

(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2005-508395

(P2005-508395A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12	C07K 16/12	4B024
A61K 39/07	A61K 39/07	4B064
A61K 39/395	A61K 39/395	H 4C085
A61P 31/04	A61P 31/04	4H045
C07K 16/18	C07K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-542630 (P2003-542630)	(71) 出願人	302014206
(86) (22) 出願日	平成14年11月5日 (2002.11.5)		ボード オブ レジェンツ, ザ ユニバー
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		シティー オブ テキサス システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/035567		アメリカ合衆国 78701 テキサス州
(87) 国際公開番号	W02003/040384		オースティン, ウェスト 7ティーエイ
(87) 国際公開日	平成15年5月15日 (2003.5.15)		チ ストリート 201
(31) 優先権主張番号	60/332, 849	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成13年11月5日 (2001.11.5)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炭疽菌毒素を検出および中和するための組換え抗体

(57) 【要約】

モノクローナル抗体に由来する親和性成熟抗体またはその一部を使用した、炭疽菌に感染した宿主または炭疽菌に感染した危険性のある宿主を治療するための組成物および方法について開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質毒素に対して結合特異性を有する精製された親和性成熟組換え抗体またはその一部。

【請求項2】

抗原ハイブリドーマからクローニングされた、請求項1記載の抗体。

【請求項4】

一部が、scFvフラグメント、Fabフラグメント、およびIgGフラグメントからなる群より選択される、請求項1記載の抗体。

【請求項5】

任意の抗体クラスを含む、請求項1記載の抗体。

【請求項7】

バクテリオファージに感染した細菌において発現された、請求項1記載の抗体。

【請求項8】

バクテリオファージが、防御性抗原に対して野生型抗体より少なくとも3倍高い親和性および増大した安定性を示す1つまたは複数のクローンについてスクリーニングされる、請求項7記載の抗体。

【請求項9】

ホモ二量体抗体を生じるように1つまたは複数のクローンが野生型抗体と融合している、請求項8記載の抗体。

【請求項10】

タンパク質毒素から宿主を防御する、請求項1記載の抗体。

【請求項11】

宿主がヒトである、請求項10記載の抗体。

【請求項12】

宿主が哺乳動物である、請求項10記載の抗体。

【請求項13】

約1対1の化学量論でタンパク質抗原に結合する、請求項1記載の抗体。

【請求項14】

タンパク質毒素が、ボツリヌス毒素、ウェルシュ菌毒素、コノトキシン、リシン、サキトキシン、志賀毒素、黄色ブドウ球菌毒素、テトロドトキシン、ベロ毒素、マイクロシスチン(シアンギノシン)、アプリン、コレラ毒素、破傷風毒素、トリコテセンマイコトキシン、および動物の毒液に由来する毒素からなる群より選択される、請求項1記載の抗体。

【請求項15】

炭疽菌防御性抗原に対して結合特異性を有する精製された親和性成熟組換え抗体またはその一部。

【請求項16】

抗防御性抗原ハイブリドーマからクローニングされた、請求項15記載の抗体。

【請求項17】

抗防御性抗原ハイブリドーマ14B7からクローニングされた、請求項15記載の抗体。

【請求項18】

一部がscFvフラグメントを含む、請求項15記載の抗体。

【請求項19】

任意の抗体クラスを含む、請求項15記載の抗体。

【請求項20】

一部がscFvフラグメントを含み、少なくとも40kDaの一価抗体部分を生じるように抗体定常領域をさらに含む、請求項15記載の抗体。

【請求項21】

バクテリオファージに感染した細菌において発現された、請求項15記載の抗体。

【請求項22】

10

20

30

40

50

バクテリオファージが、防御性抗原に対して野生型14B7より少なくとも3倍高い親和性および増大した安定性を示す1つまたは複数のクローンについてスクリーニングされる、請求項21記載の抗体。

【請求項23】

二価ホモ二量体抗体を生じるように1つまたは複数のクローンが14B7野生型と融合している、請求項22記載の抗体。

【請求項24】

炭疽菌毒素から宿主を防御する、請求項15記載の抗体。

【請求項25】

宿主がヒトである、請求項24記載の抗体。

【請求項26】

宿主が哺乳動物である、請求項24記載の抗体。

【請求項27】

約1対1の化学量論で炭疽菌防御性抗原に結合する、請求項15記載の抗体。

【請求項28】

炭疽菌感染の症状を緩和する、請求項15記載の抗体。

【請求項29】

炭疽菌防御性抗原を中和する、請求項15記載の抗体。

【請求項30】

炭疽菌毒素中毒から宿主を防御する、請求項15記載の抗体。

【請求項31】

少なくとも約63nMの平衡解離定数を示す、炭疽菌防御性抗原に対する精製抗体。

【請求項32】

抗PAハイブリドーマからクローニングされた抗体配列から親和性成熟された、請求項31記載の抗体。

【請求項33】

抗PAハイブリドーマ14B7からクローニングされた抗体配列から親和性成熟された、請求項31記載の抗体。

【請求項34】

一部がscFvフラグメントを含む、請求項31記載の抗体。

【請求項35】

任意の抗体クラスを含む、請求項31記載の抗体。

【請求項36】

一部がscFvフラグメントを含み、少なくとも40kDaの一価抗体部分を生じるように抗体定常領域をさらに含む、請求項31記載の抗体。

【請求項37】

細菌において発現された、請求項31記載の抗体。

【請求項38】

防御性抗原に対して野生型14B7より少なくとも3倍高い親和性および増大した安定性を示す、請求項31記載の抗体。

【請求項39】

親和性成熟抗体を発現する遺伝子が、二価ホモ二量体抗体を生じるように14B7野生型遺伝子と融合している、請求項31記載の抗体。

【請求項40】

炭疽菌毒素から宿主を防御する、請求項31記載の抗体。

【請求項41】

宿主がヒトである、請求項40記載の抗体。

【請求項42】

宿主が哺乳動物である、請求項40記載の抗体。

【請求項43】

10

20

30

40

50

約1対1の化学量論で炭疽菌防御性抗原に結合する、請求項31記載の抗体。

【請求項44】

炭疽菌感染の症状を緩和する、請求項31記載の抗体。

【請求項45】

炭疽菌毒素を中和する、請求項31記載の抗体。

【請求項46】

炭疽菌毒素中毒から宿主を防御する、請求項31記載の抗体。

【請求項47】

細菌感染の症状から防御する免疫応答を生じる、および/または細菌感染の症状を緩和する、細菌毒素に対する抗体を生成する方法であって、以下の段階を含む方法：

細菌毒素またはその断片を発現する微生物を、微生物内で発現されるバクテリオファージ中で培養する段階；

親和性成熟抗体またはその一部を発現するバクテリオファージライブラリーを構築する段階；

バクテリオファージライブラリーと微生物を接触させる段階；および

細菌毒素に対して少なくとも3倍高い親和性を有するバクテリオファージを選択する段階

10

【請求項48】

親和性成熟抗体が、細菌毒素に特異的な抗体に由来する遺伝子配列を含む、請求項47記載の方法。

20

【請求項49】

親和性成熟抗体が、炭疽菌防御性抗原に特異的な抗体に由来する遺伝子配列を含む、請求項47記載の方法。

【請求項50】

親和性成熟抗体が14B7抗体の一部を含む、請求項47記載の方法。

【請求項51】

親和性成熟抗体が14B7抗体のscFv遺伝子断片を含む、請求項47記載の方法。

【請求項52】

親和性成熟抗体に由来する遺伝子配列とヒト定常ドメインの融合後に、より大きな分子量の一価抗体が作成される、請求項49記載の方法。

30

【請求項53】

二価ホモ二量体抗体が作成される、請求項47記載の方法。

【請求項54】

抗体またはその一部が二価である、請求項51記載の方法。

【請求項55】

親和性成熟抗体またはその一部を精製する段階をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項56】

抗体が炭疽菌毒素から宿主を防御する、請求項47記載の方法。

【請求項57】

宿主がヒトである、請求項56記載の方法。

40

【請求項58】

抗体が炭疽菌感染の症状を緩和する、請求項56記載の方法。

【請求項59】

抗体が炭疽菌毒素を中和する、請求項56記載の方法。

【請求項60】

炭疽菌に感染した宿主または炭疽菌に感染した危険性のある宿主を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

モノクローナル抗体から得られた、タンパク質毒素に対する親和性成熟抗体またはその一部を含む組成物を宿主に投与する段階。

【請求項61】

50

宿主がヒトである、請求項60記載の方法。

【請求項62】

宿主が哺乳動物である、請求項60記載の方法。

【請求項63】

症状が発症した後に親和性成熟抗体が投与される、請求項60記載の方法。

【請求項64】

親和性成熟抗体またはその一部が予防的に投与される、請求項60記載の方法。

【請求項65】

親和性成熟抗体またはその一部がscFvフラグメントを含む、請求項60記載の方法。

【請求項66】

親和性成熟抗体またはその一部が少なくとも63nMの解離定数を示す、請求項60記載の方法。

【請求項67】

薬学的に許容される担体中に毒素に対する親和性成熟抗体またはその一部を含む、病原体感染を治療するための薬学的組成物。

【請求項68】

毒素が細菌毒素である、請求項67記載の薬学的組成物。

【請求項69】

毒素が炭疽菌毒素である、請求項67記載の薬学的組成物。

【請求項70】

炭疽菌を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

薬学的に許容される担体中の、炭疽菌防御性抗原に対して結合特異性を有する治療有効量の精製された親和性成熟抗体またはその一部を、炭疽菌の治療を必要とする個体に投与する段階。

【請求項71】

タンパク質毒素に対して結合特異性を有する固定化され精製された親和性成熟組換え抗体またはその一部を含む診断装置。

【請求項72】

指標をさらに含む、請求項71記載の診断装置。

【請求項73】

指標が色の変化をさらに含む、請求項72記載の診断装置。

【請求項74】

親和性成熟組換え抗体またはその一部に対して結合親和性を有する固定化されたタンパク質毒素を含む診断装置。

【請求項75】

指標をさらに含む、請求項74記載の診断装置。

【請求項76】

指標が色の変化をさらに含む、請求項75記載の診断装置。

【請求項77】

タンパク質毒素に対する暴露を診断する方法であって、以下の段階を含む方法：

タンパク質抗原に対して結合特異性を有する固定化され精製された親和性成熟組換え抗体またはその一部を含む診断装置と液体を接触させる段階、およびタンパク質抗原と抗体の反応が表れたかどうか診断装置を分析する段階。

【請求項78】

液体が血液、尿、唾液、または他の体液である、請求項77記載の方法。

【請求項79】

分析が検出器を含む、請求項77記載の方法。

【請求項80】

検出器が、色、放射能、光ルミネセンス、化学ルミネセンス、蛍光、表面プラズモン共鳴などを検出する、請求項79記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、一般的に、抗体工学の分野、特に、治療の初期段階および進んだ段階で治療上
有用な中和抗体構築物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本願は変更書式であり、2001年11月5日に出願された米国特許仮出願第60/332,849号の優
先権を主張する。 10

【0003】

米国政府は、米国陸軍、テキサス大学会計番号26-0454-85、および国防総省助成金番号DA
A21-93C-0101により本発明において一定の権利を有し得る。

【0004】

本発明の範囲を限定することなく、真っ先に開発される生物戦病原体の1つである炭疽菌 (
Bacillus anthracis)の感染の治療に関連して、本発明の背景が説明される。現在、炭疽
菌は、一例として米国において大きな脅威と認識されている。

【0005】

今までこの分野での炭疽菌を形成する孢子に関する研究は、炭疽菌がヒトにまれにしか発
生しないために限られてきた。一般的に炭疽病 (anthrax) と呼ばれる炭疽菌による感染は
、ひづめのある哺乳動物において最もよく発生する。ヒトでの予防処置計画は、一般的に
、ペニシリン、ドキシサイクリン、およびフルロキノロンを含むいくつかの抗生物質を使
用することに限られている。(Morbidity and Mortality Weekly Report.2001.最新情報:
生物テロに関連する炭疽菌の研究および炭疽菌を保菌している可能性のある人間を臨床評
価するための中間ガイドライン (Investigation of bioterrorism-related anthrax and i
nterim guidelines for clinical evaluation of persons with possible anthrax.)50:9
41-8)。炭疽菌ワクチンでも感染を予防することができるが、米疾病管理予防センター (CD
C) は一般の人々に広範囲の予防接種を薦めていない。(CDC Health Alerts, Advisories, a
nd Updates.2001.郵便物を手で触るか、または処理をする職場での炭疽菌への暴露から就
業者を保護するためのCDC中間勧告 (CDC Interim Recommendations for protecting worke
rs from exposure to Bacillus anthracis in work site where mail is handled or pro
cessed.)2000年10月31日 www.cdc.gov/DocumentsApp/Anthrax/10312001/han51.asp)。実
際に、一般の人々へのワクチン接種は行われていない。 20 30

【0006】

ヒト炭疽病の重篤な形として、吸入型炭疽病、皮膚型炭疽病、および腸型炭疽病が挙げら
れる。吸入型炭疽病は、通常、致死性である。腸型炭疽病は、汚染された食品を食べた後
に起こることがあり、腸管の急性炎症により特徴付けられる。仮に発生しても、炭疽病が
直接人間を介して広がる可能性は極めて低い。従って、CDCは、炭疽病にかかった人に接
触した人 (例えば、家庭で接触した人、友人、または同僚) が同じ感染源に暴露されていな
い限り、接触した人に予防接種または治療する必要はないと説明している。 40

【0007】

炭疽菌に感染した人に対する治療の成功は、抗生物質耐性の発生率の増加および生存の機
会を小さくする治療の遅れなどのいくつかの要因によって限定される。抗生物質を用いた
炭疽病の早期治療は死亡率を低下させるのに必須であり、治療の遅れは生存率を著しく低
下させることが知られている。しかしながら、例えば、細菌孢子を吸入した場合、今まで
に吸入型炭疽病として知られている感染の初期症状は風邪の症状と似ている場合があるの
で、早期治療は難しい。さらに、どのように細菌に接触したかによって、炭疽菌感染の症
状が現れるのに7日から60日かかることがある。

【0008】

炭疽菌の病原性は、2つの点、すなわち浮腫の出現により明らかになる毒性作用と、感染者の死亡につながる可能性がある、いわゆる致死性の毒性作用で現れる。これらの作用は、炭疽菌に存在する3種類のタンパク質因子の組み合わせによって生じる毒素の存在に起因している。ヒトおよび哺乳動物において、毒素は、宿主に症状がないように見える感染初期段階でも体内で増加する。このことは、治療の遅れが死につながり得る理由を説明している。従って、より優れた炭疽病介入治療が絶対に必要とされるだけでなく、感染初期に炭疽菌の存在を確かめるためのポイントオブケアの迅速でかつ極めて感度の高い診断検査が絶対に必要とされる。

【0009】

様々な細菌感染に対する治療介入として、毒素を抗体(通常、ポリクローナル抗体)で中和する受動免疫が用いられてきた(Keller M A, Stiehm E R, 感染症の予防および治療における受動免疫(Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases.) Clin. Microbiol. Reviews 13:602-614)。患者にポリクローナル抗血清を使用する大きな制約は、異なる種に由来するタンパク質に対する患者の免疫応答による「血清病」の可能性である。さらに、高親和性の抗体が毒素中和に有効であるが、ポリクローナル血清の親和性を故意に高める一般的な方法はなく、ハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体でさえ親和性を意図して高める一般的な方法はない。

10

【0010】

高親和性の操作された抗体または抗体構築物を用いて毒素を中和する一般的な治療法を、炭疽病、ジフテリア(*diphtheria*)、百日咳、破傷風を生じる天然の細菌株、および志賀毒素を生成する大腸菌株を含む様々な細菌感染に適用することができる。ウシ流産菌(*Bruce*
lla abortus)、マルタ熱菌(*Brucella melitensis*)、ブルセラ・スジス(*Brucella suds*)、オウム病クラミジア(*Chlamydia psittaci*)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)、野
兎病菌(*Francisella tularensis*)、シュードモナス・マレット (*Pseudomonas mallet*)、偽
鼻疽菌(*Pseudomonas pseudomallei*)、チフス菌(*Salmonella typhi*)、志賀赤痢菌(*Shigell*
a dysenteriae)、コレラ菌(*Vibrio cholera*)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)などのオー
ストラリアグループの病原性細菌も抗体介入の対象に入れることができる。さらに、ボツリ
ヌス毒素、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)毒素、コノトキシン、リシン、サキ
トキシン、志賀毒素、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)毒素、テロドトキシン
、ペロ毒素、マイクロシスチン(シアングノシン(*Cyanginosin*))、アブリン、コレラ毒素
、破傷風毒素、トリコセシマイコトキシン、または動物の毒液に由来する毒素などの導
入毒素を含む生物戦病原体として使用することを目的とした遺伝子操作された病原体を、
同じように中和することができる。これにより、ワクチンが入手できない感染症でさえ生
存率が著しく増加する。

20

30

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

しかしながら、炭疽菌に暴露された患者を予防的に処置するための現在の組成物および方法は、抗生物質による治療が感染症に完全に効くように、細菌の防御性抗原(protective antigen)または毒素を標的としないことが分かっている。現行の治療レジメの重大な問題は、抗体が、広く使用されるのに必要な親和性およびアビディティを有さないことである。

40

【0012】

必要とされるのは、炭疽菌防御性抗原に対して結合特異性を有する精製された親和性成熟組換え抗体またはその一部である。1つの態様において、抗体は、抗防御性抗原ハイブリドーマ(例えば、マウスハイブリドーマ14B7)からクローニングされる。抗体の一部は、抗体の任意の一部またはフラグメント(例えば、scFvフラグメント)でよい。抗体は任意の抗体クラスの抗体でよい。例えば、抗体はscFvフラグメントから得られてもよく、例えば、少なくとも40kDaの一価抗体部分を生じるように抗体定常領域をさらに含む。

【0013】

50

抗体は、不完全PCR増幅後に、ハイブリドーマからクローニングされた野生型抗体配列より高い親和性を有するクローン(例えば、エラーブローン発現ライブラリー)を選択することによって親和性成熟されてもよい。1つの態様において、防御性抗原に対して野生型より少なくとも3倍高い親和性および増大した安定性を示すクローンが選択される。

【0014】

親和性成熟抗体またはその一部は、二価ホモ二量体抗体を生じるように、例えば、14B7野生型と融合されてもよい。抗体またはその一部は、一般的に、炭疽菌毒素から宿主を防御する。宿主は、例えば、ヒトでもよく、一例では、約1対1の化学量論を示す。炭疽菌防御性抗原に対する精製抗体は、一般的に、少なくとも約63nMの平衡解離定数を示す。

【0015】

本発明はまた、細菌感染の症状から防御する免疫応答を生じる、細菌毒素に対する親和性成熟抗体を生成する方法に関する。前記方法は、細菌毒素またはその断片を発現する微生物を、微生物内で発現されるバクテリオファージ中で培養する段階を含む。次いで、バクテリオファージライブラリーが親和性成熟抗体またはその一部を発現する。バクテリオファージライブラリーおよび微生物を接触させ、細菌毒素に対して少なくとも3倍高い親和性を有するバクテリオファージが選択される。本発明を用いて、炭疽菌防御性抗原に特異的な親和性成熟抗体が作成された。

【0016】

本発明は、炭疽菌に感染した宿主または炭疽菌に感染した危険性のある宿主を治療する方法をさらに含み、前記方法は、モノクローナル抗体から得られた親和性成熟抗体またはその一部を含む組成物を宿主に投与する段階を含む。親和性成熟抗体は症状が始まった後に投与されてもよく、予防的に投与されてもよい。1つの態様において、親和性成熟抗体またはその一部は、例えば、少なくとも約63nMの解離定数を有するscFvフラグメントでもよい。

【0017】

本発明はまた、薬学的に許容される担体中に毒素に対する親和性成熟抗体またはその一部を含む、病原体感染を治療するための薬学的組成物を含む。毒素は細菌毒素(例えば、炭疽菌毒素)でもよい。例えば、炭疽菌感染の治療は、薬学的に許容される担体中の、炭疽菌防御性抗原に対して結合特異性を有する治療有効量の精製された親和性成熟抗体またはその一部を、炭疽菌の治療を必要とする個体に投与する段階を含んでもよい。

【0018】

本発明はまた、タンパク質毒素に対して親和性を有する親和性成熟抗体を組み込み、固定化した診断装置を含む。逆の配置、すなわち、親和性成熟抗体の存在を診断するためにタンパク質毒素が固定化および使用される配置も含まれる。

【0019】

本発明はまた、タンパク質毒素に対する暴露を検出するための診断方法を含み、前記方法は、タンパク質毒素に対して親和性を有する親和性成熟抗体を含み、組み込み、固定化した診断装置と液体(例えば、血液または尿)を接触させる段階、および診断装置を分析する段階からなる。

【0020】

本発明の特徴および利点をさらに完全に理解できるようにするために、発明の詳細な説明と添付の図面が参照される。異なる図面中の同じ数字は同じ部分を指している。

【0021】

発明の詳細な説明

本発明の様々な態様の作成および使用が以下で詳細に議論されるが、本発明は、様々な特定の場面で具体化し得る多くの適用可能な発明概念を提供することが理解されるべきである。本明細書で議論される特定の態様は、本発明を作成および使用する特定の方法の単なる例示であり、本発明の範囲を定めない。

【0022】

炭疽菌は、世界の多くの土地で見られる、動物からヒトに感染する土壌生物である。グラ

10

20

30

40

50

ム陽性細菌である炭疽菌の耐熱性胞子を吸入して感染すると、治療せずに放置しておくこと、80%の死亡率まで達する(Shafazand.CHEST 116:1369-76)。現実には、炭疽菌は真っ先に開発される生物戦病原体の1つであった。炭疽菌は大きな脅威と認識され続けている。ワクチン株が開発されているが、広範囲の使用はできず、CDCによる推奨もされていない。

【0023】

吸入後、炭疽菌胞子は肺胞マクロファージ内で発芽し、リンパ節に移動する。リンパ節で胞子は増殖し、血流に入り、急速に血液1ミリリットルにつき $10^7 \sim 10^8$ 個の生物に達する(Dixon T, Meselson M, Guillemin J, Hanna P. 1999. 炭疽菌(Anthrax) *New England Journal of Medicine* 341:815-26)。増殖期の細菌は、疾患の原因である3つの成分からなるエキソトキシンを放出する。この毒素は83kDaポリペプチドの防御性抗原(PA)であり、最近特定されたマクロファージ表面受容体に結合し(Bradley AB, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JAT. 2001. 炭疽菌毒素の細胞受容体の特定(Identification of the Cellular Receptor for Anthrax Toxin.) *Nature* 414)、フリン様プロテアーゼにより切断され、七量体環にオリゴマー化した後、2つの触媒成分、致死因子(lethal factor)(LF)または浮腫因子(edema factor)(EF)の移動を促進する(図1)。LFは、MEK1、2、3を切断する亜鉛メタロプロテアーゼであり、サイトカインTNF およびIL-1 を放出させ、宿主においてショックを誘導する。EFは、局所浮腫を引き起こし、好中球機能を損なうカルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼである(Leppla. *Handb Exp Pharmacol*. 2000. 145:445-72)。

10

【0024】

炭疽菌毒素機構および14B7中和ステップを図1Aに示す。ステップ2において、PAは、未定の細胞受容体と結合する。ステップ2において、PAはフリン様細胞表面プロテアーゼにより切断されて、20kDaのN末端断片²⁰PAを放出する。⁶³Paは結合したままである。ステップ4において、受容体に結合しているPAは七量体化し、その後、ステップ5において、EFおよびLFが化学量論的に七量体化PAに競合結合する。ステップ6において、複合体は受容体を介したエンドサイトーシスによって内部移行し、その後、小胞が酸性化する。次いで、PAはコンフォメーションを変えてエンドリソソーム膜に孔を作り、ステップ7に示されるように、この孔を通してEF/LFは拡散する。抗体14B7は、ステップ1においてPA結合部位で細胞受容体と競合することによって、この方法を妨害する。図1Bは抗体構築物を示す: Fab(インタクトな抗体のタンパク質分解消化から作成される); 一価scFv; C末端二量体化ヘリックスにより二量体化されたscFv; およびscAb(scFvとヒト定常ドメインのC末端融合により作成される)。

20

30

【0025】

毒素または胞子による攻撃後の死亡を妨げる治療戦略として、毒素の働きを阻止することが積極的に推し進められてきた。毒素の阻止は、以下の3つの方法の1つによりPAの機能を破壊することによって最も良く達成される: 抗体またはペプチドを用いた触媒サブユニット結合の阻害(Mourez M, Kane RS, Mogridge J, Metallo S, Deschatelets Pら、2001. 炭疽菌毒素の多価阻害剤のデザイン(Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin.) *Nature Biotechnology* 19:958-61; Little SF, Novak JM, Lowe JR, Leppla SH, Singh Yら、1996. モノクローナル抗体を用いた炭疽菌防御性抗原の致死因子結合ドメインおよび細胞受容体結合ドメイン(Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies.) *Microbiology* 142:707-15)、ネガティブドミナント変異体を用いたPAオリゴマー化の妨害(Sellman B, Mourez M, Collier R. 2001. 毒素サブユニットのドミナントネガティブ変異体: 炭疽菌治療へのアプローチ(Dominant-Negative Mutants of a Toxin Subunit: An Approach to Therapy of Anthrax) *Science* 292:695-7; Singh Y, Khanna H, Chopra A, Mehra V. 2001. 炭疽菌防御性抗原のドミナントネガティブ変異体はインビボで炭疽菌毒素を阻害する(A dominant negative mutant of *Bacillus anthracis* protective antigen inhibits anthrax toxin in vivo.) *Journal of Biological Chemistry* 276:22090-4)、または抗体による毒素とその受容体の結合の阻止。最後の戦略は広範囲にわたって調べられており、エアロゾル化炭疽菌胞子で攻撃された実験動物において試験されている

40

50

唯一のものである(Little S, Ivins B, Fellows P, Friedlander A. 1997. モルモットにおける炭疽菌感染に対するポリクローナル抗体による受動防御(Passive protection by polyclonal antibodies against Bacillus anthracis infection in guinea pigs.) Infection and Immunity 65:5171-5)。PAに対するポリクローナル抗体の惹起は防御と相関している(Pitt M, Little S, Ivins B, Fellows P, Barth Jr.、2001. 吸入型炭疽病ウサギモデルにおける免疫のインビトロでの相関関係(In vitro correlate of immunity in a rabbit model of inhalational anthrax.) Vaccine 19:4768-73)、実際に、FDAより認可されたワクチンの主な免疫原成分を構成する。攻撃、特に、非常に毒性の強い炭疽菌株に対するモノクローナル抗体の防御能力は依然として問題となっている(Little S, Ivins B, Fellows P, Friedlander A. 1997. モルモットにおける炭疽菌感染に対するポリクローナル抗体による受動防御、Infection and Immunity 65:5171-5)。

10

20

30

40

50

【0026】

効果的な毒素中和への手掛かりは、遅いキネティックオフレート(kinetic off-rate)に基づく高い親和性である。抗体のオフレートがヒト血清中での抗体-毒素複合体のクリアランス時間より遅ければ、抗体は化学量論的に毒素を効果的に除去することができる。たとえクリアランス速度が抗体のオフレートより遅くても、高親和性の抗体が少量の毒素をより良く中和することができるというのは理にかなっている。従って、高親和性の抗体を非常に低い用量で使用することができるので、治療用抗体試薬に対する不要な免疫反応などの副作用の可能性が少なくなる。強力な毒素を中和するのに、約70nMまたはそれ以下の解離定数(K_D)を有する抗体が必要とされる。残念なことに、ポリクローナル免疫血清に由来する抗体の親和性を高める方法はなく、ハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体についてもない。動物免疫化後に、単に「手にしたものを選択(take what one gets)」しなければならない。他方で、抗体工学は、合理的かつ進化的な方法により抗体の親和性および特異性の改善を可能にするだけではない。遺伝子工学的技法を用いて、親和性および特異性が増大した抗体を様々な形(例えば、ヒト化された全IgG、Fab、scAb、およびscFv)で作成することができる。これらの様々な形には全て特有の治療上の利点がある。

【0027】

前述の理由の全てから、炭疽菌の症状を緩和し、感染後の抗生物質治療のウィンドウオブタイム(window of time)を延長することが必要とされる。本発明の組成物および方法は、医療の専門家および研究者に、感染したヒトまたは哺乳動物(従来、宿主として知られている)の防御を増大させ、感染の進んだ段階の患者を初めて治療する独特の治療法を提供する。

【0028】

一般的に、以下の単語または句は、説明、実施例、および特許請求の範囲で用いられた時、指示された定義を有する。

【0029】

用語「Fv」は、定常ドメインを含まない共有結合または非共有結合した重鎖および軽鎖のヘテロ二量体であると定義される。用語「scFv」は単鎖ヘテロ二量体を意味する。

【0030】

用語「Fab'」は、抗体重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメインと、抗体軽鎖の可変ドメインおよび定常ドメインと、重鎖 C_H1 ドメインのカルボキシ末端にある少なくとも1個の付加アミノ酸残基(1つまたは複数のシステイン残基を含む)からなるヘテロ二量体を含むポリペプチドと本明細書で定義される。F(ab')₂抗体フラグメントは、1つまたは複数の共有結合により結合したFab'抗体フラグメント対である。Fab'重鎖はヒンジ領域を含んでもよい。これは、任意の望ましいヒンジアミノ酸配列でよい。または、ヒンジは、1個のシステイン残基、または好ましくは短い(約1~10残基)システイン含有ポリペプチドに有利なように完全に除かれてもよい。特定の用途において、一般的な天然に生じる抗体ヒンジ配列(システインの後に、2個のプロリン、次いで、もう1つのシステイン)が用いられる。この配列はヒトIgG₁分子のヒンジに見られる(Kabat EAら、1987.免疫学的に関心のあるタンパク質の配列(Sequence of Proteins of Immunological Interest)第3版.National I

nstitutes of Health, Bethesda, MD)。他の態様において、ヒンジ領域は、別の望ましい抗体クラスまたはアイソタイプから選択される。本発明の特定の好ましい態様において、Fab'のC_H1のC末端は配列Cys X Xと融合される。Xは、好ましくはAlaであるが、Arg、Asp、またはProなどの任意の他の残基でもよい。一方または両方のXアミノ酸残基が欠失されてもよい。

【0031】

「ヒンジ領域」は、ネイティブな免疫グロブリンまたはその任意の配列バリエーションのC_H1とC_H2の間に位置するアミノ酸配列である。以下で述べるヒト化4D5抗体の場合、ヒンジ領域は、残基224(...Cys Asp Lys...のasp)と233(...Cys Pro AlaのPro)の間に位置する。他の免疫グロブリンの類似領域が用いられるが、ヒンジ領域のサイズおよび配列は大幅に変わってもよいことが理解されるだろう。例えば、ヒトIgG1のヒンジ領域はわずか約10残基であるが、ヒトIgG₃のヒンジ領域は約60残基である。

10

【0032】

用語「Fv-SH」または「Fab'-SH」は、システイン遊離チオールを有するFvまたはFab'ポリペプチドと本明細書で定義される。好ましくは、遊離チオールはヒンジ領域にあり、通常、鎖内結合に関与している軽鎖および重鎖システイン残基はネイティブな形で存在している。本発明の最も好ましい態様において、Fab'-SHポリペプチド組成物は異なる成分のタンパク質分解フラグメントを含まず、実質的に(約90モルパーセントを超えて)Fab'フラグメントを含まず、ここで、重鎖および軽鎖は還元されているか、例えば、異常なジスルフィドまたはスルフヒドリル付加産物の形成によってネイティブな状態で存在しないように誘導体化されている。

20

【0033】

本明細書での目的のヒト化抗体は、予め決められた抗原に結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するFR領域および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列または予め選択された抗原に結合するように操作された配列を実質的に有するCDRを含む、免疫グロブリンアミノ酸配列バリエーションまたはそのフラグメントである。

【0034】

用語「調節配列」は、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。例えば、原核生物に適した調節配列として、プロモーター、選択的に、オペレーター配列、リボソーム結合部位、および転写ターミネーターが挙げられる。培養細胞が増殖および成熟している間に(例えば、対数増殖期)、Fab'ポリペプチド合成を増殖阻害量未満の濃度に抑制する、高度に調節される誘導性プロモーターが特に好ましい。

30

【0035】

核酸は、別の核酸配列と機能的に関連するように配置された時に「機能的に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAが、ポリペプチドの分泌に関与するブレタンパク質として発現されれば、ポリペプチドDNAに機能的に連結されている。プロモーターまたはエンハンサーがコード配列を転写すればコード配列に機能的に連結されている。または、リボソーム結合部位が、翻訳を促進するように配置されていればコード配列に機能的に連結されている。一般的に、「機能的に連結された」は、連結されているDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合、隣接し、同じ読み枠にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、便利な制限部位での連結により達成される。このような部位が存在しない場合、従来のやり方に合わせて合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが用いられる。

40

【0036】

「外因性」エレメントは、細胞にとって外来の核酸配列、または細胞にあるものと相同であるが、そのエレメントが通常見られない宿主細胞核酸内に位置する核酸配列を意味すると本明細書で定義される。

【0037】

本明細書で使用する表現「細胞」および「培養細胞」は同義で用いられ、このような全て

50

の名称が子孫を含む。従って、単語「形質転換体」および「形質転換細胞」は、初代被験細胞および継代数に関係なく、それに由来する培養物を含む。全ての子孫は、人為的な変異または偶然の変異のためにDNA含有物が厳密に同一でなくてもよいことも理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫が含まれる。様々な名称が前後関係から明らかになるであろう。

【0038】

「プラスミド」は、小文字pの前および/または後の大文字および/または数字により示される。本明細書における出発プラスミドは市販されているか、制約なく公的に入手可能であるか、または公表されている手順に従って、このような入手可能なプラスミドから構築することができる。さらに、他の等価なプラスミドが当技術分野において周知であり、当業者に明らかであろう。

10

【0039】

制限消化物からの、ある特定のDNA断片の「回収」または「単離」は、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルでの電気泳動による消化物の分離、関心対象の断片の移動度と既知分子量のマーカ-DNA断片の移動度の比較による関心対象の断片の同定、所望の断片を含むゲル部分の切除、およびゲルとDNAの分離を意味する。この手順は一般に知られている。例えば、Lawnら, 1981. *Nucleic Acids Res.*, 9:6103-6114およびGoeddelら, 1980. *Nucleic Acids Res.* 8:4057を参照のこと。

【0040】

細胞からのDNAの「調製」は、宿主培養細胞からのプラスミドDNAの単離を意味する。一般的に用いられるDNA調製法は、Sambrookら(分子クローニング(Molecular Cloning): 1989. *A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)のセクション1.25-1.33に記載されているラージスケールおよびスモールスケールのプラスミド調製である。DNA調製物は、当技術分野において周知の方法によって精製される(Sambrookら, 前記のセクション1.40を参照のこと)。

20

【0041】

「バクテリオファージ」は、天然宿主が細菌細胞である1つまたは多数のウイルスである。

【0042】

本明細書で使用するモノクローナル抗体は、抗体産生細胞と骨髄腫細胞の融合物であるハイブリドーマ細胞により産生される。モノクローナル抗体は特異的であり、ほぼ全ての関心対象の抗原を対象とすることができ、大量に生成することができる。

30

【0043】

本発明の一形態は、63nM~0.25nMの範囲の平衡解離定数(K_D)(表面プラズモン共鳴により測定される)を示す抗PA scFv抗体パネルを含む。操作されたscFv抗体は、インビボでのscFvの生体内分布に影響を及ぼすパラメータである、血清中でのインキュベーションならびに尿素変性および熱変性に対する非常に優れた安定性を示す。インビトロ細胞培養アッセイならびにラットモデルにおける炭疽菌毒素攻撃に対する防御が親和性と強く相関し、最も高い親和性の抗体(1H, $K_D = 0.25nM$)が最高に防御した。防御に及ぼすアビディティの影響を評価するために、scFvのホモ二量体二価バリエーションも調製した。高いアビディティの抗体は細胞培養アッセイにおいて毒素を中和するのに非常に有効であるが、ラットモデルでは有効でない(恐らく、抗体の安定性が低いためである)。最後に、腎臓によるクリアランスキネティクスの遅れの影響を評価するために、ヒト定常ドメインと融合したscFv(scAb)を使用した(scFvでは28kDaに対してscAbでは45kDa)。

40

【0044】

本発明により、百日咳毒素、ボツリヌス毒素、ウェルシュ菌毒素、コノトキシン、リシン、サキトキシン、志賀毒素、黄色ブドウ球菌毒素、テトロドトキシン、ペロ毒素、マイクロシスチン(シアンギノシン)、アブリン、コレラ毒素、破傷風毒素、トリコテセンマイコトキシン、または動物の毒液に由来する毒素などの他の細菌毒素も、前述の毒素に対する抗体を作成する段階的な遺伝子工学ステップを用いて中和される。

50

【0045】

様々な抗体構築物が治療目的に使用されている。これらの抗体構築物として、全IgG抗体、Fab、scFv、および様々な二量体構築物(例えば、scAb)が挙げられる。大きな構築物、特に全IgG抗体には血清滞留時間が長いという大きな利点がある。二量体構築物にはアビディティという利点があり、小さな構築物には組織浸透性が高いという利点がある。

【0046】

細菌毒素に加えて、高親和性の操作抗体は、昆虫、軟体動物、および爬虫類に遭遇した後の、これらの動物の毒液の中和に特に重要であり得る。高親和性scFvまたはscAbなどの小さな構築物は、全IgGと比較して血清病にかかる機会が少ないので速いクリアランス速度が利点である場合に特に有効であり得る。scFvなどの小さな構築物は、大きなタイプの抗体構築物より効果的に組織に浸透することができる。 10

【0047】

親和性を高めた抗体はまた、診断試薬としてより大きな感度をもたらす。診断試薬として、このように感度が増大すると、血流中の少量の炭疽菌毒素の同定による合成炭疽菌の早期診断が可能になるかもしれない。特に、ポイントオブケアの時間内での早期診断により、首尾よい早期治療介入の可能性が高くなる。

【0048】

当業者が炭疽菌PA毒素に対する他の抗体(例えば、PAの他の領域に結合する1G3)を使用することも注目に値する。PAなどの毒素の標的をいくつかの異なるエピトープにすることには、ある特定の治療上または診断上の利点(例えば、診断試験の場合、いわゆる「サンドイッチ」アッセイ形式が可能になること、または治療用途の場合、協力作用的な非競合試薬が得られること)がある場合がある。 20

【0049】

実施例

ハイブリドーマからのクローニング 重鎖および軽鎖の可変領域を、RT-PCRにより抗PAハイブリドーマ14B7からクローニングする(Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda Jら、1997.改良ファージディスプレイシステムを用いたハイブリドーマおよび脾臓細胞レパートリーからの機能的抗体可変ドメインの信頼性の高いクローニング(Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system.) J Immunol Methods 201:35-55)。V_H遺伝子およびV_L遺伝子をオーバーラップPCRにより連結し、5'側および3'側のSfiI部位を用いてpAK100ファージディスプレイベクターにクローニングする。大腸菌株中のシングルコロニーを96ウェルプレートにおいて増殖させ、ファージディスプレイscFvを産生させ、PA反応性クローンを同定するためにELISAによりスクリーニングする。 30

【0050】

抗体親和性成熟 14B7 scFv遺伝子のエラープロオンライブラリーを、マンガンおよび偏りのあるヌクレオチド比を用いて構築する(Daugherty P, Chen G, Iverson B, Georgiou G. 2000. 抗体の親和性成熟に及ぼす変異頻度の影響の定量分析(Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of antibodies.) Proc Natl Acad Sci USA、印刷中)。DNAシャッフリングを記載のように行う(Stemmer WPC. 1994. DNAシャッフリングによるインビトロでのタンパク質の急速な進化(Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.) Nature 370:389-91)。ライブラリー構築およびスクリーニング計画および親和性が改良されたクローンの系統を図2に示す。図2ではエラープロオンPCRおよびDNAシャッフリングが行われる。例えば、パンニングは、イムノチューブ(immunoscreen)(ヌンク(Nunc))または高結合性ELISAウェル(コスター(Costar))に漸減濃度のPA(0.05 μg/ml ~ 0.0003 μg/ml)を一晩コーティングし、5%乳-PBSでブロッキングし、10¹¹ ~ 10¹² pfuファージを1時間添加し、その後、低親和性ファージに結合するように可溶性PA(60nM)を2時間添加することによって行う。洗浄後(0.1% Tween-20を含むPBSで20回、その後PBSで20回)、ファージを0.1Mエタノールアミン1mlで10分間溶出させ、新しいチューブに移し、1M Tris-HCl(pH7.5)500 μlで中和する。溶出されたファージを力 50

価測定し、次回パンニング用に、指数増殖しているTG1細胞に感染させるのに使用する。親和性成熟バリエーションをスクリーニングする前に、各ライブラリーを5回パンニングする。

【0051】

抗体発現 scFvを、Sfil-Sfilを介してファージディスプレイベクターpAK100から、以下の3つのうちの1つの発現ベクターにサブクロニングし((a)scFv発現用pAK300;(b)C末端二量体化ペプチドと融合したscFvからなる二価抗体作成用のpAK500(Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda Jら、1997.改良ファージディスプレイシステムを用いたハイブリドマおよび脾臓細胞レパートリーからの機能的抗体可変ドメインの信頼性の高いクローニング、J Immunol Methods 201:35-55);または(c)scAb発現用pAK400誘導体であるpMOPAC16(C末端ヒト 定常ドメインが融合したscFv))、ペリプラズムシャペロンskpを同時発現させる。タンパク質は大腸菌BL21株のペリプラズム内に産生され、浸透圧衝撃および固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(アマシャムファルマシア(Amersham Pharmacia))により精製される(Hayhurst A, Harris WJ.1999.大腸菌skpシャペロンの同時発現により単鎖抗体フラグメントの可溶性およびファージディスプレイが改善する(Escherichia coli skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments.)Protein Expr Purif 15:336-43)。単量体および二量体scFvおよびscAbタンパク質を、溶離液としてPBSを用いてサイズ排除クロマトグラフィー(スーパーデックス75(Superdex75),アマシャムファルマシア)により様々なオリゴマー化状態の形態から分離した(図3)。例えば、図3では、ニッケル親和性樹脂からの溶離液をスーパーデックス75カラム(アマシャムファルマシア)にロードし、PBSで溶出する。scFvは主に単量体として溶出し、約20%が二量体および高分子量凝集物として溶出した。同じ条件下での再クロマトグラフィー後、単量体は単一ピークとして溶出される。二価Fv構築物は、溶出プロフィールに基づいて、およびネイティブPAGE分析により均一なように見える。精製収量は約200ng/OD₆₀₀であり、これは全てのscFvバリエーションについて1μg/mlに相当する。汚染エンドトキシン濃度をLALエンドトキシン試験により測定し、全ての調製物について<10ng/Lであることが分かった。タンパク質濃度を、微生物学の分野において明らかなマイクロBCAアッセイにより測定する。

10

20

【0052】

モノクローナル抗体およびFabフラグメントの調製 腹水をマウスIgG₁ 14B7ハイブリドマから調製する。IgGを硫酸沈殿させ、プロテインGクロマトグラフィーにより精製する。溶出後、IgG画分を、セントリコン-30(Centricon-30)カラムを用いて10mg/mlに濃縮し、脱塩する。Fabフラグメントを、パパイン(PBS-1mM EDTA-20mMシス테인に溶解した10μgパパイン/mg免疫グロブリン)を用いて37℃で一晩消化することにより調製する。消化試料をプロテインA結合緩衝液(1.5Mグリシン, 3M NaCl, pH8.9)で10倍に希釈し、組換えプロテインAカラム(シグマ(Sigma))に加える。Fabフラグメントを含むフロースルーを集め、セントリコン-10カラムで2mg/mlに濃縮し、溶離液としてPBSを用いてサイズ排除カラム(スーパーデックス200,アマシャムファルマシア)に加える。ELISAおよびSDS-PAGEによりFab画分に汚染FcおよびインタクトなIgGが無いことを確認する。

30

40

【0053】

抗体:抗原結合性および安定性の分析。表面プラズモン共鳴により抗原結合キネティクスの分析を行う[Chenら、2001]。簡単に述べると、抗原(PAまたはBSA対照)を約1000RUのレベルでCM5チップ(ファルマシア)に固定化する。再結合効果を減らすために、試料を、HBS緩衝液(10mM HEPES, 3.4mM EDTA, 150mM NaCl, 0.005% P20界面活性剤, pH7.4)中で速い流速(60μl/分)で走らせる。オンレートは、少なくとも5種類の濃度(25nM~300nM)の抗体を用いて測定した。

【0054】

37℃、70℃、および対照として4℃での抗体安定性を、4つの試料(PBSに溶解した16μg/mlタンパク質)を各温度でインキュベートし、残った活性抗体の量をELISAでモニターすることによって測定する。尿素変性曲線を、0~8.7Mの尿素濃度の存在下でタンパク質をPBSで

50

最終濃度16 μ g/mlまで希釈することによって得る。折り畳まれたタンパク質および折り畳まれていないタンパク質を室温で3時間平衡状態に保った後、蛍光発光スペクトルを、フォトンテクノロジーインターナショナルスペクトロフルオリメーター(Photon Technology International spectrofluorimeter)を用いて得る。蛍光最大は、変性剤0の330nmから変性剤8.7Mの350nmにシフトし、これは蛍光強度の42%増加と同時に生じる。データは少なくとも3回の測定値の平均を示し、これを分析する(Pace CN.1990.タンパク質安定性の測定および増加(Measuring and increasing protein stability.)Trends in Biotechnology 8:93-8;Pace C,Shirley B,Thomson J.1989.タンパク質のコンフォメーション安定性の測定(In Measuring the Conformational Stability of a Protein)T.Creighton編,311-30頁.New York:IRL)。尿素変性の可逆性を評価し、完全に可逆性の変化を示したタンパク質についてのみデータを報告する。

10

【0055】

毒素攻撃に対するマウスマクロファージの防御 毒素攻撃後、指定の時間で抗体を投与した後の(攻撃後中和;100ng/ml PA,50ng/ml LF)、RAW264.7マウスマクロファージ様細胞(ATCC番号TIB-71)の生存を、攻撃の0、5、10、または20分後に抗体を添加した以外は本質的にLittleら(Little SF,Leppla SH,Cora E.1988.炭疽菌毒素の防御性抗原成分に対するモノクローナル抗体の作成および特徴付け(Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of Bacillus anthracis toxin.)Infect Immun 56:1807-13)により述べられたように測定する。3時間後、生存率をMTTでモニターし、吸光度を A_{590} で検出した。指定の抗体量で毒素攻撃から生き残った細胞のパーセントを報告する。

20

【0056】

ラットモデルにおける毒素攻撃に対する防御 インビボ中和実験は、本質的にIvins B,Ristroph J,Nelson G.1989.炭疽菌致死毒素に対するフィッシャー344ラットの応答に及ぼす体重の影響(Influence of Body Weight on Response of Fischer 344 Rats to Anthrax Lethal Toxin.)Applied and Environmental Microbiology 55:2098-100に記載のように行う。80mg/kg体重のケタミンおよび10mg/kgキシラジンを腹腔内注射することによって、フィッシャー344ラット(各250~275g;平均、標準偏差を加えること)に麻酔をかける。盲検試験で抗体(または滅菌PBS)を200 μ l体積で投与し、5分後に、両方とも陰茎静脈注射により、200 μ l体積で10 \times MLD致死量の炭疽菌毒素(40 μ g PA,8 μ g LF)(Ezzell JW,Ivins BE,Leppla SH.1984.炭疽菌毒素の防御性抗原および致死因子成分の免疫電気泳動分析、毒性、およびインビトロ生成キネティクス(Immunoelectrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of Bacillus anthracis toxin.)Infect Immun 45:761-7)を投与する。5匹の動物を各試験条件に使用し、不快感および死亡対生存の時間についてモニターする。ラットを、不快感を最小限にするように麻酔した状態で5時間、または死亡するまで保つ。呼吸および心拍の停止により死亡をモニターする。生存しているラットを、過量のフェノバルビトールナトリウムの腹腔内注射によって安楽死させ、その後、適切に廃棄処分する。抗体調製物の防御能力は死亡までの時間の遅れとして測定し、 $p < 0.05$ 水準で有意とみなされた(スチューデント片側t検定により測定した)。

30

40

【0057】

異なる結合親和性を有する抗PA抗体の操作 14B7モノクローナル抗体の V_H および V_L 遺伝子(Little SF,Leppla SH,Cora E.1988.炭疽菌毒素の防御性抗原成分に対するモノクローナル抗体の作成および特徴付け、Infect Immun 56:1807-13)をRT-PCRにより単離する。重鎖配列と軽鎖配列の間に(Gly₄Ser)₄リンカーをコードする配列が挿入された750bpのscFv遺伝子断片を作成するために、オーバーラップエクステンションPCRを使用する。scFv遺伝子は、繊維状バクテリオファージでのディスプレイのためにpIIIと融合している。5 \times 10⁵個の独立した形質転換体からなるライブラリーを構築するために、エラーブローンPCRを使用する。このライブラリーをファージディスプレイでスクリーニングすることによって、クローンA2Eが単離された。対応するscFvタンパク質は、PAに対する3倍高い親和性およ

50

び著しく増大した安定性を示す。DNA配列決定から、A2EはCDR L2に1個のL56Ser:Pro置換を含むことが明らかになった(表1)。

【0058】

(表1) 抗体親和性および安定性の概要

	k_{on} ($\times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-4} sec^{-1}$)	K_d (nM)	血清中で 37°C	70°C での安定性
14B7 mAb	5	13.5 ± 1.2	2.3	100%	15%
Fab	3	33 ± 2	12	100%	100%
WT scFv	3.1 ± 0.4	32 ± 2	12	100%	3.5%
L97 scFv	3	190 ± 20	63	100%	10%
A2E scFv	3	10 ±	4.0	100%	28%
1H scFv	7.2 ± 0.8	1.7 ± 0.2	0.24	100%	5%
WT二量体	6.2 ± 0.7	3.9 ± 1.3		100%	0.4%
1H二量体	6			ND	0.2%
WT scAb	2.9 ± 0.3	30 ± 0.8		ND	14%
1H scAb	ND	ND		ND	10%

10

[§] 37 の試験は90% FBS中で7日間行った。

* 70 のPBS中で2時間インキュベーションした後に残ったPA結合量

【0059】

図4は、14B7 scFvおよび関連バリエーションのアミノ酸配列アラインメントを示す。図4では、14B7 WT配列を一文字アミノ酸コードで記した。Kabat番号付けを横に示した。CDRを括弧でくくった。アミノ酸変化を赤字で示した。CDR L2の1個のL56Ser:Pro置換は、DNAシャッフリングにより親14B7 scFvと戻し交雑(backcross)した後でも後の全ての高親和性scFvに存在する(Stemmer WPC, 1994. DNAシャッフリングによるインビトロでのタンパク質の急速な進化、Nature 370:389-91)。次いで、例えば、最初のライブラリーの5回目のファージパンニングから単離されたクローンのDNAシャッフリングは、DNAシャッフリングにより再結合される。結果として生じた遺伝子プールは増幅され、ランダム変異誘発にかけられ、5回のファージパンニングによりスクリーニングされる。方法全体(すなわち、シャッフリング、エラープロン変異誘発、およびパンニング)が繰り返され、比較に値する抗原親和性を示すクローン6Aおよび1Hが得られた。さらなる研究のために後者の抗体が選択された。DNA配列決定から、1HはL56Ser:Proに加えて、さらに2つの変異:CDR L2のL55Q:Leuおよび重鎖フレームワーク4に位置するH106ALys:Arg変異を含むことが明らかになった。

20

30

【0060】

親和性成熟変異体に加えて、変異L97Leu:Alaを含む抗体も構築した。L97Leu:Ala置換は高い平衡解離定数をもたらし、14B7:PA境界の33残基のアラニンスキャニング変異誘発試験の一環として特定された。二価ホモ二量体scFv抗体を、14B7野生型ならびにA2E scFvおよび1H scFvとC末端二量体化ポリペプチドで融合させることによって構築した。(Kreber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda Jら、1997. 改良ファージディスプレイシステムを用いたハイブリドーマおよび脾臓細胞レパートリーからの機能的抗体可変ドメインの信頼性の高いクローニング、J Immunol Methods 201:35-55)。最後に、さらに大きな分子量の一価scAb(45kDa)を、scFvとヒト定常ドメインとのC末端融合によって作成した(Hayhurst A, Harris WJ. 1999. 大腸菌skpシャペロンの同時発現により単鎖抗体フラグメントの可溶性およびファージディスプレイが改善する、Protein Expr Purif 15:336-43)。

40

【0061】

特徴分析 全てのscFvおよびscAbが比較に値するレベルで大腸菌において発現した。少なくとも0.25~0.5 μgタンパク質/A₆₀₀または1mg/L培養物の精製収量が得られ、これは十分に発現された他の治療用scFv抗体の収量に匹敵する。抗体は、金属アフィニティークロマトグラフィーの後、さらに高分子量の凝集物を除去するためにサイズ排除FPLCにより精製さ

50

れる。scFvは大部分が(>80%)単量体であり、大腸菌での発現中にインピボで二量体化する傾向をほとんど示さない(図5)。クロマトグラフィー後、単離された単量体scFvタンパク質は、高分子量化学種が>95%フリーである。新たに精製された抗体試料を、表面プラズモン共鳴による抗体結合キネティクスの決定および炭疽菌毒素の中和効力の評価に使用した。二量体scFvは、何週間も4 でインキュベーションした後でさえ、どの汚染低分子量形態も高分子量形態も現れることなく均一なままであった。

【0062】

14B7 FabおよびscFvは同じ抗原結合キネティクスを示し(表面プラズモン共鳴により測定した)、 $3.1 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ の k_{on} および $0.0035 \pm 2 \text{ sec}^{-1}$ のオフレートから12nMの平衡解離定数が得られた(表1)。比較のために、二価IgGは2.3nMの K_D を示した(二価結合を最小限にするためにチップ上で低カップリング密度のPAの条件下で測定した)。A2Eおよび1H変異体は、それぞれ、1/3および1/48の平衡解離定数を示した(表1)。対照的に、アラニン変異体L97は14B7より5倍以上高い K_D を示す。scFvの二量体化により、対応する単量体と比較してほぼ10倍高い見かけの親和性が得られた。二価構築物の親和性増大は明らかにアピディティ効果によるものであり、これは以前の知見と一致している(Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger P, Zangemeister-Wittke Uら、2001.自己会合ペプチドにより多量体化された一価、二価、および三価の抗p185HER2ミニ抗体の腫瘍標的化(Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185HER2 miniantibodies multimerized by self associating peptides.) *Journal of Biological Chemistry* 276:14385-92)。

10

【0063】

上皮腫瘍抗原糖タンパク質-2(glycocoprotein-2)を認識するscFv抗体の生体内分布および標的化効率は、タンパク質の熱安定性および変性剤安定性と相関する(例えば、Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger P, Zangemeister-Wittke Uら、2001.自己会合ペプチドにより多量体化された一価、二価、および三価の抗p185HER2ミニ抗体の腫瘍標的化、*Journal of Biological Chemistry* 276:14385-92)。従って、安定性に差があると、抗PA抗体の中和能力を評価する時に親和性効果がかき消される。ほとんどのscFvは37 の血清中で急速に活性を失うが(Benhar I, Pastan I. 1995.モノクローナル抗体B3の単鎖Fvを安定化する残基の同定(Identification of residues that stabilize the single-chain Fv of monoclonal antibodies B3.) *J Biol Chem* 270:23373-80; Helfrich W, Kroesen BJ, Roovers R C, Westers L, Molema Gら、1998.T細胞をヒト癌腫に再標的化するための二重特異性抗体の構築および特徴付け(Construction and characterization of a bispecific diabody for retargeting T cell to human carcinomas.) *Int J Cancer* 76:232-9)、試験された全ての組換え抗体は血清中での不活化に対して非常に安定であることが分かった。scFvおよびscAbは高温でも優れた安定性を示したが、二量体化scFvは高温で安定性を示さなかった(表1)。特に、A2E scFvは、70 で2時間インキュベーションした後でさえ結合活性の約25%を保持した。scAbは、恐らく、Ckドメインによる好ましい相互作用が寄与するために、それぞれのscFvより高い熱安定性を示す。注目すべきことに、14B7 Fabはこれらの条件下で結合活性の消失を示さない(表1)。

20

30

【0064】

尿素中での抗体の変性は、アンフォールディングの際に生じるタンパク質蛍光の変化をモニターすることによって評価した(Pace CN. 1990.タンパク質安定性の測定および増大、*Trends in Biotechnology* 8:93-8; Worn A, Pluckthun A. 2001.抗体単鎖Fvフラグメントの安定性操作(Stability Engineering of Antibody Single Chain Fv Fragments.) *Journal of Molecular Biology* 305:989-1010)。アンフォールディング曲線は完全に可逆性であることが示され、高い尿素濃度から希釈または透析した際のタンパク質蛍光は、同じ最終尿素濃度に直接希釈したタンパク質のタンパク質蛍光と同一であった。他のいくつかのscFv抗体と同様に、抗PA scFvは、単純な2段階モデルがアンフォールディング過程を説明するのに適さない場合があることを示す比較的広範囲のアンフォールディング転移を示し、これは以前の研究と一致している(Worn A, Pluckthun A. 2001.抗体単鎖Fvフラグメントの安定性操作、*Journal of Molecular Biology* 305:989-1010)。特に、A2Eおよび1Hバリエーション(

40

50

両方ともSerからProへの置換を含む)は、ほぼ間違いなくプロリン残基が変性状態の不均一性を高めるために、14B7 scFvと比較して広範囲の転移領域を示す。全てのscFvについて、アンフォールディングは5Mを上回る尿素濃度でしか検出されない。50%アンフォールディングの尿素濃度値($m_{1/2}$ 値)は、14B7、A2E、および1H scFvそれぞれについて6.8、7.7、および6.5Mである(図6)。比較のために、代表的なscFvは2.5~4.5M尿素の $m_{1/2}$ 値を示す。

【0065】

4 または70 で2時間インキュベーションした後のscFv単量体安定性のELISA測定値を図7に示す。最大シグナルの50%を生じる濃度を基準にして、WTは、高温でのインキュベーションにより以前の活性の3.5%まで低下するのに対して、バリエーションA2Eは活性の25%を保持する。結果は4回行った実験の平均であり(エラーバーは標準誤差を示す)、片側t検定により有意($p < 0.005$ 水準)である。バリエーションおよびその高温安定性の完全なリストについては表1を参照のこと。

10

【0066】

毒素中和 毒素攻撃後の様々な時間で投与された抗体によるマクロファージの防御を評価した。攻撃後の防御は親和性の増大と強く関連した(表2)。

【0067】

(表2) ラットモデルにおける毒素攻撃に対する防御

変数	処理	用量 (μ g)	用量 (nmol)	死亡までの時間 (分)*	生存数	有意性 (t検定)
	PA対照	40	0.5	-	-	-
	LF	8	0.1	-	-	-
	PBS	-	-	91 \pm 7	0/5	
親和性	L97 scFv	56	2.0			
	WT scFv	56	2.0	110 \pm 17	0/5	<0.05
	A2E scFv	56	2.0	237 \pm 63	2/5	<0.05
	1H scFv	56	2.0		3/5	
サイズ	Fab	100	2.0	116*	4/5	
	1H二量体 scFv	130	2.0	165 \pm 11	2/5	
	WT scAb	90	2.0			
	1H scAb	90	2.0			
	1H scAb	22.5	0.5			

20

30

* 死亡までの時間は、5時間の試験期間に死亡した動物のみを計算した。全ての動物を5時間後に屠殺した。

対照動物は、PBSで処理した動物が死亡した30分後に屠殺した。

【0068】

興味深いことに、14B7 scFvは14B7モノクローナルと比較して極めて有効であり、低いIC₅₀量をもたらす。例えば、毒素および3nMの抗体が同時(すなわち、t=0)に投与された時、高親和性抗体1HのIC₅₀は、scFvおよびモノクローナルIgGで得られた値と比較して、それぞれ、1/6および1/9であった。1Hは攻撃の20分後でさえ著しく防御したのに対して、親scFvおよびモノクローナルは防御しなかった。全般的にみて、これらの結果から、小さいサイズのscFvは、毒素結合についてマクロファージ受容体と競合するのに有効でない可能性があることが分かる。

40

【0069】

毒素中毒に対する防御はフィッシャー344ラットモデルにおいて試験した。ラットを10 \times M LD量のPAおよびLFで攻撃し(それぞれ、0.160mg/kgおよび0.064mg/kg)、生存を5時間モニターする。処理としてPBSのみを与えた対照ラットは91 \pm 7分後に死亡した。毒素攻撃の5分後に14B7 scFvを与えた動物は、死亡までの時間が短い有意に延長した(110 \pm 17分, $p < 0.05$)。A2E scFvを投与すると、症状の始まりおよび死亡までの時間が両方とも著しく

50

遅れる (平均TTD 237 ± 63分、2匹が生存)。

【0070】

本発明は例示的な態様を参照して説明されたが、この説明は限定的な意味で解釈されることを目的としていない。例示的な態様の様々な変更および組み合わせならびに本発明の他の態様は、説明を参照すれば当業者に明らかであろう。従って、添付の特許請求の範囲は、このような全ての変更または態様を含むことが意図される。

【0071】

本明細書で述べた全ての刊行物および参考文献は、本発明が属する当業者の技術レベルを示す。全ての刊行物および特許出願は、それぞれ個々の刊行物または参考文献が参照として組み入れられるように詳細かつ個々に示されるのと同じ程度に参照として本明細書に組み入れられる。

10

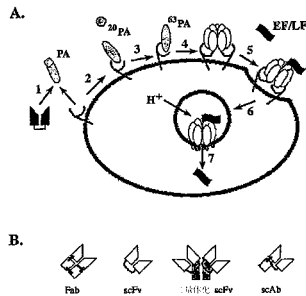
【図面の簡単な説明】

【0072】

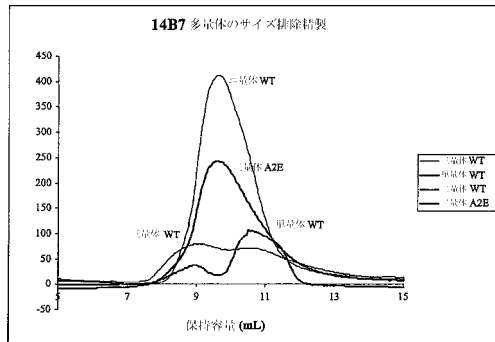
- (図1) 炭疽菌毒素機構の概略を示す図である。
- (図2) 親和性成熟ストラテジーである。
- (図3) 抗体構築物のFPLC分析である。
- (図4) 14B7 scFvおよび関連バリエーションのアミノ酸配列アラインメントである。
- (図5) インピボでの攻撃後結果を示すグラフである。
- (図6) 14B7および親和性が改善された変異体の尿素変性曲線を示すグラフである。
- (図7 A ~7 D) scFv単量体安定性のELISA測定値である。

20

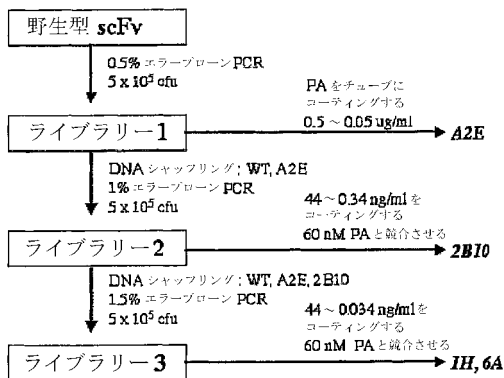
【図1】



【図3】



【図2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/040384 A1

- (51) International Patent Classification: C12P 21/08, C07K 16/00, G01N 33/53, C12M 3/00 (74) Agents: HANSON, Robert, E. et al.; Fulbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/35567 (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 5 November 2002 (05.11.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR); OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English (71) Applicant: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [—/US]; 201 W. 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (26) Publication Language: English (72) Inventors: GEORGIU, George; The University of Texas at Austin, Department of Chemical Engineering, CPE Building, Austin, TX 78712 (US); IVERSON, Brent, L.; The University of Texas at Austin, Department of Chemistry, Welch Hall 5.320, Austin, TX 78712 (US); MAYNARD, Jennifer, A.; The University of Texas at Austin, Department of Chemical Engineering, MBB 3.310, Austin, TX 78712 (US).
- (30) Priority Data: 60/332,849 5 November 2001 (05.11.2001) US
- Published:**
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/040384 A1

(54) Title: RECOMBINANT ANTIBODIES FOR THE DETECTION AND NEUTRALIZATION OF ANTHRAX TOXIN

(57) Abstract: A composition and method for treating a host having or at risk of infection by *Bacillus anthracis* using an affinity matured antibody or portion thereof derived from a monoclonal antibody.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

RECOMBINANT ANTIBODIES FOR THE DETECTION
AND NEUTRALIZATION OF ANTHRAX TOXIN

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to the field of antibody engineering and in particular to a neutralizing antibody construct with therapeutic utility in early and advanced stages of therapy.

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application is a conversion from and claims priority of U.S. Provisional Application Number 60/332,849, filed on November 5, 2001.

The United States Government may own certain rights in this invention under US Army, UT Austin Acct. No.: 26-0454-85 and DOD Grant No.: DAA21-93C-0101.

Without limiting the scope of the invention, its background is described in connection with the treatment of *Bacillus anthracis* infection, one of the first biological warfare agents to be developed and is now perceived as a major threat in the United States, as an example.

Heretofore, in this field, research on the spore forming bacterium *Bacillus anthracis* has been limited due to its rare occurrence in humans. Infections due to *Bacillus anthracis*, commonly referred to as anthrax, most commonly occur in hooved mammals. In humans, the preventive treatment strategy is generally limited to the use of a few antibiotics, including penicillin, doxycycline and fluroquinolones. (Morbidity and Mortality Weekly Report. 2001. Update: Investigation of bioterrorism-related anthrax and interim guidelines for clinical

WO 03/040384

PCT/US02/35567

evaluation of persons with possible anthrax. 50:941-8) While an anthrax vaccine can also prevent infection, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) does not recommend widespread immunization for the general public. (CDC Health Alerts, Advisories, and Updates. 2001. CDC Interim Recommendations for protecting workers from exposure to *Bacillus anthracis* in work site where mail is handled or processed. Oct 31, 2000 www.cdc.gov/DocumentsApp/Anthrax/10312001/han51.asp). In fact, vaccination for the general public is not available.

Serious forms of human anthrax include inhalation anthrax, cutaneous anthrax, and intestinal anthrax. Inhalation anthrax is usually fatal. The intestinal disease form of anthrax may follow the consumption of contaminated food and is characterized by an acute inflammation of the intestinal tract. Direct person-to-person spread of anthrax is extremely unlikely, if it occurs at all. Therefore, the CDC explains that there is no need to immunize or treat contacts of persons ill with anthrax, such as household contacts, friends, or co-workers, unless they also were also exposed to the same source of the infection.

For persons infected with anthrax, treatment success is limited by several factors, such as the increased incidence of antibiotic resistance and treatment delays that lessen the chance of survival. It is known that early treatment of anthrax with antibiotics is essential to reduce mortality—delays in treatment profoundly decrease survival rates. Early treatment, however, is difficult because initial symptoms of the infection, e.g., when the bacterial spores are inhaled, heretofore known as inhalation anthrax, may resemble those of the common cold. In addition, symptoms of anthrax infection, depending on how the bacterium is contracted, may take seven to sixty days to appear.

The pathogenicity of *B. anthracis* is expressed in two ways: a toxic effect made evident by the appearance of an edema, and a

WO 03/040384

PCT/US02/35567

so-called lethal toxic effect that may lead to the death of the subject infected. These effects are attributed to the presence of toxins produced by a combination of three protein factors present in *B. anthracis*. In both humans and mammals, toxins will increase in the body even during early stages of infection when the host appears asymptomatic. This explains why delays in treatment can be fatal. Thus, there is not only a critical need for better anthrax intervention therapies, but a critical need for point-of-care, rapid, and extremely sensitive diagnostic tests to establish the presence of anthrax early in the infection.

Passive immunization in an effort to neutralize toxins with antibodies, usually polyclonal antibodies, has been used as a therapeutic intervention for a variety of bacterial infections (Keller M A, Stiehm E R, Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Reviews* 13: 602-614). A major limitation of using polyclonal antisera in patients is the possibility of "serum sickness" due to a patient's immune response to proteins derived from a different species. In addition, higher affinity antibodies are more effective for toxin neutralization, but there is no general way to enhance intentionally the affinity of polyclonal sera or even monoclonal antibodies derived from hybridomas.

A general therapeutic method for the neutralization of toxins using high affinity, engineered antibodies or antibody constructs could have application to a wide variety of bacterial infections including native bacterial strains that produce anthrax, diphtheria, pertussis, tetanus, and *E. coli* strains producing Shiga toxin. Pathogenic bacteria of the Australia group such as *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suds*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas mallet*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*,

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Yersinia pestis could also be considered for antibody intervention. In addition, genetically engineered pathogens intended for use as biowarfare agents containing introduced toxins such as *Botulinum* toxins, *Clostridium perfringens* toxins, Conotoxin, Ricin, Saxitoxin, Shiga toxin, *Staphylococcus aureus* toxins, Tetrodotoxin, Verotoxin, Microcystin (Cyanginosin), Abrin, Cholera toxin, Tetanus toxin, Trichothecene mycotoxins, or toxins derived from animal venoms could be neutralized in a similar fashion, leading to dramatically increased survival rates, even for infections in which no vaccine is available.

SUMMARY OF THE INVENTION

It has been found, however, that present compositions and methods for the prophylactic treatment of patients exposed to *Bacillus anthracis* fail to target the protective antigen or toxin of the bacterium in a manner that allows antibiotic treatment to have a full effect on infectious disease. A significant problem of current treatment regimes is that the antibodies fail to have the required affinity and avidity for widespread use.

What is needed is a purified affinity-matured recombinant antibody or portion thereof having binding specificity for the *Bacillus anthracis* protective antigen. In one embodiment the antibody is cloned from anti-protective antigen hybridoma, e.g., the mouse hybridoma 14B7. The antibody portion may be any portion or fragment of an antibody, e.g., an scFv fragment. The antibody may be of any antibody class. The antibody may be, e.g., derived from an scFv fragment further includes antibody constant regions to create monovalent antibody portion of, e.g., at least 40 kDa.

The antibody may be affinity matured by selecting for clones having higher affinity than the wild-type antibody sequence cloned from a hybridoma after imperfect PCR

WO 03/040384

PCT/US02/35567

amplification, e.g., error-prone expression libraries. In one embodiment, the clones that exhibit at least three-fold higher affinity and an increased stability to the protective antigen than wild-type are selected.

5 The affinity matured antibodies or portions thereof may be fused to, e.g., a 14B7 wild type to create divalent homodimeric antibodies. The antibody or portions thereof will generally confer protection to a host against *Bacillus anthracis* toxin. The host may be, e.g., a human and exhibit, in one example,
10 about a one-to-one stoichiometry. The purified antibody for the *Bacillus anthracis* protective antigen will exhibit generally an equilibrium dissociation constant of at least about 63 nM.

The present invention is also directed to a process for producing affinity matured antibodies to bacterial toxins that
15 produce an immune response protective against the symptoms of bacterial infection. The process includes culturing a microorganism that expresses a bacterial toxin or fragments thereof in a bacteriophage that is expressed in the microorganism. Next, a bacteriophage library is expressed an
20 affinity matured antibodies or portions thereof. The bacteriophage library and the microorganism are contacted and the bacteriophage with at least three-fold higher affinity to the bacterial toxin are selected. Using the present invention affinity matured antibodies were generated that are specific for
25 a *Bacillus anthracis* protective antigen.

The present invention further includes a method of treating a host having or at risk of infection by *Bacillus anthracis*, the method comprising the step of administering to a host a composition comprising an affinity matured antibody or portion
30 thereof derived from a monoclonal antibody. The affinity matured antibody may be administered after onset of symptoms or may be administered prophylactically. In one embodiment the

WO 03/040384

PCT/US02/35567

affinity matured antibody or portion thereof may be an scFv fragment, e.g., having a dissociation constant of at least about 63 nM.

5 The present invention also includes a pharmaceutical composition for the treatment of a pathogenic infection including an affinity matured antibody or portion thereof against a toxin in a pharmaceutically acceptable carrier. The toxin may be a bacterial toxin, e.g., a *Bacillus anthracis* toxin. For example, a treatment for *Bacillus anthracis* 10 infection may includes administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a purified affinity matured antibody or portion thereof having binding specificity for the *Bacillus anthracis* protective antigen in a pharmaceutically acceptable carrier.

15 The present invention also includes a diagnostic device that incorporates immobilizes an affinity -matured antibody having an a affinity for a proteinaceous toxin. The converse arrangement is also included, namely, where the proteinaceous toxin is immobilized and used to diagnose the presence of an 20 affinity matured antibody.

The present invention also includes a diagnostic method for detecting exposure to a proteinaceous toxin made up of the steps of contacting a diagnostic device that includes incorporates immobilizes an affinity -matured antibody having an a affinity 25 for a proteinaceous toxin, with a fluid such as blood or urine, and analyzing the diagnostic device.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For a more complete understanding of the features and advantages of the present invention, reference is now made to 30 the detailed description of the invention along with the

WO 03/040384

PCT/US02/35567

accompanying figures in which corresponding numerals in the different figures refer to corresponding parts and in which:

Figure 1 is a diagram that outlines the *B. anthracis* toxin mechanism;

5 Figure 2 is an affinity maturation strategy;

Figure 3 is an FPLC analysis of antibody constructs;

Figure 4 is an amino acid sequence alignment of 14B7 scFv and related variants;

Figure 5 is a graph showing in vivo post-challenge results;

10 Figure 6 is a graph that shows urea denaturation curves for 14B7 and affinity improved mutants; and

Figure 7A - 7D are ELISA measurements of scFv monomer stability.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

15 While the making and using of various embodiments of the present invention are discussed in detail below, it should be appreciated that the present invention provides many applicable inventive concepts that may be embodied in a wide variety of specific contexts. The specific embodiments discussed herein
20 are merely illustrative of specific ways to make and use the invention and do not delimit the scope of the invention.

Anthrax is a zoonotic soil organism endemic to many parts of the world. Infection through the inhalation of the heat resistant spores of the Gram positive bacterium, *B. anthracis*,
25 results in up to 80% mortality rate if left untreated (Shafazand. CHEST 116:1369-76). In fact, *B. anthracis* was one

WO 03/040384

PCT/US02/35567

of the first biological warfare agents to be developed and continues to be perceived as a major threat. While vaccine strains have been developed, widespread use is neither available nor recommended by the CDC.

5 Following inhalation, the *B. anthracis* spores germinate in the alveolar macrophages and migrate to lymph nodes where they multiply and enter the bloodstream, quickly reaching 10^7 - 10^8 organisms per milliliter of blood (Dixon T, Meselson M, Guillemin J, Hanna P. 1999. Anthrax. *New England Journal of*
10 *Medicine* 341: 815-26). The vegetative bacteria excrete a tripartite exotoxin that is responsible for the etiology of the disease. The toxin is an 83 kDa polypeptide, protective antigen (PA), that binds to a recently identified receptor on the surface of macrophages (Bradley AB, Mogridge J, Mourez M,
15 Collier RJ, Young JAT. 2001. Identification of the Cellular Receptor for Anthrax Toxin. *Nature* 414:) and, following cleavage by a furin-like protease and oligomerization into a heptameric ring, facilitates translocation of the two catalytic components, the lethal factor (LF) or the edema factor (EF)
20 (Figure 1). LF is a zinc metalloprotease that cleaves MEK 1, 2, 3 leading to the release of cytokines TNF α and IL-1 β and inducing shock in the host; EF is a calmodulin-dependent adenylate cyclase that causes local edema and impairs neutrophil function (Leppa. *Handb Exp Pharmacol.* 2000. 145:445-72).

25 Anthrax toxin mechanism and 14B7 neutralization steps are shown in Figure 1A. In step 2, PA associates with an unidentified cellular receptor. PA is cleaved by a furin-like cell surface protease to release the 20 kDa N-terminal fragment, ²⁰PA, in step 2; ⁶³Pa remains bound. In step 4, receptor-bound PA
30 heptamerizes, followed by EF and LF competitively binding heptamerized PA stoichiometrically in step 5. In step 6, the complex is internalized by receptor-mediated endocytosis followed by acidification of the vacuole, after which PA changes

WO 03/040384

PCT/US02/35567

conformation creating a pore in the endo-lysosome membrane through which EF/LF diffuse as shown in step 7. The antibody 14B7 interfering with this process by competing, with the cellular receptor for the PA binding site in step 1. Figure 1B illustrates the antibody constructs: Fab, generated from proteolytic digestion of intact antibody; monovalent scFv; scFv dimerized by C-terminal dimerization helices, and scAb generated by C-terminal fusions to an scFv of a human constant kappa domain.

10 Blocking the action of the toxin has been actively pursued as a therapeutic strategy for preventing mortality following challenge with toxin or with spores. Blocking the toxin is best accomplished by disrupting the function of PA in one of three ways: preventing the binding of the catalytic subunits with
15 antibodies or peptides (Mourez M, Kane RS, Mogridge J, Metallo S, Deschatelets P, et al. 2001. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nature Biotechnology* 19: 958-61; Little SF, Novak JM, Lowe JR, Leppla SH, Singh Y, et al. 1996. Characterization of lethal factor binding and cell receptor
20 binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology* 142: 707-15), interfering with PA oligomerization using negative dominant mutants (Sellman B, Mourez M, Collier R. 2001. Dominant-Negative Mutants of a Toxin Subunit: An Approach to Therapy of Anthrax. *Science* 292: 695-7; Singh Y, Khanna H, Chopra A, Mehra V. 2001. A dominant negative mutant of *Bacillus anthracis* protective antigen inhibits anthrax toxin in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22090-4) or by blocking the binding of the toxin
25 to its receptor with antibodies. The latter strategy has been investigated more extensively and is the only one to have been
30 tested in experimental animals challenged with aerosolized anthrax spores (Little S, Ivins B, Fellows P, Friedlander A. 1997. Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. *Infection and*

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Immunity 65: 5171-5). The elicitation of polyclonal antibodies to PA correlate with protection (Pitt M, Little S, Ivins B, Fellows P, Barth J, et al. 2001. In vitro correlate of immunity in a rabbit model of inhalational anthrax. *Vaccine* 19: 4768-73) and in fact constitute a primary immunogenic component of the FDA-approved vaccine. The ability of monoclonal antibodies to protect against challenge, particularly to highly virulent strains of anthrax, is still in question (Little S, Ivins B, Fellows P, Friedlander A. 1997. Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. *Infection and Immunity* 65: 5171-5).

The key to effective toxin neutralization is high affinity, based on a slow kinetic off-rate. If the antibody off-rate is slower than the clearance time of the antibody-toxin complex in human sera, then the antibodies could effectively remove toxin stoichiometrically. Even if clearance rates are slower than antibody off-rates, it stands to reason that higher affinity antibodies will be better able to neutralize smaller amounts of a toxin. Thus, high affinity antibodies could be used at much lower doses, reducing the chance for side effects such as unwanted immune reactions to the antibody therapeutic reagent. Antibodies with dissociation constants (K_D) of about 70 nM or lower are required to neutralize potent toxins. Unfortunately, there is no way to enhance the affinities of antibodies from polyclonal immune sera or monoclonal antibodies derived from hybridomas. One must simply "take what one gets" following animal immunization. Antibody engineering, on the other hand, not only allows antibody affinity and specificity improvement through rational and evolutionary methods, the affinity and specificity enhanced antibodies can be produced in a variety of formats such as humanized whole IgG, Fab, scAb, and scFv using genetic engineering techniques. These different formats all have unique therapeutic advantages.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

For all of the reasons outlined above, there is a need to alleviate the symptoms of anthrax and extend the window of time for antibiotic therapy following infection. The compositions and methods of this invention provide healthcare professionals and researchers with a unique therapy that confers increased protection of the infected person or mammal, heretofore known as a host, and for the first time treat patients at advanced stages of infection.

In general, the following words or phrases have the indicated definitions when used in the description, examples, and claims:

The term Fv is defined to be a covalently- or noncovalently-associated heavy and light chain heterodimer that does not contain constant domains. The term scFv refers to the single chain heterodimer.

The term Fab' is defined herein as a polypeptide comprising a heterodimer of the variable domain and the first constant domain of an antibody heavy chain, plus the variable domain and constant domain of an antibody light chain, plus at least one additional amino acid residue at the carboxy terminus of the heavy chain C_H 1 domain including one or more cysteine residues. F(ab')₂ antibody fragments are pairs of Fab' antibody fragments which are linked by a covalent bond(s). The Fab' heavy chain may include a hinge region. This may be any desired hinge amino acid sequence. Alternatively the hinge may be entirely omitted in favor of a single cysteine residue or, preferably a short (about 1-10 residues) cysteine-containing polypeptide. In certain applications, a common naturally occurring antibody hinge sequence (cysteine followed by two prolines and then another cysteine) is used; this sequence is found in the hinge of human IgG₁ molecules (Kabat EA, et al. 1987. Sequences of Proteins of Immunological Interest 3rd edition. National Institutes of

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Health, Bethesda, MD). In other embodiments, the hinge region is selected from another desired antibody class or isotype. In certain preferred embodiments of this invention, the C-terminus of the C_H 1 of Fab' is fused to the sequence Cys X X. X preferably is Ala, although it may be any other residue such as Arg, Asp, or Pro. One or both X amino acid residues may be deleted.

The "hinge region" is the amino acid sequence located between C_H 1 and C_H 2 in native immunoglobulins or any sequence variant thereof. In the case of the humanized 4D5 antibody described infra, the hinge region is located between residues 224 (asp in . . . Cys Asp Lys . . .) and 233 (Pro in . . . Cys Pro Ala). Analogous regions of other immunoglobulins will be employed, although it will be understood that the size and sequence of the hinge region may vary widely. For example, the hinge region of a human IgG1 is only about 10 residues, whereas that of human IgG₃ is about 60 residues.

The term Fv-SH or Fab'-SH is defined herein as a Fv or Fab' polypeptide having a cysteinyl free thiol. Preferably the free thiol is in the hinge region, with the light and heavy chain cysteine residues that ordinarily participate in inter-chain bonding being present in their native form. In the most preferred embodiments of this invention, the Fab'-SH polypeptide composition is free of heterogenous proteolytic degradation fragments and is substantially (greater than about 90 mole percent) free of Fab' fragments wherein heavy and light chains have been reduced or otherwise derivatized so as not to be present in their native state, e.g. by the formation of aberrant disulfides or sulfhydryl addition products.

A humanized antibody for the purposes herein is an immunoglobulin amino acid sequence variant or fragment thereof which is capable of binding to a predetermined antigen and which

WO 03/040384

PCT/US02/35567

comprises a FR region having substantially the amino acid sequence of a human immunoglobulin and a CDR having substantially the amino acid sequence of a non-human immunoglobulin or a sequence engineered to bind to a preselected antigen.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, a ribosome binding site, and transcriptional terminators. Particularly preferred are highly regulated inducible promoters that suppress Fab' polypeptide synthesis at levels below growth-inhibitory amounts while the cell culture is growing and maturing, for example, during the log phase.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it effects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous and, in the case of a secretory leader, contiguous and in same reading frame. However enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, then synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accord with conventional practice.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

An "exogenous" element is defined herein to mean a nucleic acid sequence that is foreign to the cell, or homologous to the cell but in a position within the host cell nucleic acid in which the element is ordinarily not found.

5 As used herein, the expressions "cell" and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also
10 understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Different designations are will be clear from the contextually
15 clear.

"Plasmids" are designated by a lower case p preceded and/or followed by capital letters and/or numbers. The starting plasmids herein are commercially available, are publicly available on an unrestricted basis, or can be constructed from
20 such available plasmids in accord with published procedures. In addition, other equivalent plasmids are known in the art and will be apparent to the ordinary artisan.

"Recovery" or "isolation" of a given fragment of DNA from a restriction digest means separation of the digest on
25 polyacrylamide or agarose gel by electrophoresis, identification of the fragment of interest by comparison of its mobility versus that of marker DNA fragments of known molecular weight, removal of the gel section containing the desired fragment, and separation of the gel from DNA. This procedure is known
30 generally. For example, see Lawn et al., 1981. Nucleic Acids Res., 9:6103-6114, and Goeddel et al., 1980. Nucleic Acids Res. 8:4057.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

"Preparation" of DNA from cells means isolating the plasmid DNA from a culture of the host cells. Commonly used methods for DNA preparation are the large and small scale plasmid preparations described in sections 1.25-1.33 of Sambrook et al. (Molecular Cloning: 1989. A Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). DNA preparations are purified by methods well known in the art (see section 1.40 of Sambrook et al., supra).

"Bacteriophage" is one or a number of virus for which the natural host is a bacterial cell.

As used herein, monoclonal antibodies are produced by hybridoma cells, which are fusions of antibody-producing cells and myeloma cells. Monoclonal antibodies are specific, can be directed against almost any antigen of interest, and can be produced in large amounts.

One form of the present invention includes a panel of anti-PA scFv antibodies exhibiting a range of equilibrium dissociation constants (K_D) between 63 nM and 0.25 nM as measured by surface plasmon resonance. The engineered scFv antibodies exhibit exceptional stability to incubation in serum and to urea and heat denaturation, parameters that affect the biodistribution of scFvs in vivo. Protection to anthrax toxin challenge in an in vitro cell culture assay as well as in a rat model correlated strongly with affinity with the highest affinity antibody (1H, $K_D=0.25$ nM) conferring maximal protection. Homodimeric, divalent variants of the scFvs are also prepared to evaluate the effect of avidity on protection. The higher avidity antibodies are highly effective in neutralizing the toxin in the cell culture assay but not in the rat model, perhaps due to their lower stability. Finally, scFvs fused to a human constant kappa domain (scAbs) is used to evaluate the

WO 03/040384

PCT/US02/35567

effect of delayed clearance kinetics by the kidney (28 kDa for scFvs versus 45 kDa for scAbs).

With the present invention, other bacterial toxins such as pertussis toxin, Botulinum toxins, Clostridium perfringens toxins, Conotoxin, Ricin, Saxitoxin, Shiga toxin, Staphylococcus aureus toxins, Tetrodotoxin, Verotoxin, Microcystin (Cyanginosin), Abrin, Cholera toxin, Tetanus toxin, Trichothecene mycotoxins, or toxins derived from animal venoms are also neutralized using stepwise genetic engineering steps to create antibodies against the above-mentioned toxins.

A variety of antibody constructs have been used for therapeutic purposes. These include whole IgG antibodies, Fabs, scFvs and various dimer constructs such as scAbs. The larger constructs, especially the whole IgG antibodies have the considerable advantage of long serum residence time. The dimeric constructs have the advantage of avidity and the smaller constructs have the advantage of enhanced tissue penetration.

In addition to bacterial toxins, high affinity engineered antibodies could be especially important for neutralization of insect, mollusk, and reptile venoms following encounters with these animals. Smaller constructs such as high affinity scFv or scabs could be particularly effective here as the higher clearance rates would be an advantage since chances of obtaining serum sickness would be remote compared with whole IgG, and smaller constructs such as scFv can penetrate tissues more effectively than larger types of antibody constructs.

Antibodies with enhanced affinity also provide greater sensitivity as diagnostic reagents. This increase in sensitivity as a diagnostic reagent could make earlier diagnosis possible of systemic anthrax via identification of smaller amounts of anthrax toxin in the bloodstream. Earlier diagnosis,

WO 03/040384

PCT/US02/35567

especially within hours at point of care, would make more likely a successful early therapeutic intervention.

It is also noteworthy that one of skill in the art will be able to use other antibodies to the anthrax PA toxin, such as 1G3, that bind to other areas of PA. Targeting toxins such as PA at several different epitopes may have certain therapeutic or diagnostic advantages, such as enabling a so-called "sandwich" assay format for a diagnostic test or providing synergistic, non-competitive reagents for therapeutic use.

10 Examples

Cloning from Hybridomas. The heavy and light variable chain regions are cloned from anti-PA hybridoma 14B7 via RT-PCR (Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, et al. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 201: 35-55). V_H and V_L genes are joined by overlap PCR and cloned into pAK100 phage display vector using 5 prime and 3 prime SfiI sites. Single colonies in *E. coli* strain are grown in a 96-well plate, and phage displaying scFv are produced and screened by ELISA to identify PA-reactive clones.

Antibody Affinity Maturation. Error-prone libraries of the 14B7 scFv gene are constructed using manganese and biased nucleotide ratios (Daugherty P, Chen G, Iverson B, Georgiou G. 2000. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA In press*). DNA shuffling is performed as described (Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-91). The library construction and screening strategies and the lineage of affinity improved clones are described in Figure 2, in which error prone PCR and DNA

WO 03/040384

PCT/US02/35567

shuffling are performed. For example, panning is performed by coating immunotubes (Nunc) or high binding ELISA wells (Costar) with decreasing concentrations of PA (0.05 µg/ml to 0.0003 µg/ml) overnight, blocking with 5% milk-PBS, adding 10^{11} - 10^{12} pfu phage
5 for one hour, followed by addition of soluble PA to bind low affinity phage (60 nM) for two hours. After washing (20 times with PBS containing 0.1% Tween-20 followed by 20 washes with PBS), phage are eluted with 1 ml 0.1 M ethanolamine for 10 minutes, transferred to new tubes and neutralized with 500 µl 1M
10 Tris-HCl, pH 7.5. Eluted phage is titered and used to infect exponentially growing TGI cells for the next round of panning. Each library is panned for five rounds before screening for affinity matured variants.

Antibody Expression. scFvs is subcloned from the phage display vector pAK100 via SfiI-SfiI into the expression vectors in one of three ways: (a) pAK300 for scFv expression; (b) pAK500 to generate di-valent antibodies consisting of scFvs fused to a C-terminal dimerizing peptide (Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, et al. 1997. Reliable
20 cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 201: 35-55); or (c) pMOPAC16, a pAK400 derivative for scAb expression (scFv with a C-terminal human constant kappa domain fusion) and co-expressing the
25 periplasmic chaperone, skp. Proteins are produced in the periplasm of *E. coli* strain BL21, and purified by osmotic shock and immobilized metal affinity chromatography (Amersham Pharmacia) (Hayhurst A, Harris WJ. 1999. *Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of
30 single-chain antibody fragments. *Protein Expr Purif* 15: 336-43). Mono- and dimeric scFv and scAb proteins were resolved from forms with different oligomerization states by size exclusion chromatography (Superdex 75, Amersham Pharmacia) with PBS as

WO 03/040384

PCT/US02/35567

eluant (Figure 3). For example, in Figure 3, the eluant from the nickel affinity resin is loaded onto a Superdex-75 column (Amersham Pharmacia) and eluted with PBS. The scFv eluted primarily as a monomer with about 20% as dimers and higher M.W. aggregates. Following re-chromatography under identical conditions the monomer is eluted as a single peak. The divalent Fv construct appears as homogenous both on the basis of the elution profile and by native PAGE analysis. Purified yields are approximately 200 ng/OD₆₀₀ which is equivalent to 1 ug/ml for all scFv variants. Levels of contaminating endotoxin is measured by the LAL endotoxin test and are found to be <10 ng/L for all preparations. Protein concentrations are measured by micro-BCA assay as apparent to those in the art of microbiology.

Preparation of Monoclonal Antibody and Fab Fragments.

Ascites fluid is prepared from the mouse IgG₁ 14B7 hybridoma. IgG is precipitated with ammonium sulfate and purified by Protein G chromatography. Upon elution, the IgG fraction is concentrated to 10 mg/ml and desalted using a Centricon-30 column. Fab fragments are prepared by overnight digestion at 37 °C with papain (10 µg papain/ mg immunoglobulin in PBS- 1mM EDTA- 20 mM cysteine). The digested sample is diluted 10-fold in protein A binding buffer (1.5 M Glycine, 3 M NaCl, pH 8.9) and applied to a recombinant protein A column (Sigma). The flowthrough containing the Fab fragments is collected, concentrated to 2 mg/ml with a Centricon-10 column and applied to a size exclusion column (Superdex 200, Amersham-Pharmacia) with PBS as eluant. The absence of contaminating Fc and intact IgG in the Fab fraction is confirmed by ELISA and SDS-PAGE.

Antibody:Antigen Binding and Stability Analysis. The analysis of antigen binding kinetics by surface plasmon resonance is performed [Chen et al. 2001]. Briefly, antigen (PA or BSA control) is immobilized on a CM5 chip (Pharmacia) at a level of approximately 1000 RUs. To diminish rebinding effects,

WO 03/040384

PCT/US02/35567

samples are run at high flow rate (60 µl/min) in HBS buffer (10 mM HEPES, 3.4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.005% P20 surfactant, pH 7.4). On-rates were determined using at least five concentrations of antibody, ranging between 25 and 300 nM.

5 Antibody stability at 37 °C, 70 °C and at 4 °C, as a control, is determined by incubating quadruplicate samples (16 µg/ml protein in PBS) at the respective temperatures and monitoring the amount of active antibody remaining by ELISA. Urea denaturation curves are obtained by diluting proteins to a
10 final concentration of 16 µg/ml in PBS in the presence of urea concentrations varying from 0 to 8.7 M. After allowing the folded and unfolded proteins to equilibrate for 3 hours at room temperature, fluorescence emission spectra are obtained using a Photon Technology International spectrofluorimeter. The
15 fluorescence maximum shifts from 330 nm in zero denaturant to 350 nm in 8.7 M denaturant, concomitant with a 42% increase in fluorescence intensity. Data represents the average of at least three measurements, and are analyzed (Pace CN. 1990. Measuring and increasing protein stability. *Trends in Biotechnology* 8: 93-
20 8; Pace C, Shirley B, Thomson J. 1989. In *Measuring the Conformational Stability of a Protein*, ed. T. Creighton, pp. 311-30. New York: IRL). The reversibility of urea denaturation is evaluated and data are reported only for proteins that exhibited a fully reversible transition.

25 *Protection of Mouse Macrophages to Toxin Challenge.*
Survival of RAW 264.7 mouse macrophage-like cells (ATCC #TIB-71) following administration of antibodies at specified times after challenge with toxin (post-challenge neutralization; 100 ng/ml PA, 50 ng/ml LF) is determined essentially as described by
30 Little et al. (Little SF, Leppla SH, Cora E. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of Bacillus anthracis toxin. *Infect Immun* 56:

WO 03/040384

PCT/US02/35567

1807-13) except that antibodies were added 0, 5, 10 or 20 minutes after challenge. After 3 hours, viability was monitored with MTT, and absorbance detected at A₅₉₀. The percent of cells surviving toxin challenge at a specified antibody dose is reported.

Protection Against Toxin Challenge in the Rat Model. In vivo neutralization experiments are performed essentially as described (Ivins B, Ristroph J, Nelson G. 1989. Influence of Body Weight on Response of Fischer 344 Rats to Anthrax Lethal Toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2098-100). Fischer 344 rats (250-275 g each; mean, standard deviation to be added) are anesthetized by intra-peritoneal injection of 80 mg/kg weight ketamine and 10 mg/kg xylazine. Antibodies (or sterile PBS) are administered in a 200 µl volume in a blind study, followed after 5 minutes by a 10x MLD lethal dose of anthrax toxin (40 µg PA, 8 µg LF) (Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. 1984. Immunoelectrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of Bacillus anthracis toxin. *Infect Immun* 45: 761-7) in a 200 µl volume, both via penile vein injection. Five animals are used for each test condition, and are monitored for discomfort and time of death versus survival. Rats are maintained under anesthesia for 5 hours or until death to minimize discomfort. Death is monitored by a cessation of breathing and heart beat. Surviving rats are euthanized by overdose of sodium phenobarbital by intra-peritoneal injection, followed by appropriate disposal. The protective ability of antibody preparations is measured as a delayed time to death, and is considered significant at the p < 0.05 level as determined by Student's one tailed t-test.

Engineering of anti-PA Antibodies With Different Binding Affinities. The V_H and V_L genes of the 14B7 monoclonal antibody

WO 03/040384

PCT/US02/35567

(Little SF, Leppla SH, Cora E. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect Immun* 56: 1807-13) are isolated by RT-PCR. Overlap extension PCR is used to produce a 750 bp scFv gene fragment with a sequence encoding a (Gly₄Ser)₄ linker inserted between the heavy and light chain sequences. The scFv gene is fused to pIII for display in filamentous bacteriophage. Error prone PCR is used to construct a library of 5x10⁵ independent transformants which upon screening by phage display leads to the isolation of clone A2E. The corresponding scFv protein exhibits a three-fold higher affinity to PA, and markedly increased stability. DNA sequencing revealed that A2E contains a single L56Ser:Pro substitution in CDR L2 (Table 1).

15 **Table 1: Summary of antibody affinity and stability**

	k_{on} ($\times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-4} sec^{-1}$)	K_d (nM)	37°C in serum [§]	70 °C stability*
14B7 mAb	5	13.5 ± 1.2	2.3	100%	15%
Fab	3	33 ± 2	12	100%	100%
WT scFv	3.1 ± 0.4	32 ± 2	12	100%	3.5%
L97 scFv	3	190 ± 20	63	100%	10%
A2E scFv	3	10 ±	4.0	100%	28%
1H scFv	7.2 ± 0.8	1.7 ± 0.2	0.24	100%	5%
WT dimer	6.2 ± 0.7	3.9 ± 1.3		100%	0.4%
1H dimer	6			ND	0.2%
WT scAb	2.9 ± 0.3	30 ± 0.8		ND	14%
1H scAb	ND	ND		ND	10%

[§] 37 °C tests performed in 90% FBS for seven days.

*Amount of PA binding remaining after 2 hours of incubation in PBS at 70°C

20 Figure 4, shows the amino acid sequence alignment of 14B7 scFv and related variants. In Figure 4, 14B7 WT sequence is written in single letter amino acid code. Kabat numbering scheme

WO 03/040384

PCT/US02/35567

is indicated along side; CDRs are bracketed; and amino acid changes are indicated by red letters. The single L56Ser:Pro substitution in CDR L2 is present in all subsequent, higher affinity scFvs, even after backcrossing with the parental 14B7 scFv via DNA shuffling (Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-91). For example, DNA shuffling of clones isolated from the fifth round of phage panning of the original library are then recombined by DNA shuffling. The resulting gene pool is amplified, subjected to random mutagenesis and screened by five rounds of phage panning. The entire process, i.e. shuffling, error prone mutagenesis and panning is repeated, giving rise to clones 6A and 1H that exhibit comparable antigen affinities. The latter antibody is selected for further studies. DNA sequencing reveals that 1H contains, in addition to L56Ser:Pro, two more mutations: L55Q:Leu in CDR L2 and H106ALys:Arg mutation located in heavy chain framework 4.

In addition to the affinity matured mutants, an antibody containing the mutation L97Leu:Ala is also constructed. The L97Leu:Ala substitution results in a higher equilibrium dissociation constant and is identified as part of an alanine scanning mutagenesis study of 33 residues at the 14B7:PA interface. Divalent, homodimeric scFv antibodies are constructed with by fusing the 14B7 wild type and the A2E and 1H scFvs with a C-terminal dimerization polypeptide (Krebbler A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, et al. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 201: 35-55). Finally, larger molecular weight monovalent scAbs (45 kDa) are generated by C-terminal fusion of the scFv to a human constant kappa domain (Hayhurst A, Harris WJ. 1999. *Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr Purif* 15: 336-43).

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Characterization. All the scFvs and scAbs are expressed in *E. coli* at a comparable level. Purified yields of at least between 0.25 - 0.5 µg protein/A₆₀₀ or 1 mg/L culture are obtained, comparable to those of other well expressed therapeutic scFv antibodies. The antibodies are purified by metal affinity chromatography followed by size exclusion FPLC to remove higher molecular weight aggregates. The scFvs are predominantly (>80%) monomeric indicating minimal tendency to dimerize in vivo during expression in *E. coli* (Figure 5). Following chromatography, the isolated monomeric scFv proteins are >95% free of higher M.W. species. Freshly prepared antibody samples are used to determine antigen binding kinetics by surface plasmon resonance and for evaluating efficacy in neutralizing the anthrax toxin. The dimeric scFvs remained homogenous without the appearance of any contaminating lower- or higher molecular weight forms even after many weeks of incubation at 4 °C.

The 14B7 Fab and the scFv exhibited identical antigen binding kinetics, as determined by surface plasmon resonance, a k_{on} of $3.1 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, and an off-rate of $0.0035 \pm 2 \text{ sec}^{-1}$ giving an equilibrium dissociation constant of 12 nM (Table 1). For comparison, the divalent IgG exhibited a K_D of 2.3 nM (measured under conditions of low coupling density of PA on the chip to minimize divalent binding). The A2E and 1H mutants exhibited, respectively 3-fold and 48-fold lower equilibrium dissociation constants (Table 1). In contrast the alanine mutant L97 exhibits K_D that is over 5-fold higher than that of 14B7. Dimerization of the scFvs resulted in roughly ten-fold higher apparent affinities relative to the corresponding monomers. The increased affinity of the bivalent constructs is evidently due to avidity effects consistent with earlier findings (Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger P, Zangemeister-Wittke U, et al. 2001. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185HER2 miniantibodies multimerized

WO 03/040384

PCT/US02/35567

by self associating peptides. *Journal of Biological Chemistry* 276: 14385-92).

Biodistribution and targeting efficiency of scFv antibodies that recognizes the epithelial tumor antigen glycoprotein-2 correlate with the thermal and denaturant stability of the protein (e.g., Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger P, Zangemeister-Wittke U, et al. 2001. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185HER2 miniantibodies multimerized by self associating peptides. *Journal of Biological Chemistry* 276: 14385-92). Thus, differences in stability will mask the effect of affinity when evaluating the neutralizing potential of the anti-PA antibodies. Although most scFvs lose activity rapidly in serum at 37 °C (Benhar I, Pastan I. 1995. Identification of residues that stabilize the single-chain Fv of monoclonal antibodies B3. *J Biol Chem* 270: 23373-80; Helfrich W, Kroesen BJ, Roovers RC, Westers L, Molema G, et al. 1998. Construction and characterization of a bispecific diabody for retargeting T cells to human carcinomas. *Int J Cancer* 76: 232-9), all the recombinant antibodies studied are found to be remarkable stable to deactivation in serum. The scFvs and the scAbs but not the dimerized scFvs also exhibited good stability at elevated temperatures (Table 1). Notably, the A2E scFv retained about 25% of its binding activity even after a 2 hour incubation at 70 C. The scAbs exhibit higher thermal stability than the respective scFv presumably due to the contribution of favorable interactions by the Ck domain. Remarkably, the 14B7 Fab exhibits no loss in binding activity under these conditions (Table 1).

The denaturation of the antibodies in urea is evaluated by monitoring changes in protein fluorescence occurring upon unfolding (Pace CN. 1990. Measuring and increasing protein stability. *Trends in Biotechnology* 8: 93-8; Worn A, Pluckthun A. 2001. Stability Engineering of Antibody Single Chain Fv

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Fragments. *Journal of Molecular Biology* 305: 989-1010). The unfolding curves are shown to be fully reversible and the protein fluorescence upon dilution or dialysis from a high urea concentration was identical to that of proteins diluted directly
5 to the same final urea concentration. In analogy with several other scFv antibodies, the anti-PA scFvs exhibit a relatively broad unfolding transition indicating that a simple two-stage model may not be suitable for describing the unfolding process, consistent with earlier studies (Worn A, Pluckthun A. 2001.
10 *Stability Engineering of Antibody Single Chain Fv Fragments. Journal of Molecular Biology* 305: 989-1010). Notably, the A2E and 1H variants (both of which contain a Ser to Pro substitution) exhibit a broader transition region compared to the 14B7 scFv, most likely because the proline residue increases
15 the heterogeneity of the denatured state. For all the scFvs, unfolding is detected only at urea concentrations above 5 M. The urea concentrations values for 50% unfolding ($m_{1/2}$ values) are 6.8, 7.7 and 6.5 M for the 14B7, A2E and 1H scFvs respectively (Figure 6). For comparison, typical scFvs exhibit $m_{1/2}$ values
20 between 2.5-4.5 M urea.

ELISA measurement of scFv monomer stability after 2 hour incubation at 4 °C or 70 °C is demonstrated in Figure 7. Based on the concentration resulting in 50% of maximum signal, incubation at high temperature reduces WT to 3.5% of its
25 previous activity; while variant A2E retains 25% of its activity. Results are average of quadruplicates (standard error indicated by error bars), significant to the $p < 0.005$ level by a one-tailed t-test. See Table 1 for a complete listing of variants and their high temperature stability.

30 *Toxin Neutralization.* Protection of macrophages by antibodies administered at different times following toxin challenge is evaluated. Post-challenge protection correlated strongly with increased affinity (Table 2).

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Table 2. Protection to challenge with toxin in the rat model

Variable	Treatment	Dose (μ g)	Dose (nmoles)	Time to Death (min)*	Number Survivors	Significance (t-test)
	PAControl	40	0.5	-	-	-
	LF	8	0.1	-	-	-
	PBS	-	-	91 \pm 7	0/5	
Affinity	L97 scFv	56	2.0			
	WT scFv	56	2.0	110 \pm 17	0/5	<0.05
	A2E scFv	56	2.0	237 \pm 63	2/5	<0.05
	1H scFv	56	2.0		3/5	
Size	Fab	100	2.0	116*	4/5	
	1H dimer scFv	130	2.0	165 \pm 11	2/5	
	WT scAb	90	2.0			
	1H scAb	90	2.0			
	1H scAb	22.5	0.5			

5 * Time to death calculated only for those animals who died during the five hour study period; all animal sacrificed after 5 hours.

[∞] Control animals sacrificed 30 minutes after PBS-treated animals expired.

10 Interestingly, the 14B7 scFv is significantly more effective relative to the 14B7 monoclonal resulting in lower IC₅₀ dosage. For example, when toxin and 3 nM antibody are administered at the same time (i.e. at t=0) the IC₅₀ of the high affinity antibody 1H was 6-fold and 9-fold lower compared to the values obtained with the scFv and the monoclonal IgG, respectively. 1H conferred significant protection even 20 minutes post challenge while the parental scFv and the monoclonal did not. Overall, these results indicate that the smaller size of the scFv may be less effective in competing with the macrophage receptor for toxin binding.

15

20

WO 03/040384

PCT/US02/35567

Protection to toxin intoxication is examined in the Fisher
344 rat model. Rats are challenged with a 10xMLD amount of PA
and LF (0.160 and 0.064 mg/kg respectively) and survival is
monitored for five hours. Control rats receiving PBS only as
5 treatment expired after 91 ± 7 minutes. Animals receiving 14B7
scFv 5 minutes after toxin challenge exhibit a small but
significant increase in time to death (110 ± 17 minutes, $p <$
0.05). Administration of the A2E scFv results in more dramatic
delays in both the onset of symptoms and time to death (mean TTD
10 237 ± 63 minutes with two survivors).

While this invention has been described in reference to
illustrative embodiments, this description is not intended to be
construed in a limiting sense. Various modifications and
combinations of the illustrative embodiments, as well as other
15 embodiments of the invention, will be apparent to persons
skilled in the art upon reference to the description. It is
therefore intended that the appended claims encompass any such
modifications or embodiments.

All publications and references mentioned in the
20 specification are indicative of the level of skill of those
skilled in the art to which this invention pertains. All
publications and patent applications are herein incorporated by
reference to the same extent as if each individual publication
or reference was specifically and individually indicated to be
25 incorporated by reference.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

What is claimed is:

1. A purified affinity-matured recombinant antibody or portion thereof having binding specificity for a proteinaceous toxin.
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody is cloned from an antigen hybridoma.
4. The antibody of claim 1, wherein the portion is chosen from the group consisting of an scFv fragment, a Fab fragment and an IgG fragment.
5. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises any antibody class.
7. The antibody of claim 1, wherein the antibody is expressed in bacteriophage-infected bacteria.
8. The antibody of claim 7, wherein bacteriophage are screened for one or more clones that exhibit at least three-fold higher affinity and an increased stability to a protective antigen than wild-type antibodies.
9. The antibody of claim 8, wherein one or more clones are fused to a wild type antibody to create homodimeric antibodies.
10. The antibody of claim 1, wherein the antibody confers protection to a host against the proteinaceous toxin.
11. The antibody of claim 10, wherein the host is a human.
12. The antibody of claim 10, wherein the host is a mammal.
13. The antibody of claim 1, that binds to the proteinaceous antigen with about a one-to-one stoichiometry.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

14. The antibody of claim 1, wherein the proteinaceous toxin is chosen from the group consisting of Botulinum toxin, Clostridium perfringens toxins, Conotoxin, Ricin, Saxitoxin, Shiga toxin, Staphylococcus aureus toxins, Tetrodotoxin, Verotoxin, Microcystin (Cyanginosin), Abrin, Cholera toxin, Tetanus toxin, Trichothecene mycotoxins, and toxins derived from animal
5 venoms.
15. A purified affinity-matured recombinant antibody or portion thereof having binding specificity for the Bacillus anthracis protective antigen.
16. The antibody of claim 15, wherein the antibody is cloned from anti-protective antigen hybridoma.
17. The antibody of claim 15, wherein the antibody is cloned from anti-protective antigen hybridoma 14B7.
18. The antibody of claim 15, wherein the portion comprises an scFv fragment.
19. The antibody of claim 15, wherein the antibody comprises any antibody class.
20. The antibody of claim 15, wherein the portion comprises an scFv fragment further comprising antibody constant regions to create monovalent antibody portion of at least 40 kDa.
21. The antibody of claim 15, wherein the antibody is expressed in bacteriophage-infected bacteria.
22. The antibody of claim 21, wherein bacteriophage are screened for one or more clones that exhibit at least three-fold higher affinity and an increased stability to the protective antigen than wild-type 14B7.
23. The antibody of claim 22, wherein one or more clones are fused to a 14B7 wild type to create divalent homodimeric antibodies.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

24. The antibody of claim 15, wherein the antibody confers protection to a host against Bacillus anthracis toxin.
25. The antibody of claim 24, wherein the host is a human.
26. The antibody of claim 24, wherein the host is a mammal.
27. The antibody of claim 15, that binds to the Bacillus anthracis protective antigen with about a one-to-one stoichiometry.
28. The antibody of claim 15, wherein the antibody alleviates symptoms of anthrax infection.
29. The antibody of claim 15, wherein the antibody neutralizes the Bacillus anthracis protective antigen.
30. The antibody of claim 15, wherein the antibody protects the host against Bacillus anthracis toxin poisoning.
31. A purified antibody for the Bacillus anthracis protective antigen that exhibits an equilibrium dissociation constant of at least about 63 nM.
32. The antibody of claim 31, wherein the antibody is affinity matured from an antibody sequence cloned from anti-PA hybridoma.
33. The antibody of claim 31, wherein the antibody is affinity matured from an antibody sequence cloned from anti-PA hybridoma 14B7.
34. The antibody of claim 31, wherein the portion comprises an scFv fragment.
35. The antibody of claim 31, wherein the antibody comprises any antibody class.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

36. The antibody of claim 31, wherein the portion comprises an scFv fragment further comprising antibody constant regions to create monovalent antibody portion of at least 40 kDa.
37. The antibody of claim 31, wherein the antibody is expressed in a bacteria.
38. The antibody of claim 31, wherein antibody exhibits at least three-fold higher affinity and an increased stability to the protective antigen over wild-type 14B7.
39. The antibody of claim 31, wherein the gene that expressed the affinity matured antibody is fused to a 14B7 wild-type gene to create divalent a homodimeric antibody.
40. The antibody of claim 31, wherein the antibody confers protection to a host against a Bacillus anthracis toxin.
41. The antibody of claim 40, wherein the host is a human.
42. The antibody of claim 40, wherein the host is a mammal.
43. The antibody of claim 31, that binds to the Bacillus anthracis protective antigen with a one-to-one stoichiometry.
44. The antibody of claim 31, wherein the antibody alleviates symptoms of anthrax infection.
45. The antibody of claim 31, wherein the antibody neutralizes a Bacillus anthracis toxin.
46. The antibody of claim 31, wherein the antibody protects the host against Bacillus anthracis toxin poisoning.
47. A process for producing antibodies to bacterial toxins that produces an immune response protective against and or alleviates the symptoms of bacterial infection, comprising:

WO 03/040384

PCT/US02/35567

culturing a microorganism that expresses a bacterial toxin or fragments thereof in a bacteriophage that is expressed in the microorganism;

5 constructing a bacteriophage library that expressed affinity matured antibodies or portions thereof;

contacting the bacteriophage library with the microorganism; and

selecting bacteriophage with at least three-fold higher affinity to the bacterial toxin.

48. The process of claim 47, wherein the affinity matured antibodies comprise gene sequences from an antibody that is specific for a bacterial toxin.

49. The process of claim 47, wherein the affinity matured antibodies comprise gene sequences from an antibody that is specific for a Bacillus anthracis protective antigen.

50. The process of claim 47, wherein the affinity matured antibodies comprise portions of the 14B7 antibody.

51. The process of claim 47, wherein the affinity matured antibodies comprise an scFv gene fragment of the 14B7 antibody .

52. The process of claim 49, wherein larger molecular weight monovalent antibodies are generated after fusion of the gene sequences from the affinity matured antibody to a human constant domain.

53. The process of claim 47, wherein divalent, homodimeric antibodies are engineered.

54. The process of claim 51, wherein the antibody or portion thereof is divalent.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

55. The process of claim 47, further comprising the step of purifying the affinity matured antibody or portion thereof.
56. The process of claim 47, wherein the antibodies confer protection to a host against a *Bacillus anthracis* toxin.
57. The process of claim 56, wherein the host is a human.
58. The process of claim 56, wherein the antibodies alleviate symptoms of *Bacillus anthracis* infection.
59. The process of claim 56, wherein the antibodies neutralize the *Bacillus anthracis* toxin.
60. A method of treating a host having or at risk of infection by *Bacillus anthracis*, the method comprising the step of:

administering to a host a composition comprising an affinity matured antibody against a proteinaceous toxin or portion thereof derived from a monoclonal antibody.
61. The method of claim 60, wherein the host is a human.
62. The method of claim 60, wherein the host is a mammal.
63. The method of claim 60, wherein the affinity matured antibody is administered after onset of symptoms.
64. The method of claim 60, wherein the affinity matured antibody or portion thereof is administered prophylactically.
65. The method of claim 60, wherein the affinity matured antibody or portion thereof comprises an scFv fragment.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

66. The method of claim 60 wherein the affinity matured antibody or portion thereof exhibits a dissociation constant of at least 63 nM. 67. A pharmaceutical composition for the treatment of a pathogenic infection comprising an affinity matured antibody or portion thereof against a toxin in a pharmaceutically acceptable carrier.
68. The pharmaceutical composition of claim 67, wherein the toxin is a bacterial toxin.
69. The pharmaceutical composition of claim 67, wherein the toxin is a Bacillus anthracis toxin.
70. A method for the treatment of Bacillus anthracis comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a purified affinity matured antibody or portion thereof having binding specificity for the Bacillus anthracis protective antigen in a pharmaceutically acceptable carrier.
71. A diagnostic device comprising an immobilized purified affinity-matured recombinant antibody or portion thereof having binding specificity for a proteinaceous toxin.
72. The diagnostic device of claim 71, further comprising an indicator.
73. The diagnostic device of claim 72, wherein the indicator further comprises a color change.
74. A diagnostic device comprising an immobilized proteinaceous toxin that has a binding affinity for an affinity-matured recombinant antibody or portion thereof.
75. The diagnostic device of claim 74, further comprising an indicator.
76. The diagnostic device of claim 75, wherein the indicator further comprises a color change.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

77. A method for diagnosis of exposure to a proteinaceous toxin comprising the steps of;

contacting a diagnostic device comprising an immobilized purified affinity-matured recombinant antibody or portion thereof having binding specificity for a proteinaceous antigen with a fluid; and

analyzing the diagnostic device for indication of a reaction between the proteinaceous antigen and the antibody.

78. The method of claim 77, wherein the fluid is blood, urine, saliva, or other humors.

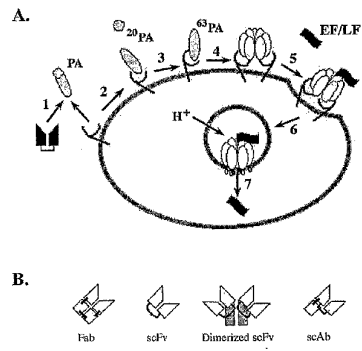
79. The method of claim 77, wherein the analysis comprises a detector.

80. The method of 79, wherein the detector detects color, radioactivity, photoluminescence, chemiluminescence, fluorescence, surface plasmon resonance, and the like.

WO 03/040384

PCT/US02/35567

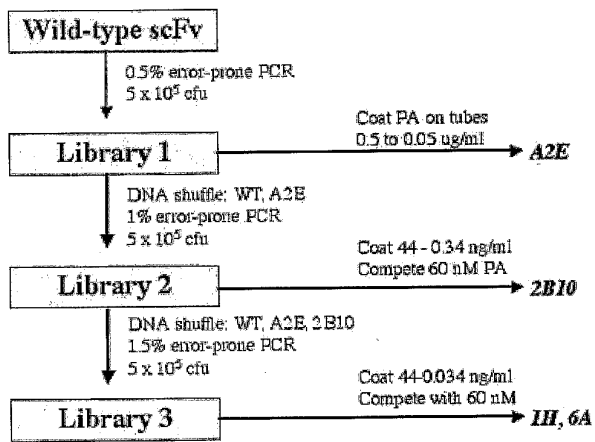
Figure 1



WO 03/040384

PCT/US02/35567

Figure 2



WO 03/040384

PCT/US02/35567

Figure 3

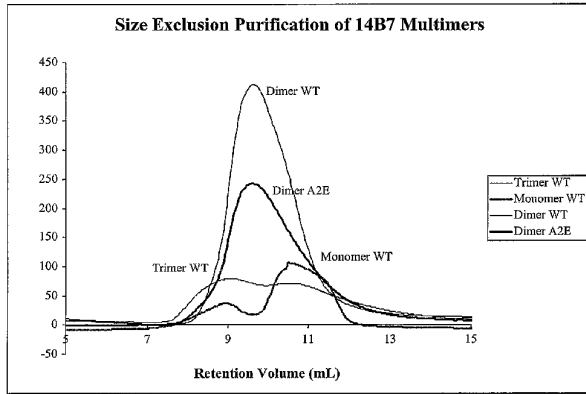


Figure 4

```

- - - - -
NR  . . . . .
AZE . . . . .
IK  . . . . .
GA  . . . . .
I97 . . . . .

NR  . . . . .
AZE . . . . .
IK  . . . . .
GA  . . . . .
I97 . . . . .

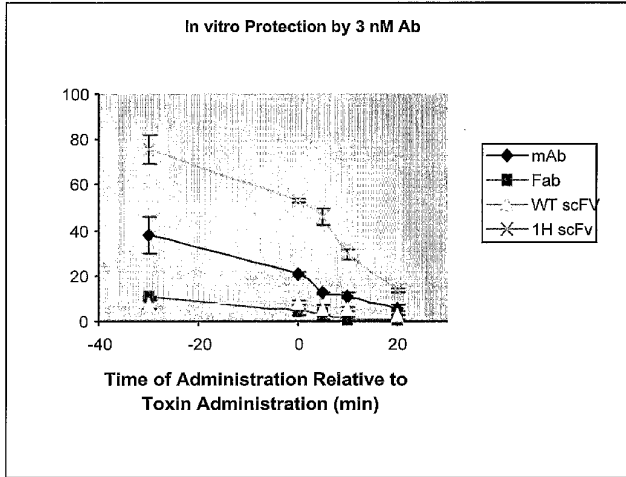
NR  . . . . .
AZE . . . . .
IK  . . . . .
GA  . . . . .
I97 . . . . .

```

WO 03/040384

PCT/US02/35567

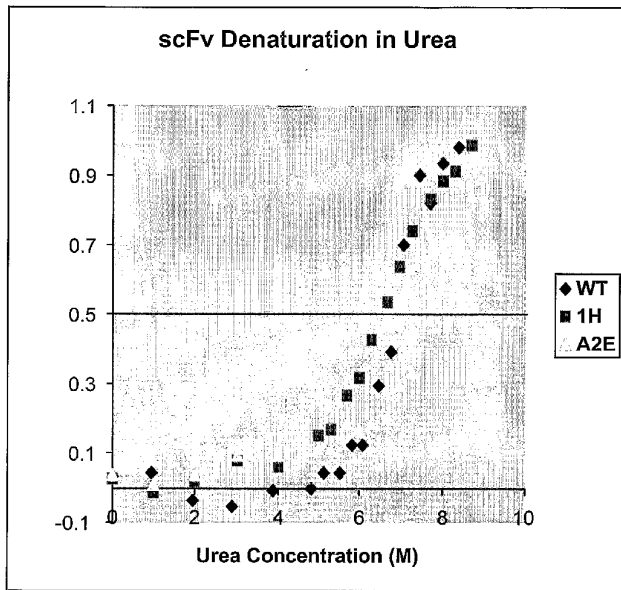
Figure 5



WO 03/040384

PCT/US02/35567

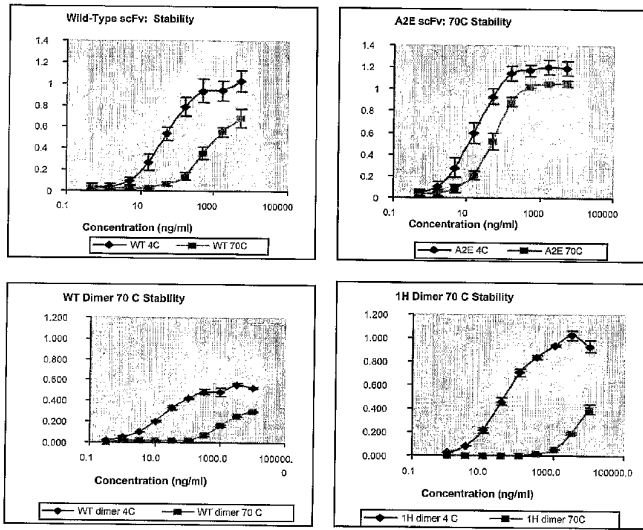
Figure 6



WO 03/040384

PCT/US02/35567

Figure 7



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PC/0502/35567
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12P 21/08; C07K 16/00; G01N 33/53; C12M 3/00 US CL : 530/387.3, 387.2, 387.9, 388.4, 388.5, 389.5, 388.15; 436/548; 424/236.1, 246.1; 435/7.1, 287.2, 975		
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) U.S. : 530/387.3, 387.2, 387.9, 388.4, 388.5, 389.5, 388.15; 436/548; 424/236.1, 246.1; 435/7.1, 287.2, 975		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P ---	US 6,329,156 B1 (CIRINO et al) 11 December 2001 (11.12.2001), Example 1.	1, 4, 5, 7, 15, 18, 19, and 21
Y,P		2, 3, 8-13, 16, 20, 24-32, 47-49, 52-66 and 70-80
Y	LITTLE, S.F. et al. Passive protection by polyclonal antibodies against Bacillus anthracis infection in guinea pigs. Infect. Immun. December 1997, Vol 65, No. 12, pages 5171-5175, abstract, Materials and Methods; and Results.	1-5, 7-13, 15, 16, 18-22, 24-32, 34-38, 40-49, 52-66 and 70-80
Y	WO 99/36569 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 22 July 1999 (22.07.1999), Examples.	1-5, 7-66 and 70-80
Y	LITTLE, S.F. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of Bacillus anthracis toxin. Infect. Immun. July 1988, Vol. 56, No. 7, 1807-1813, abstract, Materials and Methods; and Results.	1-5, 7-13, 15, 16, 18-22, 24-32, 34-38, 40-49, 52-66 and 70-80
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention	
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*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	
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)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 02 January 2003 (02.01.2003)	Date of mailing of the international search report 29 JAN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer: <i>Valera Bell-Hamilton</i> S. Devi, Ph.D. Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35567

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TURNBILL, P.C.B. et al. Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. <i>Med. Microbiol. Immunol.</i> 1988, Vol. 177, No. 5, pages 293-303, abstract; Materials and Methods; and Results.	1-5, 7-13, 15, 16, 18-22, 24-32, 34-38, 40-49, 52-66 and 70-80
Y	US 5,601,823 A (WILLIAMS et al) 17 February 1997 (17.02.1997), Examples.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35567

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS
affinity (natur? or high or increas?) (antibod? or immunoglobulin? or Ig) toxin?; inventors' names

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/35567
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 6 and 67 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: Claims 6 and 67 are absent.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 68 and 69 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 15/00	A
/(C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 R 1:01	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ゲオルギオウ ジョージ
アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン シーピーイー ビルディング デパートメント オ
ブ ケミカル エンジニアリング ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティ
ン

(72)発明者 アイバーソン ブレント エル.
アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン ウェルチ ホール 5 . 3 2 0 デパートメント
オブ ケミストリー ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン

(72)発明者 メイナード ジェニファー エー.
アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン エムビービー 3 . 3 1 0 デパートメント オブ
ケミカル エンジニアリング ザ ユニバーシティー オブ テキサス アット オースティン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA05 DA06 EA03 GA11 HA01 HA12
HA15
4B064 AG26 CA02 CC24 DA01 DA13
4C085 AA14 BA08 DD61 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 CA40 CA50 CA52 DA75 EA29
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	用于检测和中和炭疽毒素的重组抗体		
公开(公告)号	JP2005508395A	公开(公告)日	2005-03-31
申请号	JP2003542630	申请日	2002-11-05
申请(专利权)人(译)	Rejentsu董事会，得克萨斯大学体系		
[标]发明人	ゲオルギオウジョージ アイバーソンプレントエル メイナードジェニファーエー		
发明人	ゲオルギオウ ジョージ アイバーソン プレント エル. メイナード ジェニファー エー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/07 A61K39/395 A61P31/04 C07K16/12 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/01 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/1278 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2317/626 Y10S530/809 Y10S530/864 Y10S530/865 Y10S530/866 Y10S530/867		
FI分类号	C07K16/12 A61K39/07 A61K39/395.H A61P31/04 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/569. F C12N15/00.A C12R1/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/BA08 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/CA52 4H045/DA75 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/332849 2001-11-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种使用亲和力成熟的抗体或其衍生自单克隆抗体的部分来治疗患有炭疽芽孢杆菌或有被炭疽芽孢杆菌感染的宿主的组合物和方法。

	k_{on} ($\times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-4} sec^{-1}$)	K_d (nM)	血清中で 37°C	70 °C での安定性
14B7 mAb	5	13.5 ± 1.2	2.3	100%	15%
Fab	3	33 ± 2	12	100%	100%
WT scFv	3.1 ± 0.4	32 ± 2	12	100%	3.5%
L97 scFv	3	190 ± 20	63	100%	10%
A2E scFv	3	10 ±	4.0	100%	28%
1H scFv	7.2 ± 0.8	1.7 ± 0.2	0.24	100%	5%
WT 二量体	6.2 ± 0.7	3.9 ± 1.3		100%	0.4%
1H 二量体	6			ND	0.2%
WT scAb	2.9 ± 0.3	30 ± 0.8		ND	14%
1H scAb	ND	ND		ND	10%