HH又はプロテアーゼ消化されたV_HHで処理したプレート上のC・ジェジュニの平均直径を表し；エラーバーは、SEMを表す。5mmでの破線は、プレート上のC・ジェジュニの発芽直径を表す。一元配置分散分析と、それに続いて、すべてV_HHを用いない対照に対して、ダネットの多重比較検定によって統計分析を実施した（**p < 0.01）。Flag V1M及びFlag V1F23M V_HH

10

【図20】代表的なC・ジェジュニ運動性アッセイの結果を表す図である。C・ジェジュニ運動性は、機能的V_HHの存在下で低下する。C・ジェジュニ株81-176を、対照バッファー又はV_HHを有するプレートに適用した。プレート播種の24時間後に細菌成長の直径を測定した。(i)プロテアーゼを含有する対照バッファー(V_HHなし)とともに24時間インキュベートした後の対照C・ジェジュニ、(ii)画像の凡例、(iii)Flag V1M対照、15及び30分消化、(iv)Flag V1MDSB対照、15及び30分消化、(v)Flag V1F23M対照、15及び30分消化並びに(vi)Flag V1F23MDSB対照、15及び30分消化。

20

【発明を実施するための形態】

【0035】

[0055]一般には、本開示内容は、C・ジェジュニと特異的に結合する抗体及びその断片に関する。本明細書において記載される抗体及びその断片は、食物連鎖におけるC・ジェジュニ有病率の管理又は減少において有用である。C・ジェジュニレベルを低下させる、動物へのC・ジェジュニ特異的単ドメイン抗体の投与を含む方法が記載されている。

【0036】

[0056]配列GLTFRNFHMA（配列番号1）又はVSTFSINALG（配列番号4）を含む相補性決定領域(CDR)1と、

配列ISWSRDRQ（配列番号2）又はIGSDGTV（配列番号5）を含むCDR2と、

配列AARTASASGDWYKGSYQY（配列番号3）又はNAAGKRIGSDGSIFAVASFGS（配列番号6）を含むCDR3と

を含む、C・ジェジュニ鞭毛と特異的に結合する、単離又は精製された抗体又はその断片。

30

【0037】

[0057]精製された抗体又はその断片は、C・ジェジュニ鞭毛との特異的結合を示す。抗C・ジェジュニは、C・ジェジュニの鞭毛タンパク質との結合、C・ジェジュニの運動性の低下又はC・ジェジュニのコロニー形成若しくは感染の発生率の低下の点で、機能的に決定され得る。結合及び/又は運動性の評価は、本明細書において記載される技術を使用して、十分に当業者の能力の範囲内である。1つの限定されない例では、精製された抗体又はその断片は、フラジェリンと特異的に結合する。さらなる限定されない例では、精製された抗体又はその断片は、フラジェリンのFlaA成分と特異的に結合する。

40

【0038】

[0058]用語「抗体」はまた、本明細書において使用される「免疫グロブリン」(Ig)と当技術分野で呼ばれ、対となる重鎖及び軽鎖ポリペプチドから構築されるタンパク質を指し；IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMを含めた種々のIgアイソタイプが存在する。抗体が正しくフォールディングされる場合には、各鎖は、より線形のポリペプチド配列によって接続されるいくつかの別個の球状ドメインにフォールディングする。例えば、免疫グロブリン(immunoglobulin)軽鎖は、可変(V_L)及び定常

50

(C_L)ドメインにフォールディングするが、重鎖は、可変(V_H)及び3つの定常(C_H 、 C_{H2} 、 C_{H3})ドメインにフォールディングする。重鎖及び軽鎖可変ドメイン(V_H 及び V_L)の相互作用は、抗原結合領域(Fv)の形成をもたらす。各ドメインは、当業者によく知られる十分に確立された構造を有する。

【0039】

[0059]軽鎖及び重鎖可変領域は、標的抗原との結合に関与しており、従って、抗体間で相当な配列多様性を示し得る。定常領域は、配列多様性をあまり示さず、重要な生化学的事象を誘発するいくつかの天然タンパク質との結合に関与している。抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定基を含有し、従って、その標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。配列多様性の大部分は、可変重鎖(V_H)及び軽鎖(V_L)あたり各3つの、6つの超可変領域中で生じ；超可変領域が組み合わさって、抗原結合部位を形成し、抗原決定基の結合及び認識に寄与する。抗体の、その抗原に対する特異性及び親和性は、超可変領域の構造並びに抗原に示す表面のその大きさ、形状及び化学によって決定される。超可変性の領域を同定するために種々のスキームが存在し、2つの最も一般的なものは、Kabattのもの並びにChothia及びLeskのものである。Kabattら(1991a; 1991b)では、 V_H 及び V_L ドメインの抗原結合領域での配列多様性に基づいて「相補性決定領域」(CDR)が定義されている。Chothia及びLesk(1987年)では、 V_H 及び V_L ドメイン中の構造的ループ領域の位置に基づいて「超可変ループ」(H又はL)が定義されている。これらの個々のスキームが、隣接するか、又は重複しているCDR及び超可変ループ領域を定義しているので、抗体の技術分野の当業者は、用語「CDR」及び「超可変ループ」を同義的に利用することも多く、それらは本明細書においてそのように使用され得る。この理由のために、抗原結合部位を形成する領域は、現在、本明細書において、 V_H 及び V_L ドメインを含む抗体の場合には、CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2、CDR H3と、重鎖又は軽鎖いずれかの抗原結合領域の場合にはCDR 1、CDR 2、CDR 3と呼ばれる。CDR/ループは、本明細書において、可変ドメインの比較を容易にするために開発されたIMGT付番方式(Lefranc, M.-P.ら、2003年)に従って呼ばれる。この方式では、保存されたアミノ酸(Cys 23、Trp 41、Cys 104、Phe/Trp 118及び位置89の疎水性残基など)は、同一位置を常に有する。さらに、フレームワーク領域(FR1:位置1~26; FR2:39~55; FR3:66~104; 及びFR4:118~129)の、及びCDR(CDR1:27~38、CDR2:56~65; 及びCDR3:105~117)の標準化された限界の設定が提供される。

【0040】

[0060]CDRの外側の領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。FRは、可変ドメインに構造的完全性を提供し、免疫グロブリンフォールディングの保持を確実にする。抗体のこの特徴的構造が、実質的な抗原結合多様性が抗原のブロードアレイに対して特異性を得るように、免疫系によって探索され得る安定なスキャフォールドを提供する(Padlanら、1994年)。

【0041】

[0061]本明細書において「抗体断片」は、当技術分野で公知の任意の適した抗原結合性抗体断片を含み得る。抗体断片は、天然に存在する抗体の操作によって得られる場合も、組換え法を使用して得られる場合もある。例えば、抗体断片は、それだけには限らないが、 Fv 、一本鎖 Fv (sc Fv ; ペプチドリンカーで連結された V_L 及び V_H からなる分子)、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、単一ドメイン抗体(sdAb)及びこれらの多価提示を含み得る。

【0042】

[0062]限定されない例では、抗体断片は、天然に存在する供給源に由来する単一ドメイン抗体(sdAb)であり得る。ラクダ科動物起源の重鎖抗体(Hammers-Castermanら、1993年)は、軽鎖を欠き、従って、その抗原結合部位は、 V_HH と呼ばれる1つのドメインからなる。sdAbはまた、サメでも観察され、VNARと呼ばれ

10

20

30

40

50

(Greenbergら、1995年; Nuttallら、2003年); その他のsdAbは、ヒト重鎖又は軽鎖配列に基づいて操作され得る(Jespersら、2004年; Toら、2005年)。本明細書において、「sdAb」は、ファージディスプレイ又はその他のディスプレイ技術によって任意の起源のV_L、V_H、V_HH又はV_{NAR}リザーバーから直接単離されたもの及びヒト化、親和性成熟、安定化、可溶化(例えば、ラクダ化(camelization))又は抗体エンジニアリングのその他の方法によるこのようなsdAbのさらなる改変によって作製されたものを含む。また、sdAbの抗原結合機能及び特異性を保持する相同体、誘導体又は断片も本発明に記載された実施形態によって包含される。

【0043】

[0063] SdAbは、その高い熱安定性、高い界面活性剤耐性、プロテアーゼに対する比較的高い耐性(Dumoulinら、2002年)及び高い製造収率(Arbabi-Ghahroudiら、1997年)のために、新規抗体分子の優れたビルディングブロックである; それらはまた、免疫ライブラリーからの単離によって(Liら、2009年)又はin vitro親和性成熟によって(Davies & Riechmann、1996年)極めて高い親和性を有するよう操作され得る。

【0044】

[0064] 毒素中和及び/又は標的不活性化などの適用には、抗体断片(特に、sdAb)は、原核生物系における低い製造費用及び遺伝子操作の容易さのために全抗体(例えば、IgG)よりも好ましい。さらに、V_HHは、組換え発現系を使用して単量体として、クローニングされ、発現される場合に、極めて安定であると示されている(Arbabi-Ghahroudiら、1997年; Muyldermans 2001年)。

【0045】

[0065] 当業者は、単ドメイン抗体の構造について精通しているであろう。sdAbは、免疫グロブリンフォールディングを保持する単一免疫グロブリンドメインを含み; 最も注目すべきことに、3つのCDRのみが抗原結合部位を形成する。しかし、すべてのCDRが、抗原の結合にとって必要であるわけではない。例えば、限定は望まないが、CDRのうち1、2又は3つが、本開示内容のsdAbによる抗原の結合及び認識に寄与し得る。sdAbのCDRは、本明細書においてCDR1、CDR2及びCDR3と呼ばれ、IMGT付番方式(Lefranc, M.-P.ら、2003年)に基づいている。

【0046】

[0066] これまでに記載されたように、抗体又はその断片は、sdAbであり得る。sdAbは、ラクダ科動物起源のものであり得、従って、ラクダ科動物フレームワーク領域がもとになり得; 或いは、CDRは、その他の抗体ドメインのフレームワーク領域、例えば、それだけには限らないが、V_{NAR}、ヒトV_H又はヒトV_Lフレームワーク領域にグラフトされ得る。さらに別の代替法では、上記のCDRは、抗体断片のその他の種類のフレームワーク領域(Fv、scFv、Fab)にグラフトされ得る。本実施形態は、当技術分野で公知の任意の適した方法、例えば、それだけには限らないが、CDRグラフト化及びベニアリングを使用して「ヒト化」されている抗体断片をさらに包含する。抗体又は抗体断片のヒト化は、抗原結合能又は特異性を喪失することなく、配列中のアミノ酸を、ヒトコンセンサス配列中に見られるようなそのヒト対応物と置換することを含む; このアプローチは、ヒト対象に導入される場合に、抗体又はその断片の免疫原性を低下させる。CDRグラフト化のプロセスでは、本明細書において定義される1種又は複数の重鎖CDRが、ヒト可変領域(V_H又はV_L)と、又はその他のヒト抗体断片フレームワーク領域(Fv、scFv、Fab)と融合又はそれにグラフト化され得る。このような場合には、前記の1種又は複数の超可変ループのコンホメーションが保存され、sdAbのその標的(すなわち、鞭毛)に対する親和性及び特異性も保存される。CDRグラフト化は、当技術分野で公知であり、少なくとも以下: 米国特許第6180370号、同5693761号、同6054297号、同5859205号及び欧州特許第626390号に記載されている。ベニアリングはまた、当技術分野で「可変領域再表面形成(resurfaci

10

20

30

40

50

ng)」とも呼ばれ、抗体又は断片のヒト化溶媒に曝露される位置を含み；従って、埋め込まれたCDRコンホメーションにとって重要であり得る非ヒト化残基が保存され、溶媒に曝露される領域に対する免疫学的反応の可能性が最小化される。ペニアリングは、当技術分野で公知であり、少なくとも以下：米国特許第5869619号、同5766886号、同5821123号及び欧州特許第519596号に記載されている。当業者ならば、このようなヒト化抗体断片を調製する方法に十分に精通しているであろう。

【0047】

[0067]本開示内容の単離又は精製された抗体又はその断片は、配列GLTFRNFHMA (配列番号1)のCDR1と、配列ISWSRDRQ (配列番号2)のCDR2と、配列AARTASASGDWYKGSYQY (配列番号3)のCDR3とを含み得る。抗体又はその断片は、sdAbであり得る。sdAbは、ラクダ科動物起源のものであり得、従って、ラクダ科動物フレームワーク領域が基になり得る。より特定の例では、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列：

QVX₁LX₂ESGGGLVQAGGSRRRLSCATSGLTFRNFHMAWFR
QVAGKEREVVX₃AISWSRDRQYYPDPVKGRFTX₄TRDNAK
NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYW
GGTQVTVSS (配列番号7)を含み得る。

【0048】

[0068] [式中、X₁ = K又はQ；X₂ = E又はV；X₃ = A又はC；X₄ = I又はC] 又はそれと実質的に同一の配列。さらなる限定されない例では、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列：本明細書においてFlagV1Mとも呼ばれる、

QVKLEESGGGLVQAGGSRRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVA AISWSRDRQYYPDPVKGRFTITRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQ
VTVSS (配列番号8)；

本明細書においてFlagV1F23Mとも呼ばれる、

QVQLVESGGGLVQAGGSRRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVA AISWSRDRQYYPDPVKGRFTITRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQ
VTVSS (配列番号9)；

本明細書においてFlagV1MDSBとも呼ばれる、

QVKLEESGGGLVQAGGSRRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVCAISWSRDRQYYPDPVKGRFTCTRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQ
VTVSS (配列番号10)；

本明細書においてFlagV1F23MDSBとも呼ばれる、

QVQLVESGGGLVQAGGSRRRLSCATSGLTFRNFHMAWFRQV
AGKEREVVCAISWSRDRQYYPDPVKGRFTCTRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAARTASASGDWYKGSYQYWGGGTQ
VTVSS (配列番号11)

又はそれらと実質的に同一の配列を含み得る。

【0049】

[0069]配列VSTFSINALG (配列番号4)のCDR1と、配列IGSDGTV (配列番号5)のCDR2と、配列NAGKRIGSDGSIWFAVASFGS (配列番号6)のCDR3とを含む、単離又は精製された抗体又はその断片が本明細書において記載される。抗体又はその断片は、sdAbであり得る。sdAbは、ラクダ科動物起源のものであり得、従って、ラクダ科動物フレームワーク領域が基になり得る。より特定の例では、単離又は精製された抗体又はその断片は、配列：

QVX₁LX₂ESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTFSINALGWYR
QAPGKARELVX₃AIGSDGTVYYTDSVKGRFTX₄SRDNAKN

T V S L Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G
S W G Q G T Q V T V S S (配列番号 1 2)

[式中、 $X_1 = K$ 又は Q ; $X_2 = E$ 又は V ; $X_3 = A$ 又は C ; $X_4 = I$ 又は C] 又はそれ
と実質的に同一の配列を含み得る。さらなる限定されない例では、単離又は精製された抗
体又はその断片は、配列：本明細書において F l a g V 6 M と呼ばれる、

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
G T Q V T V S S (配列番号 1 3) ;

本明細書において F l a g V 6 F 2 3 M と呼ばれる、

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
G T Q V T V S S (配列番号 1 4) ;

本明細書において F l a g V 6 M D S B と呼ばれる、

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
G T Q V T V S S (配列番号 1 5) ;

本明細書において F l a g V 6 F 2 3 M D S B と呼ばれる、

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
G T Q V T V S S (配列番号 1 6)

又はそれらと実質的に同一の配列を含み得る。

【 0 0 5 0 】

[0070] 実質的に同一の配列は、1種又は複数の保存的アミノ酸突然変異を含み得る。参
照配列に対する1種又は複数の保存的アミノ酸突然変異が、参照配列と比較して生理学的
、化学的又は機能的特性の実質的变化を伴わない突然変異体ペプチドをもたらし得るこ
とは当技術分野で公知であり；このような場合には、参照及び突然変異体配列は、「実質的
に同一の」ポリペプチドと考えられる。保存的アミノ酸突然変異は、アミノ酸の付加、欠
失又は置換を含み得；1つの限定されない例では、保存的アミノ酸突然変異は、保存的ア
ミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基の、同様の化学的特性（例えば
、大きさ、電荷又は極性）を有する別のアミノ酸残基との置換として本明細書において定
義される。

【 0 0 5 1 】

[0071] 保存的アミノ酸置換は、塩基性、中性、疎水性又は酸性アミノ酸を、同一群の別
のものと置換し得る。用語「塩基性アミノ酸」とは、生理学的 pH で通常、正に荷電して
いる、7 を超える側鎖 p K 値を有する親水性アミノ酸を意味する。塩基性アミノ酸として
、ヒスチジン (H i s 又は H) 、アルギニン (A r g 又は R) 及びリシン (L y s 又は K
) が挙げられる。用語「中性アミノ酸」(また「極性アミノ酸」) とは、生理学的 pH で
荷電されていないが、2つの原子によって共通して共有される電子の対が、原子の一方に
よってより接近して保持される少なくとも1つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ
酸を意味する。極性アミノ酸として、セリン (S e r 又は S) 、トレオニン (T h r 又は
T) 、システイン (C y s 又は C) 、チロシン (T y r 又は Y) 、アスパラギン (A s n
又は N) 及びグルタミン (G l n 又は Q) が挙げられる。用語「疎水性アミノ酸」(また
「非極性アミノ酸」) とは、E i s e n b e r g (1 9 8 4 年) の標準化されたコンセン
サス疎水性スケールに従ってゼロより大きい疎水性を示すアミノ酸を含むものとする。疎
水性アミノ酸として、プロリン (P r o 又は P) 、イソロイシン (I l e 又は I) 、フェ
ニルアラニン (P h e 又は F) 、バリン (V a l 又は V) 、ロイシン (L e u 又は L) 、

トリプトファン (Trp 又は W)、メチオニン (Met 又は M)、アラニン (Ala 又は A) 及びグリシン (Gly 又は G) が挙げられる。「酸性アミノ酸」とは、生理学的 pH で通常、負に荷電している、7 未満の側鎖 pK 値を有する親水性アミノ酸を指す。酸性アミノ酸として、グルタミン酸 (Glu 又は E) 及びアスパラギン酸 (Asp 又は D) が挙げられる。

【0052】

[0072] 配列同一性は、2 種の配列の類似性を評価するために使用され；2 種の配列が、残基位置間で最大一致を求めてアラインされた場合に、同一である残基のパーセントを算出することによって決定される。配列同一性を算出するために任意の公知の方法が使用され得；例えば、配列同一性を算出するためにコンピュータソフトウェアが利用可能である。限定は望まないが、配列同一性は、Swiss Institute of Bioinformatics によって維持される NCBI BLAST2 サービス (ca.exPASy.org/tools/blast/) で見られるような、BLAST-P、BLAST-N 又は FASTA-N などのソフトウェア又は当技術分野で公知である任意のその他の適当なソフトウェアによって算出され得る。

10

【0053】

[0073] 実質的に同一の配列は、少なくとも 90% 同一であり得；別の例では、実質的に同一の配列は、本明細書において記載される配列に対して、アミノ酸レベルで少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 又は 100% 同一であり得る。例えば、いかなる方法による限定も望まないが、Flag V1M、Flag V1F 23M、Flag V1MDSB 及び Flag V1F 23MDSB のアラインメントは、96.8% から 98.4% の間の配列同一性につながる。重要なことに、実質的に同一の配列は、参照配列の活性及び特異性を保持する。当業者には公知であろうが、抗体の、特に、フレームワーク領域内の特定のアミノ酸残基は、抗体の抗原結合特性及びその他の機能的特性に影響を及ぼすことなく突然変異され得る。

20

【0054】

[0074] 抗体又はその断片はまた、組換え抗体又はその断片の発現、検出又は精製に役立つさらなる配列を含み得る。例えば、限定は望まないが、抗体又はその断片は、ターゲティング又はシグナル配列 (例えば、それだけには限らないが、ompA)、検出タグ (例えば、それだけには限らないが、c-Myc)、精製タグ (例えば、それだけには限らないが、ヒスチジン精製タグ、His₅ 又は His₆) 又はそれらの任意の組合せを含み得る。

30

【0055】

[0075] 抗体又はその断片はまた、多価提示であり得る。多量体化は、当技術分野で公知の任意の適した方法によって達成され得る。例えば、いかなる方法による限定も望まないが、多量体化は、国際公開第 2003/046560 号パンフレットに記載されるように、自己アセンブリー分子を使用して達成され得る (Zhangら、2004年；Merritt & Hol、1995年)。記載される方法は、抗体又はその断片及び AB₅ 毒素ファミリーの B-サブユニットの五量体化ドメインを含む融合タンパク質を発現させることによってペンタポディをもたらす (Nielsenら、2000年；国際公開第 2003/046560 号パンフレット)；例えば、限定は望まないが、五量体化ドメインの配列は、

40

TPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKVGDKE LFTNRANLQSL LLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR (配列番号 17) であり得る。五量体化ドメインは、五量体にアセンブルし、それによって、抗体又はその断片の多価提示が形成される。当業者には認識されるであろうが、五量体中の各サブユニットは、上記の融合タンパク質を含む。当業者には容易に認識されるであろうが、抗体又はその断片の五量体化は、その抗原結合又は認識を決して変更しない (すなわち、抗体又はその断片は、同一の特異性及び親和性で同様の方法で同一抗原と結合する)。得られたペンタポディは、緻密であり、高い結合力 (機能的親和性) を有し、安定な抗原結合分子である

50

(Zhangら、2004年)。これらの五価抗体はまた、抗原と結合している場合には、凝集を増強でき (Zhangら、2004年)、それによってその有効性を高める。

【0056】

[0076]本明細書において記載される多量体の各サブユニットは、同一である場合も、異なる場合もある。さらに、多量体化ドメインは、リンカーを使用して抗体又は抗体断片と連結され得；このようなリンカーは、2つの分子の柔軟な結合を提供するために十分な長さ及び適当な組成のものでなくてはならないが、抗体の抗原結合特性を妨害してはならない。1つの限定されない例では、リンカーは、リンカーGPGGGS GGGGS (配列番号18)であり得る。

【0057】

[0077]1つの特定の限定されない例では、多量体は、配列：

本明細書において、FlagV1Pとも呼ばれる

QV K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V
A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q
V T V S S G P G G G S G G G G S T P D C V T G K V E Y T K Y N D E D T F T V K V
G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号19)；

本明細書において、FlagV1F23Pとも呼ばれる、

QV Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V
A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q
V T V S S G P G G G S G G G G S T P D C V T G K V E Y T K Y N D E D T F T V K V
G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号20)；

本明細書において、FlagV1PDSBとも呼ばれる、

QV K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V
A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q
V T V S S G P G G G S G G G G S T P D C V T G K V E Y T K Y N D E D T F T V K V
G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号34)；

本明細書において、FlagV1F23PDSBとも呼ばれる、

QV Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V
A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q
V T V S S G P G G G S G G G G S T P D C V T G K V E Y T K Y N D E D T F T V K V
G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G G F S
E V I F R (配列番号35)；

本明細書において、FlagV6Pとも呼ばれる、

QV K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
G T Q V T V S S G P G G G S G G G G S T P D C V T G K V E Y T K Y N D E D T F T
V K V G D K E L F T N R A N L Q S L L L S A Q I T G M T V T I K T N A C H N G G
G F S E V I F R (配列番号21)；

本明細書において、FlagV6F23Pとも呼ばれる、

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

10

20

30

40

50

GTQVTVSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFT
VKVGDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGG
GFSEVIFR (配列番号22) ;

本明細書において、FlagV6PDSBとも呼ばれる、

QVKLEESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTFSINALGWYRQA
PGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDN AKNTVSL
QMSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFT
VKVGDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGG
GFSEVIFR (配列番号36) ;

10

本明細書において、FlagV6F23PDSBとも呼ばれる、

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSC T ASVSTFSINALGWYRQA
PGKARELVCAIGSDGTVYYTDSVKGRFTCSRDN AKNTVSL
QMSLKPEDTAVYYCNAAGKRIGSDGSIWFAVASFGSWGQ
GTQVTVSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDEDTFT
VKVGDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGG
GFSEVIFR (配列番号16) ;

又はそれらと実質的に同一の配列を含み得る。

【0058】

[0078]多価提示のその他の形態も包含される。例えば、限定は望まないが、抗体又はその断片は、二量体、三量体又は任意のその他の適したオリゴマーとして提示され得る。これは、当技術分野で公知の方法、例えば、直接結合連結(Nielsenら、2000年)、c-jun/Fos相互作用(de Kruifら、1996年)、「ノブ・イントゥ・ホールズ(Knob into holes)」相互作用(Ridgwayら、1996年)によって達成され得る。多量体はまた、Zhuら(2010年)によって記載される多量体化ドメインを使用して形成され得る；本明細書において「コンボディ(combody)」形態と呼ばれるこの形態は、本明細書において記載されるような抗体又はその断片と、コイルドコイルペプチドの融合物であり、多量体分子をもたらす(Zhuら、2010年)。

20

【0059】

[0079]多量体化のための当技術分野で公知の別の方法は、Fcドメインを使用して抗体又はその断片を二量体することである。このアプローチでは、Fc遺伝子が発現ベクター中に挿入され；抗体又はその断片のヌクレオチド配列が増幅され、追加の残基を付加せずに、抗体又はその断片のC末端が、Fcのヒンジ領域に連結されるように、ベクター中に挿入され得る。得られたベクターは、哺乳類細胞株にトランスフェクトされ得、融合タンパク質が組換えによって発現され、次いで、アフィニティークロマトグラフィーによって(例えば、プロテインAカラムで)精製され得る。このような多量体化の方法の1つの限定されない例は、Bellら(2010年)及びIqbalら(印刷中)によって記載されている。このような二量体化を実行する技術は、当業者に公知であろう。

30

【0060】

[0080]上記のような多量体では、多量体内のサブユニットは、本明細書において記載されるような、同一又は異なる抗体又はその断片を含み得る。

40

【0061】

[0081]本明細書において記載されるような抗体又はその断片をコードする核酸配列も包含される。当業者には容易に理解されるであろうが、遺伝暗号の縮重を考えると、いくつかのヌクレオチド配列は、ポリペプチドをコードするという効果を有するであろう。核酸配列は、コドン最適化され得る。ここで記載されるような核酸を含むベクターが包含される。

【0062】

[0082]本明細書において記載される抗体又はその断片の任意の1種をコードするヌクレ

50

オチドを含む宿主細胞も当業者には容易に認識されよう。

【0063】

[0083]本明細書において記載される抗体又はその断片を含む、及び/又はウイルスコートタンパク質(例えば、それだけには限らないが、繊維状ファージのg3p)の1種との融合物として提示する、及び/又は抗体又はその断片をコードするヌクレオチドを含むファージも包含される。

【0064】

[0084]本明細書において記載される抗体又はその断片は、検出可能な標識で標識され得る。標識は、検出可能にされ得るか、それ自体検出可能であり得、その結果、C.ジェジュニとの結合の存在が観察され得る。検出可能な標識は、放射性同位元素、常磁性標識(例えば、ガドリニウム又は酸化鉄)、フルオロフォア、フルオロフォア、蛍光物質(例えば、FITC又は高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP))、近赤外(Near Infra-Red)(NIR;例えば、Cy5.5、Alexa680、DyLight680又はDyLight800)蛍光色素又は色素、エコー源性マイクロバブル、検出可能なタンパク質ベースの分子、ヌクレオチド、量子ドット、ナノ粒子、ナノワイヤー若しくはナノチューブと融合している親和性標識(例えば、ビオチン、アビジンなど)又はイメージング法によって検出され得る任意のその他の適した物質であり得る。抗体又はその断片は、当技術分野で公知の任意の方法(組換え技術、化学的コンジュゲーションなど)を使用して検出可能な物質と連結され得;任意選択で、必要に応じてリンカーが使用され得る。検出するステップは、当技術分野で公知の任意の適した方法、例えば、それだけには限らないが、光学イメージング、免疫組織化学又は分子診断イメージング、ELISA又はその他の適した方法によって達成され得る。特定の限定されない例では、抗体又はその断片は、FITCなどの蛍光物質と連結され得るか、又は高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)と遺伝的に融合され得る。

【0065】

[0085]動物又は動物環境におけるC.ジェジュニの存在を低減する方法が、本明細書において記載される。個々の動物内で存在を低減することは、動物の表面の、又は動物の胃腸管内の汚染を低減することを含み得る。動物が、全身感染していれば、本明細書において記載される方法が、C.ジェジュニの存在を低減するために使用され得る。動物の環境は、ケージ又は設備の壁又は床、動物の囲い内の摂食又は給水装置、動物の囲い中に見られる寝床材料又は絶対に、動物の領域内の動物の外側に存在する糞便物質などの動物を直接取り囲むものと関連し得る。動物に本明細書において記載される抗体又はその断片を投与することは、抗体又はその断片が投与される動物又はこのような動物の子孫内の、又は動物が生きている群れ、ケージ若しくは家畜小屋内の、C.ジェジュニの存在を低減する目的のためであり得る。動物の胃腸管内のC.ジェジュニを低減することは、動物の環境内の汚染を低減するための1つの方法であり、汚染の発生率の低いより安全な食品サプライチェーンにつながる。

【0066】

[0086]動物への投与は、当技術分野で公知の任意の適した方法によってであり得る。本明細書において記載される抗体又はその断片は、経口投与され得ることが有利である。経口送達によって、抗体又はその断片が動物への水又は食品供給内に送達されることが可能となり、注射よりも、動物にとってあまり目立つものではなく、ストレスの多いものではない。経口投薬計画の高度に的確な送達が必要である場合には、胃管栄養法もまた、許容される経口経路である。全身による、又は直腸送達経路などのその他の投与経路も考慮され得る。例えば、いかなる方法による限定も望まないが、抗体又はその断片は、動物の食品供給中に含まれ得る。1つの限定されない例では、抗体又はその断片は、動物の食品供給中に含まれる酵母発現系中で提供され得る。限定されない例では、抗体又はその断片は、酵母コートタンパク質(複数可)上に提示され得るか、又は酵母によって内部に若しくは外部に発現され得る。

【0067】

[0087] C . ジェジュニに対して有効である別の物質の同時投与も、動物環境において C . ジェジュニを低減するための可能性ある戦略である。例えば、動物に、抗生物質を抗体又はその断片の送達と同時に又は隣接する時間に投与することは、相加作用を有し得るか、又は相乗作用を有し得る。その結果は、C . ジェジュニ汚染の可能性の低減であるが、抗生物質の使用の低減もまたそうである。C . ジェジュニに対して有効なバクテリオシンも、相加作用又は相乗作用を求めて抗体又はその断片とともに動物に提供され得る。バクテリオシンに加えて、又はその代替物として、C . ジェジュニに対して効果を有する小分子、ペプチド又はタンパク質などの任意のその他の植物又は動物由来化合物が、本明細書において記載される抗体又はその断片とともに使用され得る。競合微生物も、相加作用又は相乗作用を達成するために、抗体又はその断片と同時に動物に提供され得る。競合微生物は、プロバイオティック系の一部として本明細書において記載される抗体又はその断片と一緒に使用され得る。このようなプロバイオティック系内で、抗体又はその断片は競合微生物と同時に投与され得るか、又は連続送達され得る。プロバイオティック系内の本明細書において記載される抗体又はその断片の発現も保障され得る。

10

20

30

40

50

【0068】

[0088] C D R 領域の外側の抗体又はその断片の部分のスクヤフォールドエンジニアリングは、さらなるプロテアーゼ耐性並びに熱及び低 pH 耐性を付与し得る。送達形態はまた、腸酵素、熱又は低 pH 効果に対する保護効果を提供するコーティング又は賦形剤を用いて変更され得、このようにして、抗体又はその断片の配列は、それ自体が改変される必要はなく、むしろ、経口送達用に調製された製剤自体が、抗体又はその断片が送達されるべき対象の種のために最適化され得る。

【0069】

[0089] 投与形は、動物へのペプチド送達のために許容される任意の種類のものであり得る。望ましい場合には、コーティング形態及び持続放出形態が使用され得る。液体、散剤、結晶、ゲル、半固体又は錠剤形態も使用され得る。

【0070】

[0090] 抗体又はその断片が送達され得る動物は、ブロイラー又は産卵鶏などのトリであり得る。ウシ、ヒツジなどのその他の種類の家畜動物も、動物の腸又は周囲の環境中に C . ジェジュニが存在する場合には、ペプチドから恩恵を受け得る。従って、家畜適用は、家禽に制限されない。通常動物環境は、家畜小屋又は家禽農場などの農場であり得る。C . ジェジュニを実質的に含まない動物環境の汚染を避けるために、家畜小屋などの環境への新規の汚染動物又は「新入」動物の侵入を防ぐ方法が提供される。このような方法では、家畜小屋又は農場などの動物環境に新入動物を入れる前に、新入者に抗体又はその断片を投与すること。このようにして、動物は、汚染の可能性から開放され、その後、すでに処置を受けたその他の動物との居住を再開し得る。

【0071】

[0091] 本明細書において記載される抗体又はその断片を賦形剤と一緒に含む抗 C . ジェジュニワクチンが本明細書において記載されている。ワクチンは、上記のように、経口送達用に製剤化され得る。

【0072】

[0092] 対象に、上記の抗体又はその断片を投与することを含む、C . ジェジュニに感染した対象を治療する方法も記載される。任意選択で、C . ジェジュニに対して有効な抗生物質が、対象に同時投与されてもよい。対象は、ニワトリなどの家畜であり得るが、方法はまた、ヒト対象にも適用可能である。

【0073】

[0093] C . ジェジュニ感染の治療におけるこのような使用のための製剤は、抗体又はその断片を、賦形剤と一緒に含む。従って、抗体又はその断片は、それを必要とする対象において C . ジェジュニ感染を治療するための医薬の調製に使用され得る。

【0074】

[0094] 本明細書において記載される抗体又はその断片はまた、サンプル中の C . ジェジ

ユニを検出する方法にとって有用である。このような方法では、サンプルを、標識の存在下又は不在下で抗体又はその断片と接触させ、続いて、結合している抗体又はその断片の存在が任意の許容される手段を使用して検出される。検出が個体の汚染又は感染を調べるために使用される場合には、サンプルは、体液又は糞便物質を含み得る。C. ジェジュニの存在が食品において、又は食品加工環境において評価されるべきである実施形態では、抗体又はその断片によって接触されるサンプルは、食品、食品容器、食品加工装置又は食品、容器若しくは加工装置から得た表面スワブであり得る。

【0075】

[0095]抗体又はその断片自体を、C. ジェジュニの検出に使用するための説明書と一緒に含むであろう、このような方法を実施するためのキットが提供される。任意選択で、このような検出キットに使用されるべき試薬が、ユーザーの便宜のために含まれ得る。

10

【0076】

[0096]抗体又はその断片自体が、サンプル中のC. ジェジュニを検出するために使用されるべき検出試薬の主成分であり得る。このような検出試薬はまた、バッファーなどの適した担体でもあろう。

【0077】

[0097]本発明者らは、Flag V1M及びFlag V6Mを単離し、フラジェリン結合性単ドメイン抗体(sdAb)を鞭毛タンパク質に対するパニングによって過免疫されたラマファージディスプレイライブラリーから単離した。Flag V1F23Mを、Flag V1M DNAにランダム突然変異を導入するためにエラープローンPCRアプローチが使用されたライブラリーから単離し；プロテアーゼ処理条件下でパニングを実施した。同等の突然変異が、Flag V6Mにも付与され、Flag V6F23Mが得られた。sdAbの、ペロ毒素Bホモ五量体に由来するタンパク質ドメインとの融合によって、Flag V1M、Flag V1F23M及びFlag V6M抗体に五価が付与され、タンパク質Flag V1P、Flag V1F23P及びFlag V6Pが生じた。「ペンタボディ」と呼ばれることもある得られた抗体又はその断片は、緻密であり、高い結合力を示し、安定な抗原結合分子である。これらの五価V_HHは、抗原と結合される場合の、C. ジェジュニ及びC. コリの凝集を増強できた。

20

【0078】

[0098]単ドメイン抗体は、一般に、従来 of 抗体断片よりもプロテアーゼに対して大幅により耐性である。しかし、Flag V1M、Flag V1F23M、Flag V6M及びFlag V6F23Mはまた、腸酵素に対して増大した耐性(tolerance)を有するよう改変され、従って、経口送達の有効性が増大した。ポリペプチドに対して破壊効果を有し得る通常 of 腸酵素として、ペプシン、トリプシン及びキモトリプシンが挙げられる。従って、ペプチドが腸管内の周囲のC. ジェジュニと結合するのにより長い曝露時間を有するであろうから、これらの酵素に対する耐性は有利である。残基54と78の間に第2のジスルフィド橋を導入することによって、Flag V1M、Flag V1F23M、Flag V6M及びFlag V6F23Mへの改変を行い、それぞれ、sdAb Flag V1MDSB、Flag V1F23MDSB、Flag V6MDSB及びFlag V6F23MDSBが生じた。ジスルフィド架橋で改変された抗体の調製における改変の部位は、システイン残基が特定の部位に導入される場合のV_HH熱安定性及びタンパク質分解安定性への最適変更に基づいて選択した。

30

40

【0079】

[0099]V_HH及びペンタボディ対応物は、蛍光顕微鏡によって実証されるように、フラジェリン、C. ジェジュニ細胞表面抗原に対して特異的であった。さらに、本発明者らは、フラジェリンに対して開発されたペンタボディが、flaAタンパク質と結合し、哺乳類細胞の侵入において役割を果たすことを実証した。SPRは、V_HHが、標的に対して低いナノモル親和性を有することを実証した。V_HHはまた、運動性アッセイにおいて実証されるように、カンピロバクター成長及び運動性を防止/攪乱できた。V_HHはまた、経口投与された場合に、ニワトリにおいてC. ジェジュニコロニー形成のレベルを大幅に

50

低下させた。さらに、カンピロバクターの制御における、抗体及び抗生物質の組み合わせられた治療の研究は、 $V_{H}H$ 及びペンタボディの投与は、抗生物質の必要な用量を最大35倍低下させ得ることを示す。

【実施例】

【0080】

[00100]本発明は、以下の実施例でさらに例示される。しかし、これらの実施例は、例示目的であって、いかなる方法でも本発明の範囲を制限するために使用されてはならないということは理解されるべきである。

【0081】

[00101] 実施例1：抗原の調製

10

【0082】

[00102]鞭毛を、その後の実施例において抗原として使用するために調製した。

【0083】

[00103]C.ジェジュニ(株81-176)鞭毛を、先に記載されたように単離した(Powerら、2003年)。手短には、鞭毛を調製するために、C.ジェジュニを一晩培養し、細胞をミューラー-ヒントン培養液中に掻きとって入れ、一晩インキュベートした。次いで、細胞を遠心分離によって回収し、100mLのtris緩衝生理食塩水溶液中に再懸濁した。鞭毛を、氷上でワーリングブレンダーを使用して細胞から剪断した。細胞片を遠心分離によってペレットとし、上清を超遠心管に移した。鞭毛を45,000rpmで1時間の遠心分離によってペレットとした。サンプルの2% SDSでの再懸濁及び遠心分離によってさらなる精製を行った。ペレットを200~500 μ LのdH₂Oに再懸濁した。

20

【0084】

[00104] 実施例2：ラマ免疫処置及び血清応答

【0085】

[00105]C.ジェジュニ鞭毛を標的とする $V_{H}H$ を単離するために、実施例1において得られた鞭毛抗原を用いてラマを免疫処置した。

【0086】

[00106]雄のラマ(ラマ・グラマ(Lama glama))を、C.ジェジュニ鞭毛(実施例1)を用いて皮下に免疫処置した。合計7回の注射を実施し、各注射について、0.5mLの総容量の100 μ gの抗原を、等容量の完全(1日目)又は不完全(21、35、49、63日目)フロイントのアジュバント(Sigma)と混合した。最後の2回の注射(76及び90日目)は、アジュバントを用いずに100 μ gの抗原を用いて実施した。免疫前血液(15~20mL)を第1の注射の前に、並びに21、49、76及び90日目に採取した。特異的免疫応答を、総免疫前及び免疫血清を使用してELISAによって分析した。90日目に得たラマ血清を、Hamers-Castermanら(1993年)に従って分画した。製造業者の説明書に従う血清分画のためにプロテインG及びAカラム(GE Healthcare)を使用し、分離された画分を1M Tris/HCl pH8.8を用いてpH6に調整し、4 $^{\circ}$ Cの予冷したPBSに対して一晩透析した。個々の重い画分(G1、A1及びA2)及びG2(従来IgG)を、ELISAによって鞭毛に対する特異的結合について分析した。手短には、マイクロタイタープレート(Maxisorp(商標)プレート)(Nalge Nunc International, Rochester, NY)を、PBS中、5 μ g/mLの鞭毛抗原(実施例1)を用い、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした。ウェルをすすぎ、200 μ Lの1%カゼインを用いてブロッキングした。精製IgG画分(G1、G2、A1及びA2)の種々の希釈物を添加し、室温で1.5時間インキュベートした。PBST(0.05% v/v Tween-20)を用いてウェルを洗浄し、ヤギ抗ラマIgG(H+L)(PBS中、1:1,000)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)と、続いて、ブタ抗ヤギHRP(PBS中、1:3,000)(Cedarlane, Burlington, ON, Canada)とともにインキュベートした。100

30

40

50

μ l / ウェルの TMB ペルオキシダーゼ基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を添加することによってシグナルを検出した。100 の 1 M リン酸を添加することによって反応を停止し、Bio-Rad ELISA プレートリーダーを使用して A_{450} を測定した。

【0087】

[00107] SDS-PAGE によって、ラマ血清画分 (G1、G2、A1 及び A2 ; 示されていないデータ) の純度が確認された。画分の ELISA によって、免疫前出血 (示されていないデータ) と比較した場合に、鞭毛抗原に対して重鎖並びに従来の画分において強い免疫応答が示された。これらの結果はまた、総血清から得られた ELISA 結果 (示されていないデータ) と同等である。

10

【0088】

[00108] 実施例 3 : 鞭毛結合性 $V_{H H}$ のライブラリー構築及び選択

【0089】

[00109] 実施例 2 において採取された血清から単離された RNA に基づいて、過免疫されたラマ $V_{H H}$ ライブラリーを構築した。

【0090】

[00110] ファージディスプレイライブラリーを先に記載されたように (Arbabi Ghahroudi ら、2009 年) 構築した。手短には、QIAamp RNA 血液ミニキット (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) を使用して免疫処置の 90 日後に採取したおよそ 1×10^7 個のリンパ球から全 RNA を単離した。第一鎖 cDNA を、製造業者 (GE Healthcare) の推奨に従って、オリゴ (dT) プライマーを用い、鋳型として 5μ g の全 RNA を使用して合成した (Arbabi Ghahroudi ら、2009 年)。オリゴヌクレオチド MJ1-3 (センス) 並びに 2 種の CH2 ドメインアンチセンスプライマー CH2 及び CH2b3 (プライマー配列については、Arbabi Ghahroudi ら、2009 年を参照のこと) を使用して、可変ドメイン DNA 及び定常ドメイン DNA の一部を増幅し、QIAquick ゲル抽出キット (Qiagen) を使用して重鎖断片 (550 ~ 650 bp の長さ) をゲル精製した。MJ7 及び MJ8 プライマー (プライマー配列については、Arbabi Ghahroudi ら、2009 年を参照のこと) を使用する第 2 の PCR 反応において、重鎖抗体 (IgG2 及び IgG3) の可変領域を再増幅した。増幅された PCR 産物を、QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) を用いて精製し、SfiI (New England Biolabs, Pickering, Ontario, Canada) を用いて消化し、同キットを使用して再精製した。Ligafast Rapid DNA 連結系及びそのプロトコール (Promega, Madison, WI) を使用して、12 マイクログラムの消化された $V_{H H}$ 断片を、 40μ g の (それぞれ、3 : 1 モル比) SfiI 消化された pMED1 ファージミドベクター (Arbabi Ghahroudi ら、2009 年) とライゲーションし、先に記載されたように (Arbabi Ghahroudi ら、2009 年)、市販のエレクトロコンピテントな TG1 大腸菌細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) に形質転換し、 5×10^7 の形質転換体のライブラリーの大きさが得られた。30 コロニーから得られた $V_{H H}$ 断片を、PCR 増幅し、配列決定してライブラリーの複雑性を分析し ; すべてのクローンは、予測される大きさの挿入部分を有しており、そのコードする $V_{H H}$ 断片の配列決定によって決定されるように、その CDR 領域で互いに異なっていた。ライブラリーを、 $2 \times$ YT / Amp - グルコース (2% w/v) 培地において、37、250 rpm で 3 ~ 4 時間増殖させた。細菌細胞をペレットにし、同培地に再懸濁し、先に記載されたように、 -80 でグリセロールストックとして保存した (Arbabi Ghahroudi ら、2009 年)。

20

30

40

【0091】

[00111] パニング実験を、本質的に先に記載されたように実施した (Arbabi Ghahroudi ら、1997 年及び 2009 年)。パニングを、鞭毛抗原に対して合計

50

4ラウンド実施した。2ミリリットルのライブラリーストックを、2X YT/Amp-グルコース(2% w/v)培地において37、250rpmで1~2時間増殖させた(A₆₀₀ = 0.4~0.5)、37でM13KO7ヘルパーファージ(New England Biolabs)を用いて1時間感染させた。4で培養物を遠心分離した後、感染細胞ペレットを、200mlの、50µg/mlのカナマイシンを有する2X YT/Ampに再懸濁し、37及び250rpmで一晩インキュベートした。先に記載されたように、培養上清中のファージ粒子をPEG沈殿させ(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)、ファージペレットを2mlの滅菌PBSに再懸濁し、ファージ力価を決定した。96ウェルのMaxisorp(商標)プレートを、30µgの鞭毛抗原を用いて4で一晩コーティングした。ウェルをPBSですすぎ、PBS/1%(w/v)カゼインを用いて37で2時間ブロッキングした。およそ10¹²個の救出されたファージ粒子を、ブロッキングされたウェルに添加し、37で2時間インキュベートした。ウェルをPBST(0.1% v/v Tween-20)を用いて5回、PBSを用いて5回洗浄した。0.1Mトリエチルアミンを用いて結合しているファージを溶出し、1M Tris-HCl、pH7.4を用いて中和し、対数増殖期のTG1細胞とともにインキュベートした。37で30分インキュベートした後、細胞をM13KO7にさらに15分間重複感染させ、2X YT-Amp-Kan中、37で一晩増殖させた。抗原濃度を20、15及び10µg/ウェルに低下させた点を除いて同一条件に従って、パニングをさらに3ラウンド継続し、それぞれ、第2、第3及び第4ラウンドのパニングに対して、洗浄をPBS-T及びPBSを用いて7、10及び12回増加した。第4ラウンドのパニング後、48種の無作為に選び取ったコロニーを増殖させ、マイクロタイタープレート上に5µg/mlの鞭毛がコーティングされた点を除いて先に記載されたように(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)、ファージELISAスクリーニングに付した。陽性クローンとして、FlagV1M及びFlagV6M(配列番号8及び配列番号13;図1)が挙げられ、これらは、本明細書においてさらに研究される。

【0092】

[00112]実施例4:単量体V_HHの発現及び精製

【0093】

[00113]実施例3において同定された鞭毛に対するV_HHを、BbsI1-V_HHフォワードプライマー及びBamHI-V_HHリバースプライマー(表1)を用いてpMED1ファージミドベクターからPCR増幅した。PCR断片を、BbsI及びBamHI制限酵素を用いて消化し、同様に消化したpSJF2H発現ベクター(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)中にライゲーションした。連結すると、すべてのプラスミドを、エレクトロコンピテントなTG1大腸菌に形質転換し、LB寒天プレート+アンピシリン上で選択した。コロニーを、挿入部分についてコロニーPCRによってスクリーニングし、DNAを配列決定した。

【0094】

[00114]V_HH抗体を、5日最小培地法を使用して発現させた(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)。タンパク質発現を誘導した後、細胞培養物を6,000rpm×30分(4)で回収し、上清をデカントし、細胞ペレットから周辺質内容物を抽出した。手短には、単量体V_HHのペレットを20mlの氷冷TES(0.2M Tris-HCl pH8.0、20%(w/v)スクロース、0.5mM EDTA)中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。次いで、30mlの氷冷1/8TES(dH₂Oで希釈した)を添加し、氷上でさらに30分インキュベートし、スラリーを12,000rpmで30分(4)遠心分離した。V_HHを含有する得られた上清を、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)バッファA(10mM HEPES pH7.0、500mM NaCl)中に一晩透析し、記載されたように精製した(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)。説明書に従ってHiTrap(商標)Chelating HPカラム(GE Healthcare)を使用して抗体

の精製を行った。分画を、AKTA FPLC精製系 (GE Healthcare) で、出発バッファーとして 10 mM HEPES、500 mM NaCl、pH 7.0 を用い、溶出バッファーとして 10 mM HEPES、500 mM NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.0 を用いて実施した。

【0095】

[00115] 精製タンパク質画分をプールし、PBS に対して透析した。溶出された画分を、SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングによって分析し、その後、PBS 中に透析した。V_HH 濃度を、Paceら、1995 年に従って、理論的 MW 及び ExPASy ProtParam Tool (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) を用いて算出された吸光係数を使用して 280 nm での吸光度測定によって決定した。精製単量体 Flag V1M 及び Flag V6M V_HH の収量は、10 ~ 80 mg / 細菌培養物 1 l の範囲であった (図 2)。

10

【0096】

[00116] 表 1 . 実施例 4 及び 5 に記載されるような、単量体及び五量体 V_HH クローンの構築に使用されたプライマー

【表 1】

表 1
単量体及び五量体 V_HH クローンの構築において使用されたプライマー

名称	配列 5'→3'
BbsI1-V _H H フォワードプライマー	TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCT (配列番号 23)
BamHI-V _H H リバースプライマー	TTGTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG (配列番号 24)
ApaI-V _H H リバースプライマー	ATTATTATGGGCCCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTC (配列番号 25)

20

【0097】

[00117] 実施例 5 : 五量体 V_HH の発現及び精製

【0098】

[00118] 単量体 V_HH の五量体を、V_HH を、A B₅ 毒素ファミリーの B - サブユニットの五量体化ドメインと融合することによって調製した。発現されると、サブユニットは五量体と自己アセンブルする。Flag V1P 及び Flag V6P (配列番号 19 及び配列番号 21 ; 図 1) を調製した。

30

【0099】

[00119] 実施例 3 において同定された鞭毛に対する V_HH を、BbsI1-V_HH フォワードプライマー及び ApaI-V_HH リバースプライマー (表 1) を用いて pMED1 ファージミドベクターから PCR 増幅した。PCR 断片を、BbsI 及び ApaI 制限酵素を用いて消化し、同様に消化した pVT2 発現ベクター (Arbabi-Ghahroudiら、2009 年) 中にライゲーションした。連結すると、すべてのプラスミドをエレクトロコンピtentな TG1 大腸菌に形質転換し、LB 寒天プレート + アンピシリン上で選択した。コロニーを、挿入部分についてコロニー PCR によってスクリーニングし、DNA を配列決定した。

40

【0100】

[00120] 五量体抗体を、5 日最小培地法を使用して発現させた (Arbabi-Ghahroudiら、2009 年)。タンパク質発現を誘導した後、細胞培養物を 6,000 rpm × 30 分 (4) で回収し、上清をデカントし、細胞ペレットから周辺質内容物を抽出した。細胞を 100 ml の氷冷溶解バッファー (50 mM Tris-HCl、pH 8.0、25 mM NaCl) 中に再懸濁し、氷上、-20 で一晩維持するか、又はドライアイス上で 1 時間凍結した。凍結懸濁液に、1 ml の 100 mM PMSF 及び 200 µl の 1 M DTT を添加し、次いで、これを、時折振盪しながら、室温で解凍した。

50

3 mlの新たに調製したリゾチーム(最終濃度 = 150 µg/ml)を添加することによって細胞を溶解した。懸濁液を、時折振盪しながら、粘性になるまで室温で30~50分間インキュベートし、その時点で200 µl~300 µlのDNアーゼI(Sigma)(1M MgCl₂中の、15ユニット/µl)を添加し、続いて、室温でさらに15分インキュベートした。細胞溶解物を遠心分離し、0.22 µmメンブレンフィルターを通して濾過した。V_HHを含有する得られた上清を、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)バッファーA(10mM HEPES pH7.0、500mM NaCl)中に一晚透析し、記載されたように精製した(Arbabi-Ghahroudiら、2009年)。説明書に従ってHiTrap(商標)Chelating HPカラム(GE Healthcare)を使用して抗体の精製を行った。分画を、AKTA FPLC精製系(GE Healthcare)で、出発バッファーとして10mM HEPES、500mM NaCl、pH7.0を、溶出バッファーとして10mM HEPES、500mM NaCl、500mM イミダゾール、pH7.0を用いて実施した。

10

【0101】

[00121]精製タンパク質画分をプールし、PBSに対して透析した。溶出された画分を、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティングによって分析し、その後、PBS中に透析した。V_HH濃度を、Paceら、1995年に従って、理論的MW及びExpasy ProtParam Tool(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)を用いて算出された吸光係数を使用して280nmでの吸光度測定によって決定した。精製五量体の収量は、10~50mg/細菌培養物1lの範囲であった。

20

【0102】

[00122] 実施例6：抗鞭毛抗体の生物物理学的特性決定

【0103】

[00123]実施例4及び5において発現及び精製されたFlag V1M、Flag V6M、Flag V1P及びFlag V6P抗体を特性決定した。

【0104】

[00124]表面プラズモン共鳴。単量体及び五量体Flag V1及びFlag V6(実施例4)を、それぞれ、150mM NaCl、3mM EDTAを含有する10mM HEPES、pH7.4中で、サイズ排除カラム、Superdex 75及びSuperdex 200(GE Healthcare)に通した。単量体V_HH画分を採取し、A₂₈₀測定値を測定することによってタンパク質濃度を決定した。0.8mg/mlの抗フラジェリンV_HHを、10mMリン酸、150mM NaCl、pH7.0中、およそ10倍モル過剰のPierce EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチン(GE Healthcare)と室温で30分間混合することによってビオチン化し、続いて、同バッファーに対して透析した。Biacore 3000機器(GE Healthcare)を用いて分析を実施した。すべての測定は、150mM NaCl、3mM EDTA及び0.005%界面活性剤P20(GE Healthcare)を含有する10mM HEPES、pH7.4中、25℃で実施した。5µl/分の流速で、およそ700~900RUのビオチン化フラジェリンがSAセンサーチップ(GE Healthcare)上に捕獲された。種々の濃度の抗体を、40µl/分の流速で、参照としてSA表面を使用してフラジェリン-SA表面上に注入した。ランニングバッファーを用いて洗浄することによって表面を再生した。BIA評価4.1ソフトウェアを用いてデータを分析した。

30

40

【0105】

[00125]鞭毛は、CM%センサーチップ上での固定化に使用した酸性条件に対して感受性であったので、ビオチン化抗原をストレプトアビジン上に捕獲した。SPR結果が図3に示されている。すべてのデータセットは、1:1相互作用モデルに対して合理的に良好なフィッティングを示し、速度定数及び親和性を導き出すことが可能となり(以下、表2

50

に示される)、これは、20~30 nMの範囲であった。図3Cは、Flag V1Pが、Flag V1Mと比較して極めて遅い解離速度(off rate)を有することを示し(図3A)、これは、機能的親和性の増大を示す。

【0106】

[00126]抗体結合アッセイ。ELISAを、プレートをPBSTで洗浄し、PBS-カゼイン(1%)を用いてブロッキングした後に、それぞれのウェルにFlag V1M、Flag V1P又はFlag V6Pの5 µg/mlの溶液を添加し、37 °Cで1時間インキュベートした点を除いて、実施例2に記載されるように実施した。ウェルを、PBST(0.05% v/v Tween-20)及びHRPとコンジュゲートしたウサギ抗His6 IgG(PBS中、1:5000)(Bethyl Laboratories)を用いて洗浄し、室温で1時間インキュベートした。結合をTMB基質(Kirkegaard and Perry Laboratories)を用いて検出し、反応を1M H₃PO₄を用いて停止し、上記のようにELISAプレートリーダーを使用してA₄₅₀を測定した。

10

【0107】

[00127]ELISA結果は、図2に示されている。Flag V1Mは、ELISAによって強力な結合活性を示した。示されるように、Flag V1Mについて、0.2 µg/ml(15.6 nM)で50%最大結合を達成したのに対し、五量体Flag V1Pは、0.005 µg/ml(40 pM)で50%最大結合に達した-機能的親和性のほぼ400Xの増大。ELISAによって得られたFlag V1Mのおよその親和性(20~30 nMの範囲の)は、SPRによって得られた値と一致する。

20

【0108】

[00128]エピトープマッピング。上記のように、81-176の野生型株の全細胞溶解物とともに、C.ジェジュニのFlag A及びFlag B突然変異体株から鞭毛を調製した。鞭毛調製物を、還元条件下で12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロースメンブレンに移した。メンブレンを、PBS中、3%(w/v)BSAを用いてブロッキングし、Flag V1Pペンタボディと室温で1時間反応させた。PBSTを用いて5回洗浄した後、メンブレンを、マウス抗ペロ毒素とそれに続くヤギ抗マウスAPコンジュゲート又は抗His6 APコンジュゲート(ブロッキングバッファーで1:5,000希釈した)(Abcam, Cambridge, MA)のいずれかとともにインキュベートした。最後に、メンブレンを4回洗浄し、AP基質(Bio-Rad)とともに10分間インキュベートした。メンブレンを蒸留H₂OですすぐことによってAP反応を停止し、風乾した。

30

【0109】

[00129]結果が図4に示されている。Flag V1Pは、フラジェリンのFlag A成分と結合した。おそらくは、Flag A及びFlag Bタンパク質間の高いDNA配列同一性(95%)のために(Wassenaarら1991年)、Flag Bとの弱い交差反応性が観察された。

【0110】

[00130]Flag V1M及びFlag V6Mが同一エピトープと結合するかどうかを調べるために、上記のようにSPR同時注入実験を実施した。両抗体について、そのK_D値の50x濃度の各V_HHの60~100 µlを、30 µl/分で600~700 RUの固定化された鞭毛上に注入した。結果が図5に示されている。第2の注入でシグナルがおよそ2倍になったので、Flag V1M及びFlag V6Mは、別個の、非重複エピトープと結合すると思われた。これは、Flag V1及びFlag V6単量体又は五量体両方の組合せが、抗原、すなわち、鞭毛とのより高い結合の効率、ひいては、カンピロバクターコロニー形成の速度の低下における抗体の潜在的に良好な有効性を提供し得ることをさらに示唆する。

40

【0111】

[00131]ペンタボディのFITC標識及び蛍光顕微鏡。Flag V1P及びFlag V

50

6 Pを、FITCを2 mg/mlの濃度で用い、Invitrogen製のFITC標識キットを製造業者の説明書に従って使用して標識した。標識されたペンタポディを、PBSに対して数回透析して、組み込まれていないFITCを除去した。野生型C. ジェジュニ81176及び突然変異体cj1293を、3%ホルマリンを用いて対数増殖で一晩固定した。細胞をPBSで洗浄して、ホルマリンを除去し、次いで、約 1×10^8 個/mlで10 μ lをガラスカバースリップ上で風乾した。非特異的結合は、50 μ lの5%ミルク-PBSを用いて室温で1時間ブロッキングした。細胞を、PBSで80 μ g/mlに希釈した50 μ lのFITC標識Flag V1P中で、室温で1時間インキュベートした。細胞を、PBS/0.1% Tweenを用いて洗浄し、次いで、Vectashield-DAPI (Vector Laboratories, Burlington, Canada) 封入剤を用いてガラススライド上に載せた。スライドをZeiss Axiovert 200M顕微鏡 (Zeiss, Toronto, Canada) で調べた。実験は、2連で、3回の独立した機会に、像がとられた各カバースリップ上の少なくとも3視野を用いて実施した。

【0112】

[00132]結果は図6に示されている。ペンタポディは、C. ジェジュニ、株81176を特異的に標識するが、C. ジェジュニ(株1293)又はC. ディフィシル菌との特異的結合は、検出されなかった。Flag V1Pの結合が蛍光顕微鏡によって実証され、それによって、C. ジェジュニ81-176細胞の極に位置する鞭毛繊維と結合している抗体が見られる。C. ジェジュニ81-176のフラジェリンは、プソイダミン酸を有しグリコシル化されていると示されており (Thibaultら、2001年)、プソイダミン酸の生合成に関与している遺伝子pseBの不活性化は、細胞を鞭毛繊維をアSEMBルできないようにする (Schoenhofenら、2006年; Goonら、2003年)。図6において観察されるように (パネルe及びf)、この遺伝子の攪乱は、Flag V1PがC. ジェジュニ細胞と結合できないことにつながり、この結合が鞭毛繊維に特異的であることが確認される。

【0113】

[00133]別の実験では、蛍光顕微鏡観察を、C. ジェジュニ株81-176、81-176 f1aA-f1aB-、又はC. ジェジュニ株11168を、FITC標識Flag V1P又はFlag V6Pとともにインキュベートした点を除いて、本質的に上記のように実施した。FITC標識ウサギ抗鞭毛ポリクローナルを用いる免疫染色を、陽性対照として使用した。図7における結果は、Flag V1Pは、株81-176のC. ジェジュニ鞭毛と結合するが、Flag V6Pは、81-176及び11168株両方の鞭毛と結合することを示す。これは、Flag V6P抗体が、C. ジェジュニ株の広範な鞭毛変異体と相互作用し得ることを実証する。

【0114】

[00134]交差反応性ELISA。ELISAを使用して、精製された抗鞭毛五量体 (Flag V1P、Flag V6P) の、C. ジェジュニの9種の異なる株 (株81-176、P1、11168、P4、P19、P36、P2、P3及びP64) との交差反応性を調べた。使用したすべての株は、仔ウシから単離された株であるC. ジェジュニ株P2を除いてヒト臨床分離株であった。ウェルを、種々の株から得た10 μ gのカンピロバクター鞭毛タンパク質を用いてコーティングし、結合を、Flag V1P又はFlag V6Pペンタポディを使用して検出した点を除いて、実施例2に記載されるように、種々の株から鞭毛を調製し、ELISAアッセイにおいてマイクロタイタープレートのコーティングのために使用した。吸光度値は、2回の独立した実験の平均を示す。

【0115】

[00135]結果は図8に示されている。ELISAデータは、Flag V1Pは、81-176 (免疫原株) 及び5種のその他の株と異なる程度に強力的に相互作用したが、11168、P2及びP3株とは、試験された条件下では強力的には結合しなかったことを示した。これらのデータは、両抗体の同時適用は、C. ジェジュニ種及び亜種コロニー形成を防

10

20

30

40

50

ぐためのより有効な製品を提供し得ることを示唆する。

【0116】

[00136] 実施例7：突然変異体V_HH及びペンタボディの調製

【0117】

[00137] ランダム突然変異誘発によって、ニワトリ胃腸管の厳しい環境に抵抗することを可能にする、腸酵素に対して増大した耐性 (tolerance) を有するよう変更された抗体を開発した。そのために、Flag V1M V_HHに基づいてエラーブローンライブラリーを構築した。V_HH V1エラーブローンPCRライブラリーの構築、ファージのプロテアーゼ処理及びパニングスキームを強調するワークフロー図が図15Bに示されている。

10

【0118】

[00138] エラーブローンPCRによる突然変異体V1ライブラリーの構築。V1エラーブローンPCRライブラリーの構築の前に、pMED1ベクターからプロテアーゼ感受性His₆/HAタグを除去した。新規ベクターをpMED6 (図15A)と名付け、これまでHis₆/HAタグが位置していた5' SfiI制限酵素部位の4ヌクレオチド下流にアンバー「タグ」停止コドンを含んでいた。エラーブローンPCRのために、最初の鋳型として10ngのFlag V1M DNAを使用し、ランダム突然変異誘発PCRキット (GeneMorph IIランダム突然変異誘発キット、Stratagene) 並びにプライマーMJ7BACK及びMJFOR11 (表2) を使用して50μlの反応液中で30サイクル (95 で30秒、55 で30、72 で60秒) の間増幅し、続いて、72 で10分伸長した。PCR産物 (約500bpの長さ) をQIAquick PCR精製キット (Qiagen、Mississauga、Ontario、Canada) を用いて精製し、SfiIを用いて50 で6時間消化し (New England Biolabs、Pickering、Ontario、Canada)、同キットを使用して再精製した。200μgのpMED6ベクターも、先に記載されたように、50 で一晩、続いて、2時間のPstI/XhoIで消化した。消化されたベクターを、QIAquick PCR精製キット (Qiagene) を用いて精製し、滅菌蒸留H₂OでDNAを溶出した (Arbabi Ghahroudiら、2009年)。Ligafast Rapid DNA連結系及びそのプロトコール (Promega、Madison、WI) を使用して、45マイクログラムの消化されたV_HH断片を、150μg (それぞれ、3:1モル比) のSfiI消化されたpMED6ファージミドベクター (Arbabi Ghahroudiら、2009年) とライゲーションし、先に記載されたように (Arbabi Ghahroudiら、2009年)、市販のエレクトロコンピテントなTG1大腸菌細胞 (Stratagene、La Jolla、CA) に形質転換し、およそ2 × 10⁹ 形質転換体のライブラリーの大きさが得られた。30コロニーから得られたV_HH断片をPCR増幅し、配列決定して、V_HHアミノ酸配列内の点突然変異の存在を実証した (示されていないデータ)。ライブラリーを、2X YT/Amp-グルコース (2% w/v) 培地において、37、250rpmで3~4時間増殖させた。細菌細胞をペレットにし、同培地に再懸濁し、先に記載されたように、-80 でグリセロールストックとして保存した (Arbabi Ghahroudiら、2009年)。

20

30

40

【0119】

[00139] 表2 . エラーブローンPCRライブラリーの構築、サブクローニング及びジスルフィド結合突然変異体で使用されたプライマー。これらのプライマーを使用する方法は、実施例7及び10に記載されている。

【表 2】

表 2

エラープローン PCR ライブラリーの構築、サブクローニング及びジスルフィド結合突然変異体において使用されたプライマー

名称	配列 5'→3'	目的	
MJ7BACK	CAT GTG CAT GGC CTA GAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CC (配列番号 26)	EP-PCR	
MJFOR 11	CAT GTG TAG ATT CTG CCT GGC CGG CCT GGC C (配列番号 27)	EP-PCR	
BbsI1-V _H H	TAT GAA GAC ACC AGG CCC AGG TAA AGC TGG AGG AGT CT (配列番号 23)	サブクロー ニング	10
BamHI-V _H H	TTG TTC GGA TCC TGA GGA GAC GGT GAC CTG (配 列番号 24)	サブクロー ニング	
V1-DSB-for	TAG ACA GTA TTA TCC AGA TCC CGT GAA GGG CCG ATT CAC CTG CAC CAG AGA C (配列番号 28)	DSB クロー ニング	
V1-DSB-rev	GGA TAA TAC TGT CTA TCT CTA CTC CAG GAA ATA GCG CAC ACT AC (配列番号 29)	DSB クロー ニング	

【 0 1 2 0 】

[00140] V 1 エラープローン PCR ライブラリーのプロテアーゼパニング。パニング実験を、最初のライブラリー及びパニングの各ラウンドから救出され、増幅されたファージを、ニワトリ GI 管液並びにペプシン、キモトリプシン及びトリプシンプロテアーゼを用いて前処理した点を除いて、先に記載されたように (Arbabian Ghahroudi ら、1997年; Arbabian Ghahroudi ら、2009年) 本質的に実施した。1 mM Tris-HCl、pH 7.8 バッファー中の 3 種のファージアリコート (各 125 µl; 1 × 10¹² ファージ粒子) を調製した。第 1 のファージアリコートに、12.5 µl の GI 管ニワトリプロテアーゼ抽出物 (10 × 希釈) を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。第 2 のファージアリコートは、1 mM HCl 及び 20 mM CaCl₂ 中でキモトリプシン/トリプシンの等モル混合物 (Roche) (R1: 各プロテアーゼの 2.5 µM、R2: 7.5 µM 及び R3~4: 10 µM) とともにインキュベートし、15 分 (R1)、45 分 (R2) 及び 60 分 (R3~4) 間インキュベートした。同様に、PBS (R1: 2.5 µM、R2: 7.5 µM、R3~4: 10 µM) 及び 125 µl のファージアリコートに対して 1/10 容量の 100 mM HCl pH 2.0 中の種々の濃度のペプシン (Roche) を調製した。ニワトリプロテアーゼ及びトリプシン/キモトリプシンに対しては、12.5 µl のプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を添加することによって、又はペプシンに対しては、1/2 容量の 1 M Tris-HCl、pH 7.5 を添加することによってプロテアーゼ反応を停止した。

【 0 1 2 1 】

[00141] プロテアーゼ処理したファージアリコートを混合し、パニングに使用した。鞭毛に対して合計 4 ラウンドのパニングを先に記載されたように実施した (Arbabian Ghahroudi ら、2009年)。手短には、96 ウェル Maxisorp (商標) プレート (Nunc) のウェルを、15 µg の鞭毛又は PBS (ブランクとして) を用いて、4 °C で一晩コーティングした。ウェルを PBS を用いてすすぎ、PBS / 1% (w/v) カゼインを用いて 37 °C で 2 時間ブロッキングした。混合プロテアーゼ処理したファージ粒子 (100 µl は、およそ 10¹¹ pfu を含有する) を、ブロッキングされたウェルに添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。ウェルを PBST (0.1% (v/v) Tween-20) を用いて 6 回、PBS を用いて 6 回洗浄した。0.1 M トリエチルアミンを用いて結合しているファージを溶出し、1 M Tris-HCl、pH 7.4 を用いて中和し、対数増殖期の TG1 大腸菌細胞とともにインキュベートした。37 °C で 30 分インキュベートした後、細胞を M13KO7 にさらに 15 分間重複感染させ、2 × YT-Amp-Kan 中、37 °C で一晩増殖させた。抗原濃度を 12.5、10 及

び10 µg / ウェルに低下させた点を除いて同一条件に従って、パニングをさらに3ラウンド継続し、それぞれ、第2、第3及び第4ラウンドのパニングに対して、洗浄をPBS-T及びPBSを用いて7、10及び12回増加した。第4ラウンドのパニング後、24種の無作為に選び取ったコロニーをコロニーPCRに付し、PCR断片を配列決定した。合計9種の、1~4の点突然変異を有する抗鞭毛V_HH同定した。突然変異体クローンを、親のV1クローンとともに増殖させ、マイクロタイタープレート上に5 µg / mlの鞭毛をコーティングした点を除いて先に記載されたように(Arbabi Ghahroudiら、2009年)ファージELISAスクリーニングに付した。

【0122】

[00142]パニングの間、ニワトリGI管環境に抵抗するファージ抗体を選択するために、ファージ抗体を種々のプロテアーゼを含むニワトリGI管液とともに、又は主要なGIプロテアーゼ、すなわち、ペプシン、トリプシン及びキモトリプシンとともにブレインキュベートした(図15B)。繊維状ファージ(f1、fd及びM13)は、ほとんどのGI管液プロテアーゼに対して耐性であることがわかっており、従って、ファージディスプレイは、耐性V_HH単ドメイン抗体を選択するための理想的なディスプレイプラットフォームである。パニング後、9種の異なるV_HHが単離された；しかし、これらのクローンの半分未満が、ファージELISAアッセイにおいて陽性であることがわかった(図15C)。単量体及び五量体発現ベクター(それぞれ、pSJF2及びpVT2)中に陽性V_HHをサブクローニングした後、クローンFlagV1F23Mのみが、親のV1クローンに対して同等のELISAシグナル及び発現レベルを有しており；その他のクローンは、弱い結合物質であることがわかるか、又は少ない発現を有するのいずれかであった。配列決定データは、FlagV1M V_HH及びFlagV1F23M間の唯一の相違は、フレームワーク1中の2つの残基(位置3のLys Glu、位置5のGlu Val、IMGT付番方式)に位置することを示した。次いで、FlagV1F23クローンを単量体及び五量体(配列番号9及び配列番号20；図1)として発現させた。同一突然変異をFlagV6抗体に適用し(適当なプライマーを使用して)、FlagV6F23M及びFlagV6F23P(配列番号14及び配列番号22；図1)が得られた。

【0123】

[00143]可溶性及び五量体V_HHの発現及び精製。FlagV1F23M、FlagV1F23P、FlagV6F23M及びFlagV6F23Pを、必要に応じて実施例4及び5に記載されたように発現させ、精製した。

【0124】

[00144]実施例8：運動性アッセイ

【0125】

[00145]V_HH及びV_HHペンタポディによるカンピロバクター成長及び運動性の阻害を、標準プレートアッセイを使用して研究した。

【0126】

[00146]運動性アッセイを、先に記載されたように(Kalmoekoffら、2006年)実施した。0.25~1 µg / µlの最終濃度の抗体を、C.ジェジュニ(株81-176)又はC.コリ(5 × 10⁷ CFU)とともに、RTで30分間インキュベートした。混合物を、ミュラー-ヒントン寒天(0.4%)を含有するペトリディッシュの中心にプレーティングし、微好気性条件(5% O₂、10% CO₂及び85% N₂)下37 °Cでインキュベートした。細菌運動性は、細菌をプレーティングした24、48及び72時間後に増殖する細菌によって作られた円の直径を測定することによって調べた。ここで記載されたような方法を使用して、抗体のS.エンテリカ(enterica)血清型チフィムリウム(typhimurium)との交差反応性も調べた。抗体の抗生物質との組合せが、運動性をさらに攪乱し得るかどうかを調べるために、1 µg / µlのFlagV1Pの存在下で培養プレートに種々の濃度のテトラサイクリン(0~64 µg / ml)を添加し、アッセイの残りをここで記載されたように実施した。

【0127】

10

20

30

40

50

[00147]結果は、図9及び表3に示されている。FlagV1M、FlagV1P、FlagV6P又はFlagV1P及びFlagV6Pの組合せとともに同時インキュベートされたカンピロバクター株81-176は、細菌運動性の著しい低下を示した。別のカンピロバクターのよく使用される株、株11168も調べ、FlagV6Pを用いるプレートアッセイでの運動性阻害を実証した。FlagV1M及びFlagV1Pは両方とも、48時間インキュベートした後でさえ機能的なままであった。

【0128】

[00148]表3. FlagV1及びFlagV6単量体及び五量体とともにインキュベートした後のプレートでのC.ジェジュニ81-176及び11168運動性。播種部位からの細菌の広がりを表す円の直径を測定した。アスタリスクは、FlagV1及びFlagV6抗体処理対照非関連ペンタボディの統計的有意性を示す。

10

【表3】

表3 FlagV1 及び FlagV6 単量体及び五量体とともにインキュベートした後のC.ジェジュニ運動性			
処理	株 81-176		株 1168
	直径(mm)±SD-24時間	直径(mm)±SD-48時間	直径(mm)±SD-24時間
PBS	26.6 ± 2.25	82 ± 3.3	19.5.3 ± 1.5
非関連ペンタボディ	24 ± 2.7	67.3 ± 4.5	20.2 ± 2.22
FlagV1M	8.6 ± 1.25*	19.5 ± 0.5*	18 ± 0.83
FlagV1P	8.8 ± 0.76*	45.16 ± 5*	16.8 ± 1.35
FlagV6P	8.75 ± 0.35*	45.5 ± 14.08	12 ± 0.95*
FlagV1P+ FlagV6P	9 ± 1.32*	28 ± 3.04*	13.2 ± 0.66*

20

【0129】

[00149]C.ジェジュニ(株81-176)の運動性に対するFlagV1P及び抗生物質の組合せの効果が、図10に示されている。上の横列は、対照バッファーで処理された場合の細菌成長を示し、下の横列は、1µg/µlの濃度のFlagV1Pペンタボディを用いて処理された細菌を表す。プレートは、漸増濃度のテトラサイクリン: 0µg/ml(A)、4µg/ml(B)、16µg/ml(C)及び64µg/ml(D)を含有していた。写真は、24時間インキュベートした後に撮った。FlagV1Pペンタボディの添加は、カンピロバクター運動性に対するテトラサイクリンの効果をおよそ35倍増強する。

30

【0130】

[00150]ペンタボディFlagV1P処理されたカンピロバクター・コリ及びサルモネラ・チフィウムでの運動性アッセイの結果が、それぞれ、図11A及びBに示されている。C.コリ株VC167(A)及びS.エンテリカ血清型チフィウム(B)の細菌成長を、種々の時点で測定した。抗体を1µg/µlの濃度で使用した。ペンタボディのうち、サルモネラ菌の運動性に影響を及ぼすと思われるものはなかった。ペンタボディFlagV1P及びFlagV6PのC.コリVC167との交差反応性の結果も、表Bに示されている。

40

【0131】

[00151]表4. 運動性アッセイは、ペンタボディFlagV1P及びFlagV6Pの、C.コリVC167との交差反応性を示す。FlagV6Pペンタボディを用いた場合にC.コリの運動性の有意な低下が気づかれる。値を、統計分析のためにスチューデントのt検定に付した。* p値<0.05; ** p値<0.005

【表 4】

表 4 ペンタボディ FlagV1P 及び FlagV6P の C.コリ VC167 との交差反応性 示す運動性アッセイ			
処理	直径(mm)± SD-24 時間	直径(mm)±SD- 48 時間	直径(mm)±SD- 72 時間
PBS	12.5 ± 0.5	25.3 ± 1.52	43.6 ± 4.5
FlagV1P	10.6 ± 0.6*	22 ± 3	42.3 ± 4.1
FlagV6P	5.6 ± 0.66**	11.5 ± 1.32**	25.6 ± 3.05**

10

【 0 1 3 2 】

[00152] 実施例 9 : ニワトリの病原体局在性及び処置

【 0 1 3 3 】

[00153] カンピロバクター大流行を予防するための代替アプローチとして、抗鞭毛 V_H H 単量体又は五量体を使用するニワトリ腸における C. ジェジュニコロニー形成の障害を調べる。C. ジェジュニの鞭毛は、ニワトリ GI 管の盲腸における細菌コロニー形成を媒介する毒性因子である。従って、抗体との結合による鞭毛運動性の妨害は、腸における細菌運動性及び増殖を干渉すると提案される。

【 0 1 3 4 】

[00154] レグホン (leghorn) のひなの C. ジェジュニコロニー形成及び処置。リン酸緩衝生理食塩水溶液中で 18 時間増殖させた C. ジェジュニ 81-176 菌を回収することによって、ひなコロニー形成実験の播種物を調製した。細菌細胞を PBS で希釈し、使用の直前まで氷上で維持した。カルマリ (Karmali) 寒天 (Bacto) 上に段階希釈をプレーティングすることによって生菌数を決定した。1 日齢特定病原体除去 (SPF) レグホン (leghorn) ひな (雌雄混合) を、カナダ食品検査庁 (Canadian Food Inspection Agency)、Ottawa、Canada の孵化場から得た。それらを陰性対照、陽性対照及び処置群に無作為に割り当て、秤量し、ID タグをつけ、動物封じ込めユニットに収容し、餌及び水を自由に提供した。ユニットを環境的に管理されたレベル 2 生物学的封じ込め室に収容した。到着すると、トリの 10% を C. ジェジュニによるコロニー形成について無作為に調べた。2 日目に、300 μ l の C. ジェジュニ 81-176 10^8 cfu / PBS 1ml を用いて、陽性対照及び処置群に経口的に抗原投与した。陽性対照群に 300 μ l の PBS を与え、処置群 (n = 28 / 群、2 つの封じ込めユニットの各々中の 14 羽のニワトリ) に、抗原投与後、1 時間、24 時間及び 48 時間に 300 μ l の FlagV1P 又は FlagV1F23P を与えた。非感染陰性対照群も含めた (n = 15)。

20

30

【 0 1 3 5 】

[00155] 抗体処理の 1 時間又は 4 時間又は 48 時間後に、トリを、カナダ動物管理協会 (Canadian Council for Animal Care) の承認されたガイドラインに従って、頸椎脱臼によって安楽死させた。コロニー形成の定性的並びに定量的評価のために、盲腸を無菌的に採取した。盲腸内容物を、カルマリ (Karmali) 寒天 (Oxoid) 上に連続的にプレーティングし、微好気性条件下、37 で 2 日間インキュベートした後に C. ジェジュニカウントを行った。C. ジェジュニ単独を用いる抗原投与後又はペンタボディ投与後 1 日目及び 4 日目にニワトリ体重も測定した。対照として PBS を使用し、1 日目及び 4 日目に体重 (グラムで) を測定した。

40

【 0 1 3 6 】

[00156] 図 1 2 は、カンピロバクター・ジェジュニがコロニーを形成したニワトリにおける病原体レベルに対する FlagV1P 又は FlagV1F23P の経口投与の効果を示す。C. ジェジュニを用いる抗原投与の 1 時間、24 時間及び 48 時間後に、ニワトリに 300 μ l の五量体野生型 FlagV1P 又は突然変異体 FlagV1F23P を与え

50

た。個々の盲腸中の細菌負荷は、ペンタポディ処置ニワトリにおいて有意な低下を示す(図12A及びB)。陰性対照群は、非感染ニワトリの盲腸において検出可能なC.ジェジュニを示さなかった。

【0137】

[00157]カンピロバクター単独を用いて抗原投与した後又はペンタポディが経口投与された場合に、1日目及び4日目にニワトリを秤量することによって、ニワトリ体重に対する胃管投与されたFlagV1Pの効果を調べた。PBSを対照として使用した。各群について、28の複製から得られた値の平均体重±標準偏差が、図13に示されており；群間に有意差は見られなかった。

【0138】

[00158]サンドイッチELISAによるニワトリGI管中の五量体局在性。コロニー形成及び処置について記載されたスケジュールに従って、ニワトリに、1mgのFlagV1Pペンタポディを用いて胃管栄養を施した(上記の節を参照)。Maxisorp 96マイクロタイタープレート(Nunc)のウェルを、マウスモノクローナル抗ペロ毒素抗体(10µg/ml)を用いて、4℃で一晩コーティングした。PBS-カゼイン(1%)を用いてブロッキングした後、盲腸、回腸、空腸及び十二指腸から採取した腸液を、2倍段階希釈(1/2~1/2048)でウェルに添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートした。次いで、ウェルをPBST(0.05% v/v Tween-20)で洗浄し、HRPにコンジュゲートしたウサギ抗His6 IgG(PBS中、1:5000)を添加し(100µl/ウェル)(Bethyl Laboratories)、室温で1時間インキュベートした。TMB基質(Kirkegaard and Perry Laboratories)を用いて結合を検出し、1M H₃PO₄を用いて反応を停止した。実施例2に記載されたように、ELISAプレートリーダーを使用してA₄₅₀を測定した。データは、特に断りのない限り、各群について平均±SEMとして示されている。組織細菌負荷の相違を、適当な場合には、スチューデントのt検定又は一元配置分散分析(ANOVA)とそれに続くボンフェローニのポストホック(post-hoc)多重比較検定によって評価した。相違は、p<0.05である場合に有意と考えた。

【0139】

[00159]盲腸、回腸、空腸及び十二指腸から腸液を採取し、胃管投与されたペンタポディの存在について調べた。図14は、ニワトリ腸管の種々の部分における抗C.ジェジュニFlagV1Pの検出を示す。示されるように、平均して、盲腸に比較的高濃度のFlagV1Pがある。カンピロバクター・ジェジュニコロニー形成の主な部位が盲腸、大腸及び排泄腔であると言及することは注目し得る(Beeryら、1988年；Carrielloら、2005年)。このデータは、GI管中のペンタポディ及びカンピロバクターコロニー形成の部位の同時局在性効果を示唆する。

【0140】

[00160]実施例10：ジスルフィド突然変異体V_HHの調製

【0141】

[00161]上記のように、V_HHを、ニワトリ胃腸管中に見られる酵素に対する耐性(tolerance)をさらに増大し得るさらなるジスルフィド橋エンジニアリングを含むよう構築した。

【0142】

[00162]ジスルフィド結合突然変異体V_HHの構築。本質的に別の場所で記載されたような(Hussack、2011年)、スプライス-オーバーラップ伸長PCRを使用して、位置54及び104の残基をシステインに突然変異させることによって、さらなるジスルフィド結合をFlagV1M及びFlagV1F23Mのコア中に導入した。2つのジスルフィド結合を含有するFlagV1MDSBを作製するために、BbsI1-V_HH/V1-DSB-rev及びV1-DSB-for/BamHI-V_HHプライマーセット(表2)を使用してFlagV1Mを増幅した。同様に、F23-DSB-for/

10

20

30

40

50

V1-DSB-rev及びV1-DSB-for/BamHI-V_HHプライマーセット(表2)を用いてFlagV1F23Mを増幅することによってFlagV1F23MDSBを作製した。すべてを、pSJF2H発現ベクターにクローニングし、実施例3に記載されたようにTG1大腸菌に形質転換した。FlagV1MDSB及びFlagV1F23MDSB(それぞれ、配列番号30及び配列番号31;図1)を、実施例4に記載されたように、発現させ、精製した。

【0143】

[00163]さらなるジスルフィド結合も、上記のような方法を使用してFlagV6M及びFlagV6F23Mのコアに導入した。得られた構築物をFlagV6MDSB及びFlagV6F23MDSB(それぞれ、配列番号32及び配列番号33;図1)と呼んだ。

10

【0144】

[00164]SDS-PAGEによるジスルフィド突然変異体の分析は、FlagV1MDSB及びFlagV1F23MDSBは、その予測された分子量に移動し、非還元ゲルでは高次多量体の徴候はないことを示した(図16)。V_HH収率は、9.5mg/l(V1-DSB)~21.0mg/l(表2)の範囲であった。

【0145】

[00165]ジスルフィド結合突然変異体のサイズ排除クロマトグラフィー及び表面プラズモン共鳴(SPR)分析。先に記載されたように(Hussack, PLoS ONE, 2011年)、Superdex75カラム及び約50µMのV_HH(FlagV1M、FlagV1MDSB、FlagV1F23M又はFlagV1F23MDSB)を使用して、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を実施し、その後、SPR分析を実施した。Biacore 3000(GE Healthcare)でのSPR分析に先立って、C.ジェジュニ株81-176から得たフラジェリンを、EZ-Link Sulfo-NHS-ビオチン化キット(Thermo Scientific)を使用してビオチン化した。500mLのフラジェリンAを調製し(実施例1)、1mg/mlの濃度で使用した。ビオチンは、20xモル濃度で、製造業者によって提供された説明書に従って使用した。合計8回の、1000x容量のPBSに対する透析によって、組み込まれていないビオチンを除去した。すべてのSPR実験のランニングバッファーは、HBS-EP(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、pH7.4、0.005% P20;GE Healthcare)とした。結合分析のために、2000反応単位(RU)のビオチン化鞭毛を、ビオチンキャプチャー試薬(HBS-EPバッファー中、50µg/ml;GE Healthcare)を用いて先にロードされたCAPセンサーチップ(GE Healthcare)上に固定化した。SECカラムから溶出されたV_HHを、25~400nMの範囲の濃度で、漸増濃度の複数回注入使用して、固定化された鞭毛上に注入した。各V_HH後に再生バッファー(8M塩酸グアニジン及び1M NaOH)を使用して表面を取り除き、上記のように新たなビオチン化鞭毛表面を調製した。シングルサイクルカイネティックパッケージを有するアップデートされたBia評価4.1ソフトウェアを使用して親和性(K_Ds)を算出した。

20

30

【0146】

[00166]野生型V_HHは、位置23/104(IMG T付番)に基準ジスルフィド結合を含む。位置54/78(IMG T付番)のさらなる非基準ジスルフィド結合の、FlagV1M及びFlagV1F23M変異体への導入によって、ジスルフィド突然変異体FlagV1MDSB及びFlagV1F23MDSBを得た。ジスルフィド突然変異体の可溶性細菌発現は、最大23mg/LのV_HHを生じさせた。V_HHの親和性は、シングルサイクルカイネティックを使用するSPRによって決定した。センサーグラム及びFlagV1M、FlagV1MDSB、FlagV1F23M又はFlagV1F23MDSBの親和性が、図16Bに示されており、表2で報告されている。V_HHのすべてが、1:1結合モデルとフィットし、C.ジェジュニ鞭毛に対して高親和性結合を保持しており、K_Dは23.9nm(FlagV1M)~17.3nm(FlagV1F23MDS

40

50

B)の範囲であった。すべての $V_H H$ が単量体である(表2)ことを確認する、SECクロマトグラムが示されている(図16C)。各クロマトグラムに溶出体積(V_e)が記載されている。

【0147】

[00167] $V_H H$ の熱的アンフォールディング分析。すべての $V_H H$ の熱的アンフォールディング中点温度(T_m)を、Jasco J-815分光光度計(Jasco、Easton、MD)を使用してpH7.3及びpH2.0で円偏光二色性分光法を使用して、データ点が0.2毎に得られた点を除いて、本質的に記載されたように(Hussack、PLoS ONE、2011年)215nmでの $V_H H$ アンフォールディングをたどることによって決定した。50 μ g/mlを使用した高温での凝集のために、pH7.3での T_m 決定のために10 μ g/mlを使用した V_1 $V_H H$ の場合を除いて、50 μ g/mlのタンパク質濃度を使用して $V_H H$ アンフォールディングを測定した。

10

【0148】

[00168]pH7.3ですべての $V_H H$ について、単一相転移を有するアンフォールディング曲線が得られた。このpHで、ジスルフィド突然変異体 $V_H H$ の T_m は、単一ジスルフィド結合を有する $V_H H$ よりも高かった。例えば、Flag V1MDSB及びFlag V1F23MDSBの T_m は、それぞれ、Flag V1M及びFlag V1F23Mの61.65 \pm 0.38及び72.33 \pm 0.15と比較して、それぞれ、79.10 \pm 0.11及び80.19 \pm 0.12 $^{\circ}$ Cであった(図17;表2)。Flag V1Mは、50 μ g/mlで調べた場合に68 $^{\circ}$ Cを超える温度で凝集したが(図17、挿入部分)、濃度を10 μ g/mlに低下させた場合には、より高温で凝集は検出可能ではなく、単一相アンフォールディング曲線が得られたことは留意されなくてはならない。次いで、pH2.0で $V_H H$ の T_m を決定した。アンフォールディング実験を実施する前に、 $V_H H$ を、pH2.0で少なくとも2時間インキュベートした。図17におけるアンフォールディングプロットから得られた証拠のように、 V_1 は、pH2.0で出発温度(25 $^{\circ}$ C)で完全にアンフォールディングし、 T_m は、決定され得なかった。対照的に、Flag V1MDSBは、25 $^{\circ}$ C、pH2.0でフォールディングし、42.41 \pm 0.11の T_m が決定され、これは、Flag V1MDSB安定性に対して第2のジスルフィド結合が有する相当な影響を示す。Flag V1F23Mは、25 $^{\circ}$ C、pH2.0で部分的にアンフォールディングされ、30.51 \pm 0.26の T_m 、Flag V1Mからの改善が決定された。この結果は、より安定な結合物質の選択におけるプロテアーゼ-バニング戦略の成功を明確に示す。中性pHと同様に、pH2.0で最高 T_m を有するクローンは、F23-D-S-Bであり、44.55 \pm 0.03の T_m を有し、Flag V1F23Mにおける安定化突然変異の効果及び第2のジスルフィド結合の効果は、高安定化されたFlag V1F23MDSBドメインの作製において部分的に相乗的であったと示唆する。

20

30

【0149】

[00169] $V_H H$ の*in vitro*プロテアーゼ消化。Flag V1M、Flag V1MDSB、Flag V1F23M及びFlag V1F23MDSB $V_H H$ を、主要なGIプロテアーゼペプシン(Sigma)、トリプシン(Roche)及びキモトリプシン(Roche)を用いる*in vitro*プロテアーゼ消化アッセイに付した。 $V_H H$ 消化は、記載されたように正確に実施し(Hussack、PLoS ONE、2011年)、その後SDS-PAGEによって分析した。手短には、 $V_H H$ を、100 μ g/mlのペプシンを用い37 $^{\circ}$ C、pH2.0で60分間消化し、対照 $V_H H$ は、ペプシンの不在下でインキュベートした。トリプシン及びキモトリプシン消化については、 $V_H H$ を、37 $^{\circ}$ C、pH7.3で10 μ g/mlのプロテアーゼとともに60分間インキュベートし;対照 $V_H H$ は、プロテアーゼの不在下でインキュベートした。消化された $V_H H$ 及び対照をSDS-PAGEによって分離し、SDS-PAGEゲルの濃度測定分析を実施した。各 $V_H H$ で、合計3回の独立したプロテアーゼ消化を実施した。

40

【0150】

[00170]結果は、図18に示されている。Flag V1M及びFlag V1F23Mは

50

両方とも、ペプシン分解に対して感受性であり、60分後に、それぞれ、 $22.3 \pm 8.1\%$ 及び $6.8 \pm 3.6\%$ の $V_H H$ が無傷のままであった。ジスルフィド操作された変異体は、ペプシンに対して相当により耐性であり、Flag V1 M D S Bは、試験されたペプシンの濃度($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)で完全な耐性を示した($100.5 \pm 6.7\%$)。Flag V1 F 2 3 M D S Bも、ペプシンに対して極めて耐性であり、60分後に $96.9 \pm 15.8\%$ の $V_H H$ が無傷のままであった。トリプシンを用いて60分間消化された場合には、F 2 3は、完全に耐性であり($101.1 \pm 4.7\%$)、V1($84.4 \pm 1.8\%$)、Flag V1 F 2 3 M D S B($49.1 \pm 15.4\%$)及びFlag V1 M D S B($41.3 \pm 2.7\%$)が続いた。ジスルフィド結合の付加が、両クローンのトリプシン耐性を低下させることは、ここで明らかである。キモトリプシンを用いて60分間消化されると、Flag V1 F 2 3 M D S Bは、最高の耐性($90.9 \pm 4.1\%$)を示し、Flag V1 F 2 3 M($85.4 \pm 3.3\%$)、Flag V1 M($52.9 \pm 6.5\%$)及びFlag V1 M D S B($49.5 \pm 6.7\%$)が続いた。従って、第2のジスルフィド結合の影響は、キモトリプシン感受性を増大しないが、トリプシン感受性を増大する。これらのデータは、合わせて、プロテアーゼ - パニングから単離されたFlag V1 F 2 3 M変異体は、極めて高いトリプシン及びキモトリプシン耐性又は耐性(tolerance)について選択されていることを示す。ペプシン、トリプシン及びキモトリプシン分解に対する改善された耐性は、経口投与のために提供され得るポリペプチドの望ましい特徴である。

10

【0151】

20

[00171] GI管における連続プロテアーゼ消化を模倣するために、個々のプロテアーゼ消化に加えて、連続消化反応を実施した(図19Aを参照)。 $V_H H$ ($50 \mu\text{g}$)を、 $50 \mu\text{l}$ の総容量で、まず、ペプシン(37 、 $\text{pH} 2.0$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 最終)を用いて15又は30分間消化し、続いて、トリプシン+キモトリプシン(各々について、 37 、 $\text{pH} 7.4$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 最終)を用いて15又は30分間消化した。ペプシン消化後、反応物の pH を 1M NaOH を用いて中和した。トリプシン+キモトリプシン消化後、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma)を添加して、反応を停止した。連続的に消化された $V_H H$ を、SDS-PAGEによって非処置対照と比較した。

【0152】

[00172] SDS-PAGEによる連続消化の効果及び非処置対照が、図19Bに示されている。対照Flag V1 Mに対して、Flag V1 Mのほぼ完全な消化が、15及び30分で明らかである(「V1」対「V1(15)」及び「V1(30)」を比較する)。Flag V1 F 2 3 Mは、Flag V1 Mよりも耐性であり、連続15分消化後に存在する強力なバンドを有していた(「F23」対「F23(15)」を比較する)。30分後、Flag V1 F 2 3 Mのほぼ完全な消化が見られた。逆に、両ジスルフィド結合変異体は、処置の30分後でさえ連続プロテアーゼ消化に対して強力に耐性であった(「V1-D S B」対「V1-D S B(30)」及び「F23-D S B」対「F23-D S B(30)」を比較する)。バンドの濃度測定分析によって、同一処置後に無傷であるFlag V1 M D S B $V_H H$ の 47.6% と比較して、連続30分消化後にFlag V1 F 2 3 M D S B $V_H H$ の 74.5% が無傷であることが示された。

30

40

【0153】

[00173]プロテアーゼ消化された $V_H H$ でのC.ジェジュニ運動性アッセイ。先に記載されたように(Kalmo k o f fら、2006年)、運動性アッセイを実施した。 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の最終濃度の抗体を、C.ジェジュニ($5 \times 10^4 \text{CFU}$)とともに、RTで30分間インキュベートした。混合物を、ミュラー-ヒントン寒天(0.4%)を含有するペトリディッシュの中心にプレーティングし、微好気性条件($5\% \text{O}_2$ 、 $10\% \text{CO}_2$ 及び $85\% \text{N}_2$)下 37 でインキュベートした。細菌運動性は、細菌をプレーティングした24時間後に増殖する細菌によって作られた円の直径を測定することによって調べた。

【0154】

50

[00174] プロテアーゼ消化された V_HH 突然変異体での C . ジェジュニ運動性アッセイ。V_HH を、上記の節においてここで記載されたような連続プロテアーゼ消化スキームに曝露した。次いで、先に記載されたように (K a l m o k o f f ら、2006 年)、運動性アッセイを実施した。1 μg / μl の最終濃度の抗体を、C . ジェジュニ (株 81 - 176) (5 × 10⁴ CFU) とともに、RT で 30 分間インキュベートした。混合物を、ミュラー - ヒントン寒天 (0.4%) を含有するペトリディッシュの中心にプレーティングし、微好気性条件 (5% O₂、10% CO₂ 及び 85% N₂) 下 37 °C でインキュベートした。細菌運動性は、プレート播種の 24 時間後に増殖する細菌によって作られた円の直径を測定することによって調べた。

【0155】

[00175] 運動性アッセイにおいて V_HH を使用して、連続消化された V_HH が、C . ジェジュニ運動性の低下において依然として機能的であるかどうかを調べた (図 19 C 及び図 20 において表されるような)。プロテアーゼを用いて処置されていない V_HH は、24 時間インキュベートした後に、プレート上での細菌の成長及び拡散の阻害において有効のままであった。プロテアーゼ処理した F l a g V 1 M 及び F l a g V 1 F 2 3 M 抗体は、15 分及び 30 分のインキュベーション条件両方の後に、活性をほぼ完全に失った。対照的に、F l a g V 1 M D S B 及び F l a g V 1 F 2 3 M D S B 突然変異体の成長阻害活性は、プロテアーゼ処理によってほぼ影響を受けず、ジスルフィド結合突然変異体では、プロテアーゼ処理した V_HH が活性であり、機能的であるままであることがさらに確認された。

【0156】

[00176] 表 5 . C . ジェジュニ鞭毛特異的 V_HH の生物物理学的特性。速度及び親和性定数又は「結合」及び「解離」速度 (k_a 又は k_{o.n} 及び k_d 又は k_{o.f.f}) 並びに腸酵素ペプシン、トリプシン及びキモトリプシンに対する耐性が含まれる。^a Superdex 75 サイズ排除クロマトグラフィーピーク面積積分によって決定された ; ^b 50 μg / ml での V1 の凝集のために使用された 10 μg / ml ; ^c 100 μg / ml プロテアーゼを使用して実施された消化 ; ^d 10 μg / ml プロテアーゼを使用して実施された消化 ; n / a : pH 2.0、2.5 で変性されたタンパク質。

【表 5】

表 5
C.ジェジュニ鞭毛特異的 V_HH の生物物理学的特性

	V1M	V1-DSB	F23	F23-DSB	V6M
収率(mg/l)	17.0	9.5	21.0	16.5	20
SEC(%単量体) ^a	96.88	99.34	99.83	99.88	99.10
k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	2.36 × 10 ⁵	1.53 × 10 ⁵	2.29 × 10 ⁵	1.65 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶
k _d (s ⁻¹)	5.63 × 10 ⁻³	2.80 × 10 ⁻³	4.26 × 10 ⁻³	2.86 × 10 ⁻³	3 × 10 ⁻²
K _D (nM)	23.9	18.2	18.6	17.3	25.0
T _m pH 7.3 (°C)	61.65 ± 0.38 ^b	79.10 ± 0.11	72.33 ± 0.15	80.19 ± 0.12	nd
T _m pH 2.0 (°C)	n/a	42.41 ± 0.11	30.51 ± 0.26	44.55 ± 0.03	nd
ペプシン耐性(%) ^c	22.3 ± 8.1	100.5 ± 6.7	6.8 ± 3.6	96.9 ± 15.8	nd
トリプシン耐性(%) ^d	84.4 ± 1.8	41.3 ± 2.7	101.1 ± 4.7	49.1 ± 15.4	nd
キモトリプシン耐性(%) ^d	52.9 ± 6.5	49.5 ± 6.7	85.4 ± 3.3	90.9 ± 4.1	nd

【0157】

[00177] 細菌及びウイルス感染に対する新規ツールとして単ドメイン V_HH 抗体が新たに出現したことは明らかである。これらのポリペプチドの小さい大きさによって、従来の抗体にとって接近しづらいエピトープとの結合が可能となる。タンパク質分解、変性及び凝集に対する耐性などの独特の物理的特性はまた、ヒト又は家畜のための経口送達治療

10

20

30

40

50

における適用を可能にする。

【0158】

[00178]本明細書において記載されるように、C. ジェジュニ鞭毛に対するV_HH抗体のライブラリーをファージディスプレイ技術を使用して構築し、スクリーニングした。V_HH及びその五量体形は、抗原と結合でき、経口投与された場合にニワトリにおけるC. ジェジュニ含量の低下において有効であることが実証された。

【0159】

[00179] *in vitro* 研究によって、プレートアッセイで、Flag V1Mが、カンピロバクター・ジェジュニと結合し、その成長を攪乱したが、カンピロバクターの密接に関連する株(C. コリ)では有効ではないことが示された。Flag V1M及びFlag V1Pは両方とも、使用された濃度で、運動性アッセイにおける細菌の成長の攪乱において有効であった。理論にとらわれようとは思わないが、作用様式は、凝集及び/又はタンパク質腔中にV_HHを入れることによって、細菌運動性の攪乱を引き起こすことであり得る。

【0160】

[00180]カンピロバクターコロニー形成低減における抗体の有効性を調べるために、フラジェリン特異的V_HHの五量体形を構築し、細菌細胞はペンタボディのV_HHドメインによって凝集するようになり、これは、C. ジェジュニのニワトリ胃腸管にコロニーを形成する能力を損なうという仮定の下で、ニワトリ研究に使用した。カンピロバクターの運動性は、粘性腸粘膜のコロニー形成にとって必要であり、フラジェリンタンパク質は、細胞表面上の免疫優性抗原である。

【0161】

[00181]上記の抗体又はその断片のプロテアーゼ耐性及び多量体形態は、ニワトリにおいて、例えば、盲腸において、カンピロバクターのコロニー形成を有利なことに低減する。記載された技術は、カンピロバクター汚染を管理するための新規ツールを提供する。

【0162】

[00182]先の記載では、説明する目的で、実施形態の完全な理解を提供するために多数の詳細が示されている。しかし、当業者には理解されようが、これらの特定の詳細は必要ではない。

【0163】

[00183]上記の実施形態は、単に例であるものとする。当業者には明らかであるように、記載された特定の実施形態の代替法、改変及び変法は本明細書において包含される。

【0164】

参考文献

[00184]本明細書及び本願を通じて参照されるすべての特許、特許出願及び刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0165】

関連出願の相互参照

本願は、参照により本明細書に組み込まれる、2012年10月24日に出願された米国特許仮出願第61/718,062号の優先権の利益を主張する。

10

20

30

40

【 図 1 】

```

FlagV1M      CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV1F23M  CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV1M58H  CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV1F23M58H CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
.....

FlagV1M      PDVVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV1F23M  PDVVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV1M58H  PDVVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV1F23M58H PDVVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
.....

FlagV1M      VIVSS 125  配列番号 NO:8
FlagV1F23M  VIVSS 125  配列番号 NO:30
FlagV1M58H  VIVSS 125  配列番号 NO:31
FlagV1F23M58H VIVSS 125  配列番号 NO:31
.....

FlagV6M      CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV6F23M  CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV6M58H  CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV6F23M58H CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
.....

FlagV6M      DSVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV6F23M  DSVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV6M58H  DSVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
FlagV6F23M58H DSVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 120
.....

FlagV6M      GTQVTVSS 128  配列番号 NO:13
FlagV6F23M  GTQVTVSS 128  配列番号 NO:14
FlagV6M58H  GTQVTVSS 128  配列番号 NO:32
FlagV6F23M58H GTQVTVSS 128  配列番号 NO:33
.....

FlagV1P      CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 60
FlagV6P      CQKLEESGGRLVQAGGSRRLSCATSGIYFRNFMAMFRQVAGKREVVAAIWSRDRQVY 59
.....

FlagV1P      PDVVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 116
FlagV6P      DSVKGRFTTIRDNANKTVYSLQMKSLKPECTAVYCAARCAASAGGDWYKGSYQVYKGGSTQ 119
.....

FlagV1P      QSTCVTVSSGPGGGSSGGSTPDCVTSKVEYTKYNDCEFTVYKVGKELFINRANLQGLL 176
FlagV6P      QSTCVTVSSGPGGGSSGGSTPDCVTSKVEYTKYNDCEFTVYKVGKELFINRANLQGLL 179
.....

FlagV1P      LSACITGNTVITKTNACINGGGFEVIFR 205  配列番号 NO:19
FlagV6P      LSACITGNTVITKTNACINGGGFEVIFR 208  配列番号 NO:21
.....

```

FIG. 1

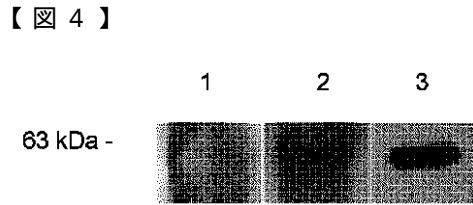


FIG. 4

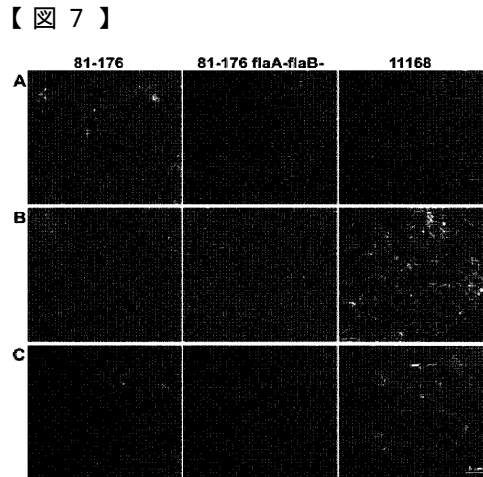


FIG. 7

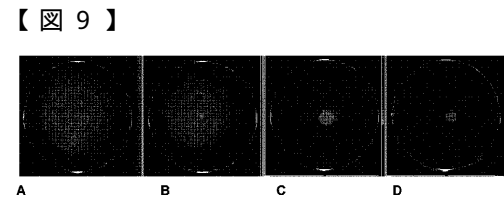


FIG. 9

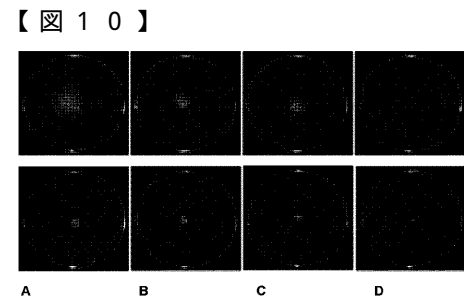


FIG. 10

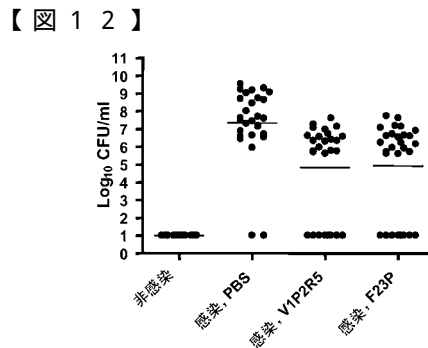


FIG. 12A

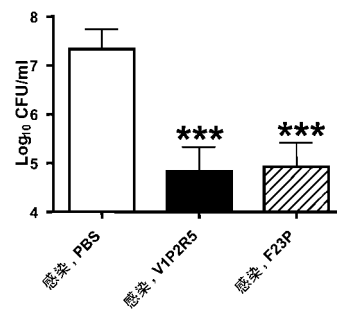


FIG. 12B

【 図 1 3 】

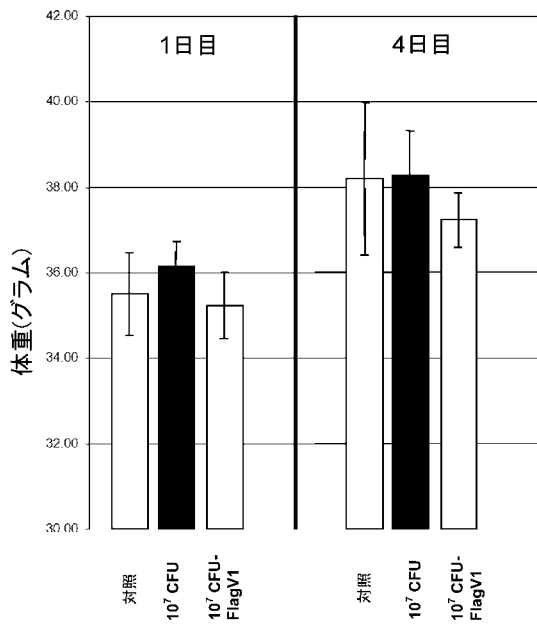


FIG. 13

【 図 2 】

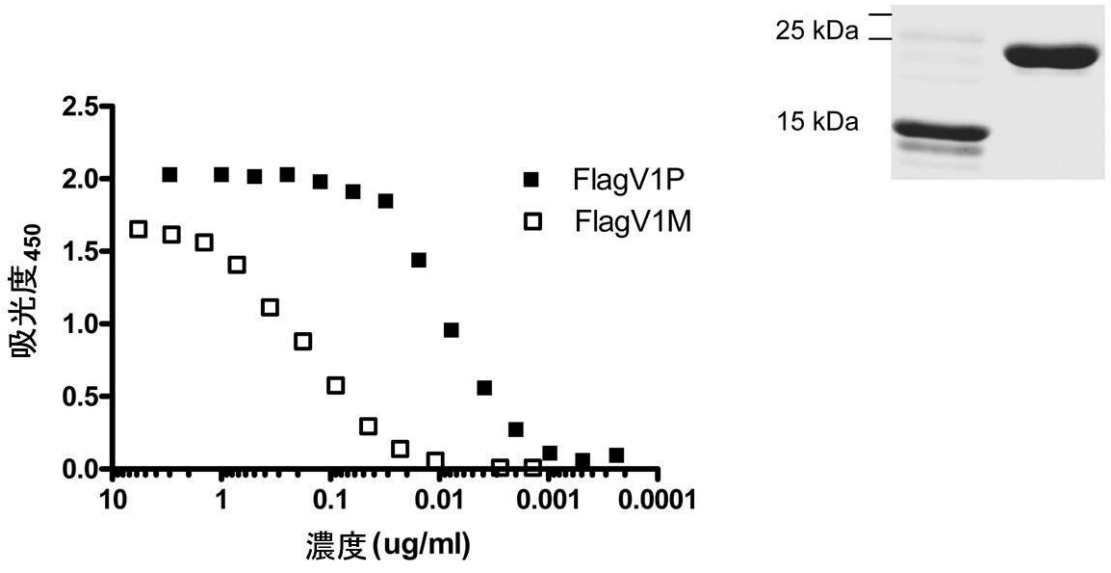


FIG. 2

【 図 3 】

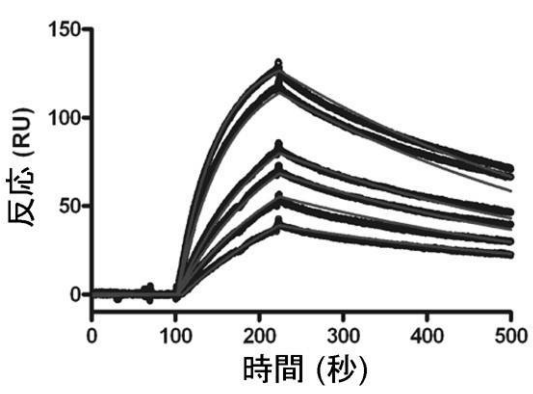


FIG. 3A

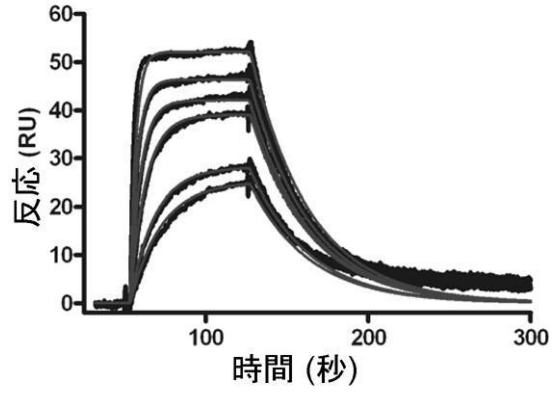


FIG. 3B

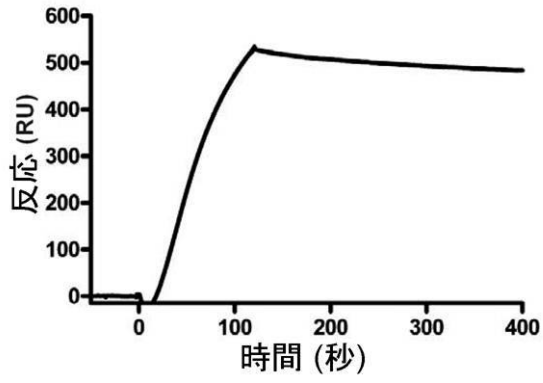


FIG. 3C

【 図 5 】

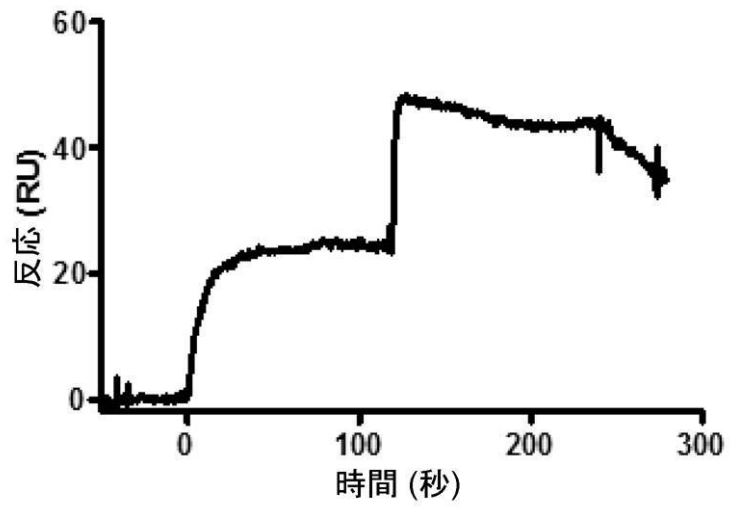


FIG. 5

【 図 6 】

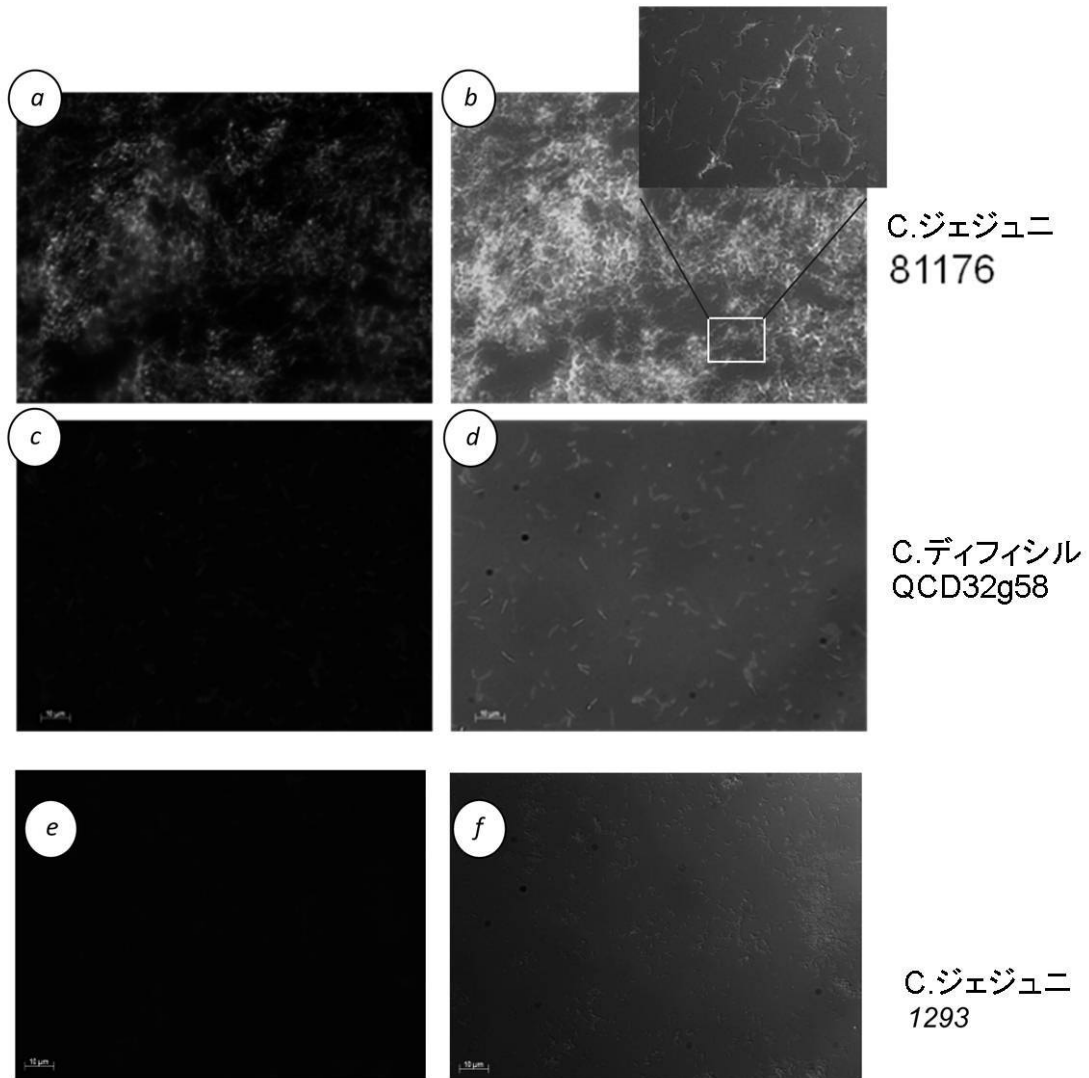
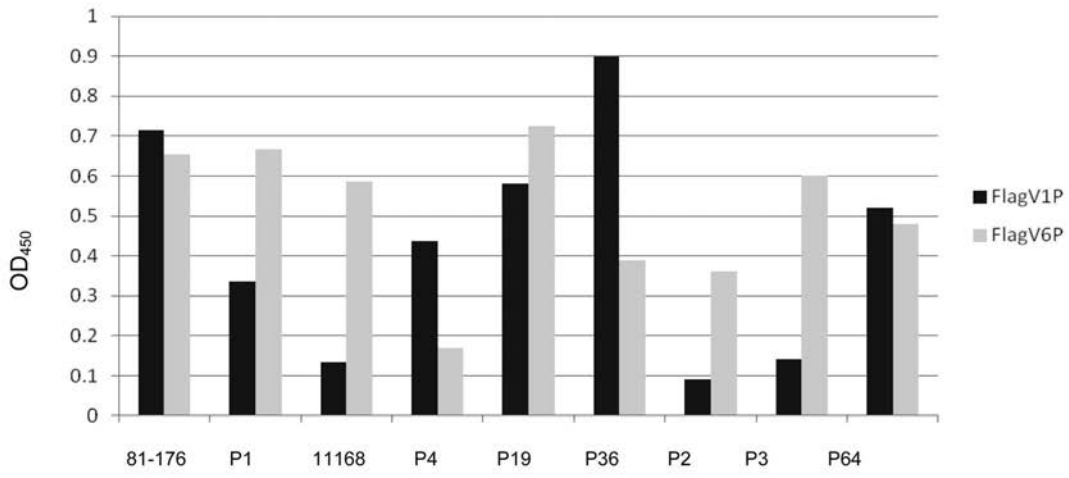


FIG. 6

【 図 8 】



C.ジェジュニ株

FIG. 8

【図 1 1】

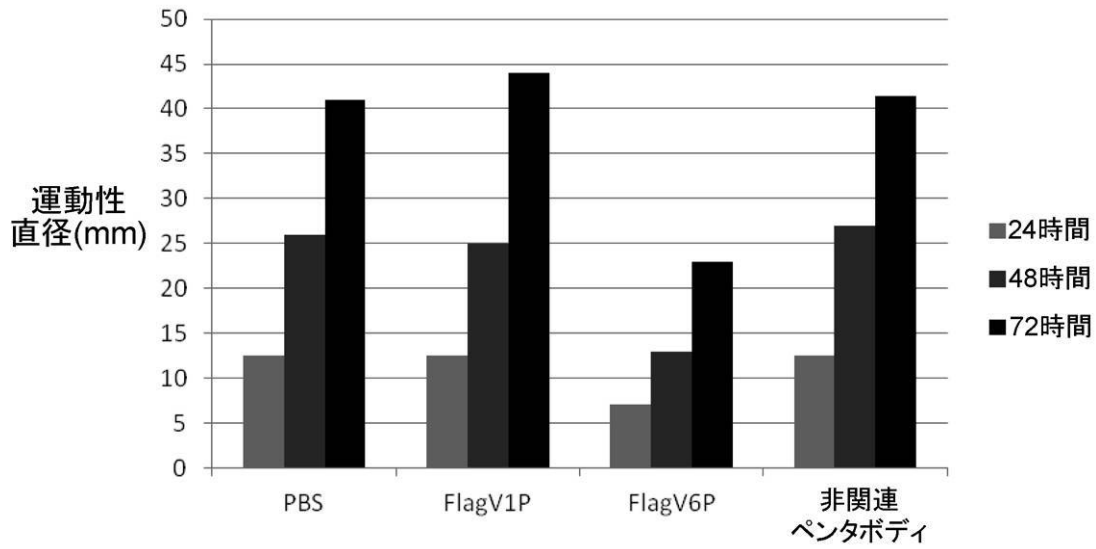


FIG. 11A

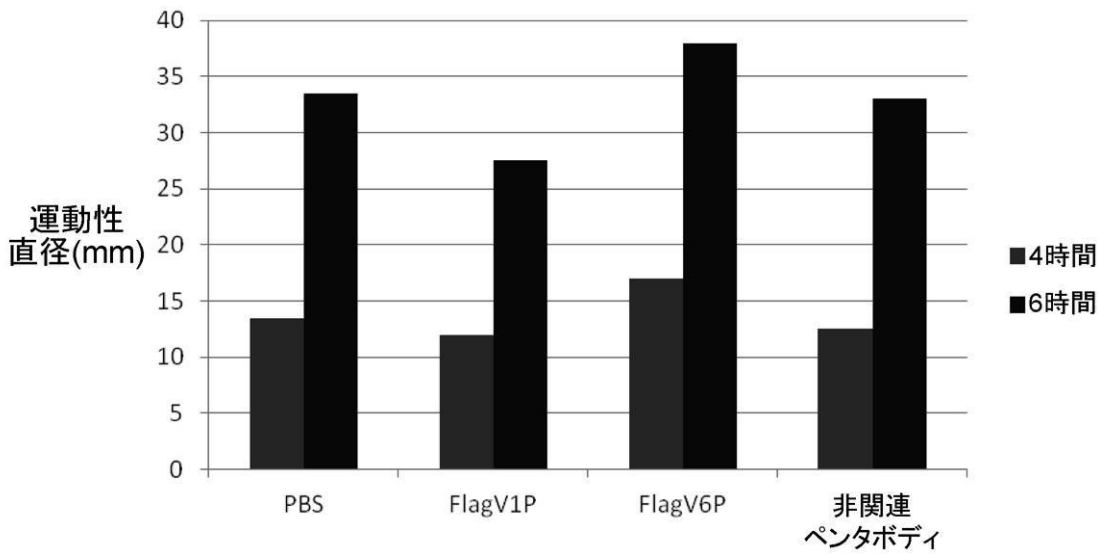


FIG. 11B

【 図 1 4 】

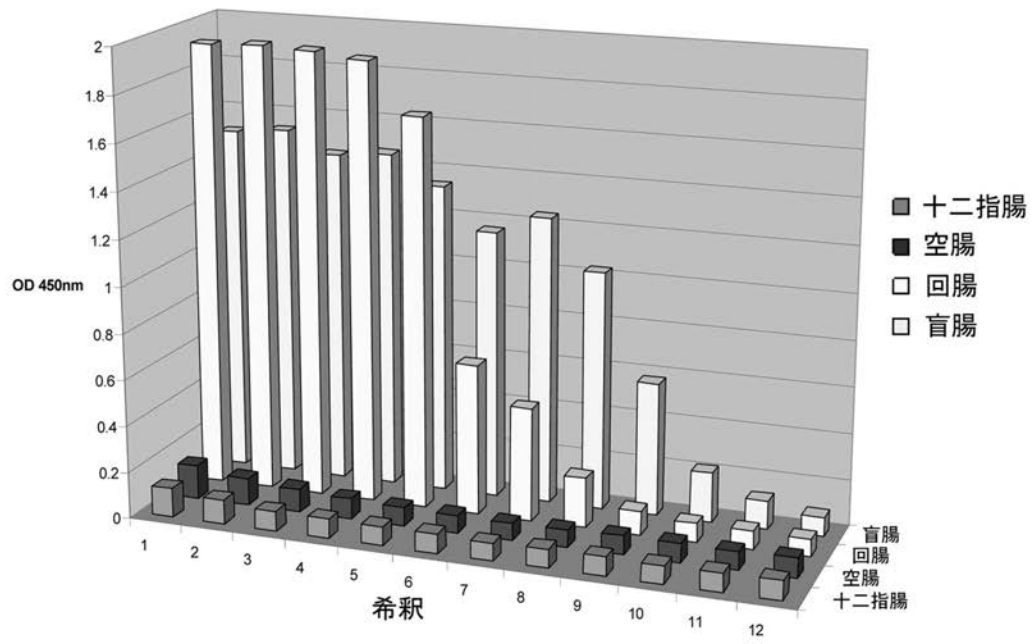


FIG. 14

【 図 1 5 】

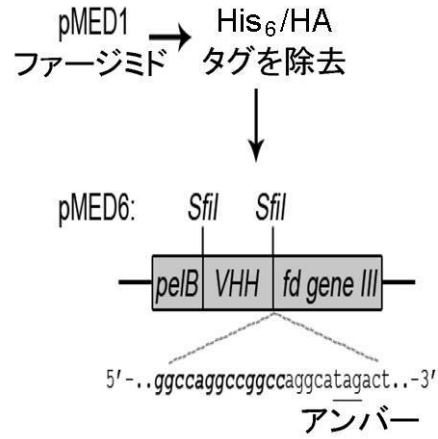


FIG. 15A

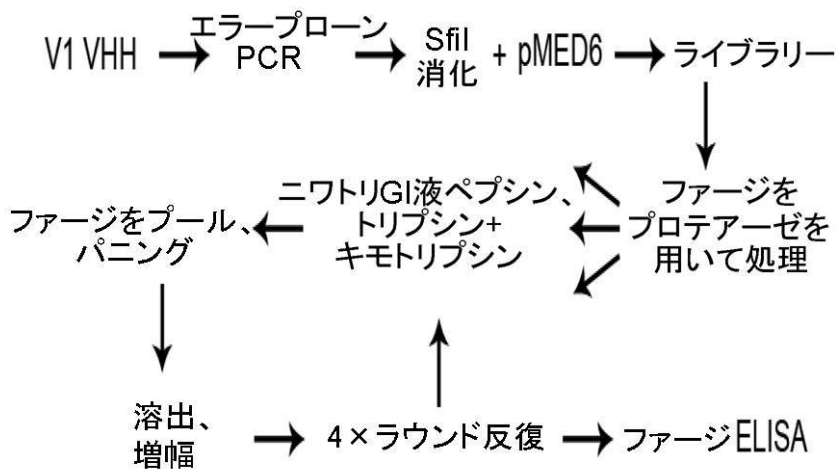


FIG. 15B

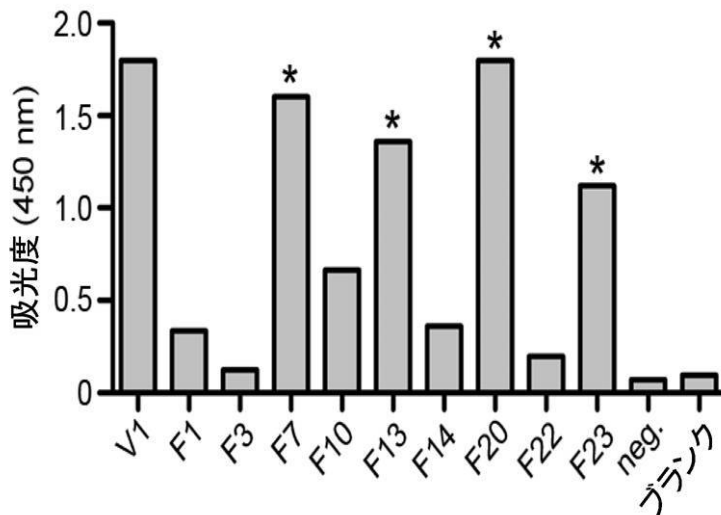


FIG. 15C

【 図 1 6 】

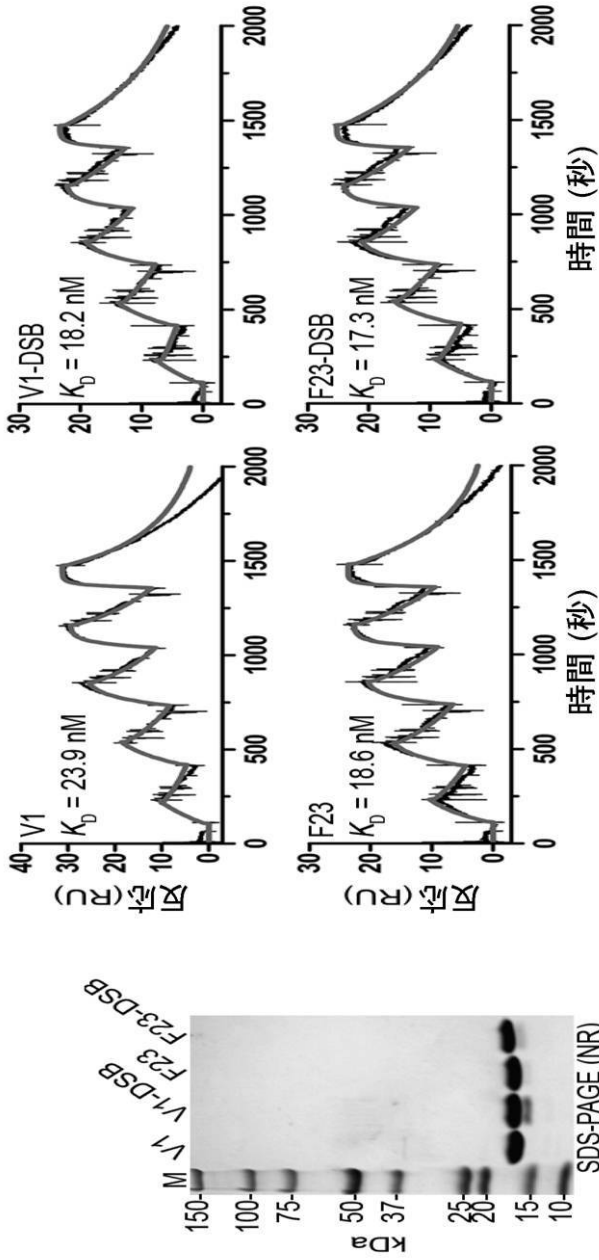


FIG. 16A

FIG. 16B

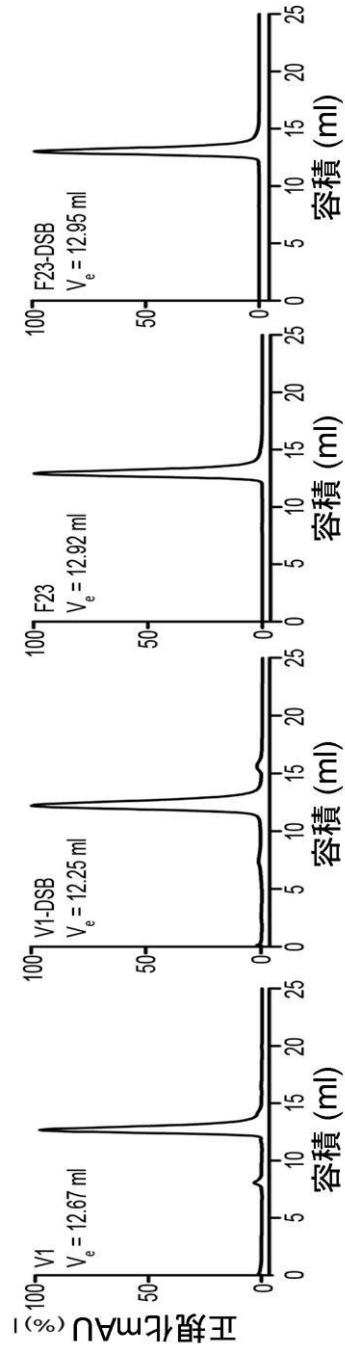


FIG. 16C

【 図 17 】

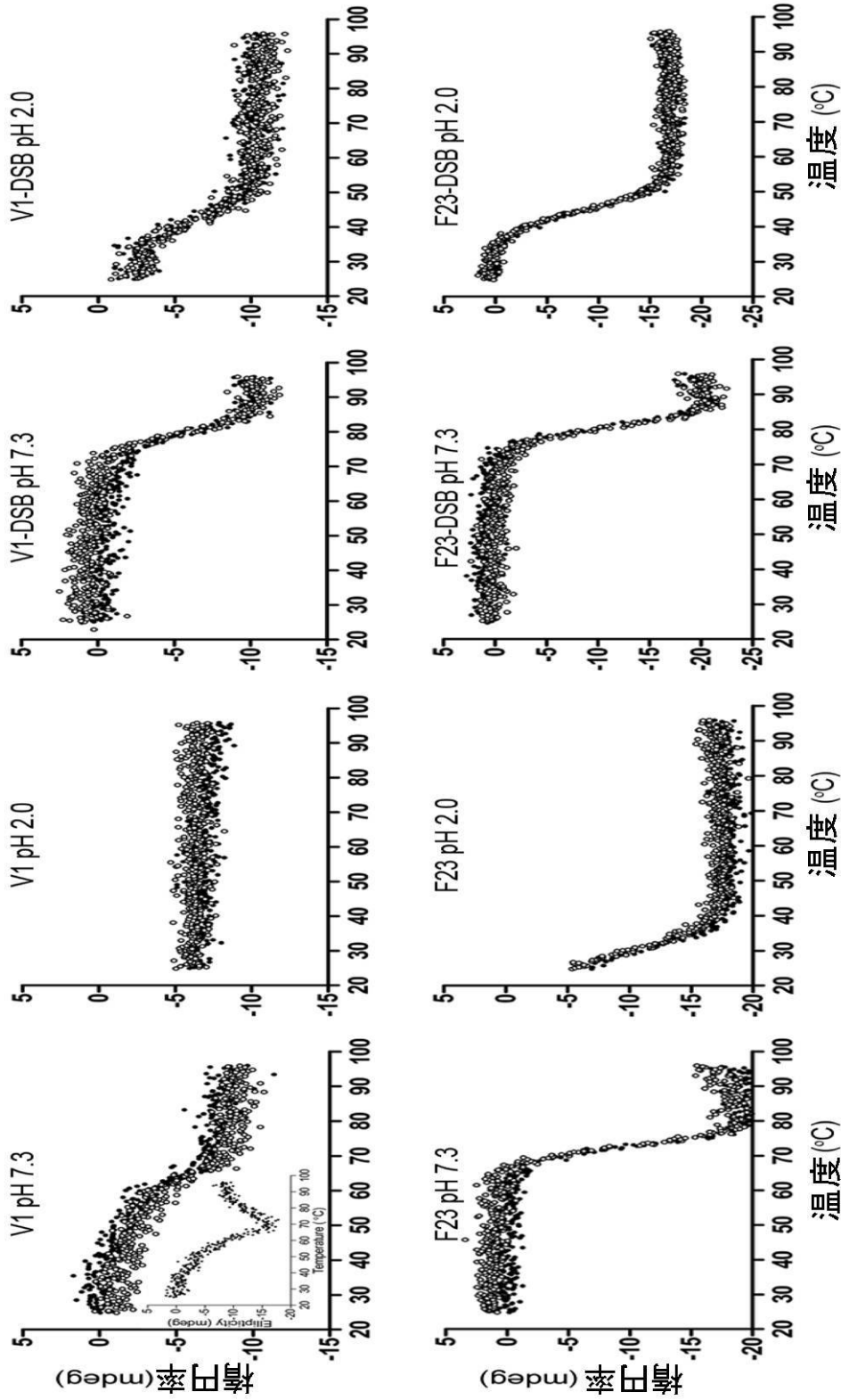


FIG. 17

【 図 18 】

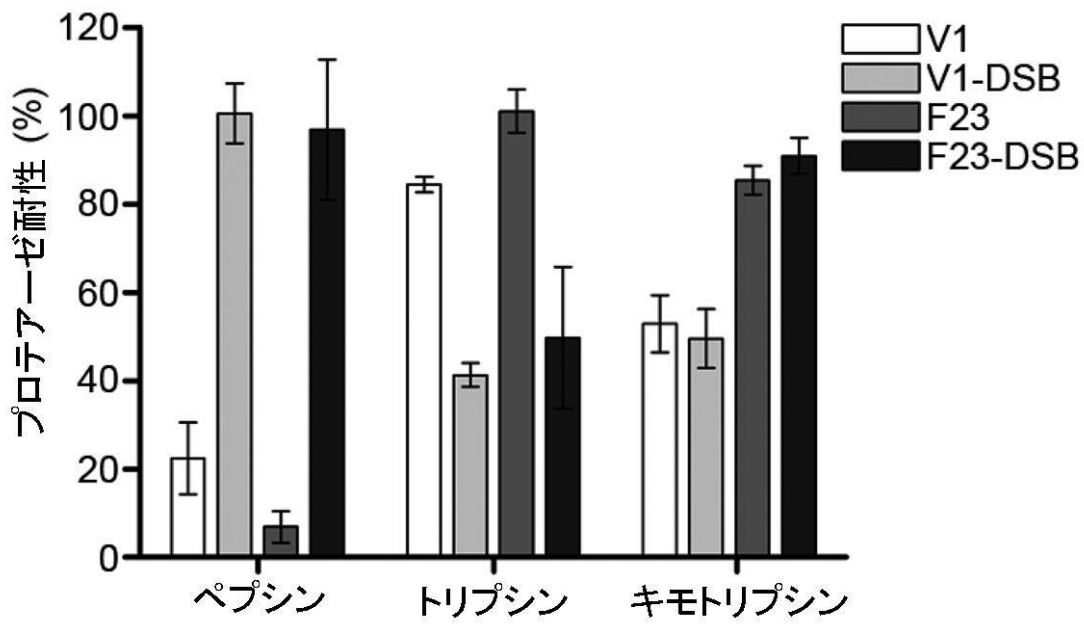


FIG. 18

【 図 1 9 】



FIG. 19A

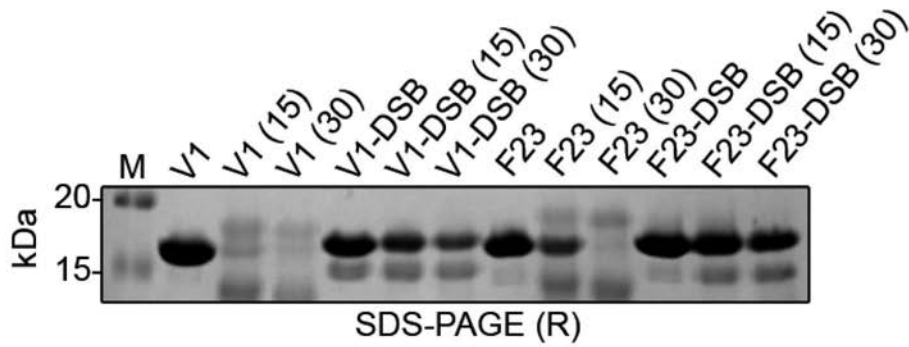


FIG. 19B

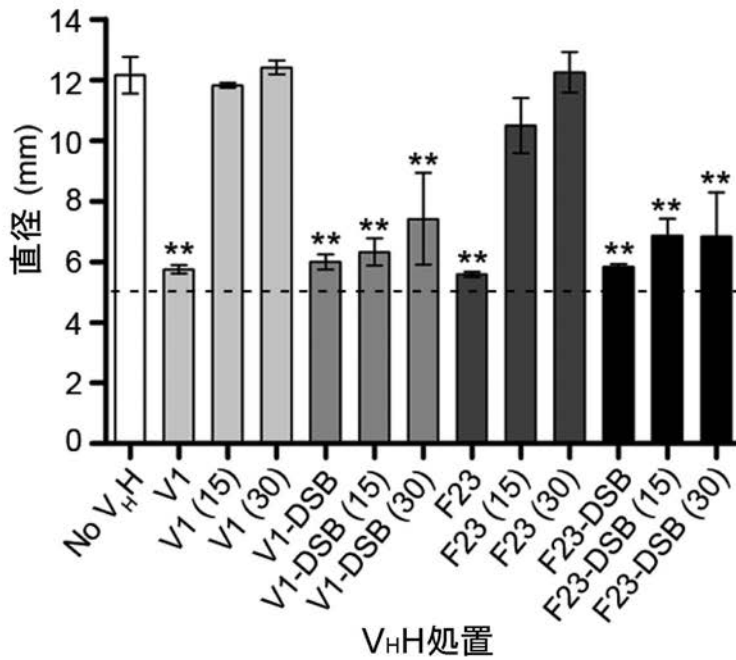


FIG. 19C

【 図 2 0 】

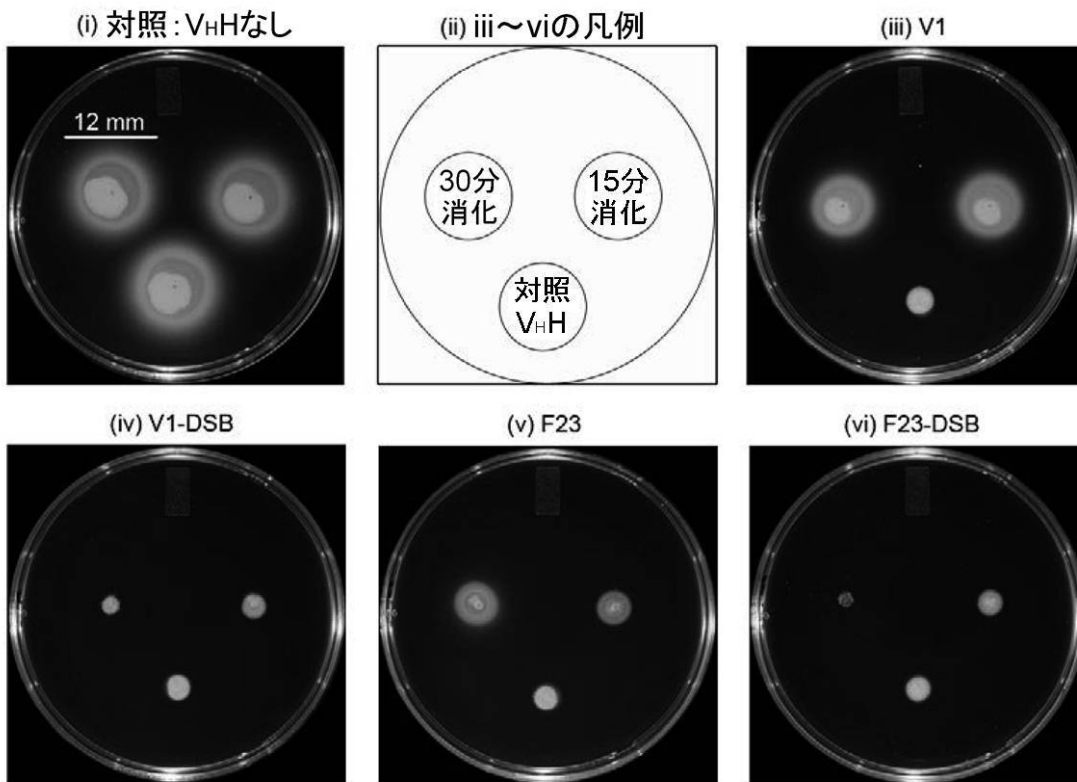


FIG. 20

【 配 列 表 】

[2015535224000001.app](#)

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 27 年 7 月 14 日 (2015.7.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C. ジェジュニ鞭毛と特異的に結合する単離又は精製された抗体又はその断片であって、

配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) 又は V S T F S I N A L G (配列番号 4) を含む相補性決定領域 (CDR) 1 と、

配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) 又は I G S D G T V (配列番号 5) を含む C D R 2 と、

配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) 又は N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) を含む C D R 3 と

を含み、フラジェリンと特異的に結合する、抗体又はその断片。

【請求項 2】

配列 G L T F R N F H M A (配列番号 1) の C D R 1 と、配列 I S W S R D R Q (配列番号 2) の C D R 2 と、配列 A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y (配列番号 3) の C D R 3 とを含むか、配列 V S T F S I N A L G (配列番号 4) の C D R 1 と、配列 I G S D G T V (配列番号 5) の C D R 2 と、配列 N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S (配列番号 6) の C D R 3 とを含む、請求項 1 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 3】

配列

Q V X₁ L X₂ E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V X₃ A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T X₄ T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 7)

[式中、X₁ = K 又は Q であり、X₂ = E 又は V であり、X₃ = A 又は C であり、X₄ = I 又は C である] 及びそれと少なくとも 90% 同一の配列、

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 8) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V A A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T I T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 9) ;

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 10) ;

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S R R L S C A T S G L T F R N F H M A W F R Q V A G K E R E V V C A I S W S R D R Q Y Y P D P V K G R F T C T R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A R T A S A S G D W Y K G S Y Q Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号 11) ;及び

それらと少なくとも 90% 同一の配列

からなる群から選択された配列を含む、請求項 2 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 4】

配列

Q V X₁ L X₂ E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R
 Q A P G K A R E L V X₃ A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T X₄ S R D N A K N
 T V S L Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G
 S W G Q G T Q V T V S S (配列番号 12)、

[式中、X₁ = K 又は Q であり、X₂ = E 又は V であり、X₃ = A 又は C であり、X₄ = I 又は C である] 及びそれと少なくとも 90% 同一の配列；

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号 13)；

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V A A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T I S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号 14)；

Q V K L E E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号 15)；

Q V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R V S C T A S V S T F S I N A L G W Y R Q A
 P G K A R E L V C A I G S D G T V Y Y T D S V K G R F T C S R D N A K N T V S L
 Q M S S L K P E D T A V Y Y C N A A G K R I G S D G S I W F A V A S F G S W G Q
 G T Q V T V S S (配列番号 16)；及び

それらと少なくとも 90% 同一の配列

からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 5】

フラジェリンの F l a A 成分と特異的に結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 6】

単ドメイン抗体 (s d A b) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 7】

多価提示である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片をコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 10】

検出可能な標識と連結している、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片。

【請求項 11】

非ヒト動物又は非ヒト動物環境における C . ジェジュニの存在を低減する方法であって、非ヒト動物に、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 12】

単離又は精製された抗体又はその断片が経口投与される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

単離又は精製された抗体又はその断片が、酵母発現系中に含まれる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

非ヒト動物に、抗生物質、バクテリオシン又は C . ジェジュニに対して有効であるその他の植物若しくは動物由来化合物を投与するステップをさらに含む、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

プロバイオティック系において、任意選択で同時発現されるか、又は同時に含有される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片と一緒に、非ヒト動物に競合微生物を投与するステップをさらに含む、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

非ヒト動物環境への C . ジェジュニの導入を低減する方法であって、非ヒト動物環境に新入非ヒト動物を入れる前に、新入非ヒト動物に、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び賦形剤を含む、C . ジェジュニワクチン。

【請求項 18】

経口送達用である、請求項 17 に記載のワクチン。

【請求項 19】

C . ジェジュニに感染した非ヒト対象を治療する方法であって、非ヒト対象に、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片を投与するステップを含む、方法。

【請求項 20】

非ヒト対象に C . ジェジュニに対して有効な抗生物質を投与するステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

非ヒト対象が、ニワトリ、ウシ及びヒツジからなる群から選択される家畜動物である、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片及び賦形剤を含む、C . ジェジュニ感染の治療に使用するための製剤。

【請求項 23】

それを必要とする非ヒト対象において C . ジェジュニ感染を治療するための医薬を調製するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片の使用。

【請求項 24】

それを必要とする非ヒト対象において C . ジェジュニ感染を治療するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片の使用。

【請求項 25】

サンプル中の C . ジェジュニを検出する方法であって、サンプルを、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体又はその断片と接触させるステップ及び結合している単離又は精製された抗体又はその断片の存在を検出するステップを含む、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2013/050806									
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 16/12</i> (2006.01), <i>A61K 39/40</i> (2006.01), <i>A61K 47/48</i> (2006.01), <i>A61P 31/04</i> (2006.01), <i>C07K 19/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/569</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C07K 16/12</i> (2006.01), <i>A61K 39/40</i> (2006.01), <i>A61K 47/48</i> (2006.01), <i>A61P 31/04</i> (2006.01), <i>C07K 19/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/569</i> (2006.01)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Total Patent, Scopus, GenomeQuest. Keywords: Campylobacter, jejuni, monoclonal antibody. Authors: Arbabi Ghahroudi, Riazi , Szymanski, Hussack, Tanha, Mackenzie</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>YOUNG, T. K. et al., "Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis", <i>Nature Reviews Microbiology</i>, September 2007 (09-2007), Vol. 5, No. 9, pp. 665-679, ISSN: 1740-1534. The whole document.</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US6551599 B2 (MANDRELL, S. et al.), 22 April 2003 (22-04-2003). The whole document.</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	YOUNG, T. K. et al., "Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis", <i>Nature Reviews Microbiology</i> , September 2007 (09-2007), Vol. 5, No. 9, pp. 665-679, ISSN: 1740-1534. The whole document.		A	US6551599 B2 (MANDRELL, S. et al.), 22 April 2003 (22-04-2003). The whole document.	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	YOUNG, T. K. et al., "Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis", <i>Nature Reviews Microbiology</i> , September 2007 (09-2007), Vol. 5, No. 9, pp. 665-679, ISSN: 1740-1534. The whole document.										
A	US6551599 B2 (MANDRELL, S. et al.), 22 April 2003 (22-04-2003). The whole document.										
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<p>* Special categories of cited documents :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>							
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>										
<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p>2 December 2013 (02-12-2013)</p>		<p>Date of mailing of the international search report</p> <p>21 January 2014 (21-01-2014)</p>									
<p>Name and mailing address of the ISA/CA</p> <p>Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Ali Abdallah (819) 994-4253</p>									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2013/050806
--

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 filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2013/050806**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. Claim Nos. : 18-23 and 26-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Although claims 18-23 and 26-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, which this authority is not required to search in view of Rule 39.1 of the PCT. This authority has nevertheless conducted a search based on the alleged therapeutic effects of the use the antibody defined therein.
2. Claim 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. Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 :

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 claim 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 claim Nos. :

- 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
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/CA2013/050806

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US6551599B2	22 April 2003 (22-04-2003)	AU3458299A US6395879B1 US2002106383A1 WO9949889A1	18 October 1999 (18-10-1999) 28 May 2002 (28-05-2002) 08 August 2002 (08-08-2002) 07 October 1999 (07-10-1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/569	F

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 アルバビ グハーラウディ, メディー
カナダ, オンタリオ州 ケー1ダブリュー 1ケー1, オタワ, デ グランド チャンプス
2 2 4 2

(72)発明者 リアジ, アリ
カナダ, オンタリオ州 エル3ティー 1ケー6, ソーンヒル, メドービュー アベニュー
5 7

(72)発明者 スジマンスキー, クリスティン, エム.
カナダ, アルバータ州 ティー6アール 0エイチ5, エドモントン, マクネイル ベイ
3 9 0 5

(72)発明者 フサック, グレグ
カナダ, オンタリオ州 ケー1エヌ 5イー1, オタワ, ブリエール ストリート 7 1
6 0

(72)発明者 タンハ, ジャムシード
カナダ, オンタリオ州 ケー4エー 4ティー2, オタワ, バリン ストリート 2 1 6 2

(72)発明者 マッケンジー, ロジャー
カナダ, オンタリオ州 ケー1ジェイ 6ケー9, オタワ, ハメリン クレセント 2 1 9
5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA07 AA10 AA11 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20
DA06 DA12 EA04 GA11 HA01 HA09
4C085 AA13 AA14 BB41 BB43 BB44 CC22 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA01 EA05 EA20 EA50
FA74 GA22

专利名称(译)	抗体Campylobacter Jejuni (CAMPYLOBACTERJEJUNI) 抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2015535224A	公开(公告)日	2015-12-10
申请号	JP2015538223	申请日	2013-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究理事会		
[标]发明人	アルバビグハーラウディメディー リアジアリ スジマンスキークリスティンエム フサックグレッグ タンハジャムシード マッケンジーロジャー		
发明人	アルバビグハーラウディ, メディー リアジ, アリ スジマンスキー, クリスティン, エム. フサック, グレッグ タンハ, ジャムシード マッケンジー, ロジャー		
IPC分类号	C07K16/12 C12N15/09 A61K39/395 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/04 C07K16/121 C07K2317/22 C07K2317/35 C07K2317/569 C07K2317/92 G01N33/56922 G01N2333/205 A61K39/40 A61K45/06 C07K2317/565 G01N2469/10		
FI分类号	C07K16/12.ZNA C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/04.171 A61P31/04 G01N33/53.D G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA05 4B024/AA07 4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024 /CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA09 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085 /CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA01 4H045/EA05 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	61/718062 2012-10-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

空肠弯曲菌是人类细菌性食源性疾病的主要原因，其范围从急性腹泻到神经系统疾病。已经描述了对空肠弯曲杆菌特异的分离的或纯化的抗体或其片段。抗体或其片段与鞭毛蛋白结合并降低空肠弯曲杆菌的运动性。该抗体或其片段源自用空肠弯曲杆菌鞭毛蛋白免疫的骆驼科重链IgG可变结构域片段 (V^hH)。已经描述了抗体或其片段的多价形式以及噬菌体形式。还描述了减少在动物或动物环境中空肠弯曲杆菌的存在的方法，用于治疗空肠弯曲杆菌感染的方法和制剂以及检测空肠弯曲杆菌的方法。[选择图]无

(21) 出願番号	特願2015-538223 (P2015-538223)	(71) 出願人	595006223 ナショナル リサーチ カウンシル オブ カナダ
(86) (22) 出願日	平成25年10月24日 (2013.10.24)		カナダ国, オンタリオ ケー1ユー Oア ール6, オタワ, モントリオール ロード 1200
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月22日 (2015.6.22)		
(86) 国際出願番号	PCT/CA2013/050806		
(87) 国際公開番号	WO2014/063253		
(87) 国際公開日	平成26年5月1日 (2014.5.1)		
(31) 優先権主張番号	61/718,062	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(32) 優先日	平成24年10月24日 (2012.10.24)	(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
		(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘

最終頁に続く