

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504586
(P2017-504586A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C076
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 R	4C084
A61K 9/08 (2006.01)	A61K 9/08	4C085
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-538593 (P2016-538593)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月15日 (2014.12.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月28日 (2016.7.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/070337
 (87) 国際公開番号 W02015/089502
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
 (31) 優先権主張番号 61/915, 953
 (32) 優先日 平成25年12月13日 (2013.12.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507245021
 ユニバーシティー オブ ロチェスター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1464
 2, ロチェスター, エルムウッド ア
 ベニュー 601, ボックス ユーアー
 ルブイ
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブドウ球菌感染に対する受動免疫

(57) 【要約】

ブドウ球菌属種自己溶解素N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼの触媒ドメイン及び/または細胞壁結合ドメインに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその結合部分、並びにそれを含有する医薬組成物を開示する。ハイブリドーマを含む、モノクローナル抗体を発現する細胞株もまた開示する。整形外科用インプラント、移植片、または医療装置の取り付けのためのモノクローナル抗体の使用法、ブドウ球菌感染の治療または予防方法、及び骨髄炎の治療方法が記載され、サンプル中のブドウ球菌を検出するための診察方法も記載される。

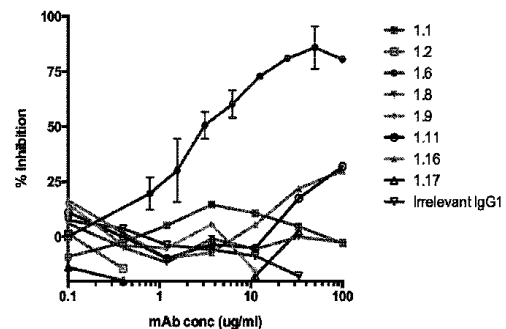


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブドウ球菌属種 (*Staphylococcus spp.*) 自己溶解素コンセンサス N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (Amd) の触媒ドメイン及び/または細胞壁結合ドメインに特異的に結合する、モノクローナル抗体またはその結合部分。

【請求項 2】

ブドウ球菌株の *in vivo* 増殖並びに/または金属、プラスチック及び有機体表面でのバイオフィルムの確立を阻害する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

【請求項 3】

前記ブドウ球菌株は黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、腐性ブドウ球菌 (*S. saprophyticus*)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (*S. haemolyticus*)、スタフィロコッカス・カブラエ (*S. caprae*) またはスタフィロコッカス・シミアン (*S. simian*) を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

10

【請求項 4】

前記ブドウ球菌株はメチシリン耐性またはバンコマイシン耐性である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

【請求項 5】

Amd の触媒ドメインのエピトープに結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

20

【請求項 6】

Amd の R 1 または R 2 細胞壁結合ドメイン内で全体的にまたは部分的にエピトープに結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

【請求項 7】

Amd の触媒ドメインまたは細胞壁結合ドメインに、 10^{-8} M を超える親和性で結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

【請求項 8】

Amd の触媒ドメインまたは細胞壁結合ドメインに、約 1 ~ 約 6 nM の K_D で結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその Amd 結合部分。

30

【請求項 9】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む V_H ドメインを含み：

SEQ ID NO: 5 (Amd1.2):

PELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTS
DKSSTTAYMELSSLTSEDXAVYYCARLDGYDCFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 7 (Amd1.1):

QQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGITNYDPKFQGRA
TITADTSSNIAYLQLTSLTSEGTAIVYYCARGGYLSPYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 9 (Amd1.5):

QQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIQDYLLHWMKQRPEQGLEWIGWIDPENDNTVYDPKFRDRA
SLTADTFSTAYLQLSGLTSEDVAVYYCARRDGIITATRAMDYWGQGTSVTVSS

10

SEQ ID NO:11 (Amd1.6):

QSGTVLARPGTSVKMSCKASGYSFTNYWMHWVRQRPGQGLEWIGSIYPGNSDTTYNQKFKDKAK
LTAVTSASTAYMELSSLTNEEDSAVYYCTGDDYSRFSYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO: 13 (Amd1.7):

QQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHVVKQSHGKSLEWIGYIFPYNGD TDYNQKFKNKA
TLTVDNSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCSRWGSYFDYWGQGTTLTVSS

20

SEQ ID NO: 15 (Amd1.9):

VESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPKKSLEWVASITSGGSAYYPDSVKGRFT
ISRDNARNILNLQMSLRS EDTAMYYCARDDGYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 17 (Amd1.11):

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTG EPTYADDF
KGRFAFSLETSASTAYLLINNLKNE DTATYFCARRDGYFDAMDYWGQGTSVTVSS

30

SEQ ID NO: 19 (Amd1.12):

QQSGAELVRPGTSVKV SCKTSGYAFTNYLIEWVNQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKAKA
TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR SERGYGNYGAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 21 (Amd1.13):

QQPGPELVKPGASLKI SCKASGYSFSSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPVDGDTNYNGKFKGKA
TLTTDKSSSTAYMQLSSLT SVDSAVYFCARTGPYAMDYWGRGTSVTVSS

40

SEQ ID NO: 23 (Amd1.16):

GAELVRPGSSVKISCKASGYTFSTYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLT
ADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARSMVTNYYFAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 25 (Amd1.17):

GGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKKLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSLKS EDTAMYYCV RGLLGFDYWGQGTTLTVSS

50

、かつ/または、以下のアミノ酸配列の1つを含むV_Lドメインを含む：

SEQ ID NO: 33 (Amd1.1):

ENVLTQSPA IMSASLGEKVTMTCRASSSVNYMFWFQQKSDASPKLWIYYT SNLAPGV PARFSGS
GSGNSYSLT ISSMEGEDAATYYCQEFTSFPYTFG

SEQ ID NO: 35 (Amd1.2):

DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPQYTF

10

SEQ ID NO: 37 (Amd1.6):

SIVMTQTPKFLLLVSAGDRLTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYT SNRYTGVPDRFTG
SGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQDYNSPWTFGGGTK

SEQ ID NO: 39 (Amd1.7):

SIVMTQTPKFLLLVSAGDRLTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYT SNRYTGVPDRFTG
SGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQDYNSPWTFGGGTK

20

SEQ ID NO: 41 (Amd1.8):

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQRSHESPRLLIKYVSQSIGIPSRFSG
SGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFG

SEQ ID NO: 43 (Amd1.9):

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTSENI FSNFAWYQQQPGKSPQLLVYGATNLADGVPSRFSG
SGSGTQYSLKITSLQSEDFGSYYCQHFWSWPWF

SEQ ID NO: 45 (Amd1.10):

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLT SNLASGV PARFSGS
GSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPYTFG

30

SEQ ID NO: 47 (Amd1.11):

DILLTQSPAILSVPGERV SFSCRASQSIGT SIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPALTFG

SEQ ID NO: 49 (Amd1.12):

DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTFAEGVRSRFSG
SGSGTQFSLQITSLQPEDFGSYQCQHHYGSPTYF

SEQ ID NO: 51 (Amd1.13):

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLISWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFG

SEQ ID NO: 53 (Amd1.15):

DIAMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVRDRFXG
SRCGTDFTFPISSVQGEDLAVYYCQQHYSIHSRS

SEQ ID NO: 55 (Amd1.17):

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVPTFGGGT

、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 10】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む V_H ドメインを含み：

SEQ ID NO: 27 (Amd 2.1):

GFVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEMRLEWVASISSGGSTYYPDSVMGRF
TISRDNARNILNLQMSLRS EDTAMYYCARVGLYYDYYSMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 29 (Amd 2.2):

ESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWRQSHGKSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKS
KATLTVDNSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREDDGYGYFDYWGQGTTLTGSS

SEQ ID NO: 31 (Amd 2.4):

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPYADDF
KGRFAFSLETSASAAYLQINNLKNE DTATYFCARDYDGYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

、かつ/または、以下のアミノ酸配列の 1 つを含む V_L ドメインを含む：

SEQ ID NO: 57 (Amd 2.1):

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKMLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNDYSYPVTFGAGTKLELK

10

20

30

40

SEQ ID NO: 59 (Amd 2.2):

EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKPKWIYEISKLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISSEAEADAIIYYCQQWNYPLITFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 61 (Amd 2.4):

ENALTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSMSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGS
GSGNSYSLTISSEAEAEVATYYCFQGGSGFPVHVRGDDQVGNKT

SEQ ID NO: 63 (Amd 2.5):

DIQMTQSPASLSASVGETITITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPHLLVHFARSLADGVPSRFSG
SGSGTQYSLNINSLQPEDEFGIYYCQHFYTPYTFGGGKLEIK

、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 1】

部分的にヒト化されているか、または完全にヒトのものである、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 2】

前記ヒト化モノクローナル抗体は I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 クラスである、請求項 1 1 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の A m d 結合部分。

【請求項 1 4】

F a b 断片、F v 断片、一本鎖抗体、V_H ドメイン、または V_L ドメインを含む、請求項 1 3 に記載の A m d 結合部分。

【請求項 1 5】

ブドウ球菌属種 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (A m d) に特異的に結合し、かつ A m d 1 . 1、A m d 1 . 2、A m d 1 . 5、A m d 1 . 6、A m d 1 . 7、A m d 1 . 8、A m d 1 . 9、A m d 1 . 1 0、A m d 1 . 1 1、A m d 1 . 1 2、A m d 1 . 1 3、A m d 1 . 1 4、A m d 1 . 1 5、A m d 1 . 1 6、A m d 1 . 1 7、A m d 2 . 1、A m d 2 . 2、A m d 2 . 4、及び A m d 2 . 5 から選択される抗体と交差競合する、モノクローナル抗体またはその結合部分。

【請求項 1 6】

A m d に結合し、かつ A m d の触媒活性を阻害する、請求項 1 5 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 7】

A m d に特異的に結合し、かつ抗体 A m d 1 . 6 と交差競合する、請求項 1 5 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 8】

A m d に特異的に結合し、かつ抗体 A m d 2 . 1 と交差競合する、請求項 1 5 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 1 9】

部分的にヒト化されているか、または完全にヒトのものである、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 0】

請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の A m d 結合部分。

【請求項 2 1】

ブドウ球菌属種 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (A m d) に特異的

10

20

30

40

50

に結合し、かつ A m d 触媒ドメインに結合する抗体と交差競合する、モノクローナル抗体またはその結合部分。

【請求項 2 2】

A m d に特異的に結合し、かつ A m d の触媒活性を阻害する、請求項 2 1 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 3】

A m d に特異的に結合し、かつ A m d 1 . 6、A m d 1 . 1 0、A m d 1 . 1 3、A m d 1 . 1 6、A m d 1 . 1 7、A m d 2 . 1、及び A m d 2 . 2 から選択される抗体と交差競合する、請求項 2 1 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 4】

部分的にヒト化されているか、または完全にヒトのものである、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 5】

請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の A m d 結合部分。

【請求項 2 6】

A m d 1 . 1、A m d 1 . 2、A m d 1 . 5、A m d 1 . 6、A m d 1 . 7、A m d 1 . 8、A m d 1 . 9、A m d 1 . 1 0、A m d 1 . 1 1、A m d 1 . 1 2、A m d 1 . 1 3、A m d 1 . 1 4、A m d 1 . 1 5、A m d 1 . 1 6、A m d 1 . 1 7、A m d 2 . 1、A m d 2 . 2、A m d 2 . 4、及び A m d 2 . 5 から選択される抗体が結合すると、同一の、ブドウ球菌属種 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (A m d) のエピトープに結合する、モノクローナル抗体またはその結合部分。

【請求項 2 7】

A m d に結合し、かつ A m d の触媒活性を阻害する、請求項 2 6 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 8】

抗体 A m d 1 . 6 と同一のエピトープに結合する、請求項 2 6 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 2 9】

抗体 A m d 2 . 1 と同一のエピトープに結合する、請求項 2 6 に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 3 0】

部分的にヒト化されているか、または完全にヒトのものである、請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその A m d 結合部分。

【請求項 3 1】

請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の A m d 結合部分。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 1 2、1 5 ~ 1 9、2 1 ~ 2 4、及び 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または請求項 1 3、1 4、2 0、2 5、及び 3 1 のいずれか一項に記載の A m d 結合部分を発現する、細胞株。

【請求項 3 3】

ハイブリドーマである、請求項 3 2 に記載の細胞株。

【請求項 3 4】

組み換え細胞株である、請求項 3 2 に記載の細胞株。

【請求項 3 5】

担体、並びに請求項 1 ~ 1 2、1 5 ~ 1 9、2 1 ~ 2 4、及び 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のモノクローナル抗体または請求項 1 3、1 4、2 0、2 5、及び 3 1 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の A m d 結合部分を含む、医薬組成物。

【請求項 3 6】

前記担体は水溶液である、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

10

20

30

40

50

抗生物質製剤または免疫療法薬を更に含む、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

前記抗生物質製剤はバンコマイシン、トブラマイシン、セファゾリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、ゲンタマイシン、フシジン酸、ミノサイクリン、コトリモキサゾール、クリンダマイシン、リネゾリド、テディゾリド、キヌプリスチン - ダルホプリスチン、ダプトマイシン、チゲサイクリン、ダルババンシン、テラバンシン、オリタバンシン、セフトピブロール、セフトアロリン、イクラプリム、及びカルバペネム C S - 023 / R O - 4908463 からなる群から選択される、請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

前記免疫療法薬はテフィバズマブまたはパギバキシマブである、請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

前記免疫療法薬は、ブドウ球菌グルコサミニダーゼ (Gmd) に特異的に結合し、かつブドウ球菌株の *in vivo* 増殖を阻害する第 2 のモノクローナル抗体またはその結合部分である、請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

前記第 2 のモノクローナル抗体は 1C11、1E12、2D11、3A8、3H6、もしくは 4A12、これらのヒト化変異体、またはこれらの Gmd 結合部分である、請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

前記第 2 のモノクローナル抗体の前記ヒト化変異体は IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 クラスである、請求項 41 に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

前記第 2 のモノクローナル抗体の前記 Gmd 結合部分は Fab 断片、Fv 断片、一本鎖抗体、V_H ドメイン、または V_L ドメインを含む、請求項 41 に記載の医薬組成物。

【請求項 44】

前記モノクローナル抗体は Amd1.6、または Amd1.6 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体であり、かつ前記第 2 のモノクローナル抗体は 1C11、または 1C11 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体である、請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 45】

整形外科用インプラント、移植片または医療装置を必要とする患者に、請求項 1 ~ 12、15 ~ 19、21 ~ 24、及び 26 ~ 30 のいずれか一項に記載の有効量のモノクローナル抗体、請求項 13、14、20、25、及び 31 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の Amd 結合部分、または請求項 35 ~ 44 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与する段階；

前記患者に前記整形外科用インプラント、移植片または医療装置を導入する段階を含む、患者への整形外科用インプラント、移植片または医療装置の導入方法。

【請求項 46】

前記導入する段階の前に前記投与する段階を繰り返すことを更に含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記導入する段階の後に前記投与する段階を繰り返すことを更に含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

前記投与する段階を全身的に実施する、請求項 45 ~ 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記投与する段階を移植部位に直接実施する、請求項 45 ~ 47 のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 5 0】

前記整形外科用インプラントを導入する、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記整形外科用インプラントは人工関節、移植片または合成インプラントである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記人工関節は全体的または部分的な人工膝関節、人工股関節、手指義手、人工肘関節、人工肩関節、人工顎関節、または人工足関節である、請求項 5 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記移植片または合成インプラントは、人工血管、心臓弁インプラント、人工椎間板、半月板インプラント、または合成もしくは同種異系の前十字靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯、後十字靭帯、アキレス腱、もしくは回旋靭帯である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記移植片または医療装置が導入される、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記医療装置は心臓ペースメーカー、髄液シャント、透析カテーテル、または人工心臓弁である、請求項 5 4 に記載の方法。

20

【請求項 5 6】

前記患者に第 2 の治療薬を投与することを更に含み、該第 2 の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬である、請求項 4 5 ~ 5 0 または 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記抗生物質製剤は、バンコマイシン、トブラマイシン、セファゾリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、ゲンタマイシン、フシジン酸、ミノサイクリン、コトリモキサゾール、クリンダマイシン、リネゾリド、トレゾリド、キヌプリスチン・ダルホプリスチン、ダプトマイシン、チゲサイクリン、ダルババンシン、テラバンシン、オリタバンシン、セフトピプロール、セフトアロリン、イクラプリム、及びカルバペネム C S - 0 2 3 / R O - 4 9 0 8 4 6 3 からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

前記免疫療法薬はテフィバズマブまたはバギバキシマブである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記免疫療法薬は、ブドウ球菌グルコサミニダーゼ (G m d) に特異的に結合し、かつブドウ球菌株の *in vivo* 増殖を阻害する第 2 のモノクローナル抗体またはその結合部分である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記第 2 のモノクローナル抗体は 1 C 1 1、1 E 1 2、2 D 1 1、3 A 8、3 H 6、もしくは 4 A 1 2、これらのヒト化変異体、またはこれらの G m d 結合部分である、請求項 5 9 に記載の方法。

40

【請求項 6 1】

前記モノクローナル抗体は A m d 1 . 6、または A m d 1 . 6 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体であり、かつ前記第 2 のモノクローナル抗体は 1 C 1 1、または 1 C 1 1 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記第 2 のモノクローナル抗体のヒト化変異体は I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 クラスである、請求項 5 9 に記載の方法。

50

【請求項 6 3】

前記第 2 のモノクローナル抗体の前記 G m d 結合部分は F a b 断片、F v 断片、一本鎖抗体、V_Hドメイン、または V_Lドメインを含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 4】

感染した人工関節を患者から取り除き、かつ前記整形外科用インプラントを患者に導入する段階の前に、患者の感染を治療する段階を更に含み、前記整形外科用インプラントは再関節全置換術用の人工関節である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記治療する段階は、
有効量の抗生物質製剤を投与すること、
前記投与する段階、または
これらの組み合わせ
を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

前記再関節全置換術の最中の感染または再感染を予防するのに効果的である、請求項 6 4 または 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記患者はヒトである、請求項 4 5 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記患者は非ヒト哺乳動物である、請求項 4 5 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6 9】

ブドウ球菌感染に罹りやすい、またはブドウ球菌感染を患っている患者に、請求項 1 ~ 1 2、1 5 ~ 1 9、2 1 ~ 2 4、及び 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の有効量のモノクローナル抗体、請求項 1 3、1 4、2 0、2 5、及び 3 1 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の A m d 結合部分、請求項 3 5 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与する段階を含む、ブドウ球菌感染の治療または予防方法。

【請求項 7 0】

前記投与する段階を繰り返すことを更に含み、請求項 6 9 に記載の方法。

30

【請求項 7 1】

前記投与する段階を全身的に実施する、請求項 6 9 または 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記投与する段階をブドウ球菌感染部位に直接実施する、請求項 6 9 または 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記ブドウ球菌感染部位は、神経系、皮膚、筋肉、心臓、気道、胃腸、眼、腎臓及び尿路、または骨及び関節感染を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記患者に第 2 の治療薬を投与することを更に含み、該第 2 の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬である、請求項 6 9 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 5】

前記抗生物質製剤は、バンコマイシン、トブラマイシン、セファゾリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、ゲンタマイシン、フシジン酸、ミノサイクリン、コトリモキサゾール、クリンダマイシン、リネゾリド、トレゾリド、キヌプリスチン - ダルホプリスチン、ダプトマイシン、チゲサイクリン、ダルババンシン、テラバンシン、オリタバンシン、セフトピプロール、セフトアロリン、イクラプリム、及びカルバペネム C S - 0 2 3 / R O - 4 9 0 8 4 6 3 からなる群から選択される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

50

前記免疫療法薬はテフィバズマブまたはパギバキシマブである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記免疫療法薬は、ブドウ球菌グルコサミニダーゼ (Gmd) に特異的に結合し、かつ/またはブドウ球菌株の *in vivo* 増殖を阻害する第 2 のモノクローナル抗体もしくはその結合部分である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記第 2 のモノクローナル抗体は 1 C 1 1、1 E 1 2、2 D 1 1、3 A 8、3 H 6、もしくは 4 A 1 2、これらのヒト化変異体、またはこれらの Gmd 結合部分である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記モノクローナル抗体は Amd 1 . 6、または Amd 1 . 6 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体であり、かつ前記第 2 のモノクローナル抗体は 1 C 1 1、または 1 C 1 1 と同一の変域ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記第 2 のモノクローナル抗体のヒト化変異体は I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 クラスである、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記第 2 のモノクローナル抗体の前記 Gmd 結合部分は Fab 断片、Fv 断片、一本鎖抗体、V_H ドメイン、または V_L ドメインを含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記患者はヒトである、請求項 6 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記患者は非ヒト哺乳動物である、請求項 6 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記ブドウ球菌株は黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス、腐性ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・カブラエまたはスタフィロコッカス・シミアンである、請求項 6 9 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記投与する段階は、感染速度、感染の重症度、感染期間、もしくはこれらの任意の組み合わせを低減する；膿瘍の総数を減少させるもしくは全て除去する；かつ/または無菌性膿瘍の数を増加させるのに有効である、請求項 6 9 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

ブドウ球菌の骨または関節感染を患う患者に、請求項 1 ~ 1 2、1 5 ~ 1 9、2 1 ~ 2 4、及び 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の有効量のモノクローナル抗体、請求項 1 3、1 4、2 0、2 5、及び 3 1 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の Amd 結合部分、請求項 3 5 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与する段階を含む、骨髄炎の治療方法。

【請求項 8 7】

前記投与する段階を繰り返すことを更に含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記投与する段階を全身的に実施する、請求項 8 6 または 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記投与する段階を、黄色ブドウ球菌の骨または関節感染の部位に直接実施する、請求項 8 6 または 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

10

20

30

40

50

前記患者に第2の治療薬を投与することを更に含み、該第2の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬である、請求項86～89のいずれか一項に記載の方法。

【請求項91】

前記抗生物質製剤は、バンコマイシン、トブラマイシン、セファゾリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、ゲンタマイシン、フシジン酸、ミノサイクリン、コトリモキサゾール、クリンダマイシン、リネゾリド、トレゾリド、キヌプリスチン-ダルホプリスチン、ダプトマイシン、チゲサイクリン、ダルババンシン、テラバンシン、オリタバンシン、セフトピプロール、セフトアロリン、イクラプリム、及びカルバペネムCS-023/RO-4908463からなる群から選択される、請求項90に記載の方法。

10

【請求項92】

前記免疫療法薬はテフィバズマブまたはパギバキシマブである、請求項90に記載の方法。

【請求項93】

前記免疫療法薬は、ブドウ球菌グルコサミニダーゼ(Gmd)に特異的に結合し、かつブドウ球菌株のin vivo増殖を阻害する第2のモノクローナル抗体またはその結合部分である、請求項90に記載の方法。

【請求項94】

前記第2のモノクローナル抗体は1C11、1E12、2D11、3A8、3H6、もしくは4A12、これらのヒト化変異体、またはこれらのGmd結合部分である、請求項93に記載の方法。

20

【請求項95】

前記モノクローナル抗体はAmd1.6、またはAmd1.6と同一の可変ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体であり、かつ前記第2のモノクローナル抗体は1C11、または1C11と同一の可変ドメインもしくは相補性決定領域を含むヒト化変異体である、請求項93に記載の方法。

【請求項96】

前記第2のモノクローナル抗体のヒト化変異体はIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4クラスである、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記第2のモノクローナル抗体の前記Gmd結合部分はFab断片、Fv断片、一本鎖抗体、V_Hドメイン、またはV_Lドメインを含む、請求項95に記載の方法。

30

【請求項98】

前記患者はヒトである、請求項86～97のいずれか一項に記載の方法。

【請求項99】

前記患者は非ヒト哺乳動物である、請求項86～97のいずれか一項に記載の方法。

【請求項100】

前記ブドウ球菌株は黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス、腐性ブドウ球菌、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・カブラエまたはスタフィロコッカス・シミアンである、請求項86～99のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項101】

前記投与する段階は、溶骨性病変を部分的または完全に治癒するのに有効である、請求項86に記載の方法。

【請求項102】

サンプル中でのブドウ球菌の存在の決定方法であって、

サンプルを、請求項1～12、15～19、21～24、及び26～30のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、または請求項13、14、20、25、及び31のいずれか一項に記載のAmd結合部分に曝露する段階；並びに

前記モノクローナル抗体または結合部分と、前記サンプル中に存在するブドウ球菌また

50

はブドウ球菌アミダーゼとの間に免疫複合体が生じるかどうかを検出する段階を含み、前記曝露する段階の後に該免疫複合体が存在することは、サンプル内にブドウ球菌が存在することを示す、前記方法。

【請求項 103】

前記検出する段階はイムノアッセイを使用して実施される、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記イムノアッセイは E L I S A、ラジオイムノアッセイ、ゲル拡散沈降反応アッセイ、免役拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテイン A イムノアッセイ、または免疫電気泳動アッセイである、請求項 103 に記載の方法。

10

【請求項 105】

前記モノクローナル抗体または結合部分は標識を含む、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 106】

前記標識は放射線標識、フルオロフォア、または化学発光標識である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 107】

前記サンプルは液体サンプルまたは組織サンプルである、請求項 102 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本出願は、2013年12月13日に出願された米国特許仮出願番号第61/915,953号の優先権の利益を主張し、その全体が参照として本明細書に組み込まれている。

【0002】

使用分野

ブドウ球菌感染に対する受動免疫のための方法及び組成物、特に骨髓炎の予防または治療のための、及び医療装置、または整形外科用インプラントもしくは移植片の移植により生じる感染に対する受動免疫のための方法及び組成物を本明細書にて開示する。ブドウ球菌属種 (*Staphylococcus spp.*) 自己溶解素 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼの触媒ドメイン及び/または細胞壁結合ドメインに特異的に結合する抗体、並びにそれを含有する医薬組成物を、これらの目的のために使用可能である。

30

【背景技術】

【0003】

背景

1年あたりで約11万2千件の整形外科装置が関係する感染が、一事例あたりおよそ1万5千ドル~7万ドルの入院費で米国内で発生している (Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants," *N. Engl. J. Med.* 350 (14): 1422-9 (2004)) ため、慢性骨髓炎 (OM) に対する新規の介入が大変必要とされている。手術手技の改善及び抗生物質による攻撃的予防は、整形外科用インプラント手術後の感染率を1~5%に下げたが、骨髓炎 (OM) は深刻な問題のままであり、最小侵襲手術により増加しているように見える (Mahomed et al., "Rates and Outcomes of Primary and Revision Total Hip Replacement in the United States Medicare Population," *J. Bone Joint Surg. Am.* 85 (A-1): 27-32 (2003); WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001)。80%が黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に起因する、この再発の深刻さは、臨床分離株の約50%がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) であるという事実により増幅される。この10年間での、人工

40

50

関節及び骨折固定装置に対する感染率はそれぞれ、症例のわずが0.3~11%、及び5~15%である(Lew and Waldvogel, "Osteomyelitis", *Lancet* 364(9431):369-79(2004); Toms et al., "The Management of Peri-Prosthetic Infection in Total Joint Arthroplasty", *J. Bone Joint Surg. Br.* 88(2):149-55(2006))が、この結果は切断手術または死をもたらし得る。更に、待機的関節全置換術(TJR)のための「最小侵襲手術」の普及では、ごく小さな切り口が、多くの場合移植中にプロテーゼが接触する皮膚からの合併症をもたらし、OMの罹患率を劇的に増加させている(Mahomed et al., "Rates and Outcomes of Primary and Revision Total Hip Replacement in the United States Medicare Population", *J. Bone Joint Surg. Am.* 85(A-1):27-32(2003)); WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001)。これらの感染には大変高価な段階式再置換術が必要であり、近年の報告では、成功率は50%の低さであり得ることを示唆している(Azzam et al., "Outcome of a Second Two-stage Reimplantation for Periprosthetic Knee Infection", *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467(7):1706-14(2009))。しかし最大の懸念は、薬剤耐性ブドウ球菌株(最も著しいのはMRSA)の出現であり、この株は、北米で最も死に至らしめる病原体としてHIVを凌駕し、慢性OMの管理を一層困難かつ高価なものにし続け、これらの感染を患う患者を治療するための、新規の治療的介入の大きな需要をもたらしている。特に、TJRの主要患者である免疫力の低下した高齢者に対する、代替となる介入戦略の大きな必要性が存在する。

【0004】

現在、最も著しい、米国内で1年にTJRを罹患する150万人の大部分を占める高齢の「ベビーブーマー」である、ハイリスクの患者をMRSAから保護可能な予防的治療は存在しない。MRSAの罹患率を50~80%低下させるワクチンは、一番複雑な関節置換及び開口亀裂修復手技を低減するだけでなく、ヘルスケアのための負担を同様の量だけ削減する。

【0005】

研究は、慢性OMの80%が黄色ブドウ球菌により引き起こされていることを証明している。これらの細菌は、黄色ブドウ球菌の骨マトリックスへの結合を促進する複数の細胞表面接着分子(Flock et al., "Cloning and Expression of the Gene for a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus aureus*", *EMBO J.* 6(8):2351-7(1987))、骨吸収を刺激可能な毒素(Nair et al., "Surface-Associated Proteins from *Staphylococcus aureus* Demonstrate Potent Bone Resorbing Activity", *J. Bone Miner. Res.* 10(5):726-34(1995))、及び増加した破骨細胞活性を刺激することによる骨の劣化(Marriott et al., "Osteoblasts Express the Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in a Murine Model of *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis and Infected Human Bone Tissue", *Am. J. Pathol.* 164(4):1399-406(2004))を含む、骨の病因となる複数の因子を含有する。進化における律速段階、及び感染の持続は、移植した装置周辺にバイオフィルムを形成する(Costerton et al., "Bacterial Biofilms: A Common

10

20

30

40

50

n Cause of Persistent Infections," *Science* 284(5418):1318-22(1999)。移植直後に、宿主由来の細胞外マトリックス成分(フィブリノゲン、フィブロネクチン、及びコラーゲンを含む)で構成される調節層(conditioning layer)がインプラント表面に形成し、血行性播種に由来する浮遊細菌、または創傷に隣接する皮膚、骨内への細菌の外科的播種、もしくは関係する軟組織骨膜の著しい破壊に伴う傷から等の、感染の近接病巣からの細菌のいずれかの付着を招く(Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants," *N. Engl. J. Med.* 350(14):1422-9(2004))。次の数日間にわたり、コロニー付着の増加、細菌細胞分裂、更なるプランクトン生物の動員、及び細菌細胞外高分子物質(グリコカリックスを形成するもの等)の分泌により、細菌バイオフィルムが生成する。このバイオフィルムは、抗生物質、食細胞及び抗体の活動から細菌を保護する、機能の優れたバリアとしての役割を果たし、宿主のリンパ球機能を損なう(Gray et al., "Effect of Extracellular Slime Substance from *Staphylococcus epidermidis* on the Human Cellular Immune Response," *Lancet* 1(8373):365-7(1984); Johnson et al., "Interference with Granulocyte Function by *Staphylococcus epidermidis* Slime," *Infect. Immun.* 54(1):13-20(1986); Naylor et al., "Antibiotic Resistance of Biomaterial-Adherent Coagulase-Negative and Coagulase-Positive *Staphylococci*," *Clin. Orthop. Relat. Res.* 261:126-33(1990))。

【0006】

近年の別の発見は、黄色ブドウ球菌は、骨マトリックスをコロニー化するだけでなく、*in vitro*で造骨細胞に内在化もまたされるということである(Ellington et al., "Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in *Staphylococcus aureus* Invasion of Normal Osteoblasts," *Infect. Immun.* 69(9):5235-42(2001))、及び *in vivo*で(Reilly et al., "In Vivo Internalization of *Staphylococcus aureus* by Embryonic Chick Osteoblasts," *Bone* 26(1):63-70(2000))。これは、抗体及び抗生物質耐性の更に別の層をもたらず。感染のこの相は、代謝活性が著しく低下した条件下にて発生し、かつ同様に黄色ブドウ球菌の持続性の原因となる、いわゆる小コロニー変異体として現れる場合がある(Proctor et al., "Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*," *Clin. Infect. Dis.* 20(1):95-102(1995))。この時点で、細菌は抗菌性治療に対する表現型耐性もまた発現する場合があります、短期治療の高い失敗率もまた説明している(Chuard et al., "Resistance of *Staphylococcus aureus* Recovered From Infected Foreign Body *In Vivo* to Killing by Antimicrobials," *J. Infect. Dis.* 163(6):1369-73(1991))。これらの大規模な病原性機構のため、OMは、数年間の静止状態の後でさえも再発する傾向があることが有名であり、完全な治療をもたらず見込みがないことが認められている(Mader and Calhoun, "Long-Bone Osteomyelitis Diagnosis and Management," *Hosp. Prac*

t. (Off Ed) 29 (10) : 71 - 6, 9, 83 passim (1994))

【0007】

慢性OMの分野における重要な問題の1つは、慢性OMを制御する因子に関する現在の知見が何故これほど限定的であるのか、ということである。おそらく、細菌の病原性遺伝子を解明するために必要な実験道具は、1世紀以上の間利用が可能であった。この異例の事態に対しては、3つの説が存在する。第1に、骨髄炎の症例の総数は多いが、関節形成再置換術の可能性を除くと、発生率は1~5%であり、厳密な前向き臨床研究を行うには低すぎる。第2に、in vitro培養は細胞外被膜を合成しない生物の生育を素早く選択することがよく知られており、このため、バイオフィルムの生態はin vivoモデルでのみ研究することができる (Costerton et al., "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections," *Science* 284 (5418) : 1318 - 22 (1999))。これは、本領域における「最大の障害」をもたらし、その障害とは、バイオフィルム形成の前に、細菌の初期のプランクトン様成長段階を評価可能な定量的動物モデルが存在しないことである。現在まで、慢性OMの病因に関する知見の大部分は、動物モデルから得られており (Norden, "Lessons Learned from Animal Models of Osteomyelitis," *Rev. Infect. Dis.* 10 (1) : 103 - 10 (1988))、これらのモデルとしては、ニワトリ (Daum et al., "A Model of Staphylococcus aureus Bacteremia, Septic Arthritis, and Osteomyelitis in Chickens," *J. Orthop. Res.* 8 (6) : 804 - 13 (1990))、ラット (Rissing et al., "Model of Experimental Chronic Osteomyelitis in Rats," *Infect. Immun.* 47 (3) : 581 - 6 (1985))、モルモット (Passl et al., "A Model of Experimental Post-Traumatic Osteomyelitis in Guinea Pigs," *J. Trauma* 24 (4) : 323 - 6 (1984))、ウサギ (Worlock et al., "An Experimental Model of Post-Traumatic Osteomyelitis in Rabbits," *Br. J. Exp. Pathol.* 69 (2) : 235 - 44 (1988))、イヌ (Varshney et al., "Experimental Model of Staphylococcal Osteomyelitis in Dogs," *Indian J. Exp. Biol.* 27 (9) : 816 - 9 (1989))、ヒツジ (Kaarsemaker et al., "New Model for Chronic Osteomyelitis With Staphylococcus aureus in Sheep," *Clin. Orthop. Relat. Res.* 339 : 246 - 52 (1997))、及び最近ではマウス (Marriott et al., "Osteoblasts Express the Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in a Murine Model of Staphylococcus aureus Osteomyelitis and Infected Human Bone Tissue," *Am. J. Pathol.* 164 (4) : 1399 - 406 (2004)) が開発されてきた。これらのモデルは、in vitroアッセイにより特定された細菌付着因子の重要性を確認するために使用されてきた (Chuard et al., "Susceptibility of Staphylococcus aureus Growing on Fibronectin-Coated Surfaces to Bactericidal Antibiotics," *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (4) : 625 - 32 (1993); Buxton et al., "Binding of a Staphylococcus aureus Bone

10

20

30

40

50

Pathogen to Type I Collagen," *Microb. Pathog.* 8(6):441-8(1990); Switalski et al., "A Collagen Receptor on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Patients With Septic Arthritis Mediates Adhesion to Cartilage," *Mol. Microbiol.* 7(1):99-107(1993))が、これらは *in vivo* 増殖、細菌負荷、または骨溶解に関する、成果となる測定値を有しない。そのため、これらは薬剤効果、細菌の突然変異株、及び宿主因子の役割を評価するために、トランスジェニックマウスと共に効率的に使用することができない。

【0008】

150年にわたる研究に基づき、ブドウ球菌の病因を説明するための明確なパラダイムが現れている。このモデルはOMにもまた適用される。感染の初期段階は、単細胞細菌が体に侵入する際に生じる。この時点で、微生物が環境変化に応答し、先天性免疫を打ち負かすことを助け、宿主に付着する付着因子受容体を提供する病原性遺伝子を発現するはずである。細菌はまた、付着及び表面コロニー形成が生じる壊死組織またはインプラント等の異物の宿主付着標的の確率論的可用性に依存する。これらの工程が上手く完了すると、バイオフィルムの指数増殖期に繋がり、この段階は、栄養素の枯渇及び/または適応免疫の進行の時点で終了する。指数増殖期に続き、細菌は、遺伝子発現でのクオラムセンシング由来の変化により、バイオフィルムの一部が浮遊細胞またはバイオフィルム断片の可動セグメントとして分離するまで、多層バイオフィルム内での成長休止条件下にて残存する (Yarwood, et al., "Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms," *J. Bact.* 186(6):1838-1850(2004))。しかしこの時点で、感染は慢性的なものであり、薬剤または宿主免疫により根絶することはできない。したがって、本領域での焦点は、MSCRAMM(微生物表面成分認識付着性マトリックス分子)として知られる細菌付着因子の一部類と特異的に相互作用する、細胞表面の細胞外マトリックス成分に当てられてきた (Patti et al., "MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues," *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617(1994))。実のところ、今日まで開発されてきた実質的に全ての抗黄色ブドウ球菌ワクチンは、宿主組織のコロニー形成及び侵入に重要なMSCRAMMに対して向けられてきた。これらのワクチンの目標は、これらの細菌表面の抗原に結合する抗体を作製することにより、宿主組織への細菌の付着を阻害し、感染の長期的なリザーバーとして機能するバイオフィルム形成を抑止することである。細菌表面をオプソニン化することにより、これらの抗体は、食細胞による黄色ブドウ球菌の除去を仲介することも可能になる。残念なことに、黄色ブドウ球菌は多くの付着因子を有し、1種以上の阻害は細菌付着を防止するには十分でない場合がある。更に、食細胞による細菌の除去は、骨などの無血管組織に限定されており、抗体のみでは、黄色ブドウ球菌の *in vivo* でのプランクトン様増殖を有意に低下し、再関節全置換術の間、慢性OMの確立または再感染を予防するための、追加の抗微生物作用機序が必要となる場合がある。

【0009】

PCT出願公開番号WO2011/140114及びWO2013/066876 (Schwarzら)は、ブドウ球菌グルコサミニダーゼに特異的に結合し、ブドウ球菌株の *in vivo* 増殖を阻害する複数のモノクローナル抗体(以下「mAb」)を説明しているが、異なるブドウ球菌標的に特異的に結合し、その機能を阻害する追加のmAbを特定する必要性が残っている。

【0010】

開示する本発明は、当該技術分野におけるこれら及び他の欠点を克服することに関する。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

第1の態様は、ブドウ球菌属種自己溶解素N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼの触媒ドメインまたは細胞壁結合ドメインに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその結合部分に関する。

【 0 0 1 2 】

第2の態様は、本明細書で開示するモノクローナル抗体または結合部分を発現する細胞株に関する。

【 0 0 1 3 】

第3の態様は、担体、及び本明細書で開示した1つ以上のモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体結合部分を含む医薬組成物に関する。

10

【 0 0 1 4 】

第4の態様は、整形外科用インプラントを必要とする患者に、本明細書で開示した第1の態様に係る、有効量のモノクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体結合部分、本明細書で開示した第3の態様に係る医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与すること、及び、患者内に整形外科用インプラント、組織移植片、または医療装置を導入することを伴う、患者内に整形外科用インプラントまたは医療装置を導入する方法に関する。

【 0 0 1 5 】

第5の態様は、ブドウ球菌感染に罹りやすい、またはブドウ球菌感染を患う患者に、本明細書で開示した第1の態様に係る、有効量のモノクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体結合部分、本明細書で開示した第3の態様に係る医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与することを含む、ブドウ球菌感染の治療または予防方法に関する。

20

【 0 0 1 6 】

第6の態様は、ブドウ球菌による骨または関節の感染を患う患者に、本明細書で開示した第1の態様に係る、有効量のモノクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体結合部分、本明細書で開示した第3の態様に係る医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与することを伴う、骨髄炎の治療方法に関する。

【 0 0 1 7 】

第7の態様は、サンプルを、本明細書で開示した第1の態様に係るモノクローナル抗体または結合部分に曝露し、かつ、モノクローナル抗体または結合部分と、サンプル内に存在するブドウ球菌またはブドウ球菌アミダーゼとの間で免疫複合体が形成するかどうかを検出することを伴う、サンプル内でのブドウ球菌の存在の測定方法に関し、前記曝露後の免疫複合体の存在は、サンプル内にブドウ球菌が存在することを示す。

30

【 0 0 1 8 】

ブドウ球菌N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ(以下「Amd」または「アミダーゼ」)は、ブドウ球菌を受動免疫のための魅力的な標的とする複数の性質を有する。アミダーゼは、細菌細胞付着、細胞分裂、分泌、及びグリコカリックス細胞外DNAを産生する自己溶解におけるその仲介によるバイオフィームグリコカリックス形成を含む複数の非常に重要な細胞機能に関与し、黄色ブドウ球菌臨床分離株間では非常に保存され、バンコマイシンの標的であり、細胞周期全体において発現する。更に、Amdは細胞壁上に発現するため、細胞外環境に存在する抗体に接近可能である。

40

【 0 0 1 9 】

モノクローナル抗体及びその結合部分、並びにそれらを含む医薬組成物は、ブドウ球菌株により感染を患うかまたはそのリスクを有する患者における免疫療法に好適な治療薬である。これらのモノクローナル抗体の力は、ブドウ球菌株の増殖、付着、及び免疫回避を妨げる複数の活性に由来する。第1に抗体として、これらは初期のブドウ球菌感染部位における、好中球によるファゴサイトーシスを促進する。第2に、ブドウ球菌の生残及び表面コロニー形成にて複数の役割を有する酵素であるブドウ球菌アミダーゼの阻害剤として、これらの抗体は潜在的に、細胞分裂及びバイオフィーム形成の一方または両方を阻害する。最後に、本明細書で説明するとおり、開示した抗体は、より少ない膿瘍の形成によって明示されるように、ブドウ球菌の拡散を減少させ、膿瘍にマクロファージを侵入さ

50

せ、無菌性膿瘍の形成を促進し、骨の治癒を加速させる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】全てのブドウ球菌属種二機能性自己溶解素タンパク質の代表である、黄色ブドウ球菌二機能性自己溶解素 (A t l A) のドメイン構造の模式図である。二官能性自己溶解素は1276アミノ酸プレプロ酵素として合成される。31アミノ酸シグナルペプチド (a a 1 ~ 31) は分泌中に除去され、167アミノ酸プロペプチド (a a 32 ~ 197) は、自己溶解素が細胞壁内に挿入された際に除去される。細胞分裂後、成熟自己溶解素がアミノ酸775にて切断し、独立したA m d R 1 R 2 (N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ、即ちアミダーゼ (A m d) a a 198 ~ 775)、及びR 3 G m d (

10

エンド - N - アセチルグルコサミニダーゼ (G m d) : a a 776 ~ 1276) となる。

【図2】8つの抗A m dモノクローナル抗体、及び無関係の特異性を有するアイソタイプ適合抗体の、A m d酵素活性の阻害を示すグラフである。組み換えA m d (r A m d) を大腸菌 (表1のH i s - A m d R 1 R 2 - B) 内で作製した。r A m d (1.5 μg / m L) を、黄色ブドウ球菌の細胞壁から調製したペプチドグリカンの混濁した懸濁液と共にP B S中で混合し、その溶解作用を、37 °Cにおける60分間のインキュベーション (60) 後の濁度の低下 (A₄₉₀として測定) により測定した。阻害試験について、r A m dの濃度はA₄₉₀を70%低下するほど十分なものであった。精製した抗A m d m A bを、指示した濃度にてr A m dに添加し、M a b : r A m d混合物によるペプチドグリカンの溶解を測定した。阻害率は、 $100 \times (1 - (60 A_{490} \text{ 阻害剤} / 60 A_{490} \text{ 阻害剤非含有の対照}))$ として計算した。

20

【図3】代表的な抗A m d抗体による黄色ブドウ球菌沈殿の画像である。黄色ブドウ球菌細胞が最もブドウ球菌特異的なm A bの存在下で培養された場合、これらは懸濁液から沈降して大型のクラスターを形成し、比較的透明な上清が得られる。U S A 300 L A C黄色ブドウ球菌はそれぞれ25 μg / m Lにて、指示した抗A m d m A bの存在下で8時間、T S Bの中で37 °Cにて培養した。抗体非含有 (A bなし) のサンプル、及び無関係のアイソタイプ適合抗体 (アイソタイプ対照) は、明らかに細胞ペレットを含まない混濁した上清を有し、m A b A m d 1.1、A m d 1.6、A m d 1.8、A m d 1.11、及びA m d 1.16は透明な上清及び細胞ペレットを有した。透明な上清及び細胞ペレットを作製した他のm A bを以下の表2に一覧にし、これらは懸濁液から黄色ブドウ球菌を沈殿しなかったm A bである。

30

【図4】固定m A b A m d 1.6と可溶性A m dとの生体分子相互作用の分析を示す。m A b A m d 1.6と可溶性A m dとの相互作用の親和性は、B i a c o r e T - 200で測定した。ウサギ抗マウスF c I g GをC M - 5バイオセンサチップの表面に固定して使用し、m A b A m d 1.6を捕捉した後、流動領域からA m dを捕捉した。m A b A m d 1.6により結合されたA m dの質量を、x軸の時間に対するレゾナンスユニット (y軸) に測定した。捕捉 (会合、t = 0 ~ 120秒) と放出 (解離、t = 120 ~ 420秒) 段階が示される。この実験を1.56から25 n Mまで、2倍ずつの増加で変化するA m d濃度で繰り返した。メーカーの取扱説明書に従って測定を行い、B i a c o r e A B製の生体分子相互作用分析 (B I A) 評価ソフトウェア (バージョン3.1) を使用して、動力学データを分析した。

40

【図5】A m d、G m d、及び自己溶解素欠変異株と比較した、i n v i t r oバイオフィーム形成での抗A m d抗体の阻害効果を示すグラフである。カルガリープレートを使用するバイオフィームアッセイを、プレート及び蓋の留め金をヒト血漿で4 °Cにて16時間コーティングし、実施した。次に、25 μg / m Lの抗A m d (A m d 1.6)、抗G m d (1 C 11)、及び抗A m d + 抗G m d (A m d 1.6 + 1 C 11) m A bの組み合わせの存在下または不存在下にて、黄色ブドウ球菌を600 n mのO D 0.05で播種した。37 °Cにて24時間、バイオフィームを形成した。洗浄後、バイオフィームをクリスタルバイオレットで染色し、バイオフィームの含量を分光測光法 (595 n m) によ

50

り測定した。バイオフィーム阻害の陽性対照として、アミダーゼ (amd)、グルコサミニダーゼ (gmd)、または自己溶解素 (atl) に対する UAMS-1 欠失株を同一の OD にて播種した。結果は、野生型 (WT)、未処理の UAMS-1 培養物 (A) の割合として、バイオフィーム形成 (即ちクリスタルバイオレット染色) 量として報告する (*WT と比較して $p < 0.05$)。

【図 6】自己溶解素欠失と比較しての、*in vivo* での、インプラントでのバイオフィーム形成における、抗 Amd モノクローナル抗体、及び抗 Amd と抗 Gmd モノクローナル抗体との組み合わせによる受動免疫効果を示す。6 ~ 10 週齢のメス Balb/c マウス ($n = 3$) を、40 mg/kg の用量の抗 Amd (Amd 1.6)、抗 Amd と抗 Gmd (Amd 1.6 + 1C11) の組み合わせ、または IgG アイソタイプ適合対照 mAb により、腹腔内で受動免疫化した。1 日後、各マウスを USA300 LAC CA-MRSA 株またはその同質遺伝子的な atl 変異体で汚染された下腿用ステンレス鋼ピンで感染させた。ピンを所定位置に残して、バイオフィームがベースとなる感染を成熟させた。感染後 14 日の時点で、ピンを取り外し走査型電子顕微鏡 (SEM) により調査した。感染したインプラント (ピン) におけるバイオフィーム形成の程度を示す代表的な顕微鏡写真を示す: IgG 対照 (図 6 A); 抗 Amd (Amd 1.6、図 6 B); 抗 Amd + 抗 Gmd (Amd 1.6 + 1C11、図 6 C); 及び atl 変異体で感染 (図 6 D)。バイオフィームで覆われた対象領域 (平板状ピンの 0.5 x 2.0 mm 面) の割合を NIH ソフトウェア (Image J) で定量化し、図 6 E に示す (* $p < 0.05$)。

【図 7】骨損傷の量の減少における、抗 Amd、抗 Gmd、及び抗 Amd と抗 Gmd モノクローナル抗体の組み合わせを用いた受動免疫の効果を示す。メス Balb/c マウス ($n = 5$) を、40 mg/kg の用量で、上述したように、PBS または抗 Gmd (1C11)、抗 Amd (1.6)、もしくは組み合わせ (1C11 + 1.6) により腹腔内で受動免疫化した (Varrone et al., "Passive Immunization With Anti-Glucosaminidase Monoclonal Antibodies Protects Mice From Implant-Associated Osteomyelitis by Mediating Opsonophagocytosis of Staphylococcus aureus Megaclusters," J Orthop Res 32(10):1389-96 (2014)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。24 時間後、全てのマウスが USA300 LAC::lux で汚染された下腿用ピンを受け、生物発光像を 3 日目に実施して感染を確認した (図 7 A)。マウスは感染後 14 日で安楽死させ、脛骨をマイクロ CT 分析のために回収した。感染した脛骨の代表的な 3D レンダリングを内側及び外側から示し (図 7 B)、脛骨の各群 (B) における骨溶解の相対レベルを表す。各脛骨の骨溶解容積を、式: 骨溶解容積 (mm^3) = [内側の骨溶解領域 + 外側の骨溶解領域 (mm^2) x 皮質厚 (mm)] (*PBS に対して $p < 0.05$) を使用して定量化した。結果を図 7 C にグラフで示す。

【図 8】Amd 1.6 による受動免疫の効果を示し、髄管内でのより少数の膿瘍形成によって明示されるように、細菌拡散の有意な減少を示している。6 ~ 10 週齢のメス Balb/c マウス ($n = 5$) を、40 mg/kg の合計用量の PBS (陰性対照)、抗 Gmd mAb 1C11、抗 Amd mAb Amd 1.6、または組み合わせ (1C11 + Amd 1.6) で腹腔内で免疫化した。24 時間後、右側脛骨を通して、各マウスに生物発光 CA-MRSA 株である USA300 LAC::lux で汚染したピンを挿入した。得られた感染を 14 日間進行させ、この時に動物を犠牲にし、感染した脛骨を組織学的分析のために回収、固定、脱灰及び切断した。オレンジ G / アルシアンブルー (ABG/OH) で染色した代表的な感染脛骨を、(図 8 A) 未治療の対照及び (図 8 B) 抗 Gmd 1C11 と抗 Amd Amd 1.6 との組み合わせで治療したマウスに関して示す。マウスの各群で観察した膿瘍の数を図 8 C に示す (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

【図 9】ブドウ球菌膿瘍コミュニティ (SAC) の形成を予防して無菌性膿瘍をもたらす、抗 Amd、抗 Gmd、及び抗 Amd と抗 Gmd モノクローナル抗体との組み合わせによ

10

20

30

40

50

る、受動免疫の効果を示す。マウス ($n = 5$) を、 $40 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量にて PBS (陰性対照) または mAb 1C11、Amd1.6 もしくは組み合わせ ($1C11 + Amd1.6$) で腹腔内で免疫化した。24 時間後、全てのマウスは、生物発光 CA-MRSA 株である USA300 LAC:lux で汚染された下腿用ピンを受けた。感染後 14 日目の代表的な感染脛骨を、細菌を表すためにグラム染色した組織学的切断面として示す。PBS 処理した脛骨は、典型的な SAC の病状を示し、以下の mAb: 1C11 (図 9C~D)、Amd1.6 (図 9E~F)、及び $1C11 + Amd1.6$ の組み合わせ (図 9G~H) で治療したマウスでは存在しない膿瘍領域 (図 9A~B) 内に、エオシン好性仮性被膜により包囲された細菌の中心病巣を含有する。

【図 10】膿瘍内でのマクロファージ様細胞の動員における、抗 Amd、抗 Gmd、及び抗 Amd と抗 Gmd モノクローナル抗体との組み合わせによる受動免疫の効果を示す。6~10 週齢のメス Balb/c マウス ($n = 5$) を、 $40 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量の PBS、または mAb 1C11、Amd1.6、もしくは組み合わせ ($1C11 + Amd1.6$) により腹腔内で免疫化した。24 時間後、全てのマウスは、生物発光 CA-MRSA 株である USA300 LAC:lux で汚染された下腿用ピンを受けた。感染後 14 日目からの、代表的な感染脛骨を、オレンジ G / アルシアンブルー (ABG / OH) で染色した組織学切断面として示す。抗 Amd、抗 Gmd、及び抗 Amd と抗 Gmd mAb との組み合わせによる受動免疫は、マクロファージ様細胞を膿瘍の中心に動員する (図 10C~H、矢印) 一方で、PBS で免疫化されたマウスは、膿瘍内でマクロファージ様細胞の動員を示さず (図 10A~B)、形態的に好中球に類似する細胞を示す。Amd1.6 及び $1C11 + Amd1.6$ の組み合わせで治療したマウス (それぞれ図 10E 及び 10G) での単一の膿瘍、または 1C11 で治療したマウスの 2 つの膿瘍構造 (図 10C) と比較して、PBS で治療した脛骨には、複数の膿瘍が髄管及び骨周辺の軟組織に存在する (図 10A)。

【図 11】抗 Amd と抗 Gmd モノクローナル抗体との組み合わせによる受動免疫の効果を示し、無菌性膿瘍内で M2 マクロファージを動員することにより、骨の治癒を加速させる。6~10 週齢のメス Balb/c マウス ($n = 5$) を、 $40 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量の PBS、または mAb 1C11、Amd1.6、もしくは組み合わせ ($1C11 + Amd1.6$) により腹腔内で免疫化した。24 時間後、全てのマウスは、生物発光 CA-MRSA 株である USA300 LAC:lux で汚染された下腿用ピンを受けた。手術後 14 日目の代表的な脛骨を、オレンジ G / アルシアンブルー (ABG / OH) で染色した組織学切断面として示す (図 11A~C)。無菌ピン対照を受けるマウスと比較して、mAb で免疫化したマウスでの著しい治癒が明らかである (図 11A~C)。再構築及び創傷治癒プロセスと関係するマクロファージ表現型による治癒の相関関係を測定するため、抗アルギナーゼ-1 抗体について、M2 マクロファージを染色して免疫組織化学法を実施した。受動免疫化したマウスの膿瘍 (茶色の染色) の中心に M2 マクロファージが動員された (図 11E) が、陰性対照の PBS 群の膿瘍の中心からは除外された (図 11D)。

【発明を実施するための形態】

【0021】

詳細な説明

ブドウ球菌属種自己溶解素 N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (Amd) の触媒ドメインまたは細胞壁結合ドメインに特異的に結合する、1 つ以上のモノクローナル抗体またはその結合部分を本明細書にて開示する。

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」とは、天然源または組み換え源由来の免疫グロブリン、及び免疫グロブリンの免疫反応性部分 (即ち抗原結合部分) を含むことを意味する。本明細書で開示するモノクローナル抗体は、例えば実質的に純粋なモノクローナル抗体、抗体断片または結合部分、キメラ抗体、及びヒト化抗体を含む、種々の形態内に存在してよいし、またはこれらから単離することができる (Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory

10

20

30

40

50

Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0023】

本明細書にて開示したモノクローナル抗体は、ブドウ球菌 N - アセチルムラモイル - L - アラニン - アミダーゼまたはその断片に結合する特異性を特徴とする。抗体は、ブドウ球菌自己溶解素 (Atl) のアミダーゼサブユニット内のエピトープに特異的に結合するが、通常は免疫優性エピトープには限らない。特定の実施形態において、これらのモノクローナル抗体はブドウ球菌株の *in vivo* 増殖を阻害する。別の実施形態において、これらのモノクローナル抗体は金属、プラスチック及び/または有機体表面でのバイオフィilm生成を阻害する。更に別の実施形態において、1つ以上のモノクローナル抗体を共

10

【0024】

本明細書にて開示したこの態様及び他の全ての態様によれば、ブドウ球菌株はヒトまたは動物に対して病原性であるかまたは病原性となり得る株である。ブドウ球菌はコアグラゼ陽性またはコアグラゼ陰性のいずれかとなることができる。代表的なブドウ球菌株としては、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、腐性ブドウ球菌 (*S. saprophyticus*)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (*S. haemolyticus*)、スタフィロコッカス・カブラエ (*S. caprae*) またはスタフィロ

20

【0025】

ある種の実施形態において、アミダーゼサブユニットのエピトープ (mAb またはその結合断片により結合されている) は、免疫優性エピトープである。免疫優性抗原は、免疫系により最も容易に認識される抗原決定基の一部であるため、誘導した抗体の特異性に最も影響を及ぼす。「免疫優性エピトープ」とは、宿主生物の免疫応答を選択的に誘発する抗原のエピトープであり、その抗原の他のエピトープを実質的に排除するエピトープを意味する。

30

【0026】

通常、免疫優性エピトープを有すると思われる抗原は、病原性生物の外表面にて抗原を選択することにより特定可能である。例えば、真菌、細菌及びウイルス等の最も単純な生物は、病原性生物の外表面に曝される1種または2種のタンパク質を有する。これらの外表面タンパク質は、適切な抗原を有する可能性が最も高い。免疫優性エピトープを有する可能性が最も高いタンパク質は、病原性生物で感染した生物の全てのタンパク質をゲル上で、血清に対して移動させるウェスタンアッセイにより特定することができる。血清からの固定抗体は、周知の ELISA 技術の1つ等の標識抗体により特定することができる。免疫優性エピトープは、病原性生物で感染した宿主生物の血清調査により特定することができる。宿主生物の免疫応答を引き起こし得る特定された抗原に結合する抗体量について血清を測定した。免疫優性エピトープがこれらの抗原に存在する場合、血清中の実質的に全ての抗体が免疫優性エピトープに結合し、抗原に存在する他のエピトープには殆ど結合しない。

40

【0027】

AtlA は、有糸分裂中に細胞壁を消化するのに必要な、黄色ブドウ球菌の触媒的に異なるペプチドグリカン加水分解酵素の1つである (Baba and Schneewind, "Targeting of Muralytic Enzymes to the Cell Division Site of Gram-Positive Bacteria: Repeat Domains Direct Autolysin to the Equatorial Surface Ring of Staphyl

50

ococcus aureus, "EMBO. J. 17(16):4639-46(1998)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。増殖のために不可欠な遺伝子であることに加え、走査型電子顕微鏡調査では、二分裂中に黄色ブドウ球菌に結合した抗AtlA抗体は、細胞壁により覆われていない細菌の領域に局在化することを示した(Yamada et al., "An Autolysin Ring Associated With Cell Separation of Staphylococcus aureus," J. Bacteriol. 178(6):1565-71(1996)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0028】

AtlA酵素はアミダーゼ(62kD)及びグルコサミニダーゼ(53kD)を含み、これらは分裂プロセスを通して、同一のAtlA前駆体タンパク質より作製されている(Baba and Schneewind, "Targeting of Muralytic Enzymes to the Cell Division Site of Gram-Positive Bacteria: Repeat Domains Direct Autolysin to the Equatorial Surface Ring of Staphylococcus aureus," Embo. J. 17(16):4639-46(1998); Komatsuzawa et al., "Subcellular Localization of the Major Autolysin, ATL and Its Processed Proteins in Staphylococcus aureus," Microbiol Immunol. 41:469-79(1997); Oshida et al., "A Staphylococcus aureus Autolysin That Has an N-acetylmuramoyl-L-alanine Amidase Domain and an Endo-beta-N-acetylglucosaminidase Domain: Cloning, Sequence Analysis, and Characterization," Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A. 92(1):285-9(1995)、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる)。自己溶解素は3つの約150のアミノ酸の細胞壁結合ドメインにより細胞壁に保持されており、これらのアミノ酸はR1、R2及びR3と呼ばれている。最終の成熟工程において、タンパク質の分解的切断は、アミダーゼドメインとそれに関係するR1及びR2ドメイン(合わせて「Amd」)を、グルコサミニダーゼ及びそれに関係するN末端R3ドメイン(合わせて「Gmd」)から分離する。図1を参照のこと。

【0029】

His-Amdに関する代表的な、コードされたコンセンサスタンパク質及びコードするオープンリーディングフレーム配列を、以下のSEQ ID NO:1及び2として示す。

10

20

30

SEQ ID NO: 1

MHHHHHSASAQPRSVAAATPKTSLPKYKPQVNSSINDYIRKNNLKAPKIEEDYTSYFPHYAYRN
 GVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHAFVDGDRI IETAPTDLVSWGVGAVGNP
 RFINVEIVHTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYYGLKPDSDAEYDGNNGTVWTHYAVSKYLGTDH
 ADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINKEYLIKMGKVAPWGTQSTTTPTTPSKPTTPSKPSTGKLTVA
 NNGVAQIKPTNSGLYTTVYDKTGKATNEVQKTFVAVSKTATLGNQKFYLVQDYNNGKFGWVKEG
 DVVYNTAKSPVNVNQSYSIKPGTKLYTVPWGTSTKQVAGSVSGSGNQTFKASKQQIDKSIYLYG
 SVNGKSGWVSKAYLVDTAKPTPTPKPSTPTTNNKLTVSSSLNGVAQINAKNNGLFVYDKTG
 KPTKEVQKTFVAVTKEASLGGNKFYLVKDYNSTLIGWVKQGDVIYNNAKSPVNVMTYTVKPGT
 KLYSVPWGTYKQEAGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLFQTVNGKSGWVSKAYLAVPAAPKKA
 VAQPKTAVK

10

SEQ ID NO: 2

ATGCACCATCACCACCACACAGCGCAAGCGCACAGCCTCGTTCGGTCGCCGCCACCCCGAAAA
 CCAGCTTGCCGAAGTACAAACCGCAAGTTAATAGCAGCATCAACGACTACATCCGCAAAAACAA
 CCTGAAGGCCCGAAAATTGAAGAGGACTATACCAGCTATTTCCCGAAATATGCTTACCGTAAT
 GGTGTCGGTTCGTCGGGAGGTATTGTGGTCCACGACACCGCGAATGACCGTAGCACCATCAACG
 GTGAGATTAGCTACATGAAAAACAATTACCAAAACGCGTTCGTGCACGCCCTTCGTGCATGGCGA
 TCGCATCATCGAAACCGCGCCAACCGACTATCTGTCTGGGGTGTGGGTGCCGTTGGCAACCCG
 CGTTTCATCAATGTGGAGATTGTTTCATACCCACGACTACGCGAGCTTTGCACGTAGCATGAACA
 ACTACGCCGATTATGCTGCAACGCAGCTGCAGTACTACGGCCTGAAACCGGATAGCGCGGAGTA
 TGACGGTAACGGTACGGTGTGGACGCATTATGCGGTGAGCAAATACCTGGGTGGTACCGATCAT
 GCTGATCCGCATGGCTACCTGCGCTCTCACAACTATAGCTACGACCAGTTGTACGACCTGATCA
 ATGAGAAATATCTGATTAAGATGGGTAAAGGTTGCACCGTGGGGTACGCAGAGCACCACGACGCC
 GACCACGCCGAGCAAACCGACGACCCCGTCCAAACCGTCTACCGGCAAACCTGACGGTTCGCGGCT
 AATAACGGTGTTCGCGCAGATTAAACCGACCAACAGCGGTCTGTACACCACCGTCTATGATAAAA
 CGGGCAAAGCCACCAATGAGGTTCAAAGACGTTTCGCAGTTAGCAAACCGGCGACCCTGGGTAA
 CCAAAGTTCTACCTGGTTCAGGATTACAATAGCGGCAACAAATTTGGTTGGGTGAAAGAAGGC
 GACGTTGTGTACAATACCGCGAAGTCCCCGGTGAACGTTAATCAGAGCTATAGCATCAAGCCGG
 GTACCAAATTTGTATACGGTGCCTGGGGTACCAGCAAGCAAGTTGCGGGTAGCGTCAGCGGCTC
 TGGTAACCAGACCTTCAAGGCGTCTAAGCAACAACAAATTTGACAAAAGCATTTACCTGTATGGT
 AGCGTTAATGGTAAAAGCGGCTGGGTGTCTAAAGCGTATCTGGTTCGACACCGCAAAGCCGACGC
 CAACGCCGACCCCGAAGCCGAGCACCCCAACCACCAACAACAAGCTGACGGTTCAGCTCCCTGAA
 TGGTGTTCGCGCAAATCAATGCGAAGAATAATGGCCTGTTTACCACCGTTTACGATAAGACGGGC
 AAGCCAACGAAAGAAGTCCAGAAAACCTTTGCTGTCAACAAAGAAGCCAGCCTGGGCGGTAACA
 AGTTCTATCTGGTAAAGGACTACAACCTCCCGACGCTGATCGGTTGGGTCAAACAAGGCGATGT
 CATTTACAATAACGCGAAAAGCCCGGTTAATGTGATGCAAACCTATACCGTCAAACCGGGTACG
 AAGCTGTATTCGGTTCGGTGGGGCACGTACAAACAAGAAGCAGGCGCGGTGAGCGGTACCGGCA
 ATCAGACCTTTAAGGCCACCAAGCAGCAGCAGATCGATAAATCTATTTACTTGTGGTGGCACCGT
 GAATGGCAAGAGCGGTTGGGTTTCTAAGGCATACCTGGCGGTGCCGGCAGCACCGAAGAAGGCG
 GTGGCGCAGCCAAAGACCGCAGTGAAG

20

30

40

【 0 0 3 0 】

ブドウ球菌 A m d は、固相もしくは液相ペプチド合成、組み換え発現により合成可能であるか、または天然源より入手可能である。自動ペプチドシンセサイザーは、Applied Biosystems, Foster City, California等の多くの供給業者から市販されている。化学的ペプチド合成の標準技術は、当該技術分野において周知である(例えば、Synthetic Peptides: A Users Guide 93-210 (Gregory A. Grant ed., 1992)を参照のこと: その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。組み換え発現によるタンパク質またはペプチド作製は、大腸菌等の細菌、酵母菌、昆虫または哺乳動物細胞、及び発現系を使用して実施することができる。組み換えタンパク質/ペプチド発現の手順は当該

50

技術分野において周知であり、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C. S. H. P. Press, NY 2nd ed., 1989)により説明されている。

【0031】

組み換え発現したペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、及び逆相クロマトグラフィー等の当該技術分野において周知の複数の方法のいずれかを使用して精製することができる。ペプチドは、従来技術によって精製形態（好ましくは少なくとも約80%または85%の純度、より好ましくは少なくとも約90%または95%の純度）で作製されるのが好ましい。組み換え宿主細胞を作製してペプチドを増殖用培地に分泌する（米国特許第6,596,509号（Bauerら）を参照、その全体が参照として本明細書に組み込まれている）かどうかに応じて、ペプチドを遠心分離（して、分泌ペプチドを含有する上清から細胞成分を分離）した後、連続的に上清を硫酸アンモニウム沈殿させて単離及び精製することができる。ペプチドを含有する画分を、適切な寸法のデキストランまたはポリアクリルアミドカラムでゲル濾過して、ペプチドを他のタンパク質から分離する。必要であれば、ペプチド画分をHPLC及び/または透析により更に精製してよい。

10

【0032】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体または結合部分はAmd触媒ドメインのエピトープに特異的に結合してよい。本明細書で使用する場合、Amd触媒ドメインは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸9~252に少なくとも70%同一、またはSEQ ID NO: 1のアミノ酸9~252に少なくとも75%もしくは80%同一、あるいは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸9~252に少なくとも85%もしくは90%同一である。特定の実施形態において、アミダーゼ触媒ドメインは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸9~252に少なくとも95%同一である。

20

【0033】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体または結合部分は、Amd1.6、Amd1.10、Amd1.13、Amd1.16、Amd1.17、Amd2.1、またはAmd2.2として示されるハイブリドーマ細胞株により作製される。

【0034】

別の実施形態において、モノクローナル抗体または結合部分は、AmdのR1またはR2細胞壁結合ドメイン内で、エピトープに全体的にまたは部分的に結合する。本明細書で使用する場合、R1またはR2細胞壁結合ドメインは、それぞれ、SEQ ID NO: 1のアミノ酸253~399もしくは421~568に少なくとも70%同一、またはそれぞれ、SEQ ID NO: 1のアミノ酸253~399もしくは421~568に少なくとも75%もしくは80%同一、あるいはそれぞれ、SEQ ID NO: 1のアミノ酸253~399もしくは421~568に少なくとも85%もしくは90%同一である。特定の実施形態において、細胞壁結合ドメインはそれぞれ、SEQ ID NO: 1のアミノ酸253~399または421~568に少なくとも95%同一である。

30

【0035】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体または結合部分は、Amd1.1、Amd1.2、Amd1.5、Amd1.7、Amd1.8、Amd1.9、Amd1.11、Amd1.12、Amd1.14、Amd1.15、Amd2.4、またはAmd2.5として示されるハイブリドーマ細胞株により作製される。

40

【0036】

特定の実施形態において、本明細書にて開示したモノクローナル抗体は、Amd触媒ドメインまたは細胞壁結合ドメインに、 10^{-8} Mまたは 10^{-9} M、ただし好ましくは 10^{-10} Mを超える親和性で結合する。

【0037】

上記の通り、特定の実施形態において、モノクローナル抗体または結合部分はブドウ球菌の*in vivo*増殖もまた阻害する。ブドウ球菌の*in vivo*増殖の阻害は、多

50

数の好適な規格に従って測定可能である。かかる一実施形態において、ブドウ球菌の *in vivo* 増殖は、生物発光アッセイにしたがって評価可能である。例として、生物発光黄色ブドウ球菌 (Xen 29; ATCC 12600) (Francis et al., "Monitoring Bioluminescent Staphylococcus aureus Infections in Living Mice Using a Novel luxABCDE Construct," *Infect. Immun.* 68(6): 3594-600 (2000); Contag et al., "Photonic Detection of Bacterial Pathogens in Living Hosts," *Mol. Microbiol.* 18(4): 593-603 (1995) もまた参照のこと: それら全体が参照として本明細書に組み込まれている) を使用して、外科移植の前に50万のCFUで下腿インプラントに投与する。5週齢のメスBALB/cJマウスは、手術の3日前に、生理食塩水、または0.25mL生理食塩水中の精製抗体/抗体断片1mgの腹腔内注射を受けることができる。マウスは種々の日数(例えば0、3、5、7、11、及び14日)で生物発光を評価して画像化することができ、BLI画像を比較することにより、生理食塩水対照、またはブラシーボ抗体を注射した対照マウスと比較して、抗体が黄色ブドウ球菌の *in vivo* 増殖を阻害するかどうかを評価することができる。

【0038】

別の実施形態において、ブドウ球菌の *in vivo* 増殖はバイオフィーム形成により評価可能である。例として、メスBalb/cマウスを、40mg/kgの用量の抗体/抗体断片または対照により腹腔内で受動免疫化することができ、1日後、各マウスをMRSA株で汚染された下腿用ステンレス鋼ピンで感染させることができる。感染後14日目に、ピンを取り除いて走査型電子顕微鏡(SEM)により検査することができ、バイオフィームで覆われた対象の領域(例えば、平板上ピンの0.5×2.0mm面)の割合を、NIHソフトウェア(Image J)で定量化することができる。

【0039】

更に他の実施形態では、感染した骨の骨溶解容積を、MicroCTイメージングを使用して測定することができる。例として、メスBalb/cマウスを、40mg/kgの用量の抗体/抗体断片または対照により腹腔内で受動免疫化することができ、1日後、各マウスをMRSA株で汚染された下腿用ステンレス鋼ピンで感染させることができる。14日後、マウスを安楽死させ、脛骨を回収することができる。得られた画像を使用して、損傷領域を2つの異なる視野(例えば内側及び外側)から測定することができ、これらを加えて皮質厚を掛け合わせる(Passive Immunization With Anti-Glucosaminidase Monoclonal Antibodies Protects Mice From Implant-Associated Osteomyelitis by Mediating Opsonophagocytosis of Staphylococcus aureus Megaclusters," *J Orthop Res* 32(10): 1389-96 (2014) を参照: その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0040】

更に他の実施形態において、ブドウ球菌の *in vivo* 増殖は、髄管または骨を取り巻く軟組織内のブドウ球菌膿瘍コミュニティ(SAC)の有無(有る場合、出現率を含む)により評価可能である。例として、メスBalb/cマウスを、40mg/kgの用量の抗体/抗体断片または対照により腹腔内で受動免疫化することができ、1日後、各マウスをMRSA株で汚染された下腿用ステンレス鋼ピンで感染させることができる。14日後、マウスを安楽死させ、脛骨及び関係する軟組織を回収することができる。組織学的サンプルを調製してオレンジG/アルシアンブルー(ABG/OH)で染色することができ、その後、膿瘍の有無を組織学的サンプルの分析により測定可能である。

【0041】

一実施形態によれば、モノクローナル抗体または結合部分は、以下のアミノ酸配列の1

つを含むV_Hドメインを含む(CDRドメインは下線で示した) :

SEQ ID NO : 5 (Amd 1. 2) :

PELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTS
DKSSTTAYMELSSLTSEDXAVYYCARLDGYDCFDYWGQGTTLTVSS

ここで、Xは任意のアミノ酸とすることができる。このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列(SEQ ID NO : 6)によりコードされる :

CCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCA
CTAGCTATATTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATAT
TAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCA
GACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTNTGCGGTCT
ATTACTGTGCAAGACTTGATGGTACTACGACTGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCT
CACAGTCTCNTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC
CAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCNGGTCAAGGG

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 5のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 7 (Amd 1. 1) :

QQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGITNYDPKPFQGRA
TITADTSSNIAYLQLTSLTSEGTAVYYCARGGYLSPYAMDYWGQGTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列(SEQ ID NO : 8)によりコードされる :

NTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGA
GTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTATTACTAATTATGACCCGAAGTTCAGGGCAGG
GCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAATATAGCCTACCTGCAGCTCACCAGCCTGACATCTG
AGGGCACTGCCGTCTACTACTGTGCTAGAGGGGGTTACCTATCCCCTTATGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG
GCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATT
NCCCTGAGCCAG

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 7のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 9 (Amd 1. 5) :

QQSGAELVLRPGALVKLSCKASGFNIQDYILHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENDNTVYDPKFRDRA
SLTADTFFSNTAYLQLSGLTSEDVAVYYCARRDGIITATRAMDYWGQGTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列(SEQ ID NO : 10)によりコードされる :

TGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGGCCAGGGGCCTTAGTCAAATTGTCCTGCAAAGCTTC
TGGCTTCAACATTCAAGACTACTATCTACACTGGATGAAACAGAGGCCTGAGCAGGGCCTGGAG
TGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGATAATACTGTATATGACCCGAAGTTCGGGACAGGG
CCAGTTTAAACAGCAGACACATTTTCCAACACAGCCTACCTACAGCTCAGCGGCCTGACATCTGA
AGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGAAGAGACGGCATTACTACGGCTACGCGGGCTATGGAC
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATC
CACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGG
CNNNNNCCTGAGCCAG

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 9のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 11 (Amd 1. 6) :

QSGTVLARPGTSVKMSCKASGYSFTNYWMHWVRQRPGQGLEWIGSIYPGNSDTTYNQKFKDKAK
LTAVTSASTAYMELSSLTNEEDSAVYYCTGDDYSRFSYWGQGTTLTVSA

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列(SEQ ID NO : 12)によりコードされる :

10

20

30

40

50

CAGTCTGGGACTGTACTGGCAAGGCCTGGGACTTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCT
 ACAGCTTTACCAACTACTGGATGCACTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGAT
 TGGTTCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCAAA
 CTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACT
 CTGCGGTCTATTACTGTACGGGGGATGATTACTCTCGGTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCT
 GGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCT
 GCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTNGTCAAGGGCTNTTTCCNGAGCCA

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO: 11のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO: 13 (Amd1.7):

QSGPELVKPGASVKISCKASGYFTDYNMHWVKQSHGKSLEWIGYIFPYNGDTDYNQKFKNKA
 TLTVDNSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCSRWGSYFDYWGQGTTLTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 14) によりコードされる:

TGCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTC
 TGGATACACATTCCTGACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAG
 TGGATTGGATATATTTTTCTTACAATGGTGATACTGACTACAACCAGAAATTCAGAACAAAGG
 CCACATTGACTGTAGACAATTCCTCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCGCAGCCTGACATCTGA
 GGACTCTGCAGTCTATTACTGTTCAAGATGGGGGTCTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC
 ACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTG
 CTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTNGTCAAGGGCT

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO: 15 (Amd1.9):

VESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPKKSLEWVASITSGGSAYYPDSVKGRFT
 ISRDNARNILNLQMSLRSSEDTAMYICARDDGYFDYWGQGTTLTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 16) によりコードされる:

GTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
 GATTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCAAAAAAGAGTCTGGAGTG
 GGTGCGCATCCATTACTAGTGGTGGTAGCGCCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACC
 ATCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGAACCTGCAGATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACA
 CGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGACGACGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT
 CACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC
 CAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAA

SEQ ID NO: 17 (Amd1.11):

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTNYGMNWKQAPGKLEWGMWINTYTGEPYADDF
 KGRFAFSLETSASTAYLLINLNKNEDTATYFCARRDGYFDAMDYWGQTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 18) によりコードされる:

NNCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGC
 TGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAAACTA
 TGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAGAGTGGATGGGCTGGATAAACACC
 TACACTGGAGAGCCAACTTATGCTGATGACTTCAAGGGACGCTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCT
 CTGCCAGCACTGCCTATTTGCTGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTG
 TGCAAGAAGGGATGGTTACTTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC
 TCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATA
 ACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGG

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 19 (Amd 1 . 12) :

QQSGAELVRPGTSVKVSCKTSSGYAFTNYLIEWVNQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKAKA
TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARSERGYYGNYGAMDYWGQTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 20) によりコードされる :

NNGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGACTT
CTGGATACGCCTTCACTAATTACTTGTATAGAGTGGGTAAATCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGA
GTGGATTGGGGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAATACTACAATGAGAAGTTCAAGGCCAAG
GCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTG
ATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCAGAGCGAGGCTACTATGGTAACTACGGAGCTAT
GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTC
TATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCA
AGGGCTATNTCCCTGAGCCAG

10

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 19のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 21 (Amd 1 . 13) :

QQPGPELVKPGASLKI SCKASGYSFSSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPVDGDTNYNGKFKGKA
TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARTGPHYAMDYWGRGTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 22) によりコードされる :

NNGCAGCAGCCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCACTGAAGATTTCTGCAAAGCTT
CTGGCTACTCATTTCAGTTCCTCTTGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGA
GTGGATTGGACGGATTTATCCTGTAGATGGAGATACTAATACTACAATGGGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACACTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG
TGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAACTGGGCCCTATGCTATGGACTACTGGGGTTCGAGG
AACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGA
TCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGG

20

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 21のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 23 (Amd 1 . 16) :

GAELVRPGSSVKISCKASGYTFSTYWMNVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGTNYNGKFKGKATLT
ADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARSMVTNYFAMDYWGQTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 24) によりコードされる :

GGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATACAT
TCAGTACCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGACCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACA
GATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAATTCAGGGTAAAGCCACACTGACT
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAACATCTGACGACTCTGCGG
TCTATTTCTGTGCAAGATCGATGGTAACGAAGTATTACTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG
AACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGA
TCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCNGGTCAAGGG

40

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 23のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 25 (Amd 1 . 17) :

GGLVKPGGSLKLSAASGTFSDYMYWVRQTPEKKLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR
DNAKNNLYLQMSLKSSEDTAMYYCVRGLLGFDYWGQTTTLTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 26) によりコードされる :

GGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAAACTGGAGTGGGTTCGCAACC
 ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCCATCTCCA
 GAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCAT
 GTATTACTGTGTAAGGGGGCTACTGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC
 TCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTA
 ACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGG

SEQ ID NO : 27 (Amd 2 . 1) :

GFVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMS~~WVRQTP~~EMRLEWVASISSGGSXTYYPDSVMGRF
 TISRDNARNILNLQMSLRS~~EDTAMYYCARVGLYYDYY~~SMDYWGQGTSVTVSS

10

ここで、Xは任意のアミノ酸とすることができる。このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 28) によりコードされる :

GGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTA
 GCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGATGAGGCTGGAGTGGGTTCGCATCCATTAG
 TAGTGGTGGTAGNNNCACCTACTATCCAGACAGTGTGATGGGCGGATTACCCATCTCCAGAGAT
 AATGCCAGGAACATCCTGAACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATT
 ACTGTGCAAGAGTGGGTCTCTACTATGATTATTACTATTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC
 CTCAGTCACCGTCTCCTCAG

ここで、各Nは、核酸分子が SEQ ID NO : 27 のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

20

SEQ ID NO : 29 (Amd 2 . 2) :

ESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVRQSHGKSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKS
 KATLLVDNSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREDGYYGYFDYWGQGTTLTGSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 30) によりコードされる :

GAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGAT
 ACACATTCACTGACTATAACATGCACTGGGTGAGGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGAT
 TGGATATATTTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAACCAGAAAGTTCAGAGTAAGGCCACA
 TTGACTGTAGACAATTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACT
 CTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGATGGTTACTACGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGG
 CACCACTCTCACAGGCTCCTCAG

30

SEQ ID NO : 31 (Amd 2 . 4) :

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPYADDF
 KGRFAFSLETSASAAYLQINNLKNEDATYFCARDYDGYYYYAMDYWGQGTSVTVSS

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 32) によりコードされる :

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAA
 GGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTC
 AAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCGCTGCCTATTTGCAGATCAACAACC
 TCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGGGACTATGATGGTTACTATTACTATGC
 TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG

40

【 0 0 4 2 】

一実施形態によれば、モノクローナル抗体または結合部分は、以下のアミノ酸配列の1つを含むV_Lドメインを含む (CDRドメインは下線で示した) :

SEQ ID NO : 33 (Amd 1 . 1) :

ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCRASSSVNYMFWFQKSDASPKLWIYYTSNLAPGVPARFSGS
 GSGNSYSLTISMEGEDAATYYCQEFTSFPYTFG

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 34) によりコードされる :

50

NTCAGTGTCTCAGTTGTAATGTCCAGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGT
 CTGCATCTCTAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAATACATGTT
 CTGGTTCAGCAGAAGTCAGATGCCTCCCCAAATTGTGGATTTATTATACATCCAACCTGGCT
 CCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAACCTTATTCTCTCACAAATCAGCA
 GCATGGAGGGTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGGAGTTTACTAGTTTCCCGTACACGTT
 CGGA

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO: 33のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO: 35 (Amd 1.2):

DIVLTQSPATLSVTPGDSVLS^QSCRAS^QSISNNLHWY^QQKSHESPRLLIKYAS^QSISGIPSRFSG
 SSGSDFTLSINSVETEDFGMYFC^QQNSWPQYTF

10

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 36) によりコードされる:

TTATGCTTTTTTGGATTTCCAGCCTCCAGAGGTGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCT
 GTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAAC
 CTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGT
 CCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTAT
 CAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCTCAG
 TACACGTTTCGG

SEQ ID NO: 37 (Amd 1.6):

SIVMTQTPKFLLSAGDRLTITCKAS^QSVSNDVAWY^QQKPG^QSPKLLIYYT^QSNRYTGVPDRFTG
 SGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC^QQDYNPWTFFGGGTK

20

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 38) によりコードされる:

CCAGGTCTTCGTATTTCTACTGCTCTGTGTGTCTGGTGCTCATGGGAGTATTGTGATGACCCAG
 ACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGCTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGA
 GTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATA
 CTATACATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGAT
 TTCATTTACCATCAGCACTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATT
 ATAACCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAG

30

SEQ ID NO: 39 (Amd 1.7):

SIVMTQTPKFLLSAGDRLTITCKAS^QSVSNDVAWY^QQKPG^QSPKLLIYYT^QSNRYTGVPDRFTG
 SGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC^QQDYNPWTFFGGGTK

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 40) によりコードされる:

TGGTGCTCATGGGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGAC
 AGGCTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGA
 AGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACTATAACATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGA
 TCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCACTGTGCAGGCTGAA
 GACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATTATAACTCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCA
 AGC

40

SEQ ID NO: 41 (Amd 1.8):

DIVMTQSPATLSVTPGDRVLS^QSCRAS^QSISDYLHWY^QQRS^QHESPRLLIKYV^QSISGIPSRFSG
 SSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFG

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 42) によりコードされる:

CTTGGACTTTTGGCTTTTCTGGACTTCAGCCTCCAGATGTGACATTGTGATGACTCAGTCTCCAG
 CCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCTCTTTCCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAG
 CGACTACTTACACTGGTATCAACAAAGATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATATGTT
 TCCCAATCCATCTCTGGGATCCCTCCAGGTTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCCAGATTTCACTC
 TCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTATTGTCAAAATGGTCACAGCTT
 TCCGTACACGTTCCGGA

SEQ ID NO : 43 (Amd 1 . 9) :

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTSENIIFSNFAWYQQQPGKSPQLLVYGATNLADGVPSRFSG
 SSGTQYSLKITSLQSEDFGSYYCQHFWGSPWTF

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 44) によりコー
 ドされる :

TTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGG
 AGAAACTGTCACCATCACATGTCGAACAAGTGAATAATTTTCAGTAATTTCCGCATGGTATCAG
 CAGCAACCGGGAAAATCTCTCAGCTCCTGGTCTATGGTGCAACAACTTAGCAGATGGTGTGC
 CATCAAGGTTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCACCAGCCTGCAGTC
 TGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGGGTAGTCCGTGGACGTTCCGG

SEQ ID NO : 45 (Amd 1 . 10) :

QIVLTQSPALMSASPGKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNLASGVPARFSGS
 GSGTSYSLTISMEAEDAATYYCQWSSNPPYTFG

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 46) によりコー
 ドされる :

TCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGGGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGTC
 TGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTAC
 TGGTACCAGCAGAAGCCAAGATCCTCCCCCAAACCTGGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTT
 CTGGAGTCCCTGCTCGCTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAG
 CATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCTACAG
 TCCGGA

SEQ ID NO : 47 (Amd 1 . 11) :

DILLTQSPAILSVPGERVVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
 SSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNSWPALTFG

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 48) によりコー
 ドされる :

GGACTTTTGGCTTTTCTGGAAFTCCAGCCTCCAGAGGTGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCA
 TCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGAGCATTGGCAC
 AAGCATACTACTGGTATCAACAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCT
 GAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTA
 GCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCC
 AGCGCTCACGTTCCGGT

SEQ ID NO : 49 (Amd 1 . 12) :

DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTFAEGVRSRFSG
 SSGTQFSLQITSLQPEDFGSYYCQHGYGSPYTF

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 50) によりコー
 ドされる :

TCTGCTGCTGTGGCTTACAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTA
 TCTGCATCTGTGGGAGATACTGTCCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAAGAATTTTACAGTTATT
 TAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTT
 CGCAGAAGGTGTGCGATCAAGGTTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGCAGATC
 ACCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTTCTCCGTACA
 CGTTCGG

SEQ ID NO : 51 (Amd 1 . 13) :

50

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTYWYQOKPGQPPKLLISWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFG

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 52) によりコードされる :

GGTACCTGTGGGGACATTGTGATGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGA
AGGTCACATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAAAACTACTT
GACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTCCTGGGCATCCACTAGG
GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCA
GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGACTATAGTTATCCATTCAC
GTTTCGGC

10

SEQ ID NO : 53 (Amd 1.15) :

DIAMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQOKPGQSPKLLIYSASYRYTGVRDRFXG
SRCGTDFTFPISSVQGEDLAVYYCQQHYSIHSRS

ここで、Xは任意のアミノ酸とすることができる。このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 54) によりコードされる :

NCTGCTATTCTGCTATGGGTATCTGGTGTGACGGAGACATTGCGATGACCCAGTCTCACAAAT
TCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTAC
TGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCC
TACCGGTACACTGGAGTCCGTGATCGCTTCANTGGCAGTCGATGTGGGACGGATTTCACTTTCC
CCATCAGCAGTGTGCAGGGTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTATCCA
TTCACGTTTCGG

20

ここで、各Nは、核酸分子がSEQ ID NO : 53のアミノ酸配列をコードするのであれば、A、T、C、またはGとすることができる。

SEQ ID NO : 55 (Amd 1.17) :

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSQV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVPTFGGGT

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 56) によりコードされる :

TGGATCCCTGCTTCCAGCAGTGTGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTC
TTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACAC
CTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAGAGTTTCC
AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCA
AGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCC
GTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAA

30

SEQ ID NO : 57 (Amd 2.1) :

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNYLTYWYQOKPGQPPKMLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTHFTLTISSVQAEDLAIYYCQNDYSYPVTFGAGTKLELK

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 58) によりコードされる :

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACATGA
GCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTATACAGTGGAAATCAAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCA
GCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAAATGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTC
CCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACACATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGG
CTGAAGACCTGGCAATTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTATCCGGTCACGTTTCGGTGGTGG
GACCAAGCTGGAGCTGAAAC

40

SEQ ID NO : 59 (Amd 2.2) :

EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVNYMHWYQOKSGTSPKPWIYEISKLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISSMEAEADAIIYYCQQWNYPLITFGAGTKLELK

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 60) によりコードされる :

50

GAAATTGTGCTCACTCAGTCTCCAGCCATCACAGCTGCATCTCTGGGGCAAAGGTCACCATCA
 CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAATACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCC
 CAAACCATGGATTTATGAAATATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGT
 GGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCATTTATT
 ACTGCCAGCAGTGGAAATATCCTCTTATCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC

SEQ ID NO : 61 (Amd 2 . 4) :

ENALTQSPAIMSASPGKEKVTMTCSASSSVSYMHWYQOKSSMSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGS
 GSGNSYSLTISMEAEVATYYCFQGSSEFPVHVRRGDQVGNKT

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 62) によりコードされる :

GAAAATGCTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGA
 CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGCATGTCCCC
 CAAACTCTGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGT
 GGGTCTGGAAACTCTTACTCTCTCACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAGGTTGCCACTTATT
 ACTGTTTTTCAGGGGtAGTGGGTTCCAGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGTTGGAAATAAAAC

SEQ ID NO : 63 (Amd 2 . 5) :

DIQMTQSPASLSASVGETITITCRASGNIHNYLAWYQOKQGKSPHLLVFHARSLADGVPSRFSG
 SGSGTQYSLNINSLQPEDFGIYYCQHFWYTPYTFGGGTKLEIK

このアミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO : 64) によりコードされる :

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTATCACCATCA
 CATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATC
 TCCTCACCTCCTGGTCTTTTCATGCAAGATCCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGC
 AGTGGATCAGGAACACAATATTTCTCTCAATATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGATTT
 ATTACTGTCAACATTTTTTGGTATACTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA
 AC

【 0 0 4 3 】

本開示はまた、開示した抗 A m d 抗体の 1 つ以上と同じ A m d のエピトープに結合する A m d 抗体、及びその A m d 結合部分も包含する。したがって、追加の抗体及び A m d 結合抗体部は、 A m d 結合アッセイにおける、開示した抗体とのそれらの交差競合 (例えば、統計的に有意な方法で結合を競合的に阻害する) 能力に基づいて特定することができる。本明細書にて開示した抗 A m d リファレンス抗体の、 A m d タンパク質 (例えば、 SEQ ID NO : 1 の配列の少なくとも一部 (SEQ ID NO : 1 の触媒ドメインもしくはアミノ酸 9 ~ 252、または細胞壁結合ドメイン等) を有する A m d タンパク質またはポリペプチド) に対する結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体が A m d への結合についてリファレンス抗体と競合可能であることを示している。かかる抗体は、理論に制限されることなく、競合するリファレンス抗体の A m d タンパク質の同一または関係する (例えば構造的に類似した、もしくは空間的に近位の) エピトープに結合する。特定の実施形態において、本明細書にて開示したリファレンス抗体と同一の A m d のエピトープに結合する抗体は、ヒト化抗体である。特定の実施形態において、本明細書にて開示したリファレンス抗体と同一の A m d のエピトープに結合する抗体は、ヒト抗体である。 A m d 結合抗体及び A m d 結合抗体部はまた、リファレンス抗体と同じエピトープに結合する、他のマウスまたはキメラ A m d 結合抗体及び A m d 結合抗体部とすることもできる。

【 0 0 4 4 】

リファレンス抗体の結合をブロックまたはその結合と競合する能力は、 A m d 結合試験抗体または A m d 結合抗体部が、リファレンス抗体により規定されるのと同じもしくは類似のエピトープ、またはリファレンス A m d 結合抗体が結合するエピトープに十分に近位であるエピトープに結合することを示す。かかる抗体は、リファレンス抗体で特定された有利な性質を特に共有する傾向にある。

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

リファレンス抗体をブロックまたはリファレンス抗体と競合する能力は、競合結合アッセイ等の当該技術分野において周知の技術を使用して測定してよい。競合結合アッセイを用いて、試験用抗体またはAmd結合抗体部は、リファレンス抗体がAmdタンパク質またはAmdタンパク質の一部（例えば、SEQ ID NO: 1の触媒ドメインもしくはアミノ酸9~252、もしくは細胞壁結合ドメイン）に特異的に結合する能力について調査を行う。試験抗体は、過剰の試験抗体が実質的にリファレンス抗体の結合を阻害する場合、抗原としてのAmdタンパク質またはその一部との特異的結合に関してリファレンス抗体と競合する。実質的な阻害とは、試験抗体がリファレンス抗体の特異的結合を、通常少なくとも10%、25%、50%、75%、または90%低減することを意味する。

【0046】

周知の競合結合アッセイは通常、Amd結合抗体またはAmd結合抗体部とリファレンスAmd結合抗体との、Amdタンパク質またはその一部への結合についての競合を評価するために適用するか、またはルーチンに適合することができる。かかる競合結合アッセイとしては、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ(RIA)、固相直接または間接酵素イムノアッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli et al., "Distinction of Epitopes by Monoclonal Antibodies," *Methods in Enzymology* 92:242-253, (1983)を参照、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)；固相直接ビオチン-アビジンEIA(Kirkland et al., "Analysis of the Fine Specificity and Cross-reactivity of Monoclonal Anti-lipid Antibodies," *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)を参照、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ(Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)；I-125標識を使用する固相直接標識RIA(Morel et al., "Monoclonal Antibodies to Bovine Serum Albumin: Affinity and Specificity Determinations," *Molec. Immunol.* 25:7-15 (1988)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)；固相直接ビオチン-アビジンEIA(Cheung et al., "Epitope-Specific Antibody Response to the Surface Antigen of Duck Hepatitis B Virus in Infected Ducks," *Virology* 176:546-552 (1990)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)；及び直接標識RIA(Moldenhauer et al., "Identity of HML-1 Antigen on Intestinal Intraepithelial T Cells and of B-ly7 Antigen on Hairy Cell Leukemia," *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)が挙げられるが、これらに限定されない。通常、かかるアッセイは、非標識試験Amd結合抗体及び標識リファレンス抗体のいずれかを有する固体表面または細胞に結合した精製抗原の使用を伴う。競合阻害は、試験抗体が存在する固体表面または細胞に結合した標識の量を求めることにより測定される。通常、試験抗体は過剰に存在する。競合アッセイにより特定された抗体及び抗原結合抗体部(競合抗体)としては、リファレンス抗体と同じエピトープに結合するリファレンス抗体及び抗原結合抗体部、並びに、リファレンス抗体が結合して立体障害が生じるエピトープに十分近位な隣接エピトープに結合する抗体が挙げられる。

【0047】

幾つかの実施形態では、抗体またはそのAmd結合部分は、Amdに特異的に結合し、

10

20

30

40

50

本明細書で記載される抗 A m d 抗体と交差競合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は、A m d に特異的に結合し、A m d 1 . 1、A m d 1 . 2、A m d 1 . 5、A m d 1 . 6、A m d 1 . 7、A m d 1 . 8、A m d 1 . 9、A m d 1 . 10、A m d 1 . 11、A m d 1 . 12、A m d 1 . 13、A m d 1 . 14、A m d 1 . 15、A m d 1 . 16、A m d 1 . 17、A m d 2 . 1、A m d 2 . 2、A m d 2 . 4、及び A m d 2 . 5 から選択される抗 A m d 抗体と交差競合する。特定の実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、抗体 A m d 1 . 6 と交差競合する。他の実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、抗体 A m d 2 . 1 と交差競合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、上記抗 A m d 抗体の 1 つ以上と交差競合し、A m d の触媒活性を阻害する。

10

【 0 0 4 8 】

更なる実施形態において、抗体またはその A m d 結合部分は、本明細書で記載される抗体と同一のエピトープに結合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は、A m d 1 . 1、A m d 1 . 2、A m d 1 . 5、A m d 1 . 6、A m d 1 . 7、A m d 1 . 8、A m d 1 . 9、A m d 1 . 10、A m d 1 . 11、A m d 1 . 12、A m d 1 . 13、A m d 1 . 14、A m d 1 . 15、A m d 1 . 16、A m d 1 . 17、A m d 2 . 1、A m d 2 . 2、A m d 2 . 4、及び A m d 2 . 5 から選択される抗体と同一のエピトープに結合する。特定の実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は抗体 A m d 1 . 6 と同一のエピトープに結合する。その他の実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は抗体 A m d 2 . 1 と同一のエピトープに結合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は上記抗 A m d 抗体の 1 つ以上と同一のエピトープに結合し、A m d の触媒活性を阻害する。

20

【 0 0 4 9 】

幾つかの実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、ブドウ球菌属種の A m d 触媒ドメインに結合する抗 A m d 抗体と交差競合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、A m d 1 . 6、A m d 1 . 10、A m d 1 . 13、A m d 1 . 16、A m d 1 . 17、A m d 2 . 1、及び A m d 2 . 2 から選択される抗 A m d 抗体と交差競合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、上で特定した抗 A m d 抗体の 1 つ以上と交差競合し、A m d の触媒活性を阻害する。

30

【 0 0 5 0 】

更なる実施形態において、抗体またはその A m d 結合部分は、本明細書で記載される抗体と同一の、A m d 触媒ドメインのエピトープに結合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は、A m d 1 . 6、A m d 1 . 10、A m d 1 . 13、A m d 1 . 16、A m d 1 . 17、A m d 2 . 1、及び A m d 2 . 2 から選択される抗体と同一の、A m d 触媒ドメインのエピトープに結合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は、上で特定した抗 A m d 抗体の 1 つ以上と同一のエピトープに結合し、A m d の触媒活性を阻害する。

40

【 0 0 5 1 】

幾つかの実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、ブドウ球菌 A m d 細胞壁結合ドメインに結合する抗 A m d 抗体と交差競合する。更なる実施形態において、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、細胞壁結合ドメインに結合する本明細書で記載される抗 A m d 抗体と交差競合する。更なる実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は A m d に特異的に結合し、A m d 1 . 1、A m d 1 . 2、A m d 1 . 5、A m d 1 . 7、A m d 1 . 8、A m d 1 . 9、A m d 1 . 11、A m d 1 . 12、A m d 1 . 14、A m d 1 . 15、A m d 2 . 4、及び A m d 2 . 5 から選択される抗体と交差競合する。

【 0 0 5 2 】

幾つかの実施形態では、抗体またはその A m d 結合部分は、本明細書で記載される抗 A

50

md抗体と同一の、Amd細胞壁結合ドメインのエピトープに結合する。更なる実施形態では、抗体またはそのAmd結合部分は、Amd1.1、Amd1.2、Amd1.5、Amd1.7、Amd1.8、Amd1.9、Amd1.11、Amd1.12、Amd1.14、Amd1.15、Amd2.4、及びAmd2.5から選択される抗体と同一の、Amd細胞壁結合ドメインのエピトープに結合する。

【0053】

本明細書にて開示した抗体はまた、合成抗体であってもよい。合成抗体は、例えばバクテリオファージにより発現される抗体等の、組み換えDNA技術を使用して作製される抗体である。あるいは、合成抗体は、抗体をコードするDNA分子を合成した後で抗体を発現すること（即ち、抗体を指定するアミノ酸の合成）により作製され、DNAまたはアミノ酸配列は、入手可能であり当該技術分野において周知の合成DNAまたはアミノ酸配列技術を使用して入手される。

10

【0054】

特定の実施形態において、合成抗体は、上で特定した重鎖可変ドメインのCDRの1つ以上、上で特定した異なる重鎖可変ドメインのCDRの組み合わせ、特定した軽鎖可変ドメインのCDRの1つ以上、または上で特定した異なる軽鎖可変ドメインのCDRの組み合わせを使用して作製される。例として、Amd1.6及びAmd2.1は以下のCDRを含む。

源及びCDR	配列	SEQ ID NO:
Amd1.6 V _H , CDR1	GYSFYNYW	65
Amd1.6 V _H , CDR2	IYPGNSDT	66
Amd1.6 V _H , CDR3	DDYSRFSY	67
Amd1.6 V _L , CDR1	QSVSND	68
Amd1.6 V _L , CDR2	YTS	69
Amd2.1 V _H , CDR1	GFTEFSSYA	70
Amd2.1 V _H , CDR2	ISSGGSXT	71
Amd2.1 V _H , CDR3	VGLYYDYYSMDY	72
Amd2.1 V _L , CDR1	QSLLYSGNQKNY	73
Amd2.1 V _L , CDR2	WAS	74

20

Amd2.1 V_H, CDR2 (SEQ ID NO: 71)において、Xは任意のアミノ酸とすることができる。

30

【0055】

一実施形態では、モノクローナル抗体または結合部分は部分的にヒト化されているか、または完全にヒトのものである。

【0056】

ヒト化抗体は、可変領域内に非ヒト（例えばマウス）抗体の最小限の配列を含有する抗体である。かかる抗体は、ヒト対象に投与された場合に、治療的に抗原性及びヒト抗マウス抗体応答を低下させるために使用される。実際には、ヒト化抗体は通常、非ヒト配列を最小限からゼロまで有するヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒトにより作製された抗体、またはヒトにより作製された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

40

【0057】

抗体は、ヒト抗体の相補的決定領域（CDR）を、所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト抗体（例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスター等）のCDRで置き換えることによりヒト化することができる（Jones et al., "Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody With Those From a Mouse," Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., "Reshaping Human Antibodies: G

50

rafting an Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536 (1988)、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる)。抗体の特異性、親和性、及び/または能力を改良及び最適化するために、ヒト化抗体は更に、Fvフレームワーク領域内及び/または置き換えた非ヒト残基内のいずれかを、追加の残基で置換することにより改変することができる。

【0058】

ヒト化抗体は、当該技術分野において周知の技術を使用して作製することができる。in vitroで免疫化されたか、標的抗原に対する抗体を産生する免疫化した個体から単離した不死化ヒトBリンパ球を作製することができる(例えば、Reisfeld et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77 (Alan R. Liss ed., 1985)及び米国特許第5,750,373号(Garrard)を参照のこと:その全体が参考として本明細書に組み込まれる)。また、ヒト化抗体はファージライブラリーから選択することができ、このファージライブラリーはヒト抗体を発現する(Vaughan et al., "Human Antibodies with Sub-Nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library," *Nature Biotechnology*, 14:309-314 (1996); Sheets et al., "Efficient Construction of a Large Nonimmune Phage Antibody Library: The Production of High-Affinity Human Single-Chain Antibodies to Protein Antigens," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom et al., "By-passing Immunisation. Human Antibodies from Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments Rearranged in vitro," *J. Mol. Biol.* 227:381-8 (1992); Marks et al., "By-passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage," *J. Mol. Biol.* 222:581-97 (1991)、これら全体が参考として本明細書に組み込まれる)。ヒト化抗体はまた、免疫化の際に、内因性免疫グロブリン産生を有しないヒト抗体の全レパートリーを作製可能な、ヒトイムノグロブリン遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスでも作製することができる。本手法は米国特許第5,545,807号(Suraniら);同第5,545,806号(Lonbergら);同第5,569,825号(Lonbergら);同第5,625,126号(Lonbergら);同第5,633,425号(Lonbergら);及び同第5,661,016号(Lonbergら)に記載されており、これら全体が参考として本明細書に組み込まれる。

【0059】

特定の実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体はIgG1、IgG2、IgG3クラスまたはIgG4クラスである。そのプロテインA結合の低下のため、IgG3クラスが特に好ましい(Natsume et al., "Engineered Antibodies of IgG1/IgG3 Mixed Isotype with Enhanced Cytotoxic Activities," *Cancer Res* 68(10):3863-72 (2008)を参照:その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0060】

これらの抗体クラスの循環半減期は、Petkovaら("Enhanced Half-life of Genetically Engineered Human IgG1 Antibodies in a Humanized FcRn Mouse

10

20

30

40

50

Model: Potential Application in Humorally Mediated Autoimmune Disease, "International Immunology 18(12):1759-1769(2006)その全体が参照として本明細書に組み込まれている)により記載されている、N434A及びT307A/E380A/N434A置換等のFcドメインの改変、またはBalsitisら("Lethal Antibody Enhancement of Dengue Disease in Mice Is Prevented by Fc Modification,"Plos Pathogens 6(2):e1000790(2010)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)により記載されているN297Q置換により向上させることができる。

10

【0061】

上で、それぞれSEQ ID NO:5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61及び63として特定されている重鎖及び軽鎖配列を、コドン最適化DNA配列を特定するために使用可能であり、これを、本発明における組み換え、キメラ抗体の作製のために好適な発現系内に導入することができる。あるいは、上で特定したDNA配列を、本発明における組み換え、キメラ抗体の作製のために好適な発現系の調製のために使用することができる。

【0062】

抗体全体に加えて、本発明は、かかる抗体のAmd結合部分を包含する。かかるAmd結合部分としては、一価のFab断片、Fv断片(例えば一本鎖抗体、scFv)、単一の可変V_H及びV_Lドメイン、並びに二価のF(ab')₂断片、Bis-scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、及び低分子抗体が挙げられるが、これらに限定されない。これらの抗体断片は、James Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 98-118 (Academic Press, 1983); Ed Harlow and David Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988); Houston et al., "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Bird et al., "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426 (1988)(それら全体が参考として本明細書に組み込まれる)に記載されているタンパク質分解断片化処理、または当該技術分野において周知の他の方法等の従来の手順で作製可能である。

20

30

【0063】

幾つかの実施形態では、抗体またはそのAmd結合部分は、アミノ酸が、それぞれヒトV_HまたはV_L生殖細胞系配列の抗体フレームワークに置換されているフレームワークを含む。以下の実施例6は、本明細書で記載される多数の抗体に対する生殖細胞系配列を特定している。

40

【0064】

特に抗体断片の場合は、抗体を改変して血清半減期を増加させるのが更に好ましい場合がある。この改変は、例えば抗体断片の適切な領域の突然変異によって、サルベージレセプター結合エピトープを抗体断片内に導入することにより、またはエピトープ結合部位をペプチドタグ内に導入した後、両端もしくは中間にて抗体断片に融合させることにより(例えば、DNAもしくはペプチド合成により)達成することができる。

【0065】

抗体模倣物もまた、本発明における使用に好適である。非限定的に、10番目のヒトF

50

ィブロネクチンIII型ドメイン (10 Fn3) に由来する、アドネクチンまたはモノボ
ディとして知られるもの (Koide et al., "The Fibronectin Type III Domain as a Scaffold for Novel Binding Proteins," *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151 (1998); Koide et al., "Probing Protein Conformational Changes in Living Cells by Using Designer Binding Proteins: Application to the Estrogen Receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1253-1258 (2002)、これらそれぞれの全体が参照として本明細書に組み込まれている); 及びブドウ球菌プロテインAの安定したヘリックス細菌受容体ドメインZに由来する、アフィボディとして知られているもの (Nord et al., "Binding Proteins Selected from Combinatorial Libraries of an α -helical Bacterial Receptor Domain," *Nature Biotechnol.* 15(8):772-777 (1997)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている) を含む多数の抗体模倣物が、当技術分野において周知である。

【0066】

これらの抗体模倣物の作製において、 V_H 及び/または V_L 鎖のCDRを、これらの抗体模倣物の可変ループ領域内に接合または移植することができる。移植は、CDR配列の置換に加え、特定のループ領域に現れる、少なくとも2つのアミノ酸残基から、1つを除く実質的に全てのアミノ酸残基までの欠失を伴うことができる。挿入は、例えば、1つのループ領域における1つのCDRの挿入、任意に第2のループ領域における第2のCDRの挿入、及び任意に、第3のループ領域における第3のCDRの挿入であることができる。ポリペプチドにおける任意の欠失、挿入、及び置換は、既知のヌクレオチド配列から始まる組み換え技術を使用して達成することができる(以下参照)。

【0067】

モノクローナル抗体の作製方法は、本明細書に記載される技術、または他の当該技術分野において公知の技術 (Monoclonal Antibodies - Production, Engineering and Clinical Applications (Mary A. Ritter and Heather M. Ladyman eds., 1995)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている) を使用して達成してよい。通常、このプロセスは、対象の抗原(即ち、ブドウ球菌N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼまたはそのペプチド断片) で事前に免疫化した動物の脾臓から、免疫細胞(リンパ球) を入手することを伴う。

【0068】

次に、抗体分泌リンパ球を、細胞培養中に無限に複製可能な骨髄腫細胞または形質転換細胞と融合させることにより、不死化免疫グロブリン分泌細胞株を作製する。細胞培養中での、無限に複製可能な哺乳動物骨髄腫細胞または他の融合パートナーとの融合は、標準的かつ周知の技術により、例えば、ポリエチレングリコール(PEG) または他の融合剤を使用すること (Milstein and Kohler, "Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion," *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている) により、達成される。好ましくはマウス、しかし他の哺乳動物種の細胞に由来してもよい不死化細胞株は、特定の栄養素の利用のために必要な酵素中で欠失し、急速な増殖が可能であり、かつ良好な融合能を有するように選択される。得られる融合細胞またはハイブリドーマを培養し、得られるコロニーを、所望のモノクローナル抗体の作製のためにスクリーニングする。かかる抗体を作製するコロニーをクローニングし、*in vivo* または *in vitro* のいずれかで増殖させて大量の抗体を作製する。

【0069】

したがって、本発明の第2の態様は、本明細書にて開示したモノクローナル抗体または結合部分を発現する細胞株に関する。一実施形態では、本明細書にて開示したモノクローナル抗体は、指定されたハイブリドーマ細胞株であるAmd1.1、Amd1.2、Amd1.3、Amd1.5、Amd1.6、Amd1.7、Amd1.8、Amd1.9、Amd1.10、Amd1.11、Amd1.12、Amd1.13、Amd1.14、Amd1.15、Amd1.16、Amd1.17、Amd2.1、Amd2.2、Amd2.4、及びAmd2.5より作製される。

【0070】

上記の通り、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号(Cabilllyら)(その全体が参照として本明細書に組み込まれている)に記載されている組み換えDNA法を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、例えば、抗体の重鎖及び軽鎖配列をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使用するRT-PCRにより、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から単離する。重鎖及び軽鎖配列をコードする単離したポリヌクレオチドを次に、好適な発現ベクター内にクローニングし、このベクターは、別様では免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞内にトランスフェクションした際、モノクローナル抗体を発現及び分泌する宿主細胞を生成する。また、所望の種の組み換えモノクローナル抗体またはその断片は、ファージディスプレイライブラリーから単離することができる(McCafferty et al., "Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains," *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson et al., "Making Antibody Fragments using Phage Display Libraries," *Nature* 352:624-628 (1991); 及びMarks et al., "By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage," *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる)。

【0071】

また更なる態様は、本明細書にて開示した抗体または結合部分をコードするDNA分子、DNA分子の5'に機能的に結合したプロモーター有効性DNA分子、及びDNA分子の3'に機能的に結合した転写終結DNA分子を含むDNA構築物に関する。本発明はまた、DNA構築物が挿入される発現ベクターを包含する。ポリペプチド用の合成遺伝子は、突然変異誘発を容易にするために便利な制限酵素切断部位を含み、高レベルのタンパク質発現のための特異的コドンを使用するように設計することができる(Gribskov et al., "The Codon Preference Plot: Graphic Analysis of Protein Coding Sequences and Prediction of Gene Expression," *Nucl. Acids. Res.* 12:539-549 (1984)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0072】

遺伝子は、以下のように組み立ててよい：まず、遺伝子配列を設計した制限酵素切断部位にて隔て、複数の部分に分断してよい；各部分について、反対側の鎖をコードし、約15塩基の相補性重複を有する一対のオリゴヌクレオチドを合成してよい；2つのオリゴヌクレオチドをアニーリングし、DNAポリメラーゼのクレノウ断片を使用して、一本鎖領域を満たしてよい；断片の末端にて制限酵素部位を使用して、二本鎖オリゴヌクレオチドをpET3aベクター(Novagen)等のベクター内にクローニングし、その配列をDNAシーケンサーにより確認してよい；及び、これらの工程を各部分について繰り返す

、遺伝子全体を入手してよい。本手法は、一工程のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法よりも、遺伝子をアセンブルするのに一層長い時間がかかる(Sandhu et al., "Dual Asymmetric PCR: One-Step Construction of Synthetic Genes," *BioTech.* 12:14-16 (1992)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。突然変異も同様に、Taqポリメラーゼによる低忠実度複製により導入可能であり、時間のかかる遺伝子編集を必要とする。組み換えDNA操作は、Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) (その全体が参照として本明細書に組み込まれている)に従って実施することができる。一工程PCR中での突然変異の導入を避けるために、当該技術分野において周知の高忠実度/低エラーポリメラーゼを用いることができる。

10

【0073】

所望の突然変異は、カセット突然変異誘発、オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発技術((Deng & Nickoloff, "Site-Directed Mutagenesis of Virtually any Plasmid by Eliminating a Unique Site," *Anal. Biochem.* 200:81-88 (1992)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)、またはKunkel突然変異誘発((Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection," *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる)のいずれかを使用してポリペプチド配列に導入することができる。

20

【0074】

カセット突然変異誘発及び部位特異的突然変異誘発は共に、所望の特異的なヌクレオチドコード配列を作製するために使用可能である。上記遺伝子構築物と同一のプロトコルを使用してカセット突然変異誘発を実施することができ、新しい配列をコードする二本鎖DNAフラグメントを、好適な発現ベクター内にクローニングすることができる。新たに合成した(突然変異をコードする)鎖、及び遺伝子合成に使用したオリゴヌクレオチドを組み合わせるにより、多くの突然変異を作製することができる。本発明に係るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に突然変異を導入するのに使用する手法に関係なく、配列決定を行い、突然変異誘発反応により設計した突然変異が導入された(かつ、他の突然変異は導入されない)ことを確認することができる。

30

【0075】

対照的に、Kunkel突然変異誘発を使用して、スクリーニング用ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーを作製するために使用可能な、複数の突然変異ポリペプチドのコード配列を無作為に産生することができる。一般的に、標的化したループ領域(またはC末端もしくはN末端尾部領域)を、NNKコドン(Nは、A、T、G、Cの混合物を示し、KはGとTの混合物を示す)を使用して無作為化することができる(Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection," *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

40

【0076】

抗体またはAmd結合部分をコードする核酸分子を作製するために使用する手法に関係なく、核酸は、従来を組み換えDNA技術を使用して宿主細胞内に導入することができる。通常、これはDNA分子が異種(即ち、通常存在しない)発現系にDNA分子を挿入す

50

ることを伴う。異種DNA分子は、センス方向かつ正しいリーディングフレームで、発現系またはベクター内に挿入される。ベクターは、挿入したタンパク質をコードする配列の転写及び翻訳に必要な要素（プロモーター、サブレッサー、オペレーター、転写終結配列等）を含有する。組み換え遺伝子またはDNA構築物は、発現ベクター内への挿入前に調製することができる。例えば、従来の組み換えDNA技術を使用して、プロモーター有効性DNA分子は、ポリペプチドをコードするDNA分子の5'に機能的に結合することができ、転写終結（即ちポリアデニル化配列）は、その3'に機能的に結合することができる。

【0077】

この態様に関して、ポリヌクレオチドは、分子が異種である発現系またはベクターに挿入される。異種核酸分子は、発現系またはベクターに、プロモーター及び任意の他の5'制御分子に対して適切なセンス（5' 3'）方向、かつ正しいリーディングフレームで挿入される。核酸構築物の作製は、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Springs Laboratory Press, 2001)（その全体が参照として本明細書に組み込まれている）に記載されているような当技術分野において標準的なクローニング法を使用して実施することができる。米国特許第4,237,224号（Cohen及びBoyer）（その全体が参照として本明細書に組み込まれている）もまた、制限酵素切断及びDNAリガーゼによるライゲーションを使用した組み換えプラスミドの形態での、発現系の作製について記載している。

【0078】

好適な発現ベクターとしては、宿主細胞と互換性を有する種に由来するレプリコン及び対照配列を含有するものが挙げられる。例えば、大腸菌を宿主細胞として使用する場合、pUC19、pUC18またはpBR322等のプラスミドを使用してよい。昆虫宿主細胞を使用する場合、昆虫宿主細胞と互換性がある適切な転写ベクターとしては、所望のタンパク質に融合した分泌シグナルを組み込んだpVL1392、pVL1393、pAcGP67及びpAcSecG2T、並びにGST及び6つのHisタグを含有するpAcGHLT及びpAcHLT（BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ）が挙げられる。本態様の実施のために使用するのに好適なウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ノダウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターが挙げられる。他の好適な発現ベクターはSambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Springs Laboratory Press, 2001)に記載されており、その全体が参照として本明細書に組み込まれている。例えば核酸構築物の作製における核酸操作、突然変異誘発、配列決定、DNAの細胞内導入及び遺伝子発現、並びにタンパク質分析のための多くの周知の技術及びプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology (Fred M. Ausubel et al. eds., 2003)に詳細に記載されており、その全体が参照として本明細書に組み込まれている。

【0079】

異なる遺伝信号及びプロセッシング事象は、遺伝子発現の多くのレベル（例えばDNA転写及びメッセンジャーRNA（「mRNA」）翻訳）、及びそれに続く、宿主細胞により産生され発現される抗体または抗体断片の量を制御する。DNAの転写はプロモーターの存在に依存し、プロモーターとはRNAポリメラーゼの結合を指示することによりmRNA合成を促進するDNA配列である。プロモーターは、その「強さ」（即ち、転写を促進する能力）が異なっている。クローニングした遺伝子を発現する目的では、高レベルの転写、及びそれ故発現を得るために、強力なプロモーターを使用するのが望ましい。使用した宿主系に応じて、多数の好適なプロモーターのいずれか1つを使用してよい。例えば、大腸菌：そのバクテリオファージ：またはプラスミド：T7ファージプロモーター、1

10

20

30

40

50

lacプロモーター、trpプロモーター、recAプロモーター、リボソームRNAプロモーター等のプロモーターを使用する場合、lacUV5、ompF、bla、lpp等が挙げられるがこれらに限定されない、大腸菌ファージ及びその他のP_R及びP_Lプロモーターを使用して、隣接するDNA断片の高レベルの転写を指示してよい。更に、組み換えDNAまたはその他合成DNA技術により作製されたハイブリッドtrp-lacUV5(tac)プロモーターまたはその他大腸菌プロモーターを使用して、挿入遺伝子の転写を提供してよい。昆虫細胞を使用する場合、好適なバキュロウイルスプロモーターとしては、39Kタンパク質プロモーターまたは塩基性タンパク質プロモーター等の後期プロモーター、並びにp10及びポリヘドロン(polyhedron)プロモーター等の最後期プロモーターが挙げられる。場合によっては、複数のバキュロウイルスプロモーターを含有する転写ベクターを使用するのが望ましい場合がある。哺乳動物細胞での発現を指示するのに好適な一般的なプロモーターとしてはSV40、MMTV、メタロチオネイン-1、アデノウイルスE1a、CMV、前初期免疫グロブリン重鎖プロモーター及びエンハンサー、並びにRSV-LTRが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターは構造的、あるいは組織特異的または組織誘発性であることができる。加えて、幾つの場合において、誘発性(TetOn)プロモーターを使用することができる。

10

【0080】

原核生物中でのmRNA翻訳は、適切な原核細胞シグナルの存在に依存し、このシグナルは真核生物のものと異なる。原核生物での効率的なmRNA翻訳には、mRNA上に、シャイン・ダルガノ(「SD」)配列と呼ばれるリボソーム結合部分位を必要とする。この配列は、開始コドン、通常AUGの前に位置する、mRNAの短いヌクレオチド配列である。AUGはタンパク質のアミノ末端メチオニンをコードする。SD配列は、16SrRNA(リボソームRNA)の3'末端に相補的であり、rRNAと二重鎖を形成することにより、mRNAのリボソームへの結合を促進し、リボソームの正しい配置を可能にする。遺伝子発現の最大化に関する確認については、Roberts and Lauer, "Maximizing Gene Expression on a Plasmid Using Recombination in vitro," Methods in Enzymology, 68:473-82(1979)を参照のこと(その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

20

【0081】

本発明はまた、本明細書にて開示したDNA構築物で形質転換した宿主細胞も含む。宿主細胞は原核生物または真核生物であることができる。本明細書にて開示したポリペプチドを発現するのに好適な宿主細胞としては、より一般に入手可能なグラム陰性菌のいずれか1つが挙げられる。好適な微生物としては、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、大腸菌(Escherichia coli)、サルモネラ胃腸炎菌(Salmonella gastroenteritis)(ネズミチフス菌(typhimurium))、チフス菌(S.typhi)、腸炎菌(S.enteritidis)、フレクスナー赤痢菌(Shigella flexneri)、ソンネ菌(S.sonnii)、志賀赤痢菌(S.dysenteriae)、淋菌(Neisseria gonorrhoeae)、髄膜炎菌(N.meningitidis)、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、ヘモフィルス・プレウロプネウモニアエ(H.pleuropneumoniae)、パステレラ・ヘモリチカ(Pasteurella haemolytica)、パステレラ・ムルトシダ(P.multilocida)、レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)、梅毒トレポネーマ(Treponema pallidum)、トレポネーマ・デンティコラ(T.denticola)、トレポネーマ・オラール(T.orales)、ボレリア・ブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)、ボレリア菌種(Borrelia spp.)、レプトスピラ・インターロガンズ(Leptospira interrogans)、クレブシエラ肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)、プロテウス・ブルガリス(Proteus

30

40

50

vulgaris)、プロテウス・モルガニイ(P. morganii)、プロテウス・ミラビリス(P. mirabilis)、発疹チフスリケッチア(Rickettsia prowazekii)、発疹熱リケッチア(R. typhi)、リケッチア・リケッチイ(R. rickettsii)、ポルフィロモナス(バクテリオデス)ジンジバリス(Porphyromonas (Bacteriodes) gingivalis)、クラミジア・シッタシ(Chlamydia psittaci)、肺炎クラミジア(C. pneumoniae)、クラミジア・トラコマチス(C. trachomatis)、カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、カンピロバクター・インターメディア(C. intermedis)、カンピロバクター・フィタス(C. fetus)、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、野兔病菌(Francisella tularensis)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、ビブリオ・バラヘモリティカス(Vibrio parahaemolyticus)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、類鼻疽菌(Burkholderie pseudomallei)、ブルセラ・アボルトス(Brucella abortus)、ブルセラ・スシ(B. susi)、ブルセラ・メリテンシス(B. melitensis)、ブルセラ・カニス(B. canis)、鼠咬症スピリルム(Spirillum minus)、鼻疽菌(Pseudomonas mallei)、エロモナス・ハイドロフィラ(Aeromonas hydrophila)、エロモナス・サルモニシダ(A. salmonicida)、及びペスト菌(Yersinia pestis)が挙げられる。

【0082】

細菌細胞に加えて、動物細胞(特に哺乳動物及び昆虫細胞)、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、または藻細胞もまた、本明細書にて開示した種類の単離ポリペプチド分子を有する組み換え発現ベクターのトランスフェクション/形質転換に好適な宿主細胞である。当該技術分野において一般的に使用される哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、COS細胞、及びその他多数が挙げられる。好適な昆虫細胞は、バキュロウイルス感染に罹りやすいものを含み、Sf9及びSf21細胞が挙げられる。

【0083】

宿主細胞を発現ベクターで形質転換/トランスフェクションする方法は当該技術分野において公知であり、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Springs Laboratory Press, 2001)(その全体が参照として本明細書に組み込まれている)に記載のとおり、選択した宿主系に依存する。細菌細胞に関しては、好適な技術としては塩化カルシウム形質転換、電気穿孔法、及びバクテリオファージを使用するトランスフェクションが挙げられる。真核細胞に関しては、好適な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、電気穿孔法、リポソームによるトランスフェクション、並びにレトロウイルスまたは任意のその他のウイルスベクターを使用する形質導入が挙げられる。昆虫細胞に関しては、ポリヌクレオチド構築物を含む転写ベクターを、AcNPV等のバキュロウイルスDNAと共にトランスフェクションし、組み換えウイルスの作製を促進する。続いてSf細胞の組み換えウイルス感染により、高率での組み換えタンパク質産生をもたらす。タンパク質産生を促進するために使用する発現系及び宿主細胞に関係なく、発現した抗体、抗体断片、または抗体模倣物を、当該技術分野において公知であり、Philip L. R. Bonner, Protein Purification (Routledge 2007)(その全体が参照として本明細書に組み込まれている)に記載されている標準的な精製方法を使用して、速やかに精製することができる。

【0084】

組み換えDNA技術を使用して、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを更に改変し、代替の抗体を作製することができる。例えば、マウスモノクローナル抗体の

軽鎖及び重鎖の定常ドメインを、ヒト抗体のこれらの領域に置換して、上述のヒト化（またはキメラ）抗体を作製することができる。あるいは、マウスモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の定常ドメインを非免疫グロブリンポリペプチドに置換して、融合抗体を作製することができる。他の実施形態では、定常領域を切断または除去して、所望のモノクローナル抗体の抗体断片を作製する。更に、可変領域の部位特異的または高密度の組み合わせ突然変異誘発を使用して、モノクローナル抗体の特異性及び親和性を最適化することができる。

【0085】

更なる態様は、担体、及び本発明における1つ以上のモノクローナル抗体またはその1つ以上のAmd結合部分を含む医薬組成物に関する。本医薬組成物は2つ以上の抗体または結合断片を含有してよく、全ての抗体または結合断片は同一のエピトープを認識する。あるいは、医薬組成物は、抗体または結合断片混合物を含有してよく、1つ以上の抗体または断片はブドウ球菌Amdの1つのエピトープを認識し、1つ以上の抗体または結合断片はブドウ球菌Amdの異なるエピトープを認識する。例えば、混合物はブドウ球菌AmdのR1またはR2ドメインに特異的に結合する1つ以上の抗体と共に、Amdの結合する任意の他の抗体（Amdの触媒ドメインに結合する抗体等）を含有してよい。医薬組成物は、以下に記載する製薬上許容できる担体または他の製薬上許容できる成分を更に含有してよい。好ましい実施形態では、担体は水溶液である。

【0086】

本明細書にて開示した抗体を含有する医薬組成物を、ブドウ球菌感染を患う、または患うリスクのある対象に投与することができる。種々のデリバリーシステムが公知であり、本明細書にて開示した抗体を投与するために使用することができる。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻孔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。治療薬は、例えば点滴またはボラス注射により、上皮内層または粘膜皮膚層（例えば口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通した吸収により投与ことができ、化学療法剤、抗生物質製剤、またはその他免疫療法薬等のその他の生物学的活性剤と共に投与することができる。投与は全身的または局所的とすることができる、即ち、ブドウ球菌感染部位にて、または手術もしくは移植部位に直接行うことができる。

【0087】

医薬組成物はまた、患者への第2の治療薬を含んでよく、第2の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬である。代表的な抗生物質製剤としてはバンコマイシン、トブラマイシン、セファゾリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リファンピン、ゲンタマイシン、フシジン酸、ミノサイクリン、コトリモキサゾール、クリンダマイシン、リネゾリド、キヌプリスチン-ダルホプリスチン、ダプトマイシン、チゲサイクリン、ダルババンシン、テラバンシン、オリタバンシン、セフトピプロール、セフトロリン、イクラプリム、カルバペネムCS-023/RO-4908463、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な免疫療法薬としてはテフィバズマブ、BSYX-A110、Aurexis（商標）、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。上の一覧の抗生物質製剤及び免疫療法薬は、非限定とすることを目的としている。したがって、他の抗生物質製剤または免疫療法薬もまた検討される。第2の治療薬の組み合わせまたは混合物もまた、これらの目的のために使用される。これらの作用物質は同時に、または単一の製剤として投与することができる。

【0088】

一実施形態では、免疫療法薬はブドウ球菌グルコサミニダーゼ（Gmd）に特異的に結合し、ブドウ球菌株の*in vivo*増殖を阻害する第2のモノクローナル抗体または結合部分を含む。好ましくは、第2のモノクローナル抗体は指定されたハイブリドーマ細胞株1C11、1E12、2D11、3A8、3H6、もしくは4A12、これらのヒト化変異体、またはこれらの結合部分により作製される（PCT出願公開番号WO2011/140114及びWO2013/066876（Schwarzら）、それら全体が参考として本明細書に組み込まれる）。また、本態様によれば、第2のモノクローナル抗体の

10

20

30

40

50

ヒト化変異体は好ましくは I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 クラスである。

【 0 0 8 9 】

別の実施形態において、第 2 のモノクローナル抗体の結合部分は、F a b 断片、F v 断片、一本鎖抗体、V_H ドメイン、または V_L ドメインを含む。

【 0 0 9 0 】

医薬組成物としては通常、1 つ以上の医薬担体（例えば水、及び石油、動物、植物または合成由来のものを含む油（例えばピーナッツオイル、大豆油、鉱油、ゴマ油等）等の滅菌液）が挙げられる。医薬組成物を静脈内投与する場合、水がより一般的な担体である。食塩水及びデキストロス水溶液及びグリセロール溶液もまた、液状担体として、特に注射可能な溶液として用いることができる。好適な医薬賦形剤としては、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂牛乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。組成物は所望する場合、微量の湿潤もしくは乳化剤、または pH 緩衝剤も含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性剤等の形態を取ることができる。組成物は、従来のトリグリセリド等の結合剤及び担体と共に座薬として製剤化することができる。経口製剤としては、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含むことができる。好適な医薬担体の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences" (E. W. Martin) に記載されている。かかる組成物は、患者に適切な投与形態を提供するように、好適な量の担体と共に、治療に有効な量の、通常は精製形態の核酸またはタンパク質を含有する。製剤は投与方法に対応する。

【 0 0 9 1 】

上述の細菌感染の治療に関する組成物の有効量は、投与方法、標的部位、患者の生理学的状態、投与される他の薬剤、及び治療が予防的であるか治療的であるか、を含む多くの異なる因子に依存し得る。予防用途において、長期間にわたり、比較的低頻度の間隔で比較的少ない用量を投与する。余命期間に治療を受け続ける患者もいる。治療用において、病気の進行が減少または停止するまで、かつ好ましくは、患者が病気の症状の部分的または完全な回復を示すまで、比較的短い間隔で、比較的多くの用量が場合によって必要である。その後、患者に予防レジメンを投与することができる。ブドウ球菌細菌感染に対する予防的治療については、本明細書にて開示した医薬組成物を、個々を細菌に曝露する前に投与することができ、得られる免疫応答が、細菌を個体から除去可能となるように細菌感染の重症度を阻害または低下することができることを意味する。例えば、モノクローナル抗体または医薬組成物を、関節置換術、またはプロテアーゼ移植を伴う任意の手術等の外科的治療の前、最中、及び/または直後に投与することができる。

【 0 0 9 2 】

本明細書にて開示した抗体または結合断片による受動免疫については、用量は、宿主の体重の約 0 . 0 0 0 1 ~ 約 1 0 0 m g / k g、及びより一般的には約 0 . 0 1 ~ 約 1 0 m g / k g の範囲である。例えば、用量は約 1 m g / 体重 k g もしくは約 1 0 m g / 体重 k g、または約 1 ~ 約 1 0 m g / k g の範囲とすることができる。代表的な治療レジメンは、2 週間一度、または 1 ヶ月に一度、または 3 ~ 6 ヶ月に一度の投与を必要とする。幾つかの方法においては、異なる結合特異性を有する 2 つ以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、投与される各抗体の用量は、指示した範囲内に収まる。抗体は通常、複数の機会に投与される。一回用量の間隔は毎日、毎週、毎月、または毎年とすることができる。幾つかの方法においては、用量は、1 ~ 1 0 0 0 μ g / m L、及び幾つかの方法では 2 5 ~ 3 0 0 μ g / m L の血漿抗体濃度に達するように調整される。あるいは、抗体は持続放出性製剤として投与することができ、この場合、より頻度の低い投与が必要となる。用量及び頻度は、患者内の抗体の半減期に応じて変化する。一般に、ヒト抗体が最

10

20

30

40

50

長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び非ヒト抗体が続く。

【0093】

更なる態様は、患者に整形外科用インプラント、組織移植片または医療装置を導入する方法であって、かかるインプラントを必要とする患者に、本明細書にて開示した有効量のモノクローナル抗体、結合部分、または医薬組成物を投与し、かつ、患者に整形外科用インプラントまたは医療装置を導入することを含む方法、に関する。

【0094】

本明細書で使用する場合、医療装置を「導入すること」とは、装置または移植片をはじめて導入するかまたは取り付けること、及び以前に取り付けた装置もしくは移植片の表面を修復するもしくは改変すること、以前に取り付けた装置もしくは移植片の全部もしくは一部を置き換えること、または以前に取り付けた装置もしくは移植片を外科的に変更することと定義される。

【0095】

一実施形態では、整形外科用インプラント、医療装置または移植片の導入方法は、整形外科用インプラント、医療装置または移植片を必要とする患者に、有効量のモノクローナル抗体もしくは結合断片、またはそれらを含む全身に、または移植部位に直接投与することを含む。あるいは、または更に、移植部位にて、整形外科用インプラント、医療装置または移植片を、移植の前、最中または直後にモノクローナル抗体もしくは結合断片、またはそれらを含む医薬組成物で覆うかまたは処理することができる。

【0096】

整形外科用インプラントは、人工関節、移植片または合成インプラント等の、ブドウ球菌感染に罹りやすい任意の種類インプラントとすることができる。代表的な人工関節としては、人工膝関節、人工股関節、手指義手、人工肘関節、人工肩関節、人工顎関節、及び人工足関節が挙げられるが、これらに限定されない。その他のプロテーゼもまた使用することができる。代表的な移植片または合成インプラントとしては人工血管、心臓弁インプラント、人工椎間板、半月板インプラント、または合成もしくは同種異系の前十字靭帯、内側側副靭帯、外側側幅靭帯、後十字靭帯、アキレス腱、及び回旋腱板が挙げられるが、これらに限定されない。他の移植片またはインプラントもまた使用することができる。

【0097】

医療装置は、ブドウ球菌感染に罹りやすい任意の医療装置とすることができる。代表的な医療装置としては心臓ペースメーカー、髄液シャント、透析カテーテル、または人工心臓弁が挙げられるが、これらに限定されない。

【0098】

この態様に関して、第2の治療薬もまた患者に投与してよい。第2の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬であってよい。代表的な抗生物質製剤及び免疫療法薬については、上述した通りである。

【0099】

一実施形態では、整形外科用インプラントまたは医療装置の導入方法は、再関節全置換術の取り付けプロセスを包含することを意図している。元の関節置換術において感染、特にブドウ球菌属種感染が発生する場合、唯一の有効な治療は、再関節全置換術である。この実施形態では、感染した人工関節をまず取り外した後、患者の根本的な感染を治療する。感染の治療は長期間（即ち6ヶ月）にわたり、この間、患者は動けず（または制限される移動性のみを有する）、根本的な感染を治療するために抗生物質、及び所望により本明細書にて開示した1つ以上のモノクローナル抗体もしくは結合部分、または医薬組成物を受ける。根本的な感染の治療の際に、新しい人工関節を取り付ける。新しい人工関節の取り付けの直前（即ち、新しい人工関節の取り付け前二週間以内）、及び所望により取り付け後に、本明細書にて開示した1つ以上のモノクローナル抗体もしくは結合部分、または医薬組成物を患者に投与する。この治療は、取り付け後の期間に一度以上繰り返すことができる。抗生物質治療薬を、本明細書にて開示した1つ以上のモノクローナル抗体もしくは結合部分、または医薬組成物と組み合わせて、または同時に投与してよい。これらの治

10

20

30

40

50

療は、再関節全置換術中の感染または再感染を予防するのに効果的である。

【0100】

別の態様は、ブドウ球菌感染に罹りやすい、または患う患者に、本明細書にて開示した有効量のモノクローナル抗体、モノクローナル抗体結合部分、もしくは医薬組成物、またはこれらの組み合わせを投与することを伴う、ブドウ球菌感染の治療または予防方法に関する。

【0101】

ブドウ球菌感染治療の一実施形態では、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体結合部分、医薬組成物、またはこれらの組み合わせの投与を繰り返す。初期投与及び反復投与は、他の治療法と比較して同時または連続とすることができ、全身に実施するか、もしくはブドウ球菌感染の部位に直接実施するか、またはその両方とすることができる。

10

【0102】

ブドウ球菌感染の治療方法を使用して、皮膚、筋肉、心臓、気道、胃腸管、眼、腎臓及び尿路感染、並びに骨または関節感染を含むがこれらに限定されない部位にてブドウ球菌感染を治療することができる。

【0103】

一実施形態では、本方法を実施して、骨または関節でのブドウ球菌感染を有する患者に、有効量のモノクローナル抗体もしくはその結合断片、または医薬組成物を投与することにより骨髄炎を治療する。これらの作用物質または組成物の投与を、上で説明した経路のいずれかを使用して実施することができる。特定の実施形態において、骨または関節感染の部位への直接投与を実施することができる。

20

【0104】

上記実施形態のそれぞれにおいて、第2の治療薬もまた患者に投与してよい。第2の治療薬は抗生物質製剤または免疫療法薬であってよい。代表的な抗生物質製剤及び免疫療法薬については、上述した通りである。

【0105】

本明細書にて開示する治療方法を使用して、ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む、必要とする任意の患者を治療することができるが、この方法は特に、任意の年齢の免疫不全の患者、及び50歳を超える患者に有用である。

【0106】

上記実施形態において、処理の予防的または治療的方法は、感染速度、感染の重症度、感染期間、またはこれらの任意の組み合わせを低減することができる。特定の実施形態において、処理の予防的または治療的方法は、SRCもしくは膿瘍の合計数を減少させるかもしくは全て除去し、かつ/または無菌SRCもしくは膿瘍の数を増加させることができる(SRCまたは膿瘍と推定されるものは存在する)。特定の実施形態において、損傷寸法または容積の減少により示される、溶骨性病変の完全または部分的な治癒が企図される。

30

【0107】

別の態様は、サンプルを本明細書にて開示したモノクローナル抗体または結合部分に曝し、かつモノクローナル抗体または結合部分と、サンプル内に存在するブドウ球菌またはブドウ球菌アミダーゼとの間に免疫複合体が形成するかどうかを検出することを伴う、サンプル内でのブドウ球菌の存在の測定方法に関し、前記曝露後に免疫複合体が存在することは、サンプル内にブドウ球菌が存在することを示す。

40

【0108】

サンプルは、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、粘膜関連リンパ組織(MALT)サンプル、脳脊髄液サンプル、関節液サンプル、胸膜液サンプル、唾液サンプル、尿サンプル、または組織生検サンプルとすることができる。

【0109】

免疫複合体の形成の検出は、当該技術分野における周知の方法により実施することができる。一実施形態では、検出はイムノアッセイを使用して実施する。使用するイムノアッ

50

セイ法は、周知のイムノアッセイ法、例えばラテックス凝集法、比濁分析法、ラジオイムノアッセイ法（例えばRIA及びRIMA）、酵素イムノアッセイ法（例えばELISA及びEIA）、ゲル核酸沈殿反応、フローサイトメトリー、免疫電気泳動（例えばウェスタンブロットング）、ドットプロット法、免疫拡散アッセイ、プロテインAイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ（例えばFIA及びIFMA）、免疫クロマトグラフィー法等の一般的なイムノアッセイ法であってよく、かつ抗体アレイ法を言及してもよいが、これらに限定されない。これらのイムノアッセイ法は、これら自体が当分野で既知であり、当業者により容易に実施されることができる。

【0110】

モノクローナル抗体または結合部分を、当該技術分野において公知の各種方法により直接標識することができる。標識は、モノクローナル抗体または結合部分に、イムノアッセイ中に検体が結合する程度を測定するための試薬の手段として機能する。標識は非限定的に、放射性同位体、酵素、発色団、フルオロフォア、光吸収または屈折粒子とすることができる。標識は、放射線標識、フルオロフォア、または化学発光標識であるのが好ましい。抗体または結合部分を、その免疫反応性をできる限り広範にわたり破壊することなく標識することが好ましい。

【実施例】

【0111】

以下の実施例は、特許請求の範囲の主題の実践を例示するが、その範囲をいかなる方法でも制限しないことを意図している。

【0112】

実施例1 - 抗原の調製

N末端付近にヘキサ - ヒスチジン配列を含む黄色ブドウ球菌自己溶解素のアミダーゼドメイン（His - Amd）全体の組み換え形態を調製した。His - Amdのオープンリーディングフレームは、黄色ブドウ球菌自己溶解素の既知の配列を収集し、Geneious（商標）ソフトウェアを使用して、コンセンサスタンパク質配列を測定し、次いで大腸菌内での発現のためにコドンの使用を最適化することにより設計した。His - Amdに関して、コードされるコンセンサスタンパク質及びコードするオープンリーディングフレーム配列を、以下のSEQ ID NO: 1及び2として示す。

SEQ ID NO: 1（ヘキサ - ヒスチジンリーダー配列に加え、自己溶解素 aa 198 - 775）

MHHHHHSASAQPRSVAAATPKTSLPKYKQVNSSINDYIRKNNLKAPKIEEDYTSYFPKYAYRN
GVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHAFVDGDRIIETAPTDYLSWVGAVGNP
RFINVEIVHTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYYGLKPDSAEYDGNQTVWTHYAVSKYLGTDH
ADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINKEYLIKMGKVAPWGTQSTTTPTTPSKPPTTPSKPSTGKLTVA
ANNVAQIKPTNSGLYTTVYDKTGKATNEVQKTFVSKTATLGNQKFYLVQDYNNGNKGFWVKEG
DVVYNTAKSPVNVNQSYSIKPGTKLYTVPWGTQVAGSVSGSNQTFKASKQQQIDKSIYLYG
SVNGKSGWVSKAYLVDTAKPTPTPKPSTPTTNNKLTVSSLNGVAQINAKNNGLFTTVYDKTG
KPTKEVQKTFVAVTKEASLGGNKFYLVKDYNSTLIGWVKQGDVIYNNAKSPVNVMTYTVKPGT
KLYSVPWGTYKQEAGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLFQTVNGKSGWVSKAYLAVPAAPKKA
VAQPKTAVK

SEQ ID NO: 2

10

20

30

40

ATGCACCATCACCACCACCACAGCGCAAGCGCACAGCCTCGTTCCGTCGCCGCCACCCCGAAAA
 CCAGCTTGCCGAAGTACAAACCGCAAGTTAATAGCAGCATCAACGACTACATCCGCAAAAACAA
 CCTGAAGGCCCGAAAAATTGAAGAGGACTATACCAGCTATTTCCCGAAATATGCTTACCGTAAT
 GGTGTCGGTTCGTCGGAGGGTATTGTGGTCCACGACACCGCGAATGACCGTAGCACCATCAACG
 GTGAGATTAGCTACATGAAAAACAATTACCAAAACGCGTTCGTGCACGCCTTCGTTCGATGGCGA
 TCGCATCATCGAAACCGCGCCAACCGACTATCTGTCTGGGGTGTGGGTGCCGTTGGCAACCCG
 CGTTTCATCAATGTGGAGATTGTTTCATACCCACGACTACGCGAGCTTTGCACGTAGCATGAACA
 ACTACGCCGATTATGCTGCAACGCAGCTGCAGTACTACGGCCTGAAACCGGATAGCGCGGAGTA
 TGACGGTAACGGTACGGTGTGGACGCATTATGCGGTGAGCAAATACCTGGGTGGTACCGATCAT
 GCTGATCCGCATGGCTACCTGCGCTCTCACAACCTATAGCTACGACCAGTTGTACGACCTGATCA
 ATGAGAAATATCTGATTAAGATGGGTAAAGTTGCACCGTGGGGTACGCAGAGCACCACGACGCC
 GACCACGCCGAGCAAACCGACGACCCCGTCCAAACCGTCTACCGGCAAACCTGACGGTCGCGGCT
 AATAACGGTGTTCGCGCAGATTAAACCGACCAACAGCGGTCTGTACACCACCGTCTATGATAAAA
 CGGGCAAAGCCACCAATGAGGTTCAAAGACGTTTCGCAGTTAGCAAACCGGCGACCCTGGGTAA
 CCAAAGTTCTACCTGGTTCAGGATTACAATAGCGGCAACAAATTTGGTTGGGTGAAAGAAGGC
 GACGTTGTGTACAATACCGCGAAGTCCCCGGTGAACGTTAATCAGAGCTATAGCATCAAGCCGG
 GTACCAAATTTGTATACGGTGGCGTGGGGTACCAGCAAGCAAGTTGCGGGTAGCGTCAGCGGCTC
 TGGTAACCAGACCTTCAAGGCGTCTAAGCAACAACAAATTTGACAAAAGCATTTACCTGTATGGT
 AGCGTTAATGGTAAAAGCGGCTGGGTGTCTAAAGCGTATCTGGTTCGACACCGCAAAGCCGACGC
 CAACGCCGACCCCGAAGCCGAGCACCACAACCAACAACAAGCTGACGGTCAGCTCCCTGAA
 TGGTGTTCGCGCAAATCAATGCGAAGAATAATGGCCTGTTTACCACCGTTTACGATAAGACGGGC
 AAGCCAACGAAAGAAGTCCAGAAAACCTTTGCTGTCACCAAAGAAGCCAGCCTGGGCGGTAACA
 AGTTCTATCTGGTTAAGGACTACAACCTCCCCGACGCTGATCGGTTGGGTCAAACAAGGCGATGT
 CATTTACAATAACGCGAAAAGCCCGGTTAATGTGATGCAAACCTATACCGTCAAACCGGGTACG
 AAGCTGTATTCGTTCCGTGGGGCACGTACAAACAAGAAGCAGGCGCGGTGAGCGGTACCGGCA
 ATCAGACCTTTAAGGCCACCAAGCAGCAGCAGATCGATAAATCTATTTACTTGTTTGGCACCGT
 GAATGGCAAGAGCGGTTGGGTTTCTAAGGCATACCTGGCGGTGCCGCGCAGCACCGAAGAAGGCG
 GTGGCGCAGCCAAAGACCGCAGTGAAG

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】

H i s - A m d をコードする D N A 分子を D N A 2 . 0 (M e n l o P a r k , C A)
) により新規に合成した後、 p J e x p r e s s 大腸菌発現ベクター内に挿入した。

【 0 1 1 4 】

大腸菌内で発現した H i s - A m d タンパク質は主に不溶性封入体の形態であり、これ
 を回収し、8 M の尿素を含む P B S 中に可溶化した。T A L O N 樹脂上での金属錯体化ク
 ロマトグラフィーによる更なる精製の後、H i s - A m d を、1 m M の $Z n^{2+}$ を含有す
 るリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に対する透析の全体プロセス、及び尿素量の段階的な
 減少により、復元した。

【 0 1 1 5 】

R 1 及び R 2 ドメインをコードするオープンリーディングフレーム部分を取り除いたこ
 とを除き、A m d 触媒ドメイン (H i s - A m d - 触媒) を同一の方法で調製した (図 1
 を参照) 。 H i s - A m d - 触媒に関して、コードされるコンセンサスタンパク質及びコ
 ードするオープンリーディングフレーム配列を、以下の S E Q I D N O : 3 及び 4 と

S E Q I D N O : 3 (ヘキサ - ヒスチジンリーダー配列に加え、自己溶解素 a a 1 9
 8 - 4 4 1)

MHHHHHSASAAQPRSVAAATPKTSLPKYKPVNNSINDYIRKNNLKAPKIEEDYTSYFPHYAYRN
 GVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHAFVDGDRIIETAPTDYLSWVGAVGNP
 RFINVEIVHTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYYGLKPDSAEYDGNGTVWTHYAVSKYLGSTDH
 ADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINKEYLIKMGKVAPWGTQSTTTPTTSPKPTTSPKPSTGK

S E Q I D N O : 4

ATGCACCATCACCACCACCACAGCGCAAGCGCACAGCCTCGTTCGGTCGCCGCCACCCCGAAAA
 CCAGCTTGCCGAAGTACAAACCGCAAGTTAATAGCAGCATCAACGACTACATCCGCAAAAACAA
 CCTGAAGGCCCGAAAAATTGAAGAGGACTATACCAGCTATTTCCCGAAATATGCTTACCGTAAT
 GGTGTCGGTCGTCCGGAGGGTATTGTGGTCCACGACACCGCGAATGACCGTAGCACCATCAACG
 GTGAGATTAGCTACATGAAAAACAATTACCAAAACGCGTTCGTGCACGCCTTCGTGCATGGCGA
 TCGCATCATCGAAACCGCGCCAACCGACTATCTGTCTGGGGTGTGGGTGCCGTTGGCAACCCG
 CGTTTCATCAATGTGGAGATTGTTTCATACCCACGACTACGCGAGCTTTGCACGTAGCATGAACA
 ACTACGCCGATTATGCTGCAACGCAGCTGCAGTACTACGGCCTGAAACCGGATAGCGCGGAGTA
 TGACGGTAACGGTACGGTGTGGACGCATTATGCGGTGAGCAAATACCTGGGTGGTACCGATCAT
 GCTGATCCGCATGGCTACCTGCGCTCTCACAACCTATAGCTACGACCAGTTGTACGACCTGATCA
 ATGAGAAATATCTGATTAAGATGGGTAAGGTTGCACCGTGGGGTACGCAGAGCACCACGACGCC
 GACCACGCCGAGCAAACCGACGACCCCGTCCAAACCGTCTACCGGCAAA

10

【0116】

実施例2 - マウスの接種及びハイブリドーマの調製

初期のハイブリドーマ融合（融合番号1）に関して、Sigma Adjuvant System（Sigma, カタログ番号S6322）内で、6匹のメスBalb/cマウスを、His - AmdR1R2 75 μgで7週間間隔の二度の腹腔内注射により免疫化した。固定化したHis - AmdR1R2のELISAにおいて、最高の力価を有するマウス2匹をハイブリドーマ融合のために選択した。各マウスは、His - AmdR1R2 350 μgの腹腔内での最終的な免疫化を受け、4日後に犠牲にし、ハイブリドーマ融合を行った。

20

【0117】

第2のハイブリドーマ融合（融合番号2）について、Balb/cマウスを二度免疫化した：最初の用量は、Sigma Adjuvant System（Sigma, カタログ番号S6322）内でGenScript（ロット番号222933S05/P20011303）のHis - AmdR1R2 - B 120 μg、第2の免疫化は、12週間の間隔で、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）（Imject EDC mc KLH Spin Kit; Thermo Scientific; カタログ番号77671）とコンジュゲートしたHis - AmdR1R2 - B 100 μgであった。固定化したHis - AmdR1R2のELISAにおいて、最高の力価を有するマウス2匹をハイブリドーマ融合のために選択した。各マウスは、His - AmdR1R2 100 μgの腹腔内での最終的な免疫化を受け、4日後に犠牲にし、ハイブリドーマ融合を行った。

30

【0118】

従来の方法により、脾細胞からハイブリドーマを調製した。

【0119】

実施例3 - モノクローナル抗体の性質決定

新しいモノクローナル抗体を複数の関連タンパク質についてスクリーニングし、これらは内在性Amd（かつ組み換え形態ではない）を認識したこと、及びこれらのエピトープが触媒ドメイン（C）または細胞壁結合ドメイン（R1、R2もしくはR3）に存在するかを測定した。モノクローナル抗体のスクリーニングに使用したタンパク質を下表1に示す。

40

【0120】

（表1）モノクローナル抗体のスクリーニングに使用したタンパク質

タンパク質／抗原名	自己溶解素の領域／配列の説明
His-AmdR1R2	MGHHHHHHH – 自己溶解素 アミノ酸198～775
His-Amdcat	MGHHHHHHH – 自己溶解素 アミノ酸198～441
未変性 Amd	完全長自己溶解素 (アミノ酸198～1276)、Amd (アミノ酸198～775) 及びGmd (アミノ酸776～1276) を含む、黄色ブドウ球菌UAMS-1Δspaタンパク質の混合物
His-AmdR1R2-B	MGHHHHHHH – 自己溶解素 アミノ酸198～775-BirAビオチン化部位
His-R3Gmd-B	MGHHHHHHH – 自己溶解素 アミノ酸776～1276-BirAビオチン化部位

10

【 0 1 2 1 】

表 1 に示したタンパク質を捕捉抗原として使用する E L I S A により、スクリーニングアッセイを実施した。E L I S A 試験は、幅広く実践されている伝統的手法を使用して実施した。具体的には、抗原を N U N C M a x i s o r p マイクロタイタープレートのウェル上に吸着させた。各抗原を、2 μ g / m L のリン酸塩 - 緩衝生理食塩水 (P B S) 溶液として調製し、100 μ L を割り当てたマイクロタイターウェルに加え、抗原を室温で 1 時間、または 4 時間で一晩のいずれかで吸着させた。覆っている抗原を除去せずに、3 % ウシ血清アルブミン (B S A) 200 μ L を添加してウェルをブロックし、室温で 1 時間、または 4 時間で一晩のいずれかでインキュベーションした。次に、コーティング及びブロックしたプレートを、0.05 % T w e e n 20 を補充した P B S (P B S - T) で 3 回洗浄し、直ちに使用したが、4 時間で保管した。

20

【 0 1 2 2 】

細胞非含有ハイブリドーマ培養上清液を割り当てたウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベーションした後、P B S - T で 6 回洗浄した。次に、二次抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体化ヤギ抗マウス I g G (S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y) を、P B S - T 中に 0.1 ~ 0.5 μ g / m L にてウェルあたり 100 μ L で加え、室温で 1 時間インキュベーションした。マイクロタイタープレートを再度、P B S - T で 6 回洗浄した後、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (T M B) または 2, 2' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) (A B T S) のいずれか 100 μ L を加えることにより、顕色した。これらの E L I S A の結果を、下表 2 に示す。

30

【 0 1 2 3 】

(表 2) クローニング成功及び特性決定した抗 A m d m A b の概要

抗Amd mAb	重鎖 クラス	アミダーゼ ドメイン CまたはR1R2	未変性 アミダーゼ でIP	黄色ブドウ球菌 の沈降	K _D	アミダーゼ 酵素 阻害
1.1	IgG1	R1R2	あり	あり	2.5 nM	なし
1.2	IgG1	R1R2	あり	あり	ND	なし
1.4	IgG1	R1R2	あり	あり	ND	ND
1.5	IgG1	R1R2	あり	あり	ND	なし
1.6	IgG1	C	あり	あり	2.1 nM	あり
1.7	IgG1	R1R2	あり	あり	ND	なし
1.8	IgG1	R1R2	あり	あり	2.6 nM	なし
1.9	IgG1	R1R2	あり	あり	2.6 nM	なし
1.10	IgG1	C	なし	ND	ND	ND
1.11	IgG1	R1R2	あり	あり	3.4 nM	なし
1.12	IgG1	R1R2	なし	なし	ND	ND
1.13	IgG1	C	あり	なし	ND	ND
1.14	IgG1	R1R2	なし	ND	ND	ND
1.15	IgG1	R1R2	あり	あり	ND	ND
1.16	IgG1	C	あり	あり	2.6 nM	なし
1.17	IgG1	C	あり	なし	ND	なし
2.1	IgG1	C	あり	あり	4.9 nM	あり
2.2	IgG1	C	あり	あり	1.4 nM	なし
2.4	IgG1	R1R2	あり	あり	1.9 nM	なし
2.5	IgG1	R1R2	あり	あり	6.3 nM	なし

ND = 測定されず。

【0124】

実施例4 - *in vitro*でのAmdの触媒活性の阻害

治療用モノクローナル抗体の効力に寄与しうる特質は、細菌増殖及び生残に不可欠な、アミダーゼ等の酵素の活性を直接阻害することである。抗Amd mAbの幾つかを、黄色ブドウ球菌ペプチドグリカンの混濁した懸濁液を透明にするアミダーゼの能力を阻害した程度を測定することにより、アミダーゼ活性の阻害について試験した。融合番号1からの8つの抗体の結果を図2に示す。mAb Amd 1.6はアミダーゼ活性の強力阻害剤である一方で他はそうではなく、低い親和性阻害剤であるようであるAmd 1.16は例外の可能性ある。全ての抗体についての結果を表2にまとめている。

【0125】

実施例5 - 抗Amd mAbの大部分が黄色ブドウ球菌を沈殿させる

治療用モノクローナル抗体の効力に関して重要であろう別の特質は、無傷の細菌細胞の外側から接近可能な抗原構造(エピトープ)の認識である。この認識の可視的な発現は、懸濁液から沈殿する巨大な凝集体内への、抗体が仲立ちする個々の細菌のクラスタリングにより、細胞リッチなペレット及びさほど混濁していない上清を得ることである。候補mAbの多くは、図3に示すようにはっきりとした沈殿物を形成した。融合1及び2からの候補mAbの沈殿活性の一覧は、表2にある。

【0126】

実施例6 - 各mAbの独自性、及び配列決定に基づく生殖細胞系の割り当ての特定

遺伝子の割り当ては、抗Amd重鎖及び軽鎖配列のヌクレオチド配列を、国立生物工学情報センターのIgBLAST内にある、既知のマウスV領域配列のファイルとマッチングすることにより特定した。本分析の結果を下表3に表す。融合番号1のそれぞれの抗体は、同一の生殖細胞系V_H遺伝子断片に由来した可能性のあるAmd 1.1及び1.4を除いて独自のであった。融合番号2からの2つの抗体は、融合番号1で単離したmAbと重鎖V_H及びJ_H遺伝子断片を共有する(mAb Amd 2.4とmAb Amd 1.1; mAb Amd 2.2とmAb Amd 1.7)。各場合において、軽鎖が異なる。

【 0 1 2 7 】

(表 3) 最も可能性の高い生殖細胞系 V_H 、 J_H 、 V_L 及び J_L 遺伝子セグメント

ハイブリドーマ	生殖細胞系 V_H	生殖細胞系 J_H	生殖細胞系 V_L	生殖細胞系 J_L	
Amd 1.1	IGHV14-3 (7)	IGHJ4 (0)	IGKV4-50 (6)	IGKJ2 (0)	
Amd 1.2	IGHV1-14 (4)	IGHJ2 (0)	IGKV5-43 (0)	IGKJ2 (0)	
Amd 1.4	IGHV14-3 (6)	IGHJ4 (0)	NA	NA	
Amd 1.5	IGHV14-1 (11)	IGHJ4 (0)	NA	NA	
Amd 1.6	IGHV1-5 (8)	IGHJ3 (0)	IGKV6-32 (3)	IGKJ1 (0)	
Amd 1.7	IGHV1S29 (7)	IGHJ2 (0)	IGKV6-32 (3)	IGKJ1 (0)	10
Amd 1.8	NA	NA	IGKV5-39 (2)	IGKJ2 (0)	
Amd 1.9	IGHV5S12 (5)	IGHJ2 (0)	IGKV12-46 (8)	IGKJ1 (0)	
Amd 1.10	NA	NA	IGKV4-68 (0)	IGKJ2 (0)	
Amd 1.11	IGHV9-3-1 (2)	IGHJ4 (0)	IGKV5-48 (0)	IGKJ5 (0)	
Amd 1.12	IGHV1-54 (3)	IGHJ4 (0)	IGKV12-44 (6)	IGKJ2 (0)	
Amd 1.13	IGHV1-82 (7)	IGHJ4 (0)	IGKV8-19 (1)	IGKJ4 (0)	
Amd 1.15	NA	NA	IGKV6-17 (7)	IGKJ4 (0)	
Amd 1.16	IGHV1-80 (6)	IGHJ4 (0)	NA	NA	
Amd 1.17	IGHV5-4 (2)	IGHJ2 (0)	IGKV1-117 (1)	IGKJ1 (0)	20
Amd 2.1	IGHV5S12 (5)	IGHJ4 (0)	IGKV8-19 (4)	IGKJ5 (0)	
Amd 2.2	IGHV1S29 (5)	IGHJ2 (0)	IGKV4-86 (1)	IGKJ5 (0)	
Amd 2.4	IGHV9-3-1 (1)	IGHJ4 (0)	IGKV4-63 (7)	IGKJ2 (0)	
Amd 2.5	NA	NA	IGKV12-41 (9)	IGKJ2 (0)	

括弧内の数字は、抗 Amd 配列と推定上の生殖細胞系前駆体との間に見られる非同義の塩基変化の数である。NA = 配列決定が成功しなかった。

【 0 1 2 8 】

実施例 7 - 黄色ブドウ球菌アミダーゼに対する抗 Amd mAb の親和性の測定

抗菌抗体に必要不可欠な特質は、細菌抗原に対する高親和性である。親和性が高ければ高いほど、予防または治療に必要な投与量は少なくなる。幾つかの治療用抗体は、 K_D として表される親和性を、 10 nM ($K_A = 10^8\text{ M}^{-1}$) の範囲で有するが、 K_D が約 1 nM (K_A が約 10^9 M^{-1}) の抗体を有するのが一般的に望ましい。可溶性 His - Amd R1R2 - B に対する固定化抗 Amd mAb の親和性を、Biacore T-200 で表面プラズモン共鳴技術を使用して測定した。mAb Amd 1.6 の代表的なデータを図 4 に示す。Amd に対するこの平均親和性は約 2.1 nM であるが、図 4 は、約 1 nM の測定親和性を示す。他の候補 mAb に対して測定した親和性を、表 2 に一覧にしている。

【 0 1 2 9 】

実施例 8 - 抗 Amd mAb Amd 1.6 は、黄色ブドウ球菌株 UAMS - 1 による *in vitro* バイオフィーム形成を阻害する

Amd は、バイオフィーム形成に關与することが報告されている (Bose et al., "Contribution of the Staphylococcus aureus Atl AM and GL Murein Hydrolase Activities in Cell Division, Autolysis, and Biofilm Formation," PLoS One 7:e42244 (2012)); Chen et al., "Secreted Proteases Control Autolysin-mediated Biofilm Growth of Staphylococcus aureus," J Biol Chem. 288:29440-29452 (2013); Houston et al., "Essentia

l Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-binding Protein-mediated Staphylococcus aureus Biofilm Phenotype, "Infect Immun. 79:1153-1165 (2011)、それら全体が参照として本明細書に組み込まれている)。バイオフィーム形成は、*in vivo*での、特に整形外科用インプラントに関係する黄色ブドウ球菌感染の持続性の中核をなすと考えられているプロセスである (Ehrlich and Arciola, "From Koch's Postulates to Biofilm Theory: The Lesson of Bill Costerton, "Internat'l J Artificial Organs 35:695-699 (2012)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。抗Amd mAb 1.6がバイオフィーム形成を阻害する能力を測定するために、バイオフィーム形成測定用に特異的に設計した黄色ブドウ球菌株UAMS-1をカルガリープレート内で増殖させた (Ceri et al., "The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms, "J Clin Microbiol. 37:1771-1776 (1999)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。自己溶解素遺伝子 (*atl*) 並びにそのAmd (*amd*) 及びGmd (*gmd*) サブドメインの欠失変異体はそれぞれ、WT UAMS-1よりも実質的に少ないバイオフィームを形成した (WTの20~35%)。Amd 1.6単独、または抗Gmd mAb 1C11と組み合わせたAmd 1.6 (PCT出願公開番号WO2011/140114 (Schwarzら)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている) は50%を超えてバイオフィーム形成を減少させたが、特異性が無関係のアイソタイプ適合mAbは効果を有しなかった (図5)。外因性抗Amd mAbによる細胞外Amdの阻害は、自己溶解素遺伝子の欠失とほぼ同じ程度に効果的である。

【0130】

実施例9 - 抗Amd mAb Amd 1.6はインプラントが関係する骨髄炎の *in vivo* モデルにおけるバイオフィーム形成を減少させる

インプラントが関係するバイオフィームは、整形外科が示す持続性感染の主な原因と考えられているため、モデルインプラントにおけるバイオフィーム形成の程度を減少させる能力は、抗Amd予防の潜在的な臨床的利益の評価基準として解釈することができる。インプラントが関係する骨髄炎を患う、モデルインプラントが関心対象の画定された領域 (インプラント上の0.5×2.0mmの平面) を有するマウスモデルを使用して、黄色ブドウ球菌による14日間の感染中に、バイオフィームで覆われた領域を測定した。図6Aに示すとおり、最大の感染範囲は約40~50%であり、マウスは無関係な特異性を有するアイソタイプ適合抗体で処理されていた。mAb Amd 1.6単独、または抗Gmd mAb 1C11と組み合わせたmAb Amd 1.6は、対照と比較して約50%、バイオフィーム形成を減少させた (図6B、6C、6E)。バイオフィーム形成のこの減少の程度は、自己溶解素遺伝子 (*atl*) の遺伝的欠失により得られる減少の程度に相当し (図6B、6D、6E)、バイオフィーム形成の観点において、内部遺伝子欠失及び外因性抗Amd抗体による干渉が機能的に等価であることを示している。

【0131】

実施例10 - 抗Amd mAb Amd 1.6による受動免疫は、黄色ブドウ球菌感染から生じる骨溶解の容積を減少させる

骨の黄色ブドウ球菌感染による特徴的な形質の1つは、感染細菌により誘発される炎症反応から生じる骨溶解である。したがって、溶解した骨の容積 (骨溶解容積) の減少は、感染の制限の尺度として受け取られる。抗Amd mAb Amd 1.6が骨の損傷を制限するかどうかを確認するために、5匹の6~10週齢のメスBalb/cマウスのグループを、合計用量40mg/kgにて、PBS (未治療対照)、抗Gmd mAb 1C

11、抗Amd mAb Amd1.6、または組み合わせ(1C11+Amd1.6)で腹腔内にて免疫化した。24時間後、右側脛骨を通して、各マウスに生物発光CA-MRSA株であるUSA300 LAC::luxで汚染したピンを挿入した。

【0132】

Xenogen IVIS Spectrumイメージングシステム(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)を使用して、0、3、5、7、10、及び14日目に、全てのマウスに生物発光イメージングを実施し、3日目のピークBLIを上述したように定量化した(Liet al., "Quantitative Mouse Model of Implant-associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity," J Orthop Res 26:96-105(2008)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。各治療群の代表的なBLIを図7Aに示し、各治療群に細菌負荷が存在することを示した。

10

【0133】

得られた感染を14日間進行させてから動物を犠牲にし、感染した脛骨を、上述したマイクロCTによる分析のために回収した(Liet al., "Effects of Antiresorptive Agents on Osteomyelitis: Novel Insights into the Pathogenesis of Osteonecrosis of the Jaw," Ann N Y Acad Sci 1192:84-94(2010)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。未治療の対照では、内側及び外側の両方で骨溶解が広範囲にわたっており(図7B)、骨溶解容積は平均で0.4mm³を超えた。骨溶解容積の低下は、抗体で治療したマウスの3つの群全てにおいて測定した(図7C)。併用療法を受ける1匹の個体では、骨溶解容積は0と計算され、これは感染したインプラント部位の完全な治癒を示している。この個体における併用抗体療法の効果は、無菌のピン、及び効果的な抗生物質療法で治療した感染ピンの療法(即ち、Liet al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity," J Orthop Res 26:96-105(2008)に記載されているゲンタマイシン治療:その全体が参照として本明細書に組み込まれている)と同等である。この個体は抗生物質療法なしで、感染したインプラントの見事な治療を初めて示したと考えられている。

20

30

【0134】

実施例11-抗Amd mAb Amd1.6による受動免疫は細菌の伝播を有意に低下させる

膿瘍の形成は、感染の重症度の別の指標である。形成した膿瘍の数を、実施例10で試験したのと同じマウスで測定した。組織学的部分をオレンジG/アルシアンブルー(ABG/OH)で染色すると、膿瘍を、非染色領域により区切られた炎症性宿主細胞の円形領域として表し、場合によっては中心に濃い赤色で染色された病巣を表す。通常、病巣はブドウ球菌膿瘍コミュニティ(SAC)である。炎症細胞は好中球であり、殆どは中心付近で死んでおり、かつ殆どは周辺部で生きており、非染色領域はフィブリンから形成されるカプセルである。未治療のマウスでは、複数の膿瘍が形成し(図8A)、脛骨1つあたり、平均でおおよそ4.5個であった(図8C)。対照的に、mAb Amd1.6で治療したマウスでは、平均わずか2個の膿瘍であり、抗Gmd mAb 1C11または組み合わせで治療したマウスも同様であった(図8B、8C)。

40

【0135】

実施例12-抗Amd mAb Amd1.6のみ、または抗Gmd 1C11との組み合わせによる受動免疫は、無菌性膿瘍の形成を促進し、骨の治癒を加速させる

50

図8Bに表される同じ組織学的部分の詳細な調査は、予想しない発見をもたらした。一貫して、髄内のグラム染色膿瘍は、PBSで治療したマウスの脛骨で発見されたのみであった(図9A-B)が、抗Atlで治療したマウスの脛骨における損傷は、グラム陽性細菌を含有しない無菌性膿瘍の特徴を有していた(図9C-H)。更に、プラシーボ治療のマウスの脛骨における損傷は、ブドウ球菌膿瘍コミュニティ(SAC)のはっきりとした組織学的特徴を有していた(Cheng et al., "Genetic Requirements for Staphylococcus aureus Abscess Formation and Persistence in Host Tissues," *FASEB J* 23(10):3393-3404(2009); Cheng et al., "Contribution of Coagulases Towards Staphylococcus aureus Disease and Protective Immunity," *PLoS Pathog* 6(8):e1001036(2010)、それらそれぞれの全体が参照として本明細書に組み込まれている)が、抗Atl治療マウスの脛骨には、SACは見られなかった(図10A-Bと図10C-Hを比較)。最終的に、そして最も驚くべきことに、抗Amdと抗Gmdを組み合わせた受動免疫は、14日目にMRSA感染を消す(3日目に代謝活性であることが確認された)(図7A)だけでなく、インプラントが関係する骨髄炎を有するこのマウスモデルでは決して発生することが確認されなかった骨の治癒も可能にした(図11A-Cを比較)ことが判明した。具体的には、黄色ブドウ球菌で汚染されたインプラントの骨との一体化は図11Bに記録されており、これは、無菌ピン対照(図11C)に見られる、ピン及び毛皮質周辺での新しい骨の形成と同等の程度を表している。アルギナーゼ-1陽性染色を使用して、組織を治癒するM2マクロファージの有無もまた分析した。PBSで治療したマウス(図11D)の脛骨にSACを入れることができないM2マクロファージは、抗Amdと抗Gmdを組み合わせて治療したマウスの脛骨にある無菌性膿瘍全体に侵入し、従来組織治癒を促進した(図11E)(Murray and Wynn, "Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets," *Nat Rev Immunol* 11(11):723-737(2011)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)。

【0136】

実施例13 - ヒト化抗Amd mAb Amd1.6の作製

Amd1.6抗体の軽鎖及び重鎖可変領域を、プライマーを使用してPCR増幅し、Tillerらにより説明されているヒト抗体発現ベクター("Efficient Generation of Monoclonal Antibodies from Single Human B Cells by Single Cell RT-PCR and Expression Vector Cloning," *J. Immunol. Methods* 329(1-2):112-24(2008)、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)の中へのクローニングを可能にする。Amd1.6軽鎖及び重鎖可変領域、並びにヒト及びIgG1定常領域を含有するプラスミドを複製し、HEK293細胞内に同時にトランスフェクションする。3日後、培地を細胞から除去し、ELISAにより、ヒトIgGの存在、及び固定化したAmdタンパク質をアッセイする。結合した抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質に結合したヤギ抗ヒトIgG抗体を使用して検出する。

【0137】

ヒト:マウスキメラAmd1.6が親マウスAmd1.6と同様にAmdと反応したことを証明するために、His-Amdの酵素活性を阻害する能力について、それぞれを試験する。

【0138】

ヒト化Amd1.6抗体を、主に関節全置換術を受けた高齢の(65歳を超える)患者の第I相臨床試験で使用することができる。ヒト化Amd1.6抗体は、単独で、及び特許出願公報第20130110249号(その全体が参照として本明細書に組み込まれて

10

20

30

40

50

いる)に記載されているヒト化1C11抗Gmd抗体と組み合わせて使用する。

【0139】

実施例14 - ヒト化抗Amd mAb Amd2.1の作製

Amd2.1抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域を、プライマーを使用してPCR増幅し、Tillerら("Efficient Generation of Monoclonal Antibodies from Single Human B Cells by Single Cell RT-PCR and Expression Vector Cloning," J. Immunol. Methods 329(1-2):112-24(2008)により説明されているヒト抗体発現ベクター、その全体が参照として本明細書に組み込まれている)の中へのクローニングを可能にする。Amd2.1軽鎖及び重鎖可変領域、並びにヒト 及びIgG1定常領域を含有するプラスミドを作製し、HEK293細胞内に同時にトランスフェクションする。3日後、培地を細胞から除去し、ELISAにより、ヒトIgGの存在、及び固定化したAmdタンパク質をアッセイする。結合した抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質に結合したヤギ抗ヒトIgG抗体を使用して検出する。

10

【0140】

ヒト:マウスキメラAmd2.1が親マウスAmd2.1と同様にAmdと反応したことを証明するため、His-Amdの酵素活性を阻害する能力について、それぞれを試験する。

【0141】

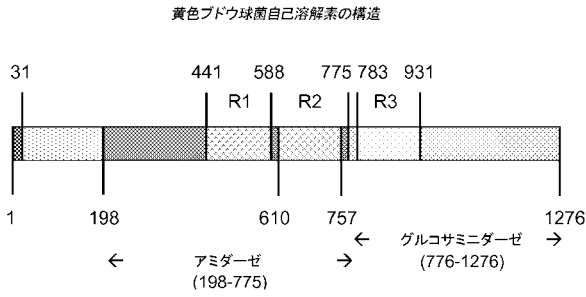
ヒト化Amd2.1抗体を、主に関節全置換術を受けた高齢の(65歳を超える)患者の第I相臨床試験で使用することができる。ヒト化Amd2.1抗体は、単独で、及び特許出願公開第20130110249号(その全体が参照として本明細書に組み込まれている)に記載されているヒト化1C11抗Gmd抗体と組み合わせて使用する。

20

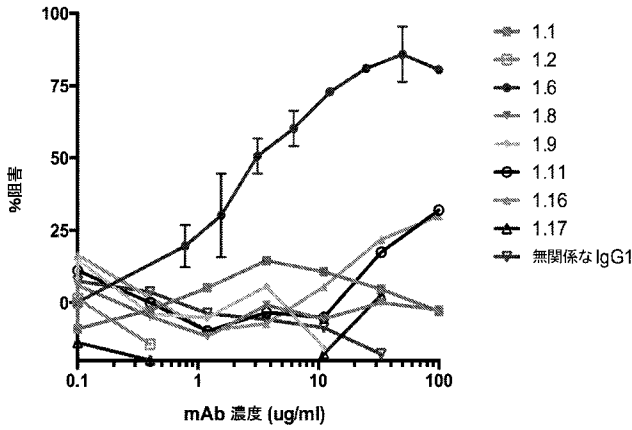
【0142】

好ましい実施形態を本明細書において詳細に記述及び記載したが、関連分野の当業者には、本発明の精神から逸脱することなく、種々の変更、追加、置換等を行うことができ、したがってこれらは、以下に続く特許請求の範囲に規定される本発明の範囲内であると考えられることが明らかとなるであろう。

【 図 1 】

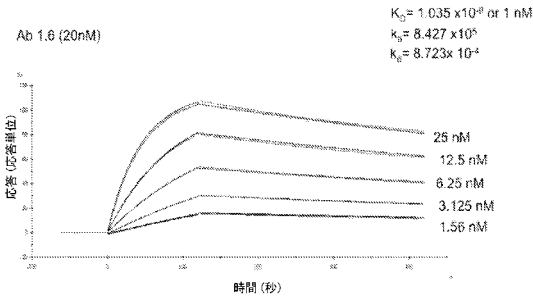


【 図 2 】

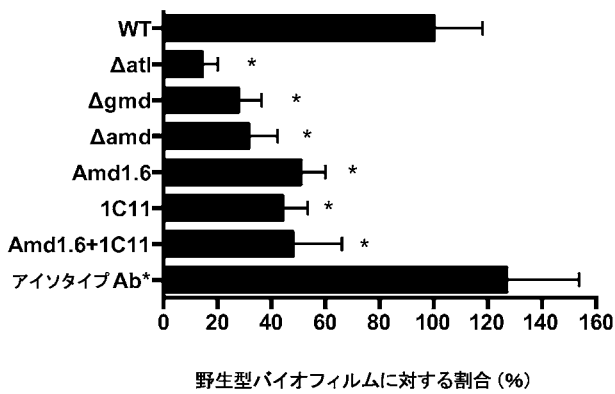


【 図 4 】

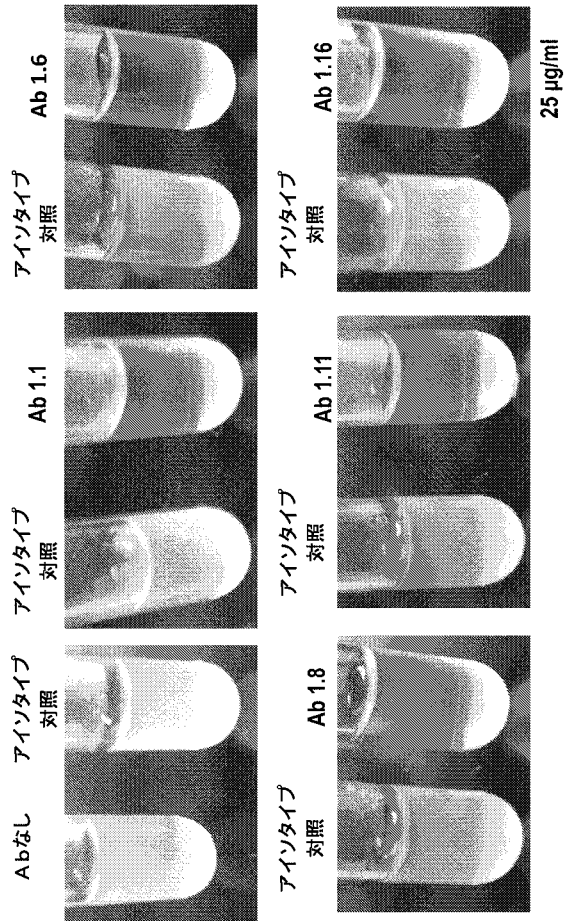
RamFc固定法を使用した、抗Amd1.6の、Amd
に対する動態及び親和性



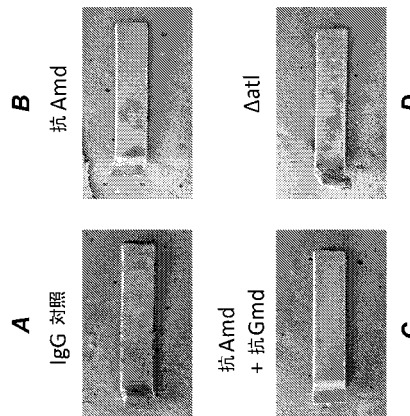
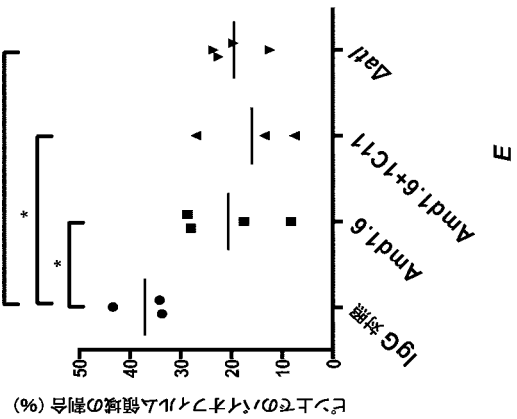
【 図 5 】



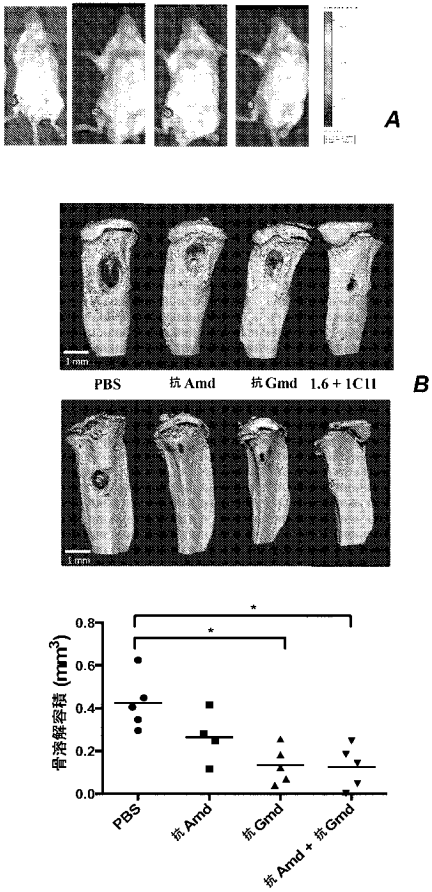
【 図 3 】



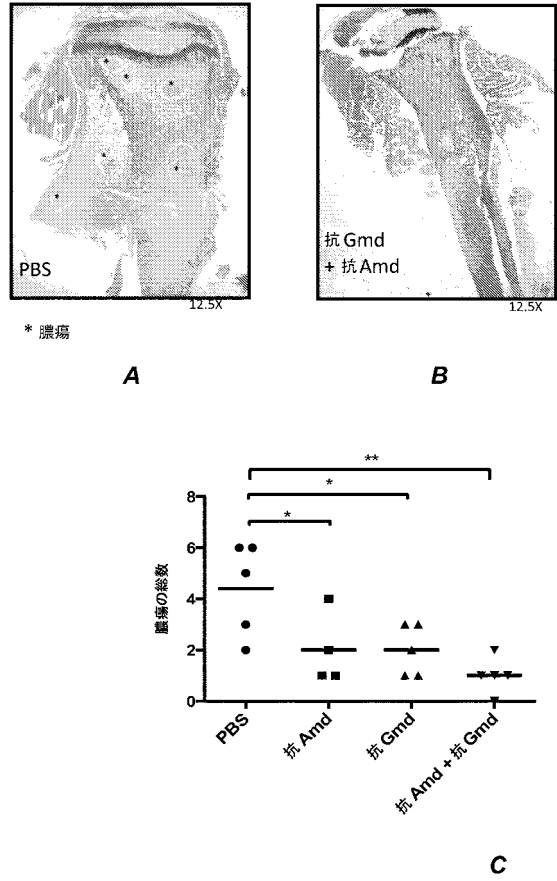
【 図 6 】



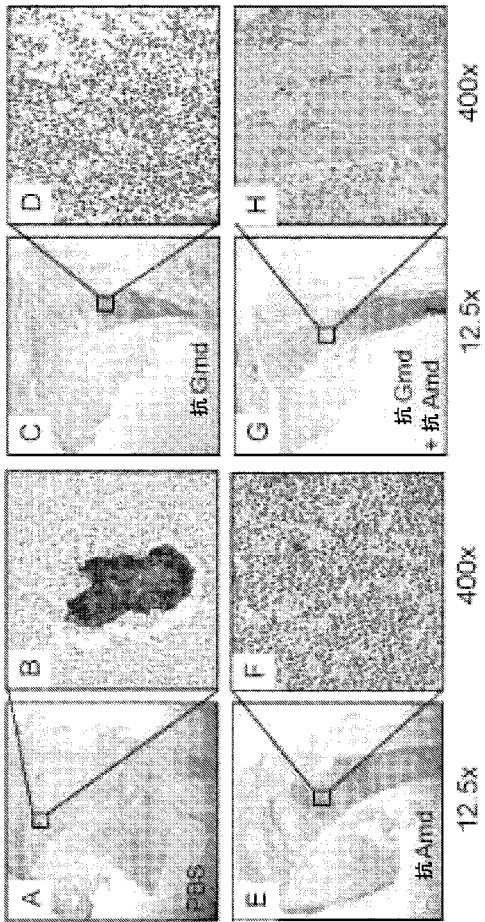
【 図 7 】



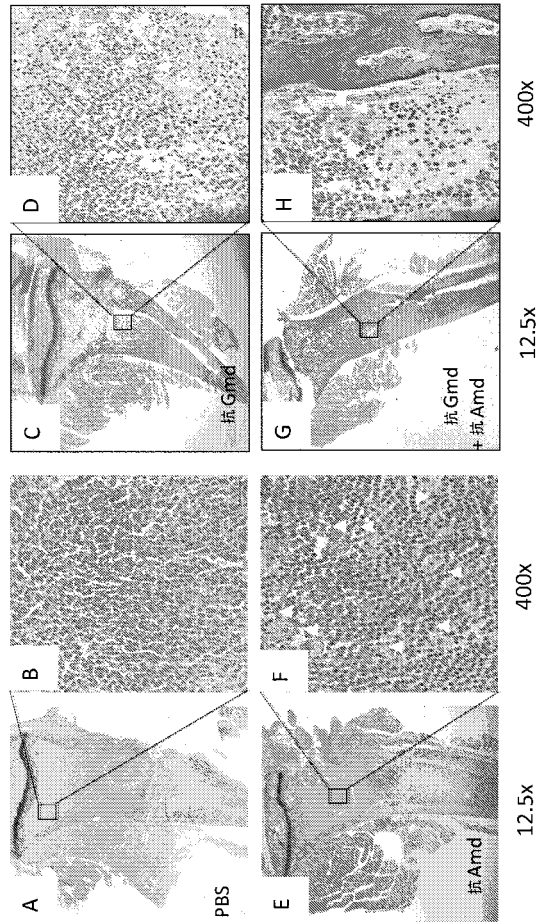
【 図 8 】



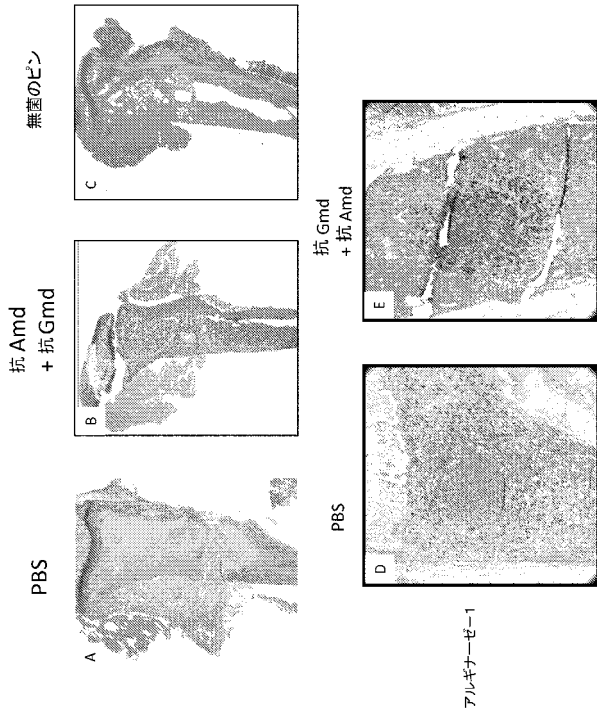
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

2017504586000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/070337

Box No. 1 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:

SEQ ID NOS: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, and 47 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/070337

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 13, 14, 20, 25, 31-107
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:

see Extra Sheet(s).

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-9, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 24, 26, 27, and 30 restricted to a monoclonal antibody, or binding portion thereof, that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic domain, wherein the antibody is selected to be Amd1.2, wherein the antibody comprises a VH domain selected to be SEQ ID NO: 5, and a VL domain selected to be SEQ ID NO: 35.

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/070337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/40 (2015.01) CPC - A61K 39/40 (2015.04) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61F 2/28, 2/30; A61K 39/40, 45/06 (2015.01) CPC - A61F 2/28, 2/30; A61K 39/40, 45/06 (2015.04) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61F 2/28, 2/30; A61K 39/40, 45/06 (2015.04) (keyword delimited) USPC - 424/146.1; 435/328; 530/388.26, 387.3, 387.9; 623/16.11, 18.11 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar Search terms used: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase catalytic domain monoclonal antibody (methicillin OR vancomycin) "and 1.1" inhibit* Staphylococcus author:schwarz		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0110249 A1 (SCHWARZ et al) 02 May 2013 (02.05.2013) entire document	1-8, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 24, 26, 27, 30
A	US 2008/0177045 A1 (LEE et al) 24 July 2008 (24.07.2008) entire document	9
A	US 2011/0092372 A1 (ALMAGRO et al) 21 April 2011 (21.04.2011) entire document	9
A	WO 2013/066876 A1 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 10 May 2013 (10.05.2013) entire document	1-9, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 24, 26, 27, 30
A	GEDBJERG et al. "Anti-Glucosaminidase IgG in Sera as a Biomarker of Host Immunity Against Staphylococcus aureus in Orthopaedic Surgery Patients," J Bone Joint Surg Am. 20 November 2013 (20.11.2013), Vol. 95, Pgs. 1-9. entire document	1-9, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 24, 26, 27, 30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2015		Date of mailing of the international search report 03 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copanheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/070337

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-12, 15-19, 21-24, and 26-30 are drawn to a monoclonal antibody, or binding portion thereof, that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic 5 domain and/or cell wall binding domain.

The first invention of Group I+ is restricted to a monoclonal antibody, or binding portion thereof, that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic domain, wherein the antibody is selected to be Amd1.2, wherein the antibody comprises a VH domain selected to be SEQ ID NO: 5, and a VL domain selected to be SEQ ID NO: 35. It is believed that claims 1-9, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 24, 26, 27, and 30 read on this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on Amd1.2, and an antibody which has a VH domain selected to be SEQ ID NO: 5, and a VL domain selected to be SEQ ID NO: 35.

Applicant is invited to elect additional antibodies with heavy and/or light chains with specific SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be a monoclonal antibody that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic domain selected to be Amd1.1, wherein the antibody has a VH domain selected to be SEQ ID NO: 7, and a VL domain selected to be SEQ ID NO: 33. Additional sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the heavy and light chain of the antibody "a VH domain comprising one of the following amino acid sequences: SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, and 31," and "a VL domain comprising ...33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, and 55," and "a *Staphylococcus* spp. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) and cross competes with an antibody selected from Amd1.1, Amd1.2, Amd1.5, Amd1.6, Amd1.7, Amd1.8, Amd1.9, Amd1.10, Amd1.11, Amd1.12, Amd1.13, Amd1.14, Amd1.15, Amd1.16, Amd1.17, Amd2.1, Amd2.2, Amd2.4, and Amd2.5."

The Groups I+ share the technical features of a monoclonal antibody, or binding portion thereof, that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic domain and/or cell wall binding domain, and binds specifically to a *Staphylococcus* spp. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) and cross competes with an antibody that binds the Amd catalytic domain. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art. Specifically, WO 2013/066876 A1 to University of Rochester et al. discloses a monoclonal antibody, or binding portion thereof (The present invention is directed to a monoclonal antibody, Abstract), that binds specifically to a *Staphylococcus* spp. autolysin consensus N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) catalytic domain and/or cell wall binding domain (binds specifically to a *Staphylococcus aureus* Glucosaminidase, Para. [0011]; Autolysin That Has an N-acetylmuramoyl-L-alanine Amidase Domain, Para. [0043]), and binds specifically to a *Staphylococcus* spp. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Amd) (binds specifically to a *Staphylococcus aureus* Glucosaminidase, Para. [0011]; Autolysin That Has an N-acetylmuramoyl-L-alanine Amidase Domain, Para. [0043]), and cross competes with an antibody that binds the Amd catalytic domain (the monoclonal antibodies may bind specifically to the catalytic domain, Para. [0048]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	E
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	B
	G 0 1 N 33/536	D
	G 0 1 N 33/532	B
	C 1 2 N 15/00	C

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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ダイス ジョン エル .

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター コリングスワース ドライブ 2 0 3

(72)発明者 シュワルツ エドワード

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター バークレー スクエア ドライブ 1 2 5

(72)発明者 ヴァーローン ジョン ジェイ .

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター エルムウッド アベニュー 6 0 1 ボックス
6 6 5

(72)発明者 ブローデル ジェームズ

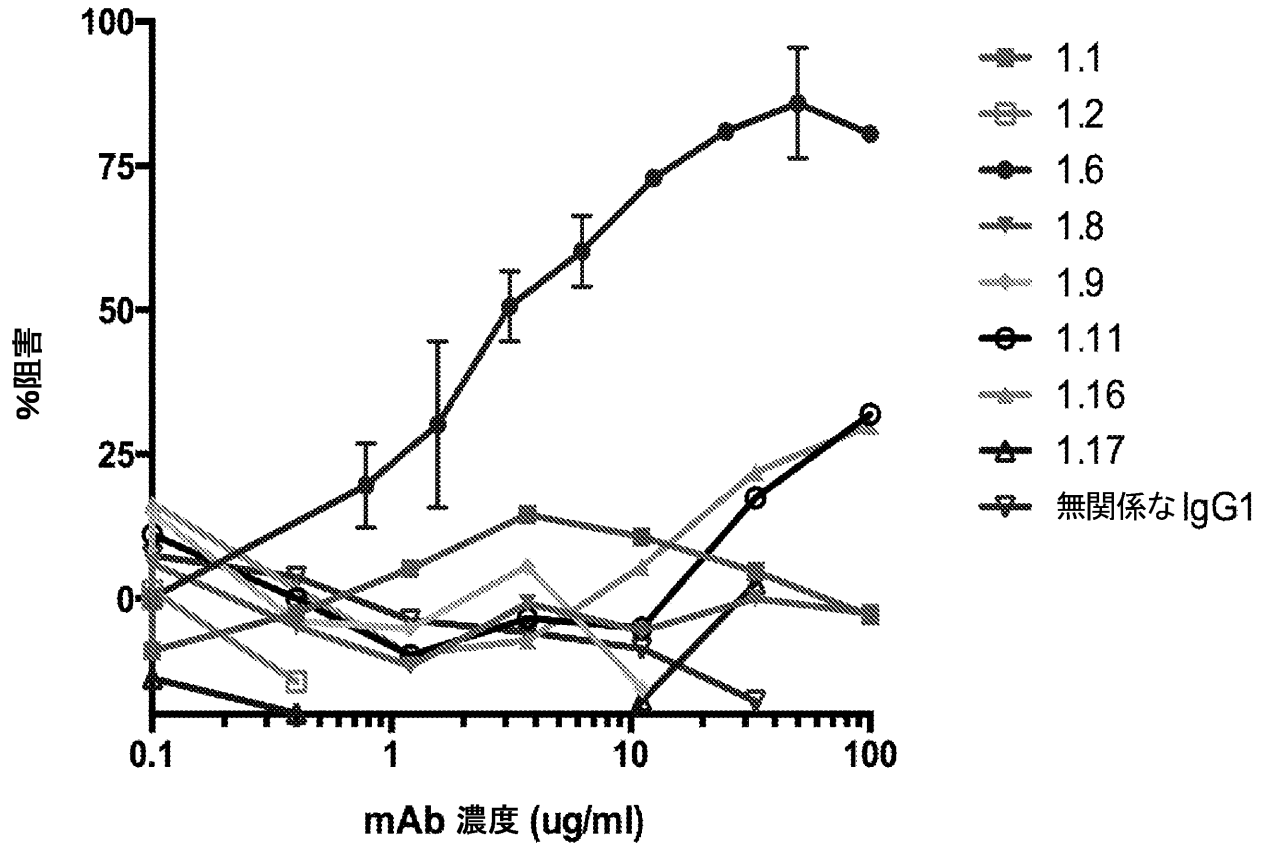
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター エルムウッド アベニュー 601 ボックス
665

(72)発明者 ベロ イリザリー シェイラ エヌ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター ライラック ドライブ 61 #6

Fターム(参考) 4B065 AA53X AA53Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 BA08 CA25 CA44
4C076 AA12 CC07 CC32
4C084 AA19 MA17 NA05 ZA511 ZA961 ZB072 ZB352
4C085 AA14 AA34 BB36 CC22 CC23
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA34 FA74

【要約の続き】



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017504586A5	公开(公告)日	2017-11-30
申请号	JP2016538593	申请日	2014-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	罗彻斯特大学		
申请(专利权)人(译)	罗切斯特大学		
[标]发明人	ダイスジョンエル シュワルツエドワード ヴァーローンジョンジェイ ブローデルジェームズ ペロイリザリーシェイラエヌ		
发明人	ダイス ジョン エル. シュワルツ エドワード ヴァーローン ジョン ジェイ. ブローデル ジェームズ ペロ-イリザリー シェイラ エヌ.		
IPC分类号	C07K16/12 C12N5/10 A61K39/395 A61K9/08 A61K45/00 A61P7/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P19/08 G01N33/569 G01N33/536 G01N33/532 C12N15/02		
CPC分类号	A61K39/40 A61K2039/505 A61K2039/507 A61P19/02 A61P19/08 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K16/1271 C07K16/40 C07K2317/24 C07K2317/76 C07K2317/92 D21H11/02 D21H11/08 D21H27 /30 D21H27/38 A61F2/30 A61K39/3955 C07K2317/56 C12Y305/01028 G01N33/532 G01N33/56938 A61K45/06 B32B29/005 B32B2250/26 B32B2262/0261 B32B2262/062 B32B2262/067 B32B2307/54 B32B2307/72 B32B2439/00 B32B2439/70 C07K2317/14 C07K2317/21		
FI分类号	C07K16/12.ZNA C12N5/10 A61K39/395.R A61K9/08 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P7 /00 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P19/08 G01N33/569.E G01N33/536. B G01N33/536.D G01N33/532.B C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B065/AA53X 4B065/AA53Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA12 4C076/CC07 4C076/CC32 4C084/AA19 4C084 /MA17 4C084/NA05 4C084/ZA511 4C084/ZA961 4C084/ZB072 4C084/ZB352 4C085/AA14 4C085 /AA34 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA34 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/915953 2013-12-13 US		
其他公开文献	JP6533226B2 JP2017504586A		
摘要(译)			

公开了一种特异性结合葡萄球菌自溶素N-乙酰基村酰-L-丙氨酸酰胺酶的催化结构域和/或细胞壁结合结构域的单克隆抗体或其结合部分，以及包含该单克隆抗体的药物组合物。还公开了表达单克隆抗体的细胞系，包括杂交瘤。描述了使用单克隆抗体附着骨科植入物，移植或医疗设备的方法，治疗或预防葡萄球菌感染的方法以及治疗骨髓炎的方法，以检测样品中的葡萄球菌。还描述了医学检查方法。