

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-515479

(P2015-515479A)

(43) 公表日 平成27年5月28日(2015.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/31 (2006.01)	C07K 14/31	4B024
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-506230 (P2015-506230)	(71) 出願人	514264606
(86) (22) 出願日	平成25年4月17日 (2013.4.17)		アルサニス・バイオサイエンスズ・ゲゼル
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月17日 (2014.12.17)		シャフト・ミト・ベシュレンクテル・ハフ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/058022		ツング
(87) 国際公開番号	W02013/156534		オーストリア国 1030 ウィーン, ヘル
(87) 国際公開日	平成25年10月24日 (2013.10.24)		ムートークヴァルティンガーガッセ
(31) 優先権主張番号	12164506.3		2
(32) 優先日	平成24年4月17日 (2012.4.17)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	13151010.9	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成25年1月11日 (2013.1.11)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 交差反応性黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 抗体

(57) 【要約】

本発明は、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) のアルファ毒素 (H1a) および少なくとも1つの二成分毒素に結合する、少なくとも1つの多重特異性結合部位を含む、交差中和性抗体、その医学的および診断的使用、抗体産生に用いられるような、単離されたヌクレオチド配列、プラスミドおよび宿主細胞を含む、抗体を産生する方法；そしてさらに特異的交差中和性抗体によって認識される単離コンホメーションエピトープに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のアルファ毒素 (H1a) および少なくとも 1 つの二成分毒素に結合する、少なくとも 1 つの多重特異性結合部位を含む、交差中和性抗体。

【請求項 2】

前記二成分毒素が、ガンマ溶血素、PVL毒素およびPVL様毒素、好ましくはH1g AB、H1g CB、LukSF、LukED、LukGH、LukS-H1gB、LukSD、H1gA-LukD、H1gA-LukF、LukG-H1gA、LukEF、LukE-H1gB、H1gC-LukDまたはH1gC-LukFのいずれかのFおよびS成分の同族 (cognate) および非同族対からなる群より選択される、請求項 1 記載の抗体。

10

【請求項 3】

前記結合部位が、少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つの二成分毒素、好ましくは、H1g AB、H1g CB、LukSFおよびLukED、好ましくはH1g AB、H1g CB、LukSFおよびLukEDのいずれかの少なくとも 2 つまたは 3 つに結合する、請求項 1 または 2 記載の抗体。

【請求項 4】

前記結合部位が、CDR結合部位、好ましくはVHおよび/またはVL結合部位のCDR配列を含む部位である、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の抗体。

20

【請求項 5】

全長モノクローナル抗体、または結合部位を取り込んでいる少なくとも 1 つの抗体ドメインを含むその抗体断片であって、好ましくは 10^{-8} M 未満、好ましくは 10^{-9} M 未満の K_d で、毒素の各々に結合するアフィニティを有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の抗体。

【請求項 6】

AB-24 と称される抗体と同じエピトープに結合し、好ましくは # AB-24 と称される抗体と同じ結合部位を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の抗体。

【請求項 7】

DSM26747 および/または DSM26748 の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体由来である、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の抗体、あるいは機能的に活性であるその変異体であって、好ましくは

30

(a) 抗体軽鎖が DSM26748 の下に寄託されている宿主細胞によって産生され；そして/または

(b) 抗体重鎖が DSM26747 の下に寄託されている宿主細胞によって産生されるか；

(c) あるいは (a) および/または (b) の機能的に活性である変異体を使用する前記抗体。

【請求項 8】

DSM26748 の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# AB-24-LC と称される抗体軽鎖をコードし；そして/または

40

DSM26747 の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# AB-24-HC と称される抗体重鎖をコードする

ヌクレオチド配列を含むプラスミド。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体の軽鎖および/または重鎖を発現するコード配列を含む発現カセットであって、発現カセットまたはコード配列が請求項 8 記載のプラスミド由来である、前記発現カセット。

【請求項 10】

請求項 8 記載のプラスミドまたは請求項 9 記載の発現カセットを含む、宿主細胞。

50

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体を産生する方法であって、請求項 1 0 記載の宿主細胞を、前記抗体を産生する条件下で培養するかまたは維持する、前記方法。

【請求項 1 2】

候補防御抗体を同定する方法であって：

(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして

(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、 # A B - 2 4 と称される抗体によって認識されるエピトープの結合に関して評価する、ここで抗体およびエピトープの間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法。

10

【請求項 1 3】

候補防御抗体を同定する方法であって：

(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして

(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも 1 つの二成分毒素の結合に関して評価する、ここで抗体および毒素の間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体を産生する方法であって

(a) 請求項 1 2 または 1 3 にしたがって同定される候補防御抗体を提供し；そして

(b) モノクローナル抗体、あるいは該候補防御抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは候補防御抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する
工程を含む、前記方法。

20

【請求項 1 5】

黄色ブドウ球菌感染のリスクがあるかまたは該感染を患っている被験体を治療するために使用するのための、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体であって、治療が、被験体における感染を限定するのに有効な量の抗体を被験体に投与して、前記感染から生じる疾患状態を寛解させるか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害する工程を含む、前記抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体の薬学的調製物であって、好ましくは、非経口または粘膜配合物を含み、場合によって薬学的に許容されうるキャリアーまたは賦形剤を含有する、前記調製物。

30

【請求項 1 7】

高毒素産生 M R S A 感染を含むいかなる黄色ブドウ球菌感染、例えば壊死性肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブンケル症における毒素産生を検出するための診断に使用するのための、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体の診断調製物であって、場合によって標識を含む抗体および/または標識を含むさらなる診断試薬を含有する、前記調製物。

【請求項 1 9】

A B - 2 4 と称される抗体によって認識される、単離コンホメーションエピトープ。

40

【請求項 2 0】

(a) 請求項 1 9 記載のエピトープ；

(b) 場合によって、(a) の前記エピトープと天然には関連しないさらなるエピトープ；および

(c) キャリアー

を含む、免疫原。

【請求項 2 1】

黄色ブドウ球菌感染から被験体を防御するか、前記感染から生じる疾患状態を防止するか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害するのに有効な量の前記免疫原を投与する

50

ことによって、被験体を治療する際に使用するための、請求項 20 記載の免疫原。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の抗体または請求項 19 記載のエピトープをコードする、単離核酸。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

重要なヒト病原体である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、赤血球、好中性顆粒球および他の免疫細胞、ならびに肺または皮膚の上皮細胞を含む、いくつかの異なる細胞タイプを殺しうる多数の分泌毒素 (外毒素) を発現する。さらに、これらの毒素の大部分は、免疫細胞を活性化し、そして強力な炎症誘発シグナルとして作用する。

10

【0002】

黄色ブドウ球菌細胞毒の主なメンバーは、アルファ溶血素 (H1a) であり、これはヒト肺上皮および内皮細胞、リンパ球およびマクロファージに対して細胞溶解機能を発揮する。これはまた、ウサギ赤血球 (RBC) を溶解することも可能であるが、ヒト RBC に対するよりはるかに毒性が低い。H1a は、黄色ブドウ球菌肺炎病変形成において、重要な病原性因子であると見なされており、そして肺上皮細胞の溶解および非常に多量の免疫細胞の補充を通じた組織損傷の原因となる。補充される食細胞は、主に好中性顆粒球であり、これは疾患中、黄色ブドウ球菌によって産生される他の細胞毒のターゲットとなる。最も強力な毒素は、一つの S (緩慢に溶出) 成分、および一つの F (迅速に溶出) 成分によって形成される、二成分細胞溶解素、またはロイコシジンである。すべての黄色ブドウ球菌株によって普遍的に発現されるガンマ溶血素 (H1g) 遺伝子産物は、2つの毒素: H1gAB および H1gCB (サブユニット B は F 成分である) を形成可能であり、これらはどちらも、ヒト免疫細胞: PMN、リンパ球およびマクロファージの殺傷において非常に強力である。前者はまた、ヒト RBC に対する非常に強力な溶血素である。

20

【0003】

LukSF とも呼ばれるパントン・バレンタイン型ロイコシジン (PVL) は、二成分毒素を最適に特徴付ける。これは、ファージ由来遺伝子要素によって保持され、そして患者から単離された黄色ブドウ球菌株のおよそ 5 ~ 10% によって産生されるが、PVL 発現株の率は、疾患のタイプに応じて、皮膚および軟組織感染において、50 ~ 93% と報告されている (Lina, Clin Infect Dis, 1999: 1128)。LukED (LukD は F 成分である) は、より強力でないロイコシジンであるが、臨床的黄色ブドウ球菌単離体の大部分に存在することが確認されている (Shukla, J Clin Microbiol, 2010: 3582)。最初は、その役割は、皮膚感染のみに関連付けられたが、二成分毒素の中でより特徴付けられておらず、黄色ブドウ球菌感染の他のタイプへの寄与は排除できない。LukED は、近年、黄色ブドウ球菌感染のネズミモデルにおける血流感染に関与することが報告されてきている (Alonzo, Mol Microbiol, 2012: 423)。これらの2つの遺伝子対は、互いに有意な相同性を共有する (68 ~ 82% のアミノ酸同一性) が、最近同定されたロイコシジン LukGH (LukG は F 成分である) は、より低い相同性を有し、同一性は 33 ~ 40% である (Ventura, PLoS ONE, 2010: e11634; DuMont, Mol Microbiol, 2011: 814)。

30

40

【0004】

H1a、LukS、LukF、H1gA および H1gB の結晶構造が決定されてきており、そして H1a および二成分毒素サブユニット間のアミノ酸相同性が 16 ~ 28% アミノ酸同一性という低レベルであるにも関わらず、ある程度の構造相同性が明らかになった (Galdiero, Protein Sci, 2004: 1503; Pedellacq, Structure, 1999: 277; Menestrina, FEBS Letters, 2003: 54)。すべてのこれらの毒素は、オリゴマー化サ

50

ブユニットによって形成される環状構造を形成し、細胞膜内の孔形成およびそれに続く細胞溶解を導く。H1aの場合、孔は七量体であることが示されてきているが、二成分毒素に関しては、六量体 (Comai, Mol Microbiol, 2002:1251)、七量体および八量体 (Yamashita, PNAS, 2011:17314) ヘテロオリゴマーが報告されており、科学コミュニティ内での議論を導いてきた (Kaneko, Biosci Biotechnol Biochem, 2004:981に詳細に概説される)。

【0005】

この毒素ファミリーの異なるF成分およびS成分は、同族 (cognate) 対 (これらは: LukS - LukF、LukE - LukD、HlgC - HlgB、HlgA - HlgBおよびLukH - LukGである) のみ形成可能なのではなく、非同族対もまた形成可能であり、こうした対の多くがGravetら (Gravet, FEBS Letters, 1998:202) によって、そしてガンマ溶血素およびLukSに関して、Dalla Serraら (Dalla Serra, J Chem Inf Model, 2005:1539) によって報告されている。この毒素ファミリーの重複性および乱交雑な性質のため、単一の成分を不活性化しても、黄色ブドウ球菌感染と戦うには有効ではない可能性が高い。この知見は、単一の二成分毒素を中和しても、表現型には部分的な影響しかないという文献に報告される観察によって裏付けられる (例えば、Ventura, PLoS ONE, 2010:e11634; Malachowa, PLoS ONE, 2011:e18617)。動物研究によって、*in vivo* 実験に使用したモデルまたは用いた種に応じて、生存に対する多様な二成分毒素の示差的な影響が示されている。多数の毒素を欠失させた際、例えば毒素発現の包括的な制御因子であるagrクオラムセンシング系が不活性化されている黄色ブドウ球菌のノックアウト株を用いた感染のウサギモデルにおけるように、疾患重症度の最も顕著な減少が観察された (Kobayashi, J Infect Dis, 2011:204)。したがって、より多くの毒素を中和する抗体カクテルは、単一毒素に対するmAbよりも有意な利点を提供することが期待される。しかし、3より多い成分を含むモノクローナル抗体 (mAb) カクテルは、開発が困難である。

【0006】

アルファ溶血素および任意の二成分毒素の間で交差反応する単一抗体を発見する可能性は、H1aおよび二成分毒素間の配列相同性が低い (<30%) ことに基づいて、低いと見なされた。S成分およびF成分間で交差反応性である単一抗体を発見する機会は、LukGHを除いて、配列相同性がより高いレベルであるため、より高いことが期待される。LukSで免疫された動物由来の過免疫血清がHlgCを認識可能であることが記載されてきているが、これは、ポリクローナル血清において異なる特異性が存在するためである。Laventieら (Laventie, PNAS, 2011:16404) は、LukSおよびHlgCに対する二重特異性中和抗体を記載した。しかし、このタイプの抗体は、同族抗原上の単一の結合部位のため、強力な相互作用を形成不能である。こうした二重特異性mAbの交差反応性は、通常、2つの特異性に限定され、すなわち、広い交差中和の潜在能力を提供しない。要約すると、異なる二成分黄色ブドウ球菌毒素に対する、またはアルファ溶血素および二成分毒素のいずれかに対する交差反応性mAbは、今日まで報告されてきていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lina, Clin Infect Dis, 1999:1128

【非特許文献2】Shukla, J Clin Microbiol, 2010:3582

【非特許文献3】Alonzo, Mol Microbiol, 2012:423

【非特許文献4】Ventura, PLoS ONE, 2010:e11634

10

20

30

40

50

【非特許文献5】DuMont, Mol Microbiol, 2011:814

【非特許文献6】Galdiero, Protein Sci, 2004:1503

【非特許文献7】Pedelacq, Structure, 1999:277

【非特許文献8】Menestrina, FEBS Letters, 2003:54

【非特許文献9】Comai, Mol Microbiol, 2002:1251

【非特許文献10】Yamashita, PNAS, 2011:17314

【非特許文献11】Kaneko, Biosci Biotechnol Biochem, 2004:981

【非特許文献12】Gravet, FEBS Letters, 1998:202

【非特許文献13】Dalla Serra, J Chem Inf Model, 2005:1539

【非特許文献14】Malachowa, PLoS ONE, 2011:e18617

【非特許文献15】Kobayashi, J Infect Dis, 2011:204

【非特許文献16】Laventie, PNAS, 2011:16404

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、交差反応能および交差中和能を持つ、異なる黄色ブドウ球菌細胞毒に対して向けられる抗体を提供することである。

【0009】

この目的は、本発明の主題によって解決される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明にしたがって、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素(H1a)および少なくとも1つの二成分毒素に結合する、少なくとも1つの多重特異性結合部位を含む、交差中和性抗体を提供する。

【0011】

特に、二成分毒素は、ガンマ溶血素(HlgABC)、PVL毒素(LukSF)およびPVL様毒素、好ましくはHlgAB、HlgCB、LukSF、LukED、LukGH、LukS-HlgB、LukSD、HlgA-LukD、HlgA-LukF、LukG-HlgA、LukEF、LukE-HlgB、HlgC-LukDまたはHlgC-LukFのいずれかのFおよびS成分の同族および非同族対からなる群より選択される。

【0012】

好ましくは、結合部位は、少なくとも2つまたは少なくとも3つの二成分毒素、好ましくは、HlgAB、HlgCB、LukSFおよびLukED、好ましくはHlgAB、HlgCB、LukSFおよびLukEDのいずれかの少なくとも2つまたは3つに結合する。

【0013】

特定の態様にしたがって、結合部位は、CDR結合部位、好ましくはVHおよび/またはVL結合部位のCDR配列を含む部位である。

【0014】

特に、抗体は、全長モノクローナル抗体、または結合部位を取り込んでいる少なくとも1つの抗体ドメインを含むその抗体断片、好ましくはネズミ、キメラ、ヒト化またはヒト抗体、重鎖抗体、Fab、Fd、scFvおよびVH、VHHまたはVLのような単ドメイン抗体、好ましくはヒトIgG1抗体からなる群より選択される抗体である。

【0015】

10

20

30

40

50

抗体は、好ましくは 10^{-8} M 未満、好ましくは 10^{-9} M 未満の K d で、毒素の各々に結合するアフィニティを有する。

【0016】

特定の側面にしたがって、抗体は、50 : 1 mAb : 毒素比 (mol / mol) 未満、好ましくは 10 : 1 未満、より好ましくは 1 : 1 未満の IC50 で、細胞に基づくアッセイにおける *in vitro* 中和能を示す。

【0017】

さらなる特定の側面にしたがって、抗体は、ヒトおよび非ヒト動物の両方を含む動物において、ターゲティングされる毒素を中和し、そして *in vivo* で黄色ブドウ球菌病変形成、好ましくは肺炎、菌血症または敗血症、腹膜炎および骨髄炎の任意のモデルを阻害する。

10

【0018】

特定の態様にしたがって、抗体は、# AB - 24 と称される抗体と同じエピトープに結合する。

【0019】

さらなる特定の態様にしたがって、抗体は、# AB - 24 と称される抗体と同じ結合部位を含む。

【0020】

さらなる特定の態様にしたがって、抗体は、# AB - 24 と称される抗体と同じエピトープに結合する。

20

【0021】

特に、抗体は、DSM 26747 および / または DSM 26748 の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体、あるいはその機能的に活性である変異体であるか、またはこれら由来である。

【0022】

特に、抗体は

(a) DSM 26748 の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体軽鎖 ; および / または

(b) DSM 26747 の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体重鎖 ;

(c) あるいは (a) および / または (b) の機能的に活性である変異体

30

を含む。

【0023】

さらなる側面にしたがって、本発明は、

DSM 26748 の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# AB - 24 - LC と称される抗体軽鎖をコードし ; そして / または

DSM 26747 の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# AB - 24 - HC と称される抗体重鎖をコードする

ヌクレオチド配列を含むプラスミドを提供する。

【0024】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明記載の抗体を発現するコード配列を含む発現カセットであって、発現カセットまたはコード配列が本発明のプラスミド由来である、前記発現カセットを提供する。

40

【0025】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体を産生する方法であって、宿主細胞を本発明のプラスミドまたは本発明の発現カセットで形質転換する、前記方法を提供する。

【0026】

特に好ましいのは、宿主細胞およびこうした宿主細胞を使用する産生法であって、ここで宿主細胞は

抗体軽鎖を発現するコード配列を取り込む、本発明のプラスミドまたは発現カセット ;

50

および

抗体重鎖を発現するコード配列を取り込む、本発明のプラスミドまたは発現カセットを含む。

【0027】

本発明のさらなる側面にしたがって、本発明は、本発明のプラスミドまたは本発明の発現カセットを含む宿主細胞を提供する。

【0028】

特に、本発明は、DSM 26747またはDSM 26748の下で寄託されている、宿主細胞を指す。こうした宿主細胞は、本発明のプラスミドで形質転換されている大腸菌（*E. coli*）宿主細胞である。特に、DSM 26748の下に寄託されている宿主細胞は、#AB-24-LCと称される抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドで形質転換され；そしてDSM 26747の下に寄託されている宿主細胞は、#AB-24-HCと称される抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドで形質転換されている。

10

【0029】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体を産生する方法であって、本発明の宿主細胞を、前記抗体を産生する条件下で培養するかまたは維持する、前記方法を提供する。

【0030】

さらなる側面にしたがって、本発明は、候補防御抗体を同定する方法であって：

20

(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして

(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、#AB-24と称される抗体によって認識されるエピトープの結合に関して評価する、ここで抗体およびエピトープの間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法を提供する。

【0031】

さらなる側面にしたがって、本発明は、候補防御抗体を同定する方法であって：

(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして

(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素の結合に関して評価する、ここで抗体および毒素の間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法を提供する。

30

【0032】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体を産生する方法であって

(a) 本発明の同定法にしたがって同定される候補防御抗体を提供し；そして

(b) モノクローナル抗体、あるいは該候補防御抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは該候補防御抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する
工程を含む、前記方法を提供する。

【0033】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体を産生する方法であって

40

(a) #AB-24と称される抗体によって認識されるエピトープで、非ヒト動物を免疫し；

(b) 単離B細胞から不死化細胞株を形成し；

(c) b)で得られた細胞株をスクリーニングして、エピトープに結合するモノクローナル抗体を産生する細胞株を同定し；そして

(d) モノクローナル抗体、あるいは該抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは該モノクローナル抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する

工程を含む、前記方法を提供する。

【0034】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体を産生する方法であって

50

(a) 黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素で、非ヒト動物を免疫し、そして抗体を産生するB細胞を単離し；

(b) 単離B細胞から不死化細胞株を形成し；

(c) 細胞株をスクリーニングして、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞株を同定し；そして

(d) モノクローナル抗体、あるいは該抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは該モノクローナル抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する工程を含む、前記方法を提供する。

【0035】

さらなる側面にしたがって、本発明は、ヒト医学的および獣医学的使用を含む、医学的使用のための本発明の抗体を提供する。具体的には、抗体は、黄色ブドウ球菌感染のリスクがあるかまたは該感染を患っている被験体を治療するために提供され、治療は、被験体における感染を限定するのに有効な量の抗体を被験体に投与して、前記感染から生じる疾患状態を寛解させるか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害する工程を含む。

10

【0036】

具体的には、抗体は、黄色ブドウ球菌感染に対して防御するために提供される。

【0037】

特定の側面にしたがって、黄色ブドウ球菌感染のリスクがあるかまたは該感染を患っている被験体を治療する方法であって、被験体における感染を限定するのに有効な量の抗体を被験体に投与して、前記感染から生じる疾患状態を寛解させるか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害する工程を含む、前記方法をさらに提供する。

20

【0038】

具体的には、病原性黄色ブドウ球菌に対して防御するための治療法を提供する。

【0039】

特定の態様にしたがって、非経口または粘膜配合物中で抗体を投与する。

【0040】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体の薬学的調製物であって、好ましくは、非経口または粘膜配合物を含み、場合によって薬学的に許容されうるキャリアまたは賦形剤を含有する、前記調製物を提供する。

30

【0041】

さらなる側面にしたがって、本発明は、高毒素産生MRSA感染を含むいかなる黄色ブドウ球菌感染も、例えば壊死性肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブンケル症における毒素産生も検出するための診断使用のための本発明の抗体を提供する。

【0042】

具体的には、本発明にしたがって使用するための抗体であって、該抗体と被験体の体液試料を接触させることによって、該被験体における黄色ブドウ球菌での全身感染が *ex vivo* で決定される、ここで抗体の特異的免疫反応が感染を決定する、前記抗体を提供する。

【0043】

特定の側面にしたがって、被験体において、高毒素産生MRSA感染を含む黄色ブドウ球菌感染、例えば壊死性肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブンケル症における毒素産生を診断する方法をさらに提供する。

40

【0044】

具体的には、該抗体と被験体の体液試料を接触させることによって、該被験体における黄色ブドウ球菌での全身感染が *ex vivo* で決定される、ここで抗体の特異的免疫反応が感染を決定する、診断法を提供する。

【0045】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体の診断調製物であって、場合によって標識を含む抗体および/または標識を含むさらなる診断試薬を含有する、前記調製物

50

を提供する。

【0046】

さらなる側面にしたがって、本発明は、# A B - 2 4 と称される抗体によって認識される、単離コンホメーションエピトープを提供する。こうしたエピトープは、# A B - 2 4 と称される抗体によって各々認識される、エピトープ変異体を含む単一エピトープまたはエピトープ混合物からなることも可能である。

【0047】

さらなる側面にしたがって、本発明は：

(a) 本発明のエピトープ；

(b) 場合によって、(a) の前記エピトープと天然には関連しないさらなるエピトープ；および

(c) キャリアー

を含む、免疫原を提供する。

【0048】

具体的には、キャリアーは、薬学的に許容されうるキャリアーであり、好ましくは緩衝剤および/またはアジュバント物質を含む。

【0049】

本発明の免疫原は、好ましくは、ワクチン配合物中で、好ましくは非経口使用のために提供される。

【0050】

具体的には、本発明の免疫原は、医学的使用のために、特に、黄色ブドウ球菌感染から被験体を防御するか、前記感染から生じる疾患状態を防止するか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害するのに有効な量の前記免疫原を投与することによって、被験体を治療する際に使用するために提供される。

【0051】

具体的には、本発明の免疫原は、防御免疫反応を誘発するために提供される。

【0052】

特定の側面にしたがって、黄色ブドウ球菌感染のリスクがある被験体を治療する治療法であって、被験体における感染を防止する、特に病原性黄色ブドウ球菌に対して防御するのに有効な量の免疫原を被験体に投与する工程を含む、前記方法をさらに提供する。

【0053】

さらなる側面にしたがって、本発明は、本発明の抗体をコードするか、または本発明のエピトープをコードする、単離核酸を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】 m A b スクリーニングのため、組換え型で産生される毒素成分を示す模式図。

【図2 A】 実施例3に記載するような、*in vitro*でのモノクローナル抗体の H l a 中和能の決定。 A : ウサギ赤血球を用いる B : ヒト肺上皮細胞 (A 5 4 9 細胞株 (A T C C から)) を用いる

【図2 B】 実施例3に記載するような、*in vitro*でのモノクローナル抗体の H l a 中和能の決定。 A : ウサギ赤血球を用いる B : ヒト肺上皮細胞 (A 5 4 9 細胞株 (A T C C から)) を用いる

【図3】 実施例3に記載するような、中和能を持つ無感作およびアフィニティ成熟 H l a 特異的 m A b のアフィニティ (K d) 。

【図4】 実施例3に記載するような、交差中和性 H l a m A b # A B - 2 4 (名称 # 9 0 2 8) を含む、アフィニティ成熟 H l a m A b の *in vitro* 中和能。

【図5】 実施例3に記載するような、ロイコシジンの F 成分に対する広域交差中和性 H l a m A b # A B - 2 4 (名称 # 9 0 2 8) のアフィニティ (K d) 。

【図6 A】 # 7 6 6 7 系譜の *in vitro* 中和能。実施例4に記載するような、A 5 4 9 細胞に対するアルファ溶血素中和アッセイ (A) 、 ヒト好中球に対する、 L u k S -

10

20

30

40

50

L u k F (B)、H l g C - H l g B (C)、および L u k E - L u k D (D) の中和。

注：# A B - 2 4 は、ここでは# 9 0 2 8 と称される。

【図 6 B】# 7 6 6 7 系譜の *in vitro* 中和能。実施例 4 に記載するような、A 5 4 9 細胞に対するアルファ溶血素中和アッセイ (A)、ヒト好中球に対する、L u k S - L u k F (B)、H l g C - H l g B (C)、および L u k E - L u k D (D) の中和。

注：# A B - 2 4 は、ここでは# 9 0 2 8 と称される。

【図 6 C】# 7 6 6 7 系譜の *in vitro* 中和能。実施例 4 に記載するような、A 5 4 9 細胞に対するアルファ溶血素中和アッセイ (A)、ヒト好中球に対する、L u k S - L u k F (B)、H l g C - H l g B (C)、および L u k E - L u k D (D) の中和。

注：# A B - 2 4 は、ここでは# 9 0 2 8 と称される。

【図 6 D】# 7 6 6 7 系譜の *in vitro* 中和能。実施例 4 に記載するような、A 5 4 9 細胞に対するアルファ溶血素中和アッセイ (A)、ヒト好中球に対する、L u k S - L u k F (B)、H l g C - H l g B (C)、および L u k E - L u k D (D) の中和。

注：# A B - 2 4 は、ここでは# 9 0 2 8 と称される。

【図 7】実施例 5 に記載するような、モノクローナル抗体での治療による、致死性毒素曝露からのマウスの保護。注：# A B - 2 4 は、ここでは# 9 0 2 8 と称される。A：鼻内 H l a 曝露 B：静脈内 H l g A B 曝露。

【図 8】実施例 6 に記載するような、F o r t e - B i o において決定される H l a m A b 間の競合。

【図 9 A】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 1 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l a ヌクレオチド配列 (G e n b a n k、寄託番号 C P 0 0 0 7 3 0) 配列番号 2： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l a アミノ酸配列 配列番号 3 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k S ヌクレオチド配列 配列番号 4： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k S アミノ酸配列

【図 9 B】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 5 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k F ヌクレオチド配列 配列番号 6： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k F アミノ酸配列 配列番号 7 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k E ヌクレオチド配列 配列番号 8： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k E アミノ酸配列

【図 9 C】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 9 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k D ヌクレオチド配列 配列番号 1 0： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k D アミノ酸配列 配列番号 1 1 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g A ヌクレオチド配列 配列番号 1 2： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g A アミノ酸配列

【図 9 D】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 1 3 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g C ヌクレオチド配列 配列番号 1 4： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g C アミノ酸配列 配列番号 1 5 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g B ヌクレオチド配列 配列番号 1 6： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の H l g B アミノ酸配列

【図 9 E】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 1 7 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k H ヌクレオチド配列 配列番号 1 8： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k H アミノ酸配列 配列番号 1 9 U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k G ヌクレオチド配列 配列番号 2 0： U S A 3 0 0 T C H 1 5 1 6 株の L u k G アミノ酸配列

【図 9 F】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 2 1 M R S A 2 5 2 株の L u k H ヌクレオチド配列 (G e n b a n k、寄託番号 B X 5 7 1 8 5 6) 配列番号 2 2： M R S A 2 5 2 株の L u k H アミノ酸配列 配列番号 2 3 M R S A 2 5 2 株の L u k G ヌクレオチド配列 配列番号 2 4： M R S A 2 5 2 株の L u k G アミノ酸配列

【図 9 G】実施例 1 に記載するように得られる黄色ブドウ球菌毒素配列。配列番号 2 5

10

20

30

40

50

M S H R 1 1 3 2 株の L u k H ヌクレオチド配列 (G e n b a n k 、 寄託番号 F R 8 2 1 7 7 7) 配列番号 2 6 : M S H R 1 1 3 2 株の L u k H アミノ酸配列 配列番号 2 7 M S H R 1 1 3 2 株の L u k G ヌクレオチド配列 配列番号 2 8 : M S H R 1 1 3 2 株の L u k G アミノ酸配列

【発明を実施するための形態】

【0055】

用語「抗体」は、本明細書において、抗体ドメインからなるかまたは抗体ドメインを含むポリペプチドまたはタンパク質を指すものとし、抗体ドメインは、リンカー配列を伴うまたは伴わない、免疫グロブリンの重鎖および/または軽鎖の定常および/または可変ドメインと理解される。ポリペプチドは、ループ配列によって連結される抗体ドメイン構造の少なくとも2つのベータ鎖からなるベータ-パレル構造を含むならば、抗体ドメインと理解される。抗体ドメインは、天然構造でもよいし、あるいは突然変異誘発または誘導体化によって修飾されて、例えば抗原結合特性または任意の他の特性、例えば安定性または機能特性、例えばFc受容体FcRnおよび/またはFcガンマ受容体への結合が修飾されてもよい。

10

【0056】

本明細書記載の抗体は、1またはそれより多い抗原、あるいはこうした抗原の1またはそれより多いエピトープに結合する、特異的結合部位を有し、特に単一可変抗体ドメインのCDR結合部位、例えばVH、VLまたはVHH、あるいは可変抗体ドメイン対の結合部位、例えばVL/VH対、VL/VHドメイン対および定常抗体ドメインを含む抗体、例えばFab、F(ab')、(Fab)₂、scFv、Fv、あるいは全長抗体を含む。

20

【0057】

用語「抗体」は、本明細書において、特に、単一可変抗体ドメイン、例えばVH、VLまたはVHH、あるいは連結配列またはヒンジ領域を伴うまたは伴わない、可変および/または定常抗体ドメインの組み合わせを含む、あるいはこれらからなる、抗体形式を指すものとし、可変抗体ドメイン対、例えばVL/VH対、VL/VHドメイン対および定常抗体ドメインを含むかまたはこれらからなる抗体、例えば重鎖抗体、Fab、F(ab')、(Fab)₂、scFv、Fd、Fv、または全長抗体、例えばIgGタイプ(例えばIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM抗体が含まれる。用語「全長抗体」を用いて、Fcドメインの少なくとも大部分、および天然存在抗体単量体に一般的に見られる他のドメインを含む、任意の抗体分子を指すことも可能である。この句は、本明細書において、特定の抗体分子が抗体断片でないことを強調するために用いられる。

30

【0058】

用語「抗体」には、特に、異なるターゲット抗原に対して向けられるか、または抗体ドメインの異なる構造配置を含む、他の抗体を実質的に含まない、単離型の抗体が含まれるものとする。なお、単離抗体は、例えば少なくとも1つの他の抗体、例えば異なる特異性を有するモノクローナル抗体または抗体断片を含む、単離抗体の組み合わせを含有する、組み合わせ調製物に含まれることも可能である。

40

【0059】

用語「抗体」は、ヒト種を含む動物起源、例えばヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、ラマ(Lama)、ウシおよびウマ、または鳥類、例えば雌鶏(hen)を含む哺乳動物の抗体に適用されるものとする。

【0060】

用語「抗体」は、さらに、異なる種起源の配列、例えばネズミおよびヒト起源の配列を持つキメラ抗体に適用される。

【0061】

用語「キメラ」は、抗体に関して用いられる際、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列各々の1つの部分が、特定の種に由来するかまたは特定のクラスに属する抗体中の対応する配列

50

に相同である一方、鎖の残りのセグメントが、別の種またはクラスの対応する配列に相同である抗体を指す。典型的には、軽鎖および重鎖両方の可変領域は、哺乳動物の1種由来の抗体可変領域を模倣し、一方、定常部分は、別の種由来の抗体配列に相同である。例えば、可変領域は、例えばヒト細胞調製物由来の定常領域と組み合わせて、非ヒト宿主生物由来の、容易に入手可能なB細胞またはハイブリドーマを用いて、現在知られる供給源から得られうる。

【0062】

用語「抗体」は、さらに、ヒト化抗体に適用される。

【0063】

用語「ヒト化」は、抗体に関して用いた際、非ヒト種由来の免疫グロブリンから実質的に得られる抗原結合部位を有する分子を指し、ここで、分子の残りの免疫グロブリン構造は、ヒト免疫グロブリンの構造および/または配列に基づく。抗原結合部位は、定常ドメインに融合した完全可変ドメイン、または可変ドメイン中の適切なフレームワーク領域上に移植された相補性決定領域(CDR)のみのいずれかを含むことも可能である。抗原結合部位は、野生型でもよいし、あるいは例えば1またはそれより多いアミノ酸置換によって、修飾されていてもよく、好ましくは、ヒト免疫グロブリンにより近く似るように修飾される。ヒト化抗体のいくつかの型は、すべてのCDR配列を保持する(例えば、マウス抗体由来の6つすべてのCDRを含有するヒト化マウス抗体)。他の型は、元来の抗体に関して改変されている1またはそれより多いCDRを有する。

10

【0064】

用語「抗体」は、さらにヒト抗体に適用される。

20

【0065】

用語「ヒト」は、抗体に関して用いられる際、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変および定常領域を有する抗体を含むと理解される。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えばランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって*in vitro*で、あるいは体細胞突然変異によって*in vivo*で導入される突然変異)が含まれてもよい。ヒト抗体には、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、あるいは1またはそれより多いヒト免疫グロブリンに関してトランスジェニックである動物から、単離される抗体が含まれる。

【0066】

該用語は、特に、任意のクラスまたはサブクラスの抗体に適用される。重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は、抗体IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの主要なクラスに割り当て可能であり、そしてこれらのいくつかは、さらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2に分けられうる。

30

【0067】

該用語は、さらに、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、特に組換え抗体に適用され、こうした用語には、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるかまたは単離されるすべての抗体および抗体構造が含まれ、例えば、異なる起源由来の遺伝子または配列を含む、例えば動物、例えばヒトを含む哺乳動物から生じる抗体、例えばキメラ、ヒト化抗体、またはハイブリドーマ由来抗体が含まれる。さらなる例は、抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞から単離される抗体、あるいは抗体または抗体ドメインの組換えコンビナトリアルライブラリーから単離される抗体、あるいは他のDNA配列に抗体遺伝子配列をスプライシングする工程を含む、任意の他の手段によって、調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体を指す。

40

【0068】

用語「抗体」はまた、抗体の誘導體、特に機能的に活性である誘導體も指すと理解される。抗体誘導體は、1またはそれより多い抗体ドメインまたは抗体および/または融合タンパク質の任意の組み合わせと理解され、ここで、抗体の任意のドメインを、例えば他の抗体、例えばCDRループを含む結合構造、受容体ポリペプチドであってもよいが、また

50

リガンド、足場タンパク質、酵素、毒素等でもよい、1またはそれより多い他のタンパク質の任意の位で、融合させてもよい。多様な化学的技術、例えば共有カップリング、静電相互作用、ジスルフィド結合等による、他の物質への会合または結合によって、抗体の誘導体を得てもよい。抗体に結合する他の物質は、脂質、炭水化物、核酸、有機および無機分子またはその任意の組み合わせ（例えばPEG、プロドラッグまたは薬剤）であってもよい。特定の態様において、抗体は、生物学的に許容されうる化合物との特異的相互作用を可能にするさらなるタグを含む誘導体である。本発明で使用可能なタグに関しては、抗体のターゲットへの結合に対して、まったく負の影響がないかまたは許容されうる負の影響しかない限り、特別な制限はない。適切なタグの例には、Hisタグ、Mycタグ、FLAGタグ、Streptタグ、カルモジュリン・タグ、GSTタグ、MBPタグ、およびSタグが含まれる。別の特定の態様において、抗体は、標識を含む誘導体である。用語「標識」は、本明細書において、「標識」抗体を生成するような、抗体に直接または間接的にコンジュゲート化された、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体検出可能であってもよく、例えば放射性同位体標識または蛍光標識であってもよく、あるいは酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的改変を触媒してもよい。

10

【0069】

本明細書に記載するような好ましい誘導体は、抗原結合に関して機能的に活性であり、好ましくは黄色ブドウ球菌を中和する能力を有し、そして/または防御抗体である。

【0070】

用語「抗体」はまた、抗体の変異体も指すと理解される。

20

【0071】

用語「変異体」は、特に、例えば突然変異誘発法によって、特に特定の抗体アミノ酸配列または領域を欠失させ、交換し、該領域内に挿入物を導入するか、あるいはアミノ酸配列を化学的に誘導体化して、例えば定常ドメインにおいて、抗体安定性、エフェクター機能または半減期を操作するか、あるいは可変ドメインにおいて、例えば当該技術分野において利用可能なアフィニティ成熟技術によって抗原結合特性を改善して、得られる突然変異抗体または抗体断片などの抗体を指すものとする。任意の既知の突然変異誘発法が使用可能であり、これには、例えばランダム化技術によって得られる、望ましい位での点突然変異が含まれる。いくつかの場合、位は、例えば任意のありうるアミノ酸または抗体配列をランダム化するために好ましいアミノ酸の選択のいずれかを用いて、ランダムに選択される。用語「突然変異誘発」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を改変するための、任意の当該技術分野に認識される技術を指す。好ましいタイプの突然変異誘発には、エラープローンPCR突然変異誘発、飽和突然変異誘発、または他の部位特異的突然変異誘発が含まれる。

30

【0072】

用語「変異体」は、特に、機能的に活性である変異体を含むものとする。

【0073】

用語、抗体の「機能的に活性である変異体」は、本明細書において、1またはそれより多いアミノ酸の挿入、欠失または置換、あるいはアミノ酸配列中の1またはそれより多いアミノ酸残基、あるいはヌクレオチド配列内のヌクレオチド、あるいは配列の遠位端のいずれかまたは両方の化学的誘導体化から生じる配列であって、そしてこうした修飾がこの配列の活性に影響を及ぼさない（特に損なわない）、前記配列を意味する。選択されるターゲット抗原に特異性を有する結合部位の場合、抗体の機能的に活性である変異体は、なお、あらかじめ決定された結合特異性を有するであろうが、これを変化させてもよく、例えば特定のエピトープに対する優れた特異性、アフィニティ、アビディティ、KonまたはKoff速度等を変化させてもよい。特に、本発明の抗体の機能的に活性である変異体は、本明細書にさらに記載するように、黄色ブドウ球菌のHlaおよび少なくとも1つの二成分毒素に結合する、多重特異性結合部位を有する。

40

【0074】

機能的に活性である変異体は、例えば親抗体の配列を変化させることによって得られる

50

ことも可能であり、例えば# A B - 2 4 と称される抗体と同じ結合部位を含むが、結合部位に加えて抗体領域内に修飾を含む抗体、あるいは抗原結合を損なわず、そして好ましくは、黄色ブドウ球菌または黄色ブドウ球菌毒素をターゲットとする特異的結合アッセイまたは機能試験によって決定されるように、特定の強度で、例えば実質的に同じ生物学的活性で、黄色ブドウ球菌の毒素に結合し、そして/または黄色ブドウ球菌を中和する能力を含めて、親抗体と類似の生物学的活性を有するであろう修飾によって、# A B - 2 4 抗体である親抗体に由来する抗体がある。用語「実質的に同じ生物学的活性」は、本明細書において、親抗体に関して決定されるような活性の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはさらに少なくとも100%、または少なくとも110%、または少なくとも120%、または少なくとも130%、または少なくとも140%、または少なくとも150%、または少なくとも160%、または少なくとも170%、または少なくとも180%、または少なくとも190%、例えば最大200%である、実質的に同じ活性によって示されるような活性を指す。

10

20

30

40

50

【0075】

好ましい態様において、親抗体の機能的に活性である変異体は

a) 抗体の生物学的活性断片であり、該断片は、分子の配列の少なくとも50%を含み、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも97%、98%または99%を含み；

b) 少なくとも1つのアミノ酸置換、付加および/または欠失によって、抗体から得られ、ここで、機能的に活性である変異体は、分子またはその部分に配列同一性を有し、例えば少なくとも50%の配列同一性、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも97%、98%または99%の配列同一性を有し；そして/または

c) 抗体またはその機能的に活性である変異体、およびポリペプチドまたはヌクレオチド配列に対して異種であるさらに少なくとも1つのアミノ酸またはヌクレオチドからなる。

【0076】

本発明の1つの好ましい態様において、本発明記載の抗体の機能的に活性である変異体は、本質的には、上記の変異体と同一であるが、異なる種の相同配列から得られている点で、それぞれ、そのポリペプチドまたはヌクレオチド配列とは異なる。これらは、天然存在変異体または類似体と称される。

【0077】

用語「機能的に活性である変異体」にはまた、天然存在アレル変異体、ならびに突然変異体または任意の他の非天然存在変異体も含まれる。当該技術分野に知られるように、アレル変異体は、ポリペプチドの生物学的機能を本質的には改変しない、1またはそれより多いアミノ酸の置換、欠失または付加を有すると特徴付けられる、(ポリ)ペプチドの代替型である。

【0078】

機能的に活性である変異体は、例えば1またはそれより多い点突然変異によって、ポリペプチドまたはヌクレオチド配列中の配列改変によって得られることも可能であり、ここで、配列改変は、本発明と組み合わせる用いられた際、改変されないポリペプチドまたはヌクレオチド配列の機能を保持する。こうした配列改変には、限定されるわけではないが、(保存的)置換、付加、欠失、突然変異および挿入が含まれうる。

【0079】

特定の機能的に活性である変異体は、CDR変異体である。CDR変異体には、CDR領域中の少なくとも1つのアミノ酸によって修飾されたアミノ酸配列が含まれ、ここで、前記修飾は、アミノ酸配列の化学的または部分的改変であってもよく、修飾は、変異体が

非修飾配列の生物学的特性を保持することを可能にする。CDRアミノ酸配列の部分的改変は、1から数個のアミノ酸、例えば1、2、3、4または5アミノ酸の欠失または置換によるか、あるいは1から数個のアミノ酸、例えば1、2、3、4または5アミノ酸の付加または挿入、あるいは1から数個のアミノ酸、例えば1、2、3、4または5アミノ酸の化学的誘導体化、あるいはその組み合わせであってもよい。アミノ酸残基における置換は、保存的置換、例えば1つの疎水性アミノ酸の別の疎水性アミノ酸に関する置換であってもよい。

【0080】

保存的置換は、側鎖および化学的特性において関連するアミノ酸ファミリー内で行われる置換である。こうしたファミリーの例は、塩基性側鎖、酸性側鎖、非極性脂肪族側鎖、非極性芳香族側鎖、非荷電極性側鎖、小側鎖、巨大側鎖等を含むアミノ酸である。

10

【0081】

点突然変異は、特に、1またはそれより多い単一の（非保存的）または二つ組のアミノ酸の異なるアミノ酸に関する置換または交換、欠失または挿入において、操作されないアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列の発現を生じる、ポリヌクレオチドの操作と理解される。

【0082】

好ましい点突然変異は、同じ極性および/または電荷のアミノ酸の交換を指す。これに関連して、アミノ酸は、64の3つ組コドンによってコードされる20の天然存在アミノ酸を指す。これらの20アミノ酸は、中性電荷、陽性電荷、および陰性電荷を有するものに分けられうる。

20

【0083】

「中性」アミノ酸を、それぞれの3文字および1文字コードおよび極性ととともに、以下に示す：

アラニン：(Ala、A)非極性、中性；
 アスパラギン：(Asn、N)極性、中性；
 システイン：(Cys、C)非極性、中性；
 グルタミン：(Gln、Q)極性、中性；
 グリシン：(Gly、G)非極性、中性；
 イソロイシン：(Ile、I)非極性、中性；
 ロイシン：(Leu、L)非極性、中性；
 メチオニン：(Met、M)非極性、中性；
 フェニルアラニン：(Phe、F)非極性、中性；
 プロリン：(Pro、P)非極性、中性；
 セリン：(Ser、S)極性、中性；
 スレオニン：(Thr、T)極性、中性；
 トリプトファン：(Trp、W)非極性、中性；
 チロシン：(Tyr、Y)極性、中性；
 バリン：(Val、V)非極性、中性；および
 ヒスチジン：(His、H)極性、陽性(10%)中性(90%)。

30

40

【0084】

「陽性」荷電アミノ酸は以下の通りである：
 アルギニン：(Arg、R)極性、陽性；および
 リジン：(Lys、K)極性、陽性。

【0085】

「陰性」荷電アミノ酸は以下の通りである：
 アスパラギン酸：(Asp、D)極性、陰性；および
 グルタミン酸：(Glu、E)極性、陰性。

【0086】

「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、抗体配列および本明細書記載の相同体に

50

関して、配列を整列させ、そして最大配列同一性パーセントを達成するために、必要であればギャップを導入した後、そしていかなる保存的置換も配列同一性の一部とは見なさずに、特定のポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合と定義される。当業者は、整列を測定するための適切なパラメータを決定することが可能であり、これには、比較しようとする配列の全長に渡って、最大整列を達成するために必要ないかなるアルゴリズムも含まれる。

【0087】

抗体変異体は、機能性であり、そして機能的同等物として働きうる、例えば特定のターゲットに結合し、そして機能的特性を持つ、例えば糖鎖工学によって産生される、特異的グリコシル化パターンを持つ相同体、類似体、断片、修飾または変異体を含むと特に理解される。本明細書に記載するような好ましい変異体は、抗原結合に関して機能的に活性であり、好ましくは黄色ブドウ球菌を中和する能力を有し、そして/または防御抗体である。

10

【0088】

本発明の抗体は、Fcエフェクター機能を示してもよいし、または示さなくてもよい。作用様式は、主に、Fcエフェクター機能を持たない中和抗体によって仲介されるが、Fcは、補体を補充し、そして免疫複合体の形成を通じて、循環からのターゲット抗原、例えば毒素の除去を補助することも可能である。

【0089】

特異的抗体は、活性Fc部分を欠き、したがって、抗体のFc部分を含有しないか、またはFcガンマ受容体結合部位を含有しない抗体ドメインで構成されるかいずれかであってもよいし、あるいは例えばFcエフェクター機能を減少させる、特にADCCおよび/またはCDC活性を無効にするかまたは減少させる修飾によって、Fcエフェクター機能を欠く抗体ドメインを含んでもよい。代替抗体を操作して、Fcエフェクター機能を増加させる、特にADCCおよび/またはCDC活性を増進させる修飾を取り込むことも可能である。

20

【0090】

こうした修飾は、突然変異誘発、例えばFcガンマ受容体結合部位の突然変異によって、あるいは抗体形式のADCCおよび/またはCDC活性に干渉する誘導体または剤によって、達成可能であり、こうしてFcエフェクター機能の減少または増加を達成することも可能である。

30

【0091】

Fcエフェクター機能の有意な減少は、典型的には、ADCCおよび/またはCDC活性によって測定されるような、非修飾(野生型)形式の10%未満のFcエフェクター機能、好ましくは5%未満のFcエフェクター機能を指すと理解される。

【0092】

Fcエフェクター機能の有意な増加は、典型的には、ADCCおよび/またはCDC活性によって測定されるような、非修飾(野生型)形式の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%または50%のFcエフェクター機能の増加を指すと理解される。

40

【0093】

用語「糖鎖操作(glycoengineered)」変異体は、抗体配列に関して、糖鎖操作の結果として、修飾された免疫原性特性、ADCCおよび/またはCDCを有するグリコシル化変異体を指すものとする。すべての抗体は、重鎖定常領域において、保存された位で炭水化物構造を含有し、各アイソタイプは、N連結炭水化物構造の異なるアレイを所持し、これはタンパク質アセンブリ、分泌または機能活性に多様に影響を及ぼす。IgG1タイプの抗体は、各CH2ドメインのAsn297に保存されたN連結グリコシル化部位を有する糖タンパク質である。Asn297に付着した2つの複雑な二分岐オリゴ糖は、CH2ドメインの間に包埋され、ポリペプチド主鎖との広範な接触を形成し、そしてその存在は、抗体が抗体依存性細胞傷害性(ADCC)などのエフェクター機能を仲

50

介するために必須である。例えば、N297の例えばAへの突然変異、またはT299を通じて、N297のN-グリカンを除去すると、典型的には、ADCCが減少した無グリコシル化抗体形式が生じる。

【0094】

抗体グリコシル化の大きな相違は細胞株間で生じ、そして異なる培養条件下で増殖する所定の細胞株に関してであってもわずかな相違が見られる。細菌細胞における発現は、典型的には、無グリコシル化抗体を提供する。テトラサイクリンが制御する、二分GlcNAcの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII(GnTII)の発現を伴うCHO細胞は、改善されたADCC活性を有すると報告された(Umanaら, 1999, Nature Biotech. 17:176-180)。宿主細胞の選択に加えて、抗体の組換え産生中のグリコシル化に影響を及ぼす要因には、増殖様式、培地配合、培養密度、酸素添加、pH、精製スキーム等が含まれる。

10

【0095】

用語「抗原結合部位」または「結合部位」は、抗原結合に関与する抗体部分を指す。抗原結合部位は、重(「H」)鎖および/または軽(「L」)鎖のN末端可変(「V」)領域、あるいはその可変ドメインのアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と称される、重鎖および軽鎖のV領域内の3つの非常に多様なストレッチは、フレームワーク領域として知られる、より保存された隣接ストレッチの間に挿入される。抗原結合部位は、結合するエピトープまたは抗原の三次元表面に相補的な表面を提供し、そして超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と称される。CDR中に取り込まれる結合部位は、本明細書において、また、「CDR結合部位」とも称される。

20

【0096】

用語「抗原」は、本明細書において、用語「ターゲット」または「ターゲット抗原」と交換可能に用いられ、全ターゲット分子または抗体結合部位によって認識されるこうした分子の断片を指すものとする。具体的には、免疫学的に適切である、一般的に「エピトープ」、例えばB細胞エピトープまたはT細胞エピトープと称される、抗原の部分構造、例えばポリペプチドまたは炭水化物構造は、こうした結合部位によって認識されうる。

【0097】

用語「エピトープ」は、本明細書において、特に、抗体の結合部位に対する特異的結合パートナーを完全に構成してもよいし、または特異的結合パートナーの一部であってもよい、分子構造を指すものとする。エピトープは、炭水化物、ペプチド性構造、脂肪酸、有機、生化学的または無機物質またはその誘導体、およびその任意の組み合わせのいずれで構成されてもよい。エピトープが、ペプチド性構造、例えばペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質で構成される場合、通常、これには、少なくとも3アミノ酸、好ましくは5~40アミノ酸、そしてより好ましくは約10~20の間のアミノ酸が含まれるであろう。エピトープは直鎖またはコンホメーションエピトープのいずれかであってもよい。直鎖エピトープは、ポリペプチドまたは炭水化物鎖の一次配列の単一セグメントで構成される。直鎖エピトープは近接していてもまたは重複していてもよい。コンホメーションエピトープは、ポリペプチドをフォールディングして、三次構造を形成することによって寄せ集められたアミノ酸または炭水化物で構成され、そしてアミノ酸は、直鎖配列においては、互いに必ずしも隣接しない。具体的には、そしてポリペプチド抗原に関しては、コンホメーションエピトープまたは不連続エピトープは、一次配列中では分離されているが、ポリペプチドが天然タンパク質/抗原にフォールディングした際には分子表面上の一貫した構造に集合する、2またはそれより多い分散したアミノ酸残基の存在によって特徴付けられる。

30

40

【0098】

本明細書において、用語「エピトープ」は、特に、抗体に認識される単一のエピトープ、または各々、交差反応性抗体によって認識されるエピトープ変異体を含むエピトープ混合物を指すものとする。

50

【0099】

用語「発現」は、以下のように理解される。発現産物、例えば本明細書に記載するような抗体の望ましいコード配列を含有する核酸分子、および機能可能であるように連結された制御配列、例えばプロモーターを、発現目的のために用いてもよい。これらの配列で形質転換されたかまたはトランスフェクションされた宿主は、コードされるタンパク質を産生可能である。形質転換を達成するため、発現系はベクター中に含まれていてもよい；が、適切なDNAはまた宿主染色体内に組み込まれてもよい。具体的には、該用語は、例えばベクターによって所持され、そして宿主細胞に導入される、外来(foreign)DNAによってコードされるタンパク質の発現のために適切な条件下にある、宿主細胞および適合するベクターを指す。

10

【0100】

コードDNAは、例えば抗体のような特定のポリペプチドまたはタンパク質のための特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列である。プロモーターDNAは、コードDNAの発現を開始するか、制御するか、あるいは別の方式で仲介するかまたは調節するDNA配列である。プロモーターDNAおよびコードDNAは、同じ遺伝子由来であってもよいし、または異なる遺伝子由来であってもよく、そして同じまたは異なる生物由来であってもよい。組換えクローニングベクターには、しばしば、クローニングまたは発現のための1またはそれより多い複製系、宿主における選択のための1またはそれより多いマーカー、例えば抗生物質耐性、および1またはそれより多い発現カセットが含まれるであろう。

20

【0101】

「ベクター」は、本明細書において、適切な宿主生物において、クローニングされた組換えヌクレオチド配列、すなわち組換え遺伝子の転写、およびそのmRNAの翻訳に必要な、DNA配列と定義される。

【0102】

「発現カセット」は、定義される制限部位でベクター内に挿入可能な発現産物をコードする、DNAコード配列またはDNAセグメントを指す。カセット制限部位は、適切なリーディングフレームでのカセットの挿入を確実にするよう設計される。一般的に、外来DNAは、ベクターDNAの1またはそれより多い制限部位で挿入され、そして次いで、ベクターによって、伝達性ベクターDNAとともに、宿主細胞内に運ばれる。挿入されたまたは付加されたDNAを有するDNAのセグメントまたは配列、例えば発現ベクターはまた、「DNA構築物」とも称されうる。

30

【0103】

発現ベクターは発現カセットを含み、そしてさらに通常、宿主細胞またはゲノム組込み部位における自立複製起点、1またはそれより多い選択可能マーカー（例えばアミノ酸合成遺伝子、あるいは抗生物質、例えばゼオシン、カナマイシン、G418またはハイグロマイシンに対する耐性を与える遺伝子）、いくつかの制限酵素切断部位、適切なプロモーター配列および転写終結因子を含み、これらの成分は、機能可能であるように共に連結される。用語「ベクター」には、本明細書において、自律性複製ヌクレオチド配列、ならびにゲノム組込みヌクレオチド配列が含まれる。ベクターの一般的なタイプは「プラスミド」であり、これは一般的に、さらなる（外来）DNAを容易に受け入れ可能であり、そして適切な宿主細胞内に容易に導入可能である、二本鎖DNAの自己完結型分子である。プラスミドベクターは、しばしば、コードDNAおよびプロモーターDNAを含有し、そして外来DNAを挿入するのに適した1またはそれより多い制限部位を有する。具体的には、用語「ベクター」または「プラスミド」は、宿主を形質転換し、そして導入した配列の発現（例えば転写および翻訳）を促進するように、DNAまたはRNA配列（例えば外来遺伝子）が宿主細胞内に導入可能であるビヒクルを指す。

40

【0104】

用語「宿主細胞」は、本明細書において、特定の組換えタンパク質、例えば本明細書記載の抗体を産生するよう形質転換された一次対象細胞、およびその任意の子孫を指すものとする。すべての子孫が親細胞と正確に同一ではないが（計画的なまたは偶発性の突然変

50

異、あるいは環境の相違による)、こうした改変された子孫は、子孫が元来形質転換された細胞のものと同じ機能性を保持する限り、これらの用語に含まれることが理解されなければならない。用語「宿主細胞株」は、組換え抗体などの組換えポリペプチドを産生する組換え遺伝子を発現するために用いられるような宿主細胞の細胞株を指す。用語「細胞株」は、本明細書において、長期間に渡って増殖する能力を獲得した、特定の細胞タイプの樹立されたクローンを指す。こうした宿主細胞または宿主細胞株を細胞培養中に維持し、そして/またはこれを培養して組換えポリペプチドを産生することも可能である。

【0105】

組成物、例えば、抗原またはエピトープを含む、本明細書において「免疫原」とも称される免疫原性組成物、あるいは本明細書に記載するようなワクチンに対する「免疫反応」は、関心対象の組成物またはワクチンに対する、細胞および/または抗体仲介性免疫反応の、宿主または被験体における発展である。通常、こうした反応は、関心対象の組成物またはワクチン中に含まれる単数または複数の抗原に対して特異的に向けられる、被験体が産生する抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞、および/または細胞傷害性T細胞からなる。

10

【0106】

「防御免疫反応」は、非免疫集団のものに比較して、誘導されたかまたは天然の感染または毒素曝露の、有意により優れた結果を提供する免疫反応と理解される。毒素に対する防御免疫反応は、主に、高いアフィニティを有する、例えば 10^{-8} M未満の K_d を持つ中和抗体によって仲介される。毒素中和の利点は、ターゲット細胞の保護および炎症の防止である。Fc仲介性免疫複合体形成は、循環から毒素を除去する(RES細胞を介する)ことによってまた寄与しうる。

20

【0107】

免疫原または免疫原性組成物は、通常、抗原またはエピトープおよびキャリアーを含み、キャリアーは特にアジュバントを含んでもよい。用語「アジュバント」は、抗原と組み合わせ投与された際、抗原に対する免疫反応を増大し、そして/または再指示するが、単独で投与された際には、抗原に対する免疫反応を生じない化合物を指す。アジュバントは、リンパ球補充、Bおよび/またはT細胞刺激、ならびにマクロファージ刺激を含む、いくつかの機構によって、免疫反応を増大させうる。例示的なキャリアーは、リボソームまたは陽イオン性ペプチドであり;例示的なアジュバントは、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム、MF59またはCpGオリゴヌクレオチドである。

30

【0108】

用語「単離された」または「単離」は、本明細書において、核酸、抗体または他の化合物に関して、「実質的に純粋な」型で存在するように、こうした化合物が天然に会合するであろう環境から十分に分離されている化合物を指すものとする。「単離された」は、他の化合物または物質との人工的なまたは合成混合物、あるいは基本的活性に干渉せず、そして例えば不完全な精製のために存在しうる不純物の存在の排除を必ずしも意味しない。特に、本発明の単離された核酸分子はまた、化学的に合成されたものも含むよう意図される。

【0109】

本発明の核酸に関連して、用語「単離された核酸」が時に用いられる。この用語は、DNAに適用された際、由来する生物の天然存在ゲノムにおいて直ちに隣接する配列から分離されたDNA分子を指す。例えば「単離された核酸」は、ベクター、例えばプラスミドまたはウイルスベクター内に挿入されたか、あるいは原核または真核細胞または宿主生物のゲノムDNA内に組み込まれたDNA分子を含むことも可能である。RNAに適用された際、用語「単離された核酸」は、主に、上に定義するような単離されたDNA分子にコードされるRNA分子を指す。あるいは、該用語は、天然状態で(すなわち細胞または組織において)会合するであろう他の核酸から十分に分離されているRNA分子を指すものとする。「単離された核酸」(DNAまたはRNAいずれか)は、さらに、生物学的または合成的手段によって直接産生され、そしてその産生中に存在する他の成分から分離され

40

50

ている分子を指すことも可能である。

【0110】

ポリペプチドまたはタンパク質、例えば本発明の抗体またはエピトープに関連して、用語「単離された」は、特に、例えば天然環境において、あるいはこうした調製が *in vitro* または *in vivo* で実施される組換えDNA技術による場合、調製される環境（例えば細胞培養）において、ともに見られる他の化合物などの、天然に会合している物質を含まないかまたは実質的に含まない、化合物を指す。単離された化合物を、希釈剤またはアジュバントとともに配合してもよく、そしてなお、単離される実際的な目的のため、例えば、診断または療法に用いる際には、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを薬学的に許容されうるキャリアーまたは賦形剤と混合してもよい。

10

【0111】

用語「中和性」または「中和」は、本明細書において、最も広い意味で用いられ、そして中和が達成される機構に関わらず、病原体、例えば黄色ブドウ球菌に、被験体が感染するのを阻害するか、または病原体が強力なタンパク質毒素を産生することによって感染を促進するのを阻害するか、または毒素が被験体においてターゲット細胞を損傷するのを阻害する、任意の分子を指す。中和は、例えば、ターゲット細胞上の同族受容体と黄色ブドウ球菌毒素（単数または複数）の結合および/または相互作用を阻害する抗体によって、達成可能である。特定の態様において、本明細書記載の抗体は、毒素活性を中和させることも可能であり、ここで、毒素およびターゲット細胞、例えば赤血球の間の相互作用の *in vivo* または *in vitro* 効果は、減少するかまたは排除される。中和はさらに、活性毒素の形成を阻害することによって、例えば黄色ブドウ球菌二成分細胞溶解素の場合、SおよびF成分の結合、または細胞膜におけるオリゴマー性孔の形成の阻害によって、起こることも可能である。

20

【0112】

細胞溶解性毒素に対する抗体の中和能は、典型的には、所定の毒素に感受性である細胞の増加した生存度または機能性を測定することによって、標準アッセイにおいて決定される。中和は、抗体を含むおよび含まない生存細胞のパーセントによって表されうる。非常に強力な抗体に関しては、中和強度を表す好ましい方式は、抗体：毒素モル比であり、ここで、より低い値はより高い強度に対応する。1未満の値は非常に高い強度を定義する。

30

【0113】

用語「交差中和性」は、本明細書において、いくつかの毒素、例えば交差反応性または多重特異性抗体によって認識される交差反応性エピトープを取り込む毒素の中和を指すものとする。

【0114】

用語「黄色ブドウ球菌」または「S. アウレウス」または「病原性黄色ブドウ球菌」は、以下のように理解される。黄色ブドウ球菌細菌は、通常、人間および動物の皮膚上または鼻中に見られる。該細菌は、切り傷または他の創傷を通じて体内に進入しない限り、一般的には無害である。典型的には、感染は、健康な人々においては、重要でない皮膚の問題である。歴史的には、感染は、広域抗生物質、例えばメチシリンによって治療された。しかし、現在、メチシリンおよび他のベータ-ラクタム抗生物質、例えばペニシリンおよびセファロスポリンに耐性である特定の株が出現してきている。これらはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（また、多剤耐性黄色ブドウ球菌、または「MRSA」としても知られる）と称される。

40

【0115】

重要なヒト病原体である黄色ブドウ球菌は、多数の分泌毒素（外毒素）を発現する。これらは、赤血球、好中性顆粒球および他の免疫細胞、ならびに肺または皮膚の上皮細胞を含む、多様な宿主細胞タイプを攻撃しうる。黄色ブドウ球菌毒素の主なメンバーは、リンパ球、マクロファージ、肺上皮細胞および肺内皮細胞に対して細胞溶解機能を発揮する、アルファ溶血素（H1a）である。

【0116】

50

M R S A を含む黄色ブドウ球菌感染は、一般的には、面疱、おできまたはクモの咬傷に似た小さな赤い隆起として始まる。これらの隆起または傷 (b l e m i s h e s) は、急速に、外科的排出を必要とする、深く有痛性の膿瘍に変わりうる。細菌は時に皮膚に限定されたままである。場合によって、これらは体の深部に掘り込まれて、皮膚、軟組織、骨、関節、外科的創傷、血流、心臓弁、肺、または他の臓器を含む、広い範囲のヒト組織において、潜在的に生命の危険を伴う感染を引き起こしうる。したがって、黄色ブドウ球菌感染は、潜在的に致死性の疾患、例えば壊死性筋膜炎、心内膜炎、敗血症、毒素性ショック症候群、および壊死性肺炎を含む多様な型の肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブネル症における毒素産生である、関連する疾患状態を生じうる。M R S A 感染は、患者が開放性創傷、侵襲性デバイス、および弱った免疫系のリスクにあるか、またはこうした

10

20

30

40

50

【 0 1 1 7 】

黄色ブドウ球菌毒素を中和する抗体は、病原体および病原性反応に干渉し、したがって、感染を限定するかまたは防止し、そして / またはこうした感染から生じる疾患状態を寛解させるか、あるいは黄色ブドウ球菌病変形成、特に肺炎病変形成を阻害することが可能である。これに関連して、「防御抗体」は、本明細書において、能動免疫または受動免疫において観察される感染性病原体に対する免疫を担う中和抗体と理解される。特に、本明細書に記載するような防御抗体は、分泌される病原性因子 (外毒素) の毒性効果 (例えば細胞溶解、ターゲット細胞による炎症誘発性サイトカイン発現の誘導) を中和することが可能であり、そしてしたがって、黄色ブドウ球菌の病変形成能に干渉する。

【 0 1 1 8 】

用語「組換え」は、本明細書において、「遺伝子操作によって調製されるかまたは遺伝子操作の結果」を意味するものとする。組換え宿主は、特に、発現ベクターまたはクローニングベクターを含むか、あるいは特に宿主に対して外来性であるヌクレオチド配列を使用して、組換え核酸配列を含有するよう遺伝子操作されている。組換えタンパク質は、宿主においてそれぞれの組換え核酸を発現することによって産生される。用語「組換え抗体」には、本明細書において、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるか、または単離される抗体、例えば (a) ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるかまたはトランス染色体性 (t r a n s c h r o m o s o m a l) である動物 (例えばマウス) あるいはそこから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、 (b) 抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクターマから単離された抗体、 (c) 組換えコンビナトリアル・ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および (d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他の D N A 配列へのスプライシングを伴う、任意の他の手段によって調製されるか、発現されるか、生成されるかまたは単離される抗体が含まれる。こうした組換え抗体は、例えば抗体成熟中に生じる再編成および突然変異を含むよう操作される抗体を含む。

【 0 1 1 9 】

本明細書において、用語「特異性」または「特異的結合」は、分子の不均一集団において、関心対象の同族リガンドの決定要因である結合反応を指す。したがって、明示される条件 (例えばイムノアッセイ条件) 下で、抗体は、特定のターゲットに特異的に結合し、そして試料中に存在する他の分子には、有意な量では結合しない。特異的結合は、結合が、選択されるように、ターゲット同一性、高い、中程度または低い結合アフィニティまたはアビディティに関して選択性であることを意味する。選択的結合性は、通常、結合定数または結合動力学が少なくとも 1 0 倍異なる場合、好ましくは相違が少なくとも 1 0 0 倍である場合、そしてより好ましくは少なくとも 1 0 0 0 倍である場合、達成される。

【 0 1 2 0 】

該用語はまた、例えば抗体が、いくつかの抗原に交差反応性である特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、この場合、特異的抗体は、交差反応性エピトープを所持する多様な抗原に結合可能であろう。抗体のこうした結合部位または交差反応性エ

ピトープに結合する特異性を持つ抗体はまた、それぞれ、多重特異性または交差特異性結合部位および抗体とも称される。例えば、抗体は、エピトープ内の配列相同性および/または構造的類似性を持ち、本質的に同じ構造のコンホメーションエピトープを提供する、多くの異なる抗原と交差反応性である、例えば少なくとも黄色ブドウ球菌のH1aおよび二成分毒素に交差反応性であるエピトープに特異的に結合する、多重特異性結合部位を有してもよい。

【0121】

交差反応性結合配列に抗体が示す、抗体の免疫特異性、その結合能および付随するアフィニティは、抗体が免疫反応する(結合する)交差反応性結合配列によって決定される。交差反応性結合配列特異性は、少なくとも部分的に、抗体の免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸残基によって、および/または軽鎖可変領域アミノ酸残基配列によって、定義されうる。

10

【0122】

用語「同じ特異性を有する」、「同じ結合部位を有する」または「同じエピトープに結合する」の使用は、同等のモノクローナル抗体が、同じまたは本質的に同じ、すなわち類似の免疫反応(結合)特性を示し、そしてあらかじめ選択されたターゲット結合配列への結合に関して競合することを示す。特定のターゲットに対する抗体分子の相対的特異性は、競合アッセイによって、例えばHarlowら, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988に記載されるように、相対的に決定可能である。

20

【0123】

用語「被験体」は、本明細書において、温血哺乳動物、特にヒトまたは非ヒト動物を指すものとする。MRSAは、非常に重要なヒト病原体であり、これはまた、獣医学においても新たに発生している懸念である。該細菌は、広い範囲の非ヒト動物種に存在する。したがって、用語「被験体」はまた、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタおよび家禽を含む動物もまた特に指す可能性もある。特に、本発明の医学的使用またはそれぞれの治療法は、黄色ブドウ球菌感染に関連する疾患状態の予防または治療が必要な被験体に適用される。被験体は、黄色ブドウ球菌感染のリスクがあるか、あるいは初期または後期疾患を含む疾患を患っている患者であってもよい。用語「患者」には、予防的または療法的治療のいずれかを受けているヒトおよび他の哺乳動物被験体が含まれる。用語「治療」は、したがって、予防的および療法的治療の両方を含むよう意図される。

30

【0124】

被験体は、例えば、黄色ブドウ球菌疾患状態の予防または療法のために治療される。特に、感染の、あるいはこうした疾患または疾患再発を進展させるかいずれかのリスクがある被験体、あるいはこうした感染および/またはこうした感染に関連する疾患を患う被験体が治療される。

【0125】

特に、用語「予防」は、病変形成の開始の防止または病変形成のリスクを減少させる予防的手段を含むよう意図される、防御手段を指す。

40

【0126】

特に、本明細書に記載するような被験体における疾患状態を治療するか、防止するか、または遅延させるための方法は、状態の原因病原体としての黄色ブドウ球菌の病変形成に干渉することにより、ここで病変形成には、例えば特定の病原性因子または毒素による、被験体の細胞膜上に孔を形成する工程が含まれる。

【0127】

用語「毒素」は、本明細書において、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素(H1a)および二成分毒素を指すものとする。

【0128】

黄色ブドウ球菌の病原性は、細菌が真核細胞膜に接着することを可能にする表面会合タ

50

ンパク質、オプソニン化貪食作用から細菌を保護する莢膜多糖類、およびいくつかの外毒素を含む、多くの病原性因子の組み合わせによる。黄色ブドウ球菌は、主に、分泌される病原性因子、例えば溶血素、エンテロトキシンおよび毒素性ショック症候群毒素の産生を通じて疾患を引き起こす。これらの分泌される病原性因子は、宿主における多くの免疫学的機構を不活性化させることによって、免疫反応を抑制し、そして組織破壊を引き起こし、そして感染確立を補助する。後者は、孔形成毒素群によって達成され、このうち最も顕著なものが、黄色ブドウ球菌肺炎の重要な病原性因子であるH1aである。

【0129】

黄色ブドウ球菌は、この細菌が異なる種類の免疫細胞、特に体の主な防御系を構成する白血球の下位集団による攻撃を中和し、そしてこれに抵抗することを可能にする、多様なアレイのさらなる病原性因子および毒素を産生する。これらの病原性因子および毒素の産生は、黄色ブドウ球菌が感染状態を維持することを可能にする。これらの病原性因子のうち、黄色ブドウ球菌は、いくつかの二成分ロイコトキシンを産生し、これは、2つの関連しないタンパク質またはサブユニットの相乗作用によって、宿主防御細胞および赤血球の膜を損傷する。これらの二成分毒素のうち、ガンマ溶血素(H1gABおよびH1gCB)およびパントン-パレンタイン・ロイコシジン(PVL)が最もよく特徴付けられている。

10

【0130】

哺乳動物細胞に対するロイコシジンの毒性は、二成分の作用を伴う。最初のサブユニットはクラスS成分と称され、そして第二のサブユニットはクラスF成分と称される。SおよびFサブユニットは相乗的に作用して、単球、マクロファージ、樹状細胞および好中球(集合的に、食細胞として知られる)を含む白血球上に孔を形成する。黄色ブドウ球菌によって産生される二成分ロイコトキシンのレパートリーは、FおよびS成分の同族および非同族対を含むことが知られ、これには、例えば本明細書に記載するような好ましいターゲットである、ガンマ溶血素、PVL毒素およびPVL様毒素が含まれ、H1gAB、H1gCB、LukSF、LukED、LukGH、LukS-H1gB、LukSD、H1gA-LukD、H1gA-LukF、LukG-H1gA、LukEF、LukE-H1gB、H1gC-LukDまたはH1gC-LukFが含まれる。図1は、いくつかの主な二成分毒素の概観を提供する。

20

【0131】

用語「実質的に純粋」または「精製された」は、本明細書において、少なくとも50%(w/w)、好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%または95%の化合物、例えば核酸分子または抗体を含む調製物を指すものとする。純度は、化合物に適した方法によって測定される(例えばクロマトグラフィ法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC分析等)。

30

【0132】

用語「療法的に有効な量」は、本明細書において、用語、化合物、例えば本発明の抗体または免疫原の「有効量」または「十分量」のいずれとも交換可能に用いられ、被験体に投与された際、有益なまたは望ましい、臨床的な結果を含む結果を達成するのに十分な量または活性であり、そしてこうしたものとして、有効量またはその同義語は、適用される背景に応じる。

40

【0133】

有効量は、こうした疾患または障害を治療するか、防止するかまたは阻害するのに十分である化合物の量を意味するよう意図される。疾患の背景において、本明細書に記載するような抗体の療法的有効量は、特に、黄色ブドウ球菌または黄色ブドウ球菌病変形成の阻害から利益を受ける、疾患または状態を治療するか、調節するか、減弱させるか、逆転させるか、または影響を及ぼすように用いられる。

【0134】

こうした有効量に対応するであろう化合物の量は、多様な要因、例えば所定の薬剤または化合物、薬学的配合物、投与経路、疾患または障害のタイプ、治療される被験体または

50

宿主の同一性等に応じて多様であろうが、にもかかわらず、当業者によってルーチンに決定可能である。

【0135】

本発明の抗体または免疫原を予防的に用いて、黄色ブドウ球菌感染の開始を阻害するか、または黄色ブドウ球菌感染、特に抵抗性であることが知られるか、または特定の被験体の場合、他の慣用的な抗生物質療法での治療に抵抗性であることが立証されている、MRSAなどの黄色ブドウ球菌感染を治療することも可能である。

【0136】

治療の必要があるヒト患者に提供されるような、本明細書記載の抗体の療法的有効量は、特に、0.5~500mg、好ましくは1~400mg、さらにより好ましくは最大300mg、最大200mg、最大100mgまたは最大10mgの範囲であることも可能であるが、例えば、急性疾患状態を治療するために、より高い用量が示されうる。

10

【0137】

さらに、療法的有効量の本発明の抗体での被験体の治療または防止投与計画は、単回投与からなることも可能であるし、あるいは一連の適用を含んでもよい。例えば、抗体を少なくとも1年に1回、少なくとも半年に1回または少なくとも1ヶ月に1回投与してもよい。しかし、別の態様において、所定の治療のため、週あたり約1回からほぼ毎日の投与で、抗体を被験体に投与してもよい。治療期間の長さは、多様な要因、例えば疾患の重症度、急性または慢性疾患であるか、患者の年齢、抗体形式の濃度および活性に応じる。治療または予防に用いられる有効投薬量は、特定の治療または予防投与計画の経過に渡って増加させてもまたは減少させてもよいこともまた、認識されるであろう。投薬量変化は、当該技術分野に知られる標準的診断アッセイによって生じ、そして明らかになりうる。いくつかの例では、長期投与が必要でありうる。

20

【0138】

黄色ブドウ球菌感染と関連する疾患状態を発展させるリスクがある患者に提供されるものなどの、本明細書に記載するような免疫原の有効量は、特に、用量あたり、1~15mg/kgの範囲であることも可能である。

【0139】

例えば、プライム-ブースト免疫スキームにしたがって、免疫原を最初の用量として投与して、その後、特定の時間枠内で、1またはそれより多いブースター用量（単数または複数）を投与して、黄色ブドウ球菌感染に対する長期持続性の有効な免疫反応を誘導してもよい。好ましいワクチン接種スケジュールは、3回の用量、例えば第0日の最初の用量、第5~40日の第二の用量、および第10~100日の第三の用量、好ましくは第0日、第28日および第90日の投与を含むであろう。好ましい加速スケジュールにしたがって、投与は第0日、第7日および第14日であってもよい。加速スケジュールは、予防のため、例えば待機手術に直面している患者のために示されうる。通常、ミョウバンがアジュバントとして、例えばリン酸塩または水酸化物として、用いられる。

30

【0140】

したがって、本発明は特に、20~28%の配列相同性で、黄色ブドウ球菌のアルファ溶血素および二成分毒素の両方を交差中和するモノクローナル抗体を指す。配列相同性が低レベルであるため、これは驚くべきことであった。H1aおよび少なくとも1つの二成分毒素を交差中和するmAbが生じる可能性は、低いと予期された。

40

【0141】

詳細な作用様式は解明すべきままであるが、#AB-24（#9028）に関して得られたデータは、大きな潜在的値であり、そしてアルファ溶血素および多数の二成分毒素もまた中和する単一抗体の最初の概念証明を提供する。

【0142】

多重二成分特異性抗体を記載する最初の刊行物（Laventie, PNAS, 2011:16404）は、LukSおよびHlgCに対する二重特異性が、2つの異なる結合部位を利用する二重特異性抗体を設計することによって生成されたため、本発明とは

50

関連しないと見なされる。対照的に、本発明は、異なる毒素、例えば4つの異なる毒素：アルファ毒素およびガンマ溶血素のF成分、パンテン・バレンタイン・ロイコシジン（PVL、LukSF）およびLukEDに結合可能な同じ結合部位を指す。LukEDおよびLukSFに対する高いアミノ酸相同性に基づいて、四重反応性mAbがまた、ウシLukMロイコシジンにも結合する可能性が高い。

【0143】

いくつかの態様において、H1a上のエピトープを認識し、そしてH1gAと交差反応する本発明の抗体は、H1gC、LukS-PVL、LukHLukS-I、LukE、LukEv、およびLukMなどの、他のブドウ球菌ロイコシジンS成分とさらに交差反応性を有することも可能である。同様に、いくつかの態様において、H1a上のエピトープを認識し、そしてH1gBと交差反応する本発明の抗体は、LukF'-PV、LukF-PV、LukDv、LukD、LukF-I、およびLukGなどの、他のブドウ球菌ロイコシジンF成分とさらに交差反応性を有することも可能である。本発明の交差反応性抗H1gAおよび/または抗H1gB抗体は、それぞれ、H1gA活性およびH1gB活性を阻害するかまたは減少させることも可能である。いくつかの態様において、交差反応性抗H1gAおよび/または抗H1gB抗体は、それぞれ、H1gAおよびH1gB活性を中和する、例えば実質的に除去する。

10

【0144】

特定の側面にしたがって、同じエピトープに結合する抗体を提供し、該用語には、#AB-24と称される抗体と本質的に同じエピトープに結合するか、または同じ結合部位を含む変異体が含まれ、該用語には、#AB-24と称される抗体と本質的に同じ結合部位を含む変異体が含まれる。#AB-24抗体および機能的に活性である変異体は、H1aを強力に中和し、そしてLukS-LukF、LukE-LukD、およびH1gB-H1gCの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの同族毒素対、ならびに場合によってはさらに二成分毒素を交差中和する結合部位を特に含むであろう。

20

【0145】

抗体は、所定の時点で1つの抗体のみがエピトープに結合可能であるように、抗体が交差競合する場合、すなわち1つの抗体が他方の結合または調節効果を防止する場合、「同じエピトープに結合する」か、または「同じ結合部位を含む」か、または「本質的に同じ結合を有する」と言われる。

30

【0146】

用語「競合する」または「交差競合する」は、本明細書において、抗体に関して用いられる場合、同族エピトープと第一の抗体の結合の結果が、第二の抗体の非存在下での第一の抗体の結合に比較して、第二の抗体の存在下で、検出可能に減少するように、第一の抗体、またはその抗原結合部分が、第二の抗体、またはその抗原結合部分の結合に十分に類似の方式でエピトープに結合することを意味する。これとは別に、エピトープへの第二の抗体の結合がまた、第一の抗体の存在下でやはり検出可能に減少する場合もありうるが、そうである必要はない。すなわち、第一の抗体は、第二の抗体がそれぞれのエピトープに対する第一の抗体の結合を阻害することを伴わずに、そのエピトープへの第二の抗体の結合を阻害可能である。しかし、各抗体が、同じ、より高いまたはより低い度合いのいずれであっても、同族エピトープと他の抗体の結合を検出可能に阻害する場合、抗体は、それぞれのエピトープ（単数または複数）の結合に関して互いに「交差競合する」と言われる。競合および交差競合抗体はどちらも、本発明に含まれる。

40

【0147】

本明細書の競合は、例えば実施例セクションに記載されるように、競合ELISA分析によって決定した際、約30%より大きい相対阻害を意味する。特定の背景において、例えば競合分析を用いて、黄色ブドウ球菌のさらなるまたは他の毒素の結合の意図される機能を持つように設計される新規抗体に関して選択するかまたはスクリーニングする場合、何が競合の適切なレベルであるかの基準として、相対阻害のより高い閾値を設定することが望ましい可能性もある。したがって、例えば、競合結合に関して、基準を設定すること

50

が可能であり、ここで、抗体が十分に競合性であると見なされる前に、少なくとも40%の相対阻害が検出されるか、あるいは少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはさらに少なくとも100%が検出される。

【0148】

具体的には、# A B - 2 4 と称される抗体の可変領域、特に C D R 配列の少なくとも1つ、好ましくは C D R 配列の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つ、あるいは機能的に活性であるその C D R 変異体を含む抗体を提供する。より具体的には、# A B - 2 4 と称される抗体を提供する。

【0149】

具体的には、寄託される物質、例えば寄託されるプラスミドの1つまたは両方ならびに/あるいは寄託される宿主細胞の1つまたは両方を使用して、# A B - 2 4 抗体または任意のその機能的に活性である変異体を産生してもよい。

【0150】

特定の側面にしたがって、本発明のプラスミドにコードされる抗体から、例えば寄託される物質の部分配列を使用して、# A B - 2 4 抗体またはその任意の機能的に活性である変異体を操作して、抗体を得てもよい。

【0151】

さらなる特定の側面にしたがって、D S M 2 6 7 4 7 および/または D S M 2 6 7 4 8 の下に寄託される宿主細胞によって産生される抗体から、例えば寄託される物質の部分配列を使用して、# A B - 2 4 抗体またはその任意の機能的に活性である変異体を操作して、# A B - 2 4 抗体または任意のその機能的に活性である変異体を得てもよい。

【0152】

具体的には、# A B - 2 4 変異体は、例えば C D R 配列の少なくとも1つに部分的改変を伴い、機能的に活性である C D R 変異体である。

【0153】

特定の側面において、本発明は、重鎖および軽鎖を含み、任意の重鎖または V H 可変領域またはそれぞれの C D R が、それぞれの寄託されるプラスミドから、そして/またはそれぞれの寄託される宿主細胞から得られるようなアミノ酸配列を含む、こうした変異体抗体、好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒト抗体を提供する。

【0154】

特定の側面において、本発明は、重鎖および軽鎖を含み、任意の軽鎖または V L 可変領域またはそれぞれの C D R が、それぞれの寄託されるプラスミドから、そして/またはそれぞれの寄託される宿主細胞から得られるようなアミノ酸配列を含む、こうした変異体抗体、好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒト抗体を提供する。

【0155】

特定の側面において、本発明は、重鎖および軽鎖を含み、任意の重鎖および軽鎖、または V H / V L 可変領域、またはそれぞれの C D R が、それぞれの寄託されるプラスミドから、そして/またはそれぞれの寄託される宿主細胞から得られるようなアミノ酸配列を含む、こうした変異体抗体、好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒト抗体を提供する。

【0156】

特定の側面において、本発明はまた、それぞれの結合配列、例えば寄託される物質から得られるような可変配列および/または C D R 配列を含む、こうした変異体抗体も提供し、ここで結合配列は、寄託される物質から得られるようなアミノ酸配列に、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含み、そして変異体は機能的に活性である変異体である。

【0157】

本明細書に記載するように、1つの側面において、本発明は、例えば、H 1 a、L u k

10

20

30

40

50

S F、L u k E DおよびH i g C Bに対する結合に関して、モノクローナル抗体# A B - 2 4と競合する能力によって特徴付けられる抗体分子を提供する。# A B - 2 4は、本発明者らが単離し、そして特徴付けた、ヒトI g G 1抗体である。# A B - 2 4の成熟重鎖可変鎖は、例えば、D S M 2 6 7 4 7の宿主細胞を使用して産生される。# A B - 2 4の成熟軽鎖可変鎖は、例えば、D S M 2 6 7 4 8の宿主細胞を使用して産生される。

【0158】

本発明の好ましい抗体は、前記の個々の抗原に、高いアフィニティで、特に高いオンおよび/または低いオフ速度で、あるいは結合の高いアピディティで、結合する。抗体の結合アフィニティは、通常、解離定数(K_d または K_D)として知られる、抗原結合部位の半数が占有される抗体濃度に関して特徴付けられる。通常、結合剤は、 $K_d < 10^{-8} M$ 、好ましくは $K_d < 10^{-9} M$ の高アフィニティ結合剤と見なされ、さらにより好ましくは $K_d < 10^{-10} M$ である。

10

【0159】

にもかかわらず、特定の好ましい態様において、個々の抗原結合アフィニティは、例えば少なくとも2つの抗原に結合する際、例えば 10^{-6} 未満であり、そして最大 $10^{-8} M$ である K_d で、中程度のアフィニティである。

【0160】

本発明にしたがって、好ましくは、必要であればアフィニティ成熟プロセスと組み合わせて、中程度のアフィニティの結合剤を提供してもよい。

【0161】

アフィニティ成熟は、ターゲット抗原に対して増加したアフィニティを持つ抗体が産生されるプロセスである。本明細書に開示する、本発明の多様な態様にしたがって、アフィニティ成熟抗体を生成するため、当該技術分野で入手可能なアフィニティ成熟ライブラリーを調製し、そして/または用いる、任意の1またはそれより多い方法を使用してもよい。例示的なこうしたアフィニティ成熟法および使用法、例えばランダム突然変異誘発、細菌ミュテーター株継代、部位特異的突然変異誘発、突然変異ホットスポットターゲティング、簡潔(*parsimonious*)突然変異誘発、抗体シャフリング、軽鎖シャフリング、重鎖シャフリング、CDR1および/またはCDR1突然変異誘発、ならびに本明細書に開示する本発明の多様な態様にしたがった方法および使用の実施を受け入れ可能なアフィニティ成熟ライブラリーを産生し、そして用いる方法には、例えば：Prasslerら(2009); *Immunotherapy*, Vol. 1(4), pp. 571-583; Sheedyら(2007), *Biotechnol. Adv.*, Vol. 25(4), pp. 333-352; WO2012/009568; WO2009/036379; WO2010/105256; US2002/0177170; WO2003/074679に開示されるものが含まれる。

20

30

【0162】

アミノ酸突然変異誘発、または免疫グロブリン遺伝子セグメントにおける体細胞突然変異の結果を含む、抗体の構造変化と共に、抗原に対する結合部位の変異体を産生し、そしてより高いアフィニティに関して選択する。アフィニティ成熟抗体は、親抗体より数対数倍($\log fold$)大きいアフィニティを示しうる。単一の親抗体をアフィニティ成熟に供してもよい。ターゲット抗原に対して類似の結合アフィニティを持つ抗体の別のプールは、アフィニティ成熟単一抗体またはこうした抗体のアフィニティ成熟プールを得るために変動する親構造と見なされうる。

40

【0163】

本発明記載の抗体の好ましいアフィニティ成熟変異体は、結合アフィニティの少なくとも10倍増加、好ましくは少なくとも100倍増加を示す。親分子のそれぞれのライブラリーを使用する選択キャンペーンの経過において、結合アフィニティ $K_d < 10^{-8} M$ の特異的ターゲット結合特性を有する本発明の抗体を得るため、中程度の結合アフィニティを有する抗体いずれかとともにアフィニティ成熟を使用してもよい。あるいは、本発明にしたがった抗体のアフィニティ成熟によって、アフィニティをさらにより増加させて、1

50

10^{-9} M未満、好ましくは 10^{-10} M未満、またはさらに 10^{-11} M未満、最も好ましくはピコモル範囲のKdに対応する高い値を得ることも可能である。

【0164】

補体の活性化を使用する別の経路を通じて、食細胞性エフェクター細胞を活性化してもよい。微生物上の表面抗原に結合する抗体は、Fc領域との補体カスケードの最初の成分を誘引し、そして「古典的」補体系の活性化を開始する。これらは、食細胞性エフェクター細胞の刺激を生じ、これは最終的に、補体依存性細胞傷害性(CDC)によってターゲットを殺す。

【0165】

特異的な態様にしたがって、本発明の抗体は、標準的ADCCまたはCDCアッセイにおいて測定されるように、免疫エフェクター細胞の存在下で、細胞傷害性活性を有する。対照に比較した際、細胞溶解の割合に有意な増加があれば、ADCCまたはCDCアッセイのいずれかによって決定されるような細胞傷害活性を、本発明の抗体に関して示してもよい。ADCCまたはCDCに関連する細胞傷害活性は、好ましくは、絶対パーセント増加として測定され、これは好ましくは5%より高く、より好ましくは10%より高く、さらにより好ましくは20%より高い。

【0166】

本発明は、特に、多重特異性を持つ中和抗体を同定するプロセスによって、例えば交差反応性発見選択スキームによって得られる、交差反応性抗体を提供する。したがって、2つのターゲット、ターゲットAおよびBとの反応性を示す抗体を含む抗体ライブラリーをまず、ターゲットの1つ、例えばターゲットAとの反応性に関して選択し、その後、もう一方のターゲット、例えばターゲットBとの反応性に関して選択してもよい。各連続選択周期は、生じるプールの反応強度を、両方のターゲットに向けて強化する。したがって、この方法は、2つの異なるターゲットに向けられる交差反応性、および病原体を交差中和する能力を持つ抗体を同定するために特に有用である。該方法を拡張して、さらなるターゲット(単数または複数)に向かう濃縮のさらなる周期を含めることによって、さらなるターゲットに向かって反応性を示す抗体を同定することも可能である。

【0167】

交差反応性抗体は、いくつかの例で、単一の抗原に対するスクリーニングを通じて出現する。交差反応性クローンを単離する可能性を増加させるため、多数の抗原に対する前進性のスクリーニングによって、多数の選択圧を適用するであろう。特別なmAb選択戦略は、交互の様式で、異なる毒素成分を使用する。例えば、最も強力な中和抗H1amAbを、次いで、黄色ブドウ球菌感染中の二成分毒素の主なターゲットを代表する、ヒト好中球上のPVLおよびPVL様毒素への結合に関して試験する。

【0168】

抗体ライブラリー、例えば酵母ディスプレイ抗体ライブラリーから抗体を選択するために組換え毒素を用いてもよい。

【0169】

どちらの場合でも、交差反応性は、当該技術分野に知られる抗体最適化法によって、さらに改善されうる。例えば、本明細書記載の免疫グロブリン鎖の可変領域の特定の領域を、軽鎖シャフリング、目的地(destinational)突然変異誘発、CDR融合(amalgamation)、ならびに選択したCDRおよび/またはフレームワーク領域の定方向突然変異誘発を含む、1またはそれより多い最適化戦略に供してもよい。

【0170】

望ましい中和特性を持つ抗体を同定するためのスクリーニング法は、ターゲット細胞への毒素結合の阻害、二量体またはオリゴマー形成の阻害、孔形成の阻害、細胞溶解の阻害、サイトカイン、リンホカイン、および任意の炎症誘発性シグナル伝達の誘導の阻害、ならびに/あるいは動物に対するin vivo効果(死亡、溶血、オーバーシュート炎症、臓器不全)の阻害であってもよい。例えば標準アッセイを用いて、望ましい毒素への直接結合に基づいて、反応性を評価してもよい。

10

20

30

40

50

【0171】

ひとたび望ましい特性を持つ交差中和抗体が同定されたら、抗体によって認識される単数または複数のドミナントエピトープを決定してもよい。エピトープマッピングのための方法が、当該技術分野に周知であり、そして例えば、Epitope Mapping: A Practical Approach, WestwoodおよびHay監修, Oxford University Press, 2001に開示される。

【0172】

エピトープマッピングは、抗体が結合するエピトープの同定に関する。タンパク質上のエピトープの位置を決定するために当業者に知られる多くの方法があり、これには、抗体-抗原複合体の結晶学分析、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ、および合成ペプチドに基づくアッセイが含まれる。参照抗体と「同じエピトープに結合する」抗体は、本明細書において、以下の方式で理解される。2つの抗体が、同一であるかまたは立体的に重複するエピトープを認識する場合、抗体は、同じまたは本質的に同じ、あるいは実質的に同じエピトープと結合すると称される。2つの抗体が、同一のまたは立体的に重複するエピトープに結合するかどうかを決定するための、一般的に用いられる方法は、競合アッセイであり、該方法は、標識抗原または標識抗体のいずれかを用いて、多くの異なる形式のすべてに設置可能である。通常、抗原を96ウェルプレート上に固定して、そして放射性または酵素標識を用いて、非標識抗体が、標識抗体の結合を遮断する能力を測定する。

10

【0173】

ひとたび、望ましい交差中和特性を持つ抗体が同定されたら、抗体断片を含むこうした抗体を、当該技術分野に周知の方法によって産生させることも可能であり、例えば、こうした方法には、ハイブリドーマ技術または組換えDNA技術が含まれる。

20

【0174】

ハイブリドーマ法において、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えばハムスターを免疫して、免疫に用いたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するかまたは産生することが可能なリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球を*in vitro*で免疫してもよい。次いで、適切な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いて、リンパ球を骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する。

【0175】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地を、抗原に対して向けられるモノクローナル抗体の産生に関してアッセイする。好ましくは、免疫沈降によって、または*in vitro*結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)によって、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を決定する。

30

【0176】

組換えモノクローナル抗体は、例えば、必要な抗体鎖をコードするDNAを単離し、そして周知の組換え発現ベクター、例えば抗体配列をコードするヌクレオチド配列を含む本発明のプラスミドまたは発現カセット(単数または複数)を用いて、発現のためのコード配列で、組換え宿主細胞をトランスフェクションすることによって産生可能である。組換え宿主細胞は、上に記載するものなどの原核および真核細胞であることも可能である。

40

【0177】

特定の側面にしたがって、遺伝子操作のためにヌクレオチド配列を用いて、抗体をヒト化するか、あるいは抗体のアフィニティまたは他の特性を改善することも可能である。例えば、抗体を臨床試験およびヒトにおける治療に用いる場合、定常領域を操作して、免疫反応を回避するために、ヒト定常領域により似せてもよい。抗体配列を遺伝子操作して、ターゲット毒素に対するより高いアフィニティおよび黄色ブドウ球菌に対するより高い有効性を得ることが望ましい可能性もある。当業者には、1またはそれより多いポリヌクレオチド変化を抗体に作製して、そしてなお、ターゲット毒素に対する結合能を維持することが可能であることが明らかであろう。

【0178】

50

多様な手段による抗体分子産生は、一般的によく理解される。米国特許 6 3 3 1 4 1 5 (Cabillyら)は、例えば、単一細胞において、単一のベクターから、または2つの別個のベクターから、同時に重鎖および軽鎖が発現される、抗体の組換え産生のための方法を記載する。Wibbenmeyerら(1999, Biochim Biophys Acta 1430(2):191-202)、ならびにLeeおよびKwak(2003, J. Biotechnology 101:189-198)は、大腸菌の別個の培養において発現されるプラスミドを用いた、別個に産生される重鎖および軽鎖からのモノクローナル抗体の産生を記載する。抗体産生に適した多様な他の技術は、例えば、Harlowら, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)に提供される。

10

【0179】

望ましい場合、本発明の抗体、例えば#AB-24抗体を配列決定し、そして次いで、発現または増殖のため、ポリヌクレオチド配列をベクター内にクローニングしてもよい。抗体をコードする配列を宿主細胞中のベクターにおいて維持してもよいし、そして次いで、宿主細胞株を拡大して、そして将来の使用のために凍結してもよい。細胞培養における組換えモノクローナル抗体の産生は、当該技術分野に知られる手段によって、B細胞からの抗体遺伝子のクローニングを通じて実施可能である。

【0180】

別の側面において、本発明は、本発明の組換え抗体の産生のためにコードする配列を含む単離核酸を提供する。

20

【0181】

別の側面において、本発明は、本発明の組換えエピトープの産生のためにコードする配列を含む単離核酸、または本発明のこうしたエピトープを含む分子を提供する。しかし、本発明のエピトープはまた、例えば当該技術分野に周知の合成法のいずれかを通じて、合成的に産生されてもよい。

【0182】

核酸をコードする抗体またはエピトープは、任意の適切な特性を有し、そして任意の適切な特徴またはその組み合わせを含むことも可能である。したがって、例えば、抗体またはエピトープをコードする核酸は、DNA、RNA、またはそのハイブリッドの形であってもよく、そしてこれには、非天然存在塩基、修飾主鎖、例えば核酸の安定性を促進するホスホロチオエート主鎖、またはその両方が含まれてもよい。核酸は、好適には、ターゲット宿主細胞(単数または複数)における望ましい発現、複製、および/または選択を促進する特徴を含む、本発明の発現カセット、ベクターまたはプラスミド中に取り込まれてもよい。こうした特徴の例には、複製起点成分、選択遺伝子成分、プロモーター成分、エンハンサー要素成分、ポリアデニル化配列成分、終結成分等が含まれてもよく、これらの多くの適切な例が知られる。

30

【0183】

本開示はさらに、1またはそれより多い本明細書記載のヌクレオチド配列を含む組換えDNA構築物を提供する。これらの組換え構築物を、任意の開示する抗体をコードするDNA分子が挿入されているベクター、例えばプラスミド、ファージミド、ファージまたはウイルスベクターと組み合わせて用いる。

40

【0184】

培養中の連続細胞株によって抗体分子を産生する任意の方法を用いて、モノクローナル抗体を産生する。モノクローナル抗体を調製するために適した方法の例には、Kohlerらのハイブリドーマ法(1975, Nature 256:495-497)およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001;およびBrodeurら, 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applic

50

ations, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51 - 63) が含まれる。

【0185】

本発明はさらに、本明細書に記載するような抗体または免疫原および薬学的に許容されうるキャリアーまたは賦形剤を含む、薬学的組成物を提供する。これらの薬学的組成物を、ポラス注射または注入として、あるいは連続注入によって、本発明にしたがって投与してもよい。投与のこうした手段を促進するのに適した薬学的キャリアーが当該技術分野に周知である。

【0186】

薬学的に許容されうるキャリアーには、一般的に、本発明によって提供される抗体または関連組成物または組み合わせと生理学的に適合する、あらゆる適切な溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に許容されうるキャリアーのさらなる例には、無菌水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、ならびにそのいずれかの組み合わせが含まれる。

【0187】

1つのこうした側面において、抗体を、所望の投与経路に適した1またはそれより多いキャリアーと組み合わせてもよく、抗体を、例えば、ラクトース、スクロース、デンプン、アルカン酸のセルロースエステル、ステアリン酸、タルク、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウムおよびカルシウム塩、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリジン、ポリビニルアルコールのいずれかと混合してもよく、そして場合によって、慣用的投与のため、さらに錠剤化する (tableted) かまたは被包してもよい。あるいは、抗体を、生理食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、カルボキシメチルセルロースコロイド性溶液、エタノール、コーン油、ピーナツ油、綿実油、ゴマ油、トラガカントゴム、および/または多様な緩衝剤中に溶解してもよい。他のキャリアー、アジュバント、および投与様式は、薬学業において周知である。キャリアーには、徐放物質または時間遅延物質、例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのみ、またはワックスと合わせたもの、あるいは当該技術分野に周知の他の物質が含まれてもよい。

【0188】

さらなる薬学的に許容されうるキャリアーが当該技術分野に知られ、そして例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESに記載される。液体配合物は、溶液、エマルジョンまたは懸濁物であることも可能であり、そしてこれには、懸濁剤、安定化剤、界面活性剤、保存剤、およびキレート剤などの賦形剤が含まれてもよい。

【0189】

本発明の抗体または免疫原および1またはそれより多い療法活性剤が配合される薬学的組成物が意図される。望ましい度合いの純度を有する前記免疫グロブリンを、場合によって薬学的に許容されうるキャリアー、賦形剤または安定化剤と、凍結乾燥配合物または水溶液の形で混合することによって、本発明の抗体または免疫原の安定配合物を保存のために調製する。in vivo投与に用いようとする配合物は、特に、無菌であり、好ましくは無菌水溶液の形である。これは、無菌濾過膜または他の方法を通じた濾過によって容易に達成される。本明細書に開示する抗体および他の療法活性剤はまた、イムノリボソームとして配合され、そして/または微小カプセル中に捕捉されることも可能である。

【0190】

本発明の抗体または免疫原を含む薬学的組成物の投与を、経口、皮下、静脈内、鼻内、耳内 (intranasally)、経皮、粘膜、例えばジェル、軟膏 (salves)、ローション、クリーム等で局所、腹腔内、筋内、例えば吸入技術または肺送達系を使用して肺内、膈内、非経口、直腸、または眼内を含む多様な経路で行ってもよい。

【0191】

10

20

30

40

50

非経口投与に用いられるような例示的な配合物には、例えば無菌溶液、エマルジョンまたは懸濁物のような、皮下、筋内または静脈内注射に適したものが含まれる。

【0192】

1つの態様において、本発明の抗体または免疫原は、例えば疾患を修飾するかまたは防止する単一療法として、被験体に投与される、唯一の療法活性剤である。

【0193】

あるいは、本発明の抗体または免疫原を、限定されるわけではないが、標準的治療、例えば抗生物質、ステロイドおよび炎症の非ステロイド阻害剤、および/または例えば抗細菌または抗炎症剤を使用する、他の抗体に基づく療法を含めて、1またはそれより多い他の療法剤または予防剤と組み合わせて投与する。

【0194】

併用療法は、特に、例えばMRSA感染を治療するのに用いられるような、標準的な投与計画を使用する。これには、抗生物質、例えばチゲサイクリン、リネゾリド、メチシリンおよび/またはバンコマイシンが含まれる。

【0195】

併用療法において、抗体を混合物として、あるいは1またはそれより多い他の療法投与計画と組み合わせて、例えば同時療法の前に、同時に、または後にのいずれかで投与してもよい。

【0196】

いくつかの場合、免疫原の予防的投与は、本発明の免疫原を含むワクチン、すなわち一価ワクチンを使用してもよい。にもかかわらず、同じまたは異なるターゲット病原体に対する免疫反応を誘導するため、異なる免疫原を含む多価ワクチンを使用してもよい。

【0197】

本発明の抗体、免疫原またはそれぞれの薬学的調製物の生物学的特性を、細胞、組織、および全生物実験において、*ex vivo*で特徴付けてもよい。当該技術分野に知られるように、薬剤はしばしば、疾患または疾患モデルに対する治療に関する薬剤の有効性を測定するため、あるいは薬剤の薬物動態学、薬力学、毒性、および他の特性を測定するため、限定されるわけではないが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、およびサルを含む動物において、*in vivo*で試験される。動物は、疾患モデルと称されることも可能である。療法剤は、しばしば、限定されるわけではないが、ヌードマウス、SCIDマウス、異種移植マウス、およびトランスジェニックマウス（ノックインおよびノックアウトを含む）を含むマウスで試験される。こうした実験は、抗体が、能動または受動免疫療法に際して、適切な半減期、エフェクター機能、（交差）中和活性および/または免疫反応を伴う療法剤としてまたは予防剤として、使用される能力の決定のための意義あるデータを提供しうる。任意の生物、好ましくは哺乳動物が、試験に使用可能である。例えば、ヒトに対する遺伝的類似性のため、霊長類、サルが適切な療法モデルである可能性もあり、そしてしたがって、これらを用いて、対象の剤または組成物の有効性、毒性、薬物動態学、薬力学、半減期、または他の特性を試験することも可能である。ヒトにおける試験は、最終的には、薬剤としての認可に必要であり、そしてしたがって、もちろん、これらの実験が意図される。したがって、本発明の抗体、免疫原およびそれぞれの薬学的組成物を、ヒトにおいて試験して、療法的または予防的有効性、毒性、免疫原性、薬物動態学、および/または他の臨床特性を決定してもよい。

【0198】

本発明はまた、診断目的のため、例えば生物学的液体試料中の免疫試薬またはターゲットとしての毒素または抗体を検出し、そしてその濃度を定量的に決定する方法において使用するための、本発明の対象抗体も提供する。

【0199】

本発明はまた、生物学的試料、例えば体液において、毒素または黄色ブドウ球菌感染のレベルを検出するための方法であって、本発明の抗体と試料を接触させる工程を含む、前記方法も提供する。本発明の抗体を、任意の既知のアッセイ法、例えば競合的結合アッセ

10

20

30

40

50

イ、直接および間接的サンドイッチアッセイ、免疫沈降アッセイ、ならびに酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）において使用してもよい。

【0200】

本発明にしたがって用いられるような体液には、被験体の生物学的試料、例えば組織抽出物、尿、血液、血清、便および痰が含まれる。

【0201】

1つの態様において、方法は、固体支持体を、ターゲット、例えば本発明の抗体によってターゲットとされる毒素の少なくとも1つとの複合体を特異的に形成する、特定のタイプの抗体断片の過剰量と、抗体が固体支持体表面に付着するのを可能にする条件下で、接触させる工程を含む。抗体が付着している、生じた固体支持体を、次いで、生物学的液体中のターゲットが抗体に結合し、そしてターゲット-抗体複合体を形成するように、生物学的液体試料と接触させる。複合体を検出可能マーカーで標識してもよい。あるいは、複合体の形成前に、ターゲットまたは抗体のいずれかを標識してもよい。例えば、検出可能マーカー（標識）を抗体にコンジュゲート化してもよい。次いで、複合体を検出し、そして定量的に決定し、それによって、生物学的液体試料中のターゲットを検出し、そしてその濃度を定量的に決定することも可能である。

10

【0202】

特定の適用のため、本発明の抗体を、有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、色素原標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属複合体、金属、コロイド性金およびその混合物からなる群より選択される、標識またはレポーター分子にコンジュゲート化する。標識またはレポーター分子にコンジュゲート化された抗体を、例えばアッセイ系または診断法において用いて、例えば黄色ブドウ球菌感染またはそれに関連する疾患状態を診断してもよい。

20

【0203】

本発明の抗体を、例えば結合アッセイ（例えばELISA）および結合研究において、前記コンジュゲートの単純な検出を可能にする他の分子にコンジュゲート化してもよい。

【0204】

本発明の別の側面は、1またはそれより多い抗体に加えて、多様な診断または療法剤を含んでもよい、抗体を含むキットを提供する。キットにはまた、診断または療法において使用するための使用説明書も含まれてもよい。こうした使用説明書は、例えば、キット中に含まれているデバイス、例えば診断目的のために生物学的試料を調製する、例えば、疾患を診断しようとするそれぞれの毒素（単数または複数）を決定する前に、細胞および/またはタンパク質含有分画を分離するためのツールまたはデバイス上に含まれてもよい。好適には、こうしたキットには、1またはそれより多くの本明細書記載の多様な診断法において使用可能な抗体および診断剤または試薬が含まれる。別の好ましい態様において、キットには、使用前に混合して近い将来の投与のための注射可能組成物を形成可能な薬学的に許容されうるキャリアー（単数または複数）と組み合わせ、例えば凍結乾燥型の抗体が含まれる。

30

【0205】

AB-24（本明細書において、# 9028ともまた称される）と称される抗体、特に抗体軽鎖および/または重鎖は、本明細書に示すような寄託番号の下に、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b / Inhofenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE)に寄託される生物学的物質によって、さらに特徴付けられる。

40

【0206】

DSMZ 26747は、# AB-24重鎖（AB-24-HC）のコード配列を含むプラスミドで形質転換された大腸菌宿主細胞：大腸菌DH5アルファAB-24-HC=DSMZ 26747、寄託日：2013年1月8日；寄託者：Arsanis Biosciences GmbH, オーストリア・ウィーンである。

50

【0207】

DSM 26748は、#AB-24軽鎖(AB-24-LC)のコード配列を含むプラスミドで形質転換された大腸菌宿主細胞：大腸菌DH5アルファAB-24-LC=DSM 26748、寄託日：2013年1月8日；寄託者：Arsanis Biosciences GmbH, オーストリア・ウィーンである。

【0208】

以下の定義の主題は、本発明の態様と見なされる：

1. 黄色ブドウ球菌のアルファ毒素(H1a)および少なくとも1つの二成分毒素に結合する少なくとも1つの多重特異性結合部位を含む、交差中和性抗体。

【0209】

2. 前記二成分毒素が、ガンマ溶血素、PVL毒素およびPVL様毒素、好ましくはH1gAB、H1gCB、LukSF、LukED、LukGH、LukS-H1gB、LukSD、H1gA-LukD、H1gA-LukF、LukG-H1gA、LukEF、LukE-H1gB、H1gC-LukDまたはH1gC-LukFのいずれかのFおよびS成分の同族および非同族対からなる群より選択される、定義1記載の抗体。

【0210】

3. 前記結合部位が、少なくとも2つまたは少なくとも3つの二成分毒素、好ましくは、H1gAB、H1gCB、LukSFおよびLukED、好ましくはH1gAB、H1gCB、LukSFおよびLukEDのいずれかの少なくとも2つまたは3つに結合する、定義1または2記載の抗体。

【0211】

4. 前記結合部位が、CDR結合部位、好ましくはVHおよび/またはVL結合部位のCDR配列を含む部位である、定義1~3のいずれか記載の抗体。

【0212】

5. 全長モノクローナル抗体、または結合部位を取り込んでいる少なくとも1つの抗体ドメインを含むその抗体断片であって、好ましくはネズミ、キメラ、ヒト化またはヒト抗体、重鎖抗体、Fab、Fd、scFv、およびVH、VHHまたはVLのような単ドメイン抗体からなる群より選択される抗体、好ましくはヒトIgG1抗体である、定義1~4のいずれか記載の抗体。

【0213】

6. 10^{-8} M未満、好ましくは 10^{-9} M未満のKdで、毒素の各々に結合するアフィニティを有する、定義1~5のいずれか記載の抗体。

【0214】

7. 細胞に基づくアッセイにおいて、50:1未満のmAb:毒素比(mol/mol)、好ましくは10:1未満、より好ましくは1:1未満のIC50の、in vitro中和強度を示す、定義1~6のいずれか記載の抗体。

【0215】

8. 動物においてターゲティングされた毒素を中和し、そしてin vivoで黄色ブドウ球菌病変形成、好ましくは肺炎、菌血症または敗血症、腹膜炎および骨髄炎のいずれかを阻害する、定義1から7のいずれか記載の抗体。

【0216】

9. #AB-24と称される抗体と同じエピトープに結合する、定義1~8のいずれか記載の抗体。

【0217】

10. #AB-24と称される抗体と同じ結合部位を含む、定義1~9のいずれか記載の抗体。

【0218】

11. DSM26747および/またはDSM26748の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体、またはその機能的に活性である変異体由来である、定義1~10のいずれか記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0219】

12. 定義11記載の抗体であって、
(a) D S M 2 6 7 4 8の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体軽鎖；
および/または
(b) D S M 2 6 7 4 7の下に寄託されている宿主細胞によって産生される抗体重鎖；
(c) あるいは(a)および/または(b)の機能的に活性である変異体
を含む、前記抗体。

【0220】

13. D S M 2 6 7 4 8の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# A B - 2 4 - L Cと称される抗体軽鎖をコードし；そして/または
D S M 2 6 7 4 7の下に寄託されている宿主細胞に含まれる、# A B - 2 4 - H Cと称される抗体重鎖をコードする
ヌクレオチド配列を含むプラスミド。

10

【0221】

14. 定義1～12のいずれか記載の抗体の軽鎖および/または重鎖を発現するコード配列を含む発現カセットであって、発現カセットまたはコード配列が定義13記載のプラスミド由来である、前記発現カセット。

【0222】

15. 宿主細胞を、定義13のプラスミドまたは定義14記載の発現カセットで形質転換する、定義1～12のいずれか記載の抗体を産生する方法。

20

【0223】

16. 定義13記載のプラスミドまたは定義14記載の発現カセットを含む、宿主細胞。

【0224】

17. D S M 2 6 7 4 7またはD S M 2 6 7 4 8の下に寄託されている、定義16記載の宿主細胞。

【0225】

18. 定義1～12のいずれか記載の抗体を産生する方法であって、定義16または17記載の宿主細胞を、前記抗体を産生する条件下で培養するかまたは維持する、前記方法。

30

【0226】

19. 候補防御抗体を同定する方法であって：
(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして
(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、# A B - 2 4と称される抗体によって認識されるエピトープの結合に関して評価する、ここで抗体およびエピトープの間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法。

【0227】

20. 候補防御抗体を同定する方法であって：
(a) 抗体または抗体産生細胞を含有する試料を提供し；そして
(b) 試料中のまたは試料によって産生される抗体と、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素の結合に関して評価する、ここで抗体および毒素の間の陽性反応が、候補防御抗体として抗体を同定する
前記方法。

40

【0228】

21. 定義1～12のいずれか記載の抗体を産生する方法であって
(a) 定義19または20にしたがって同定される候補防御抗体を提供し；そして
(b) モノクローナル抗体、あるいは該候補防御抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは候補防御抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する
工程を含む、前記方法。

50

【0229】

22. 定義1～12のいずれか記載の抗体を産生する方法であって

(a) #AB-24と称される抗体によって認識されるエピトープで、非ヒト動物を免疫し；

(b) 単離されたB細胞から不死化細胞株を形成し；

(c) b)において得られた細胞株をスクリーニングして、エピトープに結合するモノクローナル抗体を産生する細胞株を同定し；そして

(d) モノクローナル抗体、あるいは該抗体のヒト化型またはヒト型、あるいはモノクローナル抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する工程を含む、前記方法。

10

【0230】

23. 定義1～12のいずれか記載の抗体を産生する方法であって、

(a) 黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素で、非ヒト動物を免疫し、そして抗体を産生するB細胞を単離し；

(b) 単離B細胞から不死化細胞株を形成し；

(c) 細胞株をスクリーニングして、黄色ブドウ球菌のアルファ毒素および少なくとも1つの二成分毒素に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞株を同定し；そして

(d) モノクローナル抗体、あるいは該抗体のヒト化型またはヒト型、あるいは該モノクローナル抗体と同じエピトープ結合特異性を持つその誘導体を産生する工程を含む、前記方法。

20

【0231】

24. 黄色ブドウ球菌感染のリスクがあるかまたは該感染を患っている被験体を治療する際に使用するための、定義1～12のいずれか記載の抗体であって、治療が、被験体における感染を限定するのに有効な量の抗体を被験体に投与して、前記感染から生じる疾患状態を寛解させるか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害する工程を含む、前記抗体。

【0232】

25. 黄色ブドウ球菌感染に対して防御するための、定義25記載の使用のための抗体。

【0233】

26. 抗体を非経口または粘膜配合物中で投与する、定義24または25記載の使用のための抗体。

30

【0234】

27. 定義1～12のいずれか記載の抗体の薬学的調製物であって、好ましくは、非経口または粘膜配合物を含み、場合によって薬学的に許容されうるキャリアーまたは賦形剤を含有する、前記調製物。

【0235】

28. 高毒素産生MRSA感染を含むいかなる黄色ブドウ球菌感染、例えば壊死性肺炎、ならびにフルンケル症およびカルブンケル症における毒素産生を検出するための診断に使用するための定義1～12のいずれか記載の抗体。

40

【0236】

29. 定義28記載の使用のための抗体であって、該抗体と被験体の体液試料を接触させることによって、該被験体における黄色ブドウ球菌での全身感染が*ex vivo*で決定される、ここで抗体の特異的免疫反応が感染を決定する、前記抗体。

【0237】

30. 定義1～12のいずれか記載の抗体の診断調製物であって、場合によって標識を含む抗体および/または標識を含むさらなる診断試薬を含有する、前記調製物。

【0238】

31. #AB-24と称される抗体によって認識される、単離コンホメーションエピトープ。

50

【0239】

32. (a) 定義31記載のエピトープ；
 (b) 場合によって、(a)の前記エピトープと天然には関連しないさらなるエピトープ；および
 (c) キャリアー
 を含む、免疫原。

【0240】

33. 前記キャリアーが、薬学的に許容されうるキャリアーであり、好ましくは緩衝剤および/またはアジュバント物質である、定義32記載の免疫原。

【0241】

34. ワクチン配合物中で、好ましくは非経口使用のためである、定義32または33記載の免疫原。

【0242】

35. 黄色ブドウ球菌感染から被験体を防御するか、前記感染から生じる疾患状態を防止するか、または黄色ブドウ球菌肺炎病変形成を阻害するのに有効な量の前記免疫原を投与することによって、被験体を治療するために使用するための、定義32～34記載の免疫原。

【0243】

36. 防御免疫反応を誘発するための、定義35記載の免疫原。

【0244】

37. 定義1～12のいずれか記載の抗体または定義31記載のエピトープをコードする、単離核酸。

【0245】

前述の説明は、以下の実施例を参照すると、より完全に理解されるであろう。こうした例は、しかし、単に、本発明の1またはそれより多い態様を実施する方法の代表であり、そして本発明の範囲を限定すると理解してはならない。

【実施例】

【0246】

実施例1：組換え毒素の生成

10の黄色ブドウ球菌毒素-H1a、LukF、LukD、LukS、LukE、HlgA、HlgC、HlgB、LukGおよびLukHを、大腸菌(BL21、RosettaまたはTuner DE3)中で組換え的に産生した(図1)。成熟タンパク質のための毒素遺伝子(SignalP 4.1 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>を用いて決定)を大腸菌発現のためにコドン最適化して、そして黄色ブドウ球菌株USA300_TCH1516、MRSA252およびMSHR1314の公表されるゲノム配列に基づいた遺伝子合成によって生成した(配列番号1～28、図9)。LukGおよびLukHを除くすべての毒素を、タンパク質分解的に除去される、N末端NusA/His₆タグを含む可溶型で発現した。精製は、典型的には、3つのクロマトグラフィ工程、1)IMAC(固定金属アフィニティカラム)、2)陽イオン交換またはIMAC、および3)サイズ排除クロマトグラフィからなった。LukGおよびLukHは、不溶性型でタグを伴わずに発現され、タンパク質は封入体から再フォールディングされて、そして精製され；精製は、LukHに関してはサイズ排除カラム上の2工程から、そしてLukGに関しては、陽イオン交換上の1工程およびpH10.2～11.0での陰イオン交換上の1工程からなった。

【0247】

純度(SDS-PAGEによる)および単量体状態(サイズ排除による)に関してタンパク質をアッセイし、そして二次構造(円二色性によって決定)を、入手可能な場合は文献データと比較した。すべてのタンパク質を、アミノ反応性試薬スルホ-NHS-LCビオチンで標識した。

【0248】

10

20

30

40

50

実施例 2：毒素結合性ヒトモノクローナル抗体の選択

WO 2009/036379 A 2、WO 2012009568 および WO 2010105256 にしたがって発展させた酵母表面ディスプレイライブラリーによって、毒素結合抗体を選択した。毒素分子を組換え大腸菌産生タンパク質として発現させ、そしてビオチンで標識した。高純度および完全性に関して、そしてまた機能性に関して、*in vitro* アッセイで、そして実施例 3 に記載するようなマウスの毒素曝露によって *in vivo* で、すべての毒素を試験した。

【0249】

およそ $10^9 \sim 10^{10}$ の多様性で、全長ヒト IgG1 抗体を発現するよう操作された酵母細胞のライブラリーを、異なる濃度のビオチン標識毒素とインキュベーションした。磁気ビーズ選択、およびいくつかの連続する（最大 5 回）選択周期で、ストレプトアビジン二次試薬を使用する蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）によって、毒素への結合能を持つ抗体を発現している酵母細胞を単離した。次いで、選択した酵母クローンによって抗体を産生し、そしてプロテイン A アフィニティクロマトグラフィによって精製した。ForteBio Octet Red 装置 [Pall Life Sciences] を用いたインターフェロメトリー測定によって、異なる毒素への個々の可溶性 mAb の結合を確認し；ビオチン化抗原または抗体をセンサー上に固定し、そして抗体 Fab 断片のまたは抗原の会合および解離を、それぞれ（典型的には 200 nM）、溶液中で、測定した。測定した動力学パラメータ（*k_{on}* および *k_{off}*）に基づいて、アフィニティ（*K_d* 値）を計算した。

10

20

【0250】

実施例 3：多数のブドウ球菌外毒素を中和することが可能なヒト mAb の同定。

【0251】

まず、ユニークな CDR 配列を持つ 12 の H1a 結合 mAb を、ウサギ赤血球またはヒト肺上皮細胞株 A549 のいずれかを用いた 2 つの異なる *in vitro* アッセイにおいて、H1a 中和に関して試験した。ヒト肺上皮細胞（A549、HPACC #86012804）を用いた毒素阻害アッセイのため、細胞をトリプシン処理し、そして前日に、ウェル（96 ウェル半面積発光プレート、Greiner、オーストリア）あたり 20,000 細胞の密度で、10% FCS および Pen/Strep を補った F12K 培地（Gibco、USA）中でプレATINGした。別個の希釈プレートにおいて、5% FCS および Pen/Strep を補った F12K 培地（= A549 細胞培地）中で、抗体を連続希釈して、そして固定された濃度 [3.03 nM] で、細菌培養上清から精製されたアルファ溶血素（H1a）と混合した。室温での 1 時間のプレインキュベーション工程の後、接着性 A549 細胞上の植え付け培地を廃棄し、そして mAb - 毒素混合物によって置換した。細胞を 37 + 5% CO₂ で 6 時間中毒させ、そして次いで、製造者の指示にしたがって、商業的に入手可能なキット（Cell Titer - Glo（登録商標）発光細胞生存度アッセイ；Promega、米国）を用いて、生存度を測定した。偽処理対照と比較して、% 生存度を計算した。以下の式： $\% \text{阻害} = [(\text{毒素のみの生存度} - \text{阻害された活性}) / (\text{毒素のみの生存度})] \times 100$ を用いて、毒素活性の % 阻害を計算した。

30

40

【0252】

ウサギ赤血球溶血阻害のため、ニュージーランド・ホワイト・ウサギ（Preclincs GmbH、ドイツ）からウサギ EDTA - 全血を得た。血液を、1:1 で、PBS Ca/Mg 不含（PAA Laboratories、オーストリア）で希釈し、そして 50 ml ポリプロピレン試験管中、15 ml LSM 1077（PAA Laboratories、オーストリア）上に 15 ml 希釈血液を重層することによって、勾配を調製した。680 x g（RT、ブレーキなし）での遠心分離後、血小板、血漿、PBM C および Ficoll を吸引によって除去し、そして廃棄した。残った RBC ペレットを 40 ml PBS Ca/Mg 不含で、2 回洗浄し（680 x g で遠心分離、RT、ブレーキなし）、そして最後に、20 ml PBS Ca/Mg 不含に再懸濁した。赤血球の完全性および細胞数を標準的血球計数器で決定した。モノクローナル抗体を用いた中和ア

50

ッセイのため、抗体をPBS中で連続希釈し、そして固定された濃度[12.12 nM]で、アルファ溶血素と混合した。溶血アッセイを、1時間のプレインキュベーション工程の後に開始して、抗体-毒素結合を可能にした。PBS Ca/Mg不含中で希釈したウェルあたり 5×10^7 のウサギ赤血球を添加した。以下の式： $\% \text{阻害} = [(\text{毒素のみの溶血} - \text{阻害された活性}) / (\text{毒素のみの溶血})] \times 100$ を用いて、毒素活性の%阻害を計算した。

【0253】

12のmAbのうち7つは、非常に強力なものから弱く中和するものまでの範囲で、試験した濃度で、中和活性を示した(図2)。これらの7つの抗体は、 $K_d = 9.300 \text{ nM}$ (ForteBio[PalLife Sciences]によって測定)の範囲のアフィニティ、およびアフィニティと強く相関する中和強度を有した。

10

【0254】

H1a(無感作ライブラリー選択に用いたものよりも低い濃度)で再び調べるアフィニティ成熟ライブラリーの最初のシリーズを生成するために、これらの7つのmAbのCDR配列を用いて、より高いアフィニティの子孫抗体を選択した。各系譜から、最高のアフィニティの子孫を、第二のシリーズのアフィニティ精製によって、さらにアフィニティ成熟させた。7つの系譜から生じた42のmAbは、最大10,000倍増加したアフィニティおよび中和強度を有した。多くのmAbは、Sector Imager 2400装置(Meso Scale Discovery)を用いた高感度MSD法を用いても、アフィニティ測定の限界に到達した。典型的には、20pMのビオチン化抗原を、多様な濃度のFabまたはIgGと、室温で16時間インキュベーションして、そして未結合抗原を固定IgG上に捕捉した; FabまたはIgG濃度に対する未結合抗原のプロットは、解離定数 K_d を生じ($K_d = 4 \text{ pM}$ 、図3)、そしてこのうち大部分はまた、mAb対毒素比(1:4)と表される、0.25のIC50で、*in vitro*中和アッセイの理論的限界に到達した(図4)。

20

【0255】

実施例4: H1a毒素選択mAbの交差中和強度を決定するアッセイ

二成分毒素との交差反応性に関して、7つの系譜由来の42のH1a mAbを試験すると、H1a、H1gBおよびLukFに対するピコモル結合アフィニティを示し、そしてLukDに一桁のnMの結合アフィニティを示す、最も弱い中和無感作クローンから得られる単一の子孫が明らかになった(図5)。これらの遠く関連する毒素に対する結合は、対応する二成分毒素H1gB-H1gC、H1gB-H1gA、LukSF(PVL)およびLukEDの非常に強力な中和を生じた(図6)。

30

【0256】

まさに同じ広域交差中和性mAb(#AB-24)が、H1aおよびF成分での代替スクリーニングを用いて、酵母ライブラリーから同定された。

【0257】

H1aに対する#7667系譜の中和能を、実施例3に記載するように、A549細胞(図6A)上で、そしてウサギ赤血球上で決定した。この系譜のすべてのmAbは、アルファ溶血素活性を阻害可能であった。強度は、成熟状態とよく相関した。最も弱い中和活性が無感作クローン#7667で観察され、最も強い防御がクローン#9024、#AB-24、#9029および#9030で見られ、これらは、第二のシリーズのアフィニティ成熟ライブラリーを用いて生成された。最初のアフィニティ成熟ライブラリーを使用した成熟によって生成されたmAb #8268クローンは、中間の中和活性を示した。

40

【0258】

二成分毒素LukE-LukD、H1gB-H1gCおよびLukS-LukFに対する交差中和活性を、ヒト好中球を用いた生存度アッセイにおいて評価した(図6B~D)。この目的のため、赤十字から得る(ヘパリン処理)か、またはK-EDTAバキュテナーチューブ(BD、米国)中で、正常で健康なボランティアから静脈穿刺によって得るか、いずれかで、新鮮なヒト白血球から好中球を単離した。赤血球を凝集させるため、1部

50

分の H e t a S e p 溶液 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s 、 フ ラ ン ス) を 5 部 分 の 血 液 に 添 加 し 、 混 合 し 、 そ し て 血 漿 / 赤 血 球 界 面 (i n t e r p h a s e) が 総 体 積 の お よ そ 5 0 % に なる まで 、 3 7 ° で イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン し た 。 白 血 球 濃 縮 血 漿 層 を 、 2 工 程 P e r c o l l 勾 配 (H B S S 中 で 希 釈 さ れ た 7 3 % お よ び 6 3 % P e r c o l l P l u s 、 G E H e a l t h c a r e) 上 に 注 意 深 く 重 層 し 、 そ し て 6 8 0 x g 、 R T で 3 0 分 間 、 プ レ ー キ な し で 遠 心 分 離 し た 。 回 転 後 の 勾 配 の 最 初 の 層 お よ び 第 二 の 層 (主 に 血 清 お よ び 単 球) を 吸 引 に よ っ て 除 去 し た 。 好 中 球 を 第 二 の 不 透 明 層 か ら 採 取 し 、 そ し て 5 0 m l H B S S (G i b c o 、 米 国) + 1 0 m M グ ル コ ー ス 中 で 2 回 洗 浄 し た 。 血 球 計 数 器 中 、 ト リ パ ン ブ ル ー 色 素 排 除 を 用 い て 、 生 存 細 胞 数 を 計 数 し た 。 記 載 す る 単 離 法 は 、 通 常 、 5 0 m l 全 血 か ら 、 生 存 度 9 5 % の $1 \sim 5 \times 10^8$ の 好 中 球 を 生 じ た 。 生 存 度 ア ッ セ イ の た め 、 1 0 % F C S 、 L - グ ル タ ミ ン お よ び P e n / S t r e p を 補 っ た R P M I 1 6 4 0 (P A A L a b o r a t o r i e s 、 オ ー ス ト リ ア) (= 好 中 球 培 地) 中 に 細 胞 を 再 懸 濁 し た 。 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 、 好 中 球 培 地 中 で 連 続 希 釈 し 、 そ し て 細 胞 生 存 度 を 9 5 % 減 少 さ せ る 固 定 濃 度 の 毒 素 と 混 合 し た [L u k S - L u k F お よ び H l g C - H l g B に 関 し て は 2.94 nM 、 L u k E - L u k D に 関 し て は 7.35 nM] 。 1 時 間 の プ レ イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン 工 程 後 、 生 存 度 ア ッ セ イ を 開 始 し て 、 抗 体 - 毒 素 結 合 を 可 能 に し た 。 ウ ェ ル あ た り 2 5 , 0 0 0 細 胞 を 添 加 し 、 そ し て 反 応 を 3 7 ° 、 + 5 % C O ₂ で 4 時 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン し た 。 次 い で 、 製 造 者 の 指 示 に し た が っ て 、 商 業 的 に 入 手 可 能 な キ ャ ッ プ (C e l l T i t e r - G l o (登 録 商 標) 発 光 細 胞 生 存 度 ア ッ セ イ ; P r o m e g a 、 米 国) を 用 い て 、 P M N の 生 存 度 を 調 べ た 。 偽 処 理 対 照 に 比 較 し て 、 % 生 存 度 を 計 算 し た 。 以 下 の 式 : % 阻 害 = [(毒 素 の み の 生 存 度 - 阻 害 さ れ た 活 性) / (毒 素 の み の 生 存 度)] x 1 0 0 を 用 い て 、 毒 素 活 性 の % 阻 害 を 計 算 し た 。 以 下 の 対 照 m A b が 含 ま れ た : # 8 2 4 7 (別 の 系 譜 (# 7 6 6 0) 由 来 の H l a 単 一 特 異 性 m A b) 、 # 8 2 0 7 (L u k E - L u k D ア ッ セ イ に お け る 単 一 特 異 性 L u k D m A b) 、 # 8 2 1 0 (L u k S - L u k F ア ッ セ イ に お け る 単 一 特 異 性 L u k F m A b) 、 # 8 1 8 2 (H l g C - H l g B ア ッ セ イ に お け る 単 一 特 異 性 H l g B m A b) お よ び # 7 3 3 5 (す べ て の ア ッ セ イ に お け る 雌 鶏 卵 リ ゾ チ ー ム に 対 し て 生 成 さ れ た 陰 性 対 照 m A b) 。

【 0 2 5 9 】

第 一 の ア フ ィ ニ テ ィ 成 熟 ラ イ ブ ラ リ ー を 用 い た 成 熟 に よ っ て 生 成 さ れ る 無 感 作 m A b # 7 6 6 7 お よ び 子 孫 m A b # 8 2 6 8 は 、 任 意 の 同 族 二 成 分 毒 素 に 対 し て 検 出 可 能 な 中 和 活 性 を 示 さ ない が 、 第 二 の ア フ ィ ニ テ ィ 成 熟 ラ イ ブ ラ リ ー を 用 い た 成 熟 に よ っ て 生 成 さ れ る 、 対 応 す る 子 孫 m A b # A B - 2 4 は 、 ヒ ト 好 中 球 に 対 す る L u k E - L u k D 、 H l g C - H l g B お よ び L u k S - L u k F の 強 力 な 阻 害 剤 で あ る こ と が 見 出 さ れ た (図 6 B ~ D) 。 H l a 中 和 活 性 に お い て 匹 敵 す る が 、 第 二 の ア フ ィ ニ テ ィ 成 熟 ラ イ ブ ラ リ ー を 用 い て 成 熟 さ せ た 同 じ 系 譜 の 他 の 成 熟 m A b は 、 こ の ア ッ セ イ に お い て 、 す べ て の 3 つ の 二 成 分 毒 素 を 交 差 中 和 す る こ と が 不 可 能 で あ っ た 。 し か し 、 # 9 0 2 9 は 、 L u k E - L u k D 中 和 に お い て 、 # A B - 2 4 よ り も 匹 敵 す る 強 度 を 有 す る こ と が 見 出 さ れ た 。 *in vitro* 中 和 ア ッ セ イ の 結 果 は 、 F o r t e B i o k D 測 定 に し た が っ て 、 # A B - 2 4 は 、 H l a x H l g B x L u k D x L u k F へ の 結 合 を 示 し 、 そ し て # 9 0 2 9 は 、 H l a x L u k D 結 合 剤 で あ る こ と が 見 出 さ れ た 。

【 0 2 6 0 】

実施例 5 : 生物学的活性を決定するアッセイ

in vitro 強 度 は 、 *in vivo* 有 効 性 を 予 測 す る こ と が 証 明 さ れ た 。 # A B - 2 4 m A b で マ ウ ス を 処 置 す る と 、 H l a ま た は H l g A B 毒 素 で の 致 死 性 曝 露 に 対 し て 、 非 常 に よ く 保 護 さ れ た (図 7) 。 m A b # A B - 2 4 の *in vivo* 交 差 中 和 能 を 多 様 な マ ウ ス モ デ ル に お い て 試 験 し た 。 パ イ ロ ッ ト 研 究 に お い て 、 関 心 対 象 の 精 製 毒 素 の 最 小 致 死 性 濃 度 を 、 連 続 希 釈 の 投 与 、 お よ び そ れ に 続 く 1 4 日 間 の 生 存 監 視 に よ っ て 、 決 定 し た 。 H l a の 鼻 内 滴 下 の 場 合 、 最 小 致 死 性 用 量 は 、 $0.32 \mu\text{g}$ / マ ウ ス で あ る こ と が 見 出 さ れ た 。 H l g A B の 多 様 な 用 量 の 静 脈 内 注 射 後 、 (両 成 分 の) 0.375μ

g の最小致死性用量を決定した。

【0261】

これらの結果に基づいて、mAb による受動免疫の防御能を試験する目的の曝露実験において、以下の曝露用量を用いた：鼻内適用する H1a に関しては $0.4 \mu\text{g}$ 、そして静脈内投与される H1gAB の各成分に関しては $0.5 \mu\text{g}$ であった。

【0262】

mAb #AB-24 での受動免疫を、毒素による致死性曝露の 4 時間前 (H1a 曝露) または 24 時間前 (H1gAB 曝露) のいずれかで、腹腔内で行った。5 匹のマウスの群に、PBS 中に溶解した個々の mAb の多様な用量を投与した。対照群は、PBS のみ、またはアイソタイプマッチした非特異的 mAb の最高用量を投与された。精製毒素での曝露後、マウスの致死性を 7 日間監視した。

10

【0263】

図 7A において、H1a 曝露実験の結果を示す。L1 対照マウスは、24 時間以内に毒素曝露に屈し、一方、mAb #AB-24 は、 $100 \mu\text{g}$ mAb / マウス用量で反復して有意な防御を提供した ($60 \sim 100\%$)。まさに同じ抗体はまた、マウスを致死性 H1gAB 曝露からも保護し (図 7B)、そして 200 および $50 \mu\text{g}$ / マウス用量で、それぞれ、 80% および 40% のマウスをレスキューした。

【0264】

これらの実験は、構造的に関連するが、一次アミノ酸配列レベルで非常に遠くでしかない (27% アミノ酸同一性)、2 つの最も重要なブドウ球菌細胞毒素の 2 つに関する、#AB-24 の交差保護能を立証した。

20

【0265】

実施例 6 : H1a mAb の競合を決定するアッセイ

H1a mAb 間の競合を、インターフェロメトリー (ForTe-Bio) によって研究した。典型的なセットアップにおいて、H1a [緩衝液 (1% BSA を加えた PBS) 中、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$] を、ストレプトアビジンセンサー (Pall Life Sciences) 上に固定した。次いで、センサーを一次抗体 (または緩衝液のみ) で、その後、二次抗体 (各 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で、典型的には各 10 分間、処理した (緩衝剤のみの条件は、H1a に対する二次抗体の 100% 結合に対応する反応を提供した)。各一次抗体に関して、二次抗体結合の阻害パーセントを計算した (図 8)。

30

【0266】

図 8 に示す 3 つの抗体に関して、自己阻害は、 $81 \sim 91\%$ で多様であり、一方、異なる抗体間の阻害は、 $30 \sim 76\%$ で多様であった。抗体間を細かく区別する目的のため、そしてさらなる H1a 抗体でのデータに基づいて、 80% の阻害限界がこの研究で設定された。したがって、第二の抗体の結合を 80% 阻害することが可能な任意の抗体は、前記の二次抗体と競合していると見なされ、一方、阻害が 80% 未満である場合、抗体は十分に競合性ではない。

【図9A】

配列番号1 Hla スクロレオチド配列

5 GCCGACAGCGACATCAACATCAAAACGGGACGACGACATTGGCTCAAAATACGACGGTGAAMAAAC
GGGGCTGTGGTACCTATGACAAAGAAACGGGATGCATAAAAAGGTTTATAGTTTCATGAT
GACAAAACACCAACAAAACCTGCTGTGATTCGTACCAAAAGCGACGATCGCAGCCGAGTATCCG
GTGACAGCGAAAGAGGGGCTAAATAATCAGGCTGGCATGGCCGTCGGCTTTAAAGTACAGCTG
CAACTGCGGGATAAAGAAAGTCGGCGAAATTAAGCGGATATACCCGGTAACTCTATCGATGACAA
10 GAATACATGCTACCCCTGACCTAGCGGTAAAGCGGTAATGTCACCGGGATGACACGGGTAAAAAT
GGCGGCTGATCGCGGCCAACGTGAGCATGGTATACCCGTAAGATATGTCAGCGGAGCTTTAA
ACCATCTGGAACTCCGACGGATAAAAAAGTGGGCTGGAAGTTATCTTCAACAACATGGTTAAC
CAGAACCTGGGTCGGTATGATCGTACTCATGGAAACCCGGCTTACGGGAATCAACTGTTTATGAAA
ACCGGCAACGGTTCGATGAAAGCGGGATAACTTCTGGAACCGGAATAAAGCGAGCTCTGCTGCT
GAGTTCGGGCTTTAGTCCGACTTCGGACCGGTGATACGATGGATGCGAAAGCGTCCAAACAGCA
15 AACCAATATTGATGTCATCTATGAACGTGTGGCGGATGACTACCGCTGCACCTGACCGACGCAAA
CTGGAAGGTACCAATACAAAGATAAATGATGATGACCGCTCTCGGAAAGCGTACAAAATGACTG
GGAAAAGAAAGAAAGAGCAAC

配列番号2 Hla アミノ酸配列

25 AADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTDGLVTVYDKENGMHKKVYFSDIDKNNHKKLVIRTKGIAGQYRVYSE
GANSKGLAWPSAFKVLQLDTPNEVAQISDYPNRSIDTKYEMSTLYVFNQNVTDGDDTKIGGLIGAVN
SIGHTLKYVDPFKLIESPTDFKVVWKFVFNINQNVNWPYDRSWMNVPYGNLQFMKTRNGSMKAA
25 DNFLDNPKNASSLSSGFSPDKVITMDRKASKQNTDIVERVDRDDYQLHWTSTNWKGTNKDKWID
RSSERYKIDWEKEMTN

配列番号3 LukS スクロレオチド配列

30 GACAAACACATTGAAACATTGGTGTGGCGCAGAAGTGGTGAACCGCAGGAAGATACCTCAAGC
GATAAATGGGGTGTGACCGAGAACAATCAGTTCGATTCGTCGAAAGCAAAAATACAAACAAGATG
CACTGATTTGAAAATCAAGAGCTTTATCAACAGCAAAACCCACTACTACAACCTACAAAACACCGA
CCATATCAAAAGCTATGGCTGGCCGTTCCAGTACAATATCGGTGTAAGAAACGAACTCGAATGTT
GACCTGATCACTACCTGCGGAAACAAAATCGATTGAGTGAACGTTTCGCAAAACCTGGGCTAC
35 AATATCGCGGTAACCTTAATAGTGGCCGTCACCGGGTAAACCGGTAGCTTCACTACTCTAAA
ACGATCAGTTACAAACCGAACAACCTAATCTCTGAAAGTCGAAAGTCGAAAGCAAGCAAACTGTGCAAT
GGGGATTAAGCGAATTCCTTATCACTCAGTGGGCAAAATGTGGGTCATGATCGAAACCGTGT
TTGTGGGTTATAAACCCTGACGCGAAGCCGCGGCAATTTTCCTTCCGACAAATGAACCTGCGCG
CGTGTGCTTCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACTGCACT
40 ATACCGGAAATTTGAAATCAGTATGTTGCAATATGACAGCTTACCCATCGGACCGTCCGACCA
CGCACTAGGCACTCTACCTGCGGAAAGTTCAGTATTCACAAATGCGCTTGTATGCGCAATATCAC
GGTGAATACGAGTCAACTGGAACCGCACGAAATCAAAAGTGAAGGTCATAAC

配列番号4 LukS アミノ酸配列

45 DNNIENIGDGAIEVKRTEDTSSDKWGVTONIQDFVFKDKKYNKDALILKMQGFINSKTTYNYKNTDHIK
AMRWPFQYVNLKTDNPKIDSVNVSQTLGYNIGNFNPSGPTGNGSNFYSKTSISYNO
QNYISEVERQNSKSVQWIKANSFISLKGMSHDPNLVFGYKPYQSNPRDVFYRPNELPPLVYVGNFW
PSFIATVSHKESGSDTSEFEIYGRNMDVTHAIRRTHYGNYSLEGRHNFVNRNVTYKVEYVNWKTH
50 EIKVKGHN

【図9B】

配列番号5 LukF スクロレオチド配列

5 GCGCAGCACATCAACCGCGGTCTCCGAAAAAAGTTGACGACAAAATACCCCTGTATAAAACGACG
GCGACAGGGAGCTGCGCAAACTGAAAATTTCTAGATCGTCCAGCTTCACTTATCAAAAGATAAAA
GTTACGATAAAGACAGCGTATTCGAAAGCGCGGTAACATCTATTCGGCTACACCAAAACCGA
ATCCGAAAGACACAGTACGCTGCAATCTTACGCTGGGTTCCAAATCAACAAATCAACAGTGA
10 TTCGAAAGCTCGCTCAATGTGGTGTGATTAACCGGAAAAAAGCAAGTGAAGAAATTCAGGTCGAG
CAAAACCGTGGGCTAGTTACGGGGGTGACATTAACATCTCGAATGCTGACGCGCGGTGGCA
CGGCTCAAAATCGTTCAGGAAACGATCACTACAACAGGAATTTACCGTACCAAGTGTGGATAA
ACGCGCAAAATTCAGAAAAATTTGGTTGGGACGTAAGCGCATAAAATCAATGACCAATGGTTGGG
CCGCTATGGCGGTGATTTTACAGTACCTACGCTAACGAAATTTCTGGGCTCCGCGGCTG
AAACCTGAATGCGGGTCAAAATTTCTGGAATACCAATAAAATGCGGCTTCTGAGCGCTGATAGCTT
15 AATCGGAAATTCATTTGGGCTGCTGCGGCAAAACAGCAAGCGGCAAAATTTCTAAAATACCGCTG
ACGTTATCAGGTGAAATGATGCTGCTACACCAACTTTTGAATCACTGCATGATGATGCGCAACAC
TAGAAGATGAAAACCGTGCACCGACAGGACTTACGAAAGTGTGACTGGAAAAACACACGGGTG
AAACTGATGATACCCAAAGTAAAGAAAAAACCCGATGCG

配列番号6 LukF アミノ酸配列

25 AQHITPVSEKVVDDKITLYKTTATSDSKLKIQLTFNFKDKSYDKDILLKAAAGNIYSKTPKPNKDTISS
QFYHWGSKYINISDSNDSNVNVDYAPKQNEEFVQVQTVGYSYGGDINISGLSGGNGSKSFSETI
NYKMSLDRKTRNFKIGWVDEAHKIMNNGWVPGYRDSYHSTYGNEMFLGSRQSNLQAGQNFLE
25 NHPMLVSRGNFPEFVLSRQNAAKSKITVTYQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYT
YEVDWENHVKLLDITKSKENPMS

配列番号7 LukE スクロレオチド配列

30 AATACGAATATCGAAAATATCGGCGACGCGCAGAAGTATCAACCGCAGGAAGATGTCAGCAGC
AAAATGGGGTGTACCGCAAGATGTTGATGCTGATTCGTAAGGACAAAATACAAACAAGATG
CAACTGATTTGAAAATGCAAGGCTTTTCAATTTCTGTCACAGTTTCTCGACGCTTAAAGCGAGTG
TTATGAACTGAGGAAACCGATGATTTGGCGGTTTCAGTACAACATCGTCTGACCCGAAAGATGG
35 GAGGTTTCCGCTGATCAACTACCTGCGGAAACAAAATCGGAAACACCGGACCTGGCGCAGACCC
GGTTTACAACATTTGGCGTAAATTTCAAAGCGGTCGCTATCGCGGTAACGGCTTCACTTAA
CTCGAAAAACATTAGCTATACGCAAGAAAGTACGCTGTCGAAAGTGTATAAAGCAAACTCAAAATCG
GTCAAAATGGGGGTTGAAAGCGAAGCAAAATTTGACCCCGGATGATGAAATTTGCGCATGACCC
TACCTGTTTGTGACGTCGCGAATGTTGCGACGCGGTAAGCGGTAAGCGGTAAGCGGTAAGCGG
40 GACGCTCGGCTGATACCTGCGAATTTGAAATTCATATGCTGTAATCGGATCTGACCTACCCACG
CTGTTTCCGCTACCGGTATCTATGCAAGACCGCAACCAAGCTTTTGTAACTCGCAATTTCTGTT
TCCGCTACGAAAGTGAACGTAAGAACCCATGAAATCAAAAGTGAAGGCGCATAAC

配列番号8 LukE アミノ酸配列

45 NTLNENIGDGAIEVKRTEDVSSKWKVTONIQDFVFKDKKYNKDALIVKMQGFINSRSTFSFVSKGSY
LTKRMWPFQYVNLKTDNPKIDSVNVSQTLGYNIGNFNPSGPTGNGSNFYSKTSISYNO
QKSYSEVVDKQNSKSVKQWVKAPEVTPDQKSAHCDYLFVGNPNTGFSAREYFADNQLPPLVQS
45 GNPSPFITLSHEKSSDSEFEIYGRNMDVTHAIRRTHYGNYSLEGRHNFVNRNVTYKVEYVNWKTH
VKGNH

【図9C】

配列番号9 LukD スクロレオチド配列

5 GCCAACACATTACGCGGCTCGGAAAAAAGTGGATGACAAAATACCGGTGTATAAAACGACG
GCAACCTCAGATAAGCAGAACTGAACATTAAGTCAGATCOTGACCTTCACTTCACTCAAAAGTAAAT
CCTACGATAAAGACACCGTGGTGTGAAAGCGCGCGCAACATTAATTCAGGTTACAAAACCGCA
ACCGGAAAGACTATAAATCTGCGAGTTTATTCGCGCGTAAATACAAAGTACAGCTGAGCGCTG
10 GCAAAACCGTGGGCTATGCTACGCGGAGTATTAATTAACATCTCAAAATGGCGTGGCGGGTCTGAA
CGGTTGAAAACCTTCTGTAACCCATCACTCAAAACAGGAAAGACTACCGTACCCAGTATGATCG
CAAAAACGCACTAAATCTATCCGCTGGGGTGTGAAAGCGCAAAAATATGAAACATGCGGTTGGG
TCGCTATGCGCGTGTATCTATGACCCGACCTACGATTAAGACTGTTTCTGGGCGTGGCCAGAG
15 TTCTCAAGCGGGCGGCGAAATTTCTGCGGAGCGCATCAGATGCGCGCTGCTGGCAGTGAATCT
TAATCCGGAATTCATCAGTGTGCTGCCCAAAAACAAACGATACCAAAAATCTAAAATCAAAGT
ACGATCAACCGTGAATGGACCGCTACACCAAGTGAAGTGGCTGCAATGGTGGTTPGTAAGCAAC
TACAAAACGAGAACCCGTTACGTTCACTCTACGTAAGAAAGTGCATTTGGCAAAAACCATACGGCT
AAACTGATTTGGCACGGACAGAAAGAAACGAAACCCGCGGCTG

配列番号10 LukD アミノ酸配列

25 AQHITPVSEKVVDDKITLYKTTATSDSKLKIQLTFNFKDKSYDKDILLKAAAGNIYSKTPKPNKDY
YSQFYWGGKYNVSSSENDAVNVDYAPKQNEEFVQVQTVGYSYGGDINISGLSGGNGSKSFSE
25 ETINYKQESYRITIDRKNTHKSIQWVVEAHKIMNNGWVPGYRDSYDPTYNELFLGGRQSSNAGQNF
LPTHQMLLARGNFPFISLHSHKNDTKSKIKVTYQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYT
STYEVWDQNHVTKLIGTDSKETNPGV

配列番号11 HlgA スクロレオチド配列

30 GAAAACAAAATCGAAGACATCGGCGAAGGTGCTGAAATCAATCAAAACGACGCAAGACATCACGAGT
AAACGCTGCGCAATCACGACGAATATCAGTTCGATTCGTAAGAGCAAAAATACAAACAAGATG
CACTGCTGTTAAATGCAAGCGCTTATCAGCTCTGTACCCAGCTACAGCGATCGTGAAAAATATCC
GTACATTAAGCGCATGATGTCGGCGTTCCAGTACAACATCAGTGTGAAAACCAAGAGTCCAAAGT
35 GACCTGATTAATTAACCTGCGGAAACAAAATCGATGTCGGCGGTTTCCAGAAACCTGGGCTAT
ACGATGGCGGTAATTTCAATCAGCCCGCTGATCGGCGGATGTTGTTCAATTACTCAAAA
CCATCTGTACAAACGAAAAAATTAAGTTCAGGAAGTGCAGAAAGCCAAAATCAAAAGCGGTGAAT
GGGTTTAAAGCGAATTCATTTGTCACCCGCAAGCGGAGGTCGCGGCTATGATCAGTACCTGT
40 TTGACAAAGCCGACGCGGTCGCGGAGCACGCTGATTTATTTGTTCCGGACAATCAGCTGCGGCG
CTGATTCAAAGCGGCTTTAACCGCTTTTATCAGCAACCGCTGTCOCATGAACGTCGCAAAAGT
AAAAGCGAATTTGAATTAACCTATGCTGCAACATGATGCAAACTATGCTTACGTTACCGTCACT
GCTGGCAGTTCGATGTAAGCAGCGCTTTCAAAAACCGCAATGCAACGCTGAAATACGAAAGT
40 AACTGAAAACGACGAGTCAAAATCAAAATCAATCAACCCGAA

配列番号12 HlgA アミノ酸配列

45 ENKIEDIGGAEIHKRTDQDTSKRFLATNIQDFVFKDKKYNKDALIVKMQGFISRTTYSDLKIKYPIKRM
WPFQYVNLKTDNPKIDSVNVSQTLGYNIGNFNPSGPTGNGSNFYSKTSISYNO
45 TEVESQNSKGVKQVANSFVTPNGQVSAVDYLAQDPTGPAARDYFVDPNQLPLIQSFPNPSFIT
TLSHERGKGDSEFEIYGRNMDVTHAIRRTHYGNYSLEGRHNFVNRNVTYKVEYVNWKTHKVEKISITPK

【図9D】

配列番号13 HlgC スクロレオチド配列

5 GCAAAGACACCGAAGACATCGGCAAGGTTGACGACATCGAAATCATCAAAACGCGGAAAGCA
AAGAGCAATAAATGGGTTGACGACGACATCAATTCGATTCGTAAGGACAAAATACAAATACA
AAAGATGCGCTGATTCGAAAGTCAAGCGGCTTTATCAGCTCTGTAACCGTACTACAACATCAAGA
10 AAACCAACCTGTTAAAGCCATGCGCGCTGCTGCAATCAACATCGGTTGAAAACGAAATGACA
AATATTCAGTCTGATTAACCTACCTGCGGAAAAAATAAATCGAATCGACCAACGTCGAGCGAGCG
GGCTATAAATTTGGCGTAAATTTCAATCGCACGCTCACTGGGCGGTAAACGGTTCACTTCAATTA
CTCAAATGATCAGCTATACCCGCAAAACCTGCTGCAAGTGAACAGAAATTTCAAAATG
15 GCTGTGGGCGGTGAAAGCGAATAGCTTTGACCGGAACTGTTGTTGCAAGAAAGTATTTGATTC
GACCTTGTGTTGGGCTATAACCGCATCAAAAGATCCGCGTACTACTGTCGCGGATTTGGGAA
CTCGCCCGCTGTTTCAGTCAGTTTTAACCGTTCCTTTCATGCTACGCTAGTACGAAAGCG
AGTTCCGATACCTCGAATTTGAAATTAAGTATGCTGATGATGACAGCTCAACCGTGAATCAAC
40 GCAACCGCACTAGGCAACTCTTACCTGKATGCTTACCTGTTCACTGTTCACTGCAATGCTTTT
ATTATACGTTGAAATACGAAAGTCAACTGAAAAGCGCAAGAAATGAAAGTCAAAGTCAAAAC

配列番号14 HlgC アミノ酸配列

20 ANDTEDIGKSDIEIKRTEDKTSNKKWGVTONIQDFVFKDKKYNKDALILKMQGFISRTTYYNYKTNH
KAMRWPFQYVNLKTDNPKIDSVNVSQTLGYSYGGDINISGLSGGNGSKSFSETI
20 QNYISEVQEQNSKSVLWGVKANSFATESGQSAFSDLVFVYKPHSKDPRDYFVPSLPLVQSGF
NPSFIATVSHKESGSDTSEFEIYGRNMDVTHAIRRTHYGNYSLEGRHNFVNRNVTYKVEYVNWKT
HEIKVKGHN

配列番号15 HlgB スクロレオチド配列

30 GCGGAAAGCAAAATACCCCGGTTGCGGTAAGAAAGTTGACGACAAAGTGACGCTGTATAAAACG
ACGCGCACGCGTATTCGATGAAATTTAAATTAAGCAGATCCTGACCTTCACTTCACTCAAAAGATA
AATCTTACGATAAAGACACCCCTGGTGTGAAAGCAGCGGCAACATCAATAGCGGTTTTGTTAAAC
35 CGAACCCGAAATGATACGACTTCAAAACTGATTTGGGCGGAAATCAAAATGTTTCGATGATGCT
TCAGATGACGATTCGCTCAATGTGGTGTACTGCTGCGGAAAAAAGCAAAATGAAGAAATTCAGG
CAAAAACCCCTGGGTTACAGCTTCCGCGGTGATATTTCAATCGAATGGGCTGAGTGGCGGCTG
AACCGTAAACCCGCTTTCCGAAAGGATTAACATAAAGCAAGAAAGCTACCGTACCAAGCTGCTG
40 GCAACCAAAATATAAAAATGTCGGCTGGGCTGTCGAAAGCCATCAAAATGATGAAATGCTGCGG
GTCCGTTAGCGGCTGACTCTTTCAACCGGCTGTCGAAAGCCATCAAAATGATGAAATGCTGCGG
TAAATCGCAATTCGCTGCAAGTTTATTTGCGCAACCGGATGAGGCGGCTGCAAGCTGCTGCAAG
40 TACGATACCGGCTGAAATGACCTGTACCAAAATCCGCTGGAACGGCTGATTTGGGCAAGGCTGCT
ACTCAAAAACCTCAAAAACCGTACCTGCAAAATCTACCTATGAAATCGATTTGGGAAAAACCAAA
CAAACTGCTGACACGAAAACGAAAATATAAA

配列番号16 HlgB アミノ酸配列

45 AEGKITPVSEKVVDDKITLYKTTATSDSKLKIQLTFNFKDKSYDKDILLKAAAGNIYSKTPKPNKDY
DFSKLYWGAAYNVSISQNSDSNVNVDYAPKQNEEFVQVQTVGYSYGGDINISGLSGGNGSKSF
45 ETINYKQESYRITLSPNTNFKYKNSFVTPNGQVSAVDYLAQDPTGPAARDYFVDPNQLPLIQSFPNPSFIT
FIHQHQPMLLSRNSFPEFVLSRQNAAKSKITVTYQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYTQREMDRYT
KSTYEDWENHVKLLDITKSKENK

【 図 1 】

mAb スクリーニングのために産生されそれとして用いられる 10 の機能性毒素サブユニット



アルファ毒素、 **H1a**

二成分毒素

S 成分

F 成分

HlgAB, CB (B) (A) (B) (C)

LukSF (F) (S)

LukED (D) (E)

LukGH (G) (H)

(A) (C)

(S)

(E)

(H)

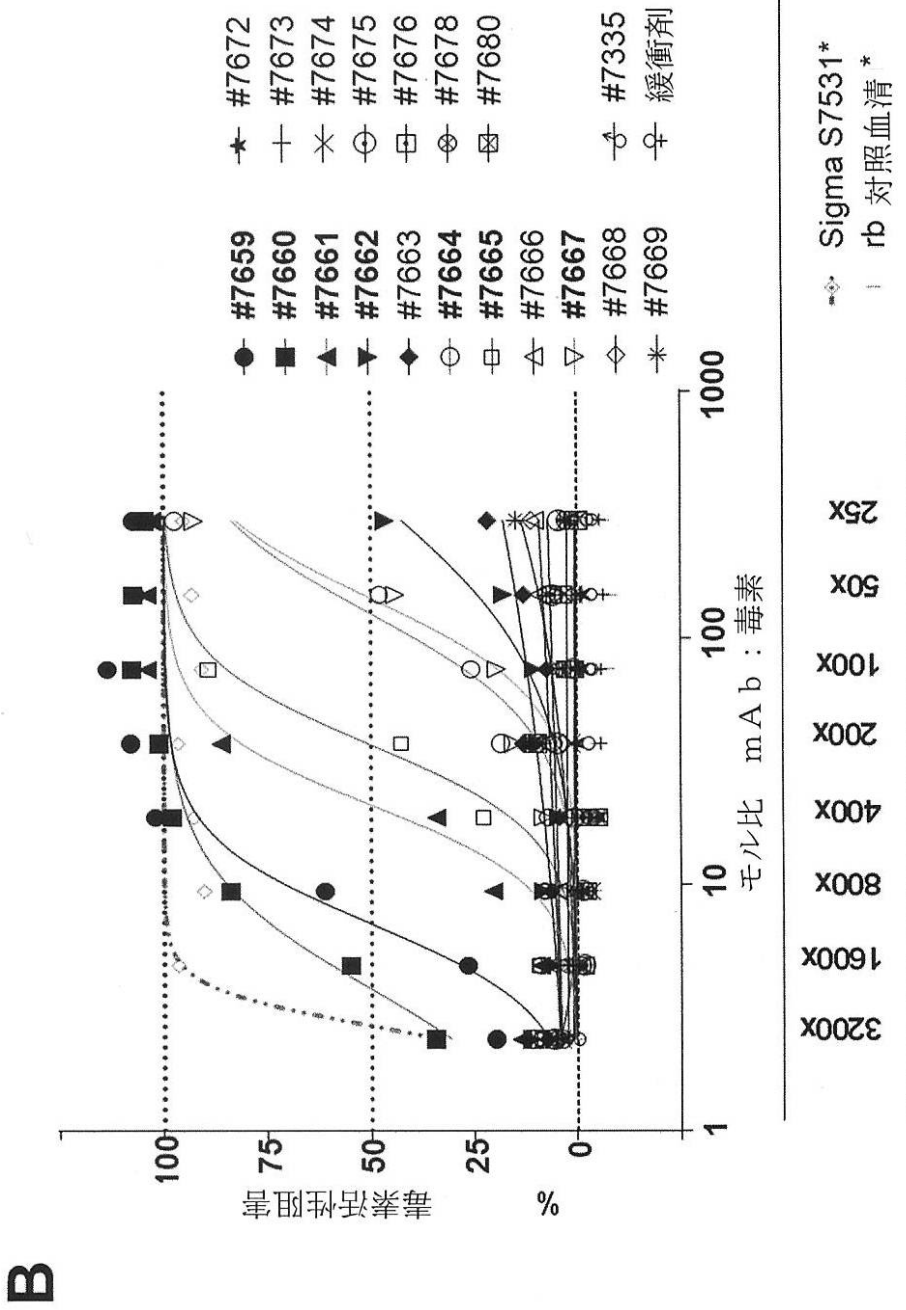
(B)

(F)

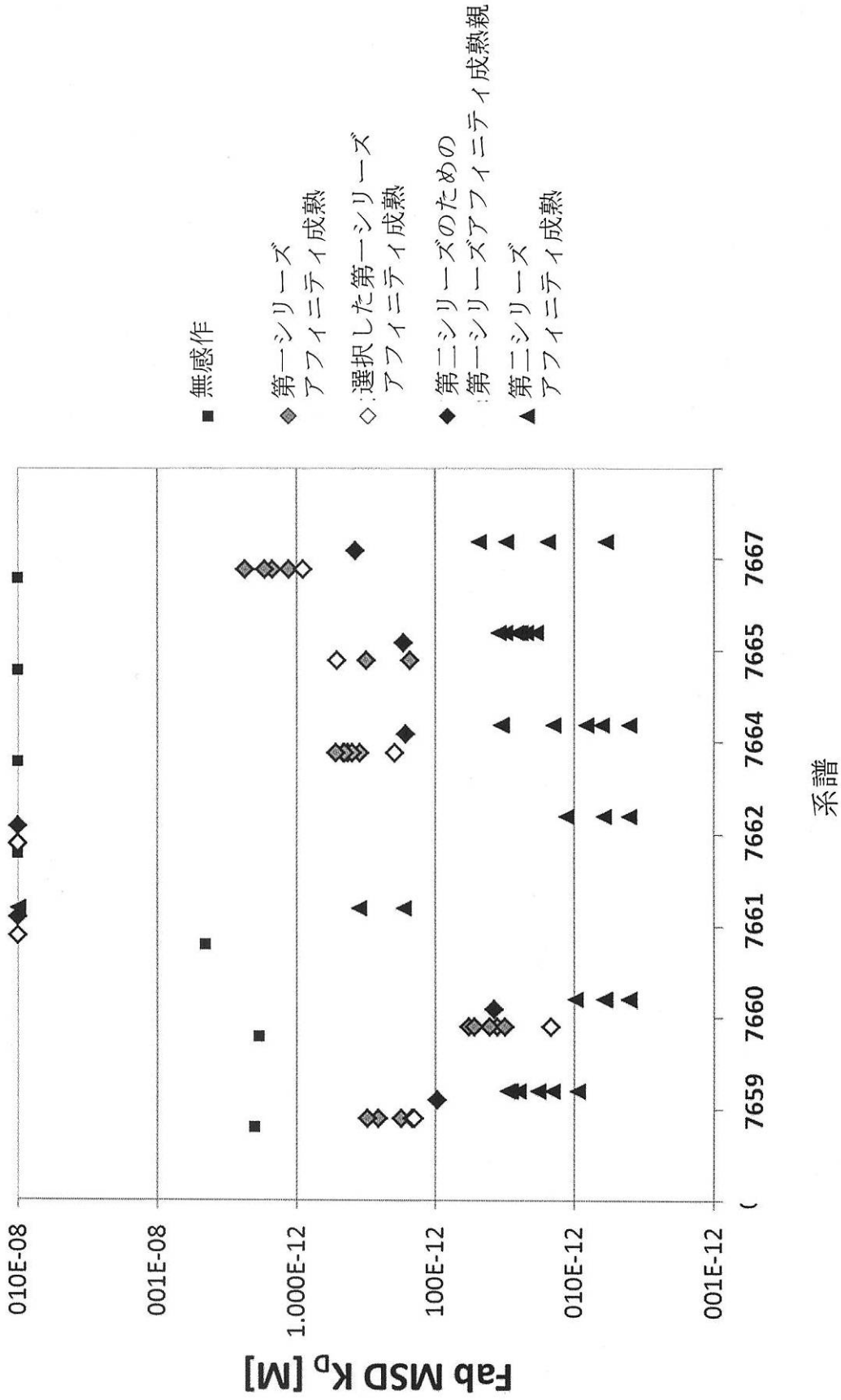
(D)

(G)

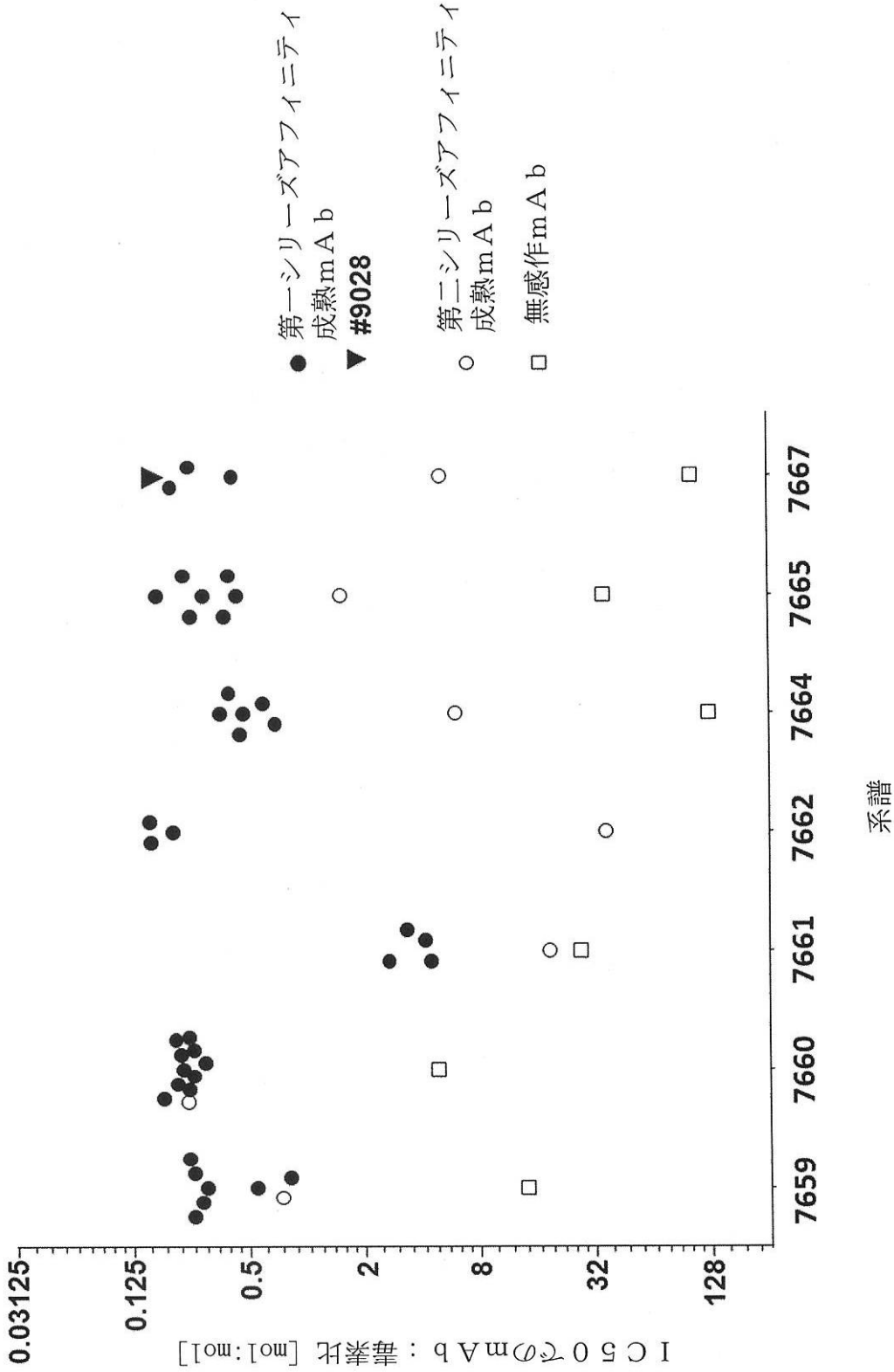
【 図 2 B 】



【 図 3 】

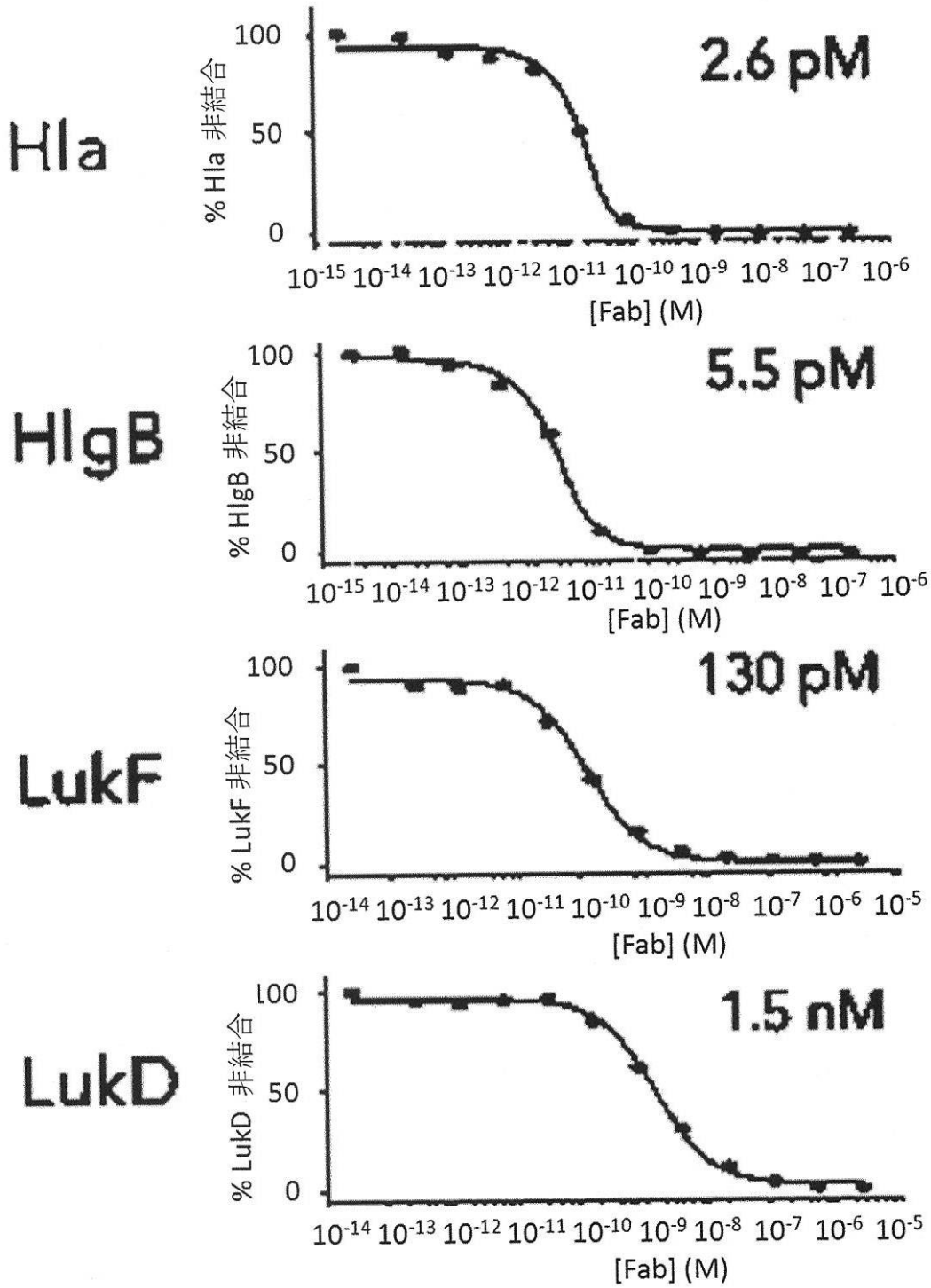


【 図 4 】



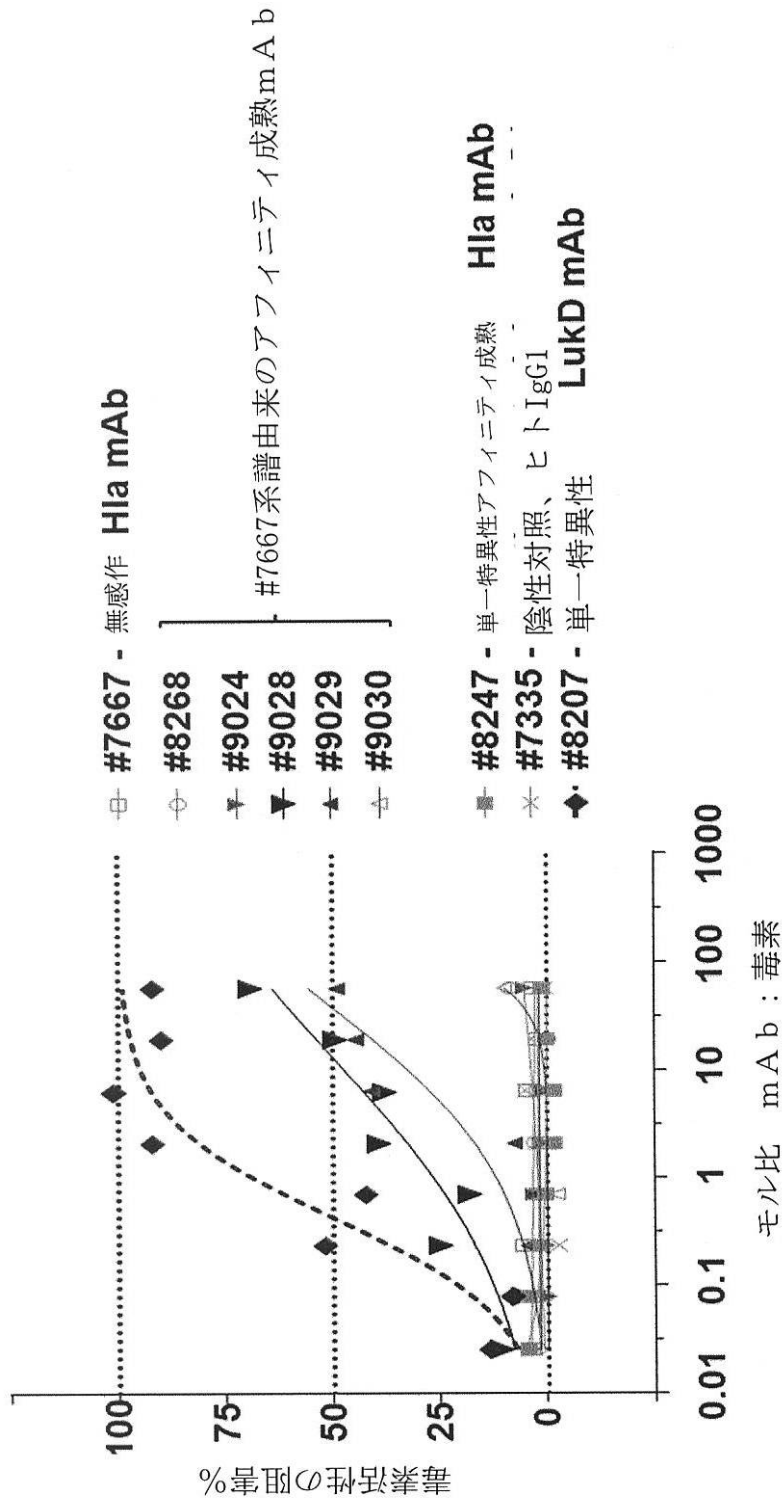
系譜

【 図 5 】

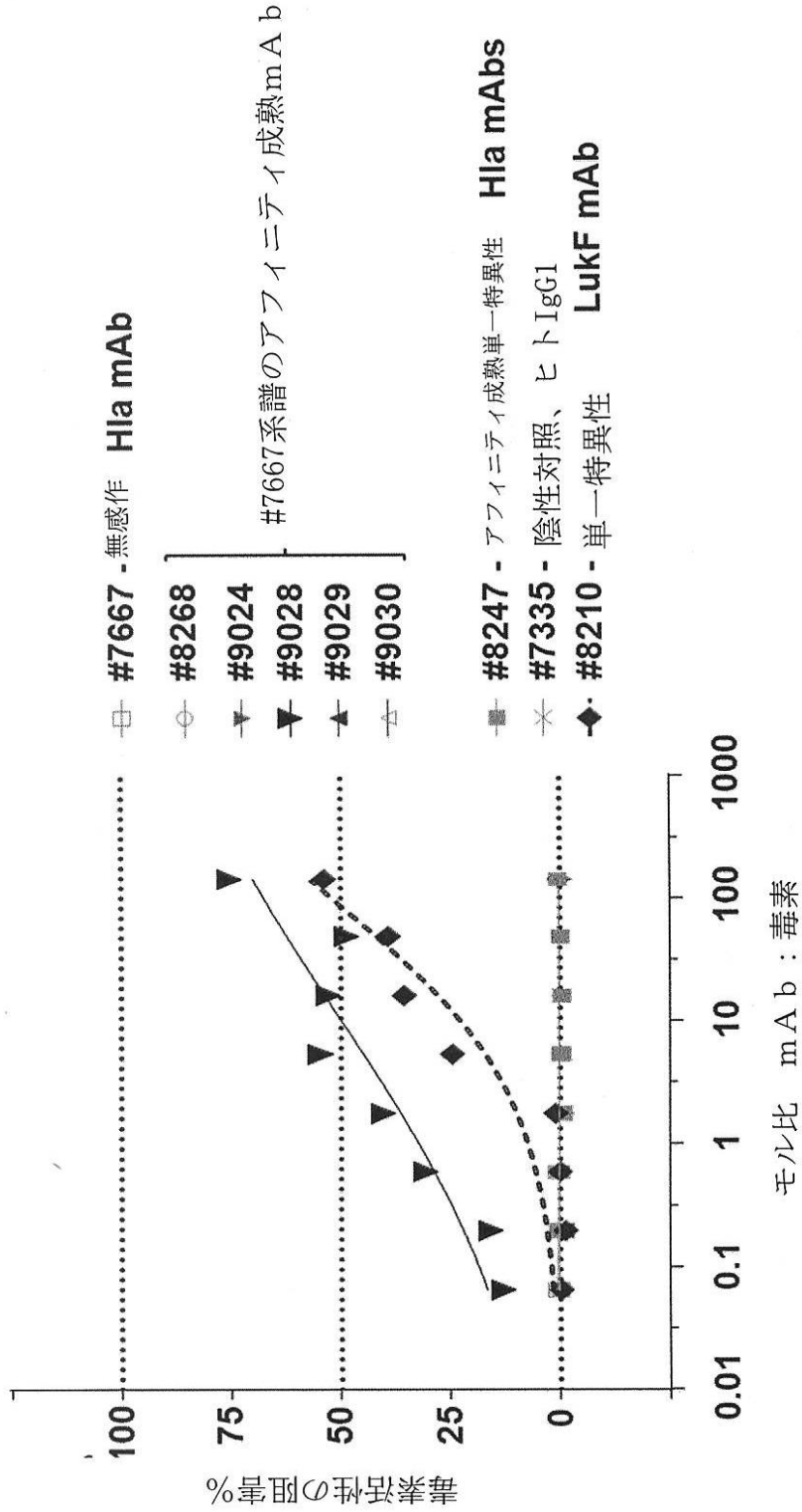


B

【 図 6 B 】



【 図 6 C 】

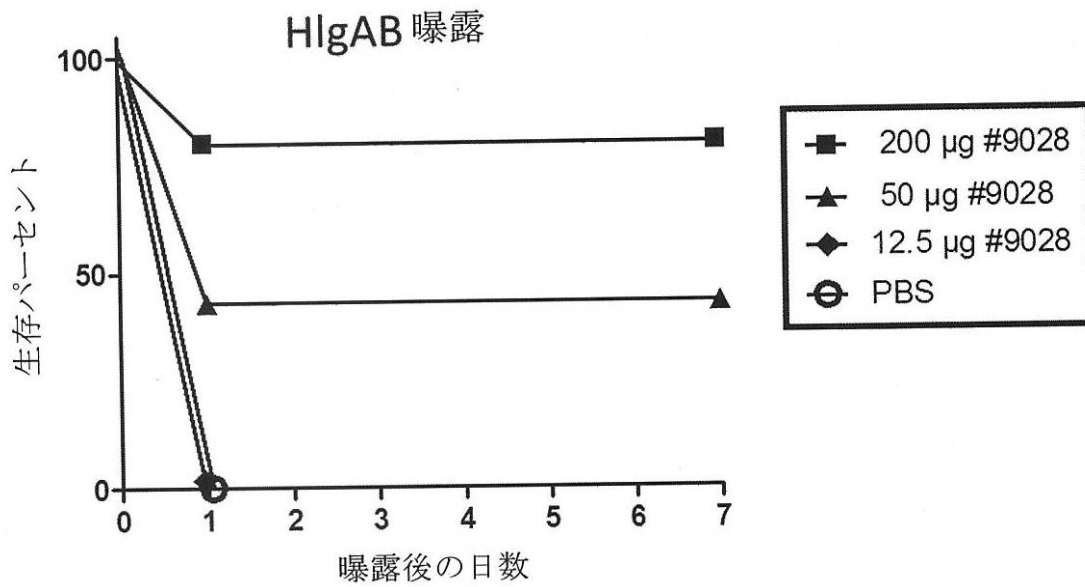
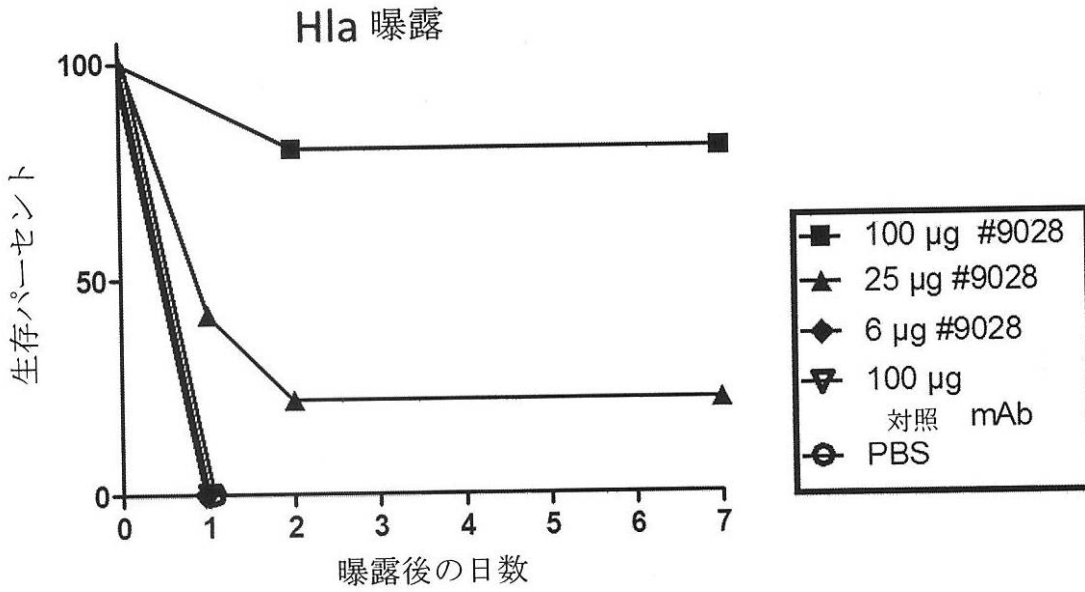


C

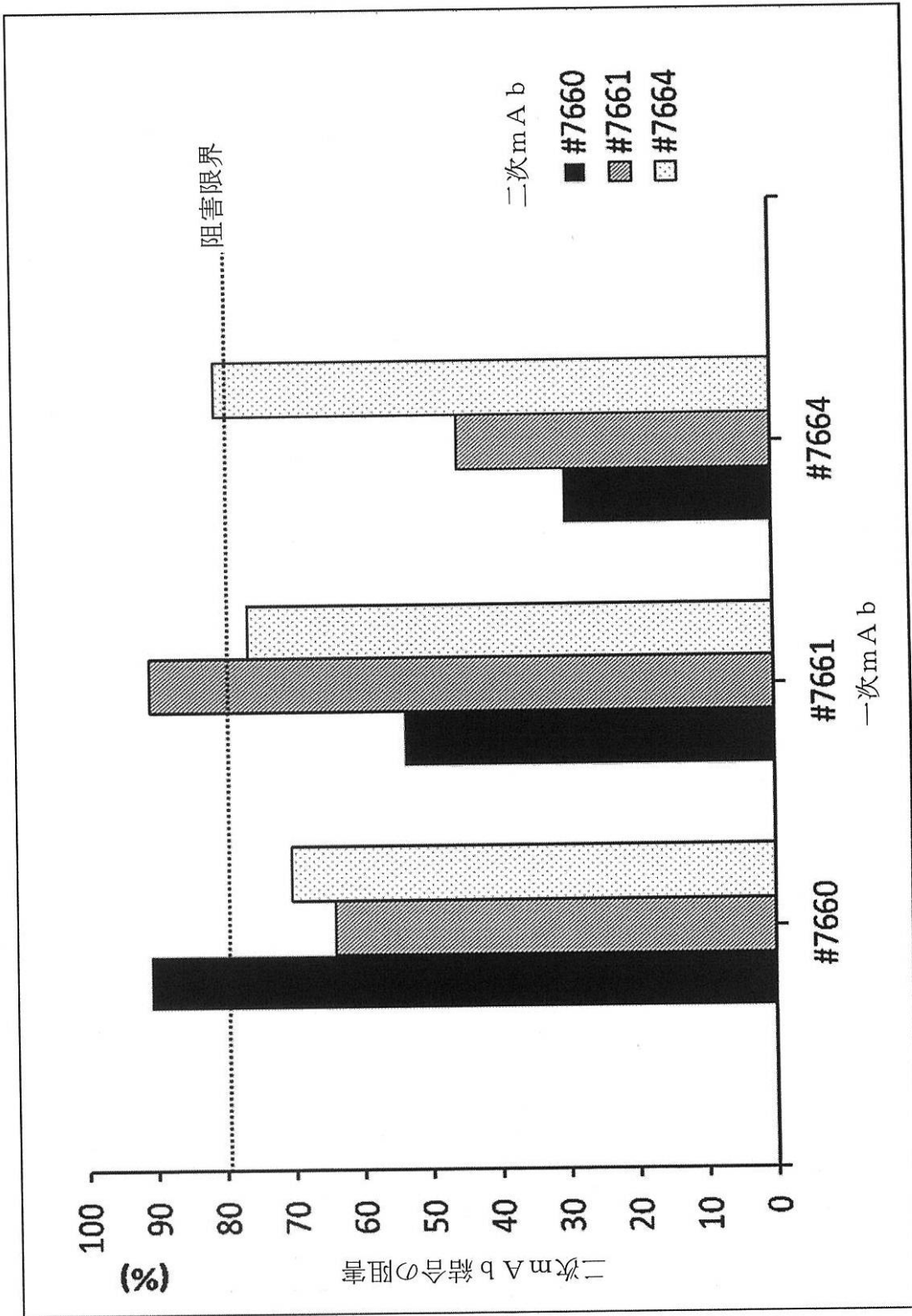
【 図 6 D 】

図 6 D、7 A および 7 B に対するいかなる言及も、存在しないと見なされるべきである

【図7】



【 図 8 】



【 配列表 】

2015515479000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/058022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/12 A61K39/40 A61P31/04 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHLESEN KNUT ET AL: "Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections", INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, URBAN UND FISCHER, DE , vol. 300, no. 6 1 August 2010 (2010-08-01), pages 402-410, XP002687632, ISSN: 1438-4221, DOI: 10.1016/J.IJMM.2010.04.015 Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422110000445	8-12,14, 19-22
A	whole document, especially Tables 2-4; page 405, "Toxins"; page 408, "Toxins" ----- -/--	1-7,13, 15-18
<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 principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but 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 combined 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		"&" 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 30 July 2013		Date of mailing of the international search report 08/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luyten, Kattie

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/058022

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JULIANE BUBECK WARDENBURG ET AL: "Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 205, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 287-294, XP002504766, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM20072208	8-12,14, 19-22
A	whole document, especially the Abstract; Figures 2 and 4	1-7,13, 15-18
X	RAGLE B E ET AL: "Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against Staphylococcus aureus pneumonia", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MACROBIOLOGY, USA, vol. 77, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 2712-2718, XP008116015, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00115-09 [retrieved on 2009-04-20]	8-12,14, 19-22
A	whole document, especially the Abstract; Figures 1-6	1-7,13, 15-18
X	HEVEKER N ET AL: "A human monoclonal antibody with the capacity to neutralize Staphylococcus aureus alpha-toxin", HUMAN ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS, IOS PRESS, NL, vol. 5, no. 1-2, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 18-24, XP002402054, ISSN: 0956-960X	8-12,14, 19-22
A	whole document, especially the Abstract; Table 3	1-7,13, 15-18
X	B.-J. LAVENTIE ET AL: "Heavy chain-only antibodies and tetravalent bispecific antibody neutralizing Staphylococcus aureus leukotoxins", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 39, 27 September 2011 (2011-09-27), pages 16404-16409, XP055059913, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1102265108 cited in the application	8-12,14, 19-22
A	whole document, especially the Abstract	1-7,13, 15-18

1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	E
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	R
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	

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

(74)代理人 100162455

弁理士 辻本 典子

(72)発明者 ナギー, エスター

オーストリア国 1 0 7 0 ウィーン, ヴェストバーンシュトラッセ 3 2 - 3 4 / イー / 1 2

(72)発明者 バダラウ, アドリアナ

オーストリア国 1 0 3 0 ウィーン, クリムシュガッセ 1 9 / 7

(72)発明者 ルーハ, ハラルド

オーストリア国 1 2 2 0 ウィーン, シュッタウシュトラッセ 4 8 / トップ 1 4

(72)発明者 ストゥリク, ルーカス

オーストリア国 1 1 6 0 ウィーン, ザントライテンガッセ 1 7 / 1 / 5

(72)発明者 ナギー, ガーボル

ハンガリー国 9 4 0 0 ショプロン, エルドバルゲル・デューロー 8

(72)発明者 ミルキナ, イリーナ

オーストリア国 1 0 2 0 ウィーン, ハルコルトシュトラッセ 7 / トップ 4

(72)発明者 マギヤリックス, ゴルターン

オーストリア国 1 1 6 0 ウィーン, ツェヒバウアーシュトラッセ 9 / 3 7

(72)発明者 ヴィスラム, ツェーラ

オーストリア国 1 0 9 0 ウィーン, テュルケンシュトラッセ 2 1 / 2

(72)発明者 イェーゲルホーファー, ミカエラ

オーストリア国 1 0 2 0 ウィーン, インシュトラッセ 2 4 / 5 / 8

(72)発明者 ゼルプス, マニユエル

オーストリア国 1 2 0 0 ウィーン, クロスターノイブルガーシュトラッセ 1 5 / 9

(72)発明者 ドレジルコバ, イヴァナ

オーストリア国 1 0 7 0 ウィーン, アホルナーガッセ 1 1 / 9

(72)発明者 テウベンバチャール, アストリッド

オーストリア国 1 0 5 0 ウィーン, フォーゲルザングガッセ 8 / 1 1 - 2 1 2

(72)発明者 バトルズ, マイケル・ベンジャミン

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州 0 3 7 6 6 , レバノン , ニューハンプシャー , ルーセント・
ドライブ 7

(72)発明者 プリンツ , ビアンカ・ドミニク

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州 0 3 7 6 6 , レバノン , ニューハンプシャー , ルーセント・
ドライブ 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA38 BA61 CA01 DA06 EA04 GA11 HA08
4B064 AG27 AG30 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA26X AA53Y AA57X AA87X AB01 BA02 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C085 AA12 AA14 CC07 DD23 DD62 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20 EA52
FA74

专利名称(译)	交叉反应性金黄色葡萄球菌抗体		
公开(公告)号	JP2015515479A	公开(公告)日	2015-05-28
申请号	JP2015506230	申请日	2013-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔萨尼斯生物科学有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Arusanisu生物科学的法理社会美图-Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ナギーエスター バダラウアドリアナ ルーハハラルド ストゥリクルーカス ナギーガーボル ミルキナイリーナ マギヤリックスゾルターン ヴイスラムツェーラ イェーゲルホーフアーミカエラ ゼルプスマニュエル ドレジルコバイヴァナ テウベンバチャールアストリッド バトルズマイケルベンジャミン プリンツピアンカドミニク		
发明人	ナギー,エスター バダラウ,アドリアナ ルーハ,ハラルド ストゥリク,ルーカス ナギー,ガーボル ミルキナ,イリーナ マギヤリックス,ゾルターン ヴイスラム,ツェーラ イェーゲルホーフアー,ミカエラ ゼルプス,マニュエル ドレジルコバ,イヴァナ テウベンバチャール,アストリッド バトルズ,マイケル・ベンジャミン プリンツ,ピアンカ・ドミニク		
IPC分类号	C07K14/31 C07K16/12 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/395 A61K39/00 A61P31/04 A61P11/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/00 C07K16/1271 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K14/195 C07K16/00 G01N33/56938		
FI分类号	C07K14/31 C07K16/12.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C12P21/08 C12N15/00.C G01N33/53.N G01N33/569.E A61K39/395.R A61K39/00.H A61P31/04 A61P11/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA38 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG27 4B064/AG30 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA53Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085		

/AA12 4C085/AA14 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20
4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045
/EA52 4H045/FA74

代理人(译)

小林 泰
竹内茂雄
山本修

优先权

2012164506 2012-04-17 EP
2013151010 2013-01-11 EP

其他公开文献

JP6228186B2

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本主题涉及交叉中和抗体，其包含至少一个结合 α -毒素 (H1a) 的多特异性结合位点和金黄色葡萄球菌的至少一种双组分毒素，其医学和诊断用途，产生抗体的方法包括用于抗体生产的分离的核苷酸序列，质粒和宿主细胞;并且进一步是由特异性交叉中和抗体识别的分离的构象表位。