

(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2017-506063

(P2017-506063A)

(43) 公表日 平成29年3月2日(2017.3.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B065
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12	4C085
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C12N 5/20 (2006.01)	C12N 5/20	
C12N 5/24 (2006.01)	C12N 5/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-543621 (P2016-543621)	(71) 出願人	513196315
(86) (22) 出願日	平成26年11月17日 (2014.11.17)		アルベルトールトヴィヒーユニベルシタ ット フライブルク
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月25日 (2016.7.25)		ドイツ, 79085 フライブルク, フェ ーネンベルクプラッツ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/074797	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開番号	W02015/101438		弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日	平成27年7月9日 (2015.7.9)	(74) 代理人	100124453
(31) 優先権主張番号	13199849.4		弁理士 資延 由利子
(32) 優先日	平成25年12月30日 (2013.12.30)	(74) 代理人	100135208
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319
			弁理士 曾我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラム陽性病原体に対するオプソニン作用性及び保護性のモノクローナル抗体

(57) 【要約】

免疫学及び感染症の分野における本発明は、グラム陽性細菌に特異的な、特に該細菌の表面上に露出された炭水化物構造に対して特異的なオプソニン作用性及び保護性の抗体に関する。本発明は、モノクローナル抗体及びキメラ抗体並びに該抗体の断片、領域及び誘導体を含む。また、この発明は、本発明の抗体が結合するエピトープ並びに該エピトープの配列、断片及び領域に関する。上記抗体及び上記エピトープを含むペプチドの両方、そしてそれらの領域及び断片は、診断用途、予防用途及び治療用途に使用することができる。

【選択図】 図1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも1つの軽鎖と少なくとも1つの重鎖とを含むグラム陽性細菌に特異的なオプソニン作用性のモノクローナル抗体であって、前記少なくとも1つの軽鎖は、配列番号1から選択される軽鎖可変領域と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、かつ前記少なくとも1つの重鎖は、配列番号3、5、7及び9から選択される重鎖可変領域と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記同一性のパーセンテージは、少なくとも90%、例えば少なくとも95%である、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 3】

前記少なくとも1つの可変領域は、配列番号1によるアミノ酸配列と、配列番号3、5、7及び9から選択される1つのアミノ酸配列とからなる、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

少なくとも1つの軽鎖、少なくとも1つの重鎖、又はその両方はキメラ型である、請求項1~3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体は、重鎖定常領域を含み、前記定常領域は、全てのサブクラス

20

【請求項 6】

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、SFv又はscFvを含む、請求項1~5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

ヒト配列又はヒト配列を含む軽鎖定常領域を含む、請求項1~6のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、検出可能な標識に結合されている、請求項1~7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 9】

請求項1~7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 10】

請求項1~7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系統。

【請求項 11】

請求項1~8のいずれか1項に記載の抗体と、医薬的に許容可能なキャリアーとを含む医薬組成物。

【請求項 12】

静脈内投与用である、請求項11に記載の医薬組成物。

40

【請求項 13】

グラム陽性細菌によって引き起こされる感染症を治療又は予防する方法であって、治療的有効量又は予防的有効量の請求項11又は12に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、方法。

【請求項 14】

前記グラム陽性細菌は、スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (Staphylococcus hemolyticus)、スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、ストレプトコッカス・ミュータンズ (Streptococcus mutans)

50

ns)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 又はエンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) 及びストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) 又はストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) 又はストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記グラム陽性細菌は、抗生物質耐性である、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

被験体においてグラム陽性細菌を検出する方法であって、該方法は、請求項1~8のいずれか1項に記載の単離された抗グラム陽性モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が被験体由来の試料へと結合する試験レベルを求めることと、その結合する試験レベルを対照と比較することとを含み、ここで、結合する試験レベルが対照よりも高いことは、前記試料においてグラム陽性細菌が存在することを示すものである、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

免疫学及び感染症の分野における本発明は、グラム陽性細菌に特異的な、特に該細菌の表面上に露出された炭水化物構造に対して特異的なオプソニン作用性及び保護性の抗体に関する。本発明は、モノクローナル抗体及びキメラ抗体並びに該抗体の断片、領域及び誘導体を含む。また、この発明は、本発明の抗体が結合するエピトープ並びに該エピトープの配列、断片及び領域に関する。上記抗体及び上記エピトープを含むペプチドの両方、そしてそれらの領域及び断片は、診断用途、予防用途及び治療用途に使用することができる。

20

【背景技術】

【0002】

抗生物質が発見されて開発される前には、細菌感染症による死はしばしば急激なものであり、避けることはできなかった。グラム陽性の多剤耐性細菌、例えばスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 及び腸球菌 (*Enterococci*) は、なかでも主要な院内病原体であり、多くの死因であるとともに患者の入院期間を長引かせる要因である。

30

【0003】

グラム陽性細菌の細胞壁は、3種の主要成分、すなわちペプチドグリカン、莢膜多糖体及びテイコ酸を含むとともに、種に応じた追加の炭水化物、複合多糖及びタンパク質を含んでいる。

【0004】

グラム陽性細菌のなかでも、最も一般的な属の一つはブドウ球菌属である。ブドウ球菌は、通常、人間及び動物にコロニー形成し、人間の、特に入院患者における罹病率及び死亡率の一つの重要な原因である。ブドウ球菌は皮膚及び粘膜内層に偏在するため、理屈上は局所性感染症及び全身性感染症の両方を引き起こす状態にある。

【0005】

ブドウ球菌感染症は様々な理由のため治療が困難である。抗生物質に対する耐性は、よく見られ、メチシリン耐性及び多剤耐性が伝播可能であるためますます増えてきている。さらに、ブドウ球菌感染症に対する宿主の耐性は、まだあまり明確に理解されていない。

40

【0006】

オプソニン作用性の抗体は、ブドウ球菌感染症の予防又は治療のために提案されている。例えば特許文献1を参照のこと。

【0007】

腸球菌は、しばしば対になって存在(「双球菌」)するか、又は短い鎖状に存在するグラム陽性球菌であるが、物理特性だけでは「ブドウ球菌」と区別しづらい。エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) (90%~95%) 及びエンテロコッカス・フェシウム (*E.*

50

faecium) (5%~10%)の2種はヒトの腸内における一般的な共生生物である。

【0008】

腸球菌によって引き起こされる重要な臨床感染症には、尿管感染症、菌血症、細菌性心内膜炎、憩室炎及び髄膜炎が含まれる。医療的観点から、この属の一つの重要な特徴は、高レベルの潜在的抗生物質耐性である。一部の腸球菌は、β-ラクタム系抗生物質（ペニシリン類、セファロスポリン類、カルバペネム類）及び多くのアミノグリコシド類に対して潜在的耐性を有する。ここ二十年で、バンコマイシンに対して耐性の腸球菌の特に毒性の強い菌株（バンコマイシン耐性腸球菌又はVRE）が、特に米国で入院患者の院内感染症において現れた。

【0009】

特許文献2は、（グラム陰性細菌である）シュードモナス・アエルギノーザ（*Pseudomonas aeruginosa*）の多くの菌株に対して免疫応答を誘導する方法であって、ヒト又は動物へと、そのヒト又は動物において免疫応答を誘導するのに十分な量のシュードモナス・アエルギノーザ2192由来のムコイド型菌体外多糖を投与することを含む方法を記載し、それと一緒にこの抗原を産生する微生物及び該抗原を細菌粘質そのものから分離する方法が開示されている。こうして、シュードモナス・アエルギノーザの多くの菌株に対する免疫応答を誘導することができるワクチンが提供される。好ましい最小量は、投与前に存在した濃度の少なくとも4倍の濃度にまで抗体形成を惹起するのに必要な量である。

【0010】

特許文献3は、シュードモナス・アエルギノーザのムコイド型菌体外多糖に特異的に結合するペプチド、特にヒトモノクローナル抗体を更に記載している。本発明は、シュードモナス・アエルギノーザ感染症及び関連疾患（例えば嚢胞性線維症）の診断、予防及び治療においてこれらのペプチドを使用する方法を更に提供する。当該発明の一部の抗体は、シュードモナス・アエルギノーザの多くのムコイド型菌株のオプソニン貪食作用性の殺菌を高める。医薬組成物を含め、上記ペプチドの組成物も提供され、そのようなペプチドの機能的に同等な変異体も提供される。

【0011】

特許文献4は、ムコイド型シュードモナス・アエルギノーザに対してオプソニン作用性である抗イディオタイプモノクローナル抗体を記載している。上記抗イディオタイプモノクローナル抗体は、C9F5と呼ばれる、ATCCアクセッション番号HB10715を有する細胞系統によって産生される。該抗イディオタイプモノクローナル抗体は、ワクチンとして有用であるととも、診断目的にも有用である。

【0012】

特許文献5は、グラム陽性細菌のリポテイコ酸へと結合するモノクローナル抗体及びキメラ抗体を記載している。該抗体は、細菌全体にも結合し、そしてin vitroでその細菌の貪食作用及び殺菌を高めるとともに、in vivoでは致死的な感染症からの保護を強める。ここでは、ヒト化されたマウスモノクローナル抗体が記載されている。当該公報は、そのモノクローナル抗体によって規定されるリポテイコ酸エピトープ結合部位のペプチドミミックも含む。

【0013】

特許文献6は、グラム陽性細菌のリポテイコ酸（LTA）へと結合するモノクローナル抗体を開示している。該抗体は、細菌全体にも結合し、そしてin vitroでその細菌の貪食作用及び殺菌を高める。また、ヒト配列を有する抗体（キメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体）も開示されている。

【0014】

特許文献7は、病原体のメチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（MRSA）、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、スタフィロコッカス・シウリ（*Staphylococcus sciuri*）、腸球菌属の一種、及びPBP2a又はこのタンパク質に相同の配列を保有する任意の他の細菌を含む、PBP2aタンパク質及びPBP2aと相同の配列を表す他のタンパク質を認識して結合することができるモノクローナル抗体を開示している。PBP2aは、ムレインの合成に際しての

10

20

30

40

50

細菌性ペプチド転移反応に役割を担う細菌の膜中に係留されたクラスIIのマルチモジュール酵素である。モノクローナル抗体での処理によって与えられた保護は、処理された動物の腎臓中に存在する細菌量に89倍の低下をもたらしたが、この保護は、5倍のバンコマイシン用量での処理により得られる保護（35倍の低下）よりも高いものであった。しかしながら、最も大きな低下の成果は、抗体 + バンコマイシンで処理された群において見られ、450倍の低下を引き起こした。

【0015】

Theilackerらは非特許文献1において、エンテロコッカス・フェカリスのLTAに対する抗体が、他のグラム陽性菌種、オプソニン化されたスタフィロコッカス・エピデルミディス菌株及びスタフィロコッカス・アウレウス菌株並びにB群連鎖球菌由来の1型のLTAにも結合することを記載している。エンテロコッカス・フェカリスのLTAに対するウサギ抗体による受動免疫化は、マウスにおけるエンテロコッカス・フェカリス及びスタフィロコッカス・エピデルミディスによる菌血症のクリアランスを促進した。LTAは、多くのグラム陽性病原体を標的とする単独のワクチン抗原として機能し得る保存された細菌構造として提案される。

10

【0016】

特許文献8は、ポリ-N-アセチルグルコサミン（PNAG）、例えばブドウ球菌のPNAGのアセチル化形、部分アセチル化形及び/又は完全脱アセチル化形に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を開示している。上記抗体は、ブドウ球菌及び大腸菌（E. coli）のようなPNAGを発現する細菌による感染症の診断、予防及び治療において使用することができる。

20

【0017】

特許文献9は、scFvファージディスプレイライブラリーから選択される腸球菌に特異的に結合する単鎖Fv断片を開示している。オプソニン貪食作用性アッセイを実施することで、腸球菌の臨床分離株12030に対する抗腸球菌のヒトIgG1の殺菌活性が定量化された。試験されたどの抗体も、スタフィロコッカス・アウレウスのリポテイコ酸（LTA）に対しては結合を示さなかった。

【0018】

上述の従来技術は、グラム陽性細菌の細胞壁のかなり広範な様々な構成成分に対して多かれ少なかれ効果的な抗体を産生するという試みがなされたことを示している。それにもかかわらず、その標的となるものも、感染症に対する保護における上記の抗体のいずれかの効果も事前に確実に予想することができるものではなかった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】米国特許第5,571,511号

【特許文献2】米国特許第4,578,458号

【特許文献3】米国特許第7,230,087号

【特許文献4】米国特許第5,233,024号

40

【特許文献5】国際公開第1998/57994号

【特許文献6】国際公開第2003/059260号

【特許文献7】欧州特許出願公開第2476702号

【特許文献8】国際公開第2005/103084号

【特許文献9】国際公開第2007/141278号

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】異種リポテイコ酸（LTA）のポリグリセロールリン酸骨格に対する抗体によるスタフィロコッカス・アウレウスに対する保護（Protection against *Staphylococcus aureus* by antibody to the polyglycerolphosphate backbone of heterologous lipo

50

teichoic acid (LTA).) J Infect Dis. 2012 Apr 1;205(7):1076-85

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

当該技術分野では、ブドウ球菌に対してより高い親和性で結合することができるとともに、該細菌の貪食作用及び殺菌を高めることができ、それにより *in vivo* での保護を強めることができる新たな効果的なモノクローナル抗体を提供することが求められている。mAb の開発の場合に、広範の病原体を網羅するためには、交差反応性抗原を認識する可変ドメインを選択することが有利であると考えられる。ヒト化モノクローナル抗体又は他のキメラヒト/マウスモノクローナル抗体と、該抗体のグラム陽性感染症の治療における各々の使用とについて関連の要望が存在する。

10

【課題を解決するための手段】

【0022】

当該技術分野におけるこれらの要望に取り組むために、本発明は、グラム陽性細菌に結合するオプソニン作用性及び保護性のモノクローナル抗体及びキメラ抗体を提供する。また、該抗体は、細菌全体にも結合し、そして *in vitro* でその細菌の貪食作用及び殺菌を高めるとともに、*in vivo* では致死が見込まれる感染症からの保護を強める。

【0023】

したがって、本発明は、グラム陽性細菌によって引き起こされる細菌感染症の診断、予防及び/又は治療のための反応性が広範なオプソニン作用性の抗体を提供する。本発明の抗体は、グラム陽性細菌との広範な反応性を有する、すなわち、上記抗体は、グラム陽性細菌を選択的に認識して該細菌に結合する。この結合を評価するために、例えば酵素結合免疫吸着アッセイを含む任意の従来結合アッセイを使用することもできる。本発明によって提供される抗体及び抗体断片の一つの重要な特性は、それらがグラム陽性細菌のオプソニン作用及び貪食作用（すなわち、オプソニン貪食作用）を高める能力である。

20

【0024】

一つの態様では、本発明は、少なくとも1つの軽鎖と少なくとも1つの重鎖とを含むグラム陽性細菌に特異的なオプソニン作用性のモノクローナル抗体であって、少なくとも1つの軽鎖は、配列番号1から選択される軽鎖可変領域と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、かつ少なくとも1つの重鎖は、配列番号3、5、7及び9から選択される重鎖可変領域と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、モノクローナル抗体を提供する。

30

【0025】

一実施の形態においては、上記単離されたペプチドは、本明細書に開示される抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。重要な実施の形態においては、上記アミノ酸配列は、配列番号1から選択される軽鎖可変領域からなる群から選択され、かつ上記重鎖可変領域は、配列番号3、5、7及び9から選択される1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0026】

本明細書においてそれぞれ（重鎖に応じて）VH2、VH3、VH4E及びVH8と呼ばれる本発明の特異抗体が好ましい。

40

【0027】

抗体及び抗体断片を含む本発明のペプチドは、グラム陽性細菌の検出、グラム陽性感染症の診断、並びにそのような感染症及び該グラム陽性細菌が関連する障害の予防及び治療において特に有用である。

【0028】

本明細書に記載される抗体の選択法は、機能（すなわち食細胞による病原体の取り込み及び殺菌）に基づいて行われ、大抵のアプローチのように親和性に基づいては行われなかった。本発明においては、健康な個体由来のオプソニン作用性及び保護性の抗体は、多剤耐性病原体を標的とするために同定された。エンテロコッカス・フェカリス12030を用い

50

たオプソニン貪食作用性アッセイを使用したドナープールの予備スクリーニングを用いることで、最高力価のオプソニン作用性の抗体を有するドナーを特定した。そのドナーから全血を採取し、そしてEBVでの感染によってB細胞を不死化した。それらの不死化B細胞を、RNA調製に十分な数に至るまで培養した。それぞれのウェルの上清を回収し、エンテロコッカス・フェカリス12030に対するOPAにおいて使用して、最も高い殺菌が生じたウェルを特定した。このウェルからのB細胞を組織培養ウェル中に入れた。上清を再びOPAによって試験し、再び最も高い殺菌に導くウェルの細胞を、新たなマイクロタイター培養プレート中に分注した。4ラウンドの後に、最も強力な応答のあるウェル中のB細胞を溶解し、そしてmRNA及びcDNAを調製した。

【0029】

変性されたプライマーセットを使用して、再編成された免疫グロブリンの可変ドメイン（VH及びVL）の遺伝子をPCRによって増幅し、ヒトIgG1の定常ドメインと、軽鎖のためのヒト定常ドメインとを含むグラム陽性発現ベクター中にクローニングした。

【0030】

同定された可変ドメイン配列を含むプラスミドを次いで（then）チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞中にトランスフェクションし、そして培養上清を回収し、硫酸アンモニウムで沈殿させ、透析し、そして抗体濃度を測定した。組換えモノクローナル抗体を、幾つかのエンテロコッカス・フェカリス菌株、エンテロコッカス・フェシウム菌株及びスタフィロコッカス・アウレウス菌株に対するOPAによって試験した。約500 pg/ml ~ 600 pg/mlの濃度で、オプソニン作用性の殺菌は、40 % ~ 70 %であった。

【0031】

マウス敗血症モデルを使用して保護効力を評価し、1匹のマウスにつき4 µg/kgが、統計学的に有意な保護をもたらした。

【0032】

予備実験は、上記抗体が、グラム陽性細胞の表面上の非タンパク質様の、したがって炭水化物の構造を特異的に認識することにより、ヒト患者における使用のための該抗体の安全性の一助となることを示している。

【0033】

本抗体の有効性は、現在市販されている他の抗感染症抗体[Andabaka T, Nickerson JW, Rojas-Reyes MX, Rueda JD, Bacic Vrca Vら(2013)「小児における呼吸器合胞体ウイルス感染症のリスク低下のためのモノクローナル抗体 (Monoclonal antibody for reducing the risk of respiratory syncytialvirus infection in children.)」Cochrane database of systematic reviews (Online) 4: CD006602. doi:10.1002/14651858.CD006602.pub 4]又は開発中の他の抗感染症抗体[Kelly-Quintos C, Cavacini LA, Posner MR, Goldmann DA, Pier GB (2006)「細菌表面多糖のポリ-N-アセチルグルコサミンに特異的な完全ヒトモノクローナル抗体のスタフィロコッカス・アウレウスに対するオプソニン作用性及び保護の活性の特性評価 (Characterization of the opsonic and protective activity against Staphylococcus aureus of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine.)」Infect Immun 74: 2742-2750. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP (2008)「モノクローナル抗体の薬物動力学及び薬力学 (Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.)」Clin Pharmacol Ther 84: 548-558. Fox JL (2013)「抗微生物剤が働かない場合の抗感染症モノクローナル抗体処置 (Anti-infective monoclonals step in where antimicrobials fail.)」Nat Biotechnol 31: 952-954.]よりも1000倍優れている。

【0034】

このように、約500 pg/ml ~ 600 pg/mlの濃度で40 % ~ 70%で、より好ましくは60 % ~ 70%でオプソニン作用性の殺菌を誘導する、本発明によるモノクローナル抗体が好ましい。

【0035】

マウス敗血症モデルにおいて、1匹のマウスにつき4 µg/kgで、より好ましくは1匹のマウスにつき3 µg/kg ~ 2 µg/kgで統計学的に有意な保護をもたらす、本発明によるモノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体が更に好ましい。

【0036】

同一性のパーセンテージが少なくとも90%であり、より好ましくは少なくとも95%であり、例えば98%である、本発明によるモノクローナル抗体が好ましい。最も好ましくは、本発明によるモノクローナル抗体の可変領域は、配列番号1によるアミノ酸配列と、配列番号3、5、7及び9から選択される1つのアミノ酸配列とからなる。

【0037】

抗体であって、該抗体の可変領域が配列番号1によるアミノ酸配列（配列番号2のDNAから得られ、ここで、同一性のパーセンテージは少なくとも90%であり、より好ましくは少なくとも95%であり、例えば98%である）と、配列番号3、5、7及び9から選択されるアミノ酸配列（配列番号4、6、8及び10のDNAから得られ、ここで、同一性のパーセンテージは少なくとも90%であり、より好ましくは少なくとも95%であり、例えば98%である）とを含む、及び/又はそれらの配列からなり、その際、該アミノ酸の幾つかが翻訳後修飾のため修飾されている、抗体も本発明に含まれる。これらの修飾は、例えば不完全なジスルフィド結合形成、グリコシル化、N末端ピログルタミン環化、C末端リジンプロセシング、脱アミド化、異性体化及び酸化だけでなく、マレウル酸によるN末端アミノ酸の修飾及びC末端アミノ酸のアミド化のようなあまり一般的でないものも含む。修飾は、*in vitro*及び/又は*in vivo*で導入することもできる。当然のことながら、本発明によれば、これらの修飾された抗体は、依然として*in vitro*で細菌の貪食作用及び殺菌を高めるとともに、*in vivo*では致死が見込まれる感染症からの保護を強める。

10

20

【0038】

代替的な一実施の形態は、少なくとも1つの軽鎖、少なくとも1つの重鎖、又はその両方が本明細書に記載されるようにキメラ型である、本発明によるモノクローナル抗体である。より好ましくは、本発明によるモノクローナル抗体は、重鎖定常領域を含み、その際、上記定常領域は、ヒトIgG配列（その全てのサブタイプ）、IgA配列、IgM配列又はIgD配列を含み、及び/又はヒト配列若しくはヒト配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【0039】

一実施の形態においては、本発明による単離された抗体又は抗体断片は、単離されたインタクトな可溶性のモノクローナル抗体であってよい。上記単離された抗体又は抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、SFv又はscFvからなる群から選択される単離されたモノクローナル抗体断片であってよい。

30

【0040】

本発明の抗体は、非常に強力な結合を示す（したがって高い親和性を有する）、すなわち試験菌株に対する酵素結合免疫吸着アッセイにおいてバックグラウンドの約2倍のO.D.を示す。好ましい一実施の形態においては、高い結合レベルは、バックグラウンドの5倍以上である。他の実施の形態においては、高い結合レベルは、バックグラウンドの10倍以上である。当然のことながら、バックグラウンド（抗体以外の全試薬を試験したときに観察されるレベル）を超える意味のある何らかの増加は、当業者によって高い結合として認識されるため、本発明の範囲内にあることとなる。また上記従来技術に記載されるように、高い結合は、オプソニン作用活性と相関することが判明している。

40

【0041】

本発明による単離された抗体又は抗体断片は、グラム陽性細菌、例えばブドウ球菌及び/又は腸球菌のオプソニン貪食作用を高める。そのような抗体又は抗体断片は、本明細書においては、「オプソニン作用性の抗体又は抗体断片」と呼ばれる。

【0042】

本発明の抗体は、グラム陽性細菌に対してオプソニン作用性であるか、又はグラム陽性細菌に対してオプソニン作用活性を示す。当業者が認識するように、「オプソニン作用活性」は、オプソニン（一般的に、抗体又は血清因子C3bのいずれか）が抗原に結合して、抗原の食細胞への結合を促進し、それにより貪食作用を高める能力を指す。幾つかの細菌、特に莢膜の存在のため貪食作用に抵抗性がある被包性細菌は、オプソニン作用性の抗体

50

で被覆されると好中球及びマクロファージのような食細胞をととも引き付けるものとなり、そして該細菌の血流からのクリアランス速度は、顕著に高められる。オプソニン作用活性は、以下に記載される任意の従来の様式で、例えばTheilackerら（以下参照）によって記載されるように測定され得る。

【0043】

オプソニン化アッセイは、或る物質のオプソニン作用能を測定し、広範に反応性の免疫グロブリンを同定する、比色アッセイ、化学発光アッセイ、蛍光アッセイ若しくは放射性標識取り込みアッセイ、細胞媒介性殺菌アッセイ、又は当該技術分野で既知の任意の他の適切なアッセイであってよい。オプソニン化アッセイにおいては、以下のもの、すなわち感染要因、真核細胞及び試験されるべきオプソニン化物質、又はオプソニン化物質とともにオプソニン化を高めるとされる物質と一緒にインキュベートされる。オプソニン化アッセイは、細胞媒介性殺菌アッセイであるのが好ましい。

10

【0044】

選択的に、オプソニン作用能力は、インキュベート前後の生きている生物の数の測定によって決定される。免疫グロブリンの存在下でのインキュベートの後の細菌数の減少は、陽性のオプソニン化能力を示している。細胞媒介性殺菌アッセイにおいて、陽性のオプソニン化は、適切な細菌増殖条件下でインキュベート混合物を培養することによって求められる。インキュベート前の試料とインキュベート後の試料とを比較した場合の、又は免疫グロブリンを含む試料と含まない試料との間で比較した場合の、生きている細菌の数の何らかの有意な減少は、陽性反応である。

20

【0045】

グラム陽性細菌による感染症の治療又は予防のための作用物質を同定するもう一つの好ましい方法は、クリアランス及び保護の尺度となる敗血症又は菌血症の動物モデルを使用するものである。そのような作用物質は、免疫グロブリン又は他の抗微生物性物質であってよい。特に有用な動物モデルは、抗体及びグラム陽性生物を免疫無防備状態（例えば未成熟の）動物に投与し、引き続き該抗体がその動物の死亡率を減らすかどうか、又は該動物からのその生物のクリアランスを高めるかどうかを評価することを含む。このアッセイは、ウサギ、モルモット、マウス、ラット、又は任意の他の適切な研究用動物を含む任意の未成熟の動物を使用してよい。

【0046】

クリアランスは、医薬組成物が動物からの感染要因のクリアランスを高めるかどうかを求めることによって評価される。これは、一般的に、生物学的流体、例えば血液、腹水若しくは髄液の試料、又は臓器、例えば肝臓、脾臓若しくは腎臓の試料から求められる。上記感染要因は、その生物学的流体又は臓器から、生き残っている感染要因の増殖又は同定に適切のように培養される。処理後或る一定の期間にわたって採取された流体試料から、当業者は、該動物が上記感染要因を浄化する能力に対する上記医薬組成物の効果を求めることができる。更なるデータは、或る一定の時間にわたり、好ましくは或る一定の日数にわたり、上記医薬組成物が投与される動物の生存を測定することによって得ることができる。通例、両方のデータセットが用いられる。

30

【0047】

上記医薬組成物がクリアランスを高めるか、又は死亡率を低下させるのであれば、結果は陽性に見なされる。生物のクリアランスが高められるが、試験動物が既に死んでいる状況でも、まだ陽性の結果が示される。

40

【0048】

本発明の抗体がグラム陽性細菌に結合し、該細菌をオプソニン化し、それにより *in vitro* の貪食作用及び殺細胞を高め、*in vivo* で保護を強める能力は、予想されるものではない。

【0049】

このレベルのオプソニン作用活性では、抗体は、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌及びコアグラーゼ陽性ブドウ球菌の両方の貪食作用及び殺細胞を高めるべきである。語句「高めら

50

れた」とは、有用なレベルでバックグラウンドを測定的に上回る活性を指す。有用であると思われるレベルは、細菌の種類及び感染の重症度を含む特定の感染状況に応じて十分に变化し得る。例えば、高められたオプソニン作用活性又は貪食作用活性に関して、好ましい実施の形態においては、高められた応答は、バックグラウンドを75 %以上だけ上回る。もう一つの好ましい実施の形態においては、高められた応答は、バックグラウンドを80 %以上だけ上回る。更にもう一つの実施の形態においては、高められた応答は、バックグラウンドを90 %以上だけ上回る。

【0050】

オプソニン作用性であると示された抗体がinvivoで保護性であることを確認するために、該抗体をマウスの感染モデルと、ラットの心内膜炎モデルとで評価した。実施例に示されるように、該抗体は、血流及び内臓（例えば肝臓、腎臓及び脾臓）及び心臓疣贅からの細菌のクリアランスを顕著に高める。

10

【0051】

本発明のこれらの抗体は、ポリクローナル抗体だけでなく、モノクローナル抗体も含むとともに、他のモノクローナル抗体、その断片及び領域、並びにそれらの誘導体も含む。上記のように、結合の強さは、バックグラウンドより2倍高いものから、バックグラウンドより5倍及び10倍高いものまでの範囲であってよい。

【0052】

さらに、本発明の抗体、断片、領域及び誘導体は、そのような細菌のオプソニン化を、75 %からそれより高い範囲の比率で高めることができる。本発明の抗体の「断片」は、例えばFab、Fab'、F(ab')₂及びscFvを含む。これらの断片は、インタクトな抗体から、当該技術分野でよく知られた方法、例えばパパイン（Fab断片の生成のため）又はペプシン（F(ab')₂の生成のため）のような酵素によるタンパク質分解的開裂等を使用して生成される。

20

【0053】

本発明の好ましい態様においては、上記領域は、グラム陽性細菌を結合する、少なくとも1つの重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。もう一つの実施の形態においては、これらの2つの可変領域は、単一鎖抗体として一緒に結合させることができる。全長重鎖は、オプソニン作用活性にとって重要なことがあり、そして抗サイトカイン（抗炎症）活性を高めることがあり、一方で、該可変領域を含む抗体断片は、上皮細胞への細菌の結合の阻害に適していることがあり、抗炎症性であることもある。

30

【0054】

本発明の特に好ましい態様においては、上記抗体は、ヒト抗体（IgG）の定常領域と一緒に本発明の抗体からの領域から作製された組換えヒト抗体である。例えば、H鎖は、ヒト重鎖定常領域の少なくとも一部に結合された本発明の抗体の重鎖可変領域の抗原結合領域を含み得る。このヒト化又はキメラ型の重鎖は、ヒト軽鎖定常領域の少なくとも一部に結合された、抗体の軽鎖可変領域の抗原結合領域を含むキメラL鎖と組み合わせられてよい。

【0055】

本発明の組換え抗体は、一価、二価又は多価の免疫グロブリンであってよい。例えば、一価の抗体は、上記のように、L鎖とジスルフィド架橋を通じて会合されたH鎖によって形成された二量体（HL）である。二価の抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋を通じて会合された2つのHL二量体によって形成された四量体である。多価の抗体は、複数の鎖の集合体を基礎としている。

40

【0056】

本発明の特に好ましい抗体は、実施例に記載されており、i) 配列番号1による配列を含む軽鎖と配列番号3による配列を含む重鎖とを含み、ii) 配列番号1による配列を含む軽鎖と配列番号5による配列を含む重鎖とを含み、iii) 配列番号1による配列を含む軽鎖と配列番号7による配列を含む重鎖とを含み、そしてiv) 配列番号1による配列を含む軽鎖と配列番号9による配列を含む重鎖とを含む。

50

【0057】

当然のことながら、本発明の抗体の種々の区分から構成される他の組換え抗体も本発明の範囲内である。特に、上記重鎖定常領域は、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、IgM抗体又はIgA抗体であってよい。

【0058】

治療又は予防されるグラム陽性細菌感染症は、スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (Staphylococcus hemolyticus)、スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 又はエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) 及びストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) 又はストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) からなる群から選択することができる。

10

【0059】

次に、本発明によるモノクローナル抗体のもう一つの態様は、上記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が検出可能な標識に結合されている抗体に関する。エピトープと、細菌と、本発明の抗体又は抗原結合断片との間の複合体の検出に使用するのに適した標識は、例えば放射性同位体、エピトープ標識 (タグ)、親和性標識 (例えばビオチン、アビジン)、スピン標識、酵素、毒素又は蛍光基若しくは化学発光基を含む。

20

【0060】

本発明のもう一つの態様においては、本発明は、また、上記のモノクローナル抗体又はその断片をコードする単離された核酸を含む。該核酸は、RNA、DNA、PNA及び/又はcDNAから選択することができる。本発明の上記核酸 (複数の場合もある) は、単離することができ、及び/又はベクター、例えばプラスミド、例えば発現ベクター中にクローニングすることができる。こうして、上記抗体のタンパク質断片及び領域に加えて、本発明は、また、上記抗体をコードする遺伝子のDNA配列及び上記DNAによってコードされるペプチドを含む。

【0061】

特に好ましいDNA及びペプチド配列は、図面及び添付の配列表において、特に配列番号1、3、5、7及び9 (ペプチドについて)、並びに配列番号2、4、6、8及び10 (核酸について) に示されており、それらは、好ましい抗体の重鎖及び軽鎖の両方の、相補性決定領域 (「CDR」)、すなわち相補性抗原上のアミノ酸と相互作用する抗体可変領域内の超可変性アミノ酸配列を含む可変領域を記述している。

30

【0062】

本発明は、これらのDNA配列及びペプチド配列、並びにこれらの配列と相同性である (同一性を共有する) DNA配列及びペプチド配列を含む。好ましい一実施の形態においては、これらの配列は、80%相同であるが、他の好ましい実施の形態は、85%、90%及び95%相同である配列を含む。DNA配列及びペプチド配列の両方についてのこれらの相同性のレベルを決定することは、十分に当業者の通常の技能の範囲内である。

【0063】

本発明のDNA配列は、当該技術分野でよく知られた手法によって、同定し、単離し、クローニングし、そして原核細胞又は真核細胞へと発現のために移入させることができる。そのような手法は、一般的にSambrookら (上記) 及び分子生物学における最新のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology) (Ausubelら (編集)、John Wiley & Sons) に記載され、それらは引用することにより本明細書の一部をなす。

40

【0064】

さらに、モノクローナル抗体及びキメラ抗体の両方を含む、本発明の抗体のDNA配列及びペプチド配列は、抗体「誘導體」の基礎を成すことができ、上記誘導體は、例えば切断遺伝子又は修飾遺伝子によってコードされるタンパク質又はペプチドを含む。そのようなタンパク質又はペプチドは、本発明の抗体と同様に機能することができる。細菌の貪食作

50

用及び/又は殺菌を含む、エフェクター機能を高め得る他の配列の付加のような他の修飾も本発明の範囲内である。

【0065】

本発明のもう一つの態様においては、本発明は、また、本発明によるモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系統を含む。一般的に、ハイブリドーマは、適切な不死細胞系統（例えばミエローマ細胞系統）と抗体産生細胞とを融合させることによって作製される。抗体産生細胞は、対象となる抗原で免疫されたヒト又は他の適切な動物の末梢血から、又は好ましくは脾臓若しくはリンパ節から得ることができる。融合細胞（ハイブリドーマ）は、選択的な培養条件を使用して単離することができ、そして限界希釈によってクローニングされる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適切なアッセイ（例えばELISA）によって選択することができる。

10

【0066】

本発明は、また、本発明のモノクローナル抗体又はキメラ抗体、並びにその断片、領域及び誘導体を、医薬的に許容可能なキャリアーと一緒に含む医薬組成物を開示している。

【0067】

医薬的に許容可能なキャリアーは、滅菌液体、例えば水、石油、動物油、植物油、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油を含む油等であってよい。静脈内投与では、水は好ましいキャリアーである。生理食塩水溶液、水性デキストロース、及びグリセロール溶液は、液体キャリアーとして、特に注射可能な溶液に使用することもできる。適切な医薬品キャリアーは、「レミントンの医薬品科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第22版(2012)に記載されており、それらは引用することにより本明細書の一部をなす。

20

【0068】

本発明による医薬組成物であって、静脈内 (i.v.)、腹腔内 (i.p.) 又は鼻腔内投与のための医薬組成物が好ましい。医薬組成物（抗体を含む）の投与は、また、静脈内、腹腔内、体内注射、関節内、心室内、くも膜下、筋内、皮下、鼻腔内、腔内、経口によって、又は任意の他の効果的な投与方法によって実現することもできる。上記組成物は、また、局所的に、例えば感染された特定領域への注射によって、筋内又は皮下のいずれかで投与してもよい。投与は、医薬組成物を、患者に直接的に塗るか、浸すか、漬けるか、又は擦り付けることによって投与することを含み得る。上記医薬組成物は、また、患者内に配置される物体に、例えば留置カテーテル、心臓弁 (valves)、髄液シャント、関節補綴物、体内への他のインプラント、又はグラム陽性細菌に感染することとなる危険性のある、若しくは患者へのそのような感染を持ち込む危険性のある任意の他の物体、機器若しくは装置に適用することもできる。

30

【0069】

最後に、本発明は、グラム陽性細菌によって引き起こされる感染症を治療又は予防する方法であって、グラム陽性細菌、例えばブドウ球菌生物又は腸球菌生物に感染しているか、又は上記グラム陽性細菌に感染していることが疑われる患者へと、治療的有効量又は予防的有効量の本発明による医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。該方法は、治療的有効量の本発明のモノクローナル抗体又はキメラ抗体（その断片、領域及びその誘導体を含む）と、医薬的に許容可能なキャリアーとを含む医薬組成物を投与することを含む。患者は、ヒト又は他の哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタ又はヤギであってよい。上記患者はヒトであるのが好ましい。

40

【0070】

治療的有効量は、感染症の治療において幾らかの軽減又は助力の指標を妥当に提供すると考えられる量である。上記の又は下記のそのような治療は、一次治療であっても、追加治療、例えばブドウ球菌若しくは腸球菌の感染症、種々の要因によって引き起こされる感染症又は無関係の病気のための抗生物質療法に対する補足的な治療であってもよい。実際に、他の抗体との組合せ療法は、明白に、本発明の範囲内と考えられる。

【0071】

予防的有効量は、グラム陽性細菌による感染症の幾らかの予防の指標を妥当に提供する

50

と考えられる量である。上記の又は下記のそのような治療は、一次治療であっても、追加治療、例えばブドウ球菌の感染症、種々の要因によって引き起こされる感染症又は無関係の病気のための抗生物質療法に対する補足的な治療であってもよい。実際に、他の抗体との組合せ療法は、明白に、本発明の範囲内と考えられる。

【0072】

治療又は予防されるグラム陽性細菌は、スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (Staphylococcus hemolyticus)、スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 又はエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) 及びストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) 又はストレプトコッカス・アガラクティエ (Streptococcus agalactiae) からなる群から選択される。

10

【0073】

本発明の方法の好ましい一実施の形態では、グラム陽性細菌は、抗生物質耐性であり、例えばMRSA、VRSA、MDR又はVREである。

【0074】

本発明の更にもう一つの態様は、被験体においてグラム陽性細菌を検出する方法であって、上記方法は、本発明による単離された抗グラム陽性モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が被験体由来の試料へと結合する試験レベルを求めることと、その結合する試験レベルを対照と比較することを含み、ここで、結合する試験レベルが対照よりも高いことは、試料においてグラム陽性細菌が存在することを示すものである、方法に関する。

20

【0075】

本発明は、保護性のヒトモノクローナル抗体の同定のためだけでなく、腸球菌感染症及びブドウ球菌感染症の予防、治療及び診断のための4種の候補抗体の同定のための選択方法に関する。このために、健康なボランティアの群から血液を採取し、その血清をオプソニン作用活性について分析した。高いオプソニン作用性の殺菌性を有するドナーを選択し、血液を抜き出し、そして全血中のB細胞を、EBVを使用して不死化した。不死化したB細胞を細胞培養プレートへと分散させ、培養した。細胞培養上清をオプソニン貪食作用性アッセイによって分析し、これらのウェルのうち最も高い殺菌性を示したウェルを特定した。このウェル中で増殖した全てのB細胞を次いで別のマイクロタイタープレートへと分散させ、そして再び最も高い殺菌性を有するウェルを特定し、再度播種した。4ラウンド後に、全RNAをその最良のウェルから単離し、cDNAへと転写した。プライマーセット (参考資料1を参照) を使用して、抗体重鎖及び抗体軽鎖の可変ドメインを増幅し、真核性発現ベクター中にクローニングした。該ウェル中には4種の異なる抗体が存在し、かつ全ての抗体は同じ軽鎖 (配列番号1) を有することが判明した。4種の構築物をCHO細胞中にトランスフェクションし、そして上清から組換えヒトモノクローナル抗体を精製した。次いでこれらの抗体をオプソニン貪食作用性アッセイにおいて試験すると、50 ng/ml ~ 500 ng/ml の濃度で殺菌性を示した。その際、該抗体の殺菌性は、試験された幾つかのエンテロコッカス・フェカリス菌株、エンテロコッカス・フェシウム菌株及びスタフィロコッカス・アウレウス菌株のいずれに対しても見られた。次いで、それらの抗体を更に *in vivo* マウスモデル及び *in vivo* ラットモデルで試験した。

30

40

【0076】

ここで本発明を以下の実施例において更に説明することとするが、当然のことながら、これらの実施例は説明の目的のために含まれているにすぎず、本発明の制限を目的とするものではない。本発明の目的上、引用される全ての参考資料は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。図面及び付属の配列表は、以下を示している。

【図面の簡単な説明】

【0077】

50

【図1】本発明による抗体を使用したエンテロコッカス・フェシウムE1162に関するオプソニン貪食作用性アッセイの結果を示す図である。F428は、米国特許第7,119,172号に記載されているシュードモナス・アエルギノーザのムコイド型菌体外多糖に特異的な結合抗体を使用した対照を示している。Opsonophagocytic Assay オプソニン貪食作用性アッセイ *E. faecium* エンテロコッカス・フェシウム

【図2】本発明による抗体を使用したエンテロコッカス・フェシウムの患者の分離株に関するオプソニン貪食作用性アッセイの結果を示す図である。F428は図1と同様である。Opsonophagocytic Assay オプソニン貪食作用性アッセイ *E. faecium* Patient Isolate エンテロコッカス・フェシウムの患者の分離株 % Killing 殺菌 (%)

【図3】本発明による抗体を使用したスタフィロコッカス・アウレウスの患者の分離株に関するオプソニン貪食作用性アッセイの結果を示す図である。F428は図1と同様である。Opsonophagocytic Assay オプソニン貪食作用性アッセイ *S. aureus* Patient Isolate スタフィロコッカス・アウレウスの患者の分離株 % Killing 殺菌 (%)

【図4】本発明による抗体を使用したスタフィロコッカス・アウレウスLACに関するオプソニン貪食作用性アッセイの結果を示す図である。F428は図1と同様である。Opsonophagocytic Assay オプソニン貪食作用性アッセイ *S. aureus* LAC スタフィロコッカス・アウレウスLAC % Killing 殺菌 (%)

【図5】本発明による抗体を使用したエンテロコッカス・フェカリス12030に関するオプソニン貪食作用性アッセイの結果を示す図である。F428は図1と同様である。Opsonophagocytic Assay オプソニン貪食作用性アッセイ *E. faecalis* 12030 エンテロコッカス・フェカリス12030 % Killing 殺菌 (%)

【図6】エンテロコッカス・フェカリス12030に関するラット心内膜炎試験の結果を示す図である。ラット心内膜炎モデルは、Haller Cらによって説明されているように成し遂げられ、このモデルにより、独立した動物モデルにおいてエンテロコッカス・フェカリス12030に対する保護が確認される。Rat Endocarditis with *E. faecalis* 12030 エンテロコッカス・フェカリス12030に関するラット心内膜炎vegetation 疣贅

【図7】スタフィロコッカス・アウレウスLACを有する肝臓中のコロニー数を示すマウスの菌血症モデルの結果を示す図である。細菌マウス敗血症はBaoらによって説明されているように成し遂げられた。それは、VH4E及びVH8が1つのマウスモデルにおいて両方の菌株に対して保護性であることを示している。*S. aureus* LAC USA300 スタフィロコッカス・アウレウスLAC USA300cfu/100mg liver 肝臓100 mg当たりのcfu

【図8】エンテロコッカス・フェカリスE1162に関するマウス菌血症モデルの結果を示す図である。Mouse Sepsis with *E. faecalis* E1162 エンテロコッカス・フェカリスE1162に関するマウス敗血症cfu/100mg Kidney 腎臓100 mg当たりのcfuBaby Rabbit Complement 仔ウサギ補体

【図9】IgG1 mAbによるスタフィロコッカス・アウレウスNewman株感染に対する保護(1群当たり10匹のマウス)を示す図である。対照として、4 µg/kgの用量のmAb VH8及び200 µlの正常ウサギ血清(NRS)を、細菌による攻撃投与の24時間前に投与した。Newman菌株は、 2×10^8 cfu/マウスの攻撃投与用量で使用した。Percent survival 生存パーセント
time in [h] 時間[h]

【発明を実施するための形態】

【0078】

配列番号1：本発明により同定された抗体の軽鎖のペプチド配列。

【0079】

配列番号3、5、7及び9：本発明により同定された抗体の重鎖のペプチド配列。

【0080】

配列番号2：本発明により同定された抗体の軽鎖のヌクレオチド配列。

【0081】

配列番号4、6、8及び10：本発明により同定された抗体の重鎖のヌクレオチド配列。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

概要

多剤耐性病原体を標的とする健康な個体からのオプソニン作用性及び保護性の抗体を同定した。エンテロコッカス・フェカリス12030に関するオプソニン貪食作用性アッセイ（OPA）を使用したドナープールの予備スクリーニングを用いて、最高力価のオプソニン作用性の抗体を有するドナーを特定した。そのドナーから10ミリリットルの全血を採取し、そしてEBVでの感染によってB細胞を不死化した。それらの不死化B細胞を、RNA調製に十分な数に至るまで48ウェルプレート中で約8週間にわたり培養した。それぞれのウェルの上清を回収し、エンテロコッカス・フェカリス12030に対するOPAにおいて使用して、最も高い殺菌が生ずるウェルを特定した。このウェルからB細胞を新たな48ウェル組織培養プレート中に分注した。上清を再びOPAによって試験し、再び最も高い殺菌に至るウェルの細胞を、新たな48ウェルプレート中に分注した。4ラウンドの後に、最も強力な応答のあるウェル中のB細胞を溶解し、そしてmRNA及びcDNAを調製した。変性されたプライマーセットを使用して、再編成された免疫グロブリンの可変ドメイン（VH及びVL）の遺伝子をPCRによって増幅し、ヒトIgG1の定常ドメインと、軽鎖のためのヒト定常ドメインを含むグラム陽性発現ベクター中にクローニングした¹。同定された可変ドメイン配列を含むプラスミドを次いでCHO細胞中にトランスフェクションし、そして培養上清を回収し、硫酸アンモニウムで沈殿させ、透析し、そして抗体濃度を測定した。組換えモノクローナル抗体を、幾つかのエンテロコッカス・フェカリス菌株、エンテロコッカス・フェシウム菌株及びスタフィロコッカス・アウレウス菌株に対するOPAによって試験した。約500 pg/ml ~ 600 pg/mlの濃度で、オプソニン作用性の殺菌は、40 % ~ 70 %であった。マウス敗血症モデルを使用して保護効力を評価し、1匹のマウスにつき4 µg/kgが、統計学的に有意な保護をもたらした。

10

20

【 0 0 8 3 】

細菌株及びプラスミド

大腸菌をルリアブロス（LB;Roth）又はLBアガー中、37 °Cで攪拌しつつ増殖させ、その一方で、グラム陽性細菌（スタフィロコッカス・アウレウス、エンテロコッカス・フェカリス及びエンテロコッカス・フェシウム）を、トリプチックソイブロス（TSB）又はトリプチックソイアガー（TSA）中、攪拌せずに37 °Cで増殖させた。抗生物質（全てSigmaから購入）を示されるように添加した。

30

【 0 0 8 4 】

EBV不死化及びオプソニン作用性のB細胞クローンの同定

血液（10 ml）を静脈穿刺により健康なボランティアから採取し、B細胞を単離し、そしてTosatoらによって記載されているように不死化させた。不死化された細胞を組織培養プレート中で6日間にわたり培養し、次いで40 µg/mlのTNP-LPS（Biosearch Technologies）、10 U/mlのhII-1(BD)及び100U/mlのhII-2(BD)によって刺激した。それぞれのウェルの上清を回収し、エンテロコッカス・フェカリス12030に対するオプソニン貪食作用性殺菌アッセイ（OPA）において使用して、最も高い殺菌が生ずるウェルを特定した。このウェルからB細胞を新たな組織培養プレート中に分注した。上清を再びOPAによって試験し、最も高い殺菌に至るウェルの細胞を、新たなプレート中に分注した。4ラウンドの後に、最も強力な応答のあるウェル中のB細胞を溶解し、そしてmRNA及びcDNAを調製した。

40

【 0 0 8 5 】

可変ドメインの増幅

それらの不死化B細胞を最後の選択の後に、RNA調製に十分な数が得られるまで約8週間にわたり培養した。RNAを約 5×10^6 の不死化細胞からRNeasyキット（QIAGEN）を使用して製造元の指示に従って抽出した。500 ngの容量の全RNAを、Omniscryptキット（QIAGEN）を使用して逆転写し、そして1 µlの容量のcDNA産物をPCRのための鋳型として使用した。それぞれの反応物は、50 µlのPCR Mix（HotStart Taq DNAポリメラーゼ、QIAGEN）と、100 pmolのそれぞれのプライマーと、1 µlのcDNA鋳型とから成っていた。PCR増幅のために、以下のプロトコールによる35サイクルを使用した：まず95 °Cで30秒間に引き続き、95

50

で30秒間と、58 で30秒間と、68 で45秒間とのサイクルで、70 で10分間にわたり最終伸長した。PCR産物をTOPOクローニングベクター2.1 (Invitrogen) 中にクローニングし、配列決定した。結果配列を、既知の生殖細胞系統配列に対してIgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) を使用して比較した。

【0086】

可変ドメインの、真核性発現ベクターTCAE6.7へのクローニング

ヒト 定常領域とIgG1定常領域とを含むTCAE6.7ベクターを先に記載されているように使用した [Preston MJ, Gerceker AA, Reff ME, PierGB (1998) 「シュードモナス・アエルギノーザ血清群O6リポ多糖に特異的な同一の可変領域を有する、一組のマウス・ヒトキメラ免疫グロブリンG (IgG) サブクラスとIgAモノクローナル抗体との産生及び特性評価 (Production and characterization of a set of mouse-human chimeric immunoglobulin G (IgG) subclass and IgA monoclonal antibodies with identical variable regions specific for *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O6 lipopolysaccharide.)」 *Infect Immun* 66: 4137-4142. PierGB, Boyer D, Preston M, Coleman FT, Llosa Nら (2004) 「ムコイド型菌株及び非ムコイド型菌株の両方による感染に対して保護するシュードモナス・アエルギノーザのアルギン酸塩に対するヒトモノクローナル抗体 (Human monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains.)」 *J Immunol* 173: 5671-5678]。4種の構築物からの重鎖 (H) V領域遺伝子を、Sall及びNheI制限酵素 (NEB) で消化し、同じ酵素で切断したTCAE6.7中にライゲーションした。ライゲーション反応混合物をコンピテントな大腸菌TOP10細胞 (Invitrogen) 中に形質転換し、そしてプラスミドを、plasmid Miniprepキット (QIAGEN) を使用して精製した。該ベクターを配列決定し、正しい配列を確認した。軽鎖 (L) の場合は、TOPOクローニングベクター2.1中にクローニングされた軽鎖の可変ドメインをBglII及びAvrII制限酵素 (NEB) で消化し、そして適合したH鎖可変領域を既に含み、同じ酵素で切断されるTCAE6.7ベクターとライゲーションした。プラスミドを大腸菌TOP10細胞 (Invitrogen) 中に形質転換し、個々のコロニーを単離し、プラスミドを得て、そして挿入されたDNAを配列決定することで、正しいL鎖V領域が該真核性発現ベクター中にクローニングされていることを確実にした。IgG1は、細菌の補体媒介性殺菌においてIgG3よりも優れていることが報告されているので [Brueggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MRら (1987) 「適合された一組のキメラ抗体を使用したヒト免疫グロブリンのエフェクター機能の比較 (Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies.)」 *J Exp Med* 166:1351-1361]、本発明者らは、IgG1定常ドメインを使用した。

【0087】

CHO細胞のトランスフェクション及び組換え抗体分子の発現

種々のH鎖 (VH2、VH3、VH4E及びVH8、本明細書の配列を参照) と組み合わせられてL鎖を含む4種の構築物を作製し、それらを、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) DHFR^{-/-}細胞中にリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を使用することによって製造元の指示に従って別々にトランスフェクションした。安定的にトランスフェクションされた細胞を、ヌクレオチドを含まない媒体 (Biochrom) を使用して選択した。トランスフェクションされたCHO細胞の培養上清を8日間にわたり毎日採取した。モノクローナル抗体を含む上清をプールし、硫酸アンモニウム (35% w/v) で沈殿させ、洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Biochrom) に対してSlide-A-Lyzer透析カセット (MWCO 10; Thermo Scientific) を使用して透析した。モノクローナル抗体 (mAb) 濃度は、ELISAによって標準及びGeneral Bioscience社製のキットを使用して求めた。

【0088】

オブソニン貪食作用性アッセイ (図1~図5)

オブソニン貪食作用性の殺菌は、Theilackerら (1,2) によって記載されているように、1.7%の仔ウサギ血清 (Cedar Lane) を補体源として使用し、そしてエンテロコッカス・フェカリス12030由来の精製リポテイコ酸 (LTA) に対して惹起されたウサギ血清をポジティ

ブコントロールとして使用して測定した(3~5)。細菌をインキュベートして、対数増殖中期 (mid-exponential) (OD_{650nm}) にまで増殖させた。等容量の細菌懸濁液 (1 ml 当たり 2.5×10^7)、白血球 (1 ml 当たり 2.5×10^7)、補体源 (1.7 %の最終濃度)、及び示された希釈での熱不活性化された免疫ウサギ血清を合わせ、ローターラックにて37 °Cで90分にわたりインキュベートした。インキュベートした後に、生細菌を連続希釈のアガー培養によって定量化した。殺菌パーセントを、PMNを含まない対照 (PMN^{neg}) の90分 (t90) でのコロニー数と、4種の全てのアッセイの成分を含んだチューブのコロニー数とを比較することによって、以下の式： $\{ [t90での平均CFU PMN^{neg}] - (t90での平均CFU)] / (t90での平均CFUPMN^{neg}) \} \times 100$ を使用して計算した。

【0089】

モノクローナル抗体VH2、VH3、VH4E及びVH8による細菌のオプソニン貪食作用性の殺菌を評価した。シュードモナス・アエルギノーザ中のアルギン酸塩を標的とするモノクローナル抗体F428を対照として使用した (Pier Preston JI 2004)。5種の菌株 (エンテロコッカス・フェカリス12030、エンテロコッカス・フェシウム1162 (VRE)、エンテロコッカス・フェシウム (患者の分離株)、スタフィロコッカス・アウレウスLAC (MRSA) 及びスタフィロコッカス・アウレウス (患者の分離株)) のオプソニン貪食作用性の殺菌は、モノクローナル抗体の存在下で用量に依存して生じたが、その一方で、対照のモノクローナル抗体F428、好中球及び補体単独は、生菌数を減らさなかった。

【0090】

動物実験 (図6~図9)

モノクローナル抗体の保護効力は、先に記載されたマウス菌血症モデルにおいてエンテロコッカス・フェカリス12030及びスタフィロコッカス・アウレウスLACに対して試験した (3)。6週齢~8週齢の8匹の雌のBALB/cマウス (CharlesRiver Laboratories Germany GmbH) を、エンテロコッカス・フェカリス12030 (1.8×10^8 cfu) 又はスタフィロコッカス・アウレウス (5.0×10^7 cfu) を尾の静脈を介して静脈内注射することによって感染させた。感染48時間後に、マウスを屠殺し、臓器を無菌的に取り出し、秤量し、そして均質化させた。細菌数は、一晚インキュベートした後にTSAプレートで連続希釈することによって数えた。統計学的有意性は、マンホイットニーの検定によって評価した。

【0091】

モノクローナル抗体VH4E及びVH8での受動免疫化は、血流からのエンテロコッカス・フェシウムE1162及びスタフィロコッカス・アウレウスLACのクリアランスを促進する一方で、非免疫ウサギ血清 (NRS) は、24時間後に細菌性の血流感染に対して保護しなかった。リポテイコ酸特異的血清 (LTAT5) をポジティブコントロールとして使用した。それというのも、本発明者らは、以前にこの血清がこれらの菌株に対してオプソニン作用性及び保護性であることを実証したからである (4)。

【0092】

体重200 g~300 gの雌のウイスターラット (CharlesRiver Laboratories Germany GmbH) をラット心内膜炎モデルにおいて使用した。それらの動物を、5.75 %のケタミン及び0.2 %のキシラジンの皮下適用によって麻酔した。小さいプラスチック製カテーテル (ポリエチレンチューブ; Intramedic PE 10) を、右頸動脈を介して挿入することによって、非細菌性の血栓性心内膜炎を引き起こした。該ポリエチレン製カテーテルを導入し、大動脈弁を通じて左心室中に進め、そしてカテーテルのルーメンを通じた観血的圧力測定により適切な配置を確実にした。カテーテルを適所に固定し、遠位で結紮した。引き続きカテーテル配置の48時間後に、尾の静脈中への注射を介して細菌の接種を行った。ラットを2つの群に割り当て、エンテロコッカス・フェカリス12030 (動物1匹当たり 1.25×10^5 cfu) で攻撃投与し、その一方で、4匹の動物に、モノクローナル抗体VH4Eを与え、4匹の動物に正常ウサギ血清 (NRS) を与えた。動物を手術後6日目に屠殺し、カテーテルの正しい配置を検証した。固有弁心内膜炎の程度を評価し、肉眼で等級付けし、引き続き弁の疣贅を無菌的に取り除いた。主な評価基準は、疣贅中の細菌数であった (1疣贅当たりのcfu)。それぞれの群について平均及び標準偏差を計算した。

10

20

30

40

50

【0093】

オプソニン貪食作用性アッセイ (OPA) によるドナープールの予備スクリーニングを用いることで、エンテロコッカス・フェカリス12030に対する最高力価のオプソニン作用性の抗体を有するドナーを特定した。健康なドナー2は、1:100血清を使用して最も高いオプソニン作用性の殺菌 (82 %) を示した。

【0094】

ドナー2のB細胞を、EBVを使用して不死化し、組織培養プレートに広げ、そして未希釈の上清をエンテロコッカス・フェカリス12030に対するオプソニン貪食作用性アッセイによって試験した。最も高いオプソニン作用性の殺菌を伴うウェルを選択し、それぞれのウェル中のB細胞を取り出し、培養し、そして引き続き新たな組織培養プレート中に播種した。4回のラウンド後に、最も高い力価を有するウェルの内容物を使用してmRNA及びcDNAを調製した。そして配列決定により、1つの軽鎖可変ドメイン及び4つの異なる重鎖可変ドメイン (本明細書の配列を参照のこと) の存在が明らかになった。これらの重鎖と軽鎖との組をTCAE中にクローニングし、これらの構築物をCHO細胞中にトランスフェクションした後に、上清からの組換えモノクローナル抗体を、4種の菌株:エンテロコッカス・フェカリス12030、エンテロコッカス・フェシウム1162 (CC17)、スタフィロコッカス・アウレウスLAC (CA-MRSA) 及びスタフィロコッカス・アウレウス (患者の分離株) を使用したオプソニン貪食作用性殺菌アッセイで使用した。オプソニン作用性の殺菌は、モノクローナル抗体の存在下で用量に依存して生じたが、その一方で、mAbが存在せず好中球及び補体のみが存在する場合には、生菌数は減らなかった。

10

20

【0095】

オプソニン貪食作用性阻害アッセイ (OPIA) を、mAbのうちの2つ (試験された菌株に対して最も高い殺菌性を示すVH4E及びVH8) で実施することで、それらの標的を決定した。エンテロコッカス・フェカリス12030の細胞壁抽出物をプロテイナーゼK又はNaIO4で処理することで、mAbの標的が多糖かタンパク質かを評価した。VH4E及びVH8のオプソニン作用活性は、細菌をNaIO4で処理したときには阻害されなかったが、細菌をプロテイナーゼで処理したときに阻害された。それはmAbの標的が多糖であることを示している。

【0096】

モノクローナル抗体VH4E及びVH8での受動免疫療法を、マウス菌血症モデルにおいて調査した。このモデルにおいて、本発明者らが実証できたことは、VH4E及びVH8が、エンテロコッカス・フェシウムE1162及びスタフィロコッカス・アウレウスLACのクリアランスを促進する一方で、正常ウサギ血清 (NRS) が、細菌性の感染に対して保護しなかったということである。両方の菌株で感染されたマウスの肝臓及び腎臓から回収された細菌の数は、mAbで処理されていないものと比較してかなり低減された。リポテイコ酸特異的血清 (LTAT5) をポジティブコントロールとして使用した。それというのも、本発明者らは、以前にこの血清が腸球菌株に対してオプソニン作用性及び保護性であることを実証したからである。

30

【0097】

ラットの心内膜炎モデルにおいてモノクローナル抗体VH4Eと正常ウサギ血清 (NRS) とを比較すると、VH4E処理されたラットの細菌性疣贅は、細菌による攻撃投与の前日にVH4Eで処理されていないラットと比較してかなり低減された (1ミリリットル当たりのcfu及び疣贅のミリグラム数で測定)。疣贅中の細菌の全量も、モノクローナル抗体を投与する群においてはより低いものであった。

40

【0098】

種々の動物モデルにおいて、細菌を腹腔内注射し、マウスに、細菌による攻撃投与の24時間前にVH8 (200 µlの生理食塩水中で1匹のマウスにつき4 µg/kg) を与えた。1匹のマウスにつき2 × 10⁸の接種量で、NRSを与えた全てのマウスは18時間後に死亡し、その一方でモノクローナル抗体を与えた動物の3/8 (37.5 %) は生存していた (図9)。

【0099】

同定された配列:

50

軽鎖VL (配列番号1)

LTMAGFPLLLLTLLIHCTGSWAQSVLTQPPSVSAAPGQRTV | SCSGSSSNLGNFASWYQQLPGAAPRLLIYDNDKRPSG | PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLTAYVFGSGTKVT

【0100】

DNA-軽鎖VL (配列番号2)

CTCACCATGGCCGGCTTCCCTCTCCTCCTCACCCCTTCTCATTCACCTGCACAGGGTCTGGGCCAGTCTGTGTTGACGCA
GCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACCTTGGGAACAATT
TTGCATCCTGGTACCAGCAACTCCCAGGAGCAGCCCCCGGCTCCTCATTTATGACAATGATAAGCGACCCCTCAGGGATT
CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGGCTCCAGACTGGGGACGAGGCCGA
TTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGACTGCTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGT

10

【0101】

重鎖VH2 (配列番号3)

GVGAELKKPGASVKVSKKASEYFTTYDI | IWRQATGQGLEWGMWNPNSGDTGFAQKFQDRVTLTRNTS | STAYMELSS
LRSEDAVYYCSRAPRYDSWSGYYSDFWGGTLVTVSS

【0102】

DNA-重鎖VH2 (配列番号4)

ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGAATACACCTTCACCACT
TATGATATCATCTGGGTGCGGCAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATGAATCCAAACAGTGGAGACAC
AGGCTTTGCACAGAAATCCAGGACAGAGTCACCTTGACCAGAAACACGTCCATTAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCA
GCCTGAGATCTGAAGATACGGCCGTCTATTACTGTTTCGAGAGCCCCTCGTTACGATTCTTGAGTGGTTATTACAGTGAC
TTCTGGGGCCAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0103】

重鎖VH3 (配列番号5)

GAGAELKKPGASVKVSKTSGYSLTNYG | NWRQAPGQGLEWMAW | CGYNGDTVFAQKFQGRVTMTTDTSTNTVYMDLRG
LTSDDAVYYCAKERRPFVAPEGMDAWGGTTVTVSS

【0104】

DNA-重鎖VH3 (配列番号6)

ATGGAGCTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGTTACAGTTTAAACCAAC
TATGGTATCAACTGGGTGCGACAGGCCCCCGACAAGGGCTTGAGTGGATGGCGTGGATCTGCGGTTACAATGGTGACAC
AGTCTTTGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAACACAGTCTACATGGACCTGAGGG
GCCTGACATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGAGAGGCGCCGTTTGTGCGACCAGAAGGAGGTATGGAC
GCCTGGGGCCAAGGGACGACAGTCACCGTCTCCTCA

30

【0105】

重鎖VH4E (配列番号7)

GVGAELKKPGSSVKVSKASGGSFASYA | SWVRQAPGQGLEWMGA | IPVFGTASYAQGFQGRVT | SADKSTNVVNMELSS
LFSEDAVYFCARTYMWNTGDWFFDLWGRGTLVTVSS

【0106】

DNA-重鎖VH4E (配列番号8)

ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCCTCGGAGGCTCGTTCCGCCAGC
TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGCGATCATCCCTGTCTTTGGTACAGC
AAGCTACGCACAGGGTTCCAAGGCAGAGTCACCATTTCCGCGGACAAATCCACAAACGTAGTCAACATGGAGCTGAGCA
GCCTGTTTTCTGAGGACACGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGGACTTACATGTGGAACACCGGGGACTGGTTTTTCGATCTC
TGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

40

【0107】

重鎖VH8 (配列番号9)

GAGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQRPGRGLEW | GR | DPNSGGTKYNEKFKNKGLTVDTSSSTAYMHLSS
LTSSEDAVYYCTRELPGTRYFDWVGAGTTVTVSS

【0108】

DNA-重鎖VH8 (配列番号10)

ATGGAGCTGGGGCTGAGCTTGTAAGCCTGGGGCTTCAAGTAAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGC

50

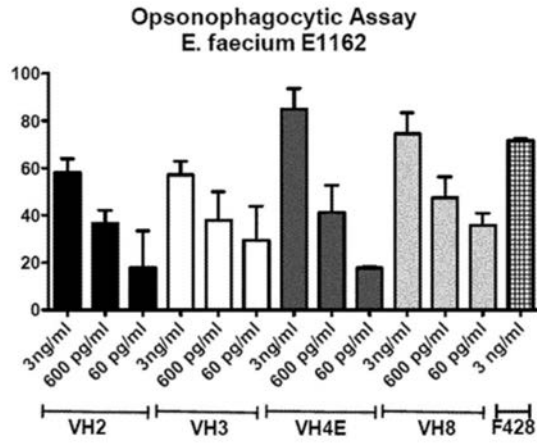
TACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTAATAGTGGTGGTAC
 TAAGTACAATGAGAAGTTCAAGAACAAGGGCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCA
 GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGAACTACCTGGGACCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCA
 GGGACCACTGTCACCGTCTCCTCA

【 0 1 0 9 】

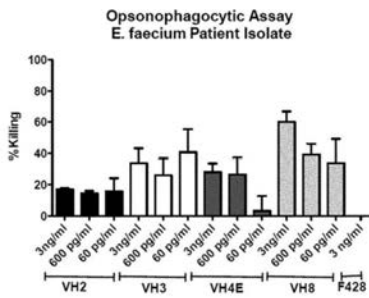
参考文献

1. Kelly-Quintos, C., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Goldmann, D. A. & Pier, G. B. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun* 74, 2742-2750 (2006). 10
2. Theilacker, C. et al. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 71, 1055-1069 (2009).
3. Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L. & Huebner, J. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J INFECT DIS* 189, 420-430 (2004).
4. Theilacker, C. et al. Protection against *Staphylococcus aureus* by antibody to the polyglycerolphosphate backbone of heterologous lipoteichoic acid. *J INFECT DIS* 205, 1076-1085 (2012).
5. Theilacker, C. et al. Serodiversity of Opsonic Antibodies against *Enterococcus faecalis* -Glycans of the Cell Wall Revisited. *PLoS ONE* 6, e17839 (2011). 20
6. Haller C, Berthold M, Wobser D, Kropec A, Lauriola M, et al. (2014) Cell-Wall Glycolipid Mutations and Their Effects on Virulence of *E. faecalis* in a Rat Model of Infective Endocarditis. *PLoS ONE* 9:e91863. doi:10.1371/journal.pone.0091863.
7. Bao Y, Li Y, Jiang Q, Zhao L, Xue T, Hu B, Sun B. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs) of *Staphylococcus aureus* is essential for the virulence independent of LuxS/AI-2 system. *Int J Med Microbiol*. 2013 May; 303(4): 190-200. doi:10.1016/j.ijmm.2013.03.004. Epub 2013 Mar 29.
8. Tosato G, Cohen JI (2007) Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit7.22. doi:10.1002/0471142735.im0722s76. 30

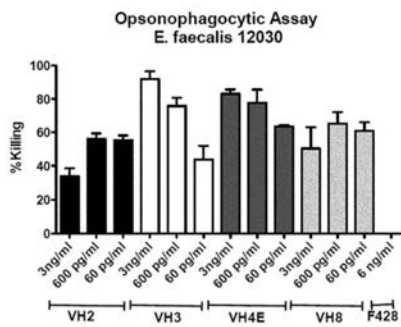
【 図 1 】



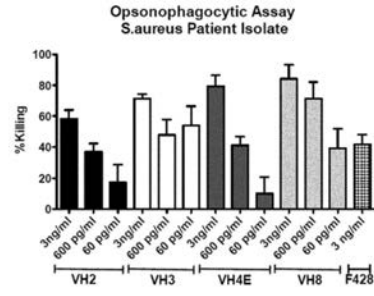
【 図 2 】



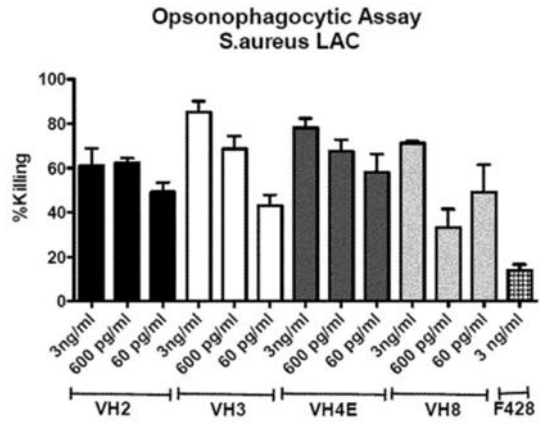
【 図 5 】



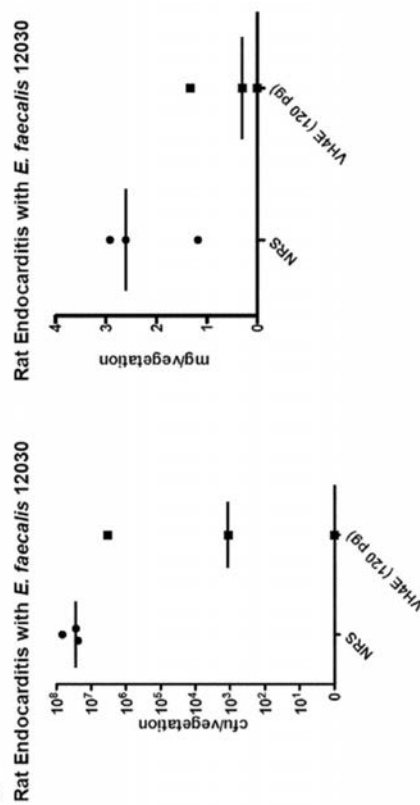
【 図 3 】



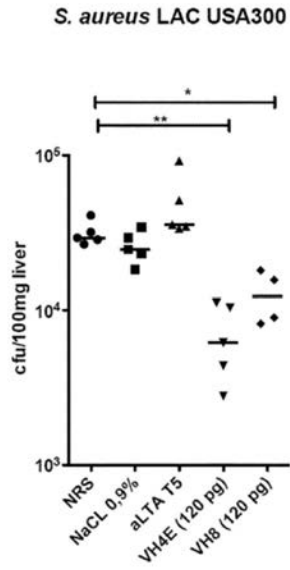
【 図 4 】



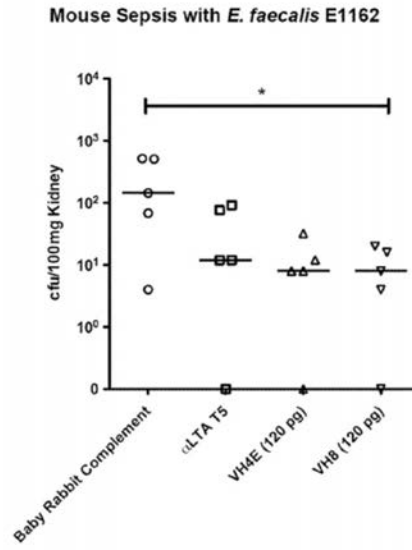
【 図 6 】



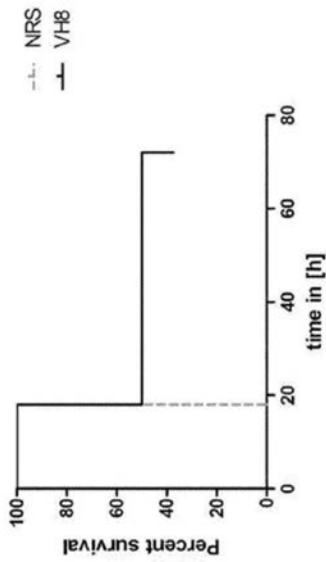
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2017506063000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/074797

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 and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- 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 purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/074797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 C07K16/12 ADD.		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/141278 A2 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]; THROSBY MARK [NL]; KRAMER ROBERT ARJEN [NL];) 13 December 2007 (2007-12-13) examples 1-10	1-16
X	WO 2005/103084 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; PIER GERALD) 3 November 2005 (2005-11-03) page 52, paragraph 5 - page 67, paragraph 1	1-16
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 February 2015		Date of mailing of the international search report 17/02/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer Cilensek, Zoran

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/074797

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. THEILACKER ET AL: "Protection Against Staphylococcus aureus by Antibody to the Polyglycerolphosphate Backbone of Heterologous Lipoteichoic Acid", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 205, no. 7, 23 February 2012 (2012-02-23), pages 1076-1085, XP055106511, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1093/infdis/jis022 figures 1-6 -----	1-16
X	EP 2 476 702 A1 (FUNDACAO OSWALDO CRUZ [BR]) 18 July 2012 (2012-07-18) examples 1-4 -----	1-16
A	US 7 230 087 B2 (PIER GERALD B [US] ET AL) 12 June 2007 (2007-06-12) sequence 6 -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/074797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007141278 A2	13-12-2007	AU 2007255388 A1	13-12-2007
		CA 2654502 A1	13-12-2007
		CN 101460518 A	17-06-2009
		EA 200870594 A1	30-06-2009
		EP 2024394 A2	18-02-2009
		JP 5586952 B2	10-09-2014
		JP 2009542194 A	03-12-2009
		KR 20090024745 A	09-03-2009
		US 2009169562 A1	02-07-2009
		US 2011268739 A1	03-11-2011
		US 2012315278 A1	13-12-2012
		US 2014099320 A1	10-04-2014
		WO 2007141278 A2	13-12-2007
		WO 2005103084 A2	03-11-2005
CA 2567748 A1	03-11-2005		
CN 101001874 A	18-07-2007		
DK 1745075 T3	24-06-2013		
EP 1745075 A2	24-01-2007		
EP 2439213 A1	11-04-2012		
EP 2455400 A1	23-05-2012		
EP 2455401 A1	23-05-2012		
EP 2455402 A1	23-05-2012		
EP 2468769 A1	27-06-2012		
ES 2415358 T3	25-07-2013		
HK 1100369 A1	13-09-2013		
JP 5080243 B2	21-11-2012		
JP 2008501317 A	24-01-2008		
JP 2011224023 A	10-11-2011		
PT 1745075 E	17-06-2013		
SI 1745075 T1	31-07-2013		
US 2006115486 A1	01-06-2006		
US 2011002932 A1	06-01-2011		
US 2011274700 A1	10-11-2011		
US 2012196359 A1	02-08-2012		
US 2012201833 A1	09-08-2012		
US 2012201834 A1	09-08-2012		
US 2012208270 A1	16-08-2012		
US 2013243806 A1	19-09-2013		
WO 2005103084 A2	03-11-2005		
EP 2476702 A1	18-07-2012	EP 2476702 A1	18-07-2012
		US 2012195907 A1	02-08-2012
US 7230087 B2	12-06-2007	AU 2002303832 A1	03-12-2002
		US 2003124631 A1	03-07-2003
		US 2006153856 A1	13-07-2006
		WO 02094854 A2	28-11-2002

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 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	R
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P	31/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N	33/569	F
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N	33/577	B

(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

(72) 発明者 ヒューブナー, ヨハネス
ドイツ, 7 9 1 1 5 フライブルク, アム リンダッカー 4 7

(72) 発明者 ロスマン, フリデリキ
ドイツ, 7 9 1 0 2 フライブルク, エルヴィン - シュトラーセ 2 4

(72) 発明者 クロペク - ヒューブナー, アンドレア
ドイツ, 7 9 1 1 5 フライブルク, アム リンダッカー 4 7

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB04 CA25
4C085 AA14 BB31 BB33 BB34 BB36 BB37 BB41 BB43 BB44 CC02
CC23 DD62 EE01 GG02
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA29 EA52 FA72 FA74

专利名称(译)	针对革兰氏阳性病原体的Opsonizing和保护性单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2017506063A	公开(公告)日	2017-03-02
申请号	JP2016543621	申请日	2014-11-17
申请(专利权)人(译)	阿尔贝托 - 路德维希 - 弗莱堡Uniberushitatto		
[标]发明人	ヒューブナーヨハネス ロスマンフリデリキ クロベクヒューブナーアンドレア		
发明人	ヒューブナー,ヨハネス ロスマン,フリデリキ クロベク-ヒューブナー,アンドレア		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/12 C07K16/46 C12N5/20 C12N5/24 A61K39/395 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/04 C07K16/1267 C07K16/1271 C07K2317/21 C07K2317/33 G01N33/56938 G01N2333/31 G01N2333/315 G01N2469/10 C07K2317/24 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2317/76 G01N33/56911		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/12 C07K16/46 C12N5/20 C12N5/24 A61K39/395.R A61P31/04 G01N33/53.D G01N33/569.F G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/CA25 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2013199849 2013-12-30 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
免疫学和传染病领域中的本发明涉及特异于革兰氏阳性细菌，特别是暴露于所述细菌表面上的碳水化合物结构的调理和保护性抗体。本发明包括单克隆和嵌合抗体以及此类抗体的片段，区域和衍生物。本发明还涉及与本发明的抗体结合的表位，以及该表位的序列，片段和区域。包含表位的抗体和肽，及其区域和片段，都可以用于诊断，预防和治疗应用。 [选型图]图1

(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2017-506063A (P2017-506063A) (43) 公表日 平成29年3月2日 (2017.3.2)
(51) Int. Cl. C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) C12N 5/20 (2006.01) C12N 5/24 (2006.01)	F I C12N 15/00 ZNA A C07K 16/12 C07K 16/46 C12N 5/20 C12N 5/24	テーマコード (参考) 4B065 4C085 4H045
(21) 出願番号 特願2016-543621 (P2016-543621)	(71) 出願人 513196315	最終頁に続く
(86) (22) 出願日 平成26年11月17日 (2014.11.17)	アルベルト-ルートヴィヒ-ユニベルシタット フライブルク	
(85) 翻訳文提出日 平成28年7月25日 (2016.7.25)	ドイツ, 79085 フライブルク, フェーネンベルクプラッツ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2014/074797	(74) 代理人 100088904	
(87) 国際公開番号 W02015/101438	弁理士 庄司 隆	
(87) 国際公開日 平成27年7月9日 (2015.7.9)	(74) 代理人 100124453	
(31) 優先権主張番号 13199849.4	弁理士 實延 由利子	
(32) 優先日 平成25年12月30日 (2013.12.30)	(74) 代理人 100135208	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	弁理士 大杉 卓也	
	(74) 代理人 100152319	
	弁理士 曾我 亜紀	

(54) 【発明の名称】 グラム陽性病原体に対するオプソニン作用性及び保護性のモノクローナル抗体