

(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2007-527370

(P2007-527370A)

(43) 公表日 平成19年9月27日(2007.9.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C085
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	5B075
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-506126 (P2006-506126)	(71) 出願人	500030172
(86) (22) 出願日	平成16年4月14日 (2004. 4. 14)		ニューテック ファーマ パブリック リ
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月12日 (2005. 12. 12)		ミテッド カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2004/001619		イギリス国 マンチェスター エム13
(87) 国際公開番号	W02004/094474		9ダヴリュエル オックスフォード ロード
(87) 国際公開日	平成16年11月4日 (2004. 11. 4)		セントラル マンチェスター アンド
(31) 優先権主張番号	0309126.1		マンチェスター チルドレンズ ユニヴ
(32) 優先日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)		ァーシティ ホスピタル エヌエイチエス
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		トラスト クリニカル サイエンスズ
		(74) 代理人	100077827
			弁理士 鈴木 弘男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 クロストリジウム・ディフィシルに収束された抗体

(57) 【要約】

本発明は、C . ディフィシルによる感染に特異的なおよびその感染またはワクチンに対する免疫を付与する抗体、それを同定する方法、医薬の製造方法、およびそれを使用する患者の処置方法に関する。同じく、患者にワクチン接種する方法、診断用試験方法、および診断用試験キットと共に、ワクチンの有効性を決定する方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR-H3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 32、配列番号 33、および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR-L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR-H3 配列ならびに配列番号 32、配列番号 33、および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR-L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 4】

感染中にクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) により生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の候補配列の同定方法であって、

(i) クロストリジウム・ディフィシルに感染したまたはそのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の少なくとも CDR3 領域を配列決定する工程 ; ならびに

20

(ii) その少なくとも一人の患者からのその B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の配列決定された少なくとも CDR3 領域を関連付けて、クロストリジウム・ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の候補 CDR3 配列の各々またはそれと少なくとも 80% の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1% の頻度で出現する工程 ; を含んでなる方法。

【請求項 5】

その B 細胞が末梢 B 細胞リンパ球および脾臓からの B 細胞よりなる群から選択されるものである、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

その末梢 B 細胞リンパ球がその少なくとも一人の患者からの血液から単離されたものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

その少なくとも一つの抗原が免疫原である、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染に应答する顕著な抗体应答を示す、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復した人である、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 10】

その関係付け工程 (ii) が、その配列決定された少なくとも VH および / または VL CDR3 領域からの推定アミノ酸配列を決定し、その推定アミノ酸配列を関係付けることを含んでなる、請求項 4 ~ 9 にいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

その関係付け工程 (ii) が、その少なくとも VH および / または VL 領域に含まれる相補性決定領域を同定し、その相補性決定領域を関係付けることを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

50

その相補性決定領域が C D R 1、C D R 2 および C D R 3 よりなる群から選択されるものである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

その関係付け工程 (i i) が、その少なくとも一人の患者に感染するクロストリジウム・ディフィシルの株、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間にその B 細胞が単離される時点、その少なくとも一人の患者の年齢、その少なくとも一人の患者の性別、およびその少なくとも一人の患者の人種よりなる群の少なくとも一つとさらに関係付ける、請求項 4 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】

その B 細胞が、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間に複数の時点で、その少なくとも一人の患者から単離されたものであり、その関連付け工程 (i i) が、その B 細胞が単離されたその少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間の時点と関連付けるものである、請求項 4 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 5】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、そのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したものであり、且つそのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したのではなく、その関連付け工程 (i i) がクロストリジウム・ディフィシルによる感染からその少なくとも二人の患者の回復に関連付けられるものである、請求項 4 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 1 6】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、その患者が、その少なくとも一つの抗原を生成するクロストリジウム・ディフィシルの異なる株で感染しており、その関連付け工程 (i i) が、B 細胞のその配列決定された少なくとも V H および / または V L をコードする領域を関連付けして抗体に対する一連の候補配列を同定し、その各々がクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される少なくとも一つの共通の抗原に特異的であるか、またはクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される異なる抗原に特異的である、請求項 4 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

少なくとも一つの抗原を生成するクロストリジウム・ディフィシルによる感染の処置用の医薬の製造方法であって、

30

(i) 請求項 4 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法を行う工程 ; および

(i i) クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を含んでなる少なくとも一つの抗体を合成する工程を含んでなる方法。

【請求項 1 8】

その合成された少なくとも一つの抗体を薬学的に許容しうる担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせる工程を含んでなる、請求項 1 7 に記載の医薬の製造方法。

【請求項 1 9】

少なくとも一つの抗原を生成するクロストリジウム・ディフィシルによる患者の感染の処置方法であって、

40

(i) 請求項 4 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法を行う工程 ;

(i i) クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を含んでなる少なくとも一つの抗体を合成する工程 ; および

(i i i) その少なくとも一つの生成された抗体の治療有効量をその患者に投与する工程を含んでなる方法。

【請求項 2 0】

50

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程；および

(ii) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程を含んでなる方法。

【請求項 21】

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程；および

(ii) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程を含んでなる方法。

10

【請求項 22】

ワクチンの有効性の決定方法であって、

(i) そのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程；ならびに

(ii) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域を関連付けて、そのワクチンに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の C D R 3 候補配列の各々またはそれと少なくとも 80% の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1% の頻度で出現するものである工程；
を含んでなる方法。

20

【請求項 23】

関連付け工程 (ii) が、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域を、そのワクチンでのワクチン接種が保護的免疫応答を促進することを意図されたクロストリジウム・ディフィシルで感染された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域と関連付けることを含んでなる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

その関係付け工程 (ii) が、その少なくとも一人の患者に感染するクロストリジウム・ディフィシルの株、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間にその B 細胞が単離される時点、その少なくとも一人の患者の年齢、その少なくとも一人の患者の性別、その少なくとも一人の患者の人種、およびその配列決定された少なくとも V H および / または V L をコードする領域の相補性決定領域よりなる群の少なくとも一つとさらに関係付ける、請求項 22 または 23 に記載の方法。

30

【請求項 25】

その方法が、そのワクチンでのワクチン接種が保護的免疫応答を促進することを意図されたクロストリジウム・ディフィシルに対する保護的免疫応答を促進することにおけるそのワクチンの有効性を決定する、請求項 22 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 26】

ワクチンの有効性を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 請求項 22 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法を行う工程；および

(ii) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程を含んでなる方法。

【請求項 27】

ワクチンの有効性を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 請求項 22 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法を行う工程；および

(ii) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程を含んでなる方法。

50

【請求項 28】

患者におけるクロストリジウム・ディフィシル感染を同定する診断用試験方法であって

(i) その患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ;

(ii) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域のその配列決定された少なくともその C D R 3 領域を、クロストリジウム・ディフィシルに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の配列と比較し、その一連の C D R 3 配列の各々またはそれと少なくとも 80 % の同一性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1 % の頻度で出現するか否かを決定する工程 ; ならびに

(iii) 比較工程 (ii) の結果を関連付けして、その患者にクロストリジウム・ディフィシル感染が存在するか否かを決定する工程 ;

を含んでなる方法。

【請求項 29】

患者のクロストリジウム・ディフィシル感染への感受性を決定する診断用試験方法であって、

(i) その患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ;

(ii) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域のその配列決定された少なくともその C D R 3 領域を、クロストリジウム・ディフィシルに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の配列と比較し、その一連の C D R 3 配列の各々またはそれと少なくとも 80 % の同一性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1 % の頻度で出現するか否かを決定する工程 ; ならびに

(iii) 比較工程 (ii) の結果を関連付けして、その患者のクロストリジウム・ディフィシル感染への感受性を決定する工程 ;

を含んでなる方法。

【請求項 30】

請求項 28 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の診断的試験方法を行うための診断用試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロストリジウム・ディフィシルによる感染に特異的なおよびそれに対する免疫を付与する抗体または C . ディフィシルに基づくワクチンでのチャレンジ後に生成された抗体、それを同定する方法、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

C . ディフィシルは、グラム陽性の嫌気性細菌であり、中程度の下痢から劇症の偽膜性大腸炎 (P M C) の範囲の - 総称して、C . ディフィシル抗生物質関連下痢 (C D A D) と称される一連の疾患を引き起こす重要なヒト病原菌と考えられている。C D A D は、特に高齢者において、かなりの罹患率および死亡率を伴う、一般的で、医原性の院内疾患である。二つの要因、抗生物質の投与による常在腸内細菌叢の抑制およびその細菌による 2 種の高分子量毒素、毒素 A および毒素 B の生成が、C D A D の病原性において主要な役割を果たしていると考えられている。

【0003】

その細菌は、病院内に特有のものであり、研究では、急性期治療用病棟において抗生物質処置を受けた患者の約 3 分の 1 が、病院にいる間に、C . ディフィシルに感染することが示されている (Kyne, L.ら、2002, Clin. Infect. Dis. 34(3), pp346-53, PMID: 11774082)。これらの患者のうち、半数以上が C D A D を発症し、残りは、症状のない保菌者であった。C D A D は、患者の病院滞在時間を延長させる主要な要因であり、米国におけ

10

20

30

40

50

るこの疾患のコストは、十一億ドル/年を超えると推定されている (Kyne, L.ら、上記文献)。C D A Dを患う患者は、誘因抗生物質の中断と抗生物質メトロニダゾールおよびバンコマイシンの何れかでの処置を含む処置によく反応する。しかしながら、バンコマイシン等の使用は、いくつかの問題を伴うため、最後の手段の一つである。腎毒性、耳毒性、骨髄毒性、およびレッドマン (red man) 症候群を引き起こすのみならず、この処置法での問題は、初期の発症を成功裡に処置したのちに、C D A Dがしばしば再発することであり、この再発は、重大な臨床上的問題を提起する。加えて、C . ディフィシルはメトロニダゾールに耐性になりつつあり、またバンコマイシンに対して一部耐性になりつつあるという兆候があり、C D A Dの処置において新規な代替法が必要であることを示している。

【0004】

その細菌の病原性株により生成される外毒素AおよびBは、細胞毒性、腸管毒性、および炎症性であり、この非侵襲性微生物の主要な病原性の要因であると考えられる。しかしながら、毒素産生株での感染が全て疾患を発症するものではなく、さらなる病原性要因の探索が推進されている。細菌表面に発現した抗原は、病原性要因の候補を提示し、また、そのようなタンパク質は、コロニー形成の第一ステップにおける腸の上皮層への接着または局所免疫のメディエーターとの相互作用等の必須の機能をおそらくは仲介するため、重要であると考えられている。他の多くの細菌に共通して、C . ディフィシルは、外側の細胞表面上で結晶性またはパラ結晶性表面層 (S層) を発現する。そのようなS層は、細菌の外表面上に規則的に配列した格子を形成するタンパク質または糖タンパク質を含み、また、アエロマナス・サルモニシダ (*Aeromonas salmonicida*) およびカンピロバクター・フェタス (*Campylobacter fetus*) 等の病原菌の病原性に必須であることが既に示されている。一つのS層を含む大部分の細菌とは対照的に、C . ディフィシルは、C . ディフィシル株の間で見かけ上の分子量が各々若干異なる糖タンパク質からなる、2種の重ね合わせられたパラ結晶性S層を含むことが知られている。C . ディフィシルの大部分の株は、32 ~ 38 kDaのもの (低分子量SLP) と42 ~ 48 kDaの二番目のもの (高分子量SLP) 2個の主たるS層タンパク質 (SLPs) を発現する。低分子量SLPは、免疫優位であるようであり、C D A Dを患う患者に最も一般的に認められる抗原であり、全C . ディフィシル細胞に対してウサギ中で育てられた抗血清による細菌のEDTA抽出物中で認められる唯一の抗原である (Calabi, E.ら、2001, *Mol. Microbiol.*, 40(5) p1187-99, PMID: 11401722)。

【0005】

微生物感染の過程において、免疫系により種々の順応方策が用いられる。そのような方策の一つであって、おそらく間違いなく最も重要なものは、抗体応答の生成である。病原菌により提示される抗原を結合しうる抗体が生成され、結合し、補足活性化、マクロファージの動員、および微生物それ自体との直接的相互作用を介して微生物が殺される。所与の抗原を結合しうる抗体の治療有効性は変動し、これは、免疫系による抗体生成は、感染の過程で成熟し、感染を成功裡に撃退した患者の場合には、収束 (focussed) されるといふ事実に反映される。

【0006】

抗体応答は、個々のB細胞は各々構造的に異なった抗体分子を生成するB細胞レパートリーにより発現される。このB細胞/抗体レパートリーの実際のサイズは未知であるが、所与の抗原に対する反応性のランダムクローナル頻度は、培養B細胞中、1 / 100, 000中程度である (Nobrega, A.ら、*Eur J Immunol.* 1998 Apr;28(4):1204-15; PMID: 9565360)。感染の過程で、病原菌と結合しうる抗体は、多数生成される鍵抗体をもたらすB細胞集団における変化により、選択される。これらの変化の機構は、クローン性拡大、イソ型スイッチング、および免疫グロブリン可変領域の体細胞変異を包含する。病原体と多重に結合しうる抗体の発生をもたらすB細胞、B細胞レパートリーを歪曲させ、B細胞の比率を変化させる。

【0007】

C . ディフィシル感染症の処置/予防に対する抗生物質に基づかない治療法は、ワクチ

10

20

30

40

50

ン接種および受動免疫化に基づく。ワクチン接種処置は、C.ディフィシル表面層タンパク質もしくは変異株もしくは同族体の免疫原性フラグメントをコードする核酸配列または(WO02/062379に開示のような)均等なポリペプチドフラグメントのいずれかを患者に投与することを含む。受動的免疫化は、病原体により生成される免疫原に特異的なモノクローナル抗体を患者に投与することにより、通常、達成される。一般に、(受動免疫治療は、ワクチン接種に应答できない免疫不全の患者および直ちに治療する必要があるワクチン接種の効果を待つことができない患者を処置するのに特に有効である。C.ディフィシル感染の場合には、(WO99/2030.4に開示のような)毒素中和ポリクローナル免疫グロブリンのまたは(WO96/07430に開示のような)細菌全体と毒素に対して育てられた抗体の患者への投与による。

10

【0008】

このように、従来技術から見る事ができるように、患者を処置するために、免疫原をまず単離精製し、試験動物に投与し、免疫原に特異的な抗体を生成する細胞をクローン化する。次いで、そのクローンにより生成される抗体の範囲を、それらの治療有効性について試験し、選択された単一のモノクローナル抗体を、次いで、患者に投与して受動免疫治療を行う。

【0009】

しかしながら、C.ディフィシル感染を処置することを目的とする現在の受動免疫治療に伴ういくつかの問題がある。例えば、受動免疫治療は、C.ディフィシル感染の生存者およびワクチン接種された患者が存在することが必要とされる。各々のバッチの抗体は異なる可能性があり、免疫治療剤の標準化と投与に困難が伴う。さらに、外因性の病因物質(例えば、HIV、HBV、HCV、または未同定病因物質)の患者への不注意による投与の問題が現実的なものであり、最新の免疫治療剤のスクリーニングが必要である。最後に、C.ディフィシルが示す株の可変性は、所与の抗体がその菌のある株に対してのみ有用であり、他のものに対しては有用でないことを意味する。

20

【0010】

明らかに、含まれる技術はやや複雑で、不便で、費用がかかり、時間のかかるものである。一般に、それらは、免疫原を感染している病原体から単離して、抗体を発生させるために使用される。本当に、免疫原の単離は、特にそれが、生体外では合成できずかつ例えば、ワクチンとして使用するための抗原として単離および生成できない炭水化物または複合体非直鎖状エピトープ(すなわち、二級、三級および/または四級構造特徴を有するエピトープ)を含んでなる場合に、極めて困難で時間がかかる。C.ディフィシルのSLPは、種の間で分子量が異なる糖タンパク質を含む。例えば、特定の抗原が宿主の感染によってのみ発現されるネisseria・ゴノルホエア(*Neisseria gonorrhoeae*)感染(淋病の病因菌)と一致して、C.ディフィシルエピトープは生体内でのみ生成され、生体外では合成されないということである。そのような抗原は、クリプト抗原の一般綱に分類される。さらに、C.ディフィシルは、抗原が使用中に簡単に分解し且つそれらが表示するエピトープが失われるので、作動しがたい非常に不安定な抗原を表示する。同定および/または生体内使用が非常に困難であるかあるいは不可能であるエピトープ/抗原のこの範囲について、本発明はこれらの欠点を克服するものであり、C.ディフィシルに感染した患者の抗体応答中にCDR領域がC.ディフィシルエピトープに应答して発生した抗体を提供することにより、解決をもたらすものである。

30

40

【0011】

さらに、従来技術は、一般に、抗原に特異的な一連の候補抗体をまず合成し、それらをそれらの結合特性について試験し、次いで、結合を最適化するために、候補の配列を改変することにより、抗体の親和性成熟の均等物を獲得しようとする必要がある。親和性成熟(すなわち、抗体結合の最適化)の完全な試みは、数千の様々な抗体を合成することを必要とし、それはコストがかかり、また時間がかかることである。本発明の抗体は、抗原を提示する病原体で感染されたあるいは抗原でワクチン接種された患者から得られるので、全く当然のことながら、可変重鎖および可変軽鎖のそれらのCDR3領域(すなわち、C

50

D R - H 3 および C D R - L 3 領域) の配列により最も明確に示されるように、それらは既に親和性成熟を受けている。

【特許文献 1】W O 0 2 / 0 6 2 3 7 9

【特許文献 2】W O 9 9 / 2 0 3 0 . 4

【特許文献 3】W O 9 6 / 0 7 4 3 0

【非特許文献 1】Kyne, L.らの論文、2002, Clin. Infect. Dis. 34(3), pp346-53, PMID : 11774082

【非特許文献 2】Calabi, E. らの論文、2001, Mol. Microbiol., 40(5) p1187-99, PMID : 11401722

【非特許文献 3】Nobrega, A. らの論文、Eur J Immunol. 1998 Apr;28(4):1204-15; PMID : 9565360 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明により、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される C D R - H 3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントが提供される。

【0013】

本発明により、また、配列番号 32、配列番号 33、および配列番号 34 よりなる群から選択される C D R - L 3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントが提供される。 20

【0014】

本発明により、同じく、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される C D R - H 3 配列ならびに配列番号 32、配列番号 33、および配列番号 34 よりなる群から選択される C D R - L 3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントが提供される。

【0015】

本発明により、また、感染中にクロストリジウム・ディフィシル (Clostridium difficile) により生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域の候補配列の同定方法であって、 30

(i) クロストリジウム・ディフィシルに感染したまたはそのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ; ならびに

(i i) その少なくとも一人の患者からのその B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域を関連付けて、クロストリジウム・ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域の一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の候補 C D R 3 配列の各々またはそれと少なくとも 80% の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1% の頻度で出現する工程 ; を含んでなる方法が提供される。 40

【0016】

そのような方法において、そのような方法において B 細胞源として使用される患者の例は、ヒトおよび他の動物、例えば、マウス、ウサギ、ラット、ヒヒ、サル、および類人猿である。

【0017】

本発明のある実施態様においては、工程 (i) は、

(i) (a) クロストリジウム・ディフィシルに感染したまたはそのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から B 細胞を単離する工程 ; および

(i i) (b) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ;

を含んでなる。

【0018】

工程(i)で決定された一連の配列において、全体として少なくとも1%の頻度で出現する配列が、候補CDR3配列またはそれと少なくとも80%の相同性、例えば85, 90, 95, 96, 97, 98または99%の相同性を有する配列である。配列の相同性は、初期値のパラメーターでNational Center for Biotechnology Information, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)でのBLAST2プログラム(Tatusova TAら、FEMS Microbiol Lett. 1999 May 15; 174(2); 247-50; PMID: 10339815)を用いて決定される。

【0019】

例えば、工程(i)で決定された一連の配列において、全体として少なくとも1%の頻度で出現する配列が、候補CDR3配列またはそれから1または2アミノ酸が変化した配列である。一般に、主要な配列の頻度が80%より大きい相同性を示す任意の配列の頻度と共に加算され、1%以上の頻度を示す任意の配列が候補配列とされる。例えば、第一の配列が0.7%の頻度で出現し、それから単一のアミノ酸が各々変化した第一、第二、第三および第四配列がそれぞれ0.1%の頻度で出現し、したがって、全体の出現が1.1%であると、(0.7%の頻度で出現する)主要な抗体配列が、それ故、候補CDR3配列である。

10

【0020】

これは、抗体が選別により単離され、構造特異的な及び電荷特異的な状態で特定の(公知の)抗原と結合することを要する、ファージライブラリー等のベクター中の抗体のライブラリーを作製する従来技術の方法とは、根本的に異なる。その二つを比較することができる共通点は、ライブラリーの従来技術の作成方法と引き続く選別は、図書館に行き、本を取り出し、それが正しいものであることを願うようなものであると言えよう。比較して、本発明は、図書館に行き、図書館の全ての本を読み、一つの本が主要であること、つまり、その多数のコピーが存在すること、それが処置すべき疾患に関連すること、を見つげ出すようなものである。

20

【0021】

さらに、ライブラリーシステムの従来技術の使用は、多くの問題を有し、特に、ライブラリーで生成されたいくつかの抗体は、それらを発現する有機体の死を招く可能性があり、従って、簡単に検出することができない。これは、例えば、癌に特異的な抗体を探索する場合には特別な問題ではないが、宿主発現系(例えば、大腸菌)で生成されるものに相同的でありうる病原体からの抗原に特異的な抗体を探索する場合、重要な抗体は発現できない。例えば、大腸菌を例えばヒト交代のライブラリーを発現させるために使用すると、同じく、コドン使用法の問題、特定のアミノ酸に対してヒトで使用されるコドンは、しばしば、大腸菌または他の宿主系における同じアミノ酸に対して最適のものではないということに苦しむ。このことは、その配列中のコドンは大腸菌中では極めて非効率的であるので大腸菌中では読み通すことおよび完全に発現することが不可能であるため、重要な抗体は発現されない(あるいは少なくとも十分な量では発現されない)であろうことを意味する。ライブラリーをまず最初に配列決定しなくてはならないため、抗体ライブラリーのコドン最適化は明らかにオプションではなく、さもないとライブラリー使用の主たる長所を無効にしてしまう。本発明は患者から直接の抗体を配列決定するので、この問題を回避する。

30

40

【0022】

その関係付け工程(ii)は、クロストリジウム・ディフィシルに感染していないまたはそのワクチンを投与されていない患者での候補配列の出現に対する候補配列の出現を関連付けるものであり、非感染/ワクチン接種患者においてある配列またはそれらに対して80%の相同性を有する配列が全体として1%未満の頻度で出現する場合にのみ、その配列は候補配列であると決定される。

【0023】

微生物により生成される少なくとも一つの抗原が、当然のことながら、免疫原でありう

50

る。

【課題を解決するための手段】

【0024】

本発明は、以前には入手できなかった感染に対する抗体応答を理解するユニークな機会を提供し、かつ、新規な診断機会および治療機会を提供する。

【0025】

特に、本発明の方法は、C.ディフィシルから抗原を単離する必要を回避するので、複雑な非直鎖状のエピトープ、炭水化物を含むエピトープ、またはクリプト抗原の同定に伴う困難を回避する。代わりに、その方法は、菌により生成される1以上の抗原に特異的な抗体の同定の決定を容易にする。以下に説明するように、本発明の方法は、治療上有効な抗体の同定を可能にし、且つ、抗体配列の最も重要な部分の同定を可能にする。所与の患者のB細胞がC.ディフィシルでの感染の過程での様々な時点でサンプリングされ、患者の免疫システムが菌に対する治療上有効量の抗体が産生されることに焦点が当てられるので、抗体配列への焦点化が認められ、VHおよび/またはVL配列のCDR部分内の可変領域および非可変領域の発達が認められる。さらに、本発明の方法は、年齢、性別および人種等の特定群の患者におけるC.ディフィシル感染の処置に最も好適な交替の同定を可能とする。同様に、C.ディフィシルでの感染から回復した患者の抗体配列と感染から回復していないものとの比較により、有効ではない抗体配列（これは双方の患者により産生されうる）を同定できる。

10

【0026】

少なくとも一人の患者から単離されたB細胞は、末梢B細胞リンパ球(PBL)であることができ、また、少なくとも一人の患者からの血液試料であることができる。B細胞はまた、他のソースから単離することもでき、本発明はそれらの使用に及ぶ。例えば、B細胞は、脾臓から単離できる。

20

【0027】

抗体CDR配列は、「実験」の項に詳述したように、標準的な手法およびその最初の部分および終わりの部分の定義を用いて決定される。

【0028】

以下に詳述するように、抗体配列は、C.ディフィシル感染した患者から決定される。これらの配列は、B細胞免疫グロブリンmRNAに由来し、それ故、発現された抗体およびその中のレパートリーを反映する。本発明に従って決定された配列は、全抗体分子の配列である必要はなく、それらは、抗体結合の原因となる領域を特定するVHおよび/またはVL配列を少なくとも含む。

30

【0029】

最初の配列決定により決定されたヌクレオチド配列から、標準的アルゴリズムおよびソフトウェアパッケージを用いて、VHおよび/またはVL領域に対する推定アミノ酸配列を決定できる（例えば、www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/, the Staden package and Gap4 programs; Rodger Staden, David P Judge and James K. Bonfield. Managing Sequencing Projects in the GAP4 Environment. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach. Eds Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ 07512 (2003); Rodger Staden, David P. Judge and James K. Bonfield. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach. Eds Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ 07512 (2003)）。これらはさらに特徴づけをして、VHおよび/またはVL配列のCDR（相補性決定領域）部分、特にCDR1、CDR2およびCDR3を決定できる。推定アミノ酸配列を決定し、CDR領域を同定する方法は、周知であり、いかに詳述する。

40

【0030】

VHおよび/またはVLアミノ酸配列と同様に、いくつかの付加的な情報が関連付け工程で使用できる：

50

(i) 患者の感染の原因となる C . ディフィシルの株、
(i i) 抗体試料がサンプリングされた、感染過程での時点、
(i i i) 患者の詳細、年齢、性別、および人種の一つ以上、
(i v) 相補性決定領域 (C D R) の範囲、つまり、直接的抗原結合 / 接触を受ける抗体の可変範囲。

【 0 0 3 1 】

そこで、本発明に係る方法においては、少なくとも一人の患者が C . ディフィシルで感染している (またはワクチン接種後の) 間の複数の時点でその少なくとも一人の患者から単離されたものである B 細胞を使用でき、関連付け工程 (i i) は、B 細胞が単離されたその少なくとも一人の患者が C . ディフィシルで感染している間の時点と関連付けるものである。

10

【 0 0 3 2 】

同様に、本発明に係る方法においては、少なくとも二人の患者から単離されたものであり、そのうちの少なくとも一人が C . ディフィシルによる感染から回復したものであり、且つそのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したのではない B 細胞を使用でき、関連付け工程 (i i) は、C . ディフィシルによる感染からその少なくとも二人の患者の回復に関連付けられるものである。

【 0 0 3 3 】

同様に、本発明に係る方法においては、少なくとも二人の患者から単離されたものであり、その患者が、その少なくとも一つの抗原を生成する C . ディフィシルの株で感染した B 細胞を使用でき、関連付け工程 (i i) は、B 細胞のその配列決定された少なくとも V H および / または V L をコードする領域を関連付けして抗体に対する一連の候補配列を同定し、その各々が C . ディフィシルの異なる株により生成される少なくとも一つの共通の抗原に特異的であるか、または C . ディフィシルのその異なる株により生成される異なる抗原に特異的である。

20

【 0 0 3 4 】

V H および / または V L 領域の配列決定は、また、周囲の抗体フレームワークを同定するために用いることができ、これは、抗体のイソ型を決定するために用いることができる。次いで、これは、関連付け工程において、特定の抗体イソ型が特に有用であるか否かを決定するために用いることができる。

30

【 0 0 3 5 】

用語「治療」は、人体または動物体のすべての疾患または不調の症状を治癒、緩和、除去または減少させることあるいはそのすべての疾患または不調にかかる可能性を予防または減少させることを意図する全ての処置を意味する。

【 0 0 3 6 】

本発明は、C . ディフィシル感染を処置する上で有用な抗体配列を同定するのに好適である。

【 0 0 3 7 】

関連付け工程 (i i) において上記の追加の情報分野を使用することにより、例えば、C D R 配列のみ、所与に患者もしくは所与の感染にいずれかまたは双方からの C D R 、所与の部位または患者群からの C D R 、あるいは感染過程をとおして異なるサンプリング時間からの C D R を用いて、関連付けを行うことが容易である。

40

【 0 0 3 8 】

これらの関連付けは C D R 特異的である。その理由は、これらが抗体レパトリーの抗原結合および配列多様性の原因となる非常に可変性の領域であるからである (フレームワーク領域を同様に関連付け工程で使用して、抗体イソ型を明らかにすることができる) 。

【 0 0 3 9 】

本発明は、広範囲な用途、例えば、抗体治療、およびワクチン研究に有用である。

抗体治療 :

50

これは、非免疫個体（例えば、化学療法／放射線療法を受ける患者、臓器移植のための免疫抑制の患者、糖尿病、損傷等の潜在的な状態、また、非常に若いまたは非常に年老いていることによる免疫不全の患者）への抗体の受動移動を含む。

【 0 0 4 0 】

本発明は、感染を克服した患者において過発現 V H および / または V L 配列を探索することにより、免疫を付与する抗体の配列を決定するために使用できる。これらの保護抗体は、遺伝子レベルで再合成し、大腸菌（または他の発現系）で過発現し、精製することができる。得られる精製組換え抗体は、次いで、患者に、受動免疫療法として投与できる。抗体は、また、単に、製造すべき抗体の配列を供与するだけで、Operon Technologies Inc. USA (www.operon.com)等の商業的供給者から取り寄せることもできる。

10

【 0 0 4 1 】

治療上有効な配列は、関連付け工程 (i i) で使用できるいくつかの方法で同定することができる：

1) C . ディフィシル感染から回復した患者において抗体配列過発現を探索することによる病原体結合しうる抗体を生成する B 細胞はクローン性増殖を行い、それ故、高頻度の抗体配列は最もよく病原体に結合し、免疫を付与する。

【 0 0 4 2 】

2) C . ディフィシル感染の過程の間、抗体レパートリーにおける変更に従うことによる。感染の間、抗体は、成熟過程を経て病原体結合を改善し、これは配列変更で特徴付けられる。また、B細胞のクローン性増殖は、感染が消える感染の最終段階でより優勢となる。レパートリーにおいて最も頻度の高い抗体が、免疫療法用の候補として選択される。成熟過程のうち、候補抗体は、鍵アミノ酸残基変更が抗原結合を改善することを示し、この情報が抗体設計の改善に使用できる。

20

【 0 0 4 3 】

3) C . ディフィシル感染した異なる患者からのレパートリーの分析により、共通する同一の保護抗体を同定できる。これらの抗体は、異なる患者中でのそれらの出現がそれらに有利な強い肯定的な選択；従って、抗体ベースの免疫における重要な役割を示唆するので、免疫療法に対する魅力的な選択である。

【 0 0 4 4 】

4) C . ディフィシルの異なる株で感染した患者からのレパートリーの分析。この状況においては、共通の抗体配列が双方の株に対するレパートリー中に見出された場合、双方の菌株の処置において有用である、すなわち、広いスペクトルを示す。

30

【 0 0 4 5 】

5) 配列の親和性成熟に対するレパートリーの分析。

【 0 0 4 6 】

ワクチン研究：

ワクチン接種は、免疫系を病原体由来の抗原でプライミング (priming) することにより、感染に対して保護する。ワクチン接種は、病原体由来の抗原に、単回または繰り返し暴露することにより行われ、完全な感染過程の有害な効果なしに、抗体の成熟と B 細胞のクローン性増殖が達成される。T細胞の関与も、患者のワクチン接種を行う上で非常に重要である。本発明は、実験的 C . ディフィシルワクチンで免疫過程をモニターするために使用できる。対象者に実験的ワクチンが投与され、V H および / または V L 配列はから増殖され、抗体レパートリーは上記のように分析された。ワクチン接種過程の定性的および定量的な評価が可能である：

40

1) 実験的 C . ディフィシルワクチンを投与された患者群の V H / V L レパートリーを評価する。ワクチンに応答して得られた抗体の詳細な分子解析を行って、(a) 保護抗体のクローン性増殖、(b) 異なる集団における保護抗体の生成（例えば、異なる遺伝子の背景を持つ民族群、ならびに、例えば、年齢および性別群を変えて）および (c) ワクチンの長期間の効果、すなわち、長期間にわたる抗体応答 免疫系における長期間の抗体記憶ならびにあらゆる自己免疫異常、を決定できる。

50

【 0 0 4 7 】

2) ワクチン接種が所与の抗体の頻度を増大させる結果となった場合、抗体配列を、クローン化し、発現させ、感染の動物モデルで使用することができる。抗体が保護的である場合、それは、それ自体で免疫治療として有用であるが、これはまた、ワクチンが、ヒト対象者を実験的感染に処することなく、おそらくは保護的であることをも示している。

【 0 0 4 8 】

同じく本発明が提供するものは、少なくとも一つの抗原を生成する C . ディフィシル感染の処置用の医薬の製造方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体の一連の候補配列を同定する工程 ; および

(i i) C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的なその候補配列を含んでなる少なくとも一つの抗体を合成する工程 ;
を含んでなる方法である。

10

【 0 0 4 9 】

本発明に係る医薬および処置方法は、当業者に容易に明らかである。医薬は、薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤を用いて調製できる (Remington's: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Mack Publishing Company, Easton, PA, USA) 。 医薬および処置方法は、薬学的に有効量の抗体 / 抗原結合性フラグメントを用いて行われる。適切な用量は、当業者に容易に明らかであり、例えば、用量応答実験により容易に決定しうる。

20

【 0 0 5 0 】

同じく本発明が提供するものは、少なくとも一つの抗原を生成する C . ディフィシルによる患者の感染の処置方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体の一連の候補配列を同定する工程 ;

(i i) C . ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的なその候補配列を含んでなる少なくとも一つの抗体を合成する工程 ; および

(i i i) その少なくとも一つの合成された抗体の治療有効量をその患者に投与する工程 ;
を含んでなる方法である。

30

【 0 0 5 1 】

同じく本発明が提供するものは、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体に対する候補配列を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体の一連の候補配列を同定する工程 ; および

(i i) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程 ;
を含んでなる方法である。

【 0 0 5 2 】

同じく本発明が提供するものは、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体に対する候補配列を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、 C . ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に特異的な抗体の一連の候補配列を同定する工程 ; および

(i i) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程
を含んでなる方法である。

40

【 0 0 5 3 】

同じく本発明が提供するものは、ワクチンの有効性の決定方法であって、

(i) そのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ; ならびに

(i i) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少な

50

くとも C D R 3 領域を関連付けて、そのワクチンに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の C D R 3 候補配列の各々またはそれと少なくとも 80% の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1% の頻度で出現するものである工程；
を含んでなる方法である。

【 0 0 5 4 】

本発明のある実施態様においては、上記の工程 (i) は、

(i) (a) そのワクチンを少なくとも一人の患者に投与する工程；

(i i) (b) その少なくとも一人の患者から B 細胞を単離する工程；および

(i i i) (c) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程；
を含んでなる。

【 0 0 5 5 】

関連付け工程 (i i) は、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域を、そのワクチンでのワクチン接種が保護的免疫応答を促進することを意図された C . ディフィシルで感染された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の配列決定された少なくとも C D R 3 領域と関連付けることを含んでいてもい。

【 0 0 5 6 】

上記のように、

(i) 患者の感染の原因となる C . ディフィシルの株、

(i i) 抗体試料がサンプリングされた、感染過程での時点、

(i i i) 患者の詳細、年齢、性別、および人種の一つ以上、

(i v) 相補性決定領域 (C D R) の範囲、つまり、直接的抗原結合 / 接触を受ける抗体の可変範囲、
を包含する、いくつかの付加的な情報を関連付け工程で使用できる。

【 0 0 5 7 】

ワクチンを投与された患者から決定された抗体配列は、ワクチンが患者において保護的免疫応答を促進することを意図された C . ディフィシルで感染された患者から単離された抗体配列と比較することができる。そこで、ワクチンが、C . ディフィシルそれ自体による感染に
30 応答しても生成される抗体の発生をもたらしたか否かを決定できる。特に、その比較は、C . ディフィシルによる感染から回復した患者から決定された抗体配列を用いて行うことができる。

【 0 0 5 8 】

特に、その方法は、そのワクチンでのワクチン接種が保護的免疫応答を促進することを意図された C . ディフィシルに対する保護的免疫応答を促進することにおける、ワクチンの有効性を決定しうる。

【 0 0 5 9 】

同じく本発明が提供するものは、ワクチンの有効性を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、そのワクチンの有効性を同定する工程；および

(i i) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程

を含んでなる方法である。

【 0 0 6 0 】

同じく本発明が提供するものは、ワクチンの有効性を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 本発明に係る方法を行って、そのワクチンの有効性を同定する工程；および

(i i) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程

を含んでなる方法である。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

同じく本発明が提供するものは、患者におけるクロストリジウム・ディフィシル感染を同定する診断用試験方法であって、

(i) その患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ;

(i i) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域のその配列決定された少なくともその C D R 3 領域を、クロストリジウム・ディフィシルに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の配列と比較し、その一連の C D R 3 配列の各々またはそれと少なくとも 8 0 % の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1 % の頻度で出現するか否かを決定する工程 ; ならびに

(i i i) 比較工程 (i i) の結果を関連付けして、その患者にクロストリジウム・ディフィシル感染が存在するか否かを決定する工程 ; 10
を含んでなる方法である。

【 0 0 6 2 】

同じく本発明が提供するものは、患者のクロストリジウム・ディフィシル感染への感受性を決定する診断用試験方法であって、

(i) その患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域の少なくとも C D R 3 領域を配列決定する工程 ;

(i i) その B 細胞の V H および / または V L をコードする領域のその配列決定された少なくともその C D R 3 領域を、クロストリジウム・ディフィシルに特異的な抗体の少なくとも C D R 3 領域に対する一連の配列と比較し、その一連の C D R 3 配列の各々または 20
それと少なくとも 8 0 % の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1 % の頻度で出現するか否かを決定する工程 ; ならびに

(i i i) 比較工程 (i i) の結果を関連付けして、その患者のクロストリジウム・ディフィシル感染への感受性を決定する工程 ;
を含んでなる方法である。

【 0 0 6 3 】

診断用試験方法は、例えば病院で患者の C D R 3 配列を配列決定して、どの患者がその菌による感染に感受性であるかを決定するために使用できる。試料中に抗体特異的な C . ディフィシルが存在すれば (C D R 3 領域の配列決定により決定される)、その患者は、その菌に対する保護的免疫応答を持つことができており、抗生物質での処置が必要ではないことをおそらくは示すであろう。対照的に、C . ディフィシル特異的抗体を生成しなかったと同定された患者は、免疫不全であり、従って、C . ディフィシル感染の過程で抗生物質処置の候補者であると同定できよう。 30

【 0 0 6 4 】

同じく本発明が提供するものは、本発明に係る診断的試験方法を行うための診断用試験キットである。キットは、当業者が患者から C D R 3 配列を同定することを可能にする試薬 (例えば、P C R プライマー) を含みうる。

【 0 0 6 5 】

本発明で使用しうる抗体、特に合成抗体に関して (用語「抗体」は、文脈が他のように求めない限り、抗体の抗原結合性フラグメントを包含すると考えられる)、抗体は、抗体全体またはその抗原結合性フラグメントであり、一般に任意の免疫グロブリンのクラスに属しうる。そこで、例えば、それは I g M、I g G または I g A 抗体でありうる。抗体またはフラグメントは、動物のもの、例えば、哺乳類起源のものであってもよく、例えば、マウス、ラット、ヒツジまたはヒト起源であってもよい。それは、天然の抗体またはそのフラグメント、あるいは、所望ならば、組換え抗体フラグメント、すなわち、組換え D N A 法を用いて製造された抗体または抗体フラグメントであってもよい。 40

【 0 0 6 6 】

特定の組換え抗体または抗体フラグメントとして、(1) 少なくとも一部が異なる抗体由来のものである、抗原結合性部位を有するもの、例えば、一つの抗体の過可変性または相補性決定リョウいきが第二の異なる抗体のフレームワークにグラフトされているもの (50

例えば、EP239400号明細書に記載のもの) ; (2) 非Fv配列が他の異なる抗体の非Fv配列で置換された組換え抗体またはフラグメント(例えば、EP171496号、EP173494号およびEP194276号の各明細書に記載のもの) ; あるいは(3) 実質的に天然免疫グロブリンの構造を有する組換え抗体またはフラグメントであって、ヒンジ領域が天然免疫グロブリンで見出されるものと異なる数のシステイン残基を有するが、組換え抗体またはフラグメントの表面ポケットにおける1以上のシステイン残基が天然免疫グロブリン中に存在する他のアミノ酸残基に代わって存在するもの(例えば、WO89/01782号およびWO89/01974号の各明細書に記載のもの)が挙げられる。

【0067】

10

Harlow, E. and Lane, D. ("Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998)等のテキストの教示が、抗体、抗体フラグメント、それらの調製および使用をさらに詳述している。

【0068】

抗体または抗体フラグメントは、ポリクローナルまたはモノクローナル起源でありうる。それは、少なくとも一つのエピトープに特異的でありうる。

【0069】

抗原結合性抗体フラグメントとして、例えば、F(ab')₂、Fab'もしくはFabフラグメント等の抗原全体のタンパク質分解性開裂に由来するフラグメント、または組換えDNA法により得られるフラグメント、例えばFvフラグメントが挙げられる(例えば、WO89/02465号明細書に記載のもの)。

20

【0070】

本発明に係る組換え抗体を生成することが望まれる場合、これらは、例えば、EP171496号、EP173494号およびEP194276号の各明細書に記載の方法を使用して生成することができる。抗体フラグメントは、例えば、ペプシンまたはパインでの酵素的消化による従来手法を使用して生成することができる。

【0071】

本発明に係る抗体は、従来法を用いて、検知可能標識で標識化してもよく、またはエフェクター分子、例えば薬物、例えば抗菌剤もしくは毒素もしくは酵素とコンジュゲートしてもよく、本発明は、そのような標識化抗体または抗体コンジュゲートを包含する。

30

【0072】

本明細書中で議論した文献の各々の内容は、それらの中に引用されている文献を含めて、それらの全体が、ここに参照として取り込まれる。

【0073】

「PMID:」参照番号が付与されている場合、これらは、US National Library of Medicineによりそれらに割り当てられたPubMed識別番号であり、それから各々の刊行物に対する完全な文献情報および要旨がwww.ncbi.nlm.nih.govで入手できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0074】

本発明は、少なくとも一つの抗原に特異的な抗体に対する候補配列を同定し、ワクチンの有効性を決定する形態を、単に例として示す、添付した図面のいくつかの図を参照して、以下の記述からさらに明らかとなるであろう。

40

【0075】

実 験

以下の実験は、C.ディフィシル感染した患者に免疫を付与する抗体VHおよび/またはVLCDR配列の同定方法を詳述する。これらの配列は、次いで、合成抗体の製造に使用でき、これらの合成抗体は治療のために患者に投与するのに好適である。また、この方法で同定したVHおよびVLCDR3配列が詳述されている。

【0076】

同じく、患者における所望の免疫応答の発生におけるワクチンの有効性を決定する方法

50

が詳述されている。

【 0 0 7 7 】

他に特記しない限り、本明細書中に詳述した全ての方法は標準的な手順を用いて、適用可能な製造者の指示書に従って行われる。PCR、分子クローニング、操作と配列決定、抗体の製造、エピトープマッピングおよびミモトープ設計、細胞培養ならびにファージ提示を含む種々の手法についての標準的な手順は、McPherson, M.J.ら、(1991, PCR: A practical approach, Oxford University Press, Oxford), Sambrook, J.およびRussell, D., ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York), HuynhおよびDavis (1985, "DNA Cloning Vol I - A Practical Approach", IRL Press, Oxford, Ed. D.M. Glover), Sanger, F.ら、(1977, PNAS USA 74(12): 5463-5467), Harlow, E.およびLane, D. ("Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998), Jung, G.およびBeck-Sickinger, A.G. (1992, Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 31: 367-486), Harris, M.A.およびRae, I.F. ("General Techniques of Cell Culture", 1997, Cambridge University Press, ISBN 0521 5736 45), "Phage Display of Peptide and Proteins: A Laboratory Manual" (Eds. Kay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J., Academic Press Inc., 1996, ISBN 0-12-402380-0)。

【 0 0 7 8 】

他のもののうち、本明細書中で詳述された方法中で有用な試薬および装置は、Amersham (www.amersham.co.uk), Boehringer Mannheim (www.boehringer-ingenelheim.com), Clontech (www.clontech.com), Genosys (www.genosys.com), Millipore (www.millipore.com), Novagen (www.novagen.com), Perkin Elmer (www.perkinelmer.com), Pharmacia (www.pharmacia.com), Promega (www.promega.com), Qiagen (www.qiagen.com), Sigma (www.sigma-aldrich.com)およびStratagene (www.stratagene.com)のようなものから入手できる。

【 0 0 7 9 】

種々の文法的形態の用語「抗体」は、本明細書中で、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、つまり、抗体結合部位またはパラトープを含む分子を指すように使用される。そのような分子は、また、免疫グロブリン分子の「抗原結合フラグメント」と称される。

【 0 0 8 0 】

例示的な抗体分子は、完全な免疫グロブリン分子、実質的に完全な免疫グロブリン分子およびFab、Fab'、F(ab')₂、scFvおよびF(v)としてこの分野で公知のそれらの部分を包含する、パラトープを含む免疫グロブリン分子のそれらの部分である。

【 0 0 8 1 】

用語「抗体結合部位」は、抗原に特異的に結合する(免疫反応する)重鎖および軽鎖可変性および過可変性領域からなる抗体分子の構造的部分を指す。

【 0 0 8 2 】

抗体を生成するB細胞の同定および配列決定ならびに得られたデータの分析は、以下の基本的な工程を含む：

- (1) ヒト患者のB細胞からのVHおよび/またはVLをコードする領域の単離。
- (2) VHおよび/またはVLレパートリーのヌクレオチド配列の決定。
- (3) VHおよび/またはVL一次アミノ酸配列の決定。
- (4) コンピュータ内でのCDR領域の抽出 データベースへの加入。
- (5) VHおよび/またはVLレパートリーにおける優位なCDRおよびフレームワークの検出。
- (6) 優位な抗体配列からの治療用組換え抗体の構築および製造。

【 0 0 8 3 】

1. ヒト患者のB細胞からのVHおよび/またはVLをコードする領域の単離
この方法のために、C. ディフィシル感染したヒト患者を免疫されたB細胞のドナーと

して選択した。選択の基準は：

(a) 患者は、例えばウエスタンブロッティングにより検出可能な、C. ディフィシルに対する明白な抗体応答を示す必要がある。抗体の試料は、患者の血液試料から採集された。試料を希釈し、C. ディフィシル由来の抗原を使用して、ウエスタンブロッティングにより免疫反応について試験した。そのようなアッセイにおいて、強い抗体応答を示す患者は、抗ヒトポリクローナル検出抗体を用いて検出されるような、C. ディフィシル抗原の明白な認識/抗体結合を示す。

(b) 患者は、C. ディフィシル感染の過程で生存し、これは、細菌を中和しうる抗体に対するB細胞応答を発生する機会を改善する。

【0084】

末梢B細胞リンパ球(PBL)を感染した患者血液試料から採集した。このヘパリン化した血液を、PBS(全部で20ml)中で希釈し、30mlの遠心管中で15ml Fico I Hypaque (Pharmacia; 特記しない限り、全ての薬品および培地はSigma, UKから購入した)のクッション上に載せた。次いで、PBLを遠心分離(400×g、5分)で収集し、PBS中で洗浄し、再び遠心分離して取得した。RNAは、製造者の指示書どおりに従って、QuikPrep mRNA精製キット(Pharmacia)を使用して、PBLから調製した。単離されたmRNAは、逆転写反応を経て、cDNAを調製するために使用した(Promega cDNA合成キット)。これについて、2μgのmRNAを16μLのヌクレアーゼを含まない水中に再懸濁し、65℃に3分間加熱し(二次構造を変性し)、次いで、直ちに、氷上で1分間冷却した。mRNAは、次いで、以下の混合物に加えた：8μLの25mM MgCl₂、4μLのdNTP混合物(各リボヌクレオチド三リン酸に関して10mM)、1μLのRNasin 40uμL⁻¹の原液、1.2μLのAMV逆転写酵素(25uμL⁻¹の原液)、6μLのcDNA 10pmolμL⁻¹のプライマー(図1-cDNA合成を参照)。

【0085】

抗原結合領域をコードするDNAは、次いで、患者のPBLから調製したcDNAを用いて、PCRにより増幅した。これのために、cDNAを以下のPCR反応で使用し、重鎖または軽鎖由来の抗体可変領域DNAを生成した(図1参照)：2.5μLのcDNA、33μLの水、4μLのdNTP混合物(各デオキシヌクレオチド三リン酸に関して25mM)、5μLのTaq反応緩衝液(Perkin Elmer)、2.5μLの等モルプライマー混合物(各プライマーに関して最終濃度20pmol)、および0.5μLのTaq DNAポリメラーゼ(1uμL⁻¹、Perkin Elmer Corp)。これらの反応で使用したフォワードおよびリバースプライマーは図1に記載されており、それらの各々のヌクレオチド配列は表1にリストされている。PCR反応条件は、94℃で1分、57℃で1分、且つ72℃で2分で、全体として30サイクルであり、サイクル1の前に延長された変性(94℃で5分)およびサイクル30の後に付加的な延長工程(72℃で10分)を伴う。PCRは、Perkin Elmer 9700 GeneAmp PCR機を使用して行った。5μLのPCR反応物を1%アガロースゲル上で流し、予期された393塩基対(bp)生成物の増幅をチェックした。残りの生成物を0.8%低融点(LMP)アガロースゲル上で流し、393バンドを清潔な外科用メスを用いて切り取った。DNAを、GeneClean II Kit (Anachem, Luton, UK)を用いて、アガロースゲルスライスから抽出した。

【0086】

PCRは、使用したPCRプライマーセットに応じて、二つのフラグメント型 各々VHおよびVL領域由来のものを与えた(抗体遺伝子用のプライマーセットおよびPCRスキームの詳細については、それぞれ、表1および図1参照)。

表1：VHおよびVL遺伝子フラグメントの発生および配列決定で使用されるプライマー。全ての配列は、5'から3'方向に与えられる。プライマーの使用は、上におよび図1に記載されている。

【0087】

10

20

30

40

【表 1】

cDNA合成反応で使用したプライマー		配列番号:
HuIgG1-4FOR	GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT	01
HuCLFOR	AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT	02
一次PCR用のプライマー		配列番号:
HuJH1-2FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC	03
HuJH3FOR	TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC	04
HuJH4-5FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	05
HuJH6FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC	06
HuVH1aBACK	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG	07
HuVH2bBACK	CAG GTG AAC TTA AGG GAG TCT GG	08
HuVH3aBACK	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG	09
HuVH4aBACK	CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG	10
HuVH4bBACK	CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG	11
HuVH5aBACK	GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC	12
HuVH6aBACK	CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG	13
HuJK1FOR	ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC	14
HuJK2FOR	ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC	15
HuJK3FOR	ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC	16
HuJK4FOR	ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC	17
HuJK5FOR	ACG TTT ATT CTC CAG TCG TGT CCC	18
HuVK1BACK	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC	19
HuVK2BACK	GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC	20
HuVK3BACK	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC	21
HuVK4BACK	GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC	22
HuVK5BACK	GAA ACT ACA CTC ACG CAG TCT CC	23
HuVK6BACK	GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC	24
DNA配列決定用のプライマー		
M13forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT	25
M13reverse	AAC AGC TAT GAC CAT G	26

10

20

30

【0088】

VHおよび/またはVL遺伝子フラグメントは、クローニングベクター pGEM-T easy (Promega Corporation) にクローニングされて、DNA配列決定を容易にする。これのために、3 μ L のPCR生成物が、製造者の指示書に従って、QIA quick PCR精製スピナラム (Qiagen, UK) を用いて、制限のために調製した。DNAは、40 μ L の緩衝液EB中でスピナラムから溶出した。精製したPCR生成物(2 μ L)を1 μ L のpGEM-T easyベクター、6 μ L の水および1 μ L のDNAリガーゼと混合し、混合物を室温で1時間連結した。次いで、連結は、エレクトロポレーションにより、エレクトロコンピテントな大腸菌TG1細胞 (Stratagene) に変換し、アンピシリン100 μ g/ml -1IPTG (100 μ M) とX-gal (0.006% w/v) を含有する寒天プレート上にプレートアウトした。コロニーを37 $^{\circ}$ Cで一晩生育させ、次いで、4 $^{\circ}$ Cで保存した。組換えコロニーは、この培地上で白色コロニーとして同定される。

40

【0089】

2. VHおよび/またはVLレポーターのヌクレオチド配列の決定

DNAをまず、VHおよび/またはVL組換え大腸菌クローンから調製した。これのために、個々のコロニーを、各々、96穴プレートフォーマットを用いて、アンピシリン100 μ g/ml⁻¹を追加した1.2mlのLBプロスに移した。培養物は、37 $^{\circ}$ Cで24時間生育させた。細菌細胞を、4,000 \times gで30分の遠心分離により取得し、上澄み液を捨てた。プラスミドDNAを、実質的に製造者の指示書に従って、Wizard SV 96プラス

50

ミド精製キット (Promega Corporation) を用いて調製した。プラスミド DNA の収率は、典型的には、1.2 ml のスターター培地あたり 5 µg であった。

【0090】

DNA 配列決定反応は、DYEnamic ET 染料ターミネーターサイクル配列決定キット (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。精製プラスミド DNA (0.5 µg) を、8 µL の DYEnamic ET ターミネーター試薬プレミックスおよび 1 µL の M13 フォワードおよびリバースプライマー (5 µM) と、20 µL の合計反応用量で混合した。次いで、熱サイクリングを、以下のパラメーターで、GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer) を用いて行った：95 で 20 秒；50 で 15 秒；60 で 1 分；30 サイクル)。反応を、96 穴フォーマット非スカーテッド ELISA プレート (AB Gene) を用いて行った。取り込まれなかった染料ターミネーターを、析出を用いて除去した。これのために、エタノール試料を、2 µL の 7.5 M 酢酸アンモニウムおよび 55 µL の 100% エタノールと混合し、3000 g で 30 分間遠心分離した。DNA ペレットを 70% エタノールで洗浄し、20 µL のローディング溶液中に再懸濁した。反応物を、製造者の指示書に従って、MegaBACE 100 DNA シーケンサー (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて配列決定した (6 kV で 200 分の電気泳動と共に、2 kV 注入電圧で 30 秒)。クロマトグラムを、終了および保管のために、.scf ファイルフォーマットを用いて、エクスポートした。

10

【0091】

3. VH および / または VL 一次アミノ酸配列の決定

VH および / または VL の DNA 配列を、フォワードおよびリバースストランドの双方において決定し (M13 フォワードおよびリバースプライマーを用いて)、相違点を際立たせ、高度の正確さを維持するために、比較した。これは、Staden プログラム一式 (Staden, R. (1996) The Staden Sequence Analysis Package. Molecular Biotechnology 5, 233-241) を用いて行った。最初に、配列 .scf ファイルをベクター配列が取り除かれ、配列の質が評価される、PREGAP プログラムに入れた。DNA 配列が不明瞭である悪い品質の配列は排斥され、再度配列決定された。フォワードおよびリバースストランドは、GAP プログラムを用いてマッチングされ、配列決定されたものを含む領域を際立たせ、解明した。VH および / または VL 配列のオリエンテーションが注目され、翻訳用にフォワードリーディングフレームオリエンテーションのみの生成が必要である場合に、逆補完された。VH および VL 遺伝子配列が、次いで、アミノ酸配列に翻訳された。各配列には、一意の識別名 (名称) が与えられた。

20

30

【0092】

4. コンピュータ内での CDR 領域の抽出 データベースへの加入

CDR 領域を同定する一般的な教示は、www.bioinf.org.uk/abs/ にある。

【0093】

以下のルールのセットが、抗体配列における CDR の定義を可能にする。これらの実質的に一定の特徴が出現しないまれな例が存在する (例えば、ヒト重鎖配列 EU は、CDR - H3 の後に、Trp-Gly を持たない)。Cys 残基が最もよく保存された特徴である。

CDR - L1

開始 ほぼ残基 24

前の残基 常に Cys

後の残基 常に Trp。典型的には、Trp-Tyr-Gln、ただし、また、Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、

Trp-Tyr-Leu

長さ 10 ~ 17 残基

CDR - L2

開始 CDR - L1 の末尾の後の、常に 16 残基

前の残基 一般に、Ile-Tyr、ただし、また、Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Phe

長さ 常に 7 残基

CDR - L3

40

50

開始 ほぼ残基 3 3
 前の残基 常にCys
 後の残基 常にPhe-Gly-Xaa-Gly (配列番号 9 2)
 長さ 7 ~ 1 1 残基
 C D R - H 1
 開始 ほぼ残基 2 6 (常に、Cysの 4 つあと)
 前の残基 常にCys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号 9 3)
 後の残基 常にTrp。典型的には、Trp-Val、ただし、また、Trp-Ile、Trp-Ala
 長さ 1 0 ~ 1 2 残基

10

C D R - H 2
 開始 C D R - H 1 の末尾の後の、常に 1 5 残基
 前の残基 典型的には、Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (配列番号 9 4)、ただし、いくつかの
 変形物
 後の残基 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala
 長さ 1 6 ~ 1 9 残基

C D R - H 3
 開始 C D R - H 2 の末尾の後の、常に 3 3 残基 (常に、Cysの 2 つあと)
 前の残基 常にCys-Xaa-Xaa (典型的には、Cys-Ala-Arg)
 後の残基 常にTrp-Gly-Xaa-Gly (配列番号 9 5)
 長さ 3 ~ 2 5 残基

20

【 0 0 9 4 】

5 . V H および / または V L レパートリーにおける優位な C D R およびフレームワークの検出

データベースは、SQL Server Databaseソフトウェア (Microsoft) を用いて構築した。これは、SQLを用いてクエリーを行うデータベースを可能にし、また、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を、F A S T A フォーマットにおいてデータベース V H および / または V L 配列の任意の範囲から抽出することを可能とした。抽出された C D R は、次いで、同一または非常に類似の C D R をブロックと一緒にグループ化するような方法で、CLUSTAL Xを用いて、多重整列に付した (Thompson, J.D., Higgins, D.G. および Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680)。これから、繰り返し出現する C D R の頻度を決定し、免疫グロブリンレパートリー中の C D R 優位性を確立した。あるいは、グラフィカル・インターフェースを、Pribiosys (proBionic EMEA, Amsterdam) を用いて、使用した。ProBiosysは、CLUSTAL.phyファイルから系統図を作成し、多数の整列した配列の中で、関係の迅速な視覚的解釈を可能とする。全過程は、データベースエントリーに加えられた検索および追加の情報に応じて、病気中の異なる時点でサンプリングされた同一の患者からの C D R について、異なる感染症の患者からの C D R について、あるいは性が一致した、年齢が一致した、または人種が一致した患者群からのものについて行われた。

30

40

【 0 0 9 5 】

6 . 優位な抗体配列からの治療用組換え抗体の構築および製造

優位な抗体配列が所与のレパートリー中で認められると、その情報を、免疫を付与する C D R およびフレームワークの存在を推論するのに用いることができる。選択された V H および / または V L 配列を同定でき、その遺伝子配列は、合成オリゴヌクレオチドを用いて再合成できる。それはまた、タンパク質発現を改善するために、ヒト由来遺伝子配列を大腸菌用にコドン最適化することを可能にするので、このことは重要である。優位な V H および / または V L 配列は、スパーサー (リンカー) 配列を用いて、一緒にスプライシングできる (図 2)。scFv と称するこの遺伝子カセットは、発現ベクター p E T 2 9 b (Novagen) 中に、末端 N d e I および N o t I 制限部位を含むように、再合成できる。ScF

50

vDNAは、NdeI (VHで切断)またはNotI (VLで切断)で、以下の反応を用いて切断できる：40 µLのDNA (4 µg)、10 µLの制限酵素緩衝液D (Promega)、47 µLの水および2 µLのNdeIおよびNotI酵素 (10 u µl⁻¹; Promega); 37 °Cで4時間消化。次いで、DNAを0.7%アガロースTAEゲル上で分画でき、消化されたDNAをゲルから切り出し、製造者の指示書に完全に従って、GeneClean IIキット (Bio 101)を用いて、アガローススライスから精製できる。pET29bベクターDNAは、上記のように、NdeIおよびNotIで切断できる。1 µgのベクターを、8.5 µLの水に再懸濁した1 µgの制限されたVL DNAと混合し、1 µLの10x連結緩衝液 (Boehringer Mannheim) および0.5 µLのDNAリガーゼ (3 u µl⁻¹; Boehringer Mannheim) を添加して連結でき、引き続き、14 °Cで一晩連結反応を行う。

10

【0096】

全連結反応物を、電気ポレーションにより、大腸菌TG2細胞 (Stratagene, UK) に形質転換できる。形質転換体は、テトラサイクリン (25 µg ml⁻¹ - TG2染色体上のrecA::Tn10に選択的) およびカナマイシン (50 µg ml⁻¹ - pET29に選択的) を含む寒天プレート上でプレートアウトできる。個々のクローンから調製された組換えプラスミドDNAは、上記のように、NdeIおよびNotIで消化することにより、scFv配列についてチェックできる。

【0097】

組換えscFvは、大腸菌JM109 (DE3) 中で過発現して精製でき、従って、生化学的および生物学的な特徴づけが可能となる。組換え体は、50 µg ml⁻¹のカナマイシンを追加したLBプレート上に播くことができ、単一コロニーを用いて、50 µg ml⁻¹のカナマイシンを有するLBプロスの10 µLのスターター培地に接種できる。これのために、1 Lの発現培養物を、カナマイシンの存在下に、300 rpmで振盪しながら、37 °Cで4~5時間かけて調製できる。OD₆₀₀ = 1において、IPTGを用いて誘導を行うことができ、細胞は、激しく攪拌しながら、さらに3~5時間増殖させることができる。次いで、細胞を遠心分離 (4000 x g、15分、4 °C) により、取得できる。細胞ペレットを10 mlの新鮮な (4 °C) 溶解緩衝液 (下記) に再懸濁し、25 ml X-プレスシステム (AB Biox) を用いて細胞破壊をする前に、-20 °Cで一晩保存できる。

20

溶解緩衝液

50 nM トリスHCl pH 8.0
1 mM EDTA
100 mM KCl
0.1 mM AEBSF (アミノエチルベンゼンスルホン酸)

30

【0098】

溶解物は、オークリッジ管中で遠心分離できる (24300 x g、4 °C、30分)。ペレットを、Silversonラボブレンダーを用いて、氷上で20 mlの氷冷溶解緩衝液に再懸濁できる。溶解物を、8個のオークリッジ管に分け、各々のアリコート氷冷溶解緩衝液中30 ml (合計120 ml) に希釈できる。包接体をペレット化でき (24300 x g、4 °C、30分)、上澄み液を捨てる。各々の8ペレットを30 mlの溶解緩衝液に再懸濁し、包接体再度遠心分離 (24300 x g、4 °C、30分) することにより取得できる。この洗浄/遠心分離工程は、合計5回行って、包接体画分を精製できる。各ペレットは、15 mlの氷冷水に再懸濁でき、包接体は-20 °Cで保存できる。

40

【0099】

リフォールディングのために、50 mM トリスHCl pH 9.0中の2% (w/v) N-ラウリルザルコシン (NLS) の200 ml溶液は、次のようにして調製できる。4 g NLSを100 mlの水に攪拌しながら溶解させる。10 mlの1 M トリス pH 9.0原液を加えて、水で195 mlにする。5 mlの包接体スラリーを加えて、室温で30分間、激しく攪拌する。

【0100】

CuCl₂を100 µMの濃度に加える。これは、酸化用触媒として働く。リフォール

50

ディング反応物は、 $0.44 \mu\text{M}$ vaccupボトルトップフィルターユニット（90 mm 径、Gellman Science）を通して真空濾過でき、ろ液を、PLGC10膜を取り付けたPellicon Labscale TFFシステム（Millipore）に移す。反応物を、タンジェンシャルフローを用いて、25 ml に濃縮でき、透過物を捨てる（scFvは残留物に局在する）。溶液は、10 mM 酢酸アンモニウム（AAT）pH 9.0 の40 x ターンオーバー容量（1 L）に対してダイアフィルトレーションできる。最後に、抗体の容積を、10 mM AAT pH 9.0 を用いて、50 ml に希釈できる。典型的なタンパク質含有量は、1 リットルあたり50 mg までの収量で、 $1 \sim 2 \text{ mg ml}^{-1}$ であった。

【0101】

scFv精製のために、10 ml ベッド容量のNiNTAスーパーフローアガロースQiageenを、フローアダプターなしに、10 ml のガラスカラム（Sigma）を用いて、製造者の指示書に従って、調製できる。カラムは、50 ml 緩衝液B（6 M 尿素、0.1 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、10 mM トリスHCl pH 8.0）で平衡化できる。リフォールディングされたscFv（上記のとおり）は、緩衝液B中で1/5に希釈でき、カラムに直接、ml/minで適用できる。50 ml の緩衝液Bを、カラムに適用でき（流速5 ml/min）、続いて、緩衝液C（緩衝液Bと同じ組成ながら、pH 6.3）を適用できる。精製したscFvは、250 mM 高純度イミダゾールを追加した緩衝液Bを $A_{280} < 0.05$ まで適用することによりカラムから溶出できる。

【0102】

結果

C. ディフィシルに感染した患者から単離された末梢血リンパ球（PBL）からの抗体遺伝子の可変性重鎖（VH）および可変性軽鎖が、TAKローン化され、配列決定されている。各々の場合において、第三の相補性決定領域（すなわち、CDR-H3またはCDR-L3）が同定された。この領域は、双方とも、VH鎖の最も可変性の領域であり、その領域は、抗原結合を決定する上で最も重要なものとして同定されている。この理由で、この領域は各々のVH鎖に対する特徴部分として使用される。

【0103】

臨床情報

患者D01 可変性重鎖（VH）および可変性軽鎖（VL）は、CDADの発症後10日で作られたPBLから配列決定された。Lab結果は、C. ディフィシル毒素が存在したことを確認した。

患者D02 VHおよびVLは、CDADの発症後10日で作られたPBLから配列決定された。Lab結果は、C. ディフィシル毒素が存在したことを確認した。試料を採った後の引き続く7週において、患者はそれ以上のC. ディフィシル感染を進展させず、感染に应答して生成した抗体が保護的であったことを示唆している。

患者D03 VHおよびVLは、CDADの発症後10日で作られたPBLから配列決定された。Lab結果は、C. ディフィシル毒素が存在したことを確認した。試料を採った後の引き続く3週において、患者はそれ以上のC. ディフィシル感染を進展させず、感染に应答して生成した抗体が保護的であったことを示唆している。

【0104】

配列決定結果

患者D01は、VHとVLの双方で高度の収束（focussing）を示した。三つの異なるCDR3配列が、配列決定されたVHの80%超を構成する。配列番号27のCDR3配列を有するVHが、この患者からの配列決定されたVHの57.8%を占める。配列番号28のCDR3配列を有するVHが、全てのVHの13.5%を占め、配列番号29のCDR3配列を有するVHが、この患者中の全ての配列決定されたVHの10%を占める。三つの異なるCDR3配列が、同じく、配列決定されたVLの多数を構成し、これらは、配列番号32、34および33のCDR3配列である（それぞれ、32.7%、15.3%および6.6%の頻度で出現）。

【0105】

10

20

30

40

50

類似性検索が、データベース（F A B T E Cデータベース）内に含まれる他のV Hおよび/またはV L配列に対して、これらの共通V Hおよび/またはV L配列を用いて行われた。そのデータベースは、メチシリン抵抗性スタフィロコッカス・オウレウス（M R S A）、カンジダ・アルビカンス、シュードモナス・アエルギノーザ（嚢胞性線維症の原因菌）、ストレプトコッカス・オラリスおよびバンコマイシン抵抗性エンテロコッカス（V R E）に感染した患者から単離されたP B LのV Hおよび/またはV Lを含む。その感染症に対する抵抗性に関係し、且つ、それ故、それらの感染症に対する治療を行うために使用できる抗体配列を同定するために、その類似性検索を行った。これらの配列は、W O O 1 / 7 6 6 2 7号明細書に基づいて作成されている。これらの全てに対して、単離されたV Hおよび/またはV L配列は、感染の過程をとおして、抗体レパートリーのスキューイング(skewing)を示し、従って、成熟した、免疫を付与するVHおよび/またはVL配列の正体を明らかにしている。これは、典型的には、各V Hおよび/またはV Lに対して、5, 0 0 0 ~ 1 5, 0 0 0配列を用いて行われている。健康な個体からのV Hおよび/またはV Lレパートリーもまた、比較の目的で、用いることができる。

10

【0106】

B L O S U M 5 0マトリックスを用いて、70%より大きい類似性を有するC D R 3を持つ抗体の群をピックアップすることが可能であった。配列番号27および28のC D R 3配列（それぞれ、表2および表3）は、C・ディフィシルに感染した患者からの他のV Hとのみ、70%より大きい配列類似性を示した。他の感染症（C・アルビカンス、M R S AおよびV R E）を有する個体からのV H配列は、類似のC D R 3配列を示さなかった。

20

【0107】

以下の表において、Dで始まるライブラリーは、C・ディフィシルに感染した患者由来のものであり、Mで始まるライブラリーは、M R S Aに感染した患者由来のものであり、Vで始まるライブラリーは、V R Eに感染した患者由来のものであり、また、Cで始まるライブラリーは、C・アルビカンスに感染した患者由来のものである。

【0108】

【表2】

CDR3配列番号：	類似性	ライブラリー	クローンの数
27	100.0	D01	184
27	100.0	D03	5
35	100.0	D01	1
36	100.0	D01	3
37	100.0	D01	1
37	100.0	D03	1
38	93.75	D01	1

30

40

【0109】

【表 3】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
28	100.0	D01	43
28	100.0	D03	1
39	100.0	D01	1
40	88.88	D01	1

10

配列番号 29 の CDR3 配列を持つ VH は、他の C. ディフィシルに感染した患者および MRSA に感染した患者からの VH と類似性を示した (表 4)。

【0110】

【表 4】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
41	100.0	D01	1
29	100.0	D01	32
29	100.0	M01	1
29	100.0	M02	5
29	100.0	M03	2
29	100.0	M04	8
42	100.0	M03	1
43	100.0	D01	1
44	93.75	D01	1
45	93.75	D01	1
46	75.0	M04	1
47	70.58	M05	1

20

30

【0111】

患者 D01 の VL からの CDR3 は、また、それらについて類似性探索が行われた。配列番号 32 および 33 を持つ VL (それぞれ、表 5 および表 6) は、C. ディフィシルに感染した患者からの CDR3 配列と高度の相同性を示すが、異なる臨床的感染症の患者由来の CDR3 には相同性を示さない。配列番号 34 の CDR3 配列を持つ VL は、C. ディフィシル、MRSA および VRE に感染した患者から単離された VL と類似性を示した (表 7)。

40

【0112】

【表 5】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
32	100.0	D51	64
48	90.9	D52	2
49	90.9	D52	1
50	90.9	D52	1
51	90.0	D51	1
52	90.0	D52	1
53	81.8	D52	1
54	81.8	D52	1
55	81.8	D52	2
56	81.8	D52	1
57	80.0	D52	1
58	72.7	D52	1

10

20

【 0 1 1 3 】

【表 6】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
33	100.0	D51	13
59	90.9	D52	1
60	83.3	D52	1
61	81.8	D52	4
62	81.8	D52	1
63	81.8	D52	1
64	81.8	D52	1
65	81.8	D51	1
66	81.8	D52	1
67	81.8	D52	1
68	72.7	D52	1
69	72.7	D52	1

30

40

【 0 1 1 4 】

50

【表 7】

CDR3 配列番号：	類似性	ライブラリー	クローンの数
34	100.0	D51	30
34	100.0	M56	2
34	100.0	V54	2
70	88.9	D51	1
71	88.9	D51	1
72	88.9	V54	2
73	77.9	M55	1
74	77.9	D51	1
75	77.9	M55	1
76	77.9	M55	1

10

20

【0115】

患者 D02 は、同じく、VH レパートリーで高度の収束を示しが、VL レパートリーでは収束はそれほど明確ではなかった。二つのタイプが、この患者の VH ライブラリー中で優位である。配列番号 30 の CDR3 配列を有する VH が、配列決定されたクローンの 45.6% を占め、配列番号 31 の CDR3 配列を有するものが、そのライブラリーの 8.8% を占める。VL ライブラリーにおいては、配列番号 61、96 および 97 の CDR3 配列を有する最も高頻度に単離される三つのクローンが、それぞれ、4%、4% および 4% の頻度で見出された。

【0116】

FABTEC データベースにおける類似性検索は、二つの共通の VH CDR3 配列が C. ディフィシル患者に特異的であることを示した(表 8 および表 9)。配列番号 30 の CDR3 配列を有する VH は、そのライブラリー中の他の抗体およびライブラリー D03 からの抗体と適合した(表 8)。配列番号 31 の CDR3 配列を有する VH は、ライブラリー D03 からの抗体と適合した(表 9)。

30

【0117】

【表 8】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
77	100.0	D02	1
78	100.0	D02	1
30	100.0	D02	52
30	100.0	D03	1
79	100.0	D02	1
79	100.0	D03	1
80	94.4	D02	1
81	94.4	D02	1
82	94.4	D02	1
83	88.8	D02	1
84	77.7	D03	1

10

20

【0118】

【表 9】

CDR3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
31	100.0	D02	10
31	100.0	D03	4
85	90.0	D03	1
86	90.0	D03	1

30

【0119】

VLのいくつかを用いる類似性検索は、配列のクラスター化を示した。患者D02からのVLの15% (ライブラリーD52) は、配列番号48のCDR3配列との高度の類似性を示し、患者D01からのVL (ライブラリーD51) も、この配列との高度の類似性を示した (表10)。同様に、配列番号61のまわりのクラスターは、患者D02の配列決定されたVLの13%を占め、再び、これに類似のクローンが、また、患者D01中に見出される (表11)。これらのクローンのいずれもが、他の病原体に感染した患者から単離されたVL CDR3配列と全く類似性を示さない。BLOSUM50マトリックスを用いると、これら二つのクローンは、互いに、60%より大きい類似性を示すことが特記される。

40

【0120】

【表 1 0】

CDR 3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
48	100.0	D52	2
49	100.0	D52	1
53	100.0	D52	1
32	90.9	D51	64
87	81.8	D52	2
51	81.8	D51	1
88	81.8	D52	1
57	72.7	D52	1
89	72.7	D52	1
50	72.7	D52	1
54	72.7	D52	1
55	72.7	D52	2

10

20

【 0 1 2 1】

【表 1 1】

CDR 3 配列番号 :	類似性	ライブラリー	クローンの数
61	100.0	D52	4
65	100.0	D51	1
59	81.8	D52	1
33	81.8	D51	13
62	81.8	D52	1
63	81.8	D52	1
60	75.0	D52	1
64	72.7	D52	1
66	72.7	D52	1
68	72.7	D52	1
67	72.7	D52	1

30

40

【 0 1 2 2】

患者 D 0 3 では、V H について予備的な結果しか得られていないが、D 0 1 および D 0 50

2の双方と多くの類似の配列が示されており、報告する価値がある。49のVH配列からのデータのみが得られている。クローンの10%が配列番号27のCDR3配列を有しており、これは、患者D01中で最も共通な配列である。VHの8%が配列番号31のCDR3配列を有しており、これは、患者D02中で最も共通な配列である。VHのCDR3配列のライブラリー間比較(表12)は、1より多いC.ディフィシルに感染した患者中で出現する8つのCDR3配列を示した。配列番号27、28および37のCDR3配列は、患者D01およびD03において出現し、配列番号31、90、91、79および30のすべてのCDR3配列は、患者D02およびD03において出現する。これまでのところ、患者D01とD02は、共通のCDR3配列を全く示さない。VLは患者D01とD02からのみ配列決定されており、これらの患者は、同一のCDR3配列を全く分け合っていない。

10

【0123】

【表12】

VH CDR3 配列番号 :	患者
27	D01 and D03
28	D01 and D03
37	D01 and D03
31	D02 and D03
90	D02 and D03
91	D02 and D03
79	D02 and D03
30	D02 and D03

20

【0124】

30

まとめ

C.ディフィシルに感染した患者中に多数の特定のVH CDR3配列が存在することは、scFvの一部としてのVHが有機体に対して保護的であることを示している。一人より多い患者により分け合われているCDR3配列は、特異的なC.ディフィシル配列を示す。患者内でしばしば体細胞変異により高度の相同性を持つ配列は、類似のただし微妙に異なる性質を持つ重要な配列を示していることも特記される。これらの個体からのVHのCDR3配列は、17個の潜在的に保護的なVHの同定に導いた。これらのVH CDR3配列は、配列番号30、79、28、91、41、39、38、27、36、36、40、37、90、29、44、45および43に対応する。

【0125】

40

VLの同様の解析により、44個の異なるVH CDR3配列が同定された。数が多いのは、少し異なる配列を有するVLに導く、抗体軽鎖での体細胞変異の割合が増加しているためである。これらのVL CDR3配列は、配列番号59、60、61、33、62、63、64、65、66、77、84、78、30、79、80、81、82、87、57、74、85、31、86、82、51、48、88、49、53、32、52、70、71、34、89、68、67、50、54、55、56、59、58、96および97に対応する。

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】B細胞からのVHおよび/またはVL抗体遺伝子フラグメントの単離およびDN 50

A 配列決定に対する一般原理を示す。参照番号 10 は一次 PCR を示し、参照番号 20 は T ティリング原理 - ランダムオリエンテーションを用いる DNA 配列決定ベクターへのクローニングを示し、参照番号 30 は、M13 フォワードおよびリバースプライマーを用いるフォワードおよびリバースストランドのヌクレオチド配列の決定を示す。

【図 2】再合成組換え抗体遺伝子カセットの図を示す。VH および VL 領域は、グリセリン - セリンに富んだリンカーで結合している。各々の可変ドメインは、抗原結合に關与する三つの相補性決定領域 (CDR) を含んでいる。

【配列表】

[2007527370000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 12 月 21 日 (2005.12.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR - H3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 32、および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR - L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR - H3 配列ならびに配列番号 32 および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR - L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

感染中にクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) により生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の候補配列の同定方法であって、

(i) クロストリジウム・ディフィシルに感染したまたはそのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の少なくとも CDR3 領域を配列決定する工程 ; ならびに

(ii) その少なくとも一人の患者からのその B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の配列決定された少なくとも CDR3 領域を関連付けて、クロストリジウム・ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の候補 CDR3 配列の各々またはそれと少なくとも 80% の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1% の頻度で出現する工程 ; を含んでなる方法。

【請求項 5】

その B 細胞が末梢 B 細胞リンパ球および脾臓からの B 細胞よりなる群から選択されるものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

その末梢 B 細胞リンパ球がその少なくとも一人の患者からの血液から単離されたものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

その少なくとも一つの抗原が免疫原である、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染に应答する顕著な抗体应答を示す、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復した人である、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

その関係付け工程 (i i) が、その配列決定された少なくとも V H および / または V L C D R 3 領域からの推定アミノ酸配列を決定し、その推定アミノ酸配列を関係付けることを含んでなる、請求項 4 ~ 9 にいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

その関係付け工程 (i i) が、その少なくとも V H および / または V L 領域に含まれる相補性決定領域を同定し、その相補性決定領域を関係付けることを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

その相補性決定領域が C D R 1、C D R 2 および C D R 3 よりなる群から選択されるものである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

その関係付け工程 (i i) が、その少なくとも一人の患者に感染するクロストリジウム・ディフィシルの株、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間にその B 細胞が単離される時点、その少なくとも一人の患者の年齢、その少なくとも一人の患者の性別、およびその少なくとも一人の患者の人種よりなる群の少なくとも一つとさらに関係付ける、請求項 4 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

その B 細胞が、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間に複数の時点で、その少なくとも一人の患者から単離されたものであり、その関連付け工程 (i i) が、その B 細胞が単離されたその少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間の時点と関連付けるものである、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、そのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したものであり、且つそのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したのではなく、その関連付け工程 (i i) がクロストリジウム・ディフィシルによる感染からその少なくとも二人の患者の回復に関連付けられるものである、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、その患者が、その少なくとも一つの抗原を生成するクロストリジウム・ディフィシルの異なる株で感染しており、その関連付け工程 (i i) が、B 細胞のその配列決定された少なくとも V H および / または V L をコードする領域を関連付けして抗体に対する一連の候補配列を同定し、その各々がクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される少なくとも一つの共通の抗原に特異的であるか、またはクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される異なる抗原に特異的である、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程 ; および

(i i) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程を含んでなる方法。

【請求項 18】

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程 ; および

(i i) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程を含んでなる方法。

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 19 年 4 月 6 日 (2007 . 4 . 6)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR - H3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【 請求項 2 】

配列番号 32、および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR - L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【 請求項 3 】

配列番号 27、配列番号 28、配列番号 30、および配列番号 31 よりなる群から選択される CDR - H3 配列ならびに配列番号 32 および配列番号 34 よりなる群から選択される CDR - L3 配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【 請求項 4 】

感染中にクロストリジウム・ディフィシル (Clostridium difficile) により生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の候補配列の同定方法であって、

(i) クロストリジウム・ディフィシルに感染したまたはそのワクチンを投与された少なくとも一人の患者から単離された B 細胞で、その B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の少なくとも CDR3 領域を配列決定する工程 ; ならびに

(i i) その少なくとも一人の患者からのその B 細胞の VH および / または VL をコードする領域の配列決定された少なくとも CDR3 領域を関連付けて、クロストリジウム・ディフィシルにより生成される少なくとも一つの抗原に対してまたはワクチンに対して特異的な抗体の少なくとも CDR3 領域の一連の候補配列を同定する工程であって、その一連の候補 CDR3 配列の各々またはそれと少なくとも 80 % の相同性を有する配列が、工程 (i) で決定された一連の配列において全体で少なくとも 1 % の頻度で出現する工程 ; を含んでなる方法。

【 請求項 5 】

その B 細胞が末梢 B 細胞リンパ球および脾臓からの B 細胞よりなる群から選択されるものである、請求項 4 に記載の方法。

【 請求項 6 】

その末梢 B 細胞リンパ球がその少なくとも一人の患者からの血液から単離されたものである、請求項 5 に記載の方法。

【 請求項 7 】

その少なくとも一つの抗原が免疫原である、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【 請求項 8 】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染に应答する顕著な抗体应答を示す、請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【 請求項 9 】

その少なくとも一人の患者が、クロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復し

た人である、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

その関係付け工程 (i i) が、その配列決定された少なくとも V H および / または V L C D R 3 領域からの推定アミノ酸配列を決定し、その推定アミノ酸配列を関係付けることを含んでなる、請求項 4 ~ 9 にいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

その関係付け工程 (i i) が、その少なくとも V H および / または V L 領域に含まれる相補性決定領域を同定し、その相補性決定領域を関係付けることを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

その相補性決定領域が C D R 1、C D R 2 および C D R 3 よりなる群から選択されるものである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

その関係付け工程 (i i) が、その少なくとも一人の患者に感染するクロストリジウム・ディフィシルの株、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間にその B 細胞が単離される時点、その少なくとも一人の患者の年齢、その少なくとも一人の患者の性別、およびその少なくとも一人の患者の人種よりなる群の少なくとも一つとさらに関係付ける、請求項 4 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

その B 細胞が、その少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間に複数の時点で、その少なくとも一人の患者から単離されたものであり、その関連付け工程 (i i) が、その B 細胞が単離されたその少なくとも一人の患者がクロストリジウム・ディフィシルで感染している間の時点と関連付けるものである、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、そのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したものであり、且つそのうちの少なくとも一人がクロストリジウム・ディフィシルによる感染から回復したのではなく、その関連付け工程 (i i) がクロストリジウム・ディフィシルによる感染からその少なくとも二人の患者の回復に関連付けられるものである、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

その B 細胞が少なくとも二人の患者から単離されたものであり、その患者が、その少なくとも一つの抗原を生成するクロストリジウム・ディフィシルの異なる株で感染しており、その関連付け工程 (i i) が、B 細胞のその配列決定された少なくとも V H および / または V L をコードする領域を関連付けして抗体に対する一連の候補配列を同定し、その各々がクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される少なくとも一つの共通の抗原に特異的であるか、またはクロストリジウム・ディフィシルのその異なる株により生成される異なる抗原に特異的である、請求項 4 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するデータベースの作成方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程；および

(i i) そのデータベースにその方法で作成されたデータを格納する工程を含んでなる方法。

【請求項 18】

クロストリジウム・ディフィシルにより生成されるその少なくとも一つの抗原に特異的な少なくとも一つの候補配列を同定するレポートの発生方法であって、

(i) 請求項 4 ~ 16 のいずれかに記載の方法を行う工程；および

(i i) その方法で作成されたデータを含んでなるレポートを作成する工程

を含んでなる方法。

【請求項 19】

クロストリジウム・ディフィシルによる感染の治療用または予防用薬剤の製造用の請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合性フラグメントの使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No T/GB2004/001619
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/12 A61K39/40 C12Q1/68 G01N33/563		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 39 685 A (EICHEL STREIBER CHRISTOPH VON) 11 March 1999 (1999-03-11) page 3, line 1 - line 11 examples 1-6	1-3, 30
X	WO 00/12562 A (GENENTECH INC) 9 March 2000 (2000-03-09) figure 2 claim 8 SEQ ID No. 15	1-3
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 September 2004		Date of mailing of the international search report 27/09/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

T/GB2004/001619

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/20932 A (ALLEN DEBORAH JULIE ; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH (GB); MCCAFFERTY JOHN GE) 12 June 1997 (1997-06-12) example 1 table 1 figure 1b claim 14	1-3, 30
X	----- WHITE HARRY ET AL: "Analysis of immunoglobulin (Ig) isotype diversity and IgM/D memory in the response to phenyl-oxazolone" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 191, no. 12, 19 June 2000 (2000-06-19), pages 2209-2219, XP002293496 ISSN: 0022-1007 page 2210, left-hand column, paragraph 3 - page 2211, left-hand column, paragraph 1	30
X	----- NIE XIAOBO ET AL: "Immunization with immune complex alters the repertoire of antigen-reactive B cells in the germinal centers" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 3517-3525, XP009035552 ISSN: 0014-2980 page 3524, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1	30
P,X	----- WO 03/052416 A (MATTHEWS RUTH CHRISTINE ; NEUTEC PHARMA PLC (GB); RIGG GORDON PATRICK) 26 June 2003 (2003-06-26) the whole document in particular SEQ ID Nos. 37 and 50.	1, 3-27, 30
P,X	----- HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-3, 17-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2004/001619

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
- in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/001619

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 19 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

T/GB2004/001619

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19739685	A	11-03-1999	DE 19739685 A1	11-03-1999
			AT 254139 T	15-11-2003
			AU 9742698 A	29-03-1999
			BR 9815367 A	06-11-2001
			CA 2303202 A1	18-03-1999
			CN 1273588 T	15-11-2000
			DE 59810172 D1	18-12-2003
			WO 9912971 A2	18-03-1999
			EP 0994904 A2	26-04-2000
			ES 2210832 T3	01-07-2004
			JP 2001515920 T	25-09-2001
			US 6667035 B1	23-12-2003
			US 2004137601 A1	15-07-2004
WO 0012562	A	09-03-2000	AT 217889 T	15-06-2002
			AU 766551 B2	16-10-2003
			AU 5692399 A	21-03-2000
			BR 9913435 A	25-09-2001
			CA 2341276 A1	09-03-2000
			CN 1317015 T	10-10-2001
			DE 69901569 D1	27-06-2002
			DE 69901569 T2	19-12-2002
			DK 1107996 T3	16-09-2002
			EP 1107996 A1	20-06-2001
			ES 2177316 T3	01-12-2002
			JP 2002523081 T	30-07-2002
			NZ 509430 A	26-04-2002
			PT 1107996 T	31-10-2002
			WO 0012562 A1	09-03-2000
			US 6624295 B1	23-09-2003
			ZA 200100681 A	24-01-2002
WO 9720932	A	12-06-1997	AT 200516 T	15-04-2001
			AU 703319 B2	25-03-1999
			AU 1103697 A	27-06-1997
			CA 2239519 A1	12-06-1997
			DE 69612509 D1	17-05-2001
			DE 69612509 T2	18-10-2001
			DK 865492 T3	11-06-2001
			EP 0865492 A1	23-09-1998
			ES 2157473 T3	16-08-2001
			WO 9720932 A1	12-06-1997
			JP 2000504204 T	11-04-2000
			US 5872215 A	16-02-1999
WO 03052416	A	26-06-2003	CA 2471570 A1	26-06-2003
			EP 1415002 A2	06-05-2004
			WO 03052416 A2	26-06-2003

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)		A 6 1 K	39/395		N
G 0 6 F 17/30	(2006.01)		G 0 1 N	33/53		Y
			G 0 6 F	17/30	1 7 0 F	

(81) 指定国 AP(BW, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バーニー・ジェームス・ピーター
イギリス国 チェシャー エスケー 9 7 ピーワイ オールダーリー エッジ グレイストーク
ドライブ 1

(72) 発明者 マシューズ・ルース・クリスティン
イギリス国 チェシャー エスケー 9 7 ピーワイ オールダーリー エッジ グレイストーク
ドライブ 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA20 DA06 EA04 GA14
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ06 QQ79 QR62
4C085 AA13 BA12 CC22 CC23 EE01
4H045 AA11 AA30 DA75 EA20 EA50
5B075 UU18 UU26

专利名称(译)	抗体聚集在艰难梭菌 (Clostridium difficile) 上		
公开(公告)号	JP2007527370A	公开(公告)日	2007-09-27
申请号	JP2006506126	申请日	2004-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	牛科技制药公共有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛科技制药公共有限公司		
[标]发明人	バーニー・ジェームス・ピーター マシューズ・ルース・クリスティン		
发明人	バーニー・ジェームス・ピーター マシューズ・ルース・クリスティン		
IPC分类号	C07K16/12 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K39/395 G01N33/53 G06F17/30 G01N33/563 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/1282 A61K2039/505 C07K2317/565 G01N33/563 G01N33/56911 G01N2333/33 Y02A90/26		
FI分类号	C07K16/12.ZNA C12N15/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.Z A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.Y G06F17/30.170.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ79 4B063/QR62 4C085/AA13 4C085/BA12 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 5B075/UU18 5B075/UU26		
代理人(译)	铃木 弘男		
优先权	2003009126 2003-04-17 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，由艰难梭菌，识别它们，制造药物的方法的方法，以及使用它们治疗患者的方法赋予免疫力针对特定和感染或疫苗感染C.抗体。另外，接种疫苗的患者的方法，诊断测试方法，并且在与诊断测试试剂盒中，确定疫苗的效力的方法结合使用。技术领域

一次PCR用のプライマー		配列番号：
HuJH1-2FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC	03
HuJH3FOR	TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC	04
HuJH4-5FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	05
HuJH6FOR	TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC	06
HuVH1aBACK	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG	07
HuVH2bBACK	CAG GTG AAC TTA AGG GAG TCT GG	08
HuVH3aBACK	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG	09
HuVH4aBACK	CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG	10
HuVH4bBACK	CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG	11
HuVH5aBACK	GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC	12
HuVH6aBACK	CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG	13
HuJK1FOR	ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC	14
HuJK2FOR	ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC	15
HuJK3FOR	ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC	16
HuJK4FOR	ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC	17
HuJK5FOR	ACG TTT ATT CTC CAG TCG TGT CCC	18
HuVK1BACK	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC	19
HuVK2BACK	GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC	20
HuVK3BACK	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC	21
HuVK4BACK	GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC	22
HuVK5BACK	GAA ACT ACA CTC ACG CAG TCT CC	23
HuVK6BACK	GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC	24
DNA配列決定用のプライマー		
M13forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT	25
M13reverse	AAC AGC TAT GAC CAT G	26