

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4355786号  
(P4355786)

(45) 発行日 平成21年11月4日(2009.11.4)

(24) 登録日 平成21年8月14日(2009.8.14)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C07K 16/14</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K 16/14	
<b>A61K 39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 39/00	H
<b>A61K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 39/395	D
<b>A61K 48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 39/395	N
<b>A61P 31/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 48/00	

請求項の数 4 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-563954 (P2002-563954)  
 (86) (22) 出願日 平成14年1月25日(2002.1.25)  
 (65) 公表番号 特表2005-500250 (P2005-500250A)  
 (43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/002382  
 (87) 国際公開番号 W02002/064161  
 (87) 国際公開日 平成14年8月22日(2002.8.22)  
 審査請求日 平成16年11月15日(2004.11.15)  
 (31) 優先権主張番号 09/770,916  
 (32) 優先日 平成13年1月26日(2001.1.26)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/264,795  
 (32) 優先日 平成13年1月29日(2001.1.29)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500345401  
 エムシーダブリュー リサーチ フォンデ  
 ーション インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 532  
 26 ミルウォーキー ウォータータウン  
 ブランク ロード 8701

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シュードモナスV抗原を用いる免疫化のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

P c r Vポリペプチドアミノ酸配列におけるアミノ酸残基144~257の領域においてエピトープを認識する抗P c r Vモノクローナル抗体またはその断片であって、配列番号4の軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列のCDRと、配列番号2の重鎖ポリペプチドアミノ酸配列のCDRとを含む、抗 P c r Vモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項2】

P c r Vポリペプチドアミノ酸配列におけるアミノ酸残基144~257を含むエピトープを認識する、請求項1記載の抗P c r Vモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項3】

(a) 配列番号4の軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列のCDR及びFR領域を含み、かつ  
 (b) 配列番号2の重鎖ポリペプチドアミノ酸配列のCDR及びFR領域を含む、  
 請求項1又は2に記載の抗P c r Vモノクローナル抗体または断片。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか1項に記載の抗P c r Vモノクローナル抗体または断片をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、以下の機関により与えられた米国政府支援によりなされた。NIH/NIA  
 DA許可番号R01 A131665-08、K04 AI01289-04およびR0

1 HL59239-02。米国は本発明に一定の権利を有する。

【発明の背景】

【0002】

シュードモナス・アエルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) は、重病の個体において致命的な急性肺感染を引き起こすことのできる日和見細菌病原体である(1)。細菌の肺上皮傷害能は、III型媒介分泌および転位機構を介して、真核細胞に直接注入される毒素の発現と関連している(2、3)。

【0003】

P.アエルギノーザ (P.aeruginosa) III型分泌および転位装置によりコード化されるタンパク質は、エルシニア (Yersinia) Yopレギュロンのメンバーと高レベルのアミノ酸同一性を示す(4-6)。グラム陰性細菌に発見された全III型系の中で、唯一、P.アエルギノーザが、エルシニアV抗原であるPcrVに相同性を有する(III型系の概観については6参照)。分泌および転位装置に相同なタンパク質は、植物および動物の両方の病原性細菌によりコード化される。これらの生物は、サルモネラ・チフス菌 (Salmonella typhimurium)、シゲラ・フレクスナー (Shigella flexneri)、腸病原性大腸菌 (E.coli)、クラミジア (Chlamydia) 種などのヒト病原体、およびキサントモナス・カンペストリス (Xanthomonas campestris)、シュードモナス・シリングエ (Pseudomonas syringae)、エルシニア・アミロボーラ (Erwinia amylovora) およびラルストニア・ソラナセアラム (Ralstonia solanacearum) などの植物病原体を含む。しかし、唯一、P.アエルギノーザ およびエルシニアが、V抗原をコード化する。

【0004】

ヤール (Yahr) 等、1997は、PcrVをコード化するオペロンの配列を開示し、この配列をLcrVタンパク質と比較している。それゆえに、PcrVのアミノ酸配列は既知であり、GenBankの寄託番号AF010149で入手できる。

【発明の要約】

【0005】

本発明は、シュードモナスV抗原は、致命的な肺感染から動物を守るために使用できるという我々の観察から発展させた方法および組成物を含む。

【0006】

1つの実施態様において、本発明は、患者 (patient、患者または患畜) に有効量のPcrV抗原を接種することを含む、シュードモナス感染を抑制する方法である。別の実施態様において、PcrVをコード化するDNAを、遺伝子ワクチンとして使用する。

【0007】

1つの好ましい実施態様において、抗原は、組換えタンパク質として発現され、危険にさらされている患者を免疫化するために使用する。

【0008】

好ましくは、患者は、感染から完全に守られる。

【0009】

別の実施態様において、PcrVをコード化するDNA (pcrVと呼ぶ) またはDNA断片は、P.アエルギノーザ感染を検出するために診断的に使用することができる。

【0010】

別の実施態様において、組換えタンパク質 (rPcrV) は、患者から抗体を検出するために診断的に使用する。PcrVに対する患者の抗体応答は、予後に関連し得る。それ故、この実施態様において、組換えタンパク質は、患者の抗体力価を測定することにより、予後の指標として使用する。

【0011】

本発明はまた、個体を、有効量のPcrV抑制剤、特にPcrV抗体、抗体誘導体もし

10

20

30

40

50

くは断片、または抗体擬似体と接触させることにより、個体のシュードモナス感染を抑制する方法を提供する。P c r V抗体、抗体誘導体および抗体断片もまた提供される。

【0012】

本発明の目的は、シュードモナス感染に対して患者を能動および受動免疫化することである。

【0013】

本発明の別の目的は、P . アエルギノーザ感染を診断的に検出することである。

【0014】

本発明の別の目的は、シュードモナス患者から抗体を診断的に検出することである。

【0015】

本発明の別の目的、特徴および利点は、明細書、特許請求の範囲および図面を概観した後、当業者には明らかとなる。

【発明の説明】

【0016】

我々は、本明細書で、P c r Vは、III型分泌産物の発現に対して新規な調節効果を有し、III型毒素の転位に関与し、P . アエルギノーザ感染により誘導される肺損傷から守る最初の抗原であることを開示する。抗P c r V I g Gを気腔に滴下注入する前に、P c r Vに対してワクチン接種することにより、攻撃された動物の生存が保証されただけでなく、細菌により引き起こされる肺炎症および損傷も減少した。

【0017】

L c r V、またはV抗原は、Y o pエフェクタータンパク質の分泌および転位を調節し、エルシニア感染に対するホストサイトカイン応答を変化させることにより、病理発生に細胞外的役割を果たしている、多機能性タンパク質である(7-11)。この危険な病原因子の唯一の既知の相同体は、P c r Vと呼ばれる、P . アエルギノーザによりコード化される細胞外タンパク質である。

【0018】

本発明の1つの実施態様は、有効量のP c r V抗原を用いて患者を免疫化することにより、シュードモナス感染を緩和または抑制する方法である。ここで「有効量」とは、抗原で処置されていない対照被検者または動物と比較して、シュードモナス感染のいくつかの緩和または抑制が示されるに有効な量のP c r V抗原を意味する。

【0019】

ここで「緩和」とは、感染が、非免疫化動物と比較して、少なくとも50%抑制されることを意味する。好ましくは、感染は完全に予防される。感染の定量評価は、好ましくは、血流または胸水中の細菌量の検査および/または肺損傷パラメーターの検査を含む。例えば、血流または胸水中での細菌の非存在は、感染の予防を示す。肺損傷パラメーターの減少は、感染の緩和を示す。

【0020】

感染は、痰、血液または胸水中の細菌容量の減少、浸潤物のサイズの減少、酸素付加改善、機械的換気時間の長さの減少、熱降下、および白血球数の減少を含む、いくつかの他の臨床指標により定量的に評価できる。

【0021】

ここで「P c r V抗原」とは、感染を予防または緩和する免疫応答を引き出すのに必要なP c r Vタンパク質の一部または断片を意味する。我々は、全長P c r Vタンパク質を、保護を誘導するための抗原として使用している。さらに、我々は、保護的なエピトープを、P c r Vのアミノ酸144~257を含む断片に特定している。このエピトープを特定するために、感染および細胞毒性から守るモノクローナル抗体を、段々と小さくした形態の組換えP c r Vに対する結合性について試験した。(ここで「組換えP c r V」または「r P c r V」とは、非天然ホストに配置しておいたP c r V遺伝子から産生されたタンパク質を意味する。)この保護により、その領域が突き止められた。

【0022】

10

20

30

40

50

P c r V 抗原は、我々が使用した方法、すなわちノバゲン ( N o v a g e n ) から市販で入手可能な細菌性発現プラスミド p e t 1 6 b により、最も容易に得られ得る。p c r V 遺伝子は、初めて、オペロンの一部として、P . アエルギノーザ 染色体からクローン化された。コード領域を増幅し、2つの異なるベクターに挿入した。1つのベクターは、図1で示すように、P . アエルギノーザ からの発現用である。これは、P c r V 発現が、細菌の残りの輸送および中毒装置と協調的に調節されるように、適切なプロモーター配列を含むように我々が修飾した、ハーバート・シュバイツァーからのベクター ( 参考文献 1 9 ) である。第二のプラスミドである p E T 1 6 b は、大腸菌からの発現および精製目的用である。

#### 【 0 0 2 3 】

この系の利点は、P . アエルギノーザ タンパク質の汚染を心配する必要がなく、タンパク質は非常に大量に産生され、そして1段階精製プロセスであるということである。この状況において、P c r V コード領域を増幅し、p E T 1 6 b ベクター上に提供されたヒスチジン標識を有するフレーム内でクローン化する。P c r V のアミノ末端に融合した複数のヒスチジン残基により、ニッケル - N T A カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーが可能となる。それ故、好ましい P c r V 抗原は、組換えバージョンの天然 P c r V タンパク質である。

#### 【 0 0 2 4 】

免疫化は、全身的にまたは鼻腔内に実施し得る。これらの個体の免疫化は、好ましくは、他の小児期疾患の普通のワクチン接種法中に開始する。我々は、おそらく5および10歳頃でのブースター用量により保護の永続を予測する。

#### 【 0 0 2 5 】

別の実施態様において、P . アエルギノーザ 感染を診断的に検出するために、P c r V タンパク質をコード化するDNA、またはこのDNAの相補体を使用する。GenBank AF010149でP c r V 抗原のDNA配列が得られる。P c r V のコード領域は、ヌクレオチド626 - 1510である。また、このコード領域の断片またはこの断片の相補体の使用を選択してもよい。成功するプローブは、P c r V DNA に特異的にハイブリッド化し、他の領域にはハイブリッド化しないものである。

#### 【 0 0 2 6 】

好ましくは、抗原配列内で少なくとも40個連続したヌクレオチドのハイブリッド形成プローブ、または配列内で少なくとも25個連続したヌクレオチドの2つのプライマーを使用する。当業者は、多くの標準的な型の核酸診断技術が適切であることを理解し、例えば、患者の痰から抽出されたDNAまたはRNAに対する一本鎖40ヌクレオチドプローブのハイブリッド形成がある。別の例では、患者の痰を、細菌性DNAまたはRNA源として使用し、それぞれ、PCRまたはRT - PCR反応の鋳型として使用する。

#### 【 0 0 2 7 】

また、個体から得られたサンプルを、P c r V に特異的な抗体と接触させ、対照サンプルと比較して増強した抗体結合を、個体のシュードモナス・アエルギノーザ 感染と関連させることにより、個体におけるシュードモナス・アエルギノーザ 感染を決定する。

#### 【 0 0 2 8 】

追加の実施態様において、P c r V をコード化するDNAを、標準的な分子生物学的方法を使用して、遺伝子ワクチンとして使用する。例えば、当業者には公知の技術について、以下の参考文献を概観し得る。デイビス・エイチ・エル ( D a v i s , H . L . ) 等、「B型肝炎のDNAワクチン：チンパンジーにおける免疫原性の証拠および他のワクチンとの比較」、Proc . Natl . Acad . Sci . 93 : 7213 - 7218、1996；バリー・エム・エー ( B a r r y , M . A . ) 等、「発現 - ライブラリー免疫化を使用したマイコプラズマ感染からの保護」、Nature 377 : 632 - 635、1995；キシアング・ゼット・キュー ( X i a n g , Z . Q . ) 等、「狂犬病ウイルスの核酸ワクチンに対する免疫応答」、Virology 209 : 569 - 579、1995。ここで「有効量」の遺伝子ワクチンとは、シュードモナス 感染またはシュードモナス

10

20

30

40

50

感染症状を緩和または排除するに有効な量のワクチンを意味する。

【0029】

タンパク質または抗原は、患者の抗体を検出するために診断的に使用することもでき、したがって、患者の感染状態を予測できる。好ましくは、シュードモナス感染が疑われる個体から得られたサンプルを、PcrVタンパク質またはその断片と接触させ、タンパク質/抗体結合を検出する。その後、(対照サンプルと比較して)増強した抗体結合を、個体のシュードモナス・アエルギノーザ感染と関連させる。

【0030】

別の実施態様において、本発明は、PcrVを阻止することができ、そしてまた長期間にわたって動物において単鎖抗体の産生を生じさせる真核生物ベクターが送達される遺伝子送達実験において配列を利用することできる組換え単鎖抗体を製造するための抗体配列(これは下記および配列番号1~4に報告される)の使用である。この配列はまた、ネズミのモノクローナル抗体をヒト化して、ヒト患者の治療において利用され得る製造物を製造するために利用することができる。

10

【0031】

抗体がヒト使用に安全となれば、(a)それを全身投与でき、また(b)予防処置または治療法として肺に投与できる。ヒトでPcrV抗体を使用するために、抗体は好ましくは「ヒト化」する。一般に、モノクローナル抗体が得られれば、重鎖および軽鎖可変領域をクローン化する。これらのクローン化した断片は、その後、ヒト抗体骨格(定常領域)に挿入する。このようにして、我々は、結合特異性を提供することに加えて、抗体

20

【0032】

本発明での使用において、PcrV抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナルでもよい。抗体は、特に治療適用のために、ヒトまたはヒト化され得る。抗体断片または誘導体、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>またはFvも使用してよい。例えば、フストン(Huston)等(Int. Rev. Immunol. 10: 195-217, 1993)に記載のような単鎖抗体は、本明細書に記載の方法にも用途を見出し得る。ここで「有効量」のPcrV抗体または抗体断片とは、シュードモナス感染または感染症状を緩和または排除するに十分な量を意味する。

【0033】

好ましくは、PcrVに対するヒトまたはヒト化モノクローナルまたはポリクローナル抗体を投与し、P.アエルギノーザによる感染を予防または治療する。P.アエルギノーザ感染にさらされる危険性の高い患者において、抗体を、感染の予防のために投与できる。さらに、抗体は、感染を治療するために、感染の開始後に、投与してもよい。この場合、抗体は、単独で、または抗生物質と組合せて投与できる。抗生物質と共に抗体を投与することにより、より短いクールまたは低用量の抗生物質の投与が可能となり得、よって、抗生物質耐性生物の出現の危険性が減少する。

30

【0034】

我々は、仮定上の少なくとも3つの型の患者を想定する。(1)重度の損傷または熱傷にさらされる危険性のある健康な個体(消防士、軍人、警官)を、永続する保護を与える方法(注射または鼻腔内のいずれか)によりワクチンで免疫化する。ブースターは、損傷後に病院の許可を得て投与する(筋肉内注射)。(2)機械的換気を受けている患者。(3)嚢胞性繊維症と遺伝子診断された患者。

40

【0035】

PcrV抗体および抗体断片に加えて、小分子ペプチド擬似体または非ペプチド擬似体を、おそらくPcrVの作用を妨害することによる、シュードモナス感染の抑制または調節におけるPcrV抗体の作用を擬似するように設計できる。かかる小分子擬似体を設計する方法は公知である(例えば、リプカ(Ripka)およびリッチ(Rich)、Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 441-452, 1998;フアング(Huang)等、Biopolymers 42: 367-382, 1997;アル-オベイ

50

ジ(al-Obeidi)等、Mol. Biotechnol. 9:205-223、1998参照)。PcrV抗体に基づき設計した小分子抑制剤を、PcrV-PcrV抗体結合相互作用を妨害する能力についてスクリーニングした。かかるアッセイで活性を示す候補小分子を、例えば、インビトロスクリーニングアッセイを含む、当分野で公知の方法により最適化し得、本明細書に記載の方法のいずれかにより、または当分野で公知のように、シュードモナス感染の抑制または調節についてインビボアッセイでさらに精製し得る。かかる小分子のPcrV作用抑制剤は、シュードモナス感染の抑制または調節において本法に有用である。

#### 【0036】

本発明の別の態様において、PcrVタンパク質は、ホスト細胞、特にヒト細胞、より特定すると、ヒト上皮細胞またはマクロファージに存在し得るPcrVレセプターを同定するために使用し得る。PcrVレセプターの同定により、組合せライブラリーなどの小分子ライブラリーを、PcrV結合を妨害する候補についてスクリーニングすることが可能となる。かかる分子は、シュードモナス感染を抑制または調節する方法にも有用である。

10

#### 【0037】

レセプター同定における我々の最初の試みは、ブルダウン実験でPcrVを使用することである。PcrVを、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)に融合させ、可溶性細胞抽出物のアフィニティークロマトグラフィーのカラムマトリックスに付着させる。PcrVに特異的に結合しているタンパク質を溶出し、同定のためにアミノ末端シークエンスにかけた。平行実験で、PcrVを、酵母二重ハイブリッド分析にかける。この場合、PcrVは、Gal4のDNA結合ドメインを有するフレーム内に融合させる。クローンが得られれば、適切な酵母宿主株に形質転換する。Gal4PcrV作成物を含む酵母株を、Gal4活性化ドメインを有するフレーム内にクローン化したHeLa細胞cDNAバンクを用いて形質転換する。ヒスチジンを利用し、ガラクトシダーゼ(PcrVと相互作用するタンパク質)を産生する能力を補完した二重形質転換体を、遺伝学的小およびヌクレオチド配列レベルで分析する。レセプターが細胞糖脂質である場合、我々は、糖脂質を、薄層クロマトグラフィーにより分離し、その後、放射標識細菌でプローブする、オーバーレイ技術を利用する。特異的成分への結合は、オートラジオグラフィーにより監視する。同じように、上皮およびマクロファージタンパク質を、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースにプロットし、放射標識細菌または標識PcrVをのせる。ここでも、細菌が結合したタンパク質成分を、その後、オートラジオグラフィーにより同定する。

20

30

#### 【0038】

シュードモナス種は、動物界およびさらには植物界内の広範囲の宿主を感染することが知られている。当業者には明らかなように、本明細書で開示した組成物および方法は、シュードモナス種による感染から生じた疾患または状態の抑制または調節において、広範囲の生物に使用し得る。本発明の組成物および方法は、特にシュードモナス・アエルギノーザへの適用について記載するが、本明細書に教示した方法を他の種に適用することは当業者の能力の十分範囲内である。

40

#### 【実施例】

#### 【0039】

##### 1. 細胞毒性におけるPcrVの役割

III型媒介調節/分泌におけるPcrVの役割を決定するために、我々は、PcrVの非極性対立遺伝子を作成し、この作成物を使用して、P.アエルギノーザ PA103株(インビトロで細胞毒性が高く(3)、インビボで肺上皮傷害を引き起こす(12、13)株である)の野生型対立遺伝子を置換した。細胞毒性および肺損傷は、特異的な細胞毒ExoUの産生に起因する(3)。

#### 【0040】

PA103 p cr Vは、ExoU細胞毒(3)、PcrV(5)、および毒素の転位

50

に必要なタンパク質 P o p D ( 1 4 ) を含む、P . アエルギノーザ III 型系により分泌されるいくつかの細胞外産物の発現により特徴づけられた。濃縮培養上清の SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、親株 P A 1 0 3 は、カルシウムキレート剤であるニトリロトリ酢酸 ( N T A ) を含む培地中での増殖により、III 型タンパク質の産生および分泌が誘導されることが示された ( 図 1 )。P c r V をコード化する発現クローンが、親株において トランス で提供される場合、N T A の存在または非存在に応答する細胞外タンパク質産生は正常である。P A 1 0 3 p c r V は、カルシウム盲目表現型を示し、細胞外タンパク質産生は、N T A の存在および非存在の両方で強く誘導される。これらの結果は、分泌系は、完全に機能しているが、調節は解除されていることを示唆する。この調節の解除された表現型は、細胞外 Y o p s を産生できず、カルシウムの存在または非存在にかかわらず 3 7 で増殖し、ほんの一部しか Y o p s の誘導を示さない、L c r V 欠損株で報告されたカルシウム非依存性表現型と対照的である ( 7 )。P A 1 0 3 p c r V を、野生型 P c r V を発現するクローンで補完することにより、N T A 誘導に応答した、正常な細胞外タンパク質産生調節が回復した。

#### 【 0 0 4 1 】

P . アエルギノーザ 病理発生に対する P c r V の寄与を試験するために、2 つの感染モデルを使用した。インビトロ モデルにおいて、親および数個の変異誘导体株を、C H O 細胞感染アッセイで、細胞毒性を引き起こす能力について比較した ( 3 )。この実験の陰性対照は、III 型病原性決定要因の転位が欠損していることが以前に示された P A 1 0 3 p o p D : : ( 1 4 )、および E x o U が産生されないために、細胞毒性のない P A 1 0 3 e x o U を含んだ ( 3、1 5 )。

#### 【 0 0 4 2 】

3 時間感染後、C H O 細胞は、野生型および P c r V を発現するプラスミド作成物で補完した p c r V 株で、トリパンブルーを除外できなかった。C H O 細胞を、陰性対照株または P A 1 0 3 p c r V で感染させた場合、染色は起こらなかった ( データは示していない )。これらの結果により、P c r V 発現は細胞毒性に必要であることが示唆される。精製組換え P c r V は、外因的に組織培養細胞に加えた場合、細胞毒性ではなかった。転位に必要な III 型タンパク質の分泌は、p c r V の欠失により影響を受けなかった ( 図 1 A および B )、P A 1 0 3 p c r V には、E x o U 転位が欠損しているようである。

#### 【 0 0 4 3 】

図 1 A および 1 B は、P A 1 0 3 p c r V の表現型分析を示す、染色ゲル ( 図 1 A ) およびウエスタンブロット ( 図 1 B ) である。トランス の P c r V を発現するプラスミドを含む、または含まない、親および p c r V 誘导体を、P . アエルギノーザ の III 型分泌の誘導物質、ニトリロトリ酢酸 ( N T A ) の非存在下または存在下で増殖させた。細胞外タンパク質プロファイル ( 図 1 A ) を、クーマシーブルーで染色した SDS - ポリアクリルアミドゲル ( 1 0 % ) 上で分析した。P . アエルギノーザ コード化 III 型タンパク質の移動は左に示し、分子量マーカーの移動は右に示す。図 1 B は、結合した I g G を検出するために、E x o U、P c r V、および P o p D に特異的な抗体および <sup>125</sup>I - プロテイン A を使用した重複ゲルのウエスタンブロットである。

#### 【 0 0 4 4 】

野生型および変異 P . アエルギノーザ 株は、低および高攻撃用量の細菌を使用して、急性肺感染モデルで試験した。生存測定により、P c r V および P o p D が、致命的感染の誘導に必要であることが示された ( 図 2 A )。3 つの独立した肺損傷測定を利用した実験において ( 肺の気腔から血流への標識アルブミンの流入、肺の気腔から胸水への標識アルブミンの流入、および肺浮腫を測定する湿潤 / 乾燥比 )、P A 1 0 3 p c r V、ベクター対照株 ( P A 1 0 3 p c r V p U C P 1 8 )、および P A 1 0 3 p o p D : : により引き起こされる損傷度は、非感染対照動物と全く異ならなかった ( 図 2 B )。P A 1 0 3 p c r V を トランス の p c r V で補完することにより、肺損傷レベルは、親株 P A 1 0 3 で測定されたものに戻った。合わせると、これらのデータにより、P c r V 発現は、

急性肺感染モデルにおける P. アエルギノーザ の病原性に必要であり、PcrV の機能の一部は、III型エフェクタータンパク質を真核細胞に転位する能力に関連があるようである。

#### 【0045】

図2Aおよび2Bは、P. アエルギノーザ 親および変異株の生存および肺損傷を示す、グラフ(図2A)および棒グラフのセット(図2B)である。図2Aに関して、マウスを、 $5 \times 10^5$  cfuの示された各株で攻撃し、生存を1週間監視した。図2Bに関して、肺損傷を、肺の気腔から血液への(肺上皮損傷)、胸水への(胸水)標識アルブミンの流入により、または湿潤/乾燥比(肺浮腫)の測定により評価した。2つの細菌感染用量を使用し、黒棒および縞棒により表した。対照ないし試験群での有意差(\* $p < 0.001$ )を、一方向性分散分析およびダネット(Dunnett)複数比較試験により決定した。以下の略称を使用した。PA103、親野生型株；pcrV、PA103 pcrV；pcrV pUCP pcrV、PcrVを発現するプラスミドで補完したPA103 pcrV；pcrV pUCP、ベクター対照を有するPA103 pcrV；popD：、転位欠損株であるPA103 popD：。

#### 2. PcrVを用いた免疫化

#### 【0046】

PcrVを用いた免疫化により致命的な肺感染から動物が守られるかを決定するために、組換えPcrV(rPcrV)またはExoU(rExoU)を、ヒスチジン標識融合タンパク質として精製し、抗原として使用した。マウスを免疫化し、その後、気腔を介して、致死量のPA103株で攻撃した。生存を測定すると、両方のワクチンがマウスを保護した(図3A)。肺損傷を評価すると、PcrVワクチン接種を受けた動物のみにおいて、上皮傷害および肺浮腫が有意に低かった(図3B)。PcrVワクチンで免疫化した動物は、その肺における細菌が有意に低く、このことは、シュードモナスV抗原の遮断により、肺からの細菌の迅速な除去が促進され、重度の上皮損傷から動物が守られることを示唆する(図3B)。

#### 【0047】

図3Aおよび3Bは、生存、肺損傷、および細菌コロニー化に対する免疫化の効果を示す、グラフ(図3A)および棒グラフのセット(図3B)である。図3Aに関して、マウスを、示されたように免疫化し(PcrV、 $n = 10$ ；ExoU、 $n = 5$ ；対照、 $n = 10$ )、 $5 \times 10^5$  CFU/動物のPA103株で攻撃した。生存動物の比率を、1週間決定した。Mantel-Cox log rank検定により $p < 0.05$ 。図3Bに関して、PA103の設置4時間後の、ワクチン接種動物の肺損傷評価および細菌コロニー形成。肺上皮損傷、肺浮腫、および細菌負荷；PcrV、 $n = 9$ ；ExoU、 $n = 4$ ；および対照、 $n = 8$ 。肺の細菌の最終数は、Y軸 $\times 10^4$  CFUの数として示される。ダネット複数比較試験により決定、肺損傷( $p < 0.01$ )、肺浮腫( $p < 0.05$ )、および細菌数( $p < 0.05$ )の有意差(\*)。肺損傷における一方向性分散分析、 $p = 0.0005$ ；肺浮腫、 $p = 0.0437$ ；細菌負荷、 $p = 0.0075$ 。

#### 【0048】

治療介入が可能であるかを決定するために、 $5 \times 10^5$  CFU/マウスの濃度のPA103を気腔滴下する1時間前に、マウスを、免疫前のウサギIgG、またはrPcrV、rExoU、またはrPopDに特異的なウサギIgGを用いて受動免疫化した。rPcrVに対する抗体により、致命的感染に対する完全な保護が提供された(図4)。抗rExoU IgGにより部分的生存が提供され、これは、対照IgGの投与とは有意に異なっていたが、全ての生存動物が試験中に重病であるようであった。生存は、別のIII型転位タンパク質PopDに対する抗体の受動移動により向上しなかった。これらの結果から、我々は、PcrVに対する抗体は、急性肺感染モデルで高度に保護的であり、PcrVは、細菌表面上にさらされ得るか、または抗体-抗原相互作用に利用可能な可溶性であり得ると結論する。

#### 【0049】

10

20

30

40

50

図4は、 $5 \times 10^5$  CFU/マウスのPA103株で攻撃して生存した動物数のグラフである。動物を、免疫IgG100 $\mu$ gまたは非免疫化ウサギ由来の対照IgG(rPcrV、免疫前の血清)で前処置した。各群について $N = 10$ ; Mantel-Cox log rank検定により、抗PcrVおよび抗ExoU IgG調製物での処理において、\* $p < 0.05$ 対対照群。

#### 【0050】

PcrVが、中和を受け易い場合、抗rPcrV IgGと細菌種菌の併用投与により、肺損傷および致死から完全に守られる。IgG調製物を、細菌を肺に滴下注入する前に、種菌(致死種菌よりも10倍高い用量)と混合し、生存を測定した。唯一、抗rPcrV IgGのみが、この極度な感染から保護した(図5A)。肺損傷は、正常致死量である $5 \times 10^5$ 細菌で感染させた動物で測定した。肺の気腔からの標識アルブミンの流出は、抗rPcrV IgGの同時投与後、非感染対照よりも僅か3%高かった(図5B)。肺から胸水への標識タンパク質の流出減少は、抗PcrVを種菌と共に含めた場合、非感染対照と同じであった。珍しいことに、湿潤/乾燥比により測定した肺浮腫は、抗rPcrVまたは抗rPopDの添加により有意に減少した(図5B)。従って、細菌と抗rPcrV IgGの併用投与は、ワクチン接種よりも、全ての肺損傷パラメーターを規格化する上で、さらにより効果的であった。これらのデータは、PcrVが抗体媒介中和を受け易いことを支持し、肺損傷の臨床関連減少を文書で裏付け; PcrVに対する抗体は、シュドモナス・アエルギノーザにより引き起こされる重度の院内肺炎の治療における治療薬として使用し得る。

#### 【0051】

図5は、IgGおよび細菌攻撃の併用投与による肺損傷からの生存および保護を示す、グラフ(図5A)および棒グラフのセット(図5B)である。IgG(5 $\mu$ g)を、 $5 \times 10^6$ (生存アッセイ用、1群あたり $n = 10$ )または $5 \times 10^5$ (肺損傷測定用、1群あたり $n = 4 \sim 6$ 動物)のP.アエルギノーザPA103株と混合した。この混合物を、肺に滴下注入し、生存(図5A)または肺損傷(図5B)を評価した。生存では、Mantel-Cox log rank検定による抗PcrVにおいて\* $p < 0.05$ 対対照IgG; 肺上皮損傷および肺浮腫では、ダネット複数比較試験により、\* $p < 0.05$ 対対照IgG。肺損傷における一方向性分散分析、 $p = 0.026$ 、および肺浮腫、 $p < 0.0005$ 。

#### 【0052】

急性P.アエルギノーザ感染では、III型媒介中毒の実効効果は、上皮を超えて細菌の播種を促進し、胸水、脾臓、肝臓、および血流の感染をもたらすことである。急性換気装置関連肺炎からの、または熱傷感染からの、P.アエルギノーザによる血液由来感染の結果、活発な抗生物質処置にもかかわらず、死亡率は40-80%であり得る(16)。PcrVは、P.アエルギノーザのIII型転位複合体の成分であるに違いない。なぜなら、このタンパク質の産生が欠損している変異体は、転位に必要なIII型エフェクターおよびタンパク質を産生および分泌できるにもかかわらず、CHO細胞を中毒させることができないか、または肺上皮損傷を引き起こすことができないからである。PopD(これもまた転位に必要である)と異なり、PcrVは、抗体媒介中和を受け易く、これは、抗体は急性感染の有用な治療剤であり得ることを示唆する。

#### 【0053】

### 3. 実施例1および2の方法

PcrVの非極性挿入物の作成および補完。pcrGVHpopBDおよびフランキング配列をコード化する5.0kbのEcoRI-NsiI制限断片を、対立遺伝子置換ベクターpNOT19にクローン化した(17)。2つのNotI部位(1つはpcrG内で、1つはpopB内)を、スカルプター(Sculptor)変異誘発系(アマシャム)を使用して、挿入配列から除去した。内部SstI制限断片を、pcrVから欠失させ、残基17-221をインフレーム欠失させた(pNOT\_pcrV)。プラスミドの組込みを選択するために、テトラサイクリン耐性(Tc)をコード化する遺伝子を、ベク

10

20

30

40

50

ターのHindIII部位にクローン化した(pNOT p cr V)。MOBカセット(17)を、NotI断片として加えた。部分二倍体の選択、プラスミド配列の分解能、および対立遺伝子置換の確認を、前記した通り行なった(18)。シャトルプラスミド(pUCP、19)を使用して、p cr V欠失を補完したクローンを作成した。P cr Vのコード配列を増幅し、ExoSプロモーター領域の制御下でクローン化した(20)。ExoSの転写は、P. アエルギノーザにおけるIII型分泌および転位を調節するオペロンと協調的に調節されている(2)。ヌクレオチド配列は、部位特異的変異、PCR増幅、またはインフレーム欠失を含む、各DNA作成物について確認した。

#### 【0054】

分泌産物のSDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析。P. アエルギノーザを、誘導(+NTA)または非誘導条件下(-NTA)で、III型分泌産物を発現させるために増殖した(18)。培養物を、540nmでの光学密度測定に基づき収集し、上清画分を、硫酸アンモニウムの飽和溶液を最終濃度が55%となるように添加して濃縮した。SDS-ポリアクリルアミドゲル(11%)の各レーンに、3μlの20倍濃縮した上清をのせ、クーマシーブルーで染色した。同一のゲルを、ExoU、PopD、およびP cr Vを特異的に認識する、ウサギ抗血清のカクテルを使用して、前記の通り(3-5)ウエスタンブロット分析にかけた。<sup>125</sup>Iで標識したプロテインAを、第二試薬として使用して、結合したIgGを同定した。

#### 【0055】

感染モデルおよび肺損傷評価。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を、細胞毒性およびIII型転位を測定するために設計した、インビトロ感染モデルに使用した(21)。簡潔には、細菌種菌を、血清を含まない組織培養培地で調製した。血清含有培地中で繁殖させたCHO細胞を洗浄し、5:1の感染多重度で、様々なP. アエルギノーザ株で感染させた。培養物を、組織培養条件下(37、5%CO<sub>2</sub>)で3時間インキュベートし、洗浄し、トリパンブルーで染色した。色素への透過性は、位相差写真から決定した。ExoUを発現する親株PA103での感染により、インキュベートの3時間後、単層の約80%がトリパンブルー染色され、インキュベートの4-5時間後、単層は完全に破壊される。マウス感染および肺損傷の評価は、前記した通りに行なった(16)。簡潔には、雄で8-12週令の病原体のないBALB/cマウスを、シモンセン(Simonson)研究所(ギルロイ、カリフォルニア)から購入し、柵のある状態に飼った。マウスを、簡潔には、吸入メトファン(メトキシフルラン、ピットマン-ムーア(Pitman-Moore)、マンデライン(Mundelein)、イリノイ)で麻酔し、約30°の角度で、仰臥位に配置した。15μlの細菌性種菌を、中咽頭を介して気管に挿入した修飾24ゲージ動物栄養補給針(ポッパー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド(Popper & Sons, Inc.)、ニューハイドパーク、ニューヨーク)を使用して、左葉にゆっくりと滴下注入した。肺損傷評価を測定する場合、5%マウスアルブミンと共に、リンガーラクトレート1ml中、0.5μCiの<sup>131</sup>I標識ヒト血清アルブミン(メルク-フロスト(Frost)、ケベック、カナダ)、0.05μgの無水エバンスブルーを滴下注入液に加えた。感染の4時間後、マウスを麻酔し、血液を頸動脈穿刺により集め、正中胸骨切開を行なった。肺、胸水、気管、中咽頭、胃、および肝臓を収集し、放射活性を測定した。滴下注入した肺に残り、循環または胸水に侵入した、放射活性アルブミンの比率を、血液量(体重×0.07)に、終末血液サンプルで測定された計数(1mlあたり)を掛けることにより計算した。肺の湿潤/乾燥比は、1mlの水を肺に加え、混合物をホモジナイズすることにより決定した。ホモジネートは、前以て秤量したアルミニウム皿に置き、80のオープンで3日間一定重量になるまで乾燥させた。肺ホモジネートは、連続希釈し、細菌を定量評価するためにヒツジ血液寒天上に置いた。

#### 【0056】

P cr V、PopD、およびExoUに対するウサギ抗血清の産生。r P cr V、r PopD、およびr ExoUは、pET16bにおいてヒスチジン標識融合タンパク質として産生し、前記した通りニッケルクロマトグラフィーにより精製した(22)。ウサギに

10

20

30

40

50

、フロイント完全アジュバント中で乳化した300 µgの組換えタンパク質を皮内注射(10部位)し、フロイント不完全アジュバント中の抗原をブースター投与し、7日間間隔で周期的に採血した。受動免疫化するために、IgG画分を、プロテインAカラムクロマトグラフィー(ピアスケミカルズ、ロックフォード、イリノイ)を使用して単離した。マウスに、 $5 \times 10^5$  CFUのPA103株で攻撃する1時間前に、100 µgのIgG(腹腔内注射)を注射した。rPcrVおよびrExoUを用いて能動免疫化するために、エンドトキシンを、1%トリトンX-114での抽出により、タンパク質調製物から除去した(23)。抽出後、トリトンX-114を、セファクリルS-200クロマトグラフィーにより除去した。全ワクチン調製物が、リムルスアメーバ様細胞ライセートアッセイ(バイオウィッターカー(BioWhittaker)、ウォーカーズヴィレ(Walkersville)、メリーランド)の使用により決定されたように、40 µgの組換えタンパク質あたり、1 ng以下のエンドトキシンを含んだ。BALB/cマウスに、フロイント完全アジュバント中、10 µgの組換えタンパク質を皮下注射した。30日目に、マウスを、フロイントの不完全アジュバント中、追加の10 µgの抗原をブースター投与した。51日目に、マウスを、その左肺へのP.アエルギノーザの滴下注入により攻撃した。

10

【0057】

#### 4. モノクローナル抗体の合成

マウスを、フロイントの完全アジュバント中、10 µgの精製、LPS非含有、組換えPcrVを用いて免疫化し、2週間後に、フロイントの不完全アジュバント中で乳化した、同量の抗原を用いてブースター投与した。免疫化は皮下で行なった。フロイントの不完全アジュバント中のPcrVのブースター用量の1週間後に、脾臓をマウスから収集した。

20

【0058】

単一の脾臓を、血清を含有しない組織培養培地5 mlに置き、片に切断し、穏やかにホモジナイズした。組織の大片を、ホモジネートおよび上清から沈降させ、単一細胞懸濁液を取り出し、1200 rpmで10分間遠心分離にかけた。ペレット化した細胞を、10 ml溶液に再懸濁し、赤血球を5分間溶解し、引き続き、10 mlのウシ胎児血清を敷いた。物質を、1200 rpmで8分間遠心分離し、上清を廃棄し、細胞を30 mlの培地に懸濁した。脾臓細胞およびミエローマ細胞(P3x63Ag8.653)を、1200 rpmで10分間の遠心分離により収集し、各ペレットを、別々に、10 mlの組織培養培地に懸濁した。 $10^8$ 脾臓細胞および $2 \times 10^7$ ミエローマ細胞を混合し、1200 rpmで6分間の遠心分離により一緒にペレット化させた。上清を吸引により取り出し、1 mlの35%ポリエチレングリコール(PEG)を加えた。細胞をこの溶液に穏やかに懸濁し、1000 rpmで3分間遠心分離した。いくつかの実験では、遠心分離は省いた。

30

【0059】

PEG添加から正確に8分後、25 mlの培地を加え、細胞を穏やかに再懸濁した。5分間の1200 rpmでの遠心分離段階の後、細胞ペレットを、30%ならし培地および70%完全培地(血清含有)中1 mlあたり $1 \times 10^6$ の密度で懸濁した。細胞を37で一晩インキュベートした。次の日、細胞を遠心分離により収集し、200 mlの30%ならし培地およびヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT)を含む70%完全培地中に懸濁した。

40

【0060】

1ウェルあたり、約0.2 mlのこの細胞懸濁液を、10個の96ウェルプレート(96ウェルプレートあたり1.2 ml)に加えた。残りの細胞の密度は、1 mlあたり $2.5 \times 10^5$ に調整し、細胞を96ウェル型式で培養した。プレートを、単一のコロニーについて顕微鏡でスクリーニングし、その後、上清を、抗原として組換えPcrVを使用して、酵素結合免疫吸着検定法により抗体産生について試験した。PcrVに反応性の抗体を産生するクローンを、より大きな培養皿に継代培養し、その後、アイソタイプを決定した。

50

## 【 0 0 6 1 】

抗体の結合は、ウェルを覆膜する抗原（ヒスチジン標識タンパク質）として組換え P c r V を使用して、酵素結合免疫吸着検定法で試験した。モノクローナル抗体は、ヒスチジン標識を有さない天然 P c r V を含む P . アエルギノーザ 上清を使用して、ウエスタンブロット反応でも試験した。

## 【 0 0 6 2 】

5 . P c r V 抗原の同定

我々は、標識された P c r V と結合する抗体を産生する約 3 0 0 個の細胞株を得た。これらの最初の細胞株は保管のために液体窒素で保存された。すべての細胞株は、安定なクローンを単離するために継代培養された。安定なクローンを単離することと同時に、我々は、インビトロアッセイを、動物感染モデルにおける中毒からの保護に対する相関関係を示すものとして開発した。

## 【 0 0 6 3 】

安定に継代培養され、そして E L I S A において P c r V に対して反応性の抗体を依然として産生するハイブリドーマ（約 8 0 個の細胞株）を、続いて、下記の技術および仮定を使用して蛍光活性化細胞分取器で試験した。抗体がタイプ III 中毒システムを阻止する場合、阻止するモノクローナル抗体が存在するもとは、より少数の細胞が我々のトキシンによって殺されると推論した。細胞を 8 0 個のモノクローナル抗体のそれぞれにさらし、毒性の細菌を加え、インキュベーションして、死細胞の D N A に対してのみ透過性である色素（ヨウ化プロピジウム）を加えた。過剰な色素を洗い流し、細胞を集め、固定して、F A C S によって分析した。死細胞は、色素が漏入し、色素により核内の D N A が染色されるので蛍光を発する。

## 【 0 0 6 4 】

細胞がウサギポリクローナル抗 P c r V、マウスポリクローナル抗 P c r V または m a b 1 6 6 および細菌とインキュベーションされた場合、関連しないポリクローナル抗体（抗 P o p D）またはそれ以外の 7 8 個のモノクローナル抗体とインキュベーションされたコントロールの場合よりも少数の細胞が死亡したことを我々は見出した。

## 【 0 0 6 5 】

m a b 1 6 6 は、細菌によってコードされるタイプ III 分泌因子（これは P c r V と名付けられた）に結合することが特異的に見出された。P c r V は、細胞死を引き起こす細菌トキシンの輸送を促進する、P . アエルギノーザ と肺細胞との相互作用を媒介する。この反応は、P . アエルギノーザ に対する固有的な免疫応答に關与する肺細胞の除去をもたらすと考えられる。これらの細胞の死は、宿主の上皮細胞を P . アエルギノーザ のコロニー形成ならびに胸膜液および血流への広がりに対して無防備の状態にする。細菌が血流中に進入すると、P . アエルギノーザ によってコードされる抗生物質抵抗性により、効果的な処置は有効でなくなる。

## 【 0 0 6 6 】

P . アエルギノーザ による急性肺感染の動物モデルにおける細菌の滴下注入前および滴下注入後に m a b 1 6 6 によってもたらされる保護は顕著である。ヒトの P . アエルギノーザ 感染症における介入のための抗体処置様式を設計するためには、ヒトのモノクローナル抗体を製造するか、または m a b 1 6 6 によって規定される P c r V の保護的なエピートープで危険性の患者を免疫化するかのいずれかが必要である。下記に記載される研究の目的は、m a b 1 6 6 が結合する P c r V のアミノ酸配列を明らかにすることである。

## 【 0 0 6 7 】

## 結果

我々は、m a b 1 6 6 が結合するアミノ酸残基を明らかにするために分子遺伝学的方法を使用した。P c r V は 2 9 4 個のアミノ酸を有する。この方法は、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して分子の一部をヌクレオチド配列レベルで欠失することからなつた。各生成物を、グルタチオン S トランスフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と読み枠を合わせてタンパク質発現ベクターにクローン化した。この方法では、少数の P c r V アミノ酸を

10

20

30

40

50

コードする欠失体が、ウエスタンブロット技術またはドットブロット技術を使用して確実に検出され得る。グルタチオンSトランスフェラーゼのみをコードするコントロールの細菌溶解物は、我々の抗PcrVポリクローナル抗体またはmab166モノクローナル抗体のいずれに対しても反応性を示さなかった。

## 【0068】

(1つの全長PcrV発現プラスミドとともに)合計で66個のクローンを構築し、発現させ、そしてウサギポリクローナル抗PcrV抗血清に対する反応性について調べた。1個のクローンを除くすべてが抗PcrVウサギ抗体に結合した。このことにより、発現したタンパク質はPcrVと読み枠が一致していることが確認された。1個の非反応性クローンは分析から除かれた。C端欠失体(n=5個の構築物)はどれもmab166と結合しなかった。このことは、エピトープがタンパク質のC末端側の半分に存在することを示唆している。PcrVのアミノ酸(aa)139~294をコードするN端短縮タンパク質(n=8個の構築物)のうち1個だけがmab166に結合した。この実験により、mab166のエピトープはタンパク質のカルボキシル端側の半分によってコードされているという我々の仮説が確認された。残る51個の構築物は分子の様々な内部欠失体をコードしていた。下記の表1にまとめられた結合性分析により、mab166によって認識される最小エピトープがPcrVのaa144~257から構成されることが明らかにされた。

## 【0069】

## 【表1-1】

表1

PcrVエピトープマッピング		
すべてのタンパク質はアミノ末端標識GST-PcrV短縮体である。		
アミノ酸	pAbに対する結合性	mAb166に対する結合性
1-294 (全長)	有	有
(C端短縮体) 1-46 1-76 1-134 1-172 1-75 + 173-294	有 有 有 有 有	無 無 無 無 無
(N端短縮体) 139-294 148-294 159-294 164-294 194-294 261-294 269-294 278-294	有 有 有 有 有 有 有	有 無 無 無 無 無 無

## 【0070】

【表 1 - 2】

アミノ酸	pAbに対する結合性	mAb 166に対する結合性	
(内部断片)			
139-191	有	無	
139-195	有	無	
139-234	有	無	
139-243	有	無	
139-256	有	無	
139-257	有	有 ; 弱い	10
139-258	有	有	
139-259	有	有	
139-260	有	有	
139-261	有	有	
139-262	有	有	
139-263	有	有	
139-264	有	有	
139-265	有	有	
139-266	有	有	
139-274	有	有	
139-281	有	有	
140-266	有	有	20
141-266	有	有	
142-266	有	有	
143-266	有	有	
144-266	有	有	
145-266	有	無	
146-266	有	無	
147-266	有	無	
148-170	無*	無	
148-202	有	無	
159-202	有	無	
159-209	有	無	
159-216	有	無	
159-226	有	無	30
159-234	有	無	
164-234	有	無	
164-243	有	無	
164-256	有	無	
164-266	有	無	
164-275	有	無	
164-281	有	無	
194-234	有	無	
194-243	有	無	
194-256	有	無	
194-266	有	無	
194-275	有	無	40
194-281	有	無	

【 0 0 7 1 】

【表 1 - 3】

アミノ酸	pAbに対する結合性	mAb 166に対する結合性
141-258	有	有; 弱い
142-258	NT**	有
143-258	有	有
144-258	有	有
141-257	有	有
142-257	有	有
143-257	有	有
144-257	有; 弱い	有; 弱い
<b>備考</b> *短縮体148~170は、ウサギのポリクローナルコントロール抗体によって認識されない唯一の短縮体である。 **NT; 細菌溶解物の量が不十分であるために試験されず。 -予測されるように、pGEX-4T-2ベクターのコントロール溶解物はいずれの抗体によっても認識されなかった。 -mAb 166によって認識され得るPcrVの最小エピトープはアミノ酸144~257から構成されるようである。		

10

## 【0072】

## 6. PcrV特異的抗体の試験

## 方法

**ポリA + RNAの抽出。**ハイブリドーマ細胞株m166を、4.5 g/LのD-グルコース、10 mMのHEPES、50 μMの2-メルカプトエタノール、3 mMのL-グルタミンおよび10%の熱不活性化ウシ胎児血清、100 U/mLのペニシリンおよび100 μg/mLの硫酸ストレプトマイシンを含む完全ダルベッコ最少必須培地で培養した。細胞が75 cm<sup>2</sup>フラスコにおいてコンフルエンス状態に達した後、細胞を600 rpmで5分間の遠心分離によって集めた。細胞のペレットを2 mLのTRIzol試薬(Life Technologies, Gaithersburg, MD)においてホモジネートした。総RNA(100 μg)が、クロロホルム分画、イソプロパノール沈殿および70%エタノール洗浄の後で抽出された。ポリA + RNA(4 μg)を、オリゴテックスmRNAスピカラム(Qiagen, Valencia, CA)を用いて抽出した。

20

## 【0073】

**RNAオリゴのキャッピング。**mRNA(250 ng)を、非mRNAまたは短縮化mRNAを脱リン酸化するためにウシ腸ホスファターゼとともに50 で1時間インキュベーションした。反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、脱リン酸化RNAをタバコ酸性ピロホスファターゼとともに37 で1時間インキュベーションして、5' -キャップ構造を全長mRNAから除いた。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の後、合成RNAオリゴ(GeneRacer RNAオリゴ、Invitrogen, Carlsbad, CA)を、T4RNAリガーゼを用いて37 で1時間、脱キャップ化RNAに連結した。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の後、RNAを13 μLのジエチルピロカルボネート処理水に懸濁した。

30

## 【0074】

**mRNAの逆転写。**RNA - オリゴが連結された全長mRNA(13 μL)を、18ヌクレオチドのdTテールを含有する54塩基対プライマー(GeneRacerオリゴdT、Invitrogen)およびトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素を用いて、20 μLの反応において42 で1時間逆転写した。反応後、サンプルを滅菌水で4倍に希釈した。

40

## 【0075】

**ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるcDNA端の増幅。**1マイクロリットルのcDNAをPCRのために使用した。合成RNAオリゴ配列に由来する5'プライマー(GeneRacer 5'プライマー、Invitrogen)およびネズミ免疫グロブリン2b鎖CH1領域特異的プライマーまたはネズミ免疫グロブリン鎖CL領域特異的プライマーを使用した。PCR反応のために使用されたサイクル処理パラメーターは下記の通

50

りであった。1) 94 で2分、1サイクル、2) 94 で30秒および72 で1分、5サイクル、3) 94 で30秒、70 で30秒および72 で1分、5サイクル、4) 94 で30秒、68 で30秒および72 で1分、20サイクル、5) 72 で10分。

#### 【0076】

サブクローニングおよびDNA配列決定。PCR産物(ネズミ免疫グロブリン 2b鎖 CH1領域由来の断片およびネズミ免疫グロブリン 鎖CL領域由来の断片)をpCRIIベクター(TOPOクローニング、Invitrogen)にサブクローン化し、そしてDNA配列を分析するためにUCSF Molecular Bioresource Centerに付託した。

10

#### 【0077】

配列番号1はm166重鎖mRNAのDNA配列であり、配列番号2はm166重鎖(IgG I<sub>b</sub>)のアミノ酸配列であり、配列番号3はm166軽鎖mRNAのDNA配列であり、配列番号4はm166軽鎖のアミノ酸配列である。図6A、図6Bおよび図7により、配列が調べられ、より細部が示される。

#### 【0078】

##### 商業的意義

本発明の抗体配列は、PcrVを阻止することができ、そしてまた長期間にわたって動物において単鎖抗体の産生を生じさせる真核生物ベクターが送達される遺伝子送達実験において配列を利用することができる組換え単鎖抗体を製造するために使用することができる。最後に、本発明の抗体配列は、ネズミのモノクローナル抗体をヒト化して、ヒト患者の治療において利用され得る製造物を製造するために利用することができる。当業者は、ヒト化抗体を作製するために、齧歯類の抗体の可変領域に由来する抗原結合性の相補性決定領域(CDR)をヒトの可変ドメインにつなぐことなどの標準的な方法に注目する。

20

#### 【0079】

##### 7. PcrVに対する単鎖抗体

###### a. 単鎖抗体の組み立て

VH遺伝子およびVL遺伝子が、それぞれの遺伝子について特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された。増幅されたVH断片およびVL断片は、プライマーとともにPCRを使用することによってリンカーとともに組み立てられた。組み立てられた単鎖抗体遺伝子(リンカーを伴うscFv::m166:VH遺伝子およびVL遺伝子)をクローニングベクターpCR4Topo(Invitrogen、Carlsbad、CA)に移した。その後、scFv::m166のコード配列を、宿主大腸菌としてのLMG194における大腸菌発現ベクターpBAD/gIII(Invitrogen)にサブクローン化した。

30

#### 【0080】

###### b. タンパク質の誘導および精製

タンパク質誘導のために、0.2%グルコースおよび100μgのアンプシリンを含有するRM培地において、形質転換大腸菌をオービタル振とう機(200rpm)にて37で一晩培養した。翌日、5mLの培養された大腸菌を500mLの同じ培地に移して、100rpmにおいて室温で3時間インキュベーションした。L-アラビノースを0.004%の濃度で加えた後、大腸菌を一晩培養した。3日目に、タンパク質を浸透圧ショック法によって大腸菌の細胞周辺腔から集めた。浸透圧ショック由来のペリプラズムタンパク質を含む溶液を溶解緩衝液に対して一晩透析した。4日目のとき、透析された溶液をニッケル-NTAカラムに負荷して、ヘキサヒスチジン標識の単鎖抗体を精製した。ニッケルカラムからの溶出液をリン酸塩緩衝化生理的食塩水に対して一晩透析した。5日目に、透析された溶液を遠心分離濃縮器に加えて、より高濃度のscFv:m166を作製した。

40

#### 【0081】

###### c. 結合試験

50

精製された単鎖抗体 (s c F v : : m 1 6 6) を、組換え P c r V に対する酵素結合免疫吸着アッセイを使用することによって、そして組換え P c r V タンパク質および P . アエルギノーザ P A 1 0 3 の未変性 P c r V の両方に対する免疫ブロット (ウエスタンブロット) によって調べた。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明の単鎖抗体により、我々は、様々なファージディスプレイ技術を利用して抗体をヒト化することができ、そしてこれらの技術を使用して抗体の親和性を改善することができる。本発明の単鎖抗体は、(組織学のための)診断ツールとして利用することができるが、治療剤としては利用されない。しかし、単鎖抗体に対する遺伝子は遺伝子治療において利用することができ、その結果、動物は、ある期間にわたって単鎖抗体を産生し、それにより、P . アエルギノーザ感染からの保護を生じさせることができる。

10

#### 【 0 0 8 3 】

##### 8 . 参考文献

1 . ウィーナー - クロニッシュ・ジェイ・ピー (Wiener - Kronish , J . P . )、サワ・ティー (Sawa , T . )、クラハシ・ケー (Kurahashi , K . )、オーハラ・エム (Ohara , M . )、およびグロッパ・エム・エー (Groppe r , M . A . )、「細菌性肺炎に関連した肺浮腫」、肺浮腫 (マタイ・エム・エー (Matthay , M . A . ) およびイングバー・ディー・エイチ (Ingbar , D . H . ) 編) pp . 2 4 7 - 2 6 7 (マーセル・デッカー・インコーポレイテッド (Marcel Dekker , Inc . )、ニューヨーク、1998)。

20

2 . フランク・ディー・ダブリュー (Frank , D . W . )、「シュードモナス・アエルギノーザの細胞外酵素 S レギュロン」、Mol . Microbiol . 2 6 : 6 2 1 - 6 2 9 (1997)。

#### 【 0 0 8 4 】

3 . フィンク - バーバンコン・ヴィー (Finck - Barbancon , V . ) 等、「シュードモナス・アエルギノーザによる ExoU 発現は、急性細胞毒性および上皮損傷と相関する」、Mol . Microbiol . 2 5 : 5 4 7 - 5 5 7 (1997)。

4 . ヤー・ティー・エル (Yahr , T . L . )、ゴランソン・ジェイ (Goranson , J . ) およびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナス・アエルギノーザの細胞外酵素は、III型経路により分泌される」、Mol . Microbiol . 2 2 : 9 9 1 - 1 0 0 3 (1996)。

30

5 . ヤー・ティー・エル、メンデ - ミュエラー・エル・エム (Mende - Mueller , L . M . )、フリーズ・エム・ビー (Friese , M . B . )、およびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナスアエルギノーザ細胞外酵素 S レギュロンの III 型分泌産物の同定」、J . Bacteriol . 1 7 9 : 7 1 6 5 - 7 1 6 8 (1997)。

6 . ウエック・シー・ジェイ (Hueck , C . J . )、「動物および植物の細菌病原体における III 型タンパク質分泌系」、Microbiol . Mol . Biol . Rev . 6 2 : 3 7 9 - 4 3 3 (1998)。

7 . スクルジペック・イー (Skrzypek , E . ) およびストラレイ・エス・シー (Straley , S . C . )、「V 抗原の分泌に対する、l c r V の欠失の異なる効果、低 Ca<sup>2+</sup> 応答の調節、および エルシニア・ペスティス の病原性」、J . Bacteriol . 1 7 7 : 2 5 3 0 - 2 5 4 2 (1995)。

40

8 . ナカジマ・アール (Nakajima , R . ) およびブルベーカー・アール・アール (Brubaker , R . R . )、「エルシニア・ペスティスの病原性ないし インターフェロンおよび腫瘍壊死因子 の抑制の関連」、Infect . Immun . 6 1 : 2 3 - 3 1 (1993)。

#### 【 0 0 8 5 】

9 . ナカジマ・アール、モティン・ヴィー・エル (Motin , V . L . ) およびブルベーカー・アール・アール、「タンパク質 A - V 抗原融合ペプチドによるマウスのサイトカ

50

インの抑制および能動免疫による合成の回復」、Infect. Immun. 63:3021-3029 (1995)。

10. ネディアルコフ・ワイ・エー (Nedialkov, Y. A.)、モティン・ヴィー・エルおよびブルベーカー・アール・アール、「エルシニア・ペスティス V 抗原 - ポリヒスチジン融合ペプチドにより媒介されるリポ多糖に対する耐性：インターロイキン - 10 の増幅」、Infect. Immun. 63:1196-1203 (1997)。

11. ニレス・エム・エル (Nilles, M. L.)、フィールズ・ケー・エー (Fields, K. A.)、およびストラレイ・エス・シー、「エルシニア・ペスティス の V 抗原は、YopB および LcrG に対する効果を介して、Yop ベクター 標的化並びに Yop 分泌を調節する」、J. Bacteriol. 180:3410-3420 (1998)。

【0086】

12. クドー・アイ (Kudoh, I.)、ウィーナー・クロニッシュ・ジェイ・ピー、ハシモト・エス (Hashimoto, S.)、ピテット・ジェイ・エフ (Pittet, J. - F.)、およびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナス・アエルギノーザ 株の細胞外産物分泌は、肺胞上皮損傷の重度に影響を及ぼす」、Am. J. Physiol. 267:L551-L556 (1994)。

13. アボダカ・ジー (Apodaca, G.) 等、「シュードモナス・アエルギノーザ 誘導 MDC 細胞損傷の特徴づけ：グリコシル化欠損宿主細胞は、細菌殺滅に耐性である」、Infect. Immun. 63:1541-1551 (1995)。

14. ヤール・ティー・エル (Yahr, T. L.)、パリス・エー・ジェイ (Wallis, A. J.)、ハンコック・エム・ケー (Hancock, M. K.)、バービエリ・ジェイ・ティー (Barbieri, J. T.)、およびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナス・アエルギノーザ III 型系により分泌される新規アデニル酸シクラーゼである ExoY」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、印刷中 (1998)。

【0087】

15. フィンク・バーバンコン・ヴィー (Finck-Barbancon, V.)、ヤール・ティー・エル、およびフランク・ディー・ダブリュー、「ExoU 細胞毒の効率的分泌に必要なシャペロン SpcU の同定および特徴づけ」、J. Bacteriol. 印刷中 (1998)。

16. サワ・ティー (Sawa, T.)、コリー・ディー・ビー (Corry, D. B.)、グロッパー・エム・エー、オーハラ・エム、クラハシ・ケーおよびウィーナー・クロニッシュ・ジェイ・ピー、「IL-10 は、シュードモナス・アエルギノーザ 肺炎における肺損傷および生存を改善する」、J. Immunol. 159:2858-2866 (1997)。

【0088】

17. シュバイツァー・エイチ・ピー (Schweizer, H. P.)、「新規 ColE1 型ベクターおよび携帯型 oriT および対抗選択可能な枯草菌 sacB マーカーを含むファミリカセットを使用した、シュードモナス・アエルギノーザ の対立遺伝子交換」、Mol. Microbiol. 6:1195-1204 (1992)。

18. フランク・ディー・ダブリュー、ナイアー・ジー (Nair, G.)、およびシュバイツァー・エイチ・ピー、「シュードモナス・アエルギノーザ 細胞外酵素 S トランス調節座位の染色体挿入変異の作成および特徴づけ」、Infect. Immun. 62:554-563 (1994)。

【0089】

19. シュバイツァー・エイチ・ピー、「pUC18/19 から得られる エセリシア (Escherichia) - シュードモナス シャトルベクター」、Gene 97:109-112 (1991)。

20. ヤール・ティー・エル、ホベイ・エー・ケー (Hovey, A. K.)、クリッヒ

10

20

30

40

50

・エス・エム (Kulich, S. M.)、およびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナス・アエルギノーザ細胞外酵素S構造遺伝子の転写分析」、J. Bacteriol. 177: 1169 - 1178 (1995)。

21. パリス・エー・ジェイ (Vallis, A. J.)、ヤール・ティー・エル、バービエリ・ジェイ・ティー (Barbieri, J. T.)、およびフランク・ディー・ダブリュー、「組織培養条件に应答したシュードモナス・アエルギノーザによるExoS産生の調節」、Infect. Immun. 提出。

【0090】

22. ヤール・ティー・エル、バービエリ・ジェイ・ティーおよびフランク・ディー・ダブリュー、「シュードモナス・アエルギノーザ由来の細胞外酵素Sの53ないし49kDa形の遺伝子関係」、J. Bacteriol. 178: 1412 - 1419 (1996)。

10

23. アイジ・ワイ (Aidi, Y.) およびパブスト・エム・ジェイ (Pabst, M. J.)、「トリトンX-114を使用した相分離によるタンパク質溶液からのエンドトキシンの除去」、J. Immunol. Methods 132: 191 - 195 (1990)。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】図1Aおよび図1Bは、PA103 pcrVの表現型分析を示す、染色ゲル(図1A)およびウエスタンブロット(図1B)である。

20

【図2】図2Aおよび図2Bは、P. アエルギノーザ親および変異株の生存および肺損傷を示す、グラフ(図2A)および棒グラフのセット(図2B)である。

【図3】図3Aおよび図3Bは、生存、肺損傷、および細菌コロニー形成に対する免疫化の効果を示す、グラフ(図3A)および棒グラフのセット(図3B)である。

【図4】図4は、PcrV、ExoU、PopDに特異的なポリクローナル抗体または非免疫化動物由来の対照IgGを受動投与した後、 $5 \times 10^5$  CFU/マウスのPA103株で攻撃して生存した動物数のグラフである。

【図5】図5は、異なる細菌性抗原に対するIgGおよび細菌攻撃の併用投与による、肺損傷からの生存および保護を示す、グラフ(図5A)および棒グラフのセット(図5B)である。肺損傷の一方向性分散分析は、 $p = 0.026$ 、および肺浮腫では、 $p < 0.005$ 。

30

【図6】図6Aおよび図6Bは、さらなる説明情報を伴う配列番号1および配列番号2のプリントアウトである。図6Aは配列番号1である。図6Bは配列番号2である。

【図7】図7は、さらなる説明情報を伴う配列番号3および配列番号4のプリントアウトである。

【図8】図8は、合成された組換え単鎖抗体(SCFV-M166)(配列番号5および配列番号6)である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Frank, Dara W.  
 Wiener-Kronish, Jeannine  
 Yahr, Timothy L.  
 Sawa, Teiji  
 Fritz, Robert B.

<120> Method of and compositions for immunization with the  
 pseudomonas V antigen

<130> 650053.91487 10

<140> 09/770,916  
 <141> 2001-01-26

<150> 09/448,339  
 <151> 1999-11-23

<150> 60/109,952  
 <151> 1998-11-25

<150> 60/126,794  
 <151> 1999-03-30

<160> 6 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
 <211> 1588  
 <212> DNA  
 <213> mouse

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (33)..(1466) 30

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (33)..(89)

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (57)..(179)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (180)..(194)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (195)..(236)  
 <223> FR2

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (237)..(284)  
 <223> CDR2

10

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (285)..(380)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (381)..(425)  
 <223> CDR3

20

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (426)..(458)  
 <223> FR4

<220>  
 <221> C\_region  
 <222> (459)..(1466)

<400> 1  
 ccatactctt ctcatagagc ctccatcaga gc atg gct gtc ttg ggg ctg etc 53  
 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu  
 1 5

30

ttc tgc ctg gtg aca ttc cca age tgt gtc cta tcc cag gtg cag ctg 101  
 Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu  
 10 15 20

aag cag tca gga cct ggc cta gtg cag ccc tca cag age ctg tcc atc 149  
 Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile

25            30            35  
 acc tgc aca gtc tct ggt ttc tca tta act agc tat ggt gta cac tgg 197  
 Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp  
 40            45            50            55  
  
 gtt cgt cag tct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg gga gtg ata tgg 245  
 Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp  
           60            65            70  
  
 agt ggt gga gac aca gac tat aat gca get ttc ata tcc aga ctg agc 293  
 Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser  
           75            80            85            10

atc agc aag gac aat tcc aag agc caa ctc ttc ttt aaa atg aac agt 341  
 Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Leu Phe Phe Lys Met Asn Ser  
           90            95            100

ctg ega gct act gac aca gcc ata tat tac tgt gcc aga aat aga ggg 389  
 Leu Arg Ala Thr Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Gly  
           105            110            115

gat att tac tat gat ttc act tat gcc atg gac tac tgg ggt caa gga 437  
 Asp Ile Tyr Tyr Asp Phe Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 120            125            130            135            20

acc tea gtc acc gtc tcc tea gcc aaa aca aca ccc cca tea gtc tat 485  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
           140            145            150

cca ctg gcc cct ggg tgt gga gat aca act ggt tcc tcc gtg act ctg 533  
 Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu  
           155            160            165

gga tgc ctg gtc aag ggc tac ttc cct gag tea gtg act gtg act tgg 581  
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp  
           170            175            180            30

aac tct gga tcc ctg tcc agc agt gtg cac acc ttc cca get ctc ctg 629  
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu  
           185            190            195

cag tct gga ctc tac act atg agc agc tea gtg act gtc ccc tcc agc 677  
 Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser  
 200            205            210            215

acc tgg cca agt cag acc gtc acc tgc agc gtt gct cac cca gcc agc 725  
 Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser  
 220 225 230

agc acc acg gtg gac aaa aaa ctt gag ccc agc ggg ccc att tca aca 773  
 Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr  
 235 240 245

atc aac ccc tgt cct cca tgc aag gag tgt cac aaa tgc cca gct cct 821  
 Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro  
 250 255 260

aac ctc gag ggt gga cca tcc gtc ttc atc ttc cct cca aat atc aag 869  
 Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys  
 265 270 275

gat gta ctc atg atc tcc ctg aca ccc aag gtc acg tgt gtg gtg gtg 917  
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val  
 280 285 290 295

gat gtg agc gag gat gac cca gac gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac 965  
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn  
 300 305 310

aac gtg gaa gta cac aca gct cag aca caa acc cat aga gag gat tac 1013  
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr  
 315 320 325

aac agt act atc cgg gtg gtc agc acc ctc ccc atc cag cac cag gac 1061  
 Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp  
 330 335 340

tgg atg agt ggc aag gag ttc aaa tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc 1109  
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu  
 345 350 355

cca tca ccc atc gag aga acc atc tca aaa att aaa ggg cta gtc aga 1157  
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg  
 360 365 370 375

gct cca caa gta tac atc ttg ccg cca cca gca gag cag ttg tcc agg 1205  
 Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg  
 380 385 390

aaa gat gtc agt etc act tgc ctg gtc gtg ggc ttc aac cct gga gac 1253  
 Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp

10

20

30

395            400            405

atc agt gtg gag tgg acc agc aat ggg cat aca gag gag aac tac aag 1301  
 Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys  
 410            415            420

gac acc gca cca gtc ctg gac tct gac ggt tct tac ttc ata tat agc 1349  
 Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser  
 425            430            435

aag ctc aat atg aaa aca agc aag tgg gag aaa aca gat tcc ttc tca 1397  
 Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser  
 440            445            450            455

tgc aac gtg aga cac gag ggt ctg aaa aat tac tac ctg aag aag acc 1445  
 Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr  
 460            465            470

atc tcc egg tet ccg ggt aaa tgagctcagc acccacaag ctctcaggtc 1496  
 Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 475

ctaagagaca ctggcaccca tatecatgca tcccttgat aaataaagca tccagcaaag 1556

cctggtacca tgtaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1588

<210> 2  
 <211> 478  
 <212> PRT  
 <213> mouse

<400> 2  
 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
 1            5            10            15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln  
 20            25            30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35            40            45

Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu  
 50            55            60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala

10

20

30

65	70	75	80	
Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln				
85	90	95		
Leu Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Arg Ala Thr Asp Thr Ala Ile Tyr				
100	105	110		
Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Gly Asp Ile Tyr Tyr Asp Phe Thr Tyr Ala				
115	120	125		
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys				10
130	135	140		
Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr				
145	150	155	160	
Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro				
165	170	175		
Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val				
180	185	190		
His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser				20
195	200	205		
Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys				
210	215	220		
Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu				
225	230	235	240	
Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu				
245	250	255		
Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe				
260	265	270		30
Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro				
275	280	285		
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val				
290	295	300		
Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr				
305	310	315	320	

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr  
 325 330 335

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
 340 345 350

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser  
 355 360 365

Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro  
 370 375 380

Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 385 390 395 400

10

Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly  
 405 410 415

His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 420 425 430

Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp  
 435 440 445

Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys  
 450 455 460

20

Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

<210> 3

<211> 979

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (44)..(745)

30

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (44)..(103)

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (104)..(172)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (173)..(205)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (206)..(250)  
 <223> FR2

10

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (251)..(271)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (272)..(367)  
 <223> FR3

20

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (368)..(394)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (455)..(487)  
 <223> FR4

<220>  
 <221> C\_region  
 <222> (428)..(745)

30

<400> 3  
 acacccttgg ctggagtcag aatcacactg atcacacaca gtc atg agt gtg ctc 55  
 Met Ser Val Leu  
 1

act cag gtc ctg gcg ttg ctg ctg ctg tgg ctt aca ggt gcc aga tgt 103  
 Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Gly Ala Arg Cys

5	10	15	20	
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc eta tct gca tct gtg gga 151				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
	25	30	35	
gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt ggg aat att caa aat tat 199				
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Gln Asn Tyr				
	40	45	50	
tta gca tgg tat cag cag aca cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 247				
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val				
	55	60	65	10
tat tct gca aaa acc tta gca gat ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 295				
Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
	70	75	80	
agt gga tca gga aca caa tat tct ctc aag atc aac agc ctg cag cct 343				
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro				
	85	90	95	100
gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat ttt tgg agt act ccg tac 391				
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr				
	105	110	115	20
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gct gat gct gca 439				
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala				
	120	125	130	
cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag cag tta aca tct gga 487				
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly				
	135	140	145	
ggg gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc 535				
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile				
	150	155	160	
aat gtc aag tgg aag att gat ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg 583				
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu				
	165	170	175	30
aac agt tgg act gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg age 631				
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser				
	185	190	195	

agc acc ctc acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga cat aac agc tat 679  
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 200 205 210

acc tgt gag gcc act cac aag aca tea act tea ccc att gtc aag agc 727  
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 215 220 225

ttc aac agg aat gag tgt tagagacaaa ggtcctgaga cgccaccacc 775  
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 230

agctccccag ctccatccta tcttcccttc taaggtctfg gaggettccc cacaagegac 835

ctaccactgt tggggtgctc caaacctcct cccacctcc ttctctcct cctcccttc 895

cttgctttt atcatgctaa tattgcaga aaatattcaa taaagtgagt ctttgcaaaa 955

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 979

10

<210> 4  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> mouse

20

<400> 4  
 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn  
 35 40 45

Ile Gln Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Gln Gly Lys Ser Pro  
 50 55 60

30

Gln Leu Leu Val Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp

100            105            110  
 Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115            120            125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
 130            135            140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145            150            155            160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
 165            170            175

10

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180            185            190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
 195            200            205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 210            215            220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 225            230

20

<210> 5  
 <211> 882  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(54)  
 <223> Gene III signal sequence

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (55)..(72)  
 <223> Joint-1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (73)..(441)

<223> m166 heavy chain

<220>

<221> misc\_feature

<222> (442)..(486)

<223> scFv-linker

<220>

<221> misc\_feature

<222> (487)..(810)

<223> m166 light chain

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (811)..(816)

<223> Joint-2

<220>

<221> misc\_feature

<222> (817)..(846)

<223> Myc epitope

<220>

<221> misc\_feature

<222> (847)..(861)

<223> Joint-3

20

<220>

<221> misc\_feature

<222> (862)..(879)

<223> Hexahistidine tag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(879)

<400> 5

atg aaa aaa ctg ctg ttc gcg att ccg ctg gtg gtg ccg ttc tat agc 48

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser

1 5 10 15

30

cat agc acc atg gag ctc gag cgg cag gtg cag ctg aag cag tca gga 96

His Ser Thr Met Glu Leu Glu Arg Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly

20 25 30

cct ggc cta gtg cgg ccc tca cag agc ctg tcc atc acc tgc aca gtc 144

Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val  
 35 40 45

tct ggt ttc tca tta act agc tat ggt gta cac tgg gtt cgt cag tct 192  
 Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser  
 50 55 60

cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg gga gtg ata tgg agt ggt gga gac 240  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp  
 65 70 75 80

aca gac tat aat gca gct ttc ata tcc aga ctg agc atc agc aag gac 288  
 Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp  
 85 90 95

10

aat tcc aag agc caa ctc ttc ttt aaa atg aac agt ctg cga gct act 336  
 Asn Ser Lys Ser Gln Leu Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Arg Ala Thr  
 100 105 110

gac aca gcc ata tat tac tgt gcc aga aat aga ggg gat att tac tat 384  
 Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Gly Asp Ile Tyr Tyr  
 115 120 125

gat ttc act tat gcg atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc 432  
 Asp Phe Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
 130 135 140

20

gtc tcc tca ggt gga ggc ggc tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc 480  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 145 150 155 160

gga tgg gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct 528  
 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser  
 165 170 175

gtg gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt ggg aat att caa 576  
 Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Gln  
 180 185 190

30

aat tat tta gca tgg tat cag cag aca cag gga aaa tct cct cag ctc 624  
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu  
 195 200 205

ctg gtc tat tct gca aaa acc tta gca gat ggt gtg cca tca agg ttc 672  
 Leu Val Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 210 215 220

agt ggc agt gga tca gga aca caa tat tct ctc aag atc aac agc ctg 720  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu  
 225 230 235 240

cag cct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat ttt tgg agt act 768  
 Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr  
 245 250 255

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa egg gct cta 816  
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Leu  
 260 265 270

gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat 864  
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His  
 275 280 285

10

cat cat cat cat cat tga 882  
 His His His His His  
 290

<210> 6  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

20

<400> 6  
 Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser  
 1 5 10 15

His Ser Thr Met Glu Leu Glu Arg Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly  
 20 25 30

Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val  
 35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser  
 50 55 60

30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp  
 65 70 75 80

Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp  
 85 90 95

Asn Ser Lys Ser Gln Leu Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Arg Ala Thr  
100 105 110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Gly Asp Ile Tyr Tyr  
115 120 125

Asp Phe Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser  
165 170 175

10

Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Gln  
180 185 190

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu  
195 200 205

Leu Val Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe  
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu  
225 230 235 240

20

Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr  
245 250 255

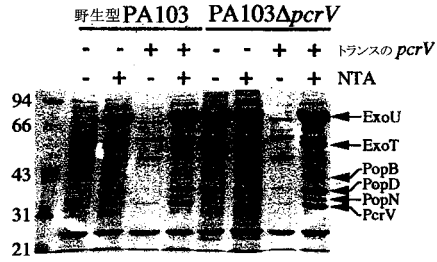
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Leu  
260 265 270

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His  
275 280 285

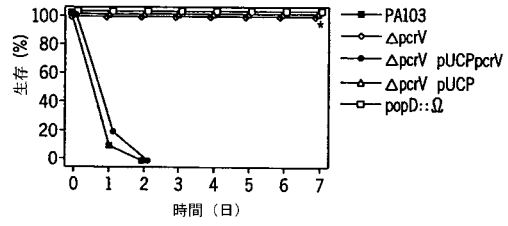
His His His His His  
290

30

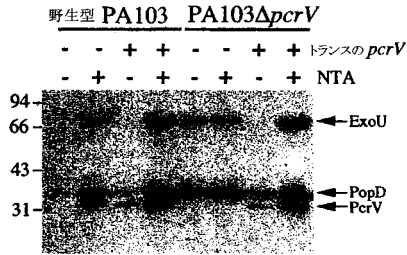
【図 1 A】



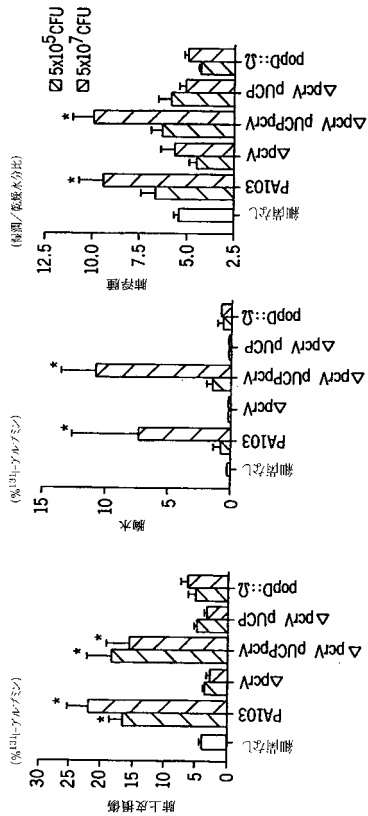
【図 2 A】



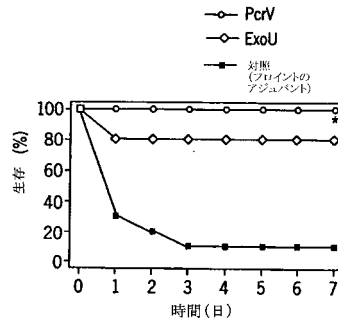
【図 1 B】



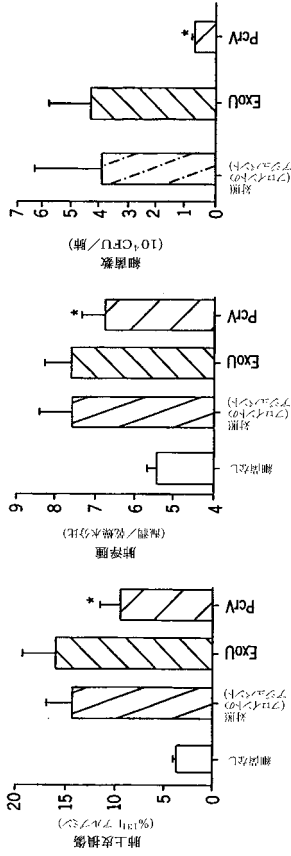
【図 2 B】



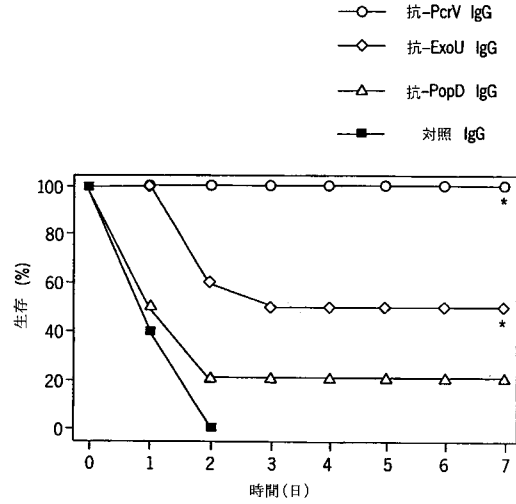
【図 3 A】



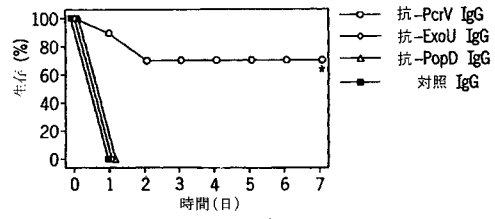
【 図 3 B 】



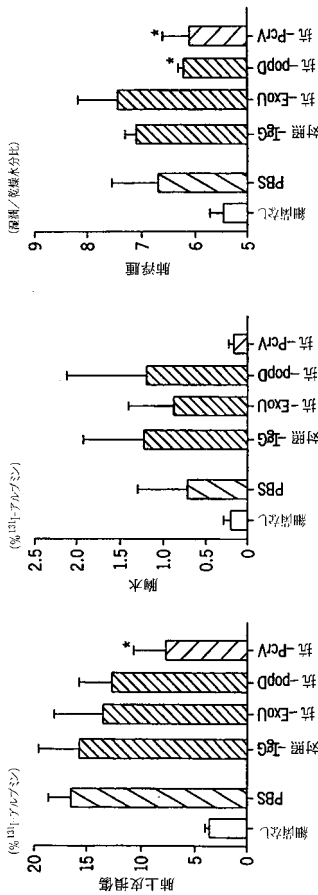
【 図 4 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A - 1 】

m1.66重鎖 (1 IgG2b) の完全なmRNA 配列:  
 1. m1.66重鎖 (転写開始点からポリAテールまで)

```

CCATCCTCTT CTCATAGAG CTCATCAGA GCATGGCTGT CTTGGGCTG
CTCTTCTGCC TGGTGACATT CCCAAGCTGT GTCCTATCCC AGTGCCAGCT
GAAGCAGTCA GGACCTGGCC TAGTGCAGCC CTCACAGAGC CTGTCCATCA
CCTGCACAGT CTCTGGTTTC TCATTAAC TAATGAGTGT ACACCTGGTT
CGTCAGTCTC CAGGAAAGGG TCTGGAGTGG CTGGGAGTGA TATGGAGTGG
TGGAGACACA GACTATAATG CAGCTTTCAT ATCCAGACTG AGCATCAGCA
AGSACAATTC CAAGAGCCAA CTCCTCTTTA AATGAACAG TCTGGAGCT
ACTGACACAG CCATATATTA CTGTGCCAGA AATAGAGGGG ATATTTACTA
TGATTTACTT TATGCCATGG ACTACTGGGG TCAAGGAACC TCACTCACCC
TCTCCTCAGC CAAAACAACA CCCCATCAG TCTATCCACT GGCCCTGGG
TGTGGAGATA CAACTGGTTC CTCGGTGCAT CTGGGATGCC TGGTCAAAGGG
CTACTTCCCT GACTCAGTGA CTGTGACTTG GAAGCTTGGG TCCCTGTCCA
GCAGTGTGCA CACCTTCCCA GCTCTCCTGC AGTCTGGACT CTACACTATG
AGGAGCTCAG TGAAGTGTCC CTCCAGCACC TGGCCAAAGT AGACCGTCA
CTGCAGCGTT GCTCACCCAG CCAGCAGCAC CACGTTGGAC AAAAACTTG
AGCCAGCGGG GCCCATTTCA ACAATCAACC CCTGTCTCTCC ATGCCAAGGAG
  
```

【 6 A - 2 】

TGTCACAAAT GCCCAGCTCC TAACCTCGAG GGTGGACCAT CCGTCTTCAT  
 CTTCCTCCA AATATCAAGG ATGTAICTAT GATCTCCCTG ACACCCAAAGG  
 TCACGTGTG GGTGGTGGAT GTGAGCGAGG ATGACCCAGA CGTCCAGATC  
 AGCTGGTTG TGAACAACGT GAAAGTACAC ACAGCTCAGA CACAAACCCA  
 TAGAGAGAT TACAACAGTA CTATCCGGT GGTCAGCACC CTCCCATCC  
 AGCACCAGGA CTGATGAGT GCAAGGAGT TCAATGCCA GGTCAACAAC  
 AAAGACCTCC CATAACCCAT CGAGAGAACC ATCTCAAAA TAAAGGGCT  
 AGTCAGAGCT CCAACAAGT ACATCTTGGC GCCACCAGCA GAGCAGTTCT  
 CCAGGAAAGA TGTCACTCTC ACTTGGCTGG TCGTGGGCTT CAACCCCTGGA  
 GACATCAGTG TGGAGTGGAC CAGCAATGGG CATACAGAGG AGAAGTACAA  
 GGACACCAGA CCAGTCTGG ACTCTGACGG TTCTTACTTC ATATATAGCA  
 AGCTCAATAT GAAAACAAGC AGTGGGAGA AAACAGATTG CTCTCATGCG  
 AACGTGAGAC ACGAGGGTCT GAAAAATTAC TACCTGAAGA AGACCATCTC  
 CCGTCTCCG GGTAAATGAG CTCAGCACCC ACAAAAGCTCT CAGGTCTTAA  
 GAGACACTGG CACCCATATC CATGCATCCC TTGTATAAT AAAGCATCCA  
 GCAAAGCCTG GTACCATGTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【 6 B - 1 】

2. m166重鎖 (1 g c 2 b) の完全なヌクレオチド配列:

(開始コドンから停止コドンまで)

MAVLGLLFCL VTFPSCVLSG YQLKQSGFGL VQPSQSLSLT VQPSQSLSLT CTVSGFSLIS  
 YGVHVVRSQP GKGLEWLVLI WSGGDDYNA AFISRLSISK DNSKSQLFEK  
 MNSLRADITA IYDEITYAMD YWGQGTSTVTV SSAKTTPPSV  
 YPLAFCCGDT TGSVTLGCL VGYFPESVT VVWNSGSLSS SVHTFPALLQ  
 SGLYTMSSSV TYPSTWFSQ TVTCSVAHPA SSTTVDKKLE PSGFISTINP  
 CPPCKECHKC PAPNLEGGPS VFIFPPNIKO VLMISLTPKV TCVVVDVSED  
 DRPDQISWVF NNVEVHTAQT QTHREDYNST IRVWSTLPIQ HQDWMSGKEF  
 KCKVNNKOLP SPIERTISKI KGLVRAPOVY ILPPPAEQLS RKDVSILTCLV  
 VGFNPDISV EWTNSNGHTEE NYKDTAPVLD SDGYSFYYSK LNMKTSDWEEK  
 TDSFSCNVRH E8LKNYYLKK TISRSPGK[STOP]

【 6 B - 2 】

[SIG-PEP] MAVLGLLFCLVTFPSCVLS  
 [VH-REGION] QVQLKQSGFGLVQPSQSLSLITCTVSGFSLT  
 FR1: SYGVH  
 FR2: WVRQSPGKLEWLG  
 FR3: VIVSGGDDYNAEIS  
 FR4: RLSISKDNSKSQLFKMNSLRADITAIYYCAR  
 NRGDIYDIFTYAMDY  
 WGGGTSVTVSS  
 [CH-REGION]  
 CH: AKTTPPSVYP LAPGGDITG SSVTLGCLVK GYFPESVTVT WNSGSLSSSV  
 HTFPALQSG LYTMSSSVTV PSSTWFSQTV TCSVAHPASS TVVDKKLEPS  
 GRISTINPCP PCKECKKCPA PNLEGGPSVF IFPPNIKDVLI MISLTPKYTC  
 VVVDVSEDDP DVQISWVFN VEVHTAQITQ HREDYNSTIR VVSTLPIQHQ  
 DWMSGKEFKC KVNKNDLPS IERTISKIG LVRAPQVYIL PPPAEQLSRK  
 DVSLTCLVVG FNPQDISVEW TSNGHTEENY KDTAPVLDSD GSYFYYSKLN  
 MKTSRWEKTD SFSCNVRHEG LKNYYLKKTI SRSPGK[ISTOP]

【 7 A 】

m166重鎖 (κ) の完全なmRNA配列:  
1. m166重鎖 (κ) の完全なmRNA配列:

(転写開始点からポリAテールまで)

ACACCCITTTG CTGGAGTCAG AATCACACTG ATCACACACA GTCATGAGTG  
 TGTCTACTCA GGTCTGGCG TTGCTGCTGC TGTGGCTTAC AGGTGGCAGA  
 TGTGACATCC AGATGACTCA GTCTCCAGCC TCCCTATCTG CATCTGTGGG  
 AGAACTGTG ACCATCACAT GTCGAGCAAG TGGGAATATT CAAAATATT  
 TAGCATGGTA TCAGCAGACA CAGGAAAAAT CTCCTCAGCT CCTGGTCTAT  
 TCTGCAAAA CTTAGCAGA TGGTGTGCCA TCAAGGTCCA GTGGCAGTGG  
 ATCAGGAACA CAATATTCTC TCAAGATCAA CAGCCTGCCG COTGAAGATT  
 TTGGGAGTTA TTAGTGCAA CATTITGGTA GTAGCTCCGTA CAGGTTCCGA  
 GGGGGGACCA AGCTGGAAAT AAAACGGGCT GATGCTGGCAC CAACGTATC  
 CATCTTCCCA CCATCCAGTG AGCAGTTAAC ATCTGGAGGT GCCTCACTCG

【 7 B 】

TGTGCTTCTT GAACAACCTC TACCCAAAAG ACATCAATGT CAAGTGGGAG  
 ATTGATGGCA GTGAACGACA AATGGGGTC CTGAACAGTT GGACTIONGATCA  
 GGACAGCAAA GACAGCACCT ACAGCATGAG CAGCACCCCTC ACGTTGACCA  
 AGGACAGATA TGAACGACAT AACAGCTATA CCTGTGAGGC CACTCACAAAG  
 ACATCAACTT CACCATTGT CAAGAGCTTC AACAGGAATG AGTGTAGAG  
 ACAAAGTCC TGAGACGCGA CCACCAGCTC CCCAGCTCCA TCCTATCTTC  
 CCTTCTAAGG TCTTGGAGGC TTCCCACAA GGGACCTACC ACTGTGCGGG  
 TGTCCAAAC CTCCTCCCA CCTCCTCTC CTCCTCCTCC CTTTCCCTGG  
 CTTTATCAT GCTAATATT GCAGAAAATA TTCAATAAAG TGAGTCTTTG  
 CAAAAAATA AAAAAAATA AAAAAAATA

【 7 C 】

MSVLTQVLAL LLLWLTGARC DIQMTQSPAS LSASVGETVT ITCRASGNIQ  
 NYLAWYQQTQ GKSPQLLVYS AKTLADGVPS RFGSGSGGTQ YSLKINSLQP  
 EDEGSIYCOH FMSTPTFEGG GTKLEIKRAD AAPTYSIFPP SSEQLTSGGA  
 SWVCLNIFY PKDINVKWIKI DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT  
 LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSFN RNEC[STOP]

[SIG-PEP] MSVLTQVLALLLLWLTGARC

[M-REGION]  
 FR1: DIQMTQSPASLSASVGETVTITC  
 CDR1: RASGNIGNYLA  
 FR2: WYQQQTQKIKSPQLLVY  
 SAKTLAD  
 FR3: GVSRRFGSGSGTQSLKINSLQPEDFGSYIC  
 QHFWSTPYT  
 FR4: FGGGTKLEIKR

[CL-REGION]  
 CL: ADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVCLNIFYPKDINVKWIKIDGSRQNGVL  
 NSWTDQDSKDYMSMSSTLTITKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRNEC[STOP]

2. m166 重鎖 (κ) の完全なアミノ酸配列:  
 (開始コドンから停止コドンまで)

【 8 A 】

合成された組換え単鎖抗体 (scFv-m166)  
 1. DNA配列:

ATGAAAAAC TGCTGTTCCG GATTCGGCTG GTGGTGCCGT TCTATAGCCA  
 TAGCACCATG GAGCTCGAGC GGCAGGTGCA GCTGAAGCAG TCAGGACCTG  
 GCGTAGTGGC GCCCTCACAG AGCCTGTCCA TCACCTGCAC AGTCTGTGGT  
 TTCTATTAA CTAGCTATGG TGTACACTGG GTTCGTGAGT CTCACGAAA  
 GGGTCTGGAG TGGCTGGAG TGATATGGAG TGGTGGAGAC ACAGACTATA  
 ATGCAGCTTT CATAATCCAG CTGAGCATCA GCAAGGACAA TTCRAAGAGC  
 CAACTCTTCT TAAAATGAA CAGTCTGCGA GCTACTGACA CAGCCATATA  
 TTACTGTGCC AGAATAGAG GGGATAITTA CTATGATTTT ACTTATGCCA  
 TGGACTACTG GGGTCAAGGA ACCTCAGTCA CCGTCTCCTC AGGTGGAGGG  
 GGCTCAGGGC GAGGTGGCTC TGGCGGTGGC GGATCGGACA TCCAGATGAC  
 TCAGTCTCCA GCCCTCCCTAT CTGCATCTGT GGGAGAAAAT GTACCATCA  
 CATGTGAGC AAGTGGGAAT ATTCAAAATT ATTTAGCATG GTATCAGCAG  
 ACACAGGAA AATCTCCTCA GCTCCTGGTC TATCTGCAA AACCTTAGC  
 AGATGGTGT CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGA ACACAATATT  
 CTCTCAAGAT CAACAGCCTG CAGCCCTGAAG ATTTTGGGAG TTAITACTGT  
 CAACATTTTT GGAGTACTCC GTACACGTTT CAGGGGGGA CCAAGCTGGA  
 AATAAAACGG GCTCTAGAAC AAAAACTCAT CTCAGAAGAG GATCTGAATA  
 GCGCCGTCGA CCATCATCAT CATCATCAIT GA

【 8 B 】

MKLLFAIPL VPFYSHSTM ELERQVLKQ SGPGLVRPSQ SLSITCTVSG  
 FSLTSGYVHW VRGSPGKLE WLGVIWSSGD TDYNAAFISR LSISKDNSKS  
 QLFFKMSLR ATDTAIYYCA RNRGDIYYDF TYAMBYWGGG TSVTVSSGGG  
 GSGGGGGGGG GSDIQMTQSP ASLSASVGET VTIITCRASGN IQNYLAWYQQ  
 TQKSPQLLV YSAKTLADGV PSRFGSGSGG TQYSLKINSL QPEDFGSYIC  
 QHFWSTPYTF GGGTKLEIKR ALEQKLISEE DLNSAVDHHH HHH[STOP]

2. アミノ酸配列:

【  8 C 】

[GENE III SIGNAL SEQUENCE] MKKLLFAIPLVVPFYSHS  
 [JOINT-1] TMELER  
 [m166 HEAVY CHAIN]  
 QVQLKQSGPG LVRPSQSLI TCTVSGFSL SYGVHWVRQS POKGLEWLGV  
 IWSGGDTDYN AAFISRLSIS KDNSKSQLFF KMNSLRATDT AIYYCARNRG  
 DIYYDFTYAM DYWGQGTSTV YSS  
 [scFv-LINKER] GGGGGGGGGGGGGG  
 [m166 LIGHT CHAIN]  
 DIQMTQSPAS LSASVGETVT ITCRAGNIQ NYLAWYQQTQ GKSPQLLYYS  
 AKTLADGVPS RFSGGSGGTQ YSLKINSLOP EDFGSYYCQH FWSTPYTFGG  
 GTLEIKR  
 [JOINT-2] AL  
 [MYC EPITOPE] EQKLISEEDL  
 [JOINT-3] NSAVD  
 [HEXAHISTIDINE TAG] HHHHHH [STOP]

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
C 0 7 K 14/21	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 0 7 K	14/21
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 M
		G 0 1 N	33/577 B

(73)特許権者 592130699

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア  
 The Regents of The University of California  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1  
 111 トゥエルフス フロア

(74)代理人 100070002

弁理士 川崎 隆夫

(74)代理人 100076439

弁理士 飯田 敏三

(72)発明者 フランク, ダラ ダブリュー.

アメリカ合衆国 53219 ウィスコンシン ウェスト アリス ウェスト ヘイス アベニュー  
 - 5425

(72)発明者 ウィーナー - クロニッシ, ジーニン

アメリカ合衆国 94116 カリフォルニア サンフランシスコ 16ス アベニュー 190  
 8

(72)発明者 イヤー, ティモシー エル.

アメリカ合衆国 52241 アイオワ コーラルビル オルデ ヒッコリー リッジ 302

(72)発明者 サワ, テイジ

アメリカ合衆国 94122 カリフォルニア サンフランシスコ 17ス アベニュー #6  
 1251

(72)発明者 フリッツ, ロバート, ビー.

アメリカ合衆国 53207 ウィスコンシン ミルウォーキー サウス パーモント アベニュー  
 - 3205

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 国際公開第00/033872(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/14

A61K 39/00

A61K 39/395

A61K 48/00

A61P 31/04

A61P 37/02

C07K 14/21

G01N 33/53

G01N 33/577

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用假单胞菌V抗原免疫的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP4355786B2</a>	公开(公告)日	2009-11-04
申请号	JP2002563954	申请日	2002-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	每次MC重影喻研究胡恩日庸股份有限公司忘川 加州大学圣地亚哥大学的Rejentsu		
当前申请(专利权)人(译)	每次MC重影喻研究胡恩日庸股份有限公司忘川 加州大学董事会		
[标]发明人	フランクダラダブリュー ウィーナークロニッシジーニン イヤーティモシーエル サワテイジ フリッツロバートビー		
发明人	フランク, ダラ ダブリュー, ウィーナー-クロニッシ, ジーニン イヤー, ティモシー エル. サワ, テイジ フリッツ, ロバート, ビー.		
IPC分类号	C07K16/14 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/04 A61P37/02 C07K14/21 G01N33/53 G01N33/577 A61K38/00 A61K39/104 C07K14/12 C07K16/12 C12N1/20 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1 /06 C12Q1/68 G01N33/569		
FI分类号	C07K16/14 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P31/04 A61P37/02 C07K14/21 G01N33/53.M G01N33/577.B		
代理人(译)	川崎孝雄 Toshizo饭		
审查员(译)	菊地美香		
优先权	09/770916 2001-01-26 US 60/264795 2001-01-29 US		
其他公开文献	JP2005500250A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了抑制，调节或诊断铜绿假单胞菌感染的方法。在一个实施方案中，该方法包括用有效量的PcrV抗原接种患者。

P c r Vエピトープマッピング		
すべてのタンパク質はアミノ末端標識GST-P c r V短縮体である。		
アミノ酸	pAbに対する結合性	mAb166に対する結合性
1-294 (全長)	有	有
(C端短縮体)		
1-46	有	無
1-76	有	無
1-134	有	無
1-172	有	無
1-75 + 173-294	有	無
(N端短縮体)		
139-294	有	有
148-294	有	無
159-294	有	無
164-294	有	無
194-294	有	無
261-294	有	無
269-294	有	無
278-294	有	無