明　細　書

発明の名称 ： 抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体

技術分野

[0001] 本発明は、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防薬として有用な物質、並びに緑膿菌感染症の治療及び／又は予防方法に関する。

背景技術

[0002] 緑膿菌は自然環境中に存在する代表的な常在菌の一種であり、免疫力の低下した人における日和見感染症の原因菌としてよく知られる。また、医療関連感染症において分離率と死亡率が高いことから最も問題視される菌種の一つである。分離率は医療関連感染症全体の原因菌として６番目、気管挿管由来の肺炎においては２番目と高率であり、また、死亡率は血流感染では２７．６－４７．９％、気管挿管由来肺炎では４２．１－８７％との報告がある（非特許文献１乃至３）。さらに、緑膿菌は消毒薬や抗生物質に対する抵抗力が元から高い上、後天的に薬剤耐性を獲得したものも多いため、治療に難渋することが多い。緑膿菌に対する抗菌薬としてカルバペネム系、セフェム系、ペニシリン系、キノロン系などが挙げられるが、これらに対する耐性率はそれぞれ２５．３％、１１．２％、１７．５％、３０．７％と高率である（非特許文献１）。特にこれらの抗菌薬複数に耐性を示す多剤耐性菌に有効な抗菌薬がほとんどないため、多剤耐性緑膿菌にも有効性を示す新しい抗緑膿菌薬が求められている。

[0003] 緑膿菌はグラム陰性菌であるため、表層にリポポリサッカライド（ＬＰＳ）を有し、このＬＰＳの外側にＯ抗原と呼ばれる糖鎖構造が存在する。Ｏ抗原は抗原性を有し、また多様であることから菌株の分類法として利用されてきた（非特許文献４、５）。緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ抗原の血清型は一般に２０種あることが知られているが、近年、多剤耐性緑膿菌ではＯ１１抗原を有する株（Ｏ１１株）の割合が高いことが報告されている。日本においては多剤耐性緑膿菌の９９％あるいは約６０％がＯ１１株であったとの報告があり、

また、フランス、ベルギー、チェコ共和国などヨーロッパでも多剤耐性緑膿菌の多くがＯ１１株であったとの報告がある（非特許文献６乃至１１）。

[0004] 抗体は古くから生体内において感染防御に働くことが知られている。緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ抗原に対する抗体は数多く報告されており、オプソニン活性によって動物の感染モデルで治療効果を示すことが報告されている（非特許文献１２乃至１４）。このことから緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する抗体は多剤耐性緑膿菌に対する新薬となることが期待され、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の報告は既にいくつかある（特許文献１、２）。

[0005] 本発明はＯ１１株の緑膿菌をターゲットとした治療用および診断用抗体である。治療用および診断用抗体としては高活性のものが望まれるが、その活性としてオプソニン活性が重要である。また、抗体は抗原特異性が高いことが知られているが、治療用および診断用抗体としてＯ１１株を幅広く網羅できる高カバー率のものが望ましい。本抗体はＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する抗体であり、従来の抗体に比べてオプソニン活性が強く、またカバー率もより高いことからより有用性が高い。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第ＷＯ２００６／０８４７５８号パンフレット

特許文献2：国際公開第ＷＯ２０１１／１０２５５１号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｈｏｓｐ．　Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ．，２９，９９６－１０１１（２００８）

非特許文献2：ＤＡＴＡＭＯＮＩＴＯＲ，ＤＭＨＣ２２８１，　Ｎｏｓｏｃｏｍｉａｌ　ｉｎｆｅｃｔｉｏｎｓ（２００７）

非特許文献3：Ｃｈｅｓｔ，１３９，９０９－９１９（２０１１）

非特許文献4：Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１７，２７３－３０４（１９９０）

非特許文献5：Ｊ．　Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ　Ｒｅｓ．，１２，３２４－３３５

（２００６）

非特許文献6：Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，４５，９７９－９８９（２００７）

非特許文献7：Ｉｎｔｅｒ．Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ，３９，５１８－５２１（２０１２）

非特許文献8：Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，４９，２５７８－２５８３（２０１１）

非特許文献9：Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，６５，８６６－８７１（２０１０）

非特許文献10：Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１６１，２３４－２４２（２０１０）

非特許文献11：ＰＬｏＳ ＯＮＥ，６，ｅ２５６１７（２０１１）

非特許文献12：Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，５７，１７４－１７９（１９８９）

非特許文献13：ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２，２６３－２６８（１９９０）

非特許文献14：Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，６６，４１３７－４１４２（１９９８）

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、緑膿菌に対して優れた抗菌活性を有する物質、及び緑膿菌感染症の治療及び／又は予防剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意、検討を行ったところ、緑膿菌のＬＰＳ Ｏ１１抗原に特異的に結合し、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防効果を有する新規な抗体を取得することに成功し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

（１）緑膿菌のＬＰＳを認識する抗体であって、Ｏ１１抗原に結合し、Ｏ１、Ｏ２、Ｏ３、Ｏ４、Ｏ５、Ｏ６、Ｏ７、Ｏ８、Ｏ９、Ｏ１０、Ｏ１３、Ｏ１４、Ｏ１５、Ｏ１６、Ｏ１７、Ｏ１８、Ｏ１９、Ｏ２０抗原、及びＯ抗原欠損株に結合せず、Ｏ１１臨床分離株に対するカバー率が８５％以上である抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２）Ｏ１１臨床分離株に対するカバー率が９５％以上である、（１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（３）緑膿菌のＬＰＳを認識する抗体であって、Ｏ１１抗原に結合し、Ｏ１、Ｏ２、Ｏ３、Ｏ４、Ｏ５、Ｏ６、Ｏ７、Ｏ８、Ｏ９、Ｏ１０、Ｏ１３、Ｏ１４、Ｏ１５、Ｏ１６、Ｏ１７、Ｏ１８、Ｏ１９、Ｏ２０抗原及びＯ抗原欠損株に結合せず、ＡＴＣＣ　２９２６０で特定される緑膿菌に対するオプソニン活性の５０％増殖阻害最小濃度が１２ｎｇ／ｍＬ以下である抗体又は該抗体の抗原結合断片

（４）ＡＴＣＣ　２９２６０で特定される緑膿菌に対するオプソニン活性の５０％増殖阻害最小濃度が４．１ｎｇ／ｍＬ以下である、（３）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（５）配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、並びに配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体からなる群から選択される少なくともいずれか一つと交差競合することを特徴とする、抗体又は該抗体の抗原結合断片

（６）配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸

残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、並びに配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体からなる群から選択される少なくともいずれか一つが結合するエピトープに結合することを特徴とする、（５）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（７）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号９に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（８）配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（７）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（９）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤ

ＲＨ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１０）配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（９）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１１）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号２６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号２７に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１２）配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１３）Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択さ

れる、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合断片

（１４）ｓｃＦｖであることを特徴とする、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体

（１５）キメラ抗体であることを特徴とする、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１６）ヒト化されていることを特徴とする、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１７）重鎖がヒト免疫グロブリンＧ１重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリンκ軽鎖の定常領域を含む、（１）乃至（１６）のいずれか一つに記載の抗体

（１８）緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を有する抗体又は該抗体の抗原結合断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号５７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ４）　配列番号６３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ５）　配列番号６５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１

乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片

（１９）配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１８）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２０）配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１８）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２１）緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を有する抗体又は該

抗体の抗原結合断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号７７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ４）　配列番号８３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ５）　配列番号８５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミ

ノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２２）配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（２１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２３）配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（２１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片

（２４）（１８）乃至（２３）のいずれか一つに記載の抗体において、カルボキシル基末端側の１乃至数個のアミノ酸が欠失した重鎖を含む抗体

（２５）（１）乃至（２４）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物

（２６）緑膿菌感染症の治療及び／又は予防剤であることを特徴とする、（２５）に記載の医薬組成物

（２７）（１）乃至（２４）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、キノロン系、アミノ配糖体系、ポリミキシン系、リファンピシン、マクロライド系抗菌薬からなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防用医薬組成物

（２８）緑膿菌感染症が、多剤耐性緑膿菌感染に起因する全身感染疾患であることを特徴とする、（２６）又は（２７）に記載の医薬組成物

（２９）緑膿菌感染症が、血流感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎、肺膿瘍、膿胸、慢性気道感染症、腹膜炎、術後感染症、胆嚢炎、胆管炎、眼瞼腫瘍、涙嚢炎、結膜炎、角膜潰瘍、角膜膿瘍、全眼球炎、眼窩感染、尿路感染症、カテーテル感染症、肛門周辺膿瘍、熱傷の二次感染、褥瘡感染症、嚢胞性線維症、リンパ管炎、リンパ節炎、骨髄炎、関節炎、扁桃炎、肝膿瘍、皮膚軟部組織感染症、子宮内感染、子宮付属器炎、子宮旁結合織炎、顎骨周辺の蜂巣炎、又は顎炎であることを特徴とする、（２６）又は（２７）に記載の医薬組成物

（３０）緑膿菌感染症が、肺炎であることを特徴とする、（２６）又は（２７）に記載の医薬組成物

（３１）（１）乃至（２４）に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は（２６）若しくは（２７）に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防方法

（３２）（１）乃至（２４）に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は（２６）に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つ、並びに、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、キノロン系、アミノ配糖体系、ポリミキシン系、リファンピシン、マクロライド系抗菌薬からなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は相前後して投与することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防方法

（３３）緑膿菌感染症が、多剤耐性緑膿菌感染に起因する全身感染疾患であることを特徴とする、（３１）又は（３２）に記載の治療及び／又は予防方法

（３４）緑膿菌感染症が、血流感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎、肺膿瘍、膿胸、慢性気道感染症、腹膜炎、術後感染症、胆嚢炎、胆管炎、眼瞼腫瘍、涙嚢炎、結膜炎、角膜潰瘍、角膜膿瘍、全眼球炎、眼窩感染、尿路感染症、カテーテル感染症、肛門周辺膿瘍、熱傷の二次感

染、褥瘡感染症、嚢胞性線維症、リンパ管炎、リンパ節炎、骨髄炎、関節炎、扁桃炎、肝膿瘍、皮膚軟部組織感染症、子宮内感染、子宮付属器炎、子宮旁結合織炎、顎骨周辺の蜂巣炎、又は顎炎であることを特徴とする、（３３）に記載の治療及び／又は予防方法

（３５）緑膿菌感染症が、肺炎であることを特徴とする（３３）に記載の治療及び／又は予防方法

（３６）（１）乃至（２４）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌感染症の診断剤

（３７）（１）乃至（２４）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌の検出キット

（３８）（１）乃至（２４）のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド

（３９）（３８）に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１）　配列番号５６に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ２）　配列番号５８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ３）　配列番号６０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ４）　配列番号６２に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ５）　配列番号６４に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列

と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ９）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１）　配列番号６６に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２）　配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３）　配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４）　配列番号７２に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号７４に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ｂ９）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド

（４０）配列番号５８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（３９）に記載のポリヌクレオチド

（４１）配列番号６０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（３９）に記載のポリヌクレオチド

（４２）（３８）に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１）　配列番号７６に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ２）　配列番号７８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ３）　配列番号８０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ４）　配列番号８２に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ５）　配列番号８４に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列

と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ９）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１）　配列番号６６に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２）　配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３）　配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４）　配列番号７２に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号７４に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント

な条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ｂ９）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド

（４３）配列番号７８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（４２）に記載のポリヌクレオチド

（４４）配列番号８０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（４２）に記載のポリヌクレオチド

（４５）（３８）乃至（４４）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター

（４６）（３８）乃至（４４）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞

（４７）（４５）に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞

（４８）（４６）又は（４７）に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む（１）乃至（２４）のいずれか一つに記載の抗体の生産方法。

発明の効果

[0010]　本発明によれば、多剤耐性緑膿菌を含む緑膿菌感染に起因する全身感染疾患の緑膿菌感染症の治療剤及び／又は予防剤を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]Ｎｏ．７６抗体の各ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を示した図である。

[図2]＃１Ｇ５抗体の各ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を示した図である。

[図3]＃４Ｃ１２抗体の各ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を示した図である。

[図4]緑膿菌Ｏ１１株に対する結合特異性を示したグラフである。

[図5]緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（静脈内投与）を示したグラフである。

[図6]緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（菌と抗体の混合投与）を示したグラフである。

[図7]緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．３１によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（菌と抗体の混合投与）を示したグラフである。

[図8]緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（静脈内投与）を示したグラフである。

[図9]ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図10]ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図11]ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図12]ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図13]ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図14]ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図15]ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図16]ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図17]ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図18]ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図19]ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図20]ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図21]ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図22]ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図23]ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図24]＃４Ｃ１３抗体の各ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を示した図である。

[図25]緑膿菌Ｏ１１株に対する結合特異性を示したグラフである。

[図26]緑膿菌Ｏ１１臨床分離株に対する結合活性を示したグラフである。

[図27]緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（静脈内投与）を示したグラフである。

[図28]Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａとの競合試験を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] １．定義

本明細書中において、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びｃＲＮＡも含まれるものとする。

[0013] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。

[0014] 本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いて

いる。

[0015] 本明細書中において、「ＲＮＡ画分」とは、ＲＮＡを含んでいる画分をいう。

[0016] 本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0017] 本明細書中において、「ＬＰＳ」は、「リポ多糖」又は「リポポリサッカライド」と同じ意味で用いている。

[0018] 本明細書中において、「血清型」という用語は、緑膿菌の任意の公知の血清型を意味する。

[0019] 本明細書中において、「多剤耐性」とは、カルバペネム（イミペネムまたはメロペネム）、キノロン（シプロフロキサシンまたはレボフロキサシン）、アミノ配糖体（トブラマイシンまたはアミカシン）の３系統全てに耐性を示すことを意味する。それぞれの薬剤の感受性はＣｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ （ＣＬＳＩ）のｂｒｅａｋｐｏｉｎｔｓに基づいて判定した。

[0020] 本明細書中において、「Ｏ１１臨床分離株」とは、Ｏ１１抗原に特異的な市販の緑膿菌群別用免疫血清によって、又はＯ１１抗原特異的プライマーを用いたＰＣＲによって陽性を示す株を意味する。

[0021] 本明細書中において、「医療関連感染（ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）」とは、院内感染（ｎｏｓｏｃｏｍｉａｌ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）又は病院感染（ｈｏｓｐｉｔａｌ－ａｃｑｕｉｒｅｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）とも呼ばれ、医療機関あるいは在宅医療において患者が原疾患とは別に新たにり患した感染症、及び医療従事者等についても医療機関あるいは在宅医療において感染した感染症を意味する。

[0022] 本明細書中における「抗体の抗原結合断片」とは、「抗体の機能性断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還

元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0023] 本明細書における、「エピトープ」とは、特定の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の結合するＬＰＳ　Ｏ１１抗原の部分構造を意味する。Ｏ１１抗原は３つの糖からなる繰り返し構造であるため（Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　Ｒｅｖ．　６３，５２３－５５３（１９９９））、異なる長さの糖鎖を合成し、それらに対する抗体の反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。又、特定の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の結合するＬＰＳ　Ｏ１１抗原の部分立体構造であるエピトープは、Ｘ線結晶構造解析によって前記の抗体と隣接するＬＰＳ　Ｏ１１抗原の構造を特定することによって決定することができる。第一の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の結合する部分糖鎖に第二の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープを有すると判定することができる。また、第一の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合に対して第二の抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体が交差競合する（すなわち、第二の抗体が第一の抗体とＬＰＳ　Ｏ１１抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープを有すると判定することができる。さらに、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗原の中和活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様な活性を有することが期待できる。

[0024] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域（ｈｙｐｅｒ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変

領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0025] 本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社製）中、６８℃でハイブリダイズすること、又は、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７－１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１－２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０　ｍＭ　ＮａＣｌ、１５　ｍＭ　クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することにより同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

[0026] 本明細書において、「１乃至数個」及び「１若しくは数個」なる記載がある場合の「数個」とは、２乃至１０個を示している。好ましくは、１０個以下、より好ましくは、５若しくは６個以下、さらにより好ましくは、２若しくは３個である。

２．ＬＰＳ　Ｏ１１

本発明の抗体が結合する「ＬＰＳ」は、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、脂質及び多糖から構成される物質（糖脂質）である。糖鎖部分は、コア多糖（またはコアオリゴ糖）と呼ばれる部分と、Ｏ抗原（Ｏ側鎖多糖）と呼ばれる部分から構成される。

[0027] 異なる緑膿菌血清型に対して、ＩＡＴＳ（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｎｔｉｇｅｎｉｃ　Ｔｙｐｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ）による型別、及び緑膿菌研究会（Ｊａｐａｎ　Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　Ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ

Ｓｏｃｉｅｔｙ，ＪＰＡＳ）血清型別検討委員会の群別がある。ＩＡＴＳによる型別及びＪＰＡＳによる群別の対応関係を表１に示す。緑膿菌の血清型は、市販の緑膿菌群別用の免疫血清を用いて判別することができる。

[0028] [表1]

ＩＡＴＳ	ＪＰＡＳ
Ｏ１	Ｉ
Ｏ２	Ｂ
Ｏ３	Ａ
Ｏ４	Ｆ
Ｏ５	Ｂ
Ｏ６	Ｇ
Ｏ７	Ｃ
Ｏ８	Ｃ
Ｏ９	Ｄ
Ｏ１０	Ｈ
Ｏ１１	Ｅ
Ｏ１２	Ｌ
Ｏ１３	Ｋ
Ｏ１４	Ｋ
Ｏ１５	Ｊ
Ｏ１６	Ｂ
Ｏ１７	Ｎ
Ｏ１８	－
Ｏ１９	－
Ｏ２０	Ｂ

[0029] 近年、多剤耐性緑膿菌ではＯ１１抗原を有する株（Ｏ１１株）の割合が高いことが報告されている。ＬＰＳ　Ｏ１１血清型の緑膿菌としては、例えば、ＡＴＣＣアクセッション番号２６２９０、３３３５８等が挙げられる。

３．抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の製造

本発明の緑膿菌ＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する抗体は、例えば、ＷＯ２００９／０９１０４８、ＷＯ２０１１／０２７８０８、又はＷＯ２０１２／１３３５７２に記載の方法で得ることができる。すなわち、非ヒト動物を目的抗原で免疫し、免疫成立後の動物からリンパ液、リンパ組織、血球試料又は骨髄由来の細胞を採取し、目的抗原に特異的に結合する非ヒト動物の形質細胞及び／又は形質芽細胞を選択する。得られた形質細胞及び／又は形質芽細胞

から目的抗原に対する抗体遺伝子を採取し、その塩基配列を同定し、同定した遺伝子の塩基配列に基づいて上記抗体又は抗体の断片を得ることができる。また、ヒト感染患者の血液から同様に形質細胞及び／又は形質芽細胞を得ることにより、抗体又は抗体断片を得ることができる。取得された抗体はＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。このようにして得られたモノクローナル抗体の例としては、Ｎｏ．７６、＃１Ｇ５、＃４Ｃ１２、＃４Ｃ１３、＃４Ｃ１３Ｋを挙げることができる。＃４Ｃ１２、＃４Ｃ１３、＃４Ｃ１３Ｋの重鎖は全て完全に共通で、＃４Ｃ１３は＃４Ｃ１２の軽鎖のアミノ酸番号７５のシステインをチロシンに置換した抗体であり、＃４Ｃ１３Ｋは＃４Ｃ１２の軽鎖を＃１Ｇ５の軽鎖に置換した抗体である。

[0030] また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　（１９７５）２５６，ｐ．４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ，Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、ＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。このような方法の具体的な例は、ＷＯ２００９／４８０７２（２００９年４月１６日公開）及びＷＯ２０１０／１１７０１１（２０１０年１０月１４日公開）に記載されている。しかし、モノクローナル抗体を取得する方法は、既に確立された分野に該当し、前記の具体例に限定されるものではない。

[0031] 本発明の抗体には、上記ＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0032] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体

、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１－６８５５，　（１９８４）参照）。Ｎｏ．７６由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号３３の２０乃至４７０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号３１の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、＃１Ｇ５由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号３７の２０乃至４７４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号３５の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、＃４Ｃ１３由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号４１の２０乃至４７０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号３９の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0033] ヒト化抗体としては、ＣＤＲのみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第ＷＯ９０／０７８６１号パンフレット）を挙げることができる。

[0034] Ｎｏ．７６抗体由来のヒト化抗体としては、Ｎｏ．７６の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。なお、Ｎｏ．７６抗体の重鎖可変領域は、配列番号９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＮＹＷＩＮ）、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＤＩＹＰＧＴＳＴＴＮＹＮＥＫＦＫＮ）、及び配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＩＹＹＤＹＤＧＹＹＦＤＹ）を保有している。また、Ｎｏ．７６抗体の軽鎖可変領域は、配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＫＡＳＥＮＶＧＴＳＶＳ）、配列番号６に示されるアミノ酸配列からな

るＣＤＲＬ２（ＧＡＳＮＲＹＴ）、及び配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＧＱＳＹＳＹＰＹＴ）を保有している。これらのＣＤＲのアミノ酸配列は、図１にも記載されている。

[0035] ＃１Ｇ５抗体由来のヒト化抗体としては、＃１Ｇ５の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。なお、＃１Ｇ５抗体の重鎖可変領域は、配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＳＹＷＩＮ）、配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＮＩＹＰＧＳＳＳＩＮＹＮＥＫＦＫＳ）、及び配列番号１９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＴＩＹＮＹＧＳＳＧＹＮＹＡＭＤＹ）を保有している。また、＃１Ｇ５抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＫＡＳＥＮＶＧＮＳＶＳ）、配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＧＡＳＮＲＹＴ）、及び配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＧＱＳＹＳＹＰＹＴ）を保有している。これらのＣＤＲのアミノ酸配列は、図２にも記載されている。

[0036] ＃４Ｃ１２抗体由来のヒト化抗体としては、＃４Ｃ１２の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。なお、＃４Ｃ１２抗体の重鎖可変領域は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＴＹＷＩＮ）、配列番号２６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＮＩＹＰＧＴＲＳＳＮＹＮＥＫＦＫＮ）、及び配列番号２７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＶＹＹＤＨＶＧＹＹＦＤＹ）を保有している。また、＃４Ｃ１２抗体の軽鎖可変領域は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＫＡＳＥＮＶＧＶＳＶＳ）、配列番号２２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＧＡＳＮＲＣＴ）、及び配列番号２３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＧＱＳＹＳＹＰＹＴ）を保有している。これらのＣＤＲのアミノ酸配列は、図３にも記載されている。

[0037] ＃４Ｃ１３抗体由来のヒト化抗体としては、＃４Ｃ１３の６種全てのＣＤ

Ｒ配列を保持し、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。なお、＃４Ｃ１３抗体の重鎖可変領域は、配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＴＹＷＩＮ）、配列番号８７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＮＩＹＰＧＴＲＳＳＮＹＮＥＫＦＫＮ）、及び配列番号８８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＶＹＹＤＨＶＧＹＹＦＤＹ）を保有している。また、＃４Ｃ１３抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１２３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＫＡＳＥＮＶＧＶＳＶＳ）、配列番号１２４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＧＡＳＮＲＹＴ）、及び配列番号１２５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＧＱＳＹＳＹＰＹＴ）を保有している。これらのＣＤＲのアミノ酸配列は、図２４にも記載されている。

＃４Ｃ１３Ｋ抗体由来のヒト化抗体としては、＃４Ｃ１３Ｋの６種全てのＣＤＲ配列を保持し、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。なお、＃４Ｃ１３Ｋ抗体の重鎖可変領域は、配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＴＹＷＩＮ）、配列番号８７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＮＩＹＰＧＴＲＳＳＮＹＮＥＫＦＫＮ）、及び配列番号８８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＶＹＹＤＨＶＧＹＹＦＤＹ）を保有している。また、＃４Ｃ１３Ｋ抗体の軽鎖可変領域は、＃１Ｇ５抗体の軽鎖可変領域と完全に共通であり、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＫＡＳＥＮＶＧＮＳＶＳ）、配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＧＡＳＮＲＹＴ）、及び配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＧＱＳＹＳＹＰＹＴ）を保有している。これらのＣＤＲのアミノ酸配列は、図２４及び図２にも記載されている。

[0038]　また、さらに各ＣＤＲ中の１乃至３個のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したＣＤＲ改変ヒト化抗体も、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を持つ限り、本発明の抗体に含まれる。

[0039]　＃１Ｇ５抗体由来のヒト化抗体の実例としては、配列表の配列番号５７に

示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号６３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、又は配列番号６５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、又は配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0040] 好適な組合せとしては、配列番号５７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号６３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域

配列を含む軽鎖からなる抗体、又は配列番号６５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0041] より好適な組合せとしては、配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、又は配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0042] ＃４Ｃ１３Ｋ抗体由来のヒト化抗体の実例としては、配列表の配列番号７７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号８３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、又は配列番号８５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、又は配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を

含む軽鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0043] 好適な組合せとしては、配列番号７７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、又は配列番号８５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0044] より好適な組合せとしては、配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体、又は配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列を含む重鎖及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0045] 本発明の抗体としては、さらに、ヒト抗体を挙げることができる。抗ＬＰ

Ｓ　Ｏ１１ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗ＬＰＳ　Ｏ１１ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，　Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，　Ｙ．，Ｍａｔｓｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ　Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

[0046] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ　ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクターなどを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせることにより作り出すことができる。

[0047] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはＣＨＯ細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0048] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（Ｗｏｒｍｓｔｏｎｅ，ｌ．Ｍ．ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｖ

estigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431等参照。) も知られている。

[0049] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，（９），ｐ．１１０５－１１１６）を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定することができる。抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる（ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９３／０６２１３、ＷＯ９３／１１２３６、ＷＯ９３／１９１７２、ＷＯ９５／０１４３８、ＷＯ９５／１５３８８、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３－４５５、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５－１１１６）。

[0050] 上記の抗体は、抗原に対する結合性、オプソニン活性、補体依存的殺菌活性及び／又は凝集活性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。抗原に対する結合性は、実施例３に示されたｗｈｏｌｅ ｃｅｌｌ ＥＬＩＳＡ法等によって評価することができ、これにより、当該抗体が結合活性を示す緑膿菌の血清型の範囲を判定することができる。オプソニン活性は、食細胞に貪食された菌の割合あるいは量を実施例１に示された生菌数測定の方法あるいは菌を蛍光ラベルで処理し、フローサイトメトリー等で定量化する方法等によって評価できる。補体依存的殺菌活性は補体と抗体により殺菌される

菌量を生菌数測定によって求める方法等によって評価できる。また、凝集活性は、段階的に希釈した抗体の菌体に対する凝集能を検出し、ＩｇＧ量当たりの凝集価として評価することができる。また、全身感染及び肺感染に対する抗菌活性は、実施例４に示された方法等によって評価できる。

[0051] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる方法である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ． ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0052] また、抗体の重鎖及び軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）を取得する方法も知られている（Ｌｅｅ，Ｈ－Ｓ，ｅｔ．ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９９）３６，ｐ．６１－７１；Ｓｈｉｒｒｍａｎｎ，Ｔ．ｅｔ．ａｌ．，ｍＡｂｓ（２０１０），２，（１）ｐ．１－４）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であっても良い。このような抗体は、単一ドメイン抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ：ｓｄＡｂ）または

ナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）と呼ばれており、実際にラクダ又はラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている（Ｍｕｙｌｄｅｍａｎｓ Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９４）７（９），１１２９－３５，Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ Ｃ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６３（６４２８）４４６－８）。上記の抗体は、本発明における抗体の抗原結合断片の一種と解釈することも可能である。

[0053] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節することによって、オプソニン活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ２０００／６１７３９、ＷＯ２００２／３１１４０等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0054] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、（１）哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質

転換により導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することにより抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

[0055] 本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１，ＩｇＡ２）、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ又はＩｇＭ、さらに好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ３を挙げることができる。

[0056] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の抗原結合断片又はその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全て又は一部を保持している断片を抗体の抗原結合断片と呼ぶことができる。抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、オプソニン活性及び補体依存的殺菌活性を挙げることができる。本発明における抗体の抗原結合断片が保持する機能は、緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性であり、好ましくは緑膿菌ＬＰＳ　Ｏ１１株に対するオプソニン活性である。

[0057] 例えば、抗体の断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又は重鎖及び軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の断片に含まれる。

[0058] さらに、本発明の抗体は少なくとも２種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は２種類の抗原に

結合するものであるが（即ち、二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ））、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、３種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0059] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、又はそのような抗体の断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）２二重特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は２種類の抗体の重鎖と軽鎖（ＨＬ対）を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８３）３０５，ｐ．５３７－５３９）。

[0060] 本発明の抗体は一本鎖抗体（ｓｃＦｖとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，１１３（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ及びＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．２６９－３１５（１９９４）、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，ｐ．１１２６－１１３６）。また、２つのｓｃＦｖをポリペプチドリンカーで結合させて作製されるＢｉｓｃＦｖ断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0061] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、米国特許第５，２６０，２０３号、米国特許第５，０９１，５１３号、米国特許第５，４５５，０３０号等を参照）。このｓｃＦｖにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８８），８５，ｐ．５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。可変領域を連結するポリペプチド

リンカーとしては、例えば１２～１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0062] ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、前記抗体の重鎖又は重鎖可変領域をコードするＤＮＡ、及び軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするＤＮＡのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてＰＣＲ法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡ、及びその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0063] また、一旦ｓｃＦｖをコードするＤＮＡが作製されると、それらを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってｓｃＦｖを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0064] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、１種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、ＩｇＧ ＣＨ３ドメインと２つのｓｃＦｖとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスーターン‐ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0065] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、ＣＤＲが異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る（ＷＯ２００４／０６１１０４参照）。

[0066] 本発明の抗体は、上記の抗体の重鎖及び／又は軽鎖と比較して８０％乃至９９％との同一性を有する抗体であってもよい。上記の重鎖アミノ酸配列及

び軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の抗原結合能、オプソニン作用及び／又は補体依存的殺菌作用を有する抗体を選択することが可能である。このような相同性は、一般的には８０％以上の相同性であり、好ましくは９０％以上の相同性であり、より好ましくは９５％以上の相同性であり、最も好ましくは９９％以上の相同性である。また、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の各種作用を有する抗体を選択することが可能である。置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基数は、一般的には１０アミノ酸残基以下であり、好ましくは５乃至６アミノ酸残基以下であり、より好ましくは２乃至３アミノ酸残基以下であり、最も好ましくは１アミノ酸残基である。

[0067] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化やオプソニン作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組み合わせたもの

であっても良い。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0068] 二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２．２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ, Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．, Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ, Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｆｆｅｒ, Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ, Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ, Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ, ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），「Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ」, Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍは、インターネットでｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔにアクセスすることによっても使用することができる。なお、上記のＢｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍによってＩｄｅｎｔｉｔｙ（又はＩｄｅｎｔｉｔｉｅｓ）及びＰｏｓｉｔｉｖｉｔｙ（又はＰｏｓｉｔｉｖｉｔｉｅｓ）の２種類のパーセンテージの値が計算される。前者は相同性を求めるべき二種類のアミノ酸配列の間でアミノ酸残基が一致した場合の値であり、後者は化学構造の類似したアミノ酸残基も考慮した数値である。本明細書においては、アミノ酸残基が一致している場合のＩｄｅｎｔｉｔｙ（同一性）の値を持って相同性の値とする。

[0069] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0070] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの（Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合してい

る物を挙げることができる（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）。

[0071] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｃｏｕｒｓｅ　Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ　Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ　ｅｔ　ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ　Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｄ　Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

[0072] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

[0073] これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0074] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。

[0075] 例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ　Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。

[0076] また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

４．抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体を含有する医薬

上述の「３．抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体は、オプソニン作用（オプソニン食作用傷害作用、Ｏｐｓｏｎｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ　ｋｉｌｌｉｎｇ（ＯＰＫ））及び／又は補体依存的殺菌作用（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｋｉｌｌｉｎｇ（ＣＤＫ））を示すことから、医薬として、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防剤として用いることができる。

[0077] 抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体で治療及び／又は予防可能な緑膿菌感染症としては、緑膿菌感染に起因する全身感染疾患を挙げることができ、好ましくは、多剤耐性緑膿菌感染に起因する全身感染疾患である。緑膿菌感染に起因する全身感染疾患としては、例えば、血流感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎、肺膿瘍、膿胸、慢性気道感染症、腹膜炎、術後感染症、胆嚢炎、胆管炎、眼瞼腫瘍、涙嚢炎、結膜炎、角膜潰瘍、角膜膿瘍、全眼球炎、眼窩感染、尿路感染症、カテーテル感染症、肛門周辺膿瘍、熱傷の二次感染、褥瘡感染症、嚢胞性線維症、リンパ管炎、リンパ節炎、骨髄炎、関節炎、扁桃炎、肝膿瘍、皮膚軟部組織感染症、子宮内感染、子宮付属器炎、子宮旁結合織炎、顎骨周辺の蜂巣炎、顎炎などが挙げられ、好ましくは肺炎であるが、緑膿菌感染に起因する全身感染疾患であれば、これらに限定されない。

[0078] 上記の医薬としての抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の例として、＃１Ｇ５抗体又は＃４Ｃ１３Ｋ抗体から「３．抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の製造」に記載の方法によって作製されたキメラ抗体又はヒト化抗体を挙げることができる。また、＃１Ｇ５抗体及び／又は＃４Ｃ１３Ｋ抗体と同じエピトープを有するキメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体も医薬として使用可能である。ある抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体が、＃１Ｇ５抗体及び／又は＃４Ｃ１３Ｋ抗体と同じエピトープを持つことは、ＬＰＳ　Ｏ１１抗原の特定の糖鎖に対してこれらの抗体が共通に結合するか否かを観察することによって確認できる。また、ある抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体が、ＬＰＳ　Ｏ１１抗原との結合において＃１Ｇ５抗体及

び／又は＃４Ｃ１３Ｋ抗体と競合するのであれば、これらの抗体が共通のエピトープを持つと判定することができる。

[0079] Ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体による抗菌活性は、例えば、緑膿菌ＡＴＣＣ ２９２６０に対するオプソニン活性または補体依存的殺菌活性を測定することで確認できる。ＡＴＣＣ ２９２６０株は最も有名なＯ１１株の一つであり、ＡＴＣＣより取得した。この株はルイスビル大学のＰ．Ｖ． ＬｉｕによってＡＴＣＣに寄託されたものである（Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．，１２８：５０６－５１３（１９７３））。この株はＩｎｓｔｉｔｕｔｅ ＰａｓｔｅｕｒからＣＩＰ １０２９６７として、あるいはＴｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｐｕｂｌｉｃ ＨｅａｌｔｈからＣＮＣＴＣ ５９９７としても入手可能である。

[0080] Ｉｎ ｖｉｖｏでの実験動物を利用した抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体の緑膿菌感染症に対する治療又は予防効果は、例えば、マウスあるいはラットにおける肺感染、全身感染、大腿部感染、熱傷感染モデルに抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体を静脈内投与し、感染部位の生菌数の変化あるいは生存率を測定することで確認することができる。

[0081] このようにして得られた抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体は、医薬として、特に血流感染、肺炎、慢性気道感染症、敗血症、腹膜炎、皮膚軟部組織感染症、熱傷の二次感染等の緑膿菌感染症の治療又は予防を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。

[0082] 本発明の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体は、緑膿菌のＬＰＳを認識する抗体であって、Ｏ１１抗原に結合し、Ｏ１、Ｏ２、Ｏ３、Ｏ４、Ｏ５、Ｏ６、Ｏ７、Ｏ８、Ｏ９、Ｏ１０、Ｏ１３、Ｏ１４、Ｏ１５、Ｏ１６、Ｏ１７、Ｏ１８、Ｏ１９、Ｏ２０抗原、及びＯ抗原欠損株に結合しない。

[0083] 本発明の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体は、Ｏ１１臨床分離株に対するカバー率、すなわち抗体が結合できる株の割合が８５％以上であり、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましくは１００％である。

[0084] また、本発明の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体は、ＡＴＣＣ ２９２６０で特定さ

れる緑膿菌に対するオプソニン活性の５０％増殖阻害最小濃度が１２ｎｇ／ｍＬ以下であり、好ましくは４．１ｎｇ／ｍＬ以下であり、より好ましくは１．４ｎｇ／ｍＬ以下である。

[0085] 抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体は、一つの例としては、緑膿菌感染症の治療又は予防に対しては該抗体単独で、あるいは少なくとも一つの他の感染症治療剤と併用して投与することができる。また一つの例として、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体は治療上有効な量の治療剤と併用して投与することができる。抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体と併用して投与できる他の感染症治療剤としては、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、キノロン系、アミノ配糖体系、ポリミキシン系、リファンピシン、マクロライド系抗菌薬等を挙げることができるがこれらに限定されない。

[0086] ペニシリン系抗菌薬としては、ピペラシリン、ピペラシリン／タゾバクタム、チカルシリン、チカルシリン／クラブラン酸等が挙げることができ、好ましくはピペラシリンまたはピペラシリン／タゾバクタムである。

[0087] セフェム系抗菌薬としては、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフタジジム、セフェピム、セフォゾプラン等が挙げることができ、好ましくはセフタジジムまたはセフェピムである。

[0088] カルバペネム系抗菌薬としては、イミペネム、パニペネム、メロペネム、ドリペネム等が挙げることができ、好ましくはメロペネムまたはドリペネムである。

[0089] モノバクタム系抗菌薬としては、アズトレオナム、カルモナム等が挙げることができ、好ましくはアズトレオナムである。

[0090] キノロン系抗菌薬としては、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、オフロキサシン、モキシフロキサシン、ガチフロキサシン、シタフロキサシン等が挙げることができ、好ましくはシプロフロキサシンまたはレボフロキサシンである。

[0091] アミノ配糖体系抗菌薬としては、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、アルベカシン等が挙げることができ、好ましくはトブラマイシンあ

るいはアミカシンである。

[0092] ポリミキシン系抗菌薬としては、ポリミキシン、コリスチン等が挙げることができる。

[0093] マクロライド系抗菌薬としては、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン等が挙げることができ、好ましくはアジスロマイシンである。

[0094] 緑膿菌感染症の状態やどの程度の治療及び／又は予防を目指すかによって、２、３あるいはそれ以上の他の治療剤を投与することもできるし、それらの他の治療剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することができる。他の治療剤と抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することもできる。また、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体と他の治療剤を別々の製剤に封入して同時に投与することもできる。さらに、他の薬剤と抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体を相前後して別々に投与することもできる。すなわち、他の治療剤を投与した後に抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与するか、あるいは抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与した後に他の治療剤を投与しても良い。遺伝子治療において投与する場合には、蛋白質性の感染症治療剤の遺伝子と抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の遺伝子は、別々のあるいは同じプロモーター領域の下流に挿入することができ、別々のあるいは、同じベクターに導入することができる。

[0095] 抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体、あるいはそのフラグメントに対し感染症治療剤を結合させることにより、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６記載の標的型薬物複合体を製造することができる。この目的には、抗体分子のほか、ＬＰＳ　Ｏ１１抗原の認識性を完全消失していない限り、いずれの抗体フラグメントも適用可能であるが、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ等のフラグメントを例として挙

げることができ、本発明においても同様に、抗体及び該フラグメントを使用することができる。抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体又は該抗体のフラグメントと感染症治療剤との結合様式は、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３等に記載される種々の形態があり得る。すなわち、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体と感染症治療剤が化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在して結合される様式や、適当な薬物担体を介在して結合される様式を挙げることができる。薬物担体の例としては、リポソームや水溶性高分子を挙げることができる。これら薬物担体が介在される様式としては、より具体的には、感染症治療剤がリポソームに包含され、該リポソームと抗体とが結合した様式、及び、感染症治療剤が水溶性高分子（分子量１０００乃至１０万程度の化合物）に化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在させて結合され、該水溶性高分子に抗体が結合した様式、を例として挙げることができる。抗体（又は該フラグメント）と感染症治療剤、リポソーム及び水溶性高分子等の薬物担体との結合は、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３に記載の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。感染症治療剤のリポソーム

への包含は、Ｄ．Ｄ．Ｌａｓｉｃ「Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｐｈｙｓｉｃｓ ｔｏ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｂ．Ｖ．， Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（１９９３）等に記載の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。感染症治療剤の水溶性高分子への結合は、Ｄ．Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３記載の方法等の当業者周知の方法により、実施することができる。抗体（又は該フラグメント）と蛋白質性の感染症治療剤（又は該フラグメント）との複合体は、上記の方法のほか、遺伝子工学的に、当業者周知の方法により作製することができる。

[0096] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

[0097] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体と治療及び／又は予防に有効な量の少なくとも一つの感染症治療剤と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

[0098] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

[0099] 本発明の医薬組成物は、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リ

ン酸、、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリス－塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０やポリソルベート８０等のポリソルベート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の重量に対して０．０１～１００倍、特に０．１～１０倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0100] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓバッファー、ｐＨ４．０－５．５の酢酸バッファー、ｐＨ３．０－６．２のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物には抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体を含む医薬組成物並びに、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体及び少

なくとも一つの感染症治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体を含む医薬組成物並びに、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体及び少なくとも一つの感染症治療剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0101] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する親和性、即ち、ＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する解離定数（Ｋｄ値）に対し、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、ヒトへの投与量を少なくしても薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体をヒトに対して投与する際には、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇを１～１８０日間に１回投与すればよい。

[0102] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。

[0103] 本発明の抗体は、緑膿菌の細胞表面に露出するＬＰＳと結合することから、緑膿菌感染症の診断剤として用いることもできる。

[0104] 本発明の抗体を診断剤として調剤するには、合目的な任意の手段を採用して任意の剤形でこれを得ることができる。例えば腹水、目的抗体を含む培養液、または精製した抗体についてその抗体価を測定し、適当にＰＢＳ（生理食塩を含むリン酸緩衝液）等で希釈した後、０．１％ナトリウムアジド等を防腐剤として加える。又はラテックス等に本発明の抗体を吸着させたものも抗体価を求め適当に希釈し、防腐剤を添加して用いる。この場合のラテックスとしては、適当な樹脂材料、例えば、ポリスチレン、ポリビニルトルエン、ポリブタジエン等のラテックスが挙げられる。

[0105] 本発明によれば、本発明の抗体を用いる緑膿菌感染の診断方法が提供され

る。本発明の診断方法は、緑膿菌感染のおそれのあるヒトを含む哺乳動物から喀痰、肺洗浄液、膿、涙、血液、尿等の生体試料を採取し、次いで、採取した試料と本発明の抗体とを接触させ、抗原抗体反応が生じたか否かを判断することにより実施することができる。

[0106] 本発明によれば、緑膿菌の存在を検出するためのキットであって、本発明の抗体を少なくとも含んでなるキットが提供される。

[0107] 本発明の抗体は、標識したものであってもよい。この検出用キットは抗原抗体反応を検出することにより緑膿菌の存在を検出する。

[0108] したがって本発明の検出キットは、所望により、抗原抗体反応を実施するための種々の試薬、例えばＥＬＩＳＡ法等に用いる２次抗体、発色試薬、緩衝液、説明書、及び／又は器具等をさらに含むことができる。

実施例

[0109] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓより１９８９年に発刊）に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

[0110] ［実施例１］抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体のスクリーニング

[0111] １）－１ 免疫

Ｍｕｅｌｌｅｒ Ｈｉｎｔｏｎ Ａｇａｒ（ＭＨＡ、Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ）で培養した緑膿菌ＡＴＣＣ ２９２６０を生食に懸濁し、ＩＣＲマウス（チャールズリバー）の腓腹筋に１０－１１日おきに５回免疫した。最終免疫６日後に膝下リンパ節を採取し、セルストレーナー（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ）で細胞を個々に分離し、ＲＰＭＩ１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ

）で洗浄した後、セルバンカー（十慈フィールド株式会社）に懸濁して－８０℃で保存した。

[0112] １）－２　モノクローナル抗体の取得

ＷＯ２００９／０９１０４８、ＷＯ２０１１／０２７８０８、ＷＯ２０１２／１３３５７２、ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１１，３９（２０１１）、及びＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１１，７５（２０１１）に記載の方法に準じて実施した。

[0113] １）－２－１　抗体産生細胞の単離

免疫マウスのリンパ節から採取した細胞を０．５％ＢＳＡ／２ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳで懸濁し、ａｌｌｏｐｈｙｃｏｃｙａｎｉｎ標識抗マウスＣＤ１３８抗体（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を添加して４℃で１５分間インキュベートした。その後、ＲＰＭＩ１６４０で細胞を洗浄し、ＥＲ－Ｔｒａｃｋｅｒ　Ｂｌｕｅ－Ｗｈｉｔｅ　ＤＰＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加し、遮光下にて５分間反応させた。細胞をＰＢＳに懸濁し、ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）のセルソーターを用いてダブルポジティブとなる細胞を個々に分離した。

[0114] １）－２－２　ｃＤＮＡ合成

セルソーターにより個々に分離された細胞をオリゴｄＴ２５が結合した磁気ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　ｍＲＮＡ　ＤＩＲＥＣＴ　Ｋｉｔ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の入った細胞溶解液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、２５０ｍＭ　ＬｉＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８）、０．５％ドデシル硫酸Ｌｉ（ＬｉＤＳ）、２．５ｍＭ　ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ（ＤＴＴ））で溶解し、ｍＲＮＡを磁気ビーズに結合させた。次に磁気ビーズをｍＲＮＡ洗浄溶液Ａ（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、０．１５Ｍ　ＬｉＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％　ＬｉＤＳ、０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）とｃＤＮＡ合成用溶液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　$MgCl_2$、５ｍＭ　ＤＴ

T、０．５mM dNTP、０．２% TritonX－１００、４８unit RNase inhibitor（Invitrogen））で1回ずつ洗浄した後、４８０unit SuperScriptIII Reverse Transcriptase（Invitrogen）を加えたcDNA合成用溶液でcDNA合成を行った。続いて3’テーリング反応溶液（５０mM リン酸カリウム、４mM $MgCl_2$、０．５mM dGTP、０．２% TritonX－１００、４８unit RNase inhibitor（Invitrogen））で洗浄した後、４８０unit Terminal Transferase, recombinant（Roche）を加えた反応溶液で3’テーリング反応を行った。

[0115] １）－２－３ マウス重、軽鎖可変領域遺伝子断片の増幅

磁気ビーズをTE溶液（１０mM Tris－HCl（pH７．５）、１mM EDTA、０．１% TritonX－１００）にて洗浄後、5’－RACE PCR法を用いてマウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子の増幅を行った。始めに、磁気ビーズをPCR反応溶液（０．２μM プライマー、０．２mM dNTP、０．１unit PrimeSTAR HS DNA Polymerase（TAKARA））に移し、９４℃３０秒－６８℃９０秒の反応を３５サイクル行った（１st PCR）。次に１st PCR産物を１０倍希釈し、これを鋳型に１st PCRと同条件でマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子の可変領域をそれぞれ別々に増幅した（２nd PCR）。各プライマーセットは下記の通り。

１st PCRプライマーセット

5’－cggtaccgcgggcccgggatccccccccccccccdn－3’（AP３dC－S）（配列番号８９）

5’－accytgcatttgaactccttgcc－3’（mlgγRT１ １１１１－AS）（配列番号９０）

5’－actgccatcaatcttccacttgaca－3’（mlgκ １st ５８９－AS）（配列番号９１）

２ｎｄ　ＰＣＲプライマーセット（重鎖）

５’－ｃｔｔｃｇａａｔｔｃｔｇｃａｇｔｃｇａｃｇｇｔａｃｃｇｃｇｇｇ
ｃｃｃｇｇｇａ－３’（ＭＣＳ－ＡＰ３－Ｓ）（配列番号９２）

５’－ｃｔｇｇａｃａｇｇｇａｔｃｃａｇａｇｔｔｃｃａ－３’（ｍＩｇγ
３ｒｄ　６５６Ｔ－ＡＳ）（配列番号９３）

２ｎｄ　ＰＣＲプライマーセット（軽鎖）

５’－ｃｔｔｃｇａａｔｔｃｔｇｃａｇｔｃｇａｃｇｇｔａｃｃｇｃｇｇｇ
ｃｃｃｇｇｇａ－３’（ＭＣＳ－ＡＰ３－Ｓ）（配列番号９２）

５’－ａｃｔｇａｇｇｃａｃｃｔｃｃａｇａｔｇｔｔａａｃｔ－３’（ｍＩ
ｇκ３ｒｄ　５２５－ＡＳ）（配列番号９４）

[0116] １）－２－４　マウスＩｇＧ２ａあるいはヒトＩｇＧ１定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片およびマウス軽鎖定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片の作製

マウスＩｇＧ２ａあるいはヒトＩｇＧ１定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片およびマウス軽鎖定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片はそれぞれ配列番号１－３に示すプラスミドｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａ、ｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａ－ｈＩｇＧ１、ｐＪＯＮ　ｍＩｇκを鋳型にそれぞれのプライマーセットでＰＣＲを実施して増幅し、ＤｐｎＩ（Ｒｏｃｈｅ）処理して得た。ＰＣＲは０．４ｎｇ／ｍＩ　ｐＪＯＮをテンプレートに０．２ｍＭ　ｄＮＴＰ、０．２μＭ　プライマー、２０ｕｎｉｔ　ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅの反応溶液で９４℃４０秒－６５℃４０秒－７２℃３０秒の反応を２５サイクル行った。

ｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａおよびｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａ－ｈＩｇＧ１用プライマーセット

５’－ｇｃｃｔｇｇｔｃａａｇｇｇｃｔａｔｔｔｃｃｃｔｇａｇ－３’（ｍＩｇＧ　ｊｏｉｎｔ　ＰＣＲ－Ｓ）（配列番号９５）

５’－ｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇａｔｃｃｃｇｇ－３’（ｐｏＩｙＧ－ＡＳ）（配列番号９６）

ｐＪＯＮ　ｍＩｇκ用プライマーセット

５’－ｃｔｇｔａｔｃｃａｔｃｔｔｃｃｃａｃｃａｔｃｃａｇｔ－３’（ｍＩｇκ　ｊｏｉｎｔ　ＰＣＲ－Ｓ）（配列番号９７）

５’－ｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇｇａｔｃｃｃｇｇ－３’（ｐｏｌｙＧ－ＡＳ）（配列番号９６）

１）－２－５　マウスあるいはヒトキメラ化免疫グロブリン線上化発現ベクターの作製

２ｎｄ　ＰＣＲ産物にＴｅｒｍｉｎａｌ　Ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ，　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ（Ｒｏｃｈｅ）を１６ｕｎｉｔ加え、３７℃にて３０分反応させ、その後９４℃にて５分間加熱することで酵素反応を停止させた。調製した３’端ポリヌクレオチド付加マウス重鎖可変領域遺伝子溶液に、マウスＩｇＧ２ａあるいはヒトＩｇＧ１定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片、０．２μＭ　プライマー、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰを加え、０．１ｕｎｉｔ　ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを用いて９４℃３０秒－７０℃４分の反応を５サイクル、引き続き、９４℃３０秒－６０℃３０秒－７２℃１分の反応を３０サイクル行うことでマウス重鎖あるいはヒトキメラ化重鎖遺伝子発現ユニットを作製した。同様に、マウス軽鎖可変領域遺伝子溶液に、マウス軽鎖定常領域遺伝子連結用二本鎖ＤＮＡ断片を加えて反応を行い、マウス軽鎖遺伝子発現ユニットを作製した。用いたプライマーは下記の通り。

連結用プライマーセット

５’－ａｇａｇａａａｃｃｇｔｃｔａｔｃａｇｇｇｃｇａｔｇｇｃ－３’（ｍｉｎｉＣＭＶ　ｆ１－Ｓ）（配列番号９８）

５’－ａｇａｇａｃｃｃｔｔｔｇａｃｇｔｔｇｇａｇｔｃｃａｃｇ－３’（ｍｉｎｉＣＭＶ　ｆ１－ＡＳ）（配列番号９９）

１）－２－６　抗体遺伝子の発現

上記の実験で増幅された全長のマウス重鎖またはヒトキメラ重鎖とマウス軽鎖遺伝子発現ユニットをＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉ

ｔｒｏｇｅｎ）を用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞に遺伝子導入し、３７℃、５％CO_2下で４日間培養することで抗体培養上清を得た。

[0117] １）－３　モノクローナル抗体のスクリーニング

１）－３－１　抗体濃度の測定

Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ａ　ＥＬＩＳＡ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ　Ｓｅｔ（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）またはＨｕｍａｎ　ＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ　Ｓｅｔ（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いて測定した。方法は添付のマニュアルに準じて行った。すなわち、Ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｐｕｒｉｆｉｅｄ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ａ　Ｃｏａｔｉｎｇ　ＡｎｔｉｂｏｄｙまたはＡｆｆｉｎｉｔｙ　ｐｕｒｉｆｉｅｄ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ－Ｆｃ　Ｃｏａｔｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｙを０．０５ＭＣａｒｂｏｎａｔｅ－Ｂｉｃａｒｂｏｎａｔｅ（ｐＨ９．６）で１０１倍希釈し、１００μｌをｗｅｌｌに添加して室温で１時間固相化した。１５０μｌの０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０添加Ｔｒｉｓ　ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓａｌｉｎｅ（ＴＢＳ；Ｔｗｅｅｎ２０添加ＴＢＳはＴＢＳＴ）で３回洗浄し、２００μｌの１％ＢＳＡ／ＴＢＳをｗｅｌｌに添加して０．５－２時間ブロッキングした。各抗体培養上清あるいは精製抗体を、原液あるいは必要に応じて１％ＢＳＡ／ＴＢＳＴで希釈し、１００μｌをｗｅｌｌに添加し、室温で１時間反応させた。ＴＢＳＴで３回洗浄し、５００００倍希釈したＨＲＰ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ａ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙまたは１００００００倍希釈したＨＲＰ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ－Ｆｃ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙを１００μｌ／ｗｅｌｌ添加し、１時間反応させた。ＴＢＳＴで３回洗浄し、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　ＥＬＩＳＡ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｋ．Ｋ．）を添加し、添加直後に発光をＡＲＶＯ　１４２０マルチラベルカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅ

ｌｍｅｒ）で測定した。キット添付の標準品を用いて検量線を求め、濃度を算出した。

[0118] １）－３－２　オプソニン活性測定

測定用バッファーとして０．１％ｇｅｌａｔｉｎ／１％ＦＢＳ／Ｈａｎｋ‘ｓ　ｂａｌａｎｃｅｄ　ｓａｌｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（オプソニンバッファー）を調製した。エフェクター細胞としてＨＬ６０を０．８％Ｎ，Ｎ－Ｄｉｍｅｔｈｙｌｆｏｒｍａｍｉｄｅを添加した１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で５または６日間培養し、好中球様分化ＨＬ６０をオプソニンバッファーで調製した。ターゲット菌としてＭＨＡで培養した緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０をオプソニンバッファーで懸濁して調製した。補体としてＢａｂｙ　Ｒａｂｂｉｔ　Ｓｅｒｕｍ（Ｃｅｄｅｒｌａｎｅ）を氷冷蒸留水で溶解して調製した。菌液（最終濃度２×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ）と抗体培養上清あるいは精製抗体を混合し、４℃で３０分間静置した後、調製した好中球用分化ＨＬ６０（最終濃度４×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ）と補体（最終濃度１０％）を添加し、３７℃、５％CO_2下で緩やかに撹拌しながら１時間培養した。培養後、各サンプルをＭＨＡに塗沫し、翌日にコロニー数をカウントした。抗体非添加のコントロールと比較して、５０％増殖抑制効果を示したサンプルを活性ありと判定した。

[0119] １）－３－３　ＣＤＲ配列の決定

１）－２－３で得たマウス重、軽鎖可変領域遺伝子産物をテンプレートとして下記シーケンスプライマーでシーケンスを確認した。シーケンス解析は遺伝子配列解析装置Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３７３０ｘｌ　ＤＮＡ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて実施した。得られた配列をもとにＡｎｄｒｅｗ　Ｃ．Ｒ．　ＭａｒｔｉｎらのＡｂｙｓｉｓデータベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／＃ｃｄｒｉｄ）に従って、ＣＤＲ配列を決定した。

シーケンスプライマー（重鎖用）

５’－ａｃａｃｃｇｃｔｇｇａｃａｇｇｇａｔｃｃａｇａｇ－３’（ｍｌｇ

Ｇ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）（配列番号１００）

シーケンスプライマー（軽鎖用）

５’－ｇｔａｇａａｇｔｔｇｔｔｃａａｇａａｇｃａｃａｃ－３’（ｍｌｇκ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）（配列番号１０１）

[0120] １）－３－４　モノクローナル抗体の選抜

以上のスクリーニングからオプソニン活性が強く、ＣＤＲ配列がユニークな抗体培養上清サンプルＮｏ．７６、＃１Ｇ５、＃４Ｃ１２を見出した。Ｎｏ．７６はｐＪＯＮ　ｍｌｇＧ２ａとｐＪＯＮ　ｍｌｇκを、＃１Ｇ５と＃４Ｃ１２はｐＪＯＮ　ｍｌｇＧ２ａ－ｈｌｇＧ１とｐＪＯＮ　ｍｌｇκをそれぞれ用いて作製した抗体である。それぞれの重鎖と軽鎖の可変領域とＣＤＲのアミノ酸配列を配列番号４－２７に示した。配列表の配列番号２０に示される＃４Ｃ１２の軽鎖はアミノ酸番号７５にシステインを含むが、チロシンに置き換えたものを「＃４Ｃ１３」と命名した。また、＃４Ｃ１２の重鎖と＃１Ｇ５の軽鎖を組み合わせたものを「＃４Ｃ１３Ｋ」と命名した。＃４Ｃ１３Ｋは１）－２－５で作製された＃４Ｃ１２のヒトキメラ化重鎖遺伝子発現ユニットおよび＃１Ｇ５のマウス軽鎖遺伝子発現ユニットを１）－２－６の方法に従って、ＨＥＫ２９３Ｔで発現させた。＃１Ｇ５と＃４Ｃ１３ＫはＰｒｏｔｅｉｎＧ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で精製し、それぞれ「ｃ＃１Ｇ５Ｍ」、「ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ」と命名した。抗体濃度は１）－３－１の方法で算出した。

[0121] ［実施例２］　ヒトキメラ化抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体およびＭｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、ヒトｌｇＧ１タイプ１ＢＯ１１（１ＢＯ１１　ｈｌｇＧ１）、マウスｌｇＧ２ａタイプＮｏ．７６（Ｎｏ．７６　ｍｌｇＧ２ａ）の調製

[0122] ２）－１　キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫの構築

プラスミドｐｃＤＮＡ３．３-ＴＯＰＯ／ＬａｃＺ（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を制限酵素Ｘｂａｌ及びＰｍｅｌで消化して得られる約５．４ｋｂのフラグメントと、配列番号２８に示すヒト軽鎖分泌シグナル、及びヒト軽鎖定

常領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて結合して、ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを作製した。

[0123] ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを鋳型として、下記プライマーセットでＰＣＲを行い、得られた約３．８ｋｂのフラグメントをリン酸化後セルフライゲーションすることによりＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、及びヒト軽鎖定常領域を持つ、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを構築した。

プライマーセット

５’－ｔａｔａｃｃｇｔｃｇａｃｃｔｃｔａｇｃｔａｇａｇｃｔｔｇｇｃ－３’（３．３－Ｆ１）（配列番号１０２）

５’－ｇｃｔａｔｇｇｃａｇｇｇｃｃｔｇｃｃｇｃｃｃｃｇａｃｇｔｔｇ－３’（３．３－Ｒ１）（配列番号１０３）

２）－２　キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１の構築

ｐＣＭＡ－ＬＫをＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化して軽鎖分泌シグナル及びヒト軽鎖定常領域を取り除いたＤＮＡ断片と、配列番号２９に示すヒト重鎖シグナル配列、及びヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて結合して、ＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトＩｇＧ１重鎖定常領域をもつキメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を構築した。

[0124] ２）－３　ヒトキメラ化抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の作製

２）－３－１　ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖発現ベクターの構築

実施例１）－２－３で得られたＮｏ．７６軽鎖の可変領域を含むｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を

増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｎｏ．７６」と命名した。ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号３０に示し、アミノ酸配列を配列番号３１に示した。

ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖用プライマーセット

５’－ａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃａａｃａｔｔｇｔａａｔｇａｃｃｃａａｔｃｔｃｃｃａａａｔｃ－３’（７６Ｌ－Ｆ）（配列番号１０４）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃａｇｃｃｃｇｔｔｔｔａｔｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｃｃｔｃｃｃ－３’（７６Ｌ－Ｒ）（配列番号１０５）

[0125] ２）－３－２　ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖発現ベクターの構築

実施例１）－２－３で得られたＮｏ．７６重鎖の可変領域を含むｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢＩｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｎｏ．７６」と命名した。ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号３２に示し、アミノ酸配列を配列番号３３に示した。

ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃｃａｇｇｔｃｃａａｃｔｇｃａｇｃａｇｃｃｔｇｇｔｇｃｔｇａｇ－３’（７６Ｈ－Ｆ）（配列番号１０６）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃｔｇｔｇａｇａｇｔｇｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇ－３’（７６Ｈ－Ｒ）（配列番号１０７）

[0126] ２）－３－３　ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号３４に示すヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩとＰｍｅＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／１Ｇ５」と命名した。ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号３５に示した。

ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇｃｃｔｃｃｇｇａｃｔｃｔａｇａｇｃｃａｃｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１０８）

５’－ａｇｔｔａｇｃｃｔｃｃｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｔｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１０９）

[0127] ２）－３－４　ヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号３６に示すヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４４９に示されるヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ

ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／１Ｇ５」と命名した。ヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号３７に示した。

ヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖用プライマーセット

５’－ａｇｃｔｃｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１１０）

５’－ｇｇｇｃｃｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ１－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１１）

[0128] ２）－３－５　ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号３８に示すヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩとＰｍｅＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／４Ｃ１３」と命名した。ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号３９に示した。

ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇｃｃｔｃｃｇｇａｃｔｃｔａｇａｇｃｃａｃｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１０８）

５’－ａｇｔｔａｇｃｃｔｃｃｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｔｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１０９）

[0129] ２）－３－６　ヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４０に示すヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖のヌクレオチド

配列のヌクレオチド番号３６乃至４３７に示されるヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／４Ｃ１３」と命名した。ヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号４１に示した。

ヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖用プライマーセット

５’－ａｇｃｔｃｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１１０）

５’－ｇｇｇｃｃｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ１－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１１）

２）－３－７　ヒトキメラ化抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の調製

２）－３－７－１　ヒトキメラ化抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。

[0130] 対数増殖期の１．２×１０^{9}個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を３Ｌ　Ｆｅｒｎｂａｃｈ　Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ　Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）で希釈して１．０×１０^{6}細胞／ｍｌに調製したのちに、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）２０ｍｌに溶解し、次に

ＰｕｒｅＬｉｎｋ ＨｉＰｕｒｅ ＰｌａｓｍｉｄキットＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を用いて調製した軽鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）及び重鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ Ｃａｐｓｕｌｅ Ｆｉｌｔｅｒ （ＡＤＶＡＮＴＥＣ ＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

[0131] ｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｎｏ．７６とｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｎｏ．７６との組合せによって取得されたヒトキメラ化Ｎｏ．７６を「ｃＮｏ．７６」、ｐＣＭＡ－ＬＫ／１Ｇ５とｐＣＭＡ－Ｇ１／１Ｇ５との組合せによって取得されたヒトキメラ化＃１Ｇ５を「ｃ＃１Ｇ５」、ｐＣＭＡ－ＬＫ／４Ｃ１３とｐＣＭＡ－Ｇ１／４Ｃ１３との組合せによって取得されたヒトキメラ化＃４Ｃ１３を「ｃ＃４Ｃ１３」と命名した。

[0132] ２）－３－７－２ ヒトキメラ化抗ＬＰＳ Ｏ１１抗体の精製

上記２）－３－７－１で得られた培養上清から抗体を、ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）１段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファー置換工程は４－６℃下で実施した。最初に、培養上清を、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製）が充填されたカラムにアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、カラム容量２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＨＢＳｏｒ（２５ｍＭヒスチジン／５％ ソルビトール、ｐＨ６．０）への液置換を

行った。Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ ＵＦ Ｆｉｌｔｅｒ Ｄｅｖｉｃｅ ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ１０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を５ｍｇ／ｍｌ以上に調製した。最後にＭｉｎｉｓａｒｔ－Ｐｌｕｓ ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

２）－４ Ｍｅｉｊｉ１６４０およびＭｅｉｊｉ１６５６、ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１（１ＢＯ１１ ｈＩｇＧ１）、マウスＩｇＧ２ａタイプＮｏ．７６（Ｎｏ．７６ ｍＩｇＧ２ａ）の作製

２）－４－１ Ｍｅｉｊｉ１６４０の作製

Ｍｅｉｊｉ１６４０はＷＯ２０１１／１０２５５１に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

[0133] ２）－４－１－１ Ｍｅｉｊｉ１６４０軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４２に示すＭｅｉｊｉ１６４０軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０８に示されるＭｅｉｊｉ１６４０軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社 人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでＭｅｉｊｉ１６４０軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＭｅｉｊｉ１６４０軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｍｅｉｊｉ１６４０」と命名した。Ｍｅｉｊｉ１６４０軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号４３に示した。

Ｍｅｉｊｉ１６４０軽鎖用プライマーセット

５’－ｃｔｇｔｇｇａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃ－３’（ＣＭ－ＬＫＦ）（配列番号１１２）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃｃｇｔａｃｇ－３’（ＫＣＬ－Ｉｎ

ｆ－Ｒ）（配列番号１１３）

[0134] ２）－４－１－２　Ｍｅｉｊｉ１６４０重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４４に示すＭｅｉｊｉ１６４０重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４５８に示されるＭｅｉｊｉ１６４０重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでＭｅｉｊｉ１６４０重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＭｅｉｊｉ１６４０重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｍｅｉｊｉ１６４０」と命名した。Ｍｅｉｊｉ１６４０重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号４５に示した。

Ｍｅｉｊｉ１６４０重鎖用プライマーセット

５’－ａｇｃｔｃｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１１０）

５’－ｇｇｇｃｃｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ１－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１１）

２）－４－２　Ｍｅｉｊｉ１６５６の作製

Ｍｅｉｊｉ１６５６はＷＯ２０１１／１０２５５１に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

[0135] ２）－４－２－１　Ｍｅｉｊｉ１６５６軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４６に示すＭｅｉｊｉ１６５６軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるＭｅｉｊｉ１６５６軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでＭｅ

ｉｊｉ１６５６軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＭｅｉｊｉ１６５６軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｍｅｉｊｉ１６５６」と命名した。Ｍｅｉｊｉ１６５６軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号４７に示した。

Ｍｅｉｊｉ１６５６軽鎖用プライマーセット

５’－ｃｔｇｔｇｇａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃ－３’（ＣＭ－ＬＫＦ）（配列番号１１２）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃｃｇｔａｃｇ－３’（ＫＣＬ－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１３）

[0136] ２）－４－２－２　Ｍｅｉｊｉ１６５６重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４８に示すＭｅｉｊｉ１６５６重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４６７に示されるＭｅｉｊｉ１６５６重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでＭｅｉｊｉ１６５６重鎖可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＭｅｉｊｉ１６５６重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｍｅｉｊｉ１６５６」と命名した。Ｍｅｉｊｉ１６５６重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号４９に示した。

Ｍｅｉｊｉ１６５６重鎖用プライマーセット

５’－ａｇｃｔｃｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１１０）

５’－ｇｇｇｃｃｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ１－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１１）

２）－４－３　ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１（１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１）の作製

１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１はＷＯ２００６／０８４７５８の図２、及び図１に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

[0137] ２）－４－３－１　１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号５０に示すマウスＩｇＧ２ｂタイプキメラ化１ＢＯ１１軽鎖をコードするＤＮＡ断片を合成した（ＭＢＬ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／１ＢＯ１１」と命名した。１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号５１に示し、アミノ酸配列を配列番号５２に示した。

１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１軽鎖用プライマーセット

５’－ａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃｇａｃｇｔｇｇｔｇａｔｇａｃｃｃａｇａｇｃｃｃｔｃｔｇｔｃｃ－３’（ｈ１ＢＯ－ＬＦ）（配列番号１１４）

５’－ｇｇｇｃｇｇｃｃａｃｃｇｔａｃｇｃｔｔｇａｔｃｔｃｃａｃｃｔｔｇｇｔｇｃｃｔｃｃｇｃｃｇ－３’（ｈ１ＢＯ－ＬＲ）（配列番号１１５）

[0138] ２）－４－３－２　１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号５３に示すマウスＩｇＧ２ｂタイプキメラ化１ＢＯ１１重鎖をコードするＤＮＡ断片を合成した（ＭＢＬ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（Ｔ

ＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢＩｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／１ＢＯ１１」と命名した。１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号５４に示し、アミノ酸配列を配列番号５５に示した。

１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃｇａｇｇａｇｃａａｇｔｇｇｔｇｇａｇａｇｃｇｇ－３’（ｈ１ＢＯ－ＨＦ）（配列番号１１６）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｃａｃｇｇｔｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｃｔｔｇｔｃ－３’（ｈ１ＢＯ－ＨＲ）（配列番号１１７）

[0139] ２）－４－４　マウスＩｇＧ２ａタイプＮｏ．７６（Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ）の作製

２）－４－４－１　Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖発現ベクターの作製

配列番号１１８に示すＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　Ｓｔｒｉｎｇｓ　ＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ）。合成したＤＮＡ断片を、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いた箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａＬ」と命名した。Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号１１９に示した。

２）－４－４－２　Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖発現ベクターの作製

配列番号１２０に示すＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖をコードする配列を

含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いた箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａＨ」と命名した。Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖のアミノ酸配列を配列番号１２１に示した。

Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇｃｃｔｃｃｇｇａｃｔｃｔａｇａｇｃｃａｃｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１０８）

５’－ａｇｔｔａｇｃｃｔｃｃｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｔｃ－３’（ＣＭ－ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１０９）

２）－４－５　Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１、Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａの生産および精製

２）－４－５－１　Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１、Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａの生産

実施例２）－３－７－１と同様の方法で生産した。

[0140] Ｍｅｉｊｉ１６４０はｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｍｅｉｊｉ１６４０とｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｍｅｉｊｉ１６４０との組合せにより取得し、Ｍｅｉｊｉ１６５６はｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｍｅｉｊｉ１６５６とｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｍｅｉｊｉ１６５６との組合せにより取得し、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１はｐＣＭＡ－ＬＫ／１ＢＯ１１とｐＣＭＡ－Ｇ１／１ＢＯ１１の組み合わせにより取得し、Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａはｐＣＭＡ　／Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａＬとｐＣＭＡ　／Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａＨの組み合わせにより取得した。

2）－4－5－2　Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１ｈＩｇＧ１、Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａの精製

上記２）－４－５－１で得られた培養上清から抗体を実施例２）－３－７－２と同様の方法で精製した。

[0141] ［実施例３］抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性

３）－１　緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０に対するオプソニン活性

１）－３－２の方法に従ってＡＴＣＣ　２９２６０に対するｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ、ｃ＃４Ｃ１３、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１のオプソニン活性を測定した。オプソニン活性は５０％増殖阻害最小濃度で示した。その結果を表２に示す。

[0142] [表2]

菌株番号	オプソニン活性（ｎｇ／ｍＬ）							
	ｃＮｏ．７６	ｃ＃１Ｇ５Ｍ	ｃ＃１Ｇ５	ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ	ｃ＃４Ｃ１３	Ｍｅｉｊｉ１６４０	Ｍｅｉｊｉ１６５６	１ＢＯ１１ｈＩｇＧ１
ＡＴＣＣ２９２６０	４．１	１．４	４．１	１．４	４．１	１１０	３７	１０００

[0143] ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ、ｃ＃４Ｃ１３のオプソニン活性はほぼ同等で、それらはＭｅｉｊｉ１６４０より２７－８１倍、Ｍｅｉｊｉ１６５６より９－２７倍、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１より２４３－７２９倍強い活性を示した。

[0144] ３）－２　緑膿菌Ｏ１１株に対する結合特異性

各種Ｏ抗原保有緑膿菌に対するｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３の結合特異性をｗｈｏｌｅ　ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡによって確認した。用いた菌株とＯ抗原を表３に示す。

[0145]

[表3]

菌株	O抗原
ＡＴＣＣ　３３３４８	Ｏ１
ＡＴＣＣ　３３３４９	Ｏ２
ＡＴＣＣ　３３３５０	Ｏ３
ＡＴＣＣ　３３３５１	Ｏ４
ＡＴＣＣ　３３３５２	Ｏ５
ＡＴＣＣ　３３３５４	Ｏ６
ＡＴＣＣ　３３３５３	Ｏ７
ＡＴＣＣ　３３３５５	Ｏ８
ＡＴＣＣ　３３３５６	Ｏ９
ＡＴＣＣ　３３３５７	Ｏ１０
ＡＴＣＣ　３３３５８	Ｏ１１
ＡＴＣＣ　３３３６０	Ｏ１３
ＡＴＣＣ　３３３６１	Ｏ１４
ＡＴＣＣ　３３３６２	Ｏ１５
ＡＴＣＣ　３３３６３	Ｏ１６
ＡＴＣＣ　３３３６４	Ｏ１７
ＡＴＣＣ　４３３９０	Ｏ１８
ＡＴＣＣ　４３７３１	Ｏ１９
ＡＴＣＣ　４３７３２	Ｏ２０
ＡＴＣＣ　２１６３６	Ｍ（ｕｎｔｙｐａｂｌｅ）
ＡＴＣＣ　２９２６０	Ｏ１１（ポジティブコントロール）
ＡＴＣＣ　２５９２２	大腸菌（ネガティブコントロール）

[0146] ＭＨＡで培養した菌を生食で懸濁してOD_{600}＝０．５－０．６に調製し、１時間固相化した。５％ｓｋｉｍ　ｍｉｌｋ（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）／ＴＢＳＴで２時間ブロッキングした後、１次抗体として０．１μｇ／ｍｌのｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３を添加して１時間反応させた。続いて２次抗体としてＡｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，ＨＲＰ－Ｌｉｎｋｅｄ　ＷｈｏｌｅＡｂ　Ｓｈｅｅｐ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を１時間反応させた後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　ＥＬＩＳＡ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｋ．Ｋ．）を添加し、添加直後に発光をＡＲＶＯ　１４２０マルチラベルカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で測定した。各ステップ間はＴＢＳＴで２ま

たは３回洗浄した。ポジティブコントロールとして緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０を、ネガティブコントロールとして大腸菌ＡＴＣＣ　２５９２２を用いた。ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３はＯ１１株に対して高い結合活性を示した。一方、他のＯ抗原保有株に結合活性を示さなかったことから、Ｏ１１抗原を特異的に認識することが明らかとなった（図４）。

[0147] ３）－３　緑膿菌Ｏ１１臨床分離株に対する結合活性

第一三共株式会社保有の緑膿菌Ｏ１１臨床分離３１株およびポジティブコントロールとしてＡＴＣＣ　２９２６０に対する結合活性をｗｈｏｌｅ　ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡによって測定した。緑膿菌のＯ抗原は緑膿菌群別免疫血清（デンカ生研）２０μｌと菌液２０μｌを混合し、抗原抗体反応による凝集の有無によって判定した。Ｗｈｏｌｅ　ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡは３）－２と同様に行い、１次抗体として０．１μｇ／ｍｌのｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６と６．４μｇ／ｍｌの１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１を調製し、１時間反応させた。用いた菌株の情報を表４に、測定結果を表５に示す。

[0148]

[表4]

菌株	分離年	分離国	分離部位
1	２０１０	日本	呼吸器
2	２０１０	日本	呼吸器
3	２０１０	日本	呼吸器
4	２０１０	日本	呼吸器
5	２０１０	日本	呼吸器
6	２０１０	日本	呼吸器
7	２０１０	日本	呼吸器
8	２０１０	日本	呼吸器
9	２０１０	日本	尿
１０	２０１０	日本	尿
１１	２００９	米国	呼吸器
１２	２００９	米国	血液
１３	２００９	米国	呼吸器
１４	２００９	米国	呼吸器
１５	２００９	米国	血液
１６	２００９	米国	呼吸器
１７	２００９	米国	呼吸器
１８	２００９	米国	血液
１９	２００９	米国	血液
２０	２００９	米国	血液
２１	２００９	ドイツ	血液
２２	２００９	スペイン	呼吸器
２３	２００９	スペイン	呼吸器
２４	２００９	フランス	血液
２５	２００９	イタリア	呼吸器
２６	２００９	イタリア	呼吸器
２７	２００９	フランス	呼吸器
２８	２００９	スペイン	血液
２９	２０１０	スウェーデン	血液
３０	２００３	スペイン	呼吸器
３１	２００７	日本	呼吸器

[0149]

[表5]

菌株番号	ｃNo.76	ｃ#1G5M	ｃ#4C13KM	Ｍｅｉｊｉ1640	Ｍｅｉｊｉ1656	1BO11 hIgG1
ＡＴＣＣ29260	＋	＋	＋	＋	＋	＋
1	＋	＋	＋	＋	＋	＋
2	＋	＋	＋	＋	＋	＋
3	＋	＋	＋	＋	＋	－
4	＋	＋	＋	＋	＋	＋
5	＋	＋	＋	＋	＋	＋
6	＋	＋	＋	＋	＋	＋
7	＋	＋	＋	＋	＋	＋
8	＋	＋	＋	＋	＋	＋
9	＋	＋	＋	－	－	－
10	＋	＋	＋	＋	＋	＋
11	＋	＋	＋	－	－	－
12	＋	＋	＋	－	－	－
13	＋	＋	＋	＋	＋	＋
14	＋	＋	＋	＋	＋	＋
15	＋	＋	＋	－	＋	－
16	＋	＋	＋	＋	＋	＋
17	＋	＋	＋	＋	＋	＋
18	＋	＋	＋	－	－	－
19	＋	＋	＋	－	＋	－
20	＋	＋	＋	－	＋	－
21	＋	＋	＋	＋	＋	＋
22	＋	＋	＋	＋	＋	＋
23	＋	＋	＋	＋	＋	＋
24	＋	＋	＋	＋	＋	＋
25	＋	＋	＋	＋	＋	＋
26	＋	＋	＋	＋	＋	＋
27	＋	＋	＋	＋	＋	＋
28	＋	＋	＋	－	－	－
29	＋	＋	＋	－	－	－
30	＋	＋	＋	＋	＋	＋
31	＋	＋	＋	＋	＋	＋

＋：活性あり、－：活性なし

[0150] 大腸菌に対する結合活性と比較して４倍以上活性が強い場合、結合活性ありと判断したところ、ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃４Ｃ１３ＫＭは全ての株に対して結合活性を示し、Ｍｅｉｊｉ１６４０は２２株、Ｍｅｉｊｉ１６５６は２５株、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１は２１株にのみ結合活性を示した。ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、及び１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１のＯ１１臨床分離株に

対するカバー率は、それぞれ１００％、１００％、１００％、７１％、８１％、及び６８％であった。

[0151] ３）－４　緑膿菌Ｏ１１臨床分離株に対するオプソニン活性

３）－３で用いたＯ１１株のうちＮｏ．９、１２、１８、２４、２６、３１株に対するオプソニン活性を測定した。方法は１）－３－２と同様の方法で行い、５０％増殖阻害活性が認められる最小濃度を求めた。その結果を表６に示す。

[0152] [表6]

菌株番号	オプソニン活性（ｎｇ／ｍＬ）					
	ｃＮｏ．７６	ｃ＃１Ｇ５／ｃ＃１Ｇ５Ｍ	ｃ＃４Ｃ１３／ｃ＃４Ｃ１３ＫＭ	Ｍｅｉｊｉ１６４０	Ｍｅｉｊｉ１６５６	１ＢＯ１１ ｈＩｇＧ１
９	４．１	４．１	１．４	＞3000	＞3000	＞27000
１２	４．１	４．１	１２	＞3000	＞3000	＞27000
１８	４．１	１．４	１．４	＞3000	＞3000	＞27000
２４	４．１	１．４	１．４	110	37	1000
２６	４．１	１．４	１．４	110	37	1000
３１	４．１	４．１	４．１	330	110	3000

[0153] ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５またはｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃４Ｃ１３またはｃ＃４Ｃ１３ＫＭは全ての株に活性を示した。一方、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１は結合活性が認められなかったＮｏ．９、１２、１８株に対してオプソニン活性を示さなかった。これらの結果からｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５またはｃ＃１Ｇ５Ｍ、ｃ＃４Ｃ１３またはｃ＃４Ｃ１３ＫＭは、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、および１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１と比較してＯ１１株に対するカバー率が高いことが明らかとなった。

[0154] ［実施例４］抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ活性

４）－１　緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（静脈内投与）

ＭＨＡで培養した緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０をOD_{600}＝０．１０に調製した後、Ｍｕｅｌｌｅｒ　Ｈｉｎｔｏｎ　Ｂｒｏｔｈ（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉ

ｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）で10^{0}－10^{9}の１０倍希釈系列を調製し、３５℃で一晩培養した。希釈系列のうち、OD_{600}＝０．１０または０．１０を超える最大希釈率の菌液を用いてOD_{600}＝０．１０に調製し、４倍希釈して接種菌液とした。ＩＣＲマウス（チャールズリバー）に接種菌液を５０μｌ経鼻接種し、接種１時間後にｃＮｏ．７６、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６を３または１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与した（ｎ＝３）。接種２４時間後に肺内生菌数を測定し、治療効果を判定した。抗体非投与のコントロール群と比較してｃＮｏ．７６投与群で良好な治療効果が確認され、またその治療効果はＭｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６と同等以上であった（図５）。

[0155] ４）－２　緑膿菌臨床分離株によるマウス肺感染モデルにおける治療効果

４）－２－１　緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（菌と抗体の混合投与）

ＭＨＡで培養した緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２を生食に懸濁し、OD_{600}＝２．０に調製した（１０倍希釈液が０．２となる菌液を調製）。菌と抗体の結合が確実に起こるよう、菌液と２０または１００μｇ／ｍｌのｃＮｏ．７６、Ｍｅｉｊｉ１６４０、またはＭｅｉｊｉ１６５６を１：９の割合で混合し、それらをＩＣＲマウス（チャールズリバー）に５０μｌ経鼻接種した（ｎ＝３）。接種２４時間後に肺内生菌数を測定し、治療効果を判定した。また、対象としてレボフロキサシン（ＬＶＦＸ）の治療効果も検討した（Ｎｏ．１２株に対するＬＶＦＸの最小発育阻止濃度（ＭＩＣ）は＞１２８μｇ／ｍｌ）。すなわち、菌液と生食を１：９で混合し、５０μｌ接種したマウスに２４０ｍｇ／ｋｇのＬＶＦＸを接種直後に皮下投与した。抗体非投与のコントロール群と比較してｃＮｏ．７６は良好な治療効果を示したが、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、ＬＶＦＸ投与群では治療効果は認められなかった（図６）。

[0156] ４）－２－２　緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．３１によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（菌と抗体の混合投与）

ＭＨＡで培養した緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．３１を生食に懸濁し、$ＯＤ_{600}$＝５．０に調製した（１０倍希釈液が０．５となる菌液を調製）。菌と抗体の結合が確実に起こるよう、菌液と２０または１００μｇ／ｍｌのｃＮｏ．７６、Ｍｅｉｊｉ１６４０、またはＭｅｉｊｉ１６５６を１：９の割合で混合し、それらをＩＣＲマウス（チャールズリバー）に５０μｌ経鼻接種した（ｎ＝３）。接種２４時間後に肺内生菌数を測定し、治療効果を判定した。また、対象としてＬＶＦＸの治療効果も検討した（Ｎｏ．３１株に対するＬＶＦＸのＭＩＣは３２μｇ／ｍｌ）。すなわち、菌液と生食を１：９で混合し、５０μｌ接種したマウスに２４０ｍｇ／ｋｇのＬＶＦＸを接種直後に皮下投与した。抗体非投与のコントロール群と比較してｃＮｏ．７６、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６は良好な治療効果を示したが、ＬＶＦＸ投与群では治療効果は認められなかった（図７）。

[0157] ４）－２－３　緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２によるマウス肺感染モデルにおける治療効果（静脈内投与）

ＭＨＡで培養した緑膿菌臨床分離株Ｎｏ．１２を生食に懸濁し、$ＯＤ_{600}$＝０．２０に調製し、それを接種菌液とした。ＩＣＲマウス（チャールズリバー）に５０μｌ経鼻接種し、接種直後にｃＮｏ．７６、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６を２または１０ｍｇ／ｋｇ静脈内投与した（ｎ＝３）。接種２４時間後に肺内生菌数を測定し、治療効果を判定した。また、対象としてＬＶＦＸも２４０ｍｇ／ｋｇ皮下投与し、治療効果を検討した。静脈内投与においてもｃＮｏ．７６は良好な治療効果を示したが、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、ＬＶＦＸ投与群では治療効果は認められなかった（図８）。以上の結果から、ｃＮｏ．７６はＬＶＦＸのような既存薬が無効である多剤耐性緑膿菌に対しても有効である可能性が示された。また、ｃＮｏ．７６は実施例３で示されたｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける高いカバー率の特長がｉｎ　ｖｉｖｏにおいても示された。

[0158] ［実施例５］＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化デザイン

５）－１　＃１Ｇ５のヒト化バージョンの設計

５）－１－１　＃１Ｇ５の可変領域の分子モデリング

＃１Ｇ５の可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般的に公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１２１－１５３，（１９９１））によって実行された。ＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａ Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．ＡｃｉｄＲｅｓ．３５，Ｄ３０１－Ｄ３０３（２００７））に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の１次配列（Ｘ線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である）を、上で決定された＃１Ｇ５の可変領域と比較した。結果として、１ＵＹＷが、＃１Ｇ５の軽鎖の可変領域に対して同様にフレームワーク中に欠損がある抗体の中で、最も高い配列相同性を有するとして選択された。また、３ＧＩ９が、＃１Ｇ５の重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、＃１Ｇ５の軽鎖及び重鎖に対応する１ＵＹＷ及び３ＧＩ９の座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。次いで、それぞれのＣＤＲについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

[0159] 最後に、エネルギーの点で＃１Ｇ５の可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造解析プログラムＤｉｓｃｏｖｅｒｙＳｔｕｄｉｏ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ，Ｉｎｃ．）を用いて行った。

[0160] ５）－１－２　ヒト化＃１Ｇ５に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化＃１Ｇ５抗体の構築を、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８９））として一般的に公知の方法によって行った。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。＃１Ｇ５のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のＫａｂａｔデータベース（Ｎｕｃ．ＡｃｉｄＲｅｓ．２９，２０５－２０６（２００１））の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、ＨｕＭｃ３抗体がフレームワーク領域についての７５％の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択され

た。ＨｕＭｃ３についてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、＃１Ｇ５についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築された＃１Ｇ５の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Ｑｕｅｅｎｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６，１００２９－１００３３（１９８９））によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化＃１Ｇ５配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0161] ５）－２　＃１Ｇ５重鎖のヒト化

５）－２－１　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号３７に示される＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）をバリンに、アミノ酸番号２６（プロリン）をセリンに、アミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５７（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号８７（アラニン）をバリンに、アミノ酸番号８９（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号９１（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１０６（スレオニン）をアルギニンに、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１１６（セリン）をアラニンに、アミノ酸番号１３９（セリン）をロイシンに、アミノ酸番号１４１（イソロイシン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５重鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１タイプ重鎖」と命名した。

[0162] ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５７に記載されている。配列番号５７のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残

基からなる配列、２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる配列、１４５乃至４７４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号５７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５６に記載されている。配列番号５６のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなる配列、４３３乃至１４２２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号５６のヌクレオチド配列及び配列番号５７のアミノ酸配列は、図９にも記載されている。

[0163] ５）－２－２　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号３７に示される＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）をバリンに、アミノ酸番号２６（プロリン）をセリンに、アミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５７（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号８７（アラニン）をバリンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１０６（スレオニン）をアルギニンに、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１３９（セリン）をロイシンに、アミノ酸番号１４１（イソロイシン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５重鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖」と命名した。

[0164] ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５９に記載されている。配列番号５９のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる配列、１４５乃至４７４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号５９のアミノ酸配列をコー

ドするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５８に記載されている。配列番号５８のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなる配列、４３３乃至１４２２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号５８のヌクレオチド配列及び配列番号５９のアミノ酸配列は、図１０にも記載されている。

[0165] ５）－２－３　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号３７に示される＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５７（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１３９（セリン）をロイシンに、アミノ酸番号１４１（イソロイシン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５重鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

[0166] ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６１に記載されている。配列番号６１のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる配列、１４５乃至４７４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号６１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６０に記載されている。配列番号６０のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなる配列、４３３乃至１４２２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号６０のヌクレオチド配列

及び配列番号６１のアミノ酸配列は、図１１にも記載されている。

[0167] ５）－２－４　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４タイプ重鎖：

配列表の配列番号３７に示される＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５７（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号１３９（セリン）をロイシンに、アミノ酸番号１４１（イソロイシン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５重鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４タイプ重鎖」と命名した。

[0168] ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６３に記載されている。配列番号６３のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる配列、１４５乃至４７４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号６３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６２に記載されている。配列番号６２のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなる配列、４３３乃至１４２２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号６２のヌクレオチド配列及び配列番号６３のアミノ酸配列は、図１２にも記載されている。

[0169] ５）－２－５　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５タイプ重鎖：

配列表の配列番号３７に示される＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５重鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５タイプ重鎖」と命名した。

[0170] ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６５に記載されている。配列番号６５のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる配列、１４５乃至４７４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重

鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号６５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６４に記載されている。配列番号６４のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなる配列、４３３乃至１４２２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号６４のヌクレオチド配列及び配列番号６５のアミノ酸配列は、図１３にも記載されている。

[0171] ５）－３　＃１Ｇ５軽鎖のヒト化

５）－３－１　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示される＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸番号２１（アスパラギン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号２９（リジン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号３１（メチオニン）をロイシンに、アミノ酸番号３２（セリン）をアラニンに、アミノ酸番号３３（メチオニン）をバリンに、アミノ酸番号３５（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号３９（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号４１（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号４２（セリン）をアスパラギンに、アミノ酸番号６０（アラニン）をプロリンに、アミノ酸番号６１（グルタミン酸）をグリシンに、アミノ酸番号６３（セリン）をプロリンに、アミノ酸番号６６（プロリン）をロイシンに、アミノ酸番号８３（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号８８（アラニン）をグリシンに、アミノ酸番号９８（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号１０３（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１０５（アスパラギン酸）をバリンに、アミノ酸番号１０７（ヒスチジン）をチロシンに、アミノ酸番号１２０（グリシン）をグルタミンに、アミノ酸番号１２４（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１２９（アラニン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５軽鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１タイプ軽鎖」と命名した。

[0172] ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６７に記載されている。配列番号６７のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残

基からなる配列、２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる配列、１３０乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号６７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６６に記載されている。配列番号６６のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなる配列、３８８乃至７０２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号６６のヌクレオチド配列及び配列番号６７のアミノ酸配列は、図１４にも記載されている。

[0173] ５）－３－２　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示される＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸番号２９（リジン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号３１（メチオニン）をロイシンに、アミノ酸番号３２（セリン）をアラニンに、アミノ酸番号３３（メチオニン）をバリンに、アミノ酸番号３５（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号３９（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号４１（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号６０（アラニン）をプロリンに、アミノ酸番号６１（グルタミン酸）をグリシンに、アミノ酸番号８３（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号９８（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号１０３（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１０５（アスパラギン酸）をバリンに、アミノ酸番号１２４（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１２９（アラニン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５軽鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖」と命名した。

[0174] ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６９に記載されている。配列番号６９のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残基からなる配列、２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる配列、１３０乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号６９のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６８に記載されている。配列

番号６８のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなる配列、３８８乃至７０２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号６８のヌクレオチド配列及び配列番号６９のアミノ酸配列は、図１５にも記載されている。

[0175] ５）－３－３　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示される＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸番号２９（リジン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号３１（メチオニン）をロイシンに、アミノ酸番号３２（セリン）をアラニンに、アミノ酸番号３３（メチオニン）をバリンに、アミノ酸番号３５（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号３９（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号４１（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号６０（アラニン）をプロリンに、アミノ酸番号６１（グルタミン酸）をグリシンに、アミノ酸番号８３（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号９８（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号１０３（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１２４（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１２９（アラニン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５軽鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖」と命名した。

[0176] ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７１に記載されている。配列番号７１のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残基からなる配列、２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる配列、１３０乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号７１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７０に記載されている。配列番号７０のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなる配列、３８８乃至７０２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号７０のヌクレオチド配列及び配列番号７１のアミノ酸配列は、図１６にも記載されている。

[0177] ５）－３－４　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示される＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸番号２９（リジン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号３９（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号９８（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号１２９（アラニン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５軽鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４タイプ軽鎖」と命名した。

[0178] ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７３に記載されている。配列番号７３のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残基からなる配列、２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる配列、１３０乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号７３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７２に記載されている。配列番号７２のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなる配列、３８８乃至７０２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号７２のヌクレオチド配列及び配列番号７３のアミノ酸配列は、図１７にも記載されている。

[0179] ５）－３－５　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示される＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸番号２９（リジン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号９８（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号１２９（アラニン）をスレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃１Ｇ５軽鎖を「ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５タイプ軽鎖」と命名した。

[0180] ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７５に記載されている。配列番号７５のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残基からなる配列、２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる配列、１３０乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号７５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７４に記載されている。配列

番号７４のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなる配列、３８８乃至７０２番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号７４のヌクレオチド配列及び配列番号７５のアミノ酸配列は、図１８にも記載されている。

[0181] ５）－４　＃４Ｃ１３Ｋのヒト化バージョンの設計

５）－４－１　＃４Ｃ１３Ｋの可変領域の分子モデリング

＃４Ｃ１３Ｋの可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般的に公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１２１－１５３，（１９９１））によって実行された。ＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａ Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．ＡｃｉｄＲｅｓ．３５，Ｄ３０１－Ｄ３０３（２００７））に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の１次配列（Ｘ線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である）を、上で決定された＃４Ｃ１３Ｋの可変領域と比較した。結果として、１ＵＹＷが、＃４Ｃ１３Ｋの軽鎖の可変領域に対して同様にフレームワーク中に欠損がある抗体の中で、最も高い配列相同性を有するとして選択された。また、１ＣＩＣが、＃４Ｃ１３Ｋの重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、＃４Ｃ１３Ｋの軽鎖及び重鎖に対応する１ＵＹＷ及び１ＣＩＣの座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。次いで、それぞれのＣＤＲについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

[0182] 最後に、エネルギーの点で＃４Ｃ１３Ｋの可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造解析プログラムＤｉｓｃｏｖｅｒｙＳｔｕｄｉｏ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ，Ｉｎｃ．）を用いて行った。

[0183] ５）－４－２　ヒト化＃４Ｃ１３Ｋに対するアミノ酸配列の設計

ヒト化＃４Ｃ１３Ｋ抗体の構築を、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８

９））として一般的に公知の方法によって行った。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。＃４Ｃ１３Ｋのフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のＫａｂａｔデータベース（Ｎｕｃ．ＡｃｉｄＲｅｓ．２９，２０５－２０６（２００１））の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、ＨｕＭｃ３抗体がフレームワーク領域についての７３％の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。ＨｕＭｃ３についてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、＃４Ｃ１３Ｋについてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築された＃４Ｃ１３Ｋの三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Ｑｕｅｅｎｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６，１００２９－１００３３（１９８９））によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化＃４Ｃ１３Ｋ配列を以下の実施例に記載されるように構築した。ヒト化＃４Ｃ１３Ｋ配列の軽鎖は、ヒト化＃１Ｇ５配列の軽鎖と完全に共通のものとした。

[0184] ５）－５　＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のヒト化

５）－５－１　ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号４１に示される＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）をバリンに、アミノ酸番号２６（プロリン）をセリンに、アミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５６（メチオニン）をバリンに、アミノ酸番号５７（グルタミン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号８７（アラニン）をバリンに、アミノ酸番号８９（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号９１（バリン）をアラニンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタ

ミン酸に、アミノ酸番号１０３（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号１０６（スレオニン）をアルギニンに、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１１６（スレオニン）をアラニンに、アミノ酸番号１３５（スレオニン）をロイシンにアミノ酸番号１３６（ロイシン）をバリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃４Ｃ１３Ｋ重鎖を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１タイプ重鎖」と命名した。

[0185] ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７７に記載されている。配列番号７７のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号７７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７６に記載されている。配列番号７６のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１４１０番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号７６のヌクレオチド配列及び配列番号７７のアミノ酸配列は、図１９にも記載されている。

[0186] ５）－５－２ ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号４１に示される＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）をバリンに、アミノ酸番号２６（プロリン）をセリンに、アミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号５６（メチオニン）をバリンに、アミノ酸番号５７（グルタミン）をアルギニンに、アミノ酸番号５９（アルギニン）をアラニンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号８７（アラニン）をバリンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸

番号１０３（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号１０６（スレオニン）をアルギニンに、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１３５（スレオニン）をロイシンにアミノ酸番号１３６（ロイシン）をバリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃４Ｃ１３Ｋ重鎖を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖」と命名した。

[0187] ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７９に記載されている。配列番号７９のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号７９のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７８に記載されている。配列番号７８のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１４１０番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号７８のヌクレオチド配列及び配列番号７９のアミノ酸配列は、図２０にも記載されている。

[0188] ５）－５－３ ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号４１に示される＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のアミノ酸番号３０（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号６７（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号８６（リジン）をアルギニンに、アミノ酸番号９５（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１０３（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号１０８（アスパラギン酸）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１１０（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号１３５（スレオニン）をロイシンにアミノ酸番号１３６（ロイシン）をバリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃４Ｃ１３Ｋ重鎖を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

[0189] ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８１に記載されている。配列番号８１のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号８１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８０に記載されている。配列番号８０のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１４１０番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号８０のヌクレオチド配列及び配列番号８１のアミノ酸配列は、図２１にも記載されている。

[0190] ５）－５－４ ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４タイプ重鎖：

配列表の配列番号４１に示される＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のアミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１０１（グルタミン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号１０３（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号１３５（スレオニン）をロイシンにアミノ酸番号１３６（ロイシン）をバリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃４Ｃ１３Ｋ重鎖を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４タイプ重鎖」と命名した。

[0191] ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８３に記載されている。配列番号８３のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号８３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８２に記載されている。配列番号８２のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１４１０番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号８２のヌクレオチド

配列及び配列番号８３のアミノ酸配列は、図２２にも記載されている。

[0192] ５）－５－５　ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５タイプ重鎖：

配列表の配列番号４１に示される＃４Ｃ１３Ｋ重鎖のアミノ酸番号３１（バリン）をリジンに、アミノ酸番号３９（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号１３５（スレオニン）をロイシンにアミノ酸番号１３６（ロイシン）をバリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃４Ｃ１３Ｋ重鎖を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５タイプ重鎖」と命名した。

[0193] ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８５に記載されている。配列番号８５のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号８５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８４に記載されている。配列番号８４のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１４１０番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号８４のヌクレオチド配列及び配列番号８５のアミノ酸配列は、図２３にも記載されている。

[0194] ［実施例６］＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体の作製

６）－１　＃１Ｇ５のヒト化抗体の軽鎖発現ベクターの構築

６）－１－１　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号６８に示すｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖の可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素

ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりｈ＃１Ｇ５－Ｌ２タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２」と命名した。

ヒト化抗体軽鎖用プライマーセット

５’－ｃｔｇｔｇｇａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃ－３’（ＣＭ－ＬＫＦ）（配列番号１１２）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃｃｇｔａｃｇ－３’（ＫＣＬ－Ｉｎｆ－Ｒ）（配列番号１１３）

[0195] ６）－１－２　ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号７０に示すｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社人工遺伝子合成サービス）。実施例６）－１－１と同様の方法によりｈ＃１Ｇ５－Ｌ３タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３」と命名した。

[0196] ６）－２　＃１Ｇ５のヒト化抗体の重鎖発現ベクターの構築

６）－２－１　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号５８に示すｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４３２に示されるｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットでｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖の可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢＩｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりｈ＃１Ｇ５－Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクタ

ーを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２」と命名した。

ヒト化抗体重鎖用プライマーセット

５’－ａｇｃｔｃｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃ－３’（ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ）（配列番号１１０）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｃａｃｇｇｔｃａｃｇａｇｇｇｔｇｃｃｃｔｇｇｃｃ－３’（Ｈ－Ｒ）（配列番号１２２）

[0197] ６）－２－２　ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号６０に示すｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４３２に示されるｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。６）－２－１と同様の方法によりｈ＃１Ｇ５－Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３」と命名した。

[0198] ６）－３　＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体の重鎖発現ベクターの構築

６）－３－１　ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号７８に示すｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４２０に示されるｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。６）－２－１と同様の方法によりｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２」と命名した。

[0199] ６）－３－２　ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号８０に示すｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４２０に示されるｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。６）－２－１と同様の方法によりｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３」と命名した。

[0200] ［実施例７］＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体の調製

[0201] ７）－１　＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体の生産

実施例２）－３－７－１と同様の方法で生産した。

[0202] なお、本明細書では、例えばｈ＃１Ｇ５－Ｈ１重鎖及びｈ＃１Ｇ５－Ｌ１を有する抗体を「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１／Ｌ１」又は「ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１／Ｌ１抗体」と呼称し、ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１重鎖及びｈ＃１Ｇ５－Ｌ１を有する抗体を「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１／Ｌ１」又は「ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１／Ｌ１抗体」と呼称する。

[0203] ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２の組合せによりｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２を取得し、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３の組合せによりｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３を取得し、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２の組合せによりｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２を取得し、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３の組合せによりｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３を取得した。

７）－２　＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体の精製

上記７）－１で得られた培養上清を、実施例２）－３－７－２と同様の方法で精製した。

[0204] ［実施例８］＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性測定

８）－１　緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０に対するオプソニン活性

１）－３－２の方法に従って、ＡＴＣＣ　２９２６０に対するｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２、ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３、ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２、及びｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３のオプソニン活性を測定し、ｃ＃１Ｇ５およびｃ＃４Ｃ１３と比較した。オプソニン活性は５０％増殖阻害最小濃度で示した。その結果を表７に示す。

[0205]

[表7]

菌株番号	オプソニン活性（ｎｇ／ｍＬ）					
	ｃ＃１Ｇ５	ｃ＃４Ｃ１３	ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２	ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３	ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２	ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３
ＡＴＣＣ２９２６０	４．１	４．１	４．１	４．１	４．１	４．１

[0206] ヒト化４抗体はｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３と同等の活性を示した。

[0207] ８）－２　緑膿菌Ｏ１１株に対する結合特異性

３）－２の方法に従って、各種Ｏ抗原保有緑膿菌に対するｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２、ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３、ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２、及びｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３の結合特異性を確認した。ヒト化４抗体はｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３と同様にＯ１１株に対してのみ特異的に高い結合活性を示した（図２５）。

[0208] ８）－３　緑膿菌Ｏ１１臨床分離株に対する結合活性

３）－３の方法に従って、第一三共株式会社保有の緑膿菌Ｏ１１臨床分離３１株に対するｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２、ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３、ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２、及びｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３の結合活性を測定した。ヒト化４抗体はｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３と同様に全てのＯ１１臨床分離株に結合活性を示した（図２６）。

[0209] ［実施例９］＃１Ｇ５、＃４Ｃ１３Ｋのヒト化抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ活性測定

４）－１の方法に従って、ＡＴＣＣ　２９２６０に対するｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３、ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２／Ｌ２、ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３／Ｌ３、ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２／Ｌ２、及びｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３／Ｌ３のｉｎ　ｖｉｖｏ活性を測定した。抗体非投与のコントロールと比較してｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３、ヒト化４抗体はいずれも治療効果を示し、またその効果はＭｅｉｊｉ１６５６以上であった（図２７）。

[0210] ［実施例１０］競合試験

緑膿菌ＡＴＣＣ　２９２６０を用いてｗｈｏｌｅ　ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡ

における結合活性を指標に、Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａとｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１の競合試験を実施した。３）－２の方法に従い、１次抗体としてＮｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ（終濃度０．０１μｇ／ｍＬ）とｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１のいずれか（終濃度０．０１、０．１、１、１０、１００、１０００μｇ／ｍＬ）をそれぞれ添加し、２次抗体としてＧｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ａ　ＨＲＰ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を用いた。Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａはｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ４、ｃ＃４Ｃ１３と競合したが、Ｍｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１とは競合しなかったことから、ｃＮｏ．７６、ｃ＃１Ｇ５、ｃ＃４Ｃ１３とＭｅｉｊｉ１６４０、Ｍｅｉｊｉ１６５６、１ＢＯ１１　ｈＩｇＧ１はエピトープが異なることが明らかとなった（図２８）。

産業上の利用可能性

[0211] 本発明のキメラ又はヒト化抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体はオプソニン作用（オプソニン食作用傷害作用）及び／又は補体依存的殺菌作用を有し、該抗ＬＰＳ　Ｏ１１抗体を含む医薬組成物は緑膿菌感染症の治療又は予防剤となり得る。

配列表フリーテキスト

[0212] 配列番号１：ｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａのヌクレオチド配列

配列番号２：ｐＪＯＮ　ｍＩｇＧ２ａ－ｈＩｇＧ１のヌクレオチド配列

配列番号３：ｐＪＯＮ　ｍＩｇκのヌクレオチド配列

配列番号４：Ｎｏ．７６の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号５：Ｎｏ．７６の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号６：Ｎｏ．７６の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号７：Ｎｏ．７６の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号８：Ｎｏ．７６の重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号９：Ｎｏ．７６の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０：Ｎｏ．７６の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１：Ｎｏ．７６の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１２：＃１Ｇ５の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１３：＃１Ｇ５の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１４：＃１Ｇ５の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１５：＃１Ｇ５の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１６：＃１Ｇ５の重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１７：＃１Ｇ５の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１８：＃１Ｇ５の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１９：＃１Ｇ５の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号２０：＃４Ｃ１２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号２１：＃４Ｃ１２の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号２２：＃４Ｃ１２の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号２３：＃４Ｃ１２の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号２４：＃４Ｃ１２の重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号２５：＃４Ｃ１２の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号２６：＃４Ｃ１２の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号２７：＃４Ｃ１２の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号２８：ヒト軽鎖分泌シグナル、及びヒト軽鎖定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片

配列番号２９：ヒト重鎖シグナル配列、及びヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片

配列番号３０：ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号３１：ヒトキメラ化Ｎｏ．７６軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３２：ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖のヌクレオチド配列

配列番号３３：ヒトキメラ化Ｎｏ．７６重鎖のアミノ酸配列

配列番号３４：ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤ

ＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号３５：ヒトキメラ化＃１Ｇ５軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３６：ヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖のヌクレオチド配列

配列番号３７：ヒトキメラ化＃１Ｇ５重鎖のアミノ酸配列

配列番号３８：ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号３９：ヒトキメラ化＃４Ｃ１３軽鎖のアミノ酸配列

配列番号４０：ヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖のヌクレオチド配列

配列番号４１：ヒトキメラ化＃４Ｃ１３重鎖のアミノ酸配列

配列番号４２：Ｍｅｉｊｉ１６４０軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号４３：Ｍｅｉｊｉ１６４０軽鎖のアミノ酸配列

配列番号４４：Ｍｅｉｊｉ１６４０重鎖のヌクレオチド配列

配列番号４５：Ｍｅｉｊｉ１６４０重鎖のアミノ酸配列

配列番号４６：Ｍｅｉｊｉ１６５６軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号４７：Ｍｅｉｊｉ１６５６軽鎖のアミノ酸配列

配列番号４８：Ｍｅｉｊｉ１６５６重鎖のヌクレオチド配列

配列番号４９：Ｍｅｉｊｉ１６５６重鎖のアミノ酸配列

配列番号５０：マウスＩｇＧ２ｂタイプキメラ化１ＢＯ１１軽鎖をコードするＤＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号５１：ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号５２：ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１軽鎖のアミノ酸配列

配列番号５３：マウスＩｇＧ２ｂタイプキメラ化１ＢＯ１１重鎖をコードするＤＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号５４：ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１重鎖のヌクレオチド配列

配列番号５５：ヒトＩｇＧ１タイプ１ＢＯ１１重鎖のアミノ酸配列

配列番号５６：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１のヌクレオチド配列

配列番号５７：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ１のアミノ酸配列

配列番号５８：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２のヌクレオチド配列

配列番号５９：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ２のアミノ酸配列

配列番号６０：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３のヌクレオチド配列

配列番号６１：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ３のアミノ酸配列

配列番号６２：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４のヌクレオチド配列

配列番号６３：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ４のアミノ酸配列

配列番号６４：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５のヌクレオチド配列

配列番号６５：ｈ＃１Ｇ５－Ｈ５のアミノ酸配列

配列番号６６：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１のヌクレオチド配列

配列番号６７：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ１のアミノ酸配列

配列番号６８：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２のヌクレオチド配列

配列番号６９：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ２のアミノ酸配列

配列番号７０：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３のヌクレオチド配列

配列番号７１：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ３のアミノ酸配列

配列番号７２：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４のヌクレオチド配列

配列番号７３：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ４のアミノ酸配列

配列番号７４：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５のヌクレオチド配列

配列番号７５：ｈ＃１Ｇ５－Ｌ５のアミノ酸配列

配列番号７６：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１のヌクレオチド配列

配列番号７７：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ１のアミノ酸配列

配列番号７８：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２のヌクレオチド配列

配列番号７９：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ２のアミノ酸配列

配列番号８０：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３のヌクレオチド配列

配列番号８１：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ３のアミノ酸配列

配列番号８２：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４のヌクレオチド配列

配列番号８３：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ４のアミノ酸配列

配列番号８４：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５のヌクレオチド配列

配列番号８５：ｈ＃４Ｃ１３Ｋ－Ｈ５のアミノ酸配列

配列番号８６：＃４Ｃ１３の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号８７：＃４Ｃ１３の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号８８：＃４Ｃ１３の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号８９：ＡＰ３ｄＣ－Ｓ

配列番号９０：ｍｌｇγＲＴ１　１１１１－ＡＳ

配列番号９１：ｍｌｇκ　１ｓｔ　５８９－ＡＳ

配列番号９２：ＭＣＳ－ＡＰ３－Ｓ

配列番号９３：ｍｌｇγ　３ｒｄ　６５６Ｔ－ＡＳ

配列番号９４：ｍｌｇκ　３ｒｄ　５２５－ＡＳ

配列番号９５：ｍｌｇＧ　ｊｏｉｎｔ　ＰＣＲ－Ｓ

配列番号９６：ｐｏｌｙＧ－ＡＳ

配列番号９７：ｍｌｇκ　ｊｏｉｎｔ　ＰＣＲ－Ｓ

配列番号９８：ｍｉｎｉＣＭＶ　ｆ１－Ｓ

配列番号９９：ｍｉｎｉＣＭＶ　ｆ１－ＡＳ

配列番号１００：ｍｌｇＧ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ

配列番号１０１：ｍｌｇκ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ

配列番号１０２：３．３－Ｆ１

配列番号１０３：３．３－Ｒ１

配列番号１０４：７６Ｌ－Ｆ

配列番号１０５：７６Ｌ－Ｒ

配列番号１０６：７６Ｈ－Ｆ

配列番号１０７：７６Ｈ－Ｒ

配列番号１０８：ＣＭ－ｉｎｆ－Ｆ

配列番号１０９：ＣＭ－ｉｎｆ－Ｒ

配列番号１１０：ＥＧ－Ｉｎｆ－Ｆ

配列番号１１１：ＥＧ１－Ｉｎｆ－Ｒ

配列番号１１２：ＣＭ－ＬＫＦ

配列番号１１３：ＫＣＬ－Ｉｎｆ－Ｒ

配列番号１１４：ｈ１ＢＯ－ＬＦ

配列番号１１５：ｈ１ＢＯ－ＬＲ

配列番号１１６：ｈ１ＢＯ－ＨＦ

配列番号１１７：ｈ１ＢＯ－ＨＲ

配列番号１１８：Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖をコードする配列を含むＤＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号１１９：Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号１２０：Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖をコードする配列を含むＤＮＡ断片のヌクレオチド配列

配列番号１２１：Ｎｏ．７６　ｍＩｇＧ２ａ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１２２：Ｈ－Ｒ

配列番号１２３：＃４Ｃ１３の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２４：＃４Ｃ１３の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１２５：＃４Ｃ１３の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 緑膿菌のＬＰＳを認識する抗体であって、Ｏ１１抗原に結合し、Ｏ１、Ｏ２、Ｏ３、Ｏ４、Ｏ５、Ｏ６、Ｏ７、Ｏ８、Ｏ９、Ｏ１０、Ｏ１３、Ｏ１４、Ｏ１５、Ｏ１６、Ｏ１７、Ｏ１８、Ｏ１９、Ｏ２０抗原、及びＯ抗原欠損株に結合せず、Ｏ１１臨床分離株に対するカバー率が８５％以上である抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項2] Ｏ１１臨床分離株に対するカバー率が９５％以上である、請求項１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項3] 緑膿菌のＬＰＳを認識する抗体であって、Ｏ１１抗原に結合し、Ｏ１、Ｏ２、Ｏ３、Ｏ４、Ｏ５、Ｏ６、Ｏ７、Ｏ８、Ｏ９、Ｏ１０、Ｏ１３、Ｏ１４、Ｏ１５、Ｏ１６、Ｏ１７、Ｏ１８、Ｏ１９、Ｏ２０抗原及びＯ抗原欠損株に結合せず、ＡＴＣＣ　２９２６０で特定される緑膿菌に対するオプソニン活性の５０％増殖阻害最小濃度が１２ｎｇ／ｍＬ以下である抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項4] ＡＴＣＣ　２９２６０で特定される緑膿菌に対するオプソニン活性の５０％増殖阻害最小濃度が４．１ｎｇ／ｍＬ以下である、請求項３に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項5] 配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、並びに配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体からなる群から選択される少なくともいずれか一つと交差競合することを特徴とする

、抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項6] 配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体、並びに配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列、及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含む抗体からなる群から選択される少なくともいずれか一つが結合するエピトープに結合することを特徴とする、請求項５に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項7] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号９に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなること；を特徴とする、請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項8] 配列番号８に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を

含むことを特徴とする請求項７に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項9] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする、請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項10] 配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項９に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項11] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号２６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号２７に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる

こと；

を特徴とする、請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項12] 配列番号２４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項13] Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合断片。

[請求項14] ｓｃＦｖであることを特徴とする、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体。

[請求項15] キメラ抗体であることを特徴とする、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項16] ヒト化されていることを特徴とする、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項17] 重鎖がヒト免疫グロブリンＧ１重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリンκ軽鎖の定常領域を含む、請求項１乃至１６のいずれか一つに記載の抗体。

[請求項18] 緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を有する抗体又は該抗体の抗原結合断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号５７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目

のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ４）　配列番号６３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ５）　配列番号６５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項19]　配列番号５９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１８に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項20]　配列番号６１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４４番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１８に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項21]　緑膿菌のＬＰＳ　Ｏ１１抗原に対する結合活性を有する抗体又は該抗体の抗原結合断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号７７に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ４）　配列番号８３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ５）　配列番号８５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ６）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ７）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号６７に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号７３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号７５に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項22]　配列番号７９に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ

酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項２１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項23] 配列番号８１に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号７１に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項２１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

[請求項24] 請求項１８乃至２３のいずれか一つに記載の抗体において、カルボキシル基末端側の１乃至数個のアミノ酸が欠失した重鎖を含む抗体。

[請求項25] 請求項１乃至２４に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

[請求項26] 緑膿菌感染症の治療及び／又は予防剤であることを特徴とする、請求項２５に記載の医薬組成物。

[請求項27] 請求項１乃至２４に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、キノロン系、アミノ配糖体系、ポリミキシン系、リファンピシン、マクロライド系抗菌薬からなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防用医薬組成物。

[請求項28] 緑膿菌感染症が、多剤耐性緑膿菌感染に起因する全身感染疾患であることを特徴とする、請求項２６又は２７に記載の医薬組成物。

[請求項29] 緑膿菌感染症が、血流感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎、肺膿瘍、膿胸、慢性気道感染症、腹膜炎、術後感染症、胆嚢炎、胆管炎、眼瞼腫瘍、涙嚢炎、結膜炎、角膜潰瘍、角膜膿瘍、全眼球炎、眼窩感染、尿路感染症、カテーテル感染症、肛門周辺膿瘍、熱傷の二次感染、褥瘡感染症、嚢胞性線維症、リンパ管炎、リン

パ節炎、骨髄炎、関節炎、扁桃炎、肝膿瘍、皮膚軟部組織感染症、子宮内感染、子宮付属器炎、子宮旁結合織炎、顎骨周辺の蜂巣炎、又は顎炎であることを特徴とする、請求項２６又は２７に記載の医薬組成物。

[請求項30] 緑膿菌感染症が、肺炎であることを特徴とする、請求項２６又は２７に記載の医薬組成物。

[請求項31] 請求項１乃至２４に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防方法。

[請求項32] 請求項１乃至２４に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は請求項２６に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つ、並びに、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系、キノロン系、アミノ配糖体系、ポリミキシン系、リファンピシン、マクロライド系抗菌薬からなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は相前後してして投与することを特徴とする、緑膿菌感染症の治療及び／又は予防方法。

[請求項33] 緑膿菌感染症が、多剤耐性緑膿菌感染に起因する全身感染疾患であることを特徴とする、請求項３１又は３２に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項34] 緑膿菌感染症が、血流感染、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎、肺膿瘍、膿胸、慢性気道感染症、腹膜炎、術後感染症、胆嚢炎、胆管炎、眼瞼腫瘍、涙嚢炎、結膜炎、角膜潰瘍、角膜膿瘍、全眼球炎、眼窩感染、尿路感染症、カテーテル感染症、肛門周辺膿瘍、熱傷の二次感染、褥瘡感染症、嚢胞性線維症、リンパ管炎、リンパ節炎、骨髄炎、関節炎、扁桃炎、肝膿瘍、皮膚軟部組織感染症、子宮内感染、子宮付属器炎、子宮旁結合織炎、顎骨周辺の蜂巣炎、又は顎炎であることを特徴とする、請求項３３に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項35] 緑膿菌感染症が、肺炎であることを特徴とする請求項３３に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項36] 請求項１乃至２４に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌感染症の診断剤。

[請求項37] 請求項１乃至２４に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、緑膿菌の検出キット。

[請求項38] 請求項１乃至２４のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[請求項39] 請求項３８に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１） 配列番号５６に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ２） 配列番号５８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ３） 配列番号６０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ４） 配列番号６２に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ５） 配列番号６４に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ６） ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ７） ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ８） ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとスト

リンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ９）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１）　配列番号６６に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２）　配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３）　配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４）　配列番号７２に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号７４に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ｂ９）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

[請求項40] 配列番号５８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項３９に記載のポリヌクレオチド。

[請求項41] 配列番号６０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４３２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項３９に記載のポリヌクレオチド。

[請求項42] 請求項３８に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１） 配列番号７６に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ２） 配列番号７８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ３） 配列番号８０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ４） 配列番号８２に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ５） 配列番号８４に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ａ６） ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ７） ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ａ８）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ９）　ａ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１）　配列番号６６に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２）　配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３）　配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４）　配列番号７２に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号７４に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９５％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と少なくとも９９％の相同性を持つヌクレオチド配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ｂ９）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチ

ド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

[請求項43] 配列番号７８に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６８に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項４２に記載のポリヌクレオチド。

[請求項44] 配列番号８０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号７０に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３８７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項４２に記載のポリヌクレオチド。

[請求項45] 請求項３８乃至４４に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項46] 請求項３８乃至４４に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

[請求項47] 請求項４５に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

[請求項48] 請求項４６又は４７に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む請求項１乃至２４のいずれか一つに記載の抗体の生産方法。