

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6751393号
(P6751393)

(45) 発行日 令和2年9月2日 (2020.9.2)

(24) 登録日 令和2年8月18日 (2020.8.18)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12 Z N A
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 47/56 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 R
請求項の数 33 (全 98 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-528877 (P2017-528877)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成27年12月2日 (2015.12.2)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-507166 (P2018-507166A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー
(43) 公表日	平成30年3月15日 (2018.3.15)		ウェイ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/063515	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開番号	W02016/090040		園田・小林特許業務法人
(87) 国際公開日	平成28年6月9日 (2016.6.9)	(72) 発明者	ブラウン, エリック
審査請求日	平成30年12月3日 (2018.12.3)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(31) 優先権主張番号	62/087, 213		80, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
(32) 優先日	平成26年12月3日 (2014.12.3)		ウェイ 1, シー/オー
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗STAPHYLOCOCCUS AUREUS抗体リファマイシン抱合体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

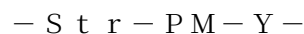
下式：



を有し、式中、

A b は、抗セリン-アスパラギン酸ジペプチドリピート (S D R) 抗体であり、

P M L は、下式：

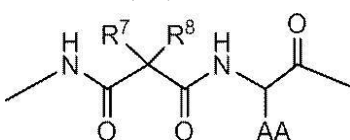


(式中、S t r はストレッチャー単位であり、P M はペプチド模倣単位であり、Y はスパーサー単位である) を有するプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーであり、

a b x が、リファマイシン型抗生物質であり、

p が 1 ~ 8 の整数であり、

P M は、下式：



を有し、

R⁷ 及び R⁸ が一緒に C₃ - C₇ シクロアルキル環を形成し、かつA A が、H、-CH₃、-CH₂(C₆H₅)、-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂、-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 、及び $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ から選択されるアミノ酸側鎖である、抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項2】

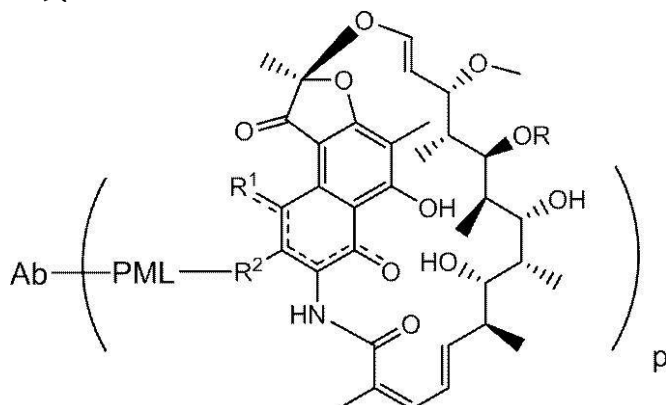
前記リファマイシン型抗生物質が、リファラジル型抗生物質である、請求項1に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項3】

前記リファマイシン型抗生物質が、前記プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーに結合される第4級アミンを含む、請求項1に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項4】

式I：



I

を有し、式中、

破線が、任意選択の結合を示し、

Rが、H、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル、または $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ であり、

R^1 がOHであり、

R^2 が $\text{CH}=\text{N}-$ （ヘテロシクリル）であり、前記ヘテロシクリルが、任意選択で、 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ヘテロアリール、 $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ ヘテロシクリル、 $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ アリール、及び $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ カルボシクリルから独立して選択される1つ以上の基で置換されるか、

あるいは R^1 及び R^2 が、5員若しくは6員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、前記スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環が、任意選択で、H、F、Cl、Br、I、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ アルキル、またはOHによって置換されており、

PMLが、 R^2 に結合された前記プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー、または R^1 及び R^2 により形成された前記縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルであり、

Abが前記抗SDR抗体である、請求項1に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項5】

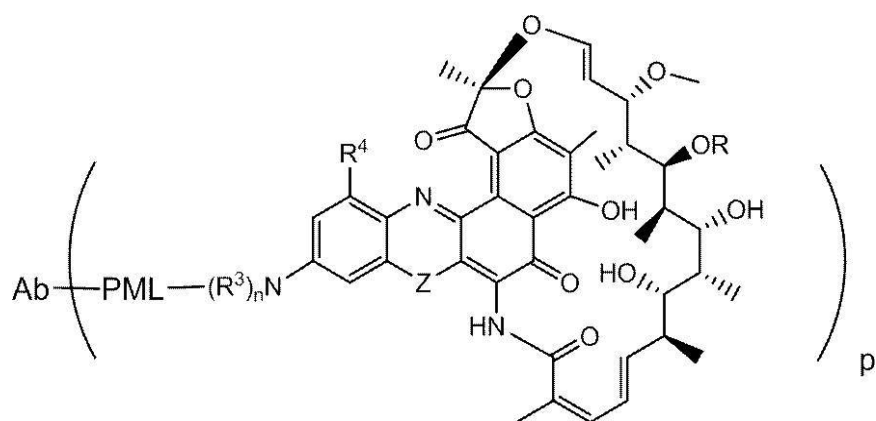
下式：

10

20

30

40

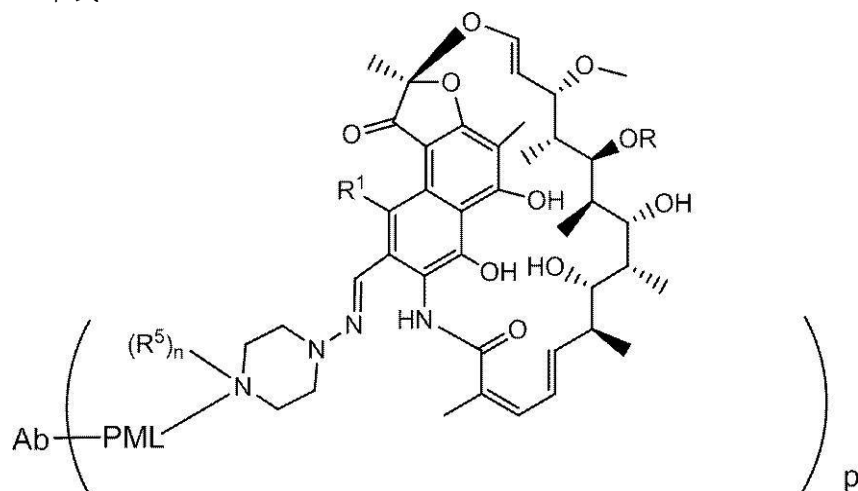


10

を有し、式中、
 R^3 が、H 及び C_{1-12} アルキルから独立して選択され、
 n が、1 または 2 であり、
 R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 C_{1-12} アルキル、及び OH から選択され、
 Z が、NH、N (C_{1-12} アルキル)、O、及び S から選択される、請求項 4 に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項 6】

下式：



20

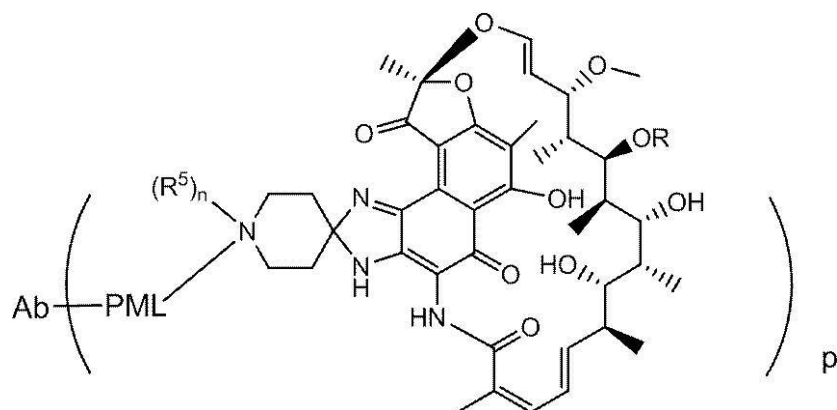
30

を有し、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、
 n が、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項 7】

下式：



40

を有し、式中、

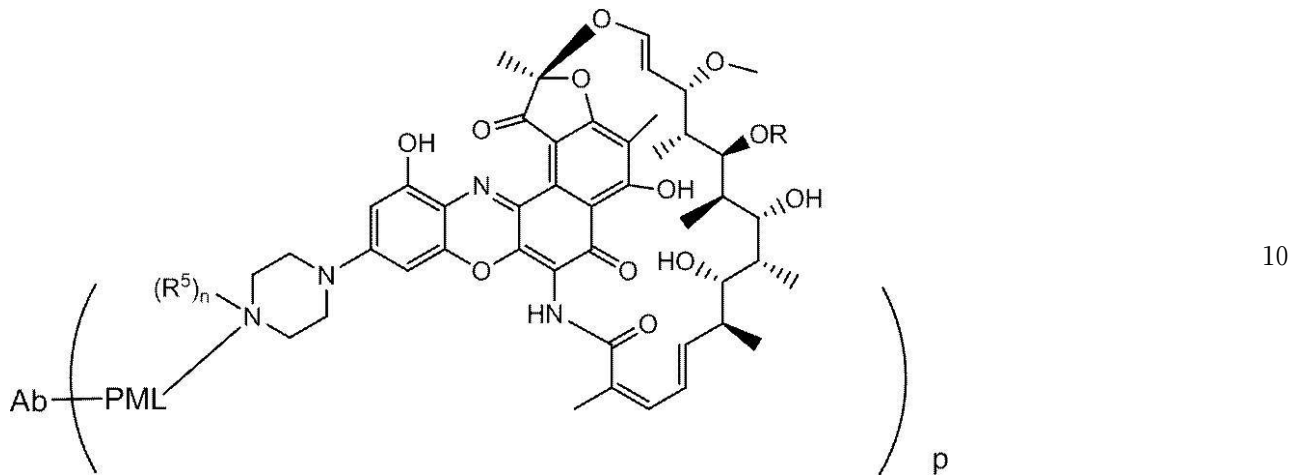
R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、

50

n が、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 8】

下式：



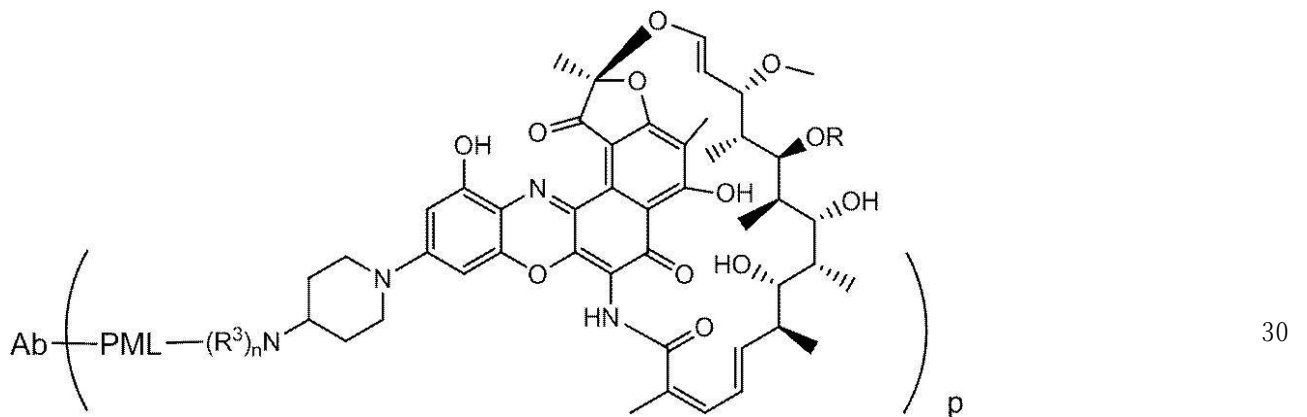
を有し、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから独立して選択され、

n が、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 9】

下式：



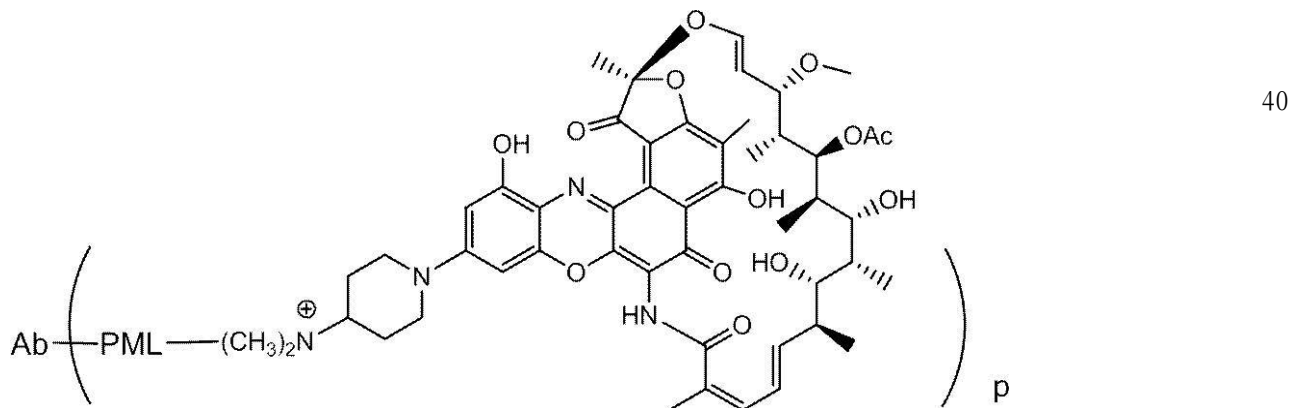
を有し、式中、

R^3 が、H 及び C_{1-12} アルキルから独立して選択され、

n が、1 または 2 である、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 10】

下式：

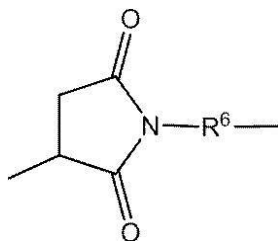


を有する、請求項 9 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 11】

50

Strが、下式：



を有し、式中、 R^6 が、 C_1-C_{12} アルキレン、 C_1-C_{12} アルキレン- $C(=O)$ 、 C_1-C_{12} アルキレン-NH、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(CH_2CH_2O)_r-C(=O)$ 、 $(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ 、及び C_1-C_{12} アルキレン-NHC(=O)CH₂CH(チオフェン-3-イル)からなる群から選択され、式中、 r が1~10の範囲の整数である、請求項1に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項12】

R^6 が、 $(CH_2)_5$ である、請求項11に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

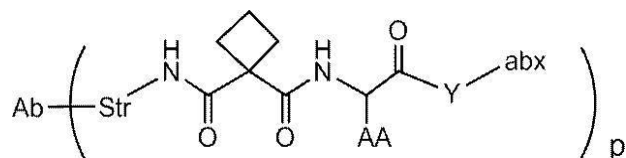
【請求項13】

Yが、パラ-アミノベンジルまたはパラ-アミノベンジルオキシカルボニルを含む、請求項1に記載の抗体-抗生物質抱合体化合物。

【請求項14】

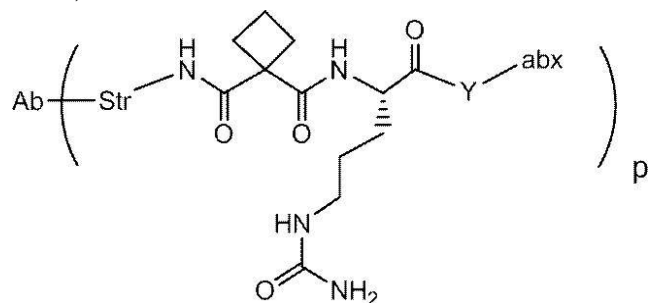
下式：

i)



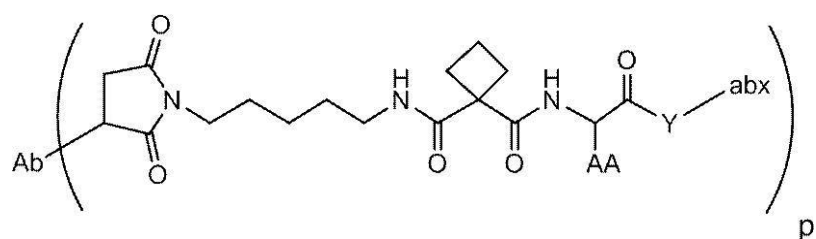
;

ii)



;

iii)



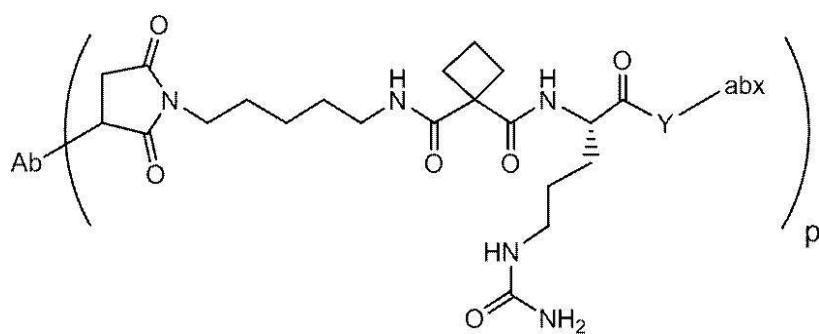
;

iv)

20

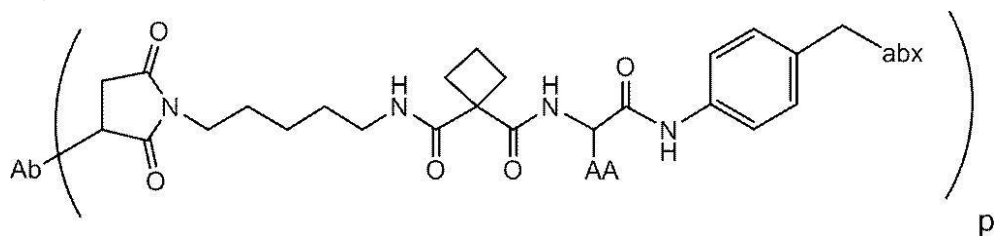
30

40



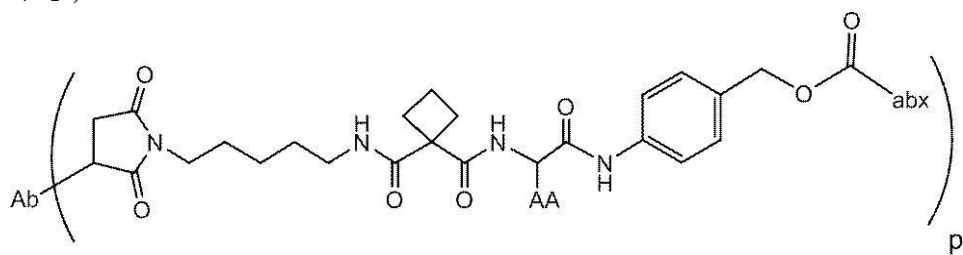
;
v)

10



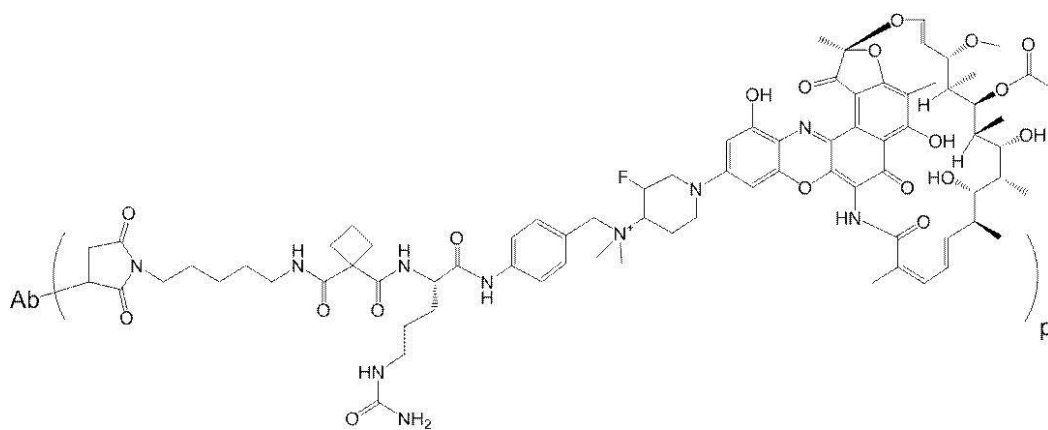
;
vi)

20



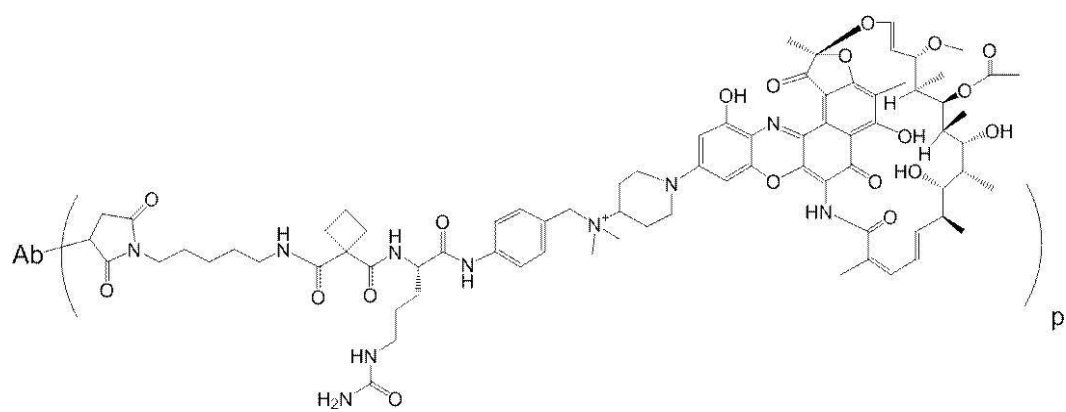
;
vii)

30

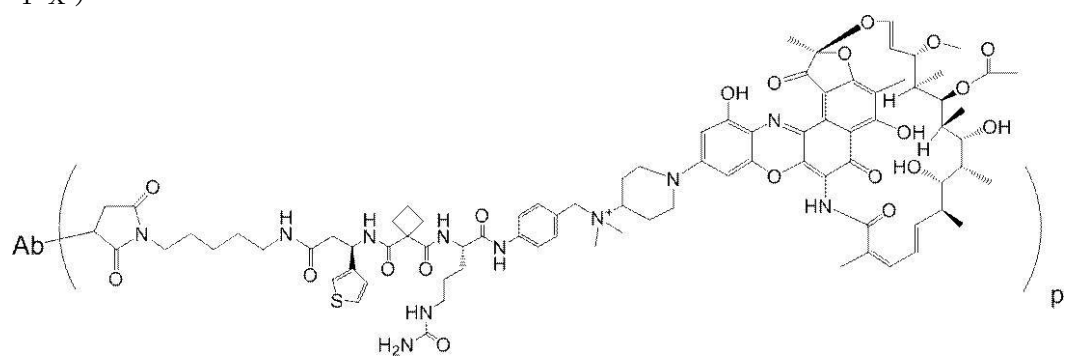


;
viii)

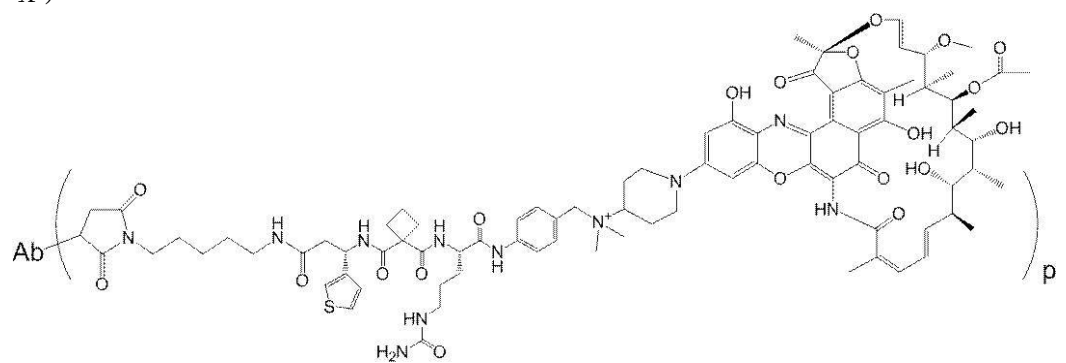
40



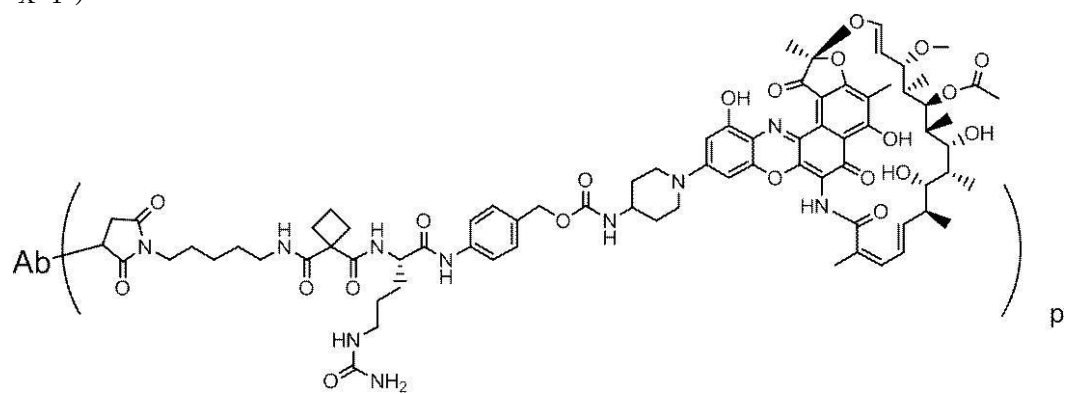
;
i x)



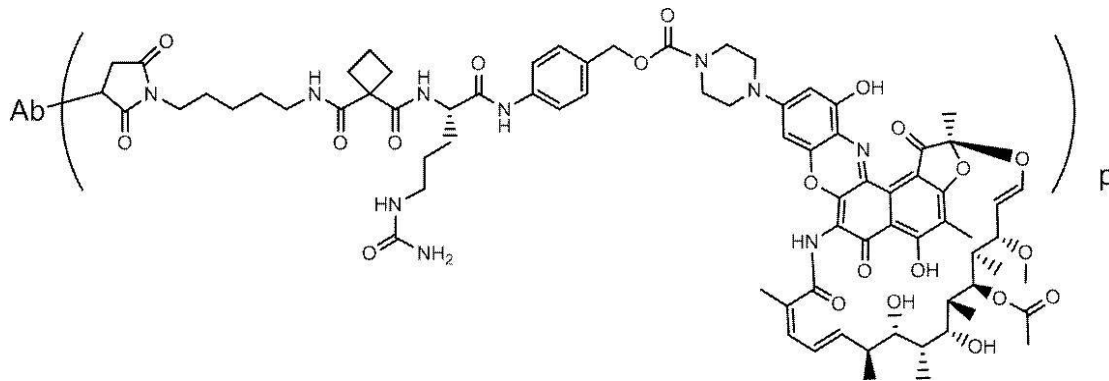
;
x)



;
x i)



; 及び
x i i)



10

から選択される、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 1 5】

前記抗 S D R 抗体が、軽（L）鎖及び重（H）鎖を含み、かつ

i) 前記 L 鎖が、配列番号 4 を含む C D R L 1、配列番号 5 を含む C D R L 2、及び配列番号 6 を含む C D R L 3 を含み、前記 H 鎖が、配列番号 1 を含む C D R H 1、配列番号 2 を含む C D R H 2、及び配列番号 3 を含む C D R H 3 を含む；

i i) 前記 L 鎖が、配列番号 4 を含む C D R L 1、配列番号 5 を含む C D R L 2、及び配列番号 7 を含む C D R L 3 を含み、前記 H 鎖が、配列番号 1 を含む C D R H 1、配列番号 2 を含む C D R H 2、及び配列番号 3 を含む C D R H 3 を含む；または

i i i) 前記 L 鎖が、配列番号 4 を含む C D R L 1、配列番号 5 を含む C D R L 2、及び配列番号 6 を含む C D R L 3 を含み、前記 H 鎖が、配列番号 1 を含む C D R H 1、配列番号 8 を含む C D R H 2、及び配列番号 3 を含む C D R H 3 を含む、

20

請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 1 6】

前記抗 S D R 抗体が重鎖可変領域（V H）を含み、前記 V H が、配列番号 1 3 の前記 V H の領域の長さにならって少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 1 7】

前記抗 S D R 抗体が、軽鎖可変領域（V L）を含み、前記 V L が、配列番号 1 4 または配列番号 1 5 の前記 V L の領域の長さにならって少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

30

【請求項 1 8】

前記抗 S D R 抗体が、インビボで *Staphylococcus aureus* 及び／または *Staphylococcus epidermidis* に結合する、請求項 1 または請求項 1 5 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 1 9】

前記抗体が、F（a b）または F（a b'）₂ である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物、薬学的に許容される担体、滑剤、希釈剤、または賦形剤を含む、薬学的組成物。

40

【請求項 2 1】

治療有効量の請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物を含む、患者における *Staphylococcal* 細菌感染を治療するための医薬。

【請求項 2 2】

前記患者が *Staphylococcus aureus* に感染している、請求項 2 1 に記載の医薬。

【請求項 2 3】

前記患者が *Staphylococcus epidermidis* に感染している、請求項 2 1 に記載の医薬。

50

【請求項 24】

前記抗体－抗生物質抱合体化合物が、 $50\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ の範囲の用量で前記患者に投与される、請求項 21 に記載の医薬。

【請求項 25】

前記患者が、第 2 の抗生物質による治療と併せて前記抗体－抗生物質抱合体化合物を投与される、請求項 21 に記載の医薬。

【請求項 26】

請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物を含む、宿主細胞を死滅させることなく、*Staphylococcus aureus* 感染患者の細胞における細胞内 *Staphylococcus aureus* を死滅させるための医薬。

10

【請求項 27】

請求項 1 に記載の抗体－抗生物質抱合体化合物の作製プロセスであって、リファマイシン型抗生物質を抗 SDR 抗体に抱合することを含む、プロセス。

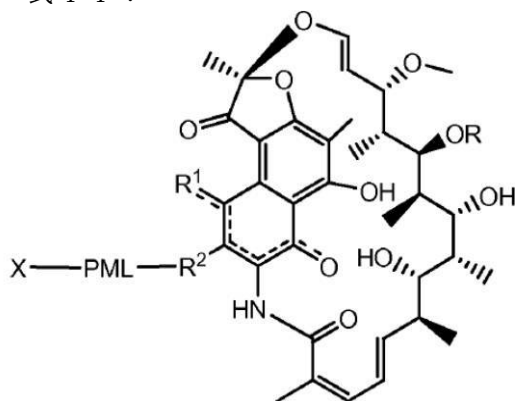
【請求項 28】

細菌感染症を治療するためのキットであって、

- a) 請求項 20 に記載の薬学的組成物と、
- b) 使用説明書と、を含む、キット。

【請求項 29】

式 I I :



20

30

I I

を有する抗生物質－リンカー中間体であって、式中、破線が、任意選択の結合を示し、

R が、H、 C_1-C_{12} アルキル、または $C(O)CH_3$ であり、

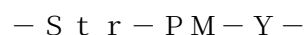
R^1 が OH であり、

R^2 が $CH=N-$ (ヘテロシクリル) であり、前記ヘテロシクリルが、任意選択で、 $C(O)CH_3$ 、 C_1-C_{12} アルキル、 C_1-C_{12} ヘテロアリール、 C_2-C_{20} ヘテロシクリル、 C_6-C_{20} アリール、及び C_3-C_{12} カルボシクリルから独立して選択される 1 つ以上の基で置換されるか、

あるいは R^1 及び R^2 が、5 員若しくは 6 員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合 6 員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、前記スピロ若しくは縮合 6 員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環が、任意選択で、H、F、Cl、Br、I、 C_1-C_{12} アルキル、または OH によって置換されており、

40

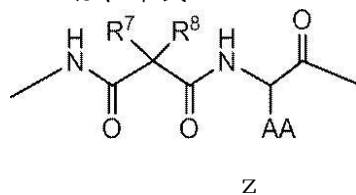
PML が、 R^2 に結合されたプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー、または R^1 及び R^2 によって形成された前記縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルであり、下式：



(式中 Str はストレッチャー単位であり、PM はペプチド模倣単位であり、Y はスペーサー単位である) を有し、

50

Xが、マレイミド、チオール、アミノ、ブロミド、ブロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p-トルエンスルホネート、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジルジスルフィド、及びN-ヒドロキシコハク酸イミドから選択される反応性官能基であり、PMは、下式：



を有し、

10

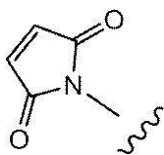
R^7 及び R^8 が一緒に $C_3 - C_7$ シクロアルキル環を形成し、かつ

AAが、H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2(C_6H_5)$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $-CHCH(CH_3)CH_3$ 、及び $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ から選択されるアミノ酸側鎖である

抗生物質-リンカー中間体。

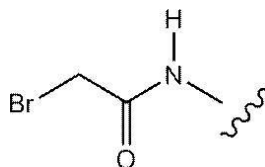
【請求項30】

Xが、



20

または

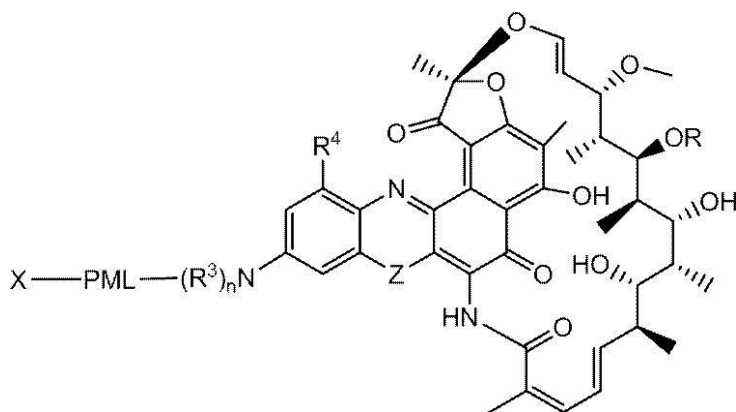


である、請求項29に記載の抗生物質-リンカー中間体。

【請求項31】

下式：

30



40

を有し、式中、

R^3 が、H及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから独立して選択され、

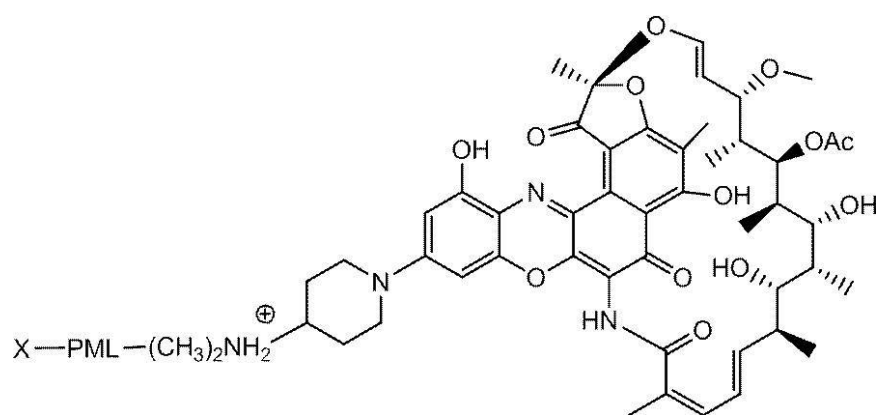
nが、1または2であり、

R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、及びOHから選択され、

Zが、NH、N($C_1 - C_{12}$ アルキル)、O、及びSから選択される、請求項29に記載の抗生物質-リンカー中間体。

【請求項32】

下式：

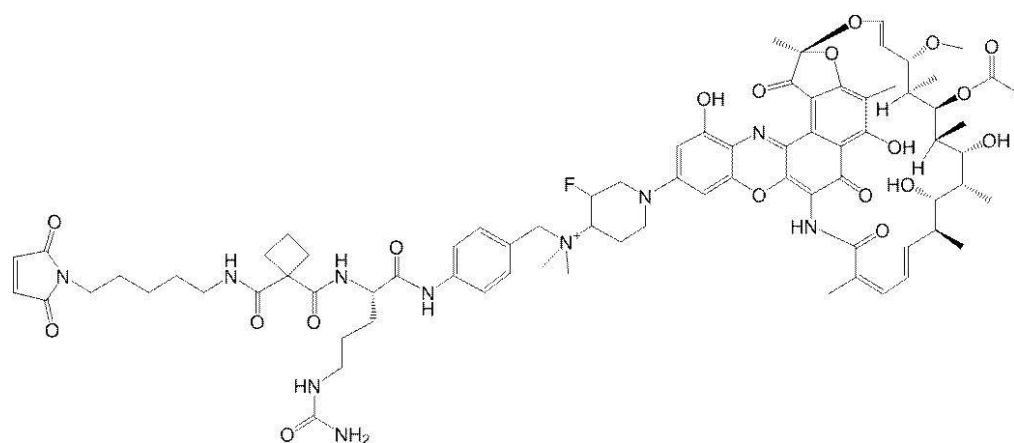


10

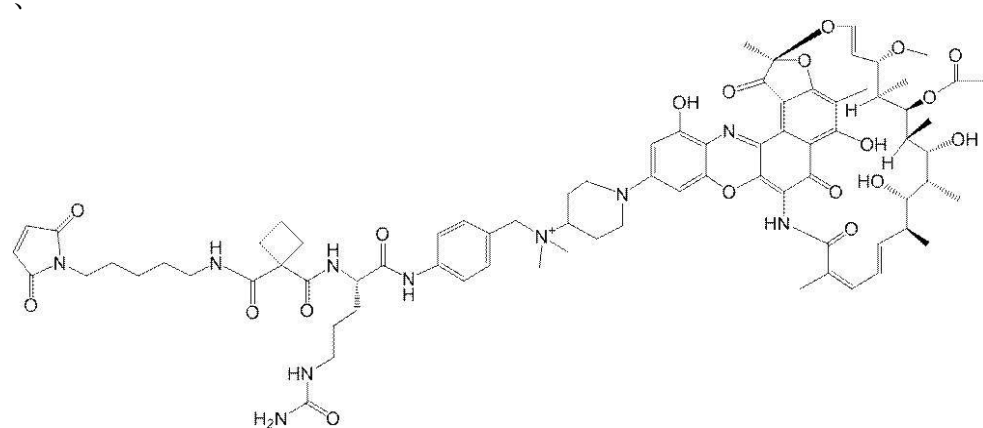
を有する、請求項 29 に記載の抗生物質－リンカー中間体。

【請求項 33】

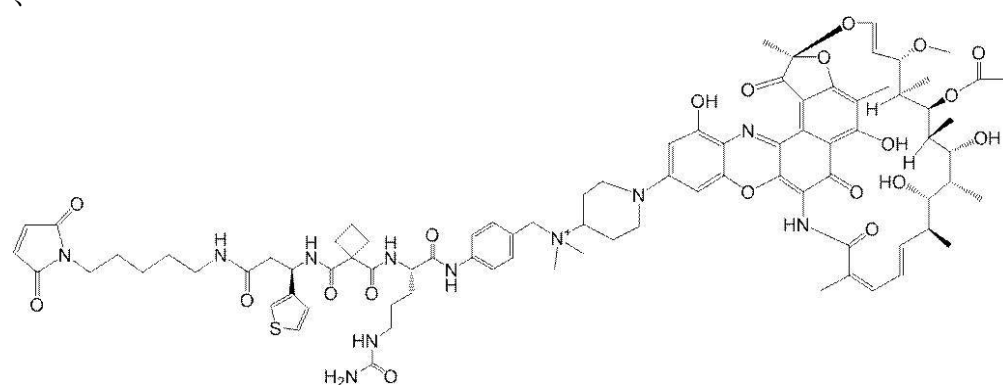
下式：



20

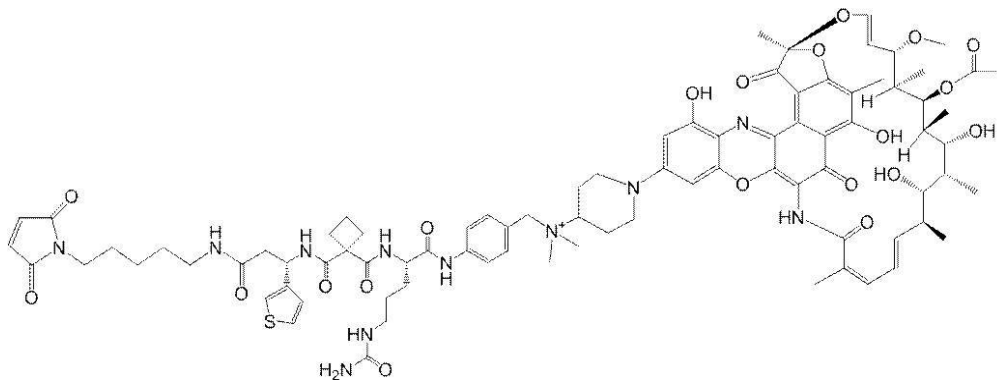


30

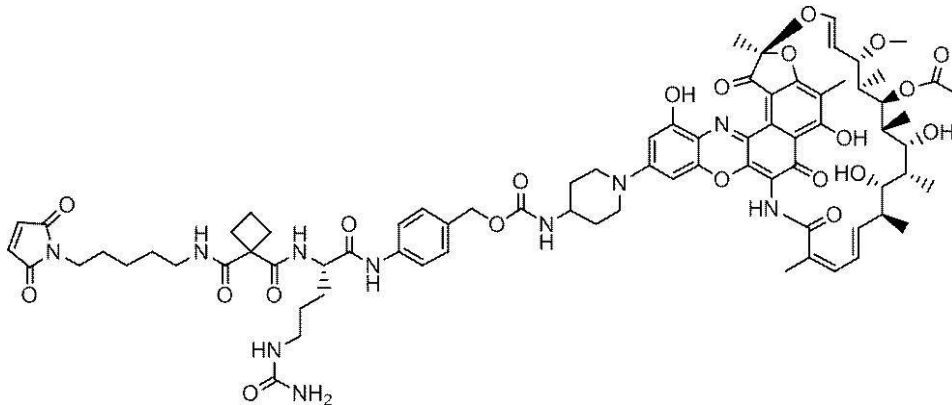


40

50

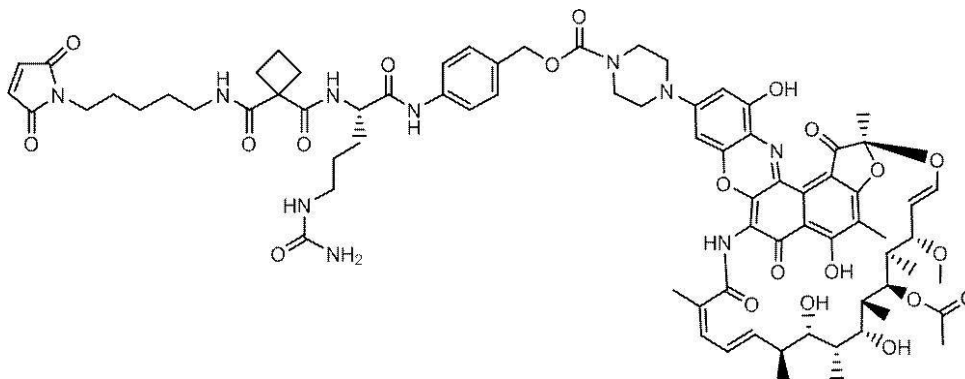


10



20

、及び



30

から選択される、請求項 29 に記載の抗生物質－リンカー中間体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年12月3日に提出された米国仮特許出願第62／087,213号の利益を主張し、全ての目的においてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。該ASCIIのコピーは、2015年12月1日に作成され、P32350WO_PCTSequenceListing.txtという名称であり、26,747バイトの大きさである。

【0003】

本発明は、リファマイシン型抗生物質に抱合された抗Staphylococcus抗体、及び得られた抗体－抗生物質抱合体の、Staphylococcus感染症の治療

50

における使用に関する。

【背景技術】

【0004】

Staphylococcus aureus 及び *S. epidermidis* は、主に鼻孔及び皮膚にコロニー形成する成功裏のヒト共生生物である。*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; SA) は様々な組織にも浸潤し、致命的な感染症を引き起こす場合があり、世界的にヒトにおける細菌感染症の主要な原因である。最近出現した *S. aureus* 株は、さもなければ健康な個体に疾患をもたらす増加した病原性及び増強した能力を示す。過去数十年にわたって、*S. aureus* の感染は、既知の全てのベータラクタム系抗生物質に耐性であるメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) の出現及びその急速な伝播により、治療が増々困難になっている (Boucher, H. W., et al. (2009) Clin Infect Dis 48, 1-12)。現在、最も流行性で、最も病原性のメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) 臨床株は USA300 であり、これは大量の病原性因子を産生する能力を有し、感染した個体を死亡させる (Chambers, HF and Deleo FR (2009) Nature Reviews Microbiology 7:629-641)。心内膜炎、骨髄炎、壊死性肺炎、及び敗血症などの最も重篤な感染症は、細菌の血流内への拡散後に生じる (Lowy, F. D. (1998) N ENGL J MED 339, 520-532)。*S. aureus* に近縁である *S. epidermidis* は、院内感染と関係することが多く、留置医療装置の最も一般的な感染源を表している。

【0005】

宿主組織への *Staphylococcal* の付着及びその成功裏のコロニー形成に重要なのは、*Staphylococci* に存在する付着性 A ドメインに隣接するセリン-アスパラギン酸ジペプチド (SDR) リピートの大きな広がりの特徴とする細胞壁タンパク質のファミリーである (Foster TJ, Hook M (1998) Trends Microbiol 6:484-488)。付着に重要なこのようなタンパク質は、クランピング因子 (Clf) A 及び Clf B (Foster TJ、上記) を含む。Clf A 及び Clf B に加えて、*S. aureus* は Sdr C、Sdr D、及び Sdr E の3つの SDR タンパク質も発現し、これはゲノムにおいてタンデムに組織される。これらのタンパク質は組織コロニー形成にも関与し、それらのうちのいずれかの排除が細菌の病原性を低下させると考えられている (Cheng AG, et al. (2009) FASEB Journal 23:3393-3404)。このファミリーの3つの追加のメンバーである Srd F、Srd G、及び Srd H は大半の *S. epidermidis* 株に存在する (McCrea KW, et al. (2000) The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 146 (Pt 7):1535-1546)。これらのタンパク質の各々において、25~275 SD ジペプチドリピートを含有する SDR 領域 (配列番号 24) は、N 末端リガンド結合 A ドメインと C 末端 LPXTG モチーフ (配列番号 25) との間に位置し、これはトランスペプチダーゼソルターゼ A による細胞壁への固着を媒介する。SDR ドメインの機能は未知のままであるが、これらのタンパク質の N 末端リガンド結合部位の露出を可能にする細胞壁貫通ドメインとして作用することが提案されている (Hartford O, et al. (1997) Mol Microbiol 25:1065-1076)。

【0006】

S. aureus 及び *S. epidermidis* の全ての SDR タンパク質の SDR ドメインが、2 段階でグリコシル化に関与する2つの新しい糖転移酵素である Sdg A 及び Sdg B により高度にグリコシル化されることが分かった (Hazenbos et al. (2013) PLOS Pathogens 9 (10):1-18)。これらのグリコシル化事象は宿主プロテアーゼによるこれらのタンパク質の分解を阻止し、それに

より細菌と宿主組織との相互作用を保つ。Hazenbos et al. (2013) はまた、SdgB媒介グリコシル化がヒトにおいて高オプソニン性抗体の免疫優性エピートを生成することも示した。これらの抗体は、総抗Staphylococcal IgG応答のかかなりの割合を占める。

【0007】

侵襲性MRSA感染症は治療が難しく、死亡率は約20%であり、米国において感染体による死亡の主要な原因である。バンコマイシン、リネゾリド、及びダプトマイシンは、よって、侵襲性MRSA感染症を治療するための少ない選択抗生物質となった(Boucher, H., Miller, L. G. & Razonable, R. R. (2010) Clin Infect Dis 51 Suppl 2, S183-197)。しかしながら、バンコマイシンに対する感受性の低下ならびにリネゾリド及びダプトマイシンに対する交差耐性がMRSA臨床株において既に報告されている(Nannini, E., Murray, B. E. & Arias, C. A. (2010) Curr Opin Pharmacol 10, 516-521)。徐々に、耐性を克服するために必要なバンコマイシン用量が腎毒性が生じるレベルまで上昇している。よって、これらの抗生物質にも関わらず、侵襲性MRSA感染症の死亡率及び罹患率が高いままである。

【0008】

研究により、S. aureusが細菌クリアランスに関与する貪食細胞を含む哺乳類細胞内に浸潤し、その中で生存できることが明らかになった。(Thwaites, G. E. & Gant, V. (2011) Nat Rev Microbiol 9, 215-222); Rogers, D. E., Tompsett, R. (1952) J. Exp. Med 95, 209-230); Gresham, H. D., et al. (2000) J Immunol 164, 3713-3722); Kapral, F. A. & Shayegani, M. G. (1959) J Exp Med 110, 123-138; Anwar, S., et al. (2009) Clin Exp Immunol 157, 216-224); Fraunholz, M. & Sinha, B. (2012) Front Cell Infect Microbiol 2, 43); Garzoni, C. & Kelley, W. L. (2011) EMBO Mol Med 3, 115-117)。S. aureusは、静脈内感染後数分以内に宿主貪食細胞、主に好中球及びマクロファージに取り込まれる(ROGERS, D. E. (1956) JEM 103, 713)。大部分の細菌はこれらの細胞によって効果的に死滅するが、血液媒介貪食細胞内のS. aureusの不完全なクリアランスにより、これらの感染した細胞が初期の感染部位から離れた細菌の拡散のための「トロイの木馬」のように作用することが可能となり得る。実際、正常な好中球数を有する患者は、減少した好中球数を有する患者よりも拡散性疾患になり易い場合がある(THWAITES, G. E. & GANT, V. (2011)、上記)。一旦組織に送達されると、S. aureusは様々な非貪食細胞型を浸潤することができ、組織中の細胞内S. aureusは慢性または再発感染と関係する。さらに、細胞内細菌を最適以下の抗生物質濃度に曝すことにより、抗生物質耐性株の出現を促し、よってこの臨床問題がより深刻なものとする。これらの知見と一致して、バンコマイシンまたはダプトマイシンを用いた菌血症または心内膜炎などの侵襲性MRSAを有する患者の治療は、50%を超える失敗率と関係する(Kullar, R., Davis, S. L., Levine, D. P. & Rybak, M. J. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 52, 975-981 (2011); Fowler, V. G., Jr. et al. Daptomycin versus stan

10

20

30

40

50

standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. The New England journal of medicine 355, 653-665 (2006); Yoon, Y. K., Kim, J. Y., Park, D. W., Sohn, J. W. & Kim, M. J. Predictors of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in patients treated with vancomycin. The Journal of antimicrobial chemotherapy 65:1015-1018 (2010)). したがって、より成功裏の抗 *Staphylococcal* 療法は細胞内細菌の排除を含むべきである。

10

【0009】

アンサマイシンは、リファマイシン、リファンピン、リファンピシン、リファブチン、リファベンチン、リファラジル、ABI-1657、及びこれらの類似体を含む、細菌RNAポリメラーゼを阻害し、グラム陽性及び選択的グラム陰性細菌に対して例外的な効力を有する抗体のクラスである (Rothstein, D. M., et al (2003) Expert Opin. Invest. Drugs 12 (2): 255-271, US7342011, US7271165)。

【0010】

S. aureus (MRSAを含む) 感染を防止及び治療するための免疫療法が報告された。US2011/0262477は、MRSAに対する免疫応答を刺激するために、ワクチンとして細菌付着タンパク質であるEap、Emp、及びAdsAの使用を示している。WO2000071585は、特定の*S. aureus*株の分離株に対して反応性である単離したモノクローナル抗体を説明している。US20110059085A1は、1つ以上のSA莢膜抗原に特異的なIgM Abを利用するAbに基づいた戦略を提案するが、実際の抗体は説明されていない。

20

【0011】

免疫複合体としても知られる抗体-薬物抱合体 (ADC) は、強力な細胞傷害性薬物を抗原発現腫瘍細胞に標的指向し (Teicher, B. A. (2009) Curr. Cancer Drug Targets 9:982-1004)、それにより、有効性を最大化し、オフターゲット毒性を最小化することにより治療指数を増強することで、抗体と細胞傷害性薬物の両方の理想的な特性を組み合わせる標的化学療法分子である (Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer J. 14 (3): 154-169, Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107。ADCは、リンカー単位を通して細胞傷害性薬物部分に共有結合されるターゲティング抗体を含む。免疫複合体は、非抱合型薬物の全身投与が正常な細胞ならびに排除されることが求められる腫瘍細胞に対して許容できないレベルの毒性をもたらし得る、薬物部分の腫瘍への標的送達、及びその中での細胞内蓄積を可能にする (Polakis P. (2005) Curr. Opin. Pharmacol. 5:382-387)。

30

40

【0012】

敗血症を治療するための、抗生物質を介した標的細菌の表面に結合する非特異的免疫グロブリン-抗生物質複合体が説明されている (US5545721、US6660267)。細菌抗原に特異的な抗原結合部分 (SA莢膜多糖など) を有するが、細菌Fc結合タンパク質、例えば *Staphylococcal* プロテインAと反応する定常領域を欠く抗生物質抱合型抗体が説明されている (US7569677)。

【0013】

従来の抗生物質に対するMRSAの驚くべき速さの耐性、ならびに侵襲性MRSA感染症により結果として生じる死亡率及び罹患率を考慮すると、*S. aureus* 感染症を治療するための新規治療薬の大きな未解決課題が存在する。本発明は、現在の治療組成物の

50

限界を克服し、以下の詳細な説明から明らかである追加の利点を提供する組成物及び使用を提供することによりこの必要性を満たす。

【発明の概要】

【0014】

本発明は、細胞内細菌の排除を含む独特な療法を提供する。本発明は、このような療法がバンコマイシンのような従来の抗生物質が機能しないインピボで有効であることを示す。

【0015】

本発明は、1つ以上のリファマイシン型抗生物質部分への共有結合により抱合された抗体を含む、「抗体-抗生物質抱合体」または「AAC」と称される組成物を提供する。

10

【0016】

本発明の態様は、プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーによってリファマイシン型抗生物質に共有結合される r F 1 抗体を含む抗体-抗生物質抱合体化合物である。

【0017】

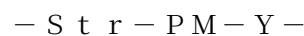
本発明の例示的な実施形態は、下式：



を有し、式中、

A b は、r F 1 抗体であり、

P M L は、下式：



20

(式中、S t r はストレッチャー単位であり、P M はペプチド模倣単位であり、Y はスパーサー単位である)を有するプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーであり、

a b x が、リファマイシン型抗生物質であり、

p が 1 ～ 8 の整数である、抗体-抗生物質抱合体である。

【0018】

先行実施形態のいずれかの抗体-抗生物質抱合体化合物は、本明細書に記載される抗 S D R A b のうちのいずれか 1 つ、及び具体的には r F 1 抗体を含み得る。これらの r F 1 抗体は S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s に結合する。例示的な r F 1 抗体において、A b は、軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を含むモノクローナル抗体であり、L 鎖は、C D R L 1、C D R L 2、及び C D R L 3 を含み、H 鎖は、C D R H 1、C D R H 2、及び C D R H 3 を含み、この C D R H 1、C D R H 2、及び C D R H 3、ならびに C D R L 1、C D R L 2、及び C D R L 3 は、表 4 A 及び 4 B に示されるように、それぞれ、A b F 1 (配列番号 1 ～ 6)、r F 1 (配列番号 1 ～ 5、7)、r F 1 . v 1 (配列番号 1、8、3、4 ～ 6) の各々の C D R のアミノ酸配列を含む。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、r F 1 抗体は重鎖可変領域 (V H) を含み、この V H は、配列番号 13 の V H 配列から選択される V H 領域の長さにわたって少なくとも 95% の配列同一性を有する。本抗体は L 鎖可変領域 (V L) をさらに含んでも良く、この V L は、それぞれ、抗体 r F 1 及び r F 1 . v 6 の配列番号 14 及び配列番号 15 の V L 配列から選択される V L 領域の長さにわたって少なくとも 95% の配列同一性を有する。

40

【0020】

特定の実施形態では、r F 1 抗体は次の L と H 鎖の対を含む：配列番号 10 の配列を含む H 鎖と対合される配列番号 9 の配列を含む L 鎖、配列番号 10 の配列を含む H 鎖と対合される配列番号 11 の配列を含む L 鎖、配列番号 12 の配列を含む H 鎖と対合される配列番号 11 の配列を含む L 鎖。

【0021】

先行実施形態のいずれか 1 つにおいて、本抗体は F c 領域を欠く抗原結合断片であって良い。いくつかの実施形態では、本抗体は F (a b) または F (a b')₂ である。いくつかの実施形態では、本抗体は重鎖定常領域及び／または軽鎖定常領域をさらに含み、この重鎖定常領域及び／または軽鎖定常領域は、システイン残基で置換される 1 つ以上のア

50

ミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域はアミノ酸置換A118C及び／若しくはS400Cを含み、ならびに／または軽鎖定常領域はアミノ酸置換V205Cを含み、この番付システムはEU番付に従う。

【0022】

上述の抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、抗体はIgMアイソタイプではない。上述の抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgE、IgD、またはIgA（例えば、IgA1またはIgA2）アイソタイプである。

【0023】

本発明の例示的な実施形態は、抗体－抗生物質抱合体化合物、及び薬学的に許容される担体、滑走剤、希釈剤、または賦形剤を含む薬学的組成物である。

10

【0024】

本発明の別の態様は、治療有効量の、先行実施形態のいずれかの抗体－抗生物質抱合体を感染患者に投与することを含む、細菌感染症の治療方法である。本発明の別の態様は、治療有効量の本発明の抗体－抗生物質抱合体を患者に投与することを含む、患者におけるStaphylococcal感染症の治療方法である。一実施形態では、患者はヒトである。一実施形態では、患者は、Staphylococcus aureus及び／またはS. epidermidis感染症に感染している。いくつかの実施形態では、患者はS. aureus感染症と診断された。いくつかの実施形態では、細菌感染症の治療は細菌負荷または細菌数を減少させることを含む。

20

【0025】

本発明の別の態様は、治療有効量の、先行実施形態のいずれか1つの抗体－抗生物質抱合体を患者に投与することを含む、感染患者におけるStaphylococcal感染症の治療方法である。一実施形態では、患者はヒトである。一実施形態では、細菌感染症はStaphylococcus aureus感染症である。いくつかの実施形態では、患者はS. aureus感染症と診断された。いくつかの実施形態では、細菌感染症の治療は細菌負荷または細菌数を減少させることを含む。

【0026】

先行治療方法のいずれかの一実施形態では、S. aureusを含む細菌感染症が菌血症を引き起こした患者に投与される。特定の実施形態では、本方法は、Staphylococcal心内膜炎または骨髓炎を治療するために使用される。一実施形態では、抗体－抗生物質抱合体化合物は、約50mg/kg～100mg/kgの範囲の用量で感染患者に投与される。

30

【0027】

上記実施形態のいずれかのrF1抗生物質抱合体化合物を投与することによる、宿主細胞を死滅させることのない、S. aureus感染患者の細胞における細胞内S. aureusの死滅方法も提供する。生残菌細菌を先行実施形態のいずれかのAACと接触させることにより、インビボで生残菌Staphylococcal細菌細胞（例えばS. aureus）を死滅させるための別の方法が提供される。

【0028】

別の実施形態では、治療方法は、第2の治療薬を投与することをさらに含む。さらなる実施形態では、第2の治療薬は、一般にStaph aureus、または特にMRSAに対する抗生物質を含む抗生物質である。

40

【0029】

一実施形態では、本発明の抗体－抗生物質抱合体化合物と併用して投与される第2の抗生物質は、(i) アミノグリコシド、(ii) ベータラクタム、(iii) マクロライド／環状ペプチド、(iv) テトラサイクリン、(v) フルオロキノロン／フルオロキノロン、(vi) 及びオキサゾリジノンの構造クラスから選択される。

【0030】

一実施形態では、本発明の抗体－抗生物質抱合体化合物と併用して投与される第2の抗

50

生物質は、クリンダマイシン、ノボビオシン、レタパムリン、ダプトマイシン、GSK-2140944、CG-400549、シタフロキサシン、テイコプラニン、トリクロサン、ナフチリドン、ラデゾリド、ドキシソルビシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタビン、ダルババンシン、及びアジスロマイシンから選択される。

【0031】

本明細書のいくつかの実施形態では、感染患者における細菌負荷は治療後に検出不可能なレベルまで低下した。一実施形態では、治療前の陽性血液培養物と比較して、治療後の患者の血液培養物は陰性である。本明細書のいくつかの実施形態では、対象における細菌耐性は検出不可能であるか、または低い。本明細書のいくつかの実施形態では、患者はメチシリンまたはバンコマイシンを用いた治療に応答しない。

10

【0032】

本発明の例示的な実施形態は、リファマイシン型抗生物質を rF1 抗体に抱合することを含む、抗体-抗生物質抱合体の作製プロセスである。

【0033】

本発明の例示的な実施形態は、

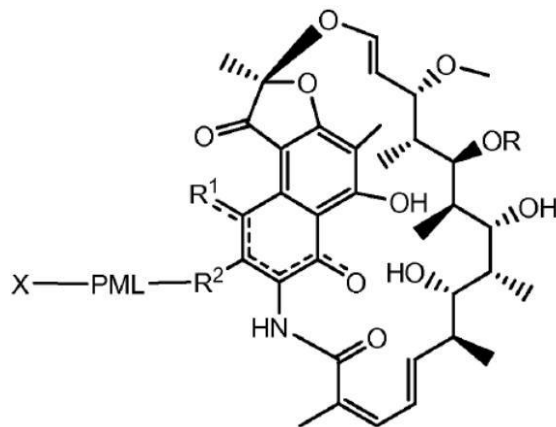
a) 抗体-抗生物質抱合体化合物、及び薬学的に許容される担体、滑走剤、希釈剤、または賦形剤を含む薬学的組成物と、

b) 使用説明書と、を含む、細菌感染症の治療キットである。

20

【0034】

本発明の態様は、式 I I :



30

I I

を有する抗生物質-リンカー中間体であり、式中、

破線が、任意選択の結合を示し、

R が、H、C₁-C₁₂ アルキル、または C(O)CH₃ であり、

R¹ が OH であり、

R² が CH=N- (ヘテロシクリル) であり、ヘテロシクリルが、任意選択で、C(O)CH₃、C₁-C₁₂ アルキル、C₁-C₁₂ ヘテロアリール、C₂-C₂₀ ヘテロシクリル、C₆-C₂₀ アリール、及び C₃-C₁₂ カルボシクリルから独立して選択される 1 つ以上の基で置換されるか、

40

あるいは R¹ 及び R² が、5 員若しくは 6 員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合 6 員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、このスピロまたは縮合 6 員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環は、任意選択で、置換 H、F、Cl、Br、I、C₁-C₁₂ アルキル、または OH であり、

PML が、R² に結合されたプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー、または R¹ 及び R² によって形成された縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルであり、下式：

50

- S t r - P M - Y -

(式中 S t r はストレッチャー単位であり、P M はペプチド模倣単位であり、Y はスペーサー単位である)を有し、

X が、マレイミド、チオール、アミノ、ブロミド、ブロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p-トルエンスルホネート、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジルジスルフィド、及びN-ヒドロキシコハク酸イミドから選択される反応性官能基である。

【0035】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの1つ、いくつか、または全てを組み合わせて、本発明の他の実施形態を形成しても良いことを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者には明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1A~1Fは、MRSAの細胞内貯蔵は、インビボ及びインビトロにおいてバンコマイシンから保護される。

【図1A】遊離細菌(プランクトン)対細胞内細菌を生成するための実験設計の概略図を示す。静脈内注射により、4つのマウスコホートをほぼ等用量の生存可能遊離細菌または細胞内細菌に感染させ、感染直後、次いで1日1回、選択群をバンコマイシンで治療した(実施例2を参照されたい)。

【図1B】感染4日後の感染マウスの腎臓及び脳における細菌負荷を示す。破線はアッセイの検出限界を示す。

【図1C】感染4日後の感染マウスの腎臓及び脳における細菌負荷を示す。破線はアッセイの検出限界を示す。

【図1D】感染可能細胞の単層上で培養されたとき、MRSAがバンコマイシンから保護されることを示す。(ND=検出なし)。

【図1E】感染可能細胞の単層上で培養されたとき、MRSAがバンコマイシン(vancomycin)の存在下で成長可能であることを示す。MRSA(遊離細菌)を、培地、培地+バンコマイシン、または培地+バンコマイシン中に播種し、MG63骨芽細胞(図1E)またはヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC、図1F)の単層上で平板培養した。細胞外細菌(遊離細菌)は培地単独中で良好に成長したが、バンコマイシンによって死滅した。哺乳類細胞の単層を含有するウェル(細胞内+バンコマイシン)では、感染から8時間の間、わずかな細菌がバンコマイシンから保護され、24時間にわたって細胞内区画内に広がる事ができた。エラーバーは、3連ウェルの標準偏差を示す。

【図1F】感染可能細胞の単層上で培養されたとき、MRSAがバンコマイシン(vancomycin)の存在下で成長可能であることを示す。MRSA(遊離細菌)を、培地、培地+バンコマイシン、または培地+バンコマイシン中に播種し、MG63骨芽細胞(図1E)またはヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC、図1F)の単層上で平板培養した。細胞外細菌(遊離細菌)は培地単独中で良好に成長したが、バンコマイシンによって死滅した。哺乳類細胞の単層を含有するウェル(細胞内+バンコマイシン)では、感染から8時間の間、わずかな細菌がバンコマイシンから保護され、24時間にわたって細胞内区画内に広がる事ができた。エラーバーは、3連ウェルの標準偏差を示す。

【図2】抗体抗生物質抱合体(AAC)の概念を示す。一実施例では、AACは、リソソームプロテアーゼによって切断されるリンカーを介して強力なリファマイシン型抗生物質(例えばRifalogs)に結合されたS. aureusの表面上のエピトープに指向される抗体からなる。

【図3】抗体-抗生物質抱合体(AAC)の薬物活性化の可能な機構を示す。AACは抗体の抗原結合ドメイン(Fab)を介して細胞外細菌に結合し、Fc媒介貪食作用を介したオプソニン化細菌の取り込みを促進する。リンカーは、カテプシンBなどのリソソームプロテアーゼによって切断される。リンカーの切断後、リンカーは加水分解され、ファゴリソソーム内に遊離抗生物質を放出する。遊離抗生物質は、同じ区画に存在する任意の予め内在化した細菌と共にオプソニン化及び貪食化細菌を死滅させる。

【図4】図4A及び4Bは、セリンーアスパラギン酸（SDR）タンパク質の態様を示す。

【図4A】*S. aureus*及び*S. epidermidis*からの質量分析により明らかになったSDRタンパク質のアライメントを示す。SDR領域はハッチング線で示される。*S. aureus*上に複数のSDRタンパク質及びタンパク質当たり複数のエピトープが存在するため、rF1エピトープは存在量で表される。図4Aは、配列番号27として「SDSDSDSD」を開示する。

【図4B】SdgA及びSdgBによるSDRタンパク質の段階的グリコシル化を示すモデルである。最初に、SdgBはGlcNAc部分をSDRタンパク質上のSD領域上に付加し、その後、SdgAによりさらにGlcNAc修飾を行う。mAb rF1のエピトープは、SdgB依存GlcNAc部分を含む。データは、rF1がGlcNAc及びSD骨格の部分に結合することを示唆する。図4Bは、配列番号28として「SDSDSD」を開示する。

【図5】図5A、5B及び5Cは、mAb rF1が*S. aureus*細菌への確実な結合及びその死滅を呈することを示す。（図A～C）細菌は、huIgG1 mAbs rF1（四角）、4675抗ClfA（三角）、または抗ヘルペスウイルスgD（丸）でプレオプソニン化された。

【図5A】mAbのWT（USA300-Δspa）細菌への結合はフローサイトメトリーで評価され、平均蛍光強度（MFI）として表される。

【図5B】CFSE標識されたプレオプソニン化WT（USA300-Δspa）細菌をヒトPMNと共にインキュベートした。細菌取り込みは、フローサイトメトリーによるCD11b陽性細胞のゲーティング後のCFSE陽性PMNの%として表された。

【図5C】細菌死滅を評価するために、プレオプソニン化WT（USA300-Δspa）細菌をPMNと共にインキュベートした。1mL当たりの生存可能なCFUの数は、少なくとも3つの実験を代表する。

【図6】様々な感染組織からのrF1の*S. aureus*への結合のフローサイトメトリー分析を示す。均質化組織をmAb rF1（X軸）及び抗ペプチドグリカンmAb 702で2重染色し、組織破片（Y軸）と細菌を区別し（左側のパネル；ゲートは矢印で示される）、その後、ヒストグラム図を生成するために細菌をゲーティングする（Hazenbos et al. (2013) PLOS Pathogens 9(10):1-18、図1Dも参照されたい）。

【図7】フローサイトメトリーによるrF1の様々なStaphylococcal及び非Staphylococcalグラム陽性細菌種への結合を示す（Hazenbos et al. (2013) PLOS Pathogens 9(10):1-18、図1Eも参照されたい）。

【図8】非複製MRSAを死滅させるその能力に対する強力なリファマイシン型抗生物質（rifalog）ジメチルピペBORの選択を示す。

【図9】成長阻害アッセイは、抗生物質がカテプシンBを用いた処理によって放出されない限り、インタクトなTAC（AACの形態）がプランクトン細菌を死滅させないことを示す。TACを、緩衝剤のみと共にインキュベートする（白丸）か、またはカテプシンBで処理した（黒丸）。インタクトなTACは、一晩インキュベートした後、細菌の成長を阻止できなかった。カテプシンBでTACを予め処理することにより、0.006ug/mLの抗生物質を含有することが予想される0.6ug/mLのTACで、細菌の成長を阻止するための十分な抗生物質活性が放出された。

【図10】実施例19に記載されるインビトロマクロファージアッセイにおけるrF1-AACの有効性を示す。

【図11】図11A及び11Bは、実施例20に記載されるインビボでのrF1-AACの有効性を示す。*S. aureus*感染マウスをrF1-AACで処置することにより、裸抗体と比較して、感染臓器における細菌数を大幅に減少または根絶した。

【図11A】抗体当たり2つの抗生物質分子を含有するAAC（AAR2）で処置するこ

10

20

30

40

50

とにより、腎臓における細菌負荷が約30倍減少し、抗体当たり4つの抗生物質分子を含むAAC (AAR4) で処置することにより、細胞負荷が30,000倍超減少したことを示す。

【図11B】 AAC AAR2で処置することにより、心臓における細菌負荷が約70倍減少し、8匹のマウス中6匹が心臓において検出不可能な細菌レベルを有し、AAC AAR4で処置することにより、心臓における感染を完全に根絶し、結果として8匹のマウス中8匹が検出不可能な細菌レベルを有したことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0037】

ここで本発明のある特定の実施形態を詳細に参照するが、それらの例は、添付の構造及び式に例示される。本発明は、方法、材料、及び実施例を含む、列挙される実施形態と共に説明されるが、このような説明は非限定的であり、本発明は、それらが一般的に既知であるか、または本明細書に組み込まれるかに関わらず、全ての代替物、修正、及び等価物を網羅することが意図される。組み込まれる文献、特許、及び同様の資料のうちの1つ以上が、本出願（定義される用語、用語の用法、記載される技法等を含むがそれらに限定されない）と異なるか、または矛盾する場合は、本出願が優先される。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。当業者であれば、本発明の実施に使用することができる、本明細書に記載されるものに類似または同等である多数の方法及び材料を認識するであろう。本発明は、決して記載される方法及び材料に限定されるものではない。

【0038】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0039】

I. 一般的な技法

本明細書に記載の、または参照される技法及び手順は、一般的に当業者に十分に理解され、従来の方法論、例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)), シリーズの *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)), *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press, *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987), *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons, *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Mi

ller and M. P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)に記載される広く利用されている方法論などを用いて通常使用されている。

10

【0040】

20

本出願に使用される命名法は、別途示されない限り、IUPACシステム命名法に基づく。別途定義されない限り、本明細書に使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有し、それらは、Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY、及びJaneway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New Yorkと一致する。

【0041】

30

II. 定義

Staphylococcus aureus は、本明細書において、手短に *Staph A* または *S. aureus* とも称される。同様に、*Staphylococcus epidermidis* は、本明細書において、*Staph E* または *S. epidermidis* とも称される。

【0042】

「抗体抗生物質抱合体」またはAACは、リンカーによって抗生物質に化学結合される抗体から構成される化合物である。抗体は、細菌表面、例えば細菌細胞壁構成成分上の抗原またはエピトープに結合する。本明細書で使用される時、リンカーは、大半の哺乳類細胞型に見られるリソソームプロテアーゼであるカテプシンBを含む、プロテアーゼによって切断されるように設計されるプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーである (Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13: 855-869)。その3つの構成成分を有するAACのダイアグラムを図2に描写する。「THIOMAB (商標) 抗生物質抱合体」または「TAC」は、抗体が、1つ以上のシステイン、一般的に、抗原結合機能に干渉しないように、抗体上の特定の部位 (複数可) で抗体内に組換え操作されるシステインを介して、リンカー-抗生物質単位に化学的に抱合される、AACの形態である。

40

【0043】

置換基の数を示すとき、用語「1つ以上」は、1つの置換基から可能な限り高い数の置換の範囲、すなわち、1個の水素の置換から置換基による最大全ての水素の置換を指す。

50

用語「置換基」は、親分子上の水素原子を置換する原子または原子の基を示す。用語「置換された」は、指定された基が1つ以上の置換基を有することを示す。任意の基が複数の置換基を有し、様々な可能な置換基が提供される場合、置換基は独立して選択され、同じである必要はない。用語「置換されない」は、指定された基が置換基を有しないことを意味する。用語「任意選択で置換される」は、指定された基が置換されないか、または1つ以上の置換基により置換され、可能な置換基の群から独立して選択されることを意味する。置換基の数を示すとき、用語「1つ以上」は、1つの置換基から可能な限り高い数の置換、すなわち、1個の水素の置換から置換基による最大全ての水素の置換を意味する。

【0044】

用語「抗生物質」(a b xまたはA b x)は、具体的には、細菌などの微生物の成長を阻害する、またはそれを死滅させるが、投与される濃度及び投薬間隔で宿主に非致死性である、任意の分子を含む。特定の態様では、抗生物質は、投与される濃度及び投薬間隔で宿主に非毒性である。細菌に対して有効な抗生物質は、殺菌(すなわち、直接死滅させる)または静菌(すなわち、分裂を阻止する)のいずれかとして広く分類することができる。抗菌性抗生物質は、狭域または広域としてさらに分類することができる。広域抗生物質は、グラム陽性及びグラム陰性細菌の両方を含む広範囲の細菌に対して有効なものであり、対照的に、狭域抗生物質は、小さい範囲または特定のファミリーの細菌に対して有効である。抗生物質の例としては、(i)アミノグリコシド、例えば、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、パロマイシン、(ii)アンサマイシン、例えば、ゲルダナマイシン、ハービマイシン、(iii)カルバセフェム、例えば、ロラカルベフ、(iv)カルバペネム、例えば、エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン、メロペネム、(v)セファロスポリン(第1世代)、例えば、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファレキシン、(vi)セファロスポリン(第2世代)、例えば、セファクロル、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル、セフロキシム、(vii)セファロスポリン(第3世代)、例えば、セフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフタジジム、セフチブテン、セフチドキシム、セフトリアキソン、(viii)セファロスポリン(第4世代)、例えば、セフェピム、(ix)セファロスポリン(第5世代)、例えば、セフトビプロール、(x)糖ペプチド、例えば、テイコプラニン、バンコマイシン、(xi)マクロライド、例えば、アキシスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン、スペクチノマイシン、(xii)モノバクタム、例えば、アクストレオナム、(xiii)ペニシリン、例えば、アモキシシリン、アンピシリン、アキシロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、ペペラシリン、チカルシリン、(xiv)抗生物質ポリペプチド、例えば、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB、(xv)キノロン、例えば、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、レメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、(xvi)スルホンアミド、例えば、マフェニド、プロントジル、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルアミド、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、トリメトプリム、トリメトプリム-スルファメトキサゾール(TMP-SMX)、(xvii)テトラサイクリン、例えば、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、及び(xviii)アルスペナミン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、エタンブトール、ホスホマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、イソニアジド、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフラントイン、プラテンシマイシン、ピラジナミド、キヌプリスチン/ダルホプリスチン、リファンピン/リファンピシン、またはチニダゾールなどのその他が挙げられる。

【0045】

あるいは多剤耐性 *Staphylococcus aureus* またはオキサシリン耐

10

20

30

40

50

性 *Staphylococcus aureus* (ORSA) として知られる、用語「メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus*」(MRSA) は、ペニシリン (例えば、メチシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、オキサシリン等) 及びセファロsporinを含む、ベータラクタム系抗生物質に耐性である任意の *Staphylococcus aureus* 株を指す。「メチシリン感受性 *Staphylococcus aureus*」(MSSA) は、ベータラクタム系抗生物質に感受性である任意の *Staphylococcus aureus* 株を指す。

【0046】

用語「最小発育阻止濃度」(「MIC」) は、一晚インキュベートした後の微生物の視認できる成長を阻害する抗菌の最小濃度を指す。MICを決定するためのアッセイは既知である。方法の1つが以下の実施例のセクションにおいて説明される。

【0047】

用語「抗Staph抗体」及び「Staphに結合する抗体」は、抗体が標的 *Staphylococcus aureus* (「*S. aureus*」) における診断及び／または治療薬として有用であるように、十分な親和性で *S. aureus* 上の抗原に結合することが可能な抗体を指す。一実施形態では、抗Staph抗体の無関係の非Staphタンパク質への結合の程度は、例えば放射免疫アッセイ(RIA)により測定されたとき、抗体のMRSAへの結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、Staphに結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 4 \text{ nM}$ 、 $\leq 3 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、または $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$) の解離定数(Kd)を有する。ある特定の実施形態では、抗Staph抗体は、異なる種からのStaph間で保存されているStaphのエピトープに結合する。本明細書の抗Staph抗体は、*S. aureus*に加えて、少なくとも1つ以上の *Staphylococcal* 種に結合する抗体を指す。

【0048】

「SDR」はセリン-アスパラギン酸リピートを指し、SDRは、*staphylococci* に存在する付着性Aドメインに隣接するセリン-アスパラギン酸ジペプチドリートの大きな広がりの特徴とする、細胞壁タンパク質のファミリーに存在する (Foster TJ, Hook M (1998) Trends Microbiol 6:484-488)。付着に関与するこのようなタンパク質は、クリンピング因子である (ClfA及びClfBを含む。ClfA及びClfBに加えて、*S. aureus* はSdrC、SdrD、及びSdrEの3つのSDRタンパク質も発現する。このファミリーの追加の3つのメンバーであるSdrF、SdrG、及びSdrHは、大半の *S. epidermidis* 株に存在する (McCrea KW, et al. (2000) The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 146 (Pt 7):1535-1546)。これらのタンパク質の各々において、25~275SDジペプチドリートを含有するSDR領域(配列番号24)は、N末端リガンド結合AドメインとC末端LPXTGモチーフ(配列番号25)との間に位置する。

【0049】

「F1」と呼ばれる抗体は、US8,617,556 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) の図1に描写される重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列を有する。特にF1の抗原結合特性に寄与するF1のCDR配列も図1に描写される。抗体F1は、完全ヒトであり、*S. aureus* 及び *S. epidermidis* などの *Staphylococcus* 種に特異的に結合することができる。重要なことには、抗体F1はインビボならびにインビトロで全細菌に結合することができる。さらに、抗体F1は、例えば動物の感染組織において成長した細菌に結合することができる。組換え産生されたF1は、本明細書において「rF1」とも呼ばれる。rF1 (及びF1) 抗体は抗SDRモノクローナル

10

20

30

40

50

Abである。mAb rF1のエピトープは、SdgB依存GlcNAc部分を含む。データは、rF1がGlcNAc及びSD骨格の一部に結合することを示唆する。本明細書において使用される「rF1抗体」は、F1抗体、rF1抗体、ならびにrF1に対するrF1含有アミノ酸改変の全ての変異形を包含する。rF1及びバリエーション抗体のアミノ酸配列は以下に提供される。

【0050】

本明細書において、用語「抗体」は、最も広義に使用され、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及びこれらの抗原結合抗体断片を網羅する（Miller et al (2003) J. of Immunology 170:4854-4861）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、または他の種に由来するものであっても良い。抗体は、特定の抗原を認識し、それに結合することができる免疫系により生成されたタンパク質である（Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York）。標的抗原は一般に、複数の抗体のCDRによって認識される多数の結合部位（エピトープとも呼ばれる）を有する。異なるエピトープに特異的に結合する各抗体は異なる構造を有する。よって、1つの抗原は2つ以上の対応する抗体によって認識され、結合され得る。抗体には、完全長免疫グロブリン分子、または完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、対象の標的抗原またはその一部に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子が含まれ、そのような標的には、癌細胞、または自己免疫疾患、感染細胞、若しくは細菌などの微生物と関連する自己免疫抗体を産生する細胞が含まれるがこれらに限定されない。本明細書に開示される免疫グロブリン（Ig）は、IgM（例えば、IgG、IgE、IgD、及びIgA）及びサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2を除く任意のイソ型のものであってよい。免疫グロブリンは、任意の種に由来し得る。一態様では、Igは、ヒト、マウス、またはウサギ起源のものである。特定の実施形態では、Igはヒト起源のものである。

【0051】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの5つの主要な抗体クラスがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂にさらに分類され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。

【0052】

「未変性抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免疫グロブリン分子を指す。例えば、未変性IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン（variable heavy domain）または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン（variable light domain）または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの型うちの1つに割り付けられ得る。

【0053】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、本明細書において、未変性抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように互換的に使用される。

【0054】

抗体の「抗原結合断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部分を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、直鎖状抗体、1本鎖抗体分子（例えば、scFv）、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

本明細書に使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体を指す、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生の変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる、可能な変異形抗体は例外であり、このような変異形は、通常少量で存在する。IgG1抗体のこのような可能な変異形の1つは重鎖定常領域のC末端リジン（K）の切断である。異なる決定基（エピトープ）に指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物中の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に指向される。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に同種の抗体の集団から得られるときの抗体の特徴を示すものであり、任意の特定の手法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されない。例えば、本発明により使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない様々な技法によって作製することができ、このような方法及びモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法が本明細書に記載される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体が混入することなく合成することができるという点で、有利である。

【0056】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／または軽鎖の一部分が特定の源または種に由来する一方で、重鎖及び／または軽鎖の残りの部分は異なる源または種に由来する抗体を指す。

【0057】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源に由来する抗体に対応するアミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【0058】

「ヒト化抗体」は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そのHVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そのFRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでも良い。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0059】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原に結合することに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。未変性抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VH及びVL）は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al. *Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい。）抗原結合特異性を付与するためには、単一のVHまたはVLドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体のVHまたはVLドメインを使用して、それぞれ、相補的VLまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離しても良い。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352:

6 2 4－6 2 8 (1 9 9 1) を参照されたい。

【0 0 6 0】

用語「超可変領域」、「HVR」または「HV」は、本明細書で使用されるとき、配列中で超可変（「相補性決定領域」または「CDR」）であり、かつ／または構造的に定義されたループを形成し、かつ／または抗原接触残基（「抗原接触体」）を含有する、抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、このうち3つがVH（H1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。未変性抗体では、H3及びL3は、6つのHVRの中で最大の多様性を示し、特にH3は、抗体に微細特異性を付与することにおいて固有の役割を果たすと考えられる。例えば、Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)、Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる自然発生ラクダ抗体は、軽鎖の不在で機能的であり安定している (Hamers-Casterman et al., (1993) Nature 363:446-448、Sheriff et al., (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736)。

10

【0 0 6 1】

いくつかのHVR描写が本明細書において使用され、ここに包含される。Kabat相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置に言及する (Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917)。抗原接触体に関しては、MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) を参照されたい。AbM HVRは、KabatのHVRとChothiaの構造的ループとの間の妥協点を示し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらのHVRの各々からの残基を以下に記載する。

20

30

ル ー プ	K a b a t	A b M	C h o t h i a	接 触	
L 1	L 2 4 - L 3 4	L 2 4 - L 3 4	L 2 6 - L 3 2	L 3 0 - L 3 6	
L 2	L 5 0 - L 5 6	L 5 0 - L 5 6	L 5 0 - L 5 2	L 4 6 - L 5 5	
L 3	L 8 9 - L 9 7	L 8 9 - L 9 7	L 9 1 - L 9 6	L 8 9 - L 9 6	
H 1	H 3 1 - H 3 5 B	H 2 6 - H 3 5 B	H 2 6 - H 3 2	H 3 0 - H 3 5 B (K a b a t 番付)	10
H 1	H 3 1 - H 3 5	H 2 6 - H 3 5	H 2 6 - H 3 2	H 3 0 ~ H 3 5 (C h o t h i a 番付)	
H 2	H 5 0 - H 6 5	H 5 0 - H 5 8	H 5 3 - H 5 5	H 4 7 - H 5 8	
H 3	H 9 5 - H 1 0 2	H 9 5 - H 1 0 2	H 9 6 - H 1 0 1	H 9 3 - H 1 0 1	20

【0062】

HVRは、次の「拡張型HVR」を含み得る：VL内の24～36または24～34（L1）、46～56または50～56（L2）、及び89～97または89～96（L3）、ならびにVH内の26～35（H1）、50～65若しくは49～65（H2）、及び93～102、94～102、または95～102（H3）。別途示されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基、CDR残基、及び他の残基（例えばFR残基）は、本明細書において、Kabataら（上記）に従い番付される。

【0063】

「Kabataにあるような可変ドメイン残基番付」または「Kabataにあるようなアミノ酸位置番付」という表現、及びそれらの変形形態は、Kabataら（上記）における抗体の編成において重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されている番付方式を指す。この番付システムを用いると、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRの短縮またはそこへの挿入に対応して、より少ないかまたは追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入（Kabataに従う残基52a）、及び重鎖FR残基82の後に挿入された残基（例えば、Kabataに従う残基82a、82b、及び、82c等）を含み得る。残基のKabata番付は、抗体の配列と「標準的な」Kabata番付配列との相同性の領域でアライメントすることによって、所与の抗体に関して決定され得る。

【0064】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは一般に、FR1、FR2、FR3、及びFR4の4つのFRドメインからなる。したがって、HVR及びFRの配列は一般に、VH（またはVL）の次の配列に現れる：FR1-H1（L1）-FR2-H2（L2）-FR3-H3（L3）-FR4。

【0065】

本明細書における目的に関して、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（VH）フレ

10

20

30

40

50

ームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、またはそれはアミノ酸配列変化を含有しても良い。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの実施形態では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0066】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンのVLまたはVHフレームワーク配列の選択において、最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンのVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団からである。一般に、配列の下位集団は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるような下位集団である。一実施形態では、VLに関して、下位集団は、Kabatら（上記）にあるような下位集団カッパIである。一実施形態では、VHに関して、下位集団は、Kabatら（上記）にあるような下位集団IIIである。

【0067】

本明細書における用語「Fc領域」は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、未変性配列のFc領域及び変異形Fc領域を含む。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226位のアミノ酸残基から、またはPro230から、そのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991）に記載される、EUインデックスとも呼ばれるEU番付システムに従う残基447）は、例えば、抗体の産生若しくは精製の間に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することによって、除去され得る。したがって、インタクトな抗体の組成物は、全K447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されない抗体集団、及びK447残基を有する抗体と有しない抗体との混合物を有する抗体集団を含み得る。用語「Fc受容体」または「FcR」はまた、胎児への母体IgGの移入に関与する、新生児型受容体であるFcRnも含む。Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)。FcRnへの結合の測定方法は既知である（例えば、Ghetie and Ward, Immunol. Today 18:(12):592-8 (1997)、Ghetie et al., Nature Biotechnology 15(7):637-40 (1997)、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6 (2004)、WO第2004/92219号（Hintonら）を参照されたい）。インビボでのFcRnへの結合及びヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス若しくは形質移入されたヒト細胞系において、または変異形Fc領域を有するポリペプチドが投与される霊長類においてアッセイすることができる。WO2004/42072（Presta）は、FcRへの結合を向上または減少させた抗体変異形を記載している。また、例えば、Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001) も参照されたい。

【0068】

「親和性成熟」抗体は、変化を保有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）において1つ以上の変化を有し、このような変化によって抗原に対する抗体の親

10

20

30

40

50

和性が改善される、抗体を指す。

【0069】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

【0070】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその抗原への結合を50%以上遮断する抗体、及び逆に、競合アッセイにおいて、抗体のその抗原への結合を50%以上遮断する参照抗体を指す。例示的な競合アッセイは、本明細書に提供される。

【0071】

「裸抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識に抱合されない抗体を指す。裸抗体は、薬学的製剤中に存在し得る。

10

【0072】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプにより異なる抗体のFc領域に起因し得るそれらの生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、貪食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0073】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用」またはADCCは、ある特定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ）に存在するFc受容体(FcR)に分泌型Igが結合することにより、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞に特異的に結合し、次いで細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする、細胞傷害性の形態を指す。抗体は細胞障害性細胞を「備え」ており、この機構による標的細胞の死滅に必要である。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fcγ(ガンマ)RIIIのみを発現する一方で、単球は、Fcγ(ガンマ)RI、Fcγ(ガンマ)RII、及びFcγ(ガンマ)RIIIを発現する。造血細胞上でのFc発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の頁464の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性を評価するために、US5,500,362またはUS5,821,337に記載されるものなどのインビトロADCCアッセイを行っても良い。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。代替的に、または追加的に、対象の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998)に開示されるものなどの動物モデルにおいて評価されても良い。

20

30

【0074】

「貪食作用」は、病原体が宿主細胞（例えば、マクロファージまたは好中球）によって貪食または内在化されるプロセスを指す。貪食細胞は、(i)直接細胞表面受容体（例えば、レクチン、インテグリン、及びスカベンジャー受容体）、(ii)補体オプソニン化病原体に結合し、それを摂取するために補体受容体(C3b、CR3、及びCR4の受容体であるCRIを含む)を使用する、強化された補体、及び(iii)後に内在化され、リソソームと縮合してファゴリソソームとなる抗体オプソニン化粒子に結合するためにFc受容体(FcγgammaRI、FcγgammaRIIA、及びFcγgammaRIIIA)を使用する、強化された抗体の3つの経路により貪食作用を媒介する。本発明において、経路(iii)が抗MRSA AAC治療薬を感染白血球、例えば、好中球及びマクロファージに送達する際に重要な役割を果たすと考えられている(Phagocytosis of Microbes: complexity in Action by D. Underhill and A Ozinsky. (2002) Annual Review of Immunology, Vol 20:825)。

40

【0075】

50

「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」は、補体の存在下における標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体系（C1q）の第1の構成成分が、同種抗原に結合した（適切なサブクラスの）抗体に結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されるCDCアッセイを行っても良い。

【0076】

FC領域に結合された炭水化物を変化させても良い。哺乳類細胞によって産生される未変性抗体は、典型的に、一般的にN-結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32を参照されたい。オリゴ糖には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、IgGにおけるオリゴ糖の修飾は、ある特定のさらに改善された特性を有するIgGを作製するために行われ得る。例えば、Fc領域に（直接的または間接的に）結合したフコースを欠いている炭水化物構造を有する、抗体修飾が提供される。このような修飾は改善されたADCC機能を有し得る。例えば、US2003/0157108（Presta, L.）、US2004/0093621（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体修飾に関連する刊行物の例としては、US2003/0157108、WO2000/61739、WO2001/29246、US2003/0115614、US2002/0164328、US2004/0093621、US2004/0132140、US2004/0110704、US2004/0110282、US2004/0109865、WO2003/085119、WO2003/084570、WO2005/035586、WO2005/035778、WO2005/053742、WO2002/031140、Okazaki et al. Biol. 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞系の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したLee13 CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)、米国特許出願公開第2003/0157108号、Al, Presta, L、及びWO2004/056312 Al、Adams et al.、特に実施例11）、及びアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞系（例えば、Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)、Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006)、及びWO2003/085107を参照されたい）が挙げられる。

【0077】

「単離された抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照されたい。

【0078】

「単離された核酸」は、核酸分子がその天然環境の構成成分から分離されたものを指す。単離された核酸には、核酸分子が、その核酸分子を通常含有する細胞内に含有されたものが含まれるが、この核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体上の位置とは異

10

20

30

40

50

なる染色体位置に存在している。

【0079】

「r F 1 抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする1つ以上の核酸分子を指し、それには単一のベクターまたは別個のベクターにおいてこのような核酸分子（複数可）が含まれ、このような核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0080】

本明細書で使用されるとき、用語「に特異的に結合する」または「に対して特異的」であるは、生体分子を含む分子の異種集団の存在下で標的の存在を決定する、標的と抗体との間の結合などの測定可能かつ再現可能な相互作用を指す。例えば、標的（これはエピトープであり得る）に特異的に結合する抗体は、他の標的に結合するよりも高い親和性、結合力で、より容易に、及び／またはより長い持続時間でこの標的に結合する抗体である。一実施形態では、r F 1 に無関係の標的への抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（R I A）によって測定されたとき、抗体の標的への結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、r F 1 に特異的に結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、または $\leq 0.1 \text{ nM}$ の解離定数（K d）を有する。ある特定の実施形態では、抗体は、異なる種から保存されるエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、それを必要としない。

【0081】

「結合親和性」は一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合相互作用の総計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は一般に、解離定数（K d）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般に、抗原をゆっくり結合し、容易に解離する傾向にあるが、高親和性抗体は一般に、抗原により速く結合し、より長く結合を維持する傾向にある。結合親和性の様々な測定方法は当該技術分野において既知であり、それらのいずれかが本発明の目的のために使用することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的及び例示的な実施形態が、以下に記載される。

【0082】

一実施形態では、本発明による「K d」または「K d 値」は、以下のアッセイに記載されるように、対象の抗体のF a b型とその抗原を用いて行われる放射標識抗原結合アッセイ（R I A）によって測定される。抗原に対するF a bの溶液結合親和性は、F a bを、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の（ 10^{-5} I）標識抗原と平衡化し、次いで抗F a b抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって、測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. Biol. 293:865-881を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、マイクロタイタープレート（DYNEX Technologies, Inc.）を、50 mM炭酸ナトリウム（pH 9.6）中5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の捕捉抗F a b抗体（Cappel Labs）で一晩コーティングし、その後、室温（約23℃）で、PBS中2%（w/v）ウシ血清アルブミンにより2~5時間遮断する。非吸着プレート（Nunc #269620）中で、100 pMまたは26 pM [10^{-5} I] - 抗原を、対象のF a bの段階希釈液と混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599（1997）における抗VEGF抗体F a b-12の評価と一致する）。対象のF a bを次いで一晩インキュベートするが、インキュベーションは、平衡が確実に達成されるようにより長い期間（例えば、約65時間）継続しても良い。その後、混合物を、室温でインキュベーションするために（例えば1時間）捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、PBS中0.1%のTWEEN-20（商標）界面活性剤で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μl /ウェルのシンチラント（MICROSCINT-
40
50

20 (商標) ; Packard) を添加し、プレートに TOPCOUNT (商標) ガンマ計数器 (Packard) で 10 分間計測する。最大結合の 20 % 以下をもたらす各 Fab の濃度を、競合結合アッセイで使用するために選択する。

【0083】

別の実施形態によると、 K_d は、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、25 °C で、約 10 応答単位 (RU) で固定化された抗原 CM5 チップを用いて測定される。簡潔に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5, BIAcore Inc.) を、供給業者の指示に従い N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) で活性化する。抗原を 10 mM の酢酸ナトリウム (pH 4.8) で 5 µg/ml (約 0.2 µM) に希釈した後、結合したタンパク質が約 10 応答単位 (RU) を達成するように、5 µl/分の流速で注入する。抗原の注入後、1 M エタノールアミンを注入して、未反応基を遮断する。速度論的測定のために、Fab の 2 倍段階希釈液 (0.78 nM ~ 500 nM) を、25 °C で、約 25 µl/分の流速で、0.05 % TWEEN 20 (商標) 界面活性剤を含む PBS (PBST) に注入する。会合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) は、単純な 1 対 1 のラングミュア結合モデル (BIACORE (登録商標) Evaluation Software バージョン 3.2) を使用して、会合センサグラムと解離センサグラムとを同時に当てはめることによって計算される。平衡解離定数 (K_d) は、 k_{off}/k_{on} 比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによるオン速度が $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、このオン速度は、ストップフロー装着分光光度計 (Aviv Instruments) または攪拌キュベットを備える 8000 シリーズ SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) などの分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、PBS (pH 7.2) 中 20 nM 抗原抗体 (Fab 型) の 25 °C での蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm 帯域通過) の増加または低下を測定する、蛍光消光技法を使用することによって決定することができる。

【0084】

本発明による「オン速度」、「会合の速度」、「会合速度」、または「 k_{on} 」も、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 システム (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用して、上述のように決定され得る。

【0085】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞系」、及び「宿主細胞培養物」は、互換的に使用され、外来性の核酸が導入された細胞を指し、これにはこのような細胞の子孫が含まれる。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、一次形質転換細胞、及び継代の数に関係なくそれに由来する子孫が含まれる。子孫は核酸含量において親細胞と完全に同一でなくてもよいが、変異を含み得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニング若しくは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【0086】

本明細書で使用されるとき、用語「ベクター」は、それが結合されている別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクターならびにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、それらが動作可能に結合された核酸の発現を指向することが可能である。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

【0087】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列をア

ライメントし、配列同一性最大パーセントを得るために、必要な場合、ギャップを導入した後に、及びいかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内の様々な方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のため、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって作成され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権局 (U. S. Copyright Office)、Washington D. C., 20559に提出されており、米国著作権番号TXU 510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、またはソースコードから編集されてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用するために編集すべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変更はない。

10

20

【0088】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に使用される場合、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対するアミノ酸配列同一性% (あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現することができる) は、次のように計算される: 分率 X/Y の100倍、ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて完全一致として評価されたアミノ酸残基の数であり、YはBの総アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対するアミノ酸配列同一性%は、BのAに対するアミノ酸配列同一性%とは異なることが理解されるであろう。別途指定のない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%の値は、記載されるように得られる。

30

【0089】

用語「リファマイシン型抗生物質」は、リファマイシンの構造、またはそれに類似する構造を有する抗生物質のクラスまたは群を意味する。

【0090】

用語「リファラジル型抗生物質」は、リファラジルの構造、またはそれに類似する構造を有する抗生物質のクラスまたは群を意味する。

【0091】

置換基の数を示すとき、用語「1つ以上」は、1つの置換基から可能な限り高い数の置換の範囲、すなわち、1個の水素の置換から置換基による最大全ての水素の置換を指す。用語「置換基」は、親分子上の水素原子を置換する原子または原子の基を示す。用語「置換された」は、指定された基が1つ以上の置換基を有することを示す。任意の基が複数の置換基を有し、様々な可能な置換基が提供される場合、置換基は独立して選択され、同じである必要はない。用語「置換されない」は、指定された基が置換基を有しないことを意味する。用語「任意選択で置換される」は、指定された基が置換されないか、または1つ以上の置換基により置換され、可能な置換基の群から独立して選択されることを意味する。置換基の数を示すとき、用語「1つ以上」は、1つの置換基から可能な限り高い数の置換、すなわち、1個の水素の置換から置換基による最大全ての水素の置換を意味する。

40

【0092】

50

本明細書で使用されるとき、用語「アルキル」は、1～12個の炭素原子 ($C_1 - C_{12}$) の飽和直鎖状または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、このアルキルラジカルは、任意選択で、独立して以下に記載される1つ以上の置換基で置換され得る。別の実施形態では、アルキルラジカルは、1～8個の炭素原子 ($C_1 - C_8$)、または1～6個の炭素原子 ($C_1 - C_6$) である。アルキル基の例としては、メチル (Me 、 $-CH_3$)、エチル (Et 、 $-CH_2CH_3$)、1-プロピル ($n-Pr$ 、 n -プロピル、 $-CH_2CH_2CH_3$)、2-プロピル ($i-Pr$ 、 i -プロピル、 $-CH(CH_3)_2$)、1-ブチル ($n-Bu$ 、 n -ブチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-メチル-1-プロピル ($i-Bu$ 、 i -ブチル、 $-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-ブチル ($s-Bu$ 、 s -ブチル、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-メチル-2-プロピル ($t-Bu$ 、 t -ブチル、 $-C(CH_3)_3$)、1-ペンチル (n -ペンチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-ペンチル ($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-2-ブチル ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ブチル ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-メチル-1-ブチル ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-メチル-1-ブチル ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-ヘキシル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-ヘキシル ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-ヘキシル ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-メチル-2-ペンチル ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-メチル-2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-メチル-2-ペンチル ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-メチル-3-ペンチル ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-メチル-3-ペンチル ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-ジメチル-2-ブチル ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-ジメチル-2-ブチル ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$)、1-ヘプチル、1-オクチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

本明細書で使用されるとき、用語「アルキレン」は、1～12個の炭素原子 ($C_1 - C_{12}$) の飽和直鎖状または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、このアルキレンラジカルは、任意選択で、独立して以下に記載される1つ以上の置換基で置換され得る。別の実施形態では、アルキレンラジカルは、1～8個の炭素原子 ($C_1 - C_8$)、または1～6個の炭素原子 ($C_1 - C_6$) である。アルキレン基の例としては、メチレン ($-CH_2-$)、エチレン ($-CH_2CH_2-$)、プロピレン ($-CH_2CH_2CH_2-$) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

用語「アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素の sp^2 2重結合を有する2～8個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖状または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、このアルケニルラジカルは、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換され得、「シス」及び「トランス」配向、ないしは別の方法で「E」及び「Z」配向を有するラジカルを含む。例としては、エチレニルまたはビニル ($-CH=CH_2$)、アリル ($-CH_2CH=CH_2$) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

用語「アルケニレン」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素の sp^2 2重結合を有する2～8個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖状または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、このアルケニレンラジカルは、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換され得、「シス」及び「トランス」配向、ないしは別の方法で「E」及び「Z」配向を有するラジカルを含む。例としては、エチレニレンまたはビニレン ($-CH=CH-$)、アリル ($-CH_2CH=CH-$) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

10

20

30

40

50

用語「アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素－炭素の sp^3 重結合を有する2～8個の炭素原子 (C_2-C_8) の直鎖状または分岐の一価の炭化水素ラジカルを指し、このアルキニルラジカルは、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換され得る。例としては、エチニル ($-C \equiv CH$)、プロピニル (プロパルギル、 $-CH_2C \equiv CH$) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0097】

用語「アルキニレン」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素－炭素の sp^3 重結合を有する2～8個の炭素原子 (C_2-C_8) の直鎖状または分岐の二価の炭化水素ラジカルを指し、このアルキニレンラジカルは、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換され得る。例としては、エチニレン ($-C \equiv C-$)、プロピニレン (プロパルギレン、 $-CH_2C \equiv C-$) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0098】

用語「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式環」、及び「シクロアルキル」は、単環式環として3～12個の炭素原子 (C_3-C_{12})、または二環式環として7～12個の炭素原子を有する、一価の非芳香族の飽和若しくは部分不飽和環を指す。7～12個の原子を有する二環式炭素環は、例えば、ビスクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または [6, 6] 系として配置され得、9～10個の環原子を有する二環式炭素環は、ビスクロ [5, 6] 若しくは [6, 6] 系として、またはビスクロ [2, 2, 1] ヘプタン、ビスクロ [2, 2, 2] オクタン、及びビスクロ [3, 2, 2] ノナンなどの架橋系として配置され得る。スピロ部分もこの定義の範囲内に含まれる。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペント-1-エニル、1-シクロペント-2-エニル、1-シクロペント-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘクス-1-エニル、1-シクロヘクス-2-エニル、1-シクロヘクス-3-エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、シクロドデシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。カルボシクリル基は、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換される。

【0099】

「アリール」は、親芳香族環系の1個の炭素原子から1個の水素原子を除去することによって生じる6～20個の炭素原子 (C_6-C_{20}) の一価の芳香族炭化水素ラジカルを意味する。いくつかのアリール基は、例示的な構造において「Ar」と表される。アリールは、飽和、部分不飽和環、または芳香族の炭素環式環に縮合された芳香族環を含む二環式ラジカルを含む。典型的なアリール基は、ベンゼン (フェニル)、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、1, 2-ジヒドロナフタレン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチルに由来するラジカルを含むが、これらに限定されない。アリール基は、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換される。

【0100】

「アリーレン」は、親芳香族環系の2個の炭素原子から2個の水素原子を除去することによって生じる6～20個の炭素原子 (C_6-C_{20}) の二価の芳香族炭化水素ラジカルを意味する。いくつかのアリーレン基は、例示的な構造において「Ar」と表される。アリーレンは、飽和、部分不飽和環、または芳香族の炭素環式環に縮合された芳香族環を含む二環式ラジカルを含む。典型的なアリーレン基は、ベンゼン (フェニレン)、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニレン、インデニレン、インダニレン、1, 2-ジヒドロナフタレン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチルなどに由来するラジカルを含むが、これらに限定されない。アリーレン基は、任意選択で、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換される。

【0101】

用語「複素環」、「ヘテロシクリル」、及び「複素環式環」は、本明細書において、互換的に使用され、少なくとも1つの環原子が窒素、酸素、リン、及び硫黄から選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子がCである（ここで、1つ以上の環原子は、任意選択で、独立して、以下に記載される1つ以上の置換基で置換される）、3～約20個の環原子の飽和または部分不飽和（すなわち、環内に1つ以上の2重及び／または3重結合を有する）炭素環式環ラジカルを指す。複素環は、3～7環員（2～6個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1～4個のヘテロ原子）を有する単環、または7～10環員（4～9個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1～6個のヘテロ原子）を有する二環、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または[6, 6]系であり得る。複素環は、Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W. A. Benjamin, New York, 1968)、特に1、3、4、6、7、及び9章、“The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に、13、14、16、19、及び28巻、ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載されている。「ヘテロシクリル」は、複素環ラジカルが飽和、部分不飽和環、または芳香族炭素環式若しくは複素環式の環と縮合するラジカルも含む。複素環式環の例としては、モルホリン-4-イル、ペペリジン-1-イル、ペペラジニル、ペペラジン-4-イル-2-オン、ペペラジン-4-イル-3-オン、ピロリジン-1-イル、チオモルホリン-4-イル、S-ジオキソチオモルホリン-4-イル、アゾカン-1-イル、アゼチジン-1-イル、オクタヒドロピリド[1, 2-a]ピラジン-2-イル、[1, 4]ジアゼパン-1-イル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ペペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ペペラジニル、ホモペペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモペペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、インドリニル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1, 3-ジオキサラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニルイミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサニル、3-アザビシクロ[4. 1. 0]ヘプタニル、アザビシクロ[2. 2. 2]ヘキサニル、3H-インドリル キノリジニル、及びN-ピリジル尿素が挙げられるが、これらに限定されない。スピロ部分もこの定義の範囲内に含まれる。2個の環原子がオキソ(=O)部分で置換される複素環式基の例は、ピリミジノニル及び1, 1-ジオキソチオモルホリニルである。本明細書において、複素環基は、任意選択で、独立して、本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換される。

【0102】

用語「ヘテロアリール」は、5、6、または7員環の一価の芳香族ラジカルを指し、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される1つ以上のヘテロ原子を含有する、5～20個の原子の縮合環系（そのうちの少なくとも1つは芳香族である）を含む。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル（例えば2-ヒドロキシピリジニルを含む）、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル（例えば4-ヒドロキシピリミジニル）、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソキサゾリル、チアゾリル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンズオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びフロピリジニルである。ヘテロアリール基は、任意選択で、独立して、

本明細書に記載される1つ以上の置換基で置換される。

【0103】

複素環またはヘテロアリアル基は、可能な場合、炭素（炭素結合）または窒素（窒素連結）結合され得る。例として、及び限定されないが、炭素結合複素環またはヘテロアリアルは、ピリジンの2、3、4、5、または6位で、ピリダジンの3、4、5、または6位で、ピリミジンの2、4、5、または6位で、ピラジンの2、3、5、または6位で、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール、若しくはテトラヒドロピロールの2、3、4、または5位で、オキサゾール、イミダゾール、若しくはチアゾールの2、4、または5位で、イソキサゾール、ピラゾール、若しくはイソチアゾールの3、4、または5位で、アジリジンの2または3位で、アゼチジンの2、3、または4位で、キノリンの2、3、4、5、6、7、または8位で、あるいはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、または8位で結合される。

10

【0104】

例として、及び限定されないが、窒素結合複素環またはヘテロアリアルは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾールの1位で、イソインドールまたはイソインドリンの2位で、モルホリンの4位で、及びカルバゾールまたはβ-カルボリンの9位で結合される。

20

【0105】

「代謝産物」は、特定の化合物またはその塩の体部において代謝により産生される産物を指す。化合物の代謝産物は、当該技術分野において既知の慣用的な技法を用いて特定することができ、それらの活性は、本明細書に記載されるものなどの試験を用いて決定することができる。このような産物は、例えば、投与される化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、脱アミド化、エステル化、脱エステル化、酵素的切断などから生じ得る。したがって、本発明は、その代謝産物を生じるのに十分な期間の間、本発明の式Iの化合物を哺乳動物と接触させることを含むプロセスによって産生された化合物を含む、本発明の化合物の代謝産物を含む。

【0106】

用語「薬学的製剤」は、その中に含有される活性成分の生物活性が有効になる様な形態であり、製剤が投与されるであろう対象に許容できないほど毒性である追加構成成分を含有しない調製物を指す。

30

【0107】

「滅菌」製剤は、無菌であるか、または全ての生存微生物及びそれらの胞子を含まない。

【0108】

「安定した」製剤は、本明細書のタンパク質が本質的に保管時にその物理的及び化学的安定性ならびに完全性を維持するものである。タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技法は当該技術分野において利用可能であり、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) 及び Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) に概説されている。安定性は、選択された時間期間の間、選択された温度で測定され得る。迅速なスクリーニングにおいて、製剤は、40℃で、2週間～1ヶ月間維持され得、その時間安定性が測定される。製剤が2～8℃で保管される場合、一般的に、製剤は、30℃または40℃で少なくとも1ヶ月間安定している、及び／または2～8℃で少なくとも2年間安定しているべきである。製剤が30℃で保管される場合、一般的に、製剤は、30℃で少なくとも2年間安定している、及び／または40℃で少なくとも6ヶ月間安定しているべきである。例えば、保管中の凝集の程度は、タンパク質の安定性の指標として使用することができる。よって、「安定している」製剤

40

50

は、約10%未満、好ましくは約5%未満のタンパク質が製剤中に凝集体として存在するものであって良い。他の実施形態では、製剤の保管中の凝集体の形成における任意の増加を決定することができる。

【0109】

「等張性」製剤は、本質的にヒトの血液と同じ浸透圧を有するものである。等張性製剤は一般に、約250～350mOsmの浸透圧を有する。用語「低張性」は、ヒトの血液よりも低い浸透圧を有する製剤を説明するものである。対応して、用語「高張性」は、ヒトの血液よりも高い浸透圧を有する製剤を説明するものである。等張性は、例えば、蒸気圧または製氷型浸透圧計を用いて測定することができる。本発明の製剤は、塩及び／または緩衝剤の添加の結果として高張性である。

10

【0110】

本明細書で使用されるとき、「担体」は、使用される投薬量及び濃度でそれに曝される細胞または哺乳動物に非毒性である、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む。多くの場合、生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトール若しくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに／またはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商標）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

20

【0111】

「薬学的に許容される担体」は、対象に非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。「薬学的に許容される酸」は、それらが製剤化される濃度及び様式で非毒性である無機酸及び有機酸を含む。例えば、好適な無機酸は、塩酸、過塩素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸、スルホン酸、スルフィン酸、スルファニル酸、リン酸、炭酸などを含む。好適な有機酸は、直鎖状及び分岐鎖アルキル、芳香族、環状脂環式、アリール脂肪族、複素環式、飽和、不飽和、モノ、ジ、及びトリカルボン酸を含み、例えば、ギ酸、酢酸、2-ヒドロキシ酢酸、トリフルオロ酢酸、フェニル酢酸、トリメチル酢酸、ト-ブチル酢酸、アントラニル酸、プロパン酸、2-ヒドロキシプロパン酸、2-オキソプロパン酸、プロパン二酸、シクロペンタンプロピオン酸、シクロペンタンプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸、ブタン酸、ブタン二酸、安息香酸、3-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、アスコルビン酸、桂皮酸、ラウリル硫酸、ステアリン酸、ムコン酸、マンデル酸、コハク酸、エンボン酸、フマル酸、リンゴ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、マロン酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、グリコール酸、グルコン酸、ピルビン酸、グリオキサール酸、シュウ酸、メシル酸、コハク酸、サリチル酸、フタル酸、パモ酸、パルモイン酸、パルメイン酸、チオシアン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼン（chlorobenzene）スルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、p-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4-メチルビスクロ[2.2.2]-オクト-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプトン酸、4,4'-メチレンビス-3-(ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸)、ヒドロキシナフトエ酸を含む。

30

40

【0112】

「薬学的に許容される塩基」は、それらが製剤化される濃度及び様式で非毒性である無機塩基及び有機塩基を含む。例えば、好適な塩基は、無機塩基形成金属、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アンモニウム、鉄、亜鉛、銅、

50

マンガン、アルミニウム、N-メチルグルカミン、モルホリン、ピペリジン、ならびに第1級、第2級、及び第3級アミンを含む有機非毒性塩基、置換アミン、環状アミン、ならびにイオン交換樹脂〔例えば、 $N(R')_4^+$ （ここで、 R' は独立してHまたは C_{1-4} アルキル、例えばアンモニウム、トリスである）〕、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジエチルアミノエタノール、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、プリン、ペパラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などから形成されたものを含む。特に好ましい有機非毒性塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン、及びカフェインである。

10

【0113】

本発明と共に使用可能な追加の薬学的に許容される酸及び塩基は、アミノ酸に由来するもの、例えば、ヒスチジン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、及びアスパラギンを含む。

【0114】

「薬学的に許容される」緩衝剤及び塩は、上記の酸及び塩基の酸及び塩基添加塩両方に由来するものを含む。具体的な緩衝剤及び／または塩は、ヒスチジン、コハク酸塩、及び酢酸塩を含む。

【0115】

20

「薬学的に許容される糖」は、対象のタンパク質と組み合わせられるとき、保管時にタンパク質の化学的及び／または物理的不安定性を大幅に阻止または減少させる分子である。製剤が凍結乾燥され、後に再構築される場合、「薬学的に許容される糖」は、「凍結乾燥防止剤」として知られる場合もある。例示的な糖及びそれらの対応する糖アルコールは、グルタミン酸ナトリウムまたはヒスチジンなどのアミノ酸；ベタインなどのメチルアミン；硫酸マグネシウムなどの離液塩；三価以上の分子量の糖アルコール、例えば、グリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなどのポリオール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；PLURONICS（登録商標）；ならびにこれらの組み合わせを含む。追加の例示的な凍結乾燥防止剤は、グリセリン及びゼラチン、ならびに糖類（メリビオース、メレジトース、ラフィノース、マンノトリオース、及びスタキオース）を含む。還元糖の例としては、グルコース、マルトース、ラクトース、マルツロース、イソマルツロース、及びラクツロースが挙げられる。非還元糖の例としては、糖アルコール及び他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元グリコシドが挙げられる。好ましい糖アルコールは、モノグリコシド、特にラクトース、マルトース、ラクツロース、及びマルツロースなどの二糖の還元により得られたそれらの化合物である。グリコシド側基は、グリコシドまたはガラクトシドのいずれかであり得る。糖アルコールの追加の例は、グルシトール、マルチトース、ラクチトース、及びイソマルツロースである。好ましい薬学的に許容される糖は、非還元糖のトレハロースまたはスクロースである。薬学的に許容される糖は、タンパク質が保管中（例えば、再構築後及び保管）に本質的にその物理的及び化学的安定性ならびに完全性を維持することを意味する「保護量」（例えば凍結乾燥前）で製剤に添加される。

30

40

【0116】

本明細書の対象の「希釈剤」は、薬学的に許容される（ヒトへの投与に安全で非毒性）であり、凍結乾燥後に再構築される製剤などの液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な希釈剤としては、滅菌水、注射用静菌水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩溶液、リングル液、またはデキストロース溶液が挙げられる。代替の実施形態では、希釈剤は、塩及び／または緩衝剤の水溶液を含み得る。

【0117】

50

「防腐剤」は、細菌の活性を減少させるために、本明細書の製剤に添加され得る化合物である。防腐剤の添加は、例えば、多用途（多用量）製剤の生産を容易にし得る。可能性のある防腐剤の例としては、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム（アルキル基が直鎖化合物である塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウムの混合物）、及び塩化ベンゼトニウムが挙げられる。防腐剤の他の種類には、フェノール、ブチル、及びベンジルアルコールなどの芳香族アルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾールが含まれる。本明細書において最も好ましい防腐剤はベンジルアルコールである。

【0118】

「個体」、「対象」、または「患者」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、及びゲッパ類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0119】

本明細書で使用されるとき、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」など、その文法上の変化形）は、臨床病理過程に治療される個体、組織、または細胞の自然経過を変化させるように設計された臨床介入を指す。治療の望ましい効果には、限定されないが、疾患進行速度の低下、疾患状態の回復または緩和、及び寛解または予後の改善が含まれ、全て医師などの当業者によって測定可能である。一実施形態では、治療は、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、感染疾患の進行速度の低下、疾患状態の回復または緩和、及び寛解または予後の改善を意味し得る。いくつかの実施形態では、本発明のAAC及びTACは、疾患の発達を遅延する、または感染疾患の進行を緩徐する、または血流ならびに／若しくは感染組織及び臓器における細菌負荷を減少させるために使用される。

【0120】

本明細書で使用されるとき、「と共に」は、1つの治療様式を別の治療様式に加えて施すことを指す。そのため、「と共に」は、1つの治療様式を、他方の治療様式を施す前に、施している間に、または施した後、個体に施すことを指す。

【0121】

用語「菌血症」は、血液培養を通して最も一般的に検出される血流中の細菌の存在を指す。細菌は、重度の感染の合併症として（肺炎または髄膜炎）、外科手術中（特に消化管などの粘膜を伴う場合）、または動脈若しくは静脈に入るカテーテル及び他の異物により、血流に入る場合がある。いくつかの結果が菌血症によりもたらされる場合がある。細菌に対する免疫応答が敗血症及び敗血症性ショックをもたらし得る場合があり、これは比較的高い死亡率を有する。細菌は、身体他の部分に拡散するのに血液を使用することもでき、感染の元の部位から離れて感染を引き起こす。例としては心内膜炎または骨髄炎が挙げられる。

【0122】

「治療有効量」は、特定の障害の測定可能な改善をもたらすのに必要とされる最低限の濃度である。本明細書における治療有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を誘起する抗体の能力などの要因によって変動し得る。治療有効量は、治療上有益な効果が、抗体の任意の毒性または悪影響を上回るものでもある。一実施形態では、治療有効量は、インビボ感染における菌血症を減少させるのに有効な量である。一態様では、「治療有効量」は、血液などの患者の試料から単離された細菌負荷またはコロニー形成単位（CFU）を、薬物の投与前と比べて少なくとも1対数分減少させるのに少なくとも有効な量である。より具体的な態様では、減少は少なくとも2対数である。別の態様では、減少は、少なくとも3、4、5対数である。また別の態様では、減少は、本明細書において例示されるアッセイを含む、当該技術分野において既知のアッセイを使用して検出可能レベルより下である。別の実施形態では、治療有効量は、感染

10

20

30

40

50

患者の治療前または治療の開始時の陽性血液培養と比較して、陰性血液培養（すなわち、A A Cの標的である細胞が成長しない）を達成する、治療期間の過程にわたって与えられる1回以上の用量のA A Cの量である。

【0123】

「予防的有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投薬量及び時間期間に有効な量を指す。典型的であって、必ずしもそうではないが、予防量は、疾患の前、その早期段階で、またはさらには感染のリスクが上昇する状態に曝される前に対象に使用されるため、予防的有効量は、治療有効量より少なくてもよい。一実施形態では、予防的有効量は、感染を減少させる、その発生、または1つの細胞から別の細胞への感染の拡散を阻止するのに少なくとも有効な量である。

10

【0124】

「長期」投与は、長期間の間、初期の治療効果（活性）を維持するために、短期モードとは対照的に連続して薬剤（複数可）を投与することを指す。「断続的」投与は、中断しないが、むしろ実際には周期的である、連続的に行われない治療である。

【0125】

用語「添付文書」は、治療用製品の市販のパッケージに慣例的に含まれる指示書を指して使用され、これにはこのような治療用製品の適応症、使用、投薬量、投与、併用療法、禁忌、及び／またはその使用に関する注意事項についての情報が含まれる。

【0126】

用語「キラル」は、鏡像パートナーの重ね合わせできない（non-superimposable）特性を有する分子を指す一方で、用語「アキラル」は、それらの鏡像パートナーと重ね合わせできる（superimposable）分子を指す。

20

【0127】

用語「立体異性体」は、同一の化学構成を有するが、空間内の原子または基の配置に関して異なる化合物を指す。

【0128】

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラル性の中心を有し、それらの分子が互いの鏡像ではない、立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動法及びクロマトグラフィーなどの高分解能分析手順の下で分離され得る。

30

【0129】

「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせできない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を指す。

【0130】

本明細書で使用される立体化学的な定義及び慣例は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、及びElieil, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は、光学活性形態で存在し、すなわち、それらは、平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際、接頭辞D及びL、またはR及びSは、そのキラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を表すように使用される。接頭辞d及びlまたは（+）及び（-）は、化合物による平面偏光の回転の徴候を表記するために使用され、このうち（-）またはlは、化合物が左旋性であることを意味する。（+）またはdの接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、それらが互いの鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、鏡像異性体とも称され得、このような異性体の混合物は、しばしば鏡像異性体混合物と呼ばれる。鏡像異性体の50:50混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、それらは、化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性が存在していない場合に生じ得る。用語「ラセミ混合物

40

50

」及び「ラセミ体」は、光学活性を欠く2つの鏡像異性体種の等モル混合物を指す。

【0131】

用語「保護基」は、特定の官能性を、化合物上の他の官能基を反応させながら、遮断するまたは保護するために一般的に使用される置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性を遮断するまたは保護する、アミノ基に結合した置換基である。好適なアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、*t*-ブトキシカルボニル (BOC)、ベンジルオキシカルボニル (CBZ)、及び9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル (Fmoc) が含まれるが、これらに限定されない。保護基の一般的な説明及びそれらの使用については、T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991、またはより新しい版を参照されたい。

10

【0132】

本明細書で使用されるとき、用語「約」は、当業者であれば容易に分かるそれぞれの値に対する通常の誤差範囲を指す。本明細書において「約 (about)」ある値またはパラメータへの参照は、その値またはパラメータ自体を対象とした実施形態を含む（及び記載する）。

【0133】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈により別様に明確に示されない限り、複数形を含む。例えば、「抗体 (antibody)」への参照は、モル量などの1つの抗体から多くの抗体に対する参照であり、当業者に既知のその同等物を含む。

20

【0134】

III. 組成物及び方法

抗体-抗生物質抱合体 (AAC)

本明細書において、実験結果は、細胞内細菌の排除を目的とした療法が臨床的成功を改善することを強く示している。この目的に向かって、本発明は、宿主細胞の細胞内区画を浸潤した *S. aureus* 生物を選択的に死滅させる独特な療法を提供する。本発明は、このような療法がバンコマイシンのような従来の抗生物質が機能しないインビボモデルにおいて有効であることを示す。

【0135】

30

本発明は、従来の抗生物質療法を逃れる細菌集団を標的とすることにより、抗生物質回避を阻止することを目的とする抗菌療法を提供する。新規抗菌療法は、*S. aureus* (MRSAを含む) に見られる細胞壁構成成分に特異的な rF1 抗体が強力なリファマイシン型抗生物質 (リファマイシンの誘導体) に化学結合される抗体抗生物質抱合体 (AAC) を用いて達成される。リファマイシン型抗生物質は、大半の哺乳類細胞型に見られるリソソームプロテアーゼであるカテプシンBを含む、プロテアーゼによって切断されるように設計されるプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーを介して抗体に結合される (Dubowchik et al (2002) *Bioconj. Chem.* 13:855-869)。その3つの構成成分を有するAACのダイアグラムを図2に描写する。いずれか1つの理論に限定されるものではないが、AACの一作用機構を図3に図示する。AACは、リンカーが切断されるまでリファマイシン型抗生物質が不活性である (抗体のサイズが大きい) という点でプロドラッグとして機能する。自然感染に見られるかなりの割合の *S. aureus* が宿主における感染の経過中のある時点で宿主細胞、主に好中球及びマクロファージによって取り込まれるため、宿主細胞内で過ごす時間が抗生物質活性を逃れる大きな機会を細菌に提供する。本発明のAACは、*Staph* 細菌に結合し、細菌が宿主細胞によって取り込まれた後にファゴリソソーム内で抗生物質を放出するように設計される。この機構により、AACは、特に *S. aureus* が従来の抗生物質によって十分に治療されなかった場所で活性抗生物質を濃縮することができる。本発明は特定の作用機構により限定または定義されないが、AACは、以下の3つの可能な機構を介して抗生物質の活性を改善する：(1) AACは細菌を取り込む哺乳類細胞内に抗生物質

40

50

を送達し、それにより細菌が隔離されるファゴリソソーム内に十分に拡散しない抗生物質の効力を増加させる。(2) AACは細菌をオプソニン化し、それにより貪食細胞による遊離細菌の取り込みを増加させ、細菌がファゴリソソーム内に隔離されている間に、それらを死滅させるために局所的に抗生物質を放出する。数千のAACが単一の細菌に結合することができるため、このプラットフォームは、最大抗菌死滅を持続するために、これらの細胞内環境に十分な抗生物質を放出する。さらに、より多くの細菌が既存細胞内貯蔵所から放出されるため、この抗体に基づく療法の迅速なオン速度は、細菌が隣接するまたは遠隔の細胞に逃れる前にこれらの細菌への即時「タグ付け」を確実にし、よって感染のさらなる拡散を軽減する。(3) AACは、血清から迅速に排除される抗生物質と比較して、抗生物質を抗体に結合することによりインビボにおける抗生物質の半減期を改善する(改善された薬物動態)。改善されたAACの薬物動態は、*S. aureus*が濃縮される領域への十分な抗生物質の送達を可能にする一方で、全身投与される必要がある全体的な抗生物質の用量を制限する。この特性は、抗生物質の副作用を最小限に抑えながら、持続感染を標的とするAACでの長期療法を可能にするはずである。

10

【0136】

本発明の抗体-抗生物質抱合体化合物は、組換えによって導入されたシステインを介して、プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーによってリファマイシン型抗生物質に共有結合された抗SDR抗体を含む。

【0137】

例示的な実施形態では、抗SDR抗体(例えばrF1抗体)は、組換えにより導入されたシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗体である。

20

【0138】

例示的な実施形態では、プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーは、rF1の抗SDR抗体上の組換えにより導入されたシステインを介してリファマイシン型抗生物質に共有結合される。

【0139】

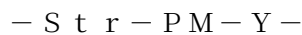
例示的な実施形態は、下式：



を有し、式中、

Abは、rF1抗体であり、

PMLは、下式：



(式中、Strはストレッチャー単位であり、PMはペプチド模倣単位であり、Yはスペーサー単位である)を有するプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーであり、

abxが、リファマイシン型抗生物質であり、

pが1~8の整数である、抗体-抗生物質抱合体である。

30

【0140】

リファマイシン型抗生物質はリファラジル型抗生物質であり得る。

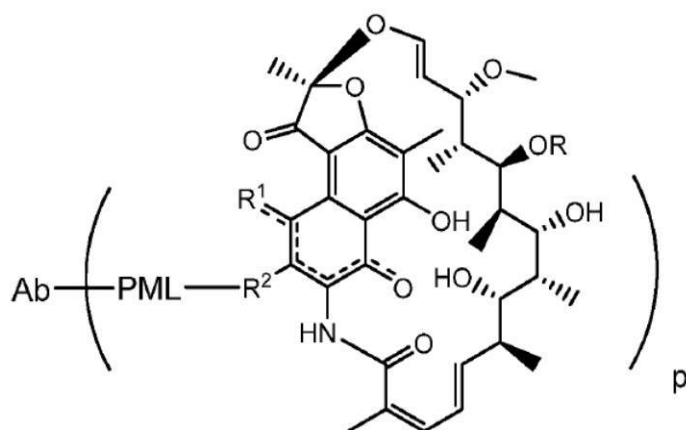
【0141】

リファマイシン型抗生物質は、プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーに結合される第4級アミンを含み得る。

40

【0142】

抗体-抗生物質抱合体の例示的な実施形態は、式I：



10

I

を有し、式中、

破線が、任意選択の結合を示し、

Rが、H、 C_1-C_{12} アルキル、または $C(O)CH_3$ であり、

R^1 がOHであり、

R^2 が $CH=N-$ （ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルが、任意選択で、 $C(O)CH_3$ 、 C_1-C_{12} アルキル、 C_1-C_{12} ヘテロアリール、 C_2-C_{20} ヘテロシクリル、 C_6-C_{20} アリール、及び C_3-C_{12} カルボシクリルから独立して選択される1

20

つ以上の基で置換されるか、
あるいは R^1 及び R^2 が、5員若しくは6員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環が、任意選択で、置換H、F、Cl、Br、I、 C_1-C_{12} アルキル、またはOHであり、

PMLが、 R^2 に結合されたプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー、または R^1 及び R^2 により形成された縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルであり、

AbがrF1抗体である。

【0143】

30

反応性リンカー部分を介して抗体分子に抱合され得る抗生物質部分の数は、本明細書に記載される方法によって導入される遊離システイン残基の数によって制限される。例示的なAACは、1、2、3、または4個の改変システインアミノ酸を有する抗体を含む（Lyon, R. et al (2012) Methods in Enzym. 502:123-138）。

【0144】

MRSAに対して効果的な標的であるように、エピトープは、好ましくは、大量に存在し、感染中に安定して発現され、全ての臨床MRSA株において高度に保存されている。rF1抗体は、これらの要件を満たし、加えて、Staph epidermidisにも結合する。

40

【0145】

抗SDR及びrF1抗体

抗SDR抗体は、F1抗体の生成に関して以下に記載されるように産生することができる。rF1、SD2、SD3、及びSD4を含む抗SDR抗体のいくつかの例が本明細書に提供される。

【0146】

ここではrF1 Abが詳細に記載される。

【0147】

rF1抗体は完全にヒトであり、S. aureus及びS. epidermidisなどのStaphylococcus種に特異的に結合することができる。重要なことには

50

、r F 1 はインビボならびにインビトロで全細菌に結合することができる。さらに、抗体 r F 1 は、例えば動物の感染組織において成長した細菌に結合することができる。本明細書に提供される r F 1 A b またはその機能的等価物は、S . a u r e u s 表面タンパク質 C l f A、C l f B、S d r C、S d r D、及び S d r E に結合することができる。

【0148】

表4 A 及び表4 B は、親抗体 F 1、r F 1 抗体、及びその変異形の H 鎖及び L 鎖の C D R 配列のアライメントを示す。F 1 及び r F 1 は、F W 1 及び L C C D R 3 の配列において異なる (Q H Y X R F P Y T、ここで、X は I または M (配列番号 2 6) であり得る。F 1 は I (配列番号 6) であり、r F 1 は M (配列番号 7) である)。

表4 A：重鎖 C D R 配列

抗体	H C C D R 1	H C C D R 2	H C C D R 3
F 1	R F A M S (配列番号 1)	S I N N G N N P Y Y A R S V Q Y (配列番号 2)	D H P S S G W P T F D S (配列番号 3)
r F 1	R F A M S (配列番号 1)	S I N N G N N P Y Y A R S V Q Y (配列番号 2)	D H P S S G W P T F D S (配列番号 3)
r F 1 . v 1	R F A M S (配列番号 1)	S I N [S] G N N P Y Y A R S V Q Y (配列番号 8)	D H P S S G W P T F D S (配列番号 3)

表4 B：軽鎖 C D R 配列

抗体	L C C D R 1	L C C D R 2	L C C D R 3
F 1	R A S E N V G D W L A (配列番号 4)	K T S I L E S (配列番号 5)	Q H Y I R F P Y T (配列番号 6)
r F 1	R A S E N V G D W L A (配列番号 4)	K T S I L E S (配列番号 5)	Q H Y [M] R F P Y T (配列番号 7)
r F 1 . v 6	R A S E N V G D W L A (配列番号 4)	K T S I L E S (配列番号 5)	Q H Y [I] R F P Y T (配列番号 6)

【0149】

一実施形態では、H 及び L 鎖フレームワーク (F R) 配列は以下の通りである：

10

20

30

40

H C F W 1 E V Q L [V] E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A
 S G F T L S (配列番号 1 6)
 H C F W 2 W V R Q A P G R G L E W V A (配列番号 1 7)
 H C F W 3 R F T V S R D V S Q N T V S L Q M N N L R A E D S
 A T Y F C A K (配列番号 1 8)
 H C F W 4 W G P G T L V T V S S (配列番号 1 9)
 L C F W 1 D I Q L T Q S P S A L P A S V G D R V S I T C (配列
 番号 2 0)
 L C F W 2 W Y R Q K P G K A P N L L I Y (配列番号 2 1)
 L C F W 3 G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P D
 D F A T Y Y C (配列番号 2 2)
 L C F W 4 F G Q G T K [V] E I K R [T] V (配列番号 2 3)

10

【0150】

安定性及び機能性を改善するために、様々なアミノ酸修飾が r F 1 に対して行われた。
 H C C D R 2 において、第 4 残基 N を S に変更することによって N G 脱アミン化部位が
 排除され、よって抗体の安定性を改善する。T V の修復は、r F 1 に存在する重度の抗体
 凝集を排除するために L C 骨格に対して行われた。

【0151】

20

本発明の治療用 A A C を形成するための抱合に関して、完全四量体抗体を形成するた
 めに以下の H 鎖及び L 鎖の対合を行うことができる。囲み部分は、C D R 1、C D R 2、C
 D R 3 配列である。導入されたシステイン (C) は下線が引かれている。太字の残基は、
 親 F 1 に対するアミノ酸の変更である。L 鎖において、太字「R T V」の後の A は、定常
 領域の第 1 残基である。H 鎖における K a b a t 1 1 4 位の下線が引かれた C から定常領
 域が始まる。

【0152】

1 A 及び 2 A において、C カップの末端近くの a a 2 0 5 に改変 C y s を有する配列
 番号 9 の完全長 (F L) L 鎖は、配列番号 1 0 (C y s なし) の F L I g G 1 H 鎖と
 対合される。この抗体は、リンカー-抗生物質単位に抱合して A A C を形成するために、
 各 L 鎖上に 1 つずつ、2 つの C y s 部位を有する。

30

1 A. r F 1 - V 2 0 5 C F L 軽鎖

D I Q L T Q S P S A L P A S V G D R V S I T C R A S E N V G D W L A W Y R Q K P G K A P N L L I Y K T S I L E S G V P S R F S G
 S G S G T E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q H Y M R F P Y T F G Q G T K **V E I K R T V** A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
 T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y
 A C E V T H Q G L S S P C T K S F N R G E C

2 A. r F 1. v 1 F L 重鎖 (C y s なし)、r F 1 - V 2 0 5 C 軽鎖と C y s 2 0 5
 の対

40

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQ
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ENSGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
 G

10

【0153】

2Aを有する1Bにおいて、改変Cys 205を有する配列番号11のrF1.v6
 L鎖は、配列番号10（Cysなし）のFL IgG1 H鎖と対合される。この抗体
 は、リンカー-抗生物質単位に抱合するために、各L鎖上に1つずつ、2つのCys部位
 を有する。

1B. rF1.v6-V205C軽鎖

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
 GVPSTRFSG
 SSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYIRFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

20

【0154】

2Bを有する1Bにおいて、L鎖及びH鎖の各々は改変Cysを有し、よって、四量体
 抗体は最大4つのAAR（抗生物質：抗体比）を有し得る。

2B. Cys114（114 Kabat番付または118-Eu番付）を有するrF1.v1 FL重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQ
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG

30

rF1.v1 H鎖可変領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYY
 ARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS

40

rF1 L鎖可変領域

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
 GVPSTRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYMRFPYTFGQGTKVEIKRTV

rF1.v6 L鎖可変領域

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
 GVPSTRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYIRFPYTFGQGTKVEIKRTV

【0155】

50

r F 1を含む抗 S D R A bは、システインに置き換えられたシステイン以外の少なくとも1つのアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、システイン以外の少なくとも1つのアミノ酸は、軽鎖205位でバリンであり、かつ／または軽鎖110位でバリンであり、かつ／または重鎖114位でアラニンであり、ここで、アミノ酸番付はK a b a t (1991)に従い、これはE U番付変換によると118位と同じである。

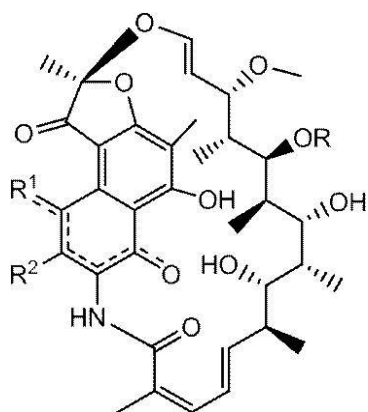
【0156】

リファマイシン型抗生物質部分

本発明の抗体-抗生物質抱合体(AAC)の抗生物質部分(abx)は、リファマイシン型抗生物質または細胞傷害性若しくは細胞分裂抑制作用を有する基である。リファマイシンは、*Nocardia mediterranei*、*Amycolatopsis mediterranei*の細菌により自然に、または人工的のいずれかにより得られる抗生物質の群である。それらは、細菌RNAポリメラーゼを阻害し(Fujii et al (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1489-1492、Feklistov, et al (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(39):14820-5)、グラム陽性及び選択的グラム陰性細菌に対して効力を有する、より大きなアンサマイシンファミリーのサブクラスである。リファマイシンは、マイコバクテリアに対して特に有効であり、したがって、結核、ハンセン病、及びマイコバクテリウム・アビウムコンプレックス(MAC)感染症を治療するために使用される。リファマイシン型の群には、「古典的な」リファマイシン薬物ならびにリファマイシン誘導体であるリファンピシン(リファンピン, CA Reg. No. 13292-46-1)、リファブチン(CA Reg. No. 72559-06-9; US 2011/0178001)、リファペンチン、及びリファラジル(CA Reg. No. 129791-92-0, Rothstein et al (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs* 12(2):255-271、Fujii et al (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1118-1122が含まれる。多くのリファマイシン型抗生物質は、耐性の発現という好ましくない特性を共有する(Wichelhaus et al (2001) *J. Antimicrob. Chemother.* 47:153-156)。リファマイシンは、*Streptomyces mediterranei*の発酵培養物から1957年に最初に単離された。約7つのリファマイシンが発見され、リファマイシンA、B、C、D、E、S、及びSV(US 3150046)と命名された。リファマイシンBは、1960年代に最初に商業的に導入され、薬物耐性結核の治療に有用であった。リファマイシンは、多くの疾患の治療に使用されてきたが、最も重要なものはHIV関連結核である。多数の利用可能な類似体及び誘導体のため、リファマイシンは一般的に使用される抗生物質に耐性となった病原菌の排除に広く利用されてきた。例えば、リファンピシンは、薬物耐性を阻止するその強い作用及び能力に関して知られている。これは、急速に分裂する桿菌株、ならびにそれらが抗生物質の活性を逃れることを可能にする長期間の間生物学的に不活性のままである「生残菌」細胞を迅速に死滅させる。加えて、リファブチン及びリファペンチンは両方とも、HIV陽性患者が獲得した結核に対して使用されてきた。

【0157】

式Iの抗体-抗生物質抱合体の抗生物質部分(abx)はリファマイシン型部分であり、下式:



10

を有するリファマイシン型部分であり、式中、

破線が、任意選択の結合を示し、

Rが、H、 C_1-C_{12} アルキル、または $C(O)CH_3$ であり、

R^1 がOHであり、

R^2 は $CH=N-$ （ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルは、任意選択で、 $C(O)CH_3$ 、 C_1-C_{12} アルキル、 C_1-C_{12} ヘテロアリール、 C_2-C_{20} ヘテロシクリル、 C_6-C_{20} アリール、及び C_3-C_{12} カルボシクリルから独立して選択される1つ以上の基で置換されるか、

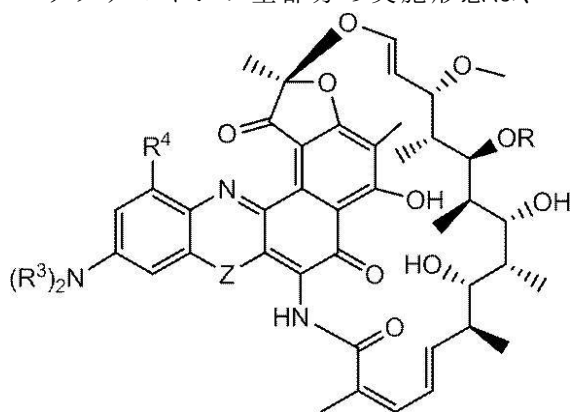
あるいは R^1 及び R^2 が、5員若しくは6員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、このスピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環が、任意選択で、置換H、F、Cl、Br、I、 C_1-C_{12} アルキル、またはOHであり、

非ペプチド性リンカーPMLが R^2 に共有結合される。

20

【0158】

リファマイシン型部分の実施形態は、



30

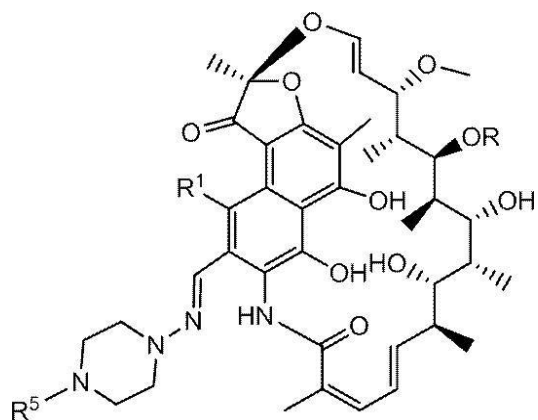
であり、式中、

R^3 が、H及び C_1-C_{12} アルキルから独立して選択され、 R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 C_1-C_{12} アルキル、及びOHから選択され、Zが、NH、 $N(C_1-C_{12}アルキル)$ 、O、及びSから選択され、非ペプチド性リンカーPMLが、 $N(R^3)_2$ の窒素原子に共有結合される。

40

【0159】

リファンピシン型部分の実施形態は、



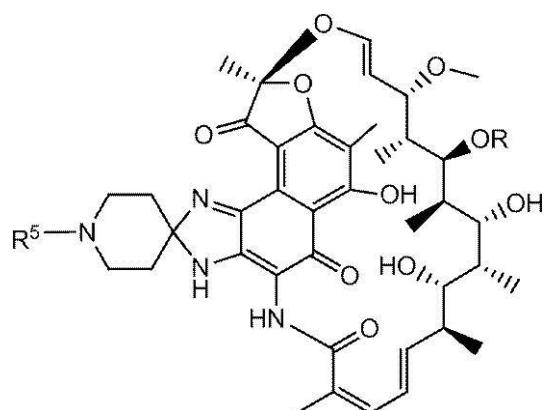
10

であり、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、非ペプチド性リンカー PML が、 NR^5 の窒素原子に共有結合される。

【0160】

リファブチン型部分の実施形態は、

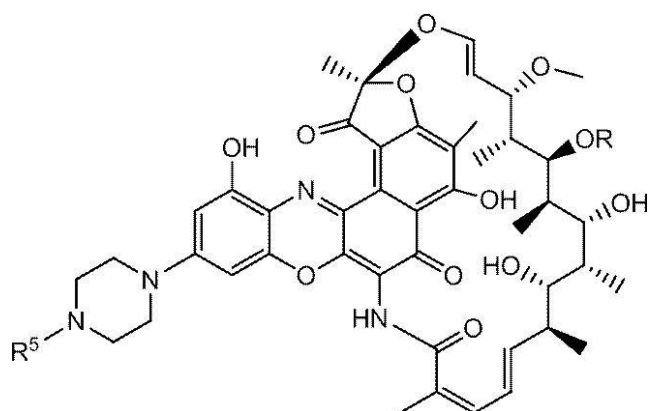


20

であり、式中、 R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、非ペプチド性リンカー PML が、 NR^5 の窒素原子に共有結合される。

【0161】

ベンゾオキサジノリファマイシン型部分の実施形態は、

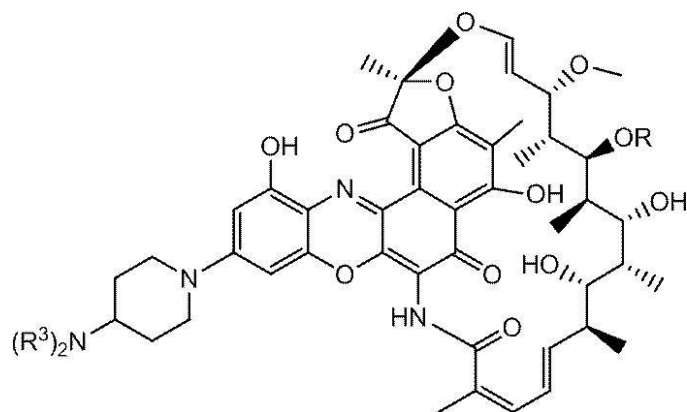


40

であり、式中、 R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、非ペプチド性リンカー PML が、 NR^5 の窒素原子に共有結合される。

【0162】

本明細書においてピベBOR (pipBOR) と称されるベンゾオキサジノリファマイシン型部分の実施形態は、

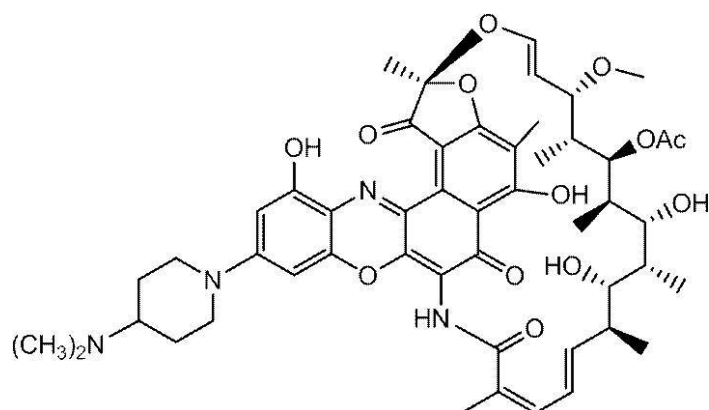


10

であり、式中、 R^3 が、H及び C_1-C_{12} アルキルから独立して選択され、非ペプチド性リンカーPMLが、 $N(R^3)_2$ の窒素原子に共有結合される。

【0163】

本明細書においてジメチルピペBORと称されるベンゾオキサジノリファマイシン型部分の実施形態は、



20

であり、式中、非ペプチド性リンカーPMLが、 $N(CH_3)_2$ の窒素原子に共有結合される。

【0164】

半合成誘導体リファマイシンS、または還元ナトリウム塩形態リファマイシンSVは、いくつかのステップにおいてリファラジル型抗生物質に変換され、式中、Rが、HまたはAcであり、 R^3 が、H及び C_1-C_{12} アルキルから独立して選択され、 R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 C_1-C_{12} アルキル、及びOHから選択され、Zが、NH、 $N(C_1-C_{12}$ アルキル)、O、及びSから選択される（例えば、WO2014/194247の図23A及びBならびに図25A及びBを参照されたい）。ベンゾオキサジノ（Z=O）、ベンズチアジノ（Z=S）、ベンズジアジノ（Z=NH、 $N(C_1-C_{12}$ アルキル））リファマイシンは、繰り返され得る（US7271165）。置換基を含有するベンゾオキサジノリファマイシン（BOR）、ベンズチアジノリファマイシン（BTR）、及びベンズジアジノリファマイシン（BDR）類似体は、US7271165（この目的のため、参照により組み込まれる）の28列目の式Aに提供される番付スキームに従い番付される。「25-O-脱アセチル」リファマイシンとは、25位のアセチル基が除去されたリファマイシン類似体を意味する。この位置がさらに誘導体化される類似体は「25-O-脱アセチル-25-（置換基）リファマイシン」と称され、誘導体化基のこの命名法は完全な化合物名において「置換基」を置き換える。

30

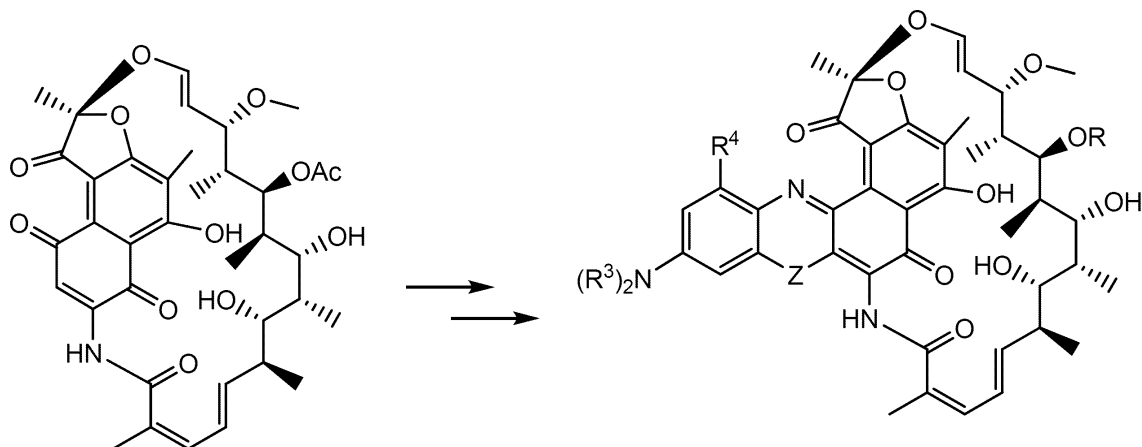
40

【0165】

リファマイシン型抗生物質部分は、US4610919、US4983602、US5786349、US5981522、US4859661、US7271165、US2011/0178001、Seligson, et al., (2001) Anti-Cancer Drugs 12:305-13、Chem. Pharm. Bull.,

50

(1993) 41:148、及びWO2014/194247（その各々は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものに類似する方法によって合成することができる。リファマイシン型抗生物質部分は、標準的なMICインビトロアッセイを使用して、それらの最小阻害濃度（MIC）を測定することにより、抗菌活性に関してスクリーニングされ得る（Tomiooka et al., (1993) Antimicrob. Agents Chemother. 37:67）。



10

【0166】

20

プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー

「プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー」（PML）は、1つ以上の抗生物質部分（abx）及び抗体単位（Ab）に共有結合して、式Iの抗体-抗生物質抱合体（AAC）を形成する二官能性または多官能性部分である。AACにおけるプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーは、リソソーム条件を含む、細胞内プロテアーゼによる切断のための基材である。プロテアーゼは様々なカテプシン及びカスパーゼを含む。AACの非ペプチド性リンカーの細胞内での切断は、抗細菌作用を有するリファマイシン型抗生物質を放出し得る。

【0167】

抗体-抗生物質抱合体（AAC）は、抗生物質（abx）及び抗体（Ab）に結合するための反応性官能基を有するリンカー試薬またはリンカー-抗生物質中間体を使用して便宜的に調製され得る。例示的な一実施形態では、システキン改変抗体（Ab）のシステインチオールは、リンカー試薬、抗生物質部分、または抗生物質-リンカー中間体の官能基と結合を形成することができる。

30

【0168】

AACのPML部分は、1つのアミノ酸残基を含み得る。

【0169】

AACのPML部分は、ペプチド模倣単位を含む。

【0170】

一態様では、リンカー試薬またはリンカー-抗生物質中間体は、抗体上に存在する求核性システインに反応性である求電子性基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー試薬またはリンカー-抗生物質上の求電子性基と反応性であり、共有結合を形成する。有用な求電子性基としては、マレイミド及びハロアセトアミド基が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0171】

システイン改変抗体は、Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15 (4): 765-773の766頁の抱合方法及び実施例18のプロトコルに従い、マレイミド若しくはα-ハロカルボニルなどの求電子性官能基を有するリンカー試薬またはリンカー-抗生物質中間体と反応する。

【0172】

50

別の実施形態では、リンカー試薬またはリンカー-抗生物質中間体の反応基は、抗体の遊離システインチオールと結合を形成することができるチオール-反応性官能基を含有する。チオール反応性官能基の例としては、マレイミド、 α -ハロアセチル、活性化エステル、例えばスクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホン、イソシアネート、及びイソチオシアネートが挙げられるがこれらに限定されない。

【0173】

別の実施形態では、リンカー試薬または抗生物質-リンカー中間体は、抗体上に存在する求電子基に反応性である求核基を有する反応性官能基を有する。抗体上の有用な求電子基には、ピリジルジスルフィド、アルデヒド及びケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。リンカー試薬または抗生物質-リンカー中間体の求核基のヘテロ原子は、抗体上の求電子基と反応し、抗体単位と共有結合を形成することができる。リンカー試薬または抗生物質-リンカー中間体上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、チオール、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。抗体上の求電子基は、リンカー試薬または抗生物質-リンカー中間体への結合のための都合のよい部位を提供する。

【0174】

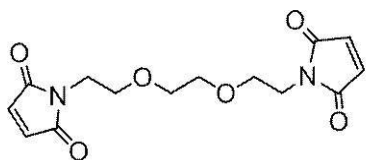
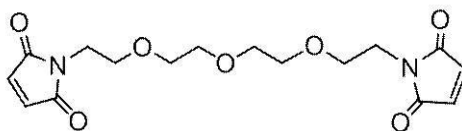
PML部分は1つ以上のリンカー構成成分を含み得る。例示的なリンカー構成成分としては、シトルリン（「cit」）などの単一アミノ酸、6-マレイミドカプロイル（「MC」）、マレイミドプロパノイル（「MP」）、及びp-アミノベンジルオキシカルボニル（「PAB」）、N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルチオ）ペンタノエート（「SPP」）、及び4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1カルボキシレート（「MCC」）が挙げられるが、これらに限定されない。様々なリンカー構成成分が当該技術分野において既知であり、このうちのいくつかを以下に記載する。

【0175】

別の実施形態では、リンカーは、溶解度または反応性を調節する基で置換されても良い。例えば、スルホネート（ $-\text{SO}_3^-$ ）またはアンモニウムなどの荷電置換基は、試薬の水溶性を増加させ、リンカー試薬と抗体若しくは抗体部分とのカップリング反応を促進するか、またはAACを調製するために使用される合成経路により、Ab-L（抗体-リンカー中間体）とabxとのカップリング反応若しくはabx-L（抗生物質-リンカー中間体）とAbとのカップリング反応を促進しても良い。

【0176】

本発明のAACは、限定されないが、リンカー試薬：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、スルホ-SMPB、SVSB（スクシンイミジルー（4-ビニルスルホン）ベンゾエート）、及びビス-マレイミド試薬、例えば、DTME、BMB、BMD B、BMH、BMOE、BM(PEG)₂、及びBM(PEG)₃を用いて調製されたものを明示的に想定する。ビス-マレイミド試薬は、連続または集中様式で、システイン改変抗体のチオール基の、チオール含有抗生物質部分、標識、またはリンカー中間体への結合を可能にする。システイン改変抗体、抗生物質部分、またはリンカー-抗生物質中間体のチオール基と反応性である、マレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、及びイソチオシアネートが含まれる。

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

【0177】

有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) などの他の商業的供給源から得るか、または Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872、Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60、Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355、Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186、US6214345、WO02/088172、US2003130189、US2003096743、WO03/026577、WO03/043583、及びWO04/032828に記載される手順に従って合成することもできる。

【0178】

別の実施形態では、AACのPML部分は、分岐した多官能性リンカー部分を通して2つ以上の抗生物質部分を抗体に共有結合するための樹状型リンカーを含む (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215、Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹状リンカーは、AACの効力に関連する、抗生物質の抗体に対するモル比、すなわち、負荷を増加させることができる。よって、システイン改変抗体が1つの反応性システインチオール基しか有さない場合、多数の抗生物質部分が樹状リンカーを通して結合されても良い。

【0179】

式IのAACのある特定の実施形態では、プロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーPMLは、下式：



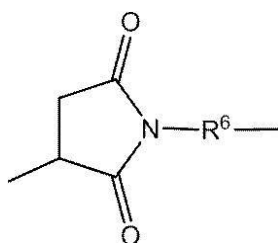
(式中、Strはストレッチャー単位であり、PMはペプチド模倣単位であり、Yはスペーサー単位である)を有し、

abxが、リファマイシン型抗生物質であり、

pが1～8の整数である。

【0180】

一実施形態では、ストレッチャー単位「Str」は、下式：

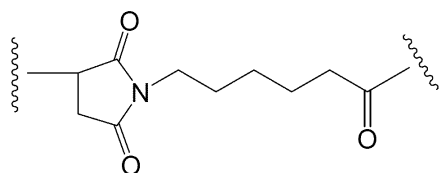


を有し、式中、R⁶が、C₁-C₁₂アルキレン、C₁-C₁₂アルキレン-C(=O)、C₁-C₁₂アルキレン-NH、(CH₂CH₂O)_r、(CH₂CH₂O)_r-C(=O)、(CH₂CH₂O)_r-CH₂、及びC₁-C₁₂アルキレン-NHC(=O)CH₂CH(チオフェン-3-イル)からなる群から選択され、式中、rが1～10の範囲の整数である。

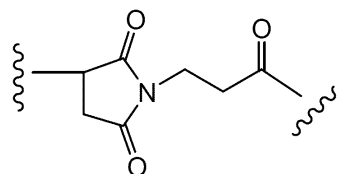
【0181】

例示的なストレッチャー単位は、以下に示される(式中、波線は抗体への共有結合の部

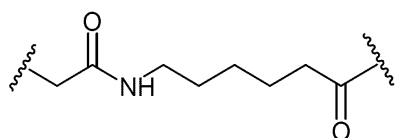
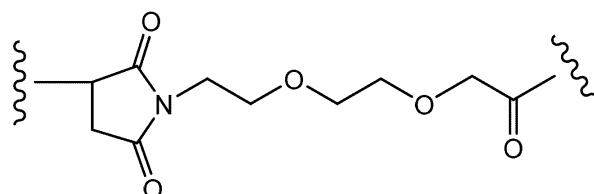
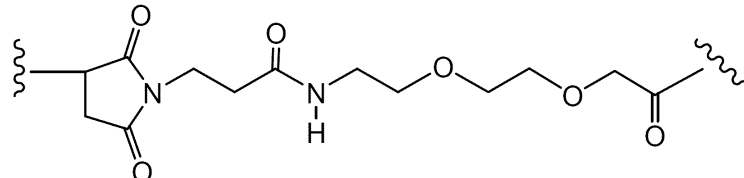
位を示す)。



M C

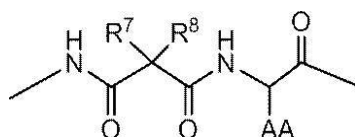


M P



【0182】

一実施形態では、PMは、下式：



を有し、式中、 R^7 及び R^8 が一緒に $C_3 - C_7$ シクロアルキル環を形成し、
AAが、 H 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2(C_6H_5)$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、
 $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $-CHCH(CH_3)CH_3$ 、及び $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ から選択されるアミノ酸側鎖である。

【0183】

一実施形態では、スペーサー単位Yは、パラアミノベンジル(PAB)またはパラアミノベンジルオキシカルボニル(PABC)を含む。

【0184】

スペーサー単位は、別個に加水分解ステップを行うことなく、抗生物質部分の放出を可能にする。スペーサー単位は、「自壊型(self-immolative)」または「非自壊型」であり得る。ある特定の実施形態では、リンカーのスペーサー単位はp-アミノベンジル単位(PAB)を含む。このような一実施形態では、p-アミノベンジルアルコールは、p-アミノベンジル基と抗生物質部分との間のアミド結合、カルバメート、メチルカルバメート、またはカーボネートを介してアミノ酸単位に結合される(Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103)。一実施形態では、スペーサー単位は、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PABC)である。

【0185】

一実施形態では、抗生物質は、非ペプチド性リンカーのPABスペーサー単位に結合されるとき、ジメチルアミノピペリジル基などの第4級アミンを含む。このような第4級アミンの例は、リンカー-抗生物質中間体(PLA)(表2のPLA-1~4)である。第4級アミン基は、抗生物質部分の切断を調節して、AACの抗菌作用を最適化しても良い。別の実施形態では、抗生物質は、非ペプチド性リンカーのPABCスペーサー単位に結合され、AACにおいてカルバメート官能基を形成する。このようなカルバメート官能基はまた、AACの抗菌作用を最適化しても良い。PABCカルバメートリンカー-抗生物質中間体(PLA)の例は、表2のPLA-5及びPLA-6である。

【0186】

自壊性スペーサーの他の例としては、PAB基に電子的に類似する芳香族化合物、例えば、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(US7375078、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及びオルト-またはパラ-アミノベンジルアセタールが挙げられる、これらに限定されない。置換及び非置換4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]及びビシクロ[2.2.2]環系(Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)、ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867)などの、アミド結合加水分解時に環化を受けるスペーサーを使用することができる。グリシンで置換されるアミン含有薬物の排除(Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447)もまた、AACに有用な自壊性スペーサーの例である。

【0187】

AACの切断から放出される活性抗生物質の量は、カスパーゼ放出アッセイにより測定することができる。

【0188】

AACに有用なリンカー-抗生物質中間体

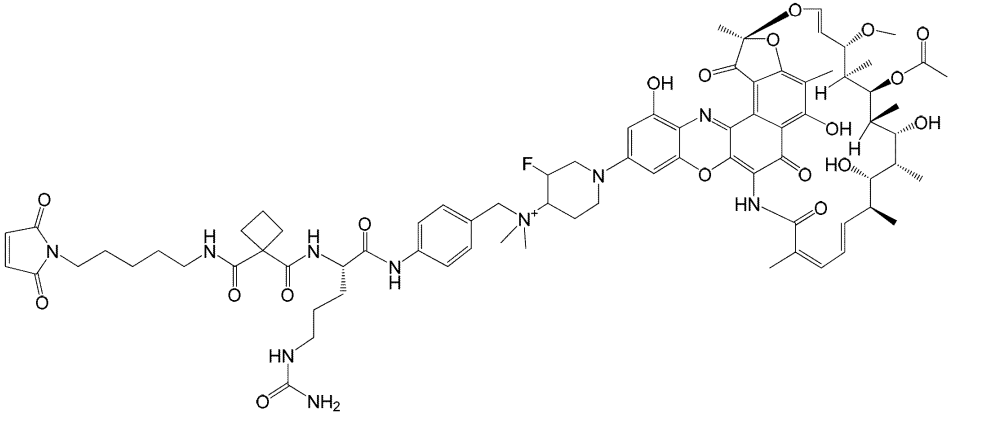
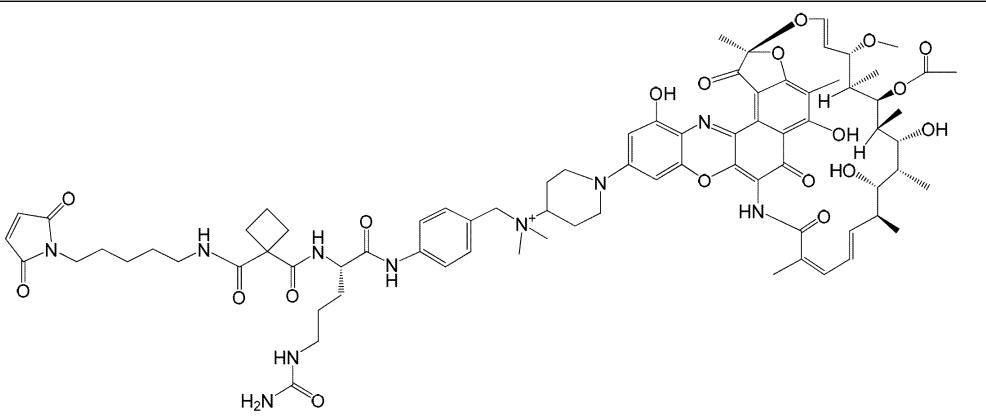
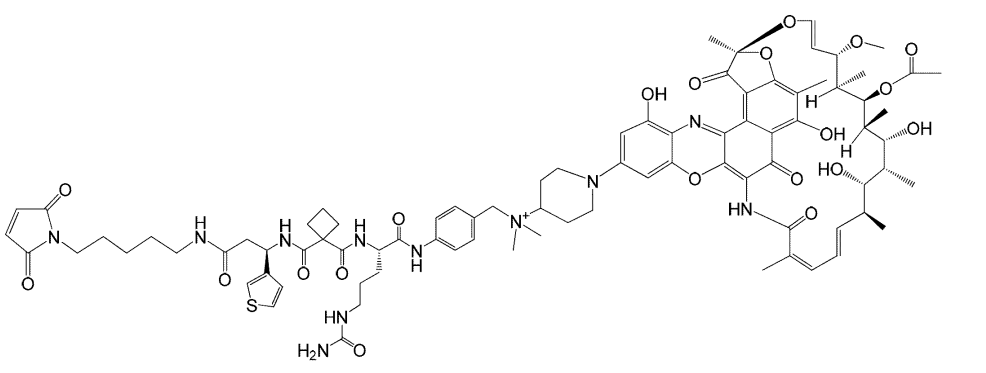
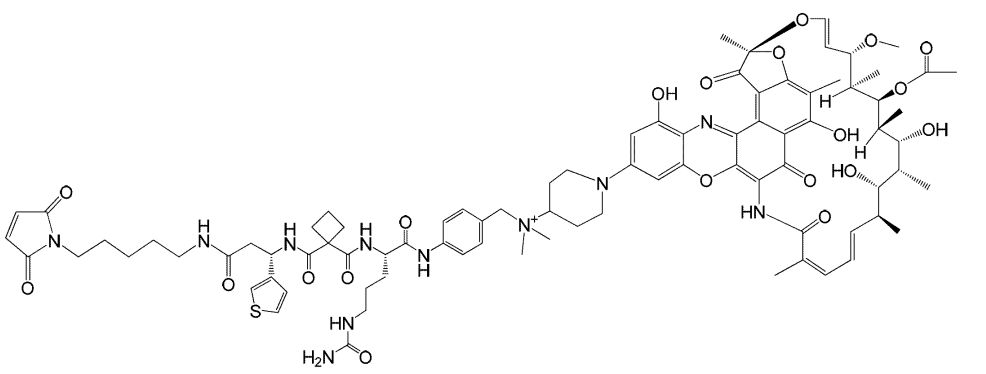
式II及び表2のPMLリンカー-抗生物質中間体(PLA)は、リファマイシン型抗生物質部分をリンカー試薬とカップリングすることによって調製された(実施例7~17)。リンカー試薬は、WO2012/113847、US7659241、US7498298、US20090111756、US2009/0018086、US6214345、Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855-869に記載される方法により調製された。

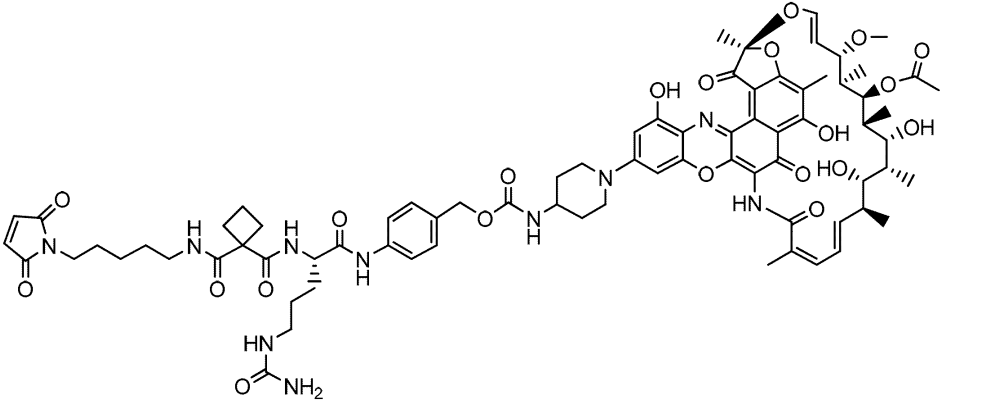
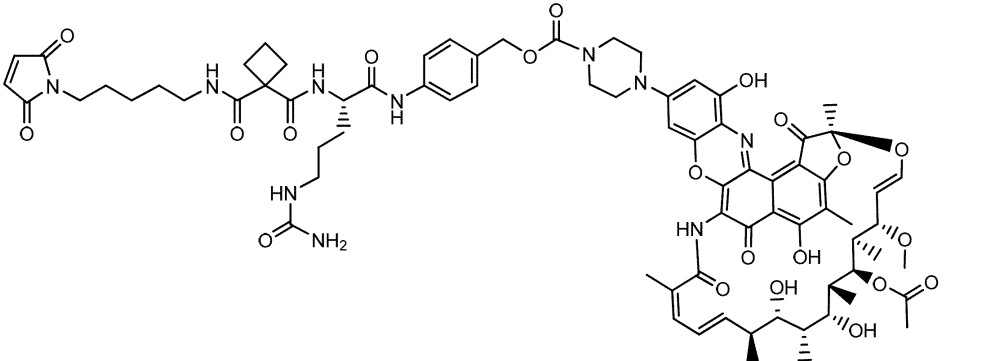
表2 PMLリンカー-抗生物質中間体

10

20

30

L A 番号	構造	
P L A — 1		10
P L A — 2		20
P L A — 3		30
P L A — 4		40

P L A — 5	
P L A — 6	

10

20

【0189】

抗体－抗生物質抱合体の実施形態

システイン改変 r F 1 抗体を、遊離システインチオール基を介して（ピペBORと称される）、他はプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカーを介してリファマイシンの誘導体に結合して、表3の抗体－抗生物質抱合体化合物（AAC）を形成した。リンカーは、カテプシンB、D、及びその他を含むリソソームプロテアーゼにより切断されるように設計される。抗生物質及びPMLリンカーならびにその他からなるリンカー－抗生物質中間体の生成は、実施例7～17に詳細に記載される。リンカーは、PAB部分でのアミド結合の切断が活性状態で抗生物質から抗体を分離するように設計される。

30

【0190】

「ジメチルピペBOR」と称されるAACは、抗生物質上のジメチル化アミノ及びリンカー上のオキシカルボニル基を除き、「ピペBOR」AACと同じである。

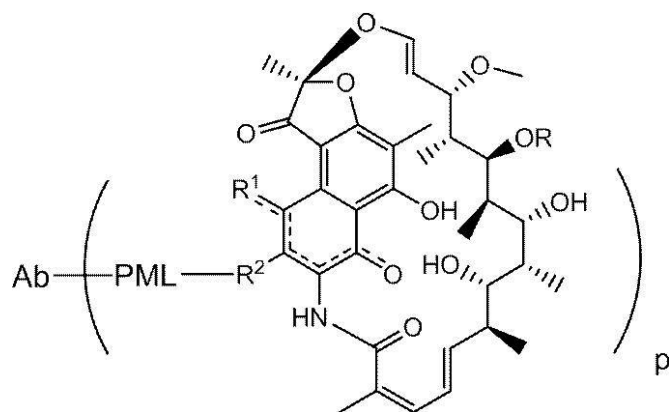
【0191】

図3は、抗体－抗生物質抱合体（AAC）の薬物活性の可能な機構を示す。活性抗生物質（Ab）は、AACが哺乳類細胞内で内在化された後にのみ放出される。AACにおける抗体のFab部分はS. aureusに結合するが、AACのFc部分は、好中球及びマクロファージを含む貪食細胞へのFc受容体媒介結合により細菌の取り込みを増強する。ファゴリソソーム内に内在化された後、リンカーがリソソームプロテアーゼによって切断されて、活性抗生物質をファゴリソソーム内に放出し得る。

40

【0192】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の実施形態は、式I：



10

I

を含み、式中、

破線が、任意選択の結合を示し、

Rが、H、C₁-C₁₂アルキル、またはC(O)CH₃であり、

R¹がOHであり、

R²がCH=N-(ヘテロシクリル)であり、ヘテロシクリルが、任意選択で、C(O)CH₃、C₁-C₁₂アルキル、C₁-C₁₂ヘテロアリール、C₂-C₂₀ヘテロシクリル、C₆-C₂₀アリール、及びC₃-C₁₂カルボシクリルから独立して選択される1つ以上の基で置換されるか、

20

あるいはR¹及びR²が、5員若しくは6員縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルを形成し、任意選択で、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環を形成し、スピロ若しくは縮合6員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはカルボシクリル環が、任意選択で、置換H、F、Cl、Br、I、C₁-C₁₂アルキル、またはOHであり、

PMLが、R²に結合されたプロテアーゼ切断可能な非ペプチド性リンカー、またはR¹及びR²により形成された縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルであり、

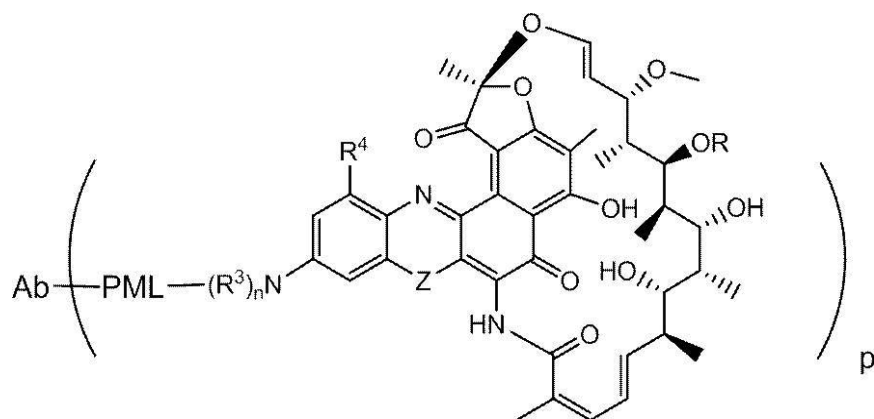
Abが、rF1抗体であり、

pが1～8の整数である。

【0193】

30

本発明の抗体-抗生物質抱合体(AAC)化合物の別の実施形態は、下式：



40

を含み、式中、

R³が、H及びC₁-C₁₂アルキルから独立して選択され、

nが、1または2であり、

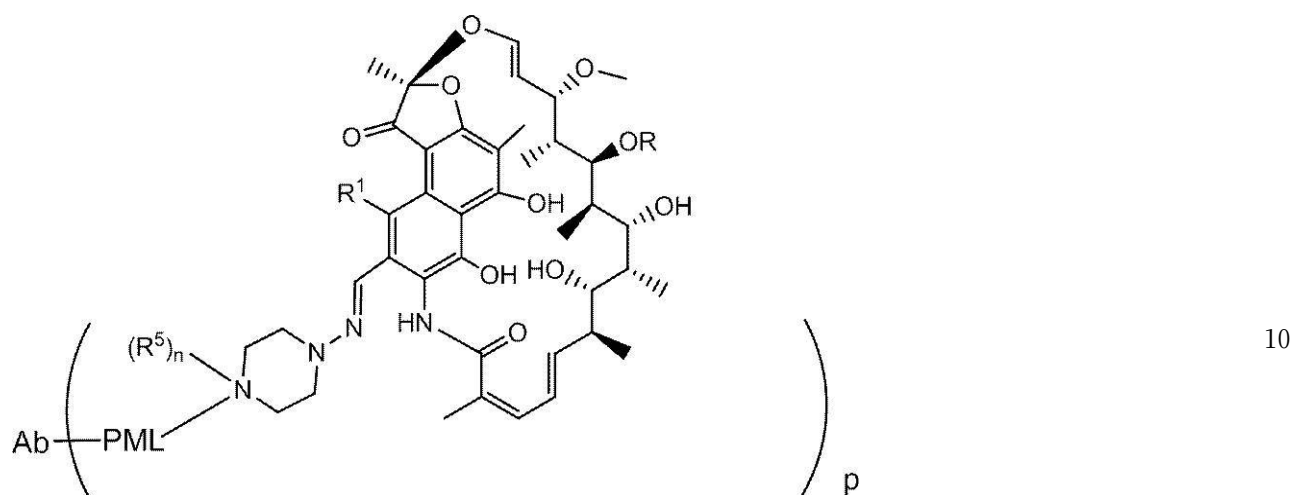
R⁴が、H、F、Cl、Br、I、C₁-C₁₂アルキル、及びOHから選択され、

Zが、NH、N(C₁-C₁₂アルキル)、O、及びSから選択される。

【0194】

本発明の抗体-抗生物質抱合体(AAC)化合物の別の実施形態は、下式：

50

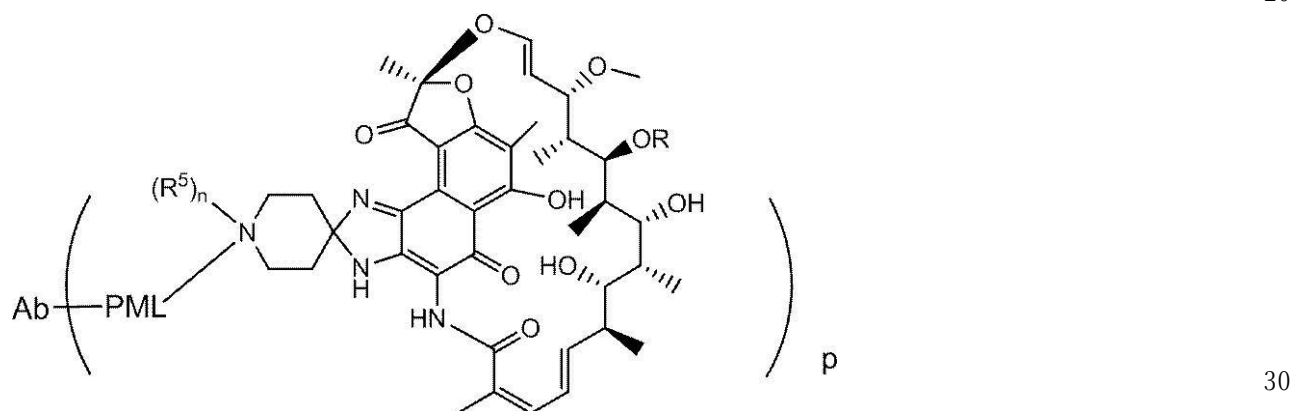


を含み、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、
 n が、0 または 1 である。

【0195】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

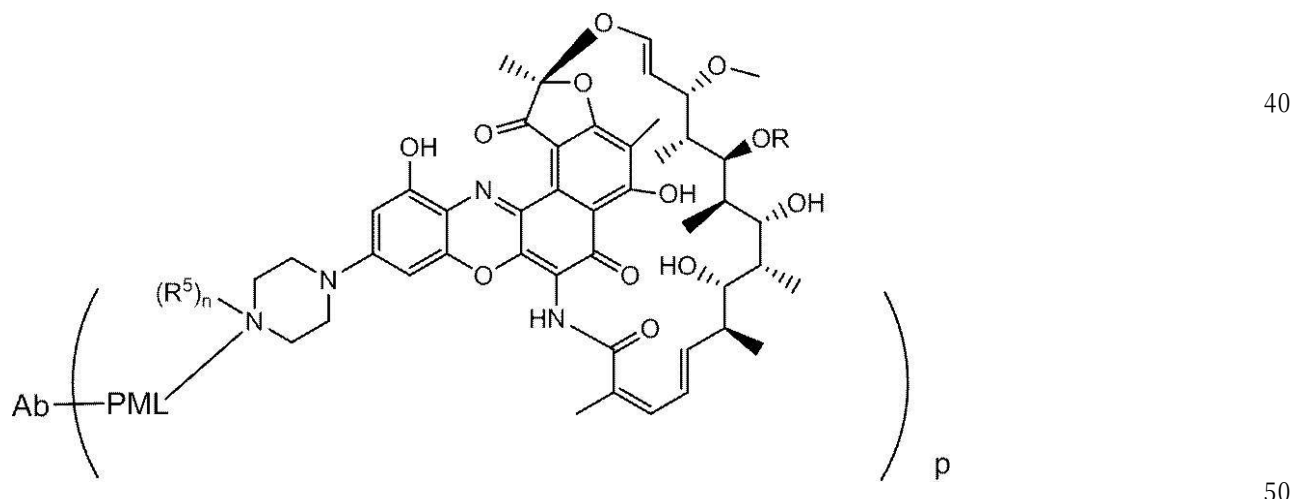


を含み、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、
 n が、0 または 1 である。

【0196】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

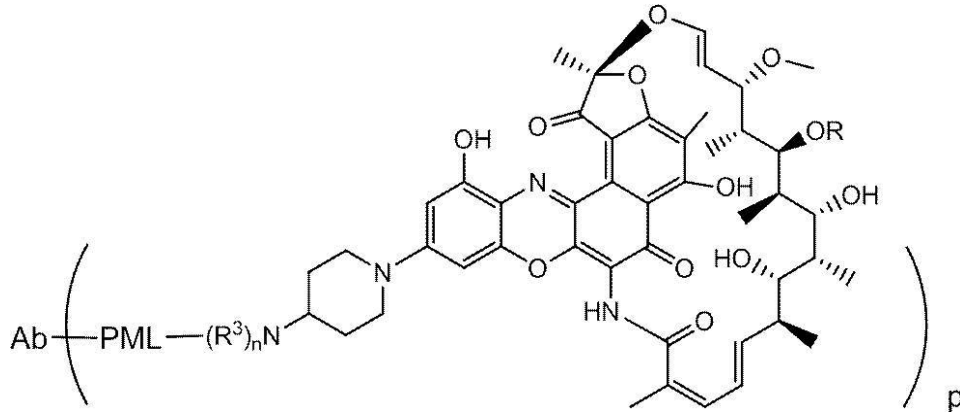


を含み、式中、

R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから独立して選択され、
 n が、0 または 1 である。

【0197】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：



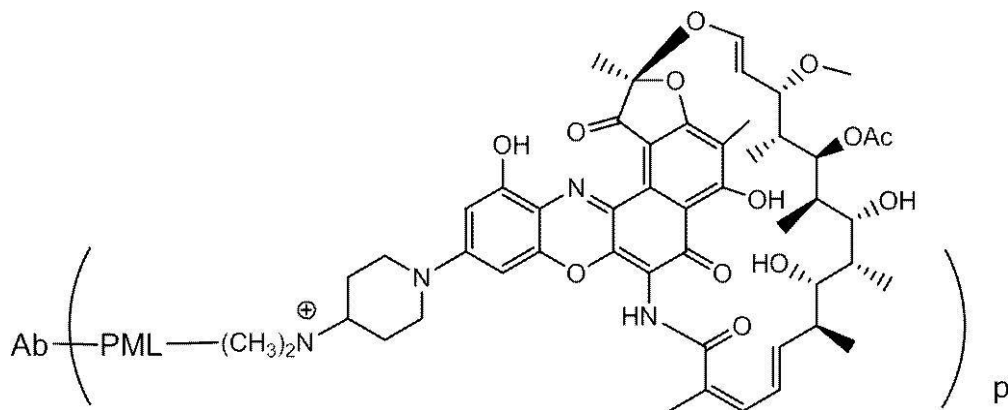
10

を含み、式中、

R^3 が、H 及び C_{1-12} アルキルから独立して選択され、
 n が、1 または 2 である。

【0198】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

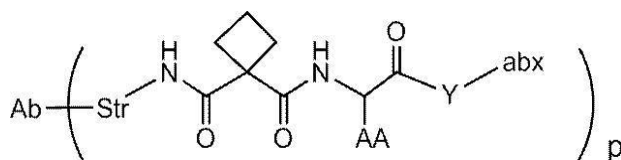


30

を含む。

【0199】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

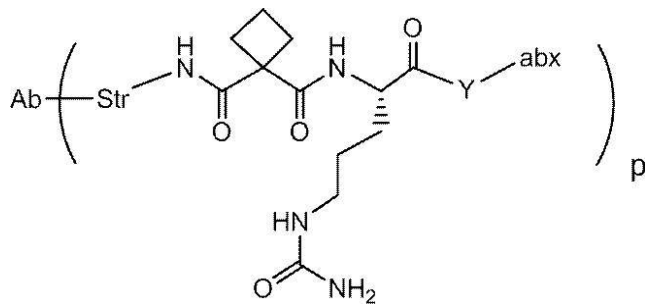


40

を含む。

【0200】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

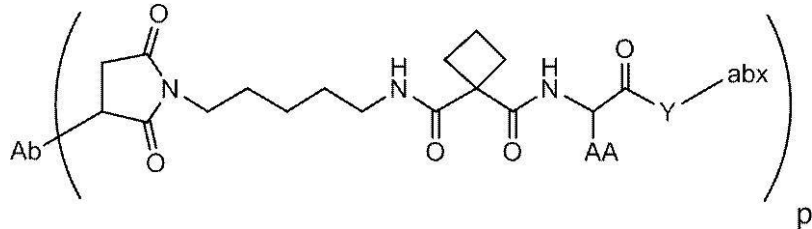


を含む。

【0201】

10

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

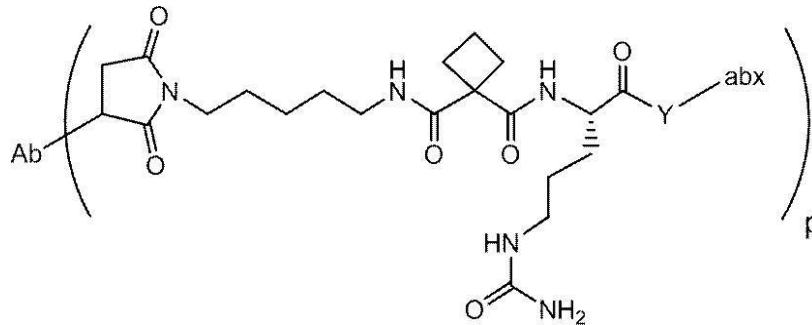


を含む。

【0202】

20

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：

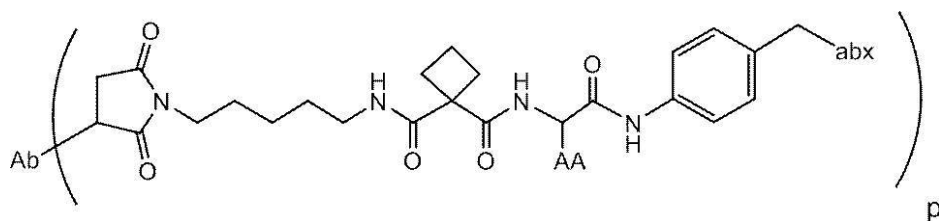


を含む。

30

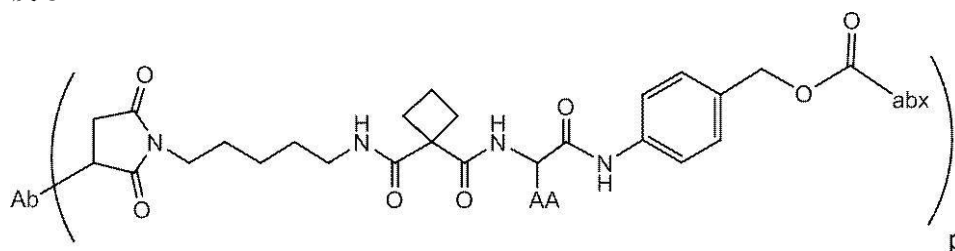
【0203】

本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：



及び

40

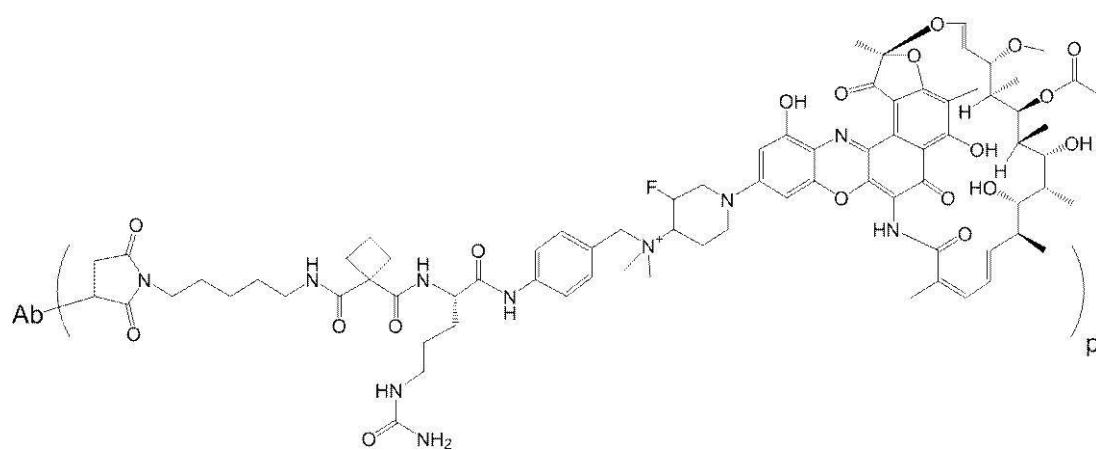


を含む。

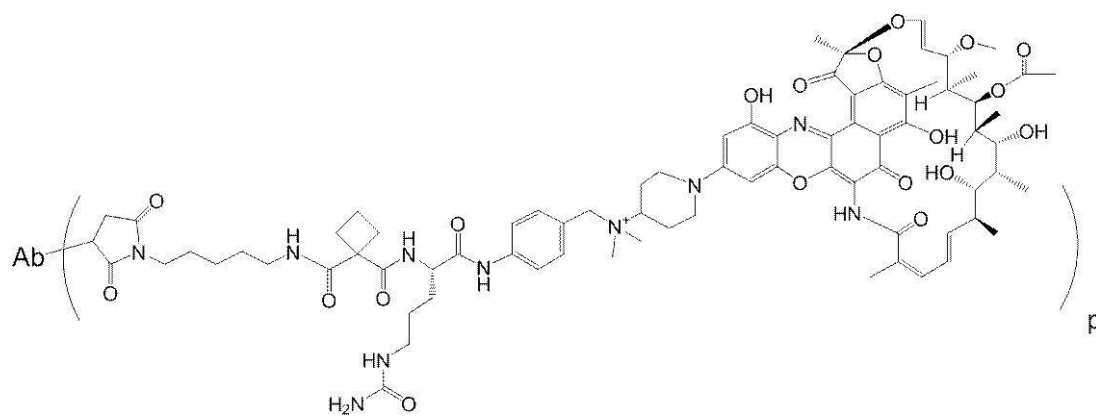
【0204】

50

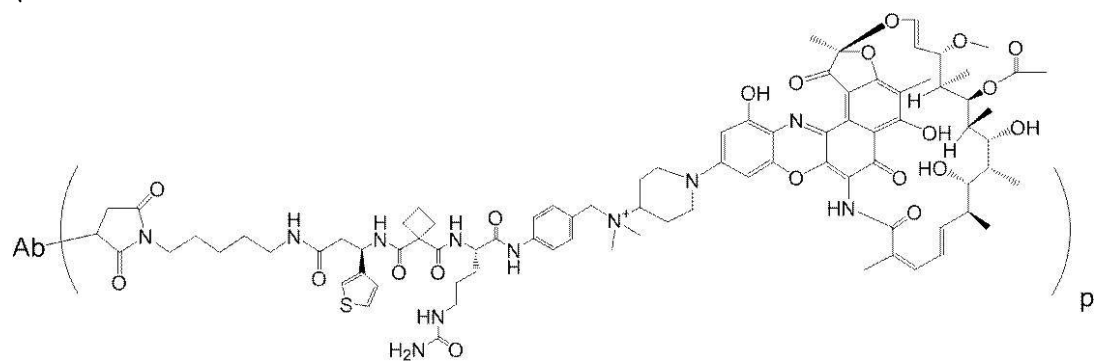
本発明の抗体－抗生物質抱合体（AAC）化合物の別の実施形態は、下式：



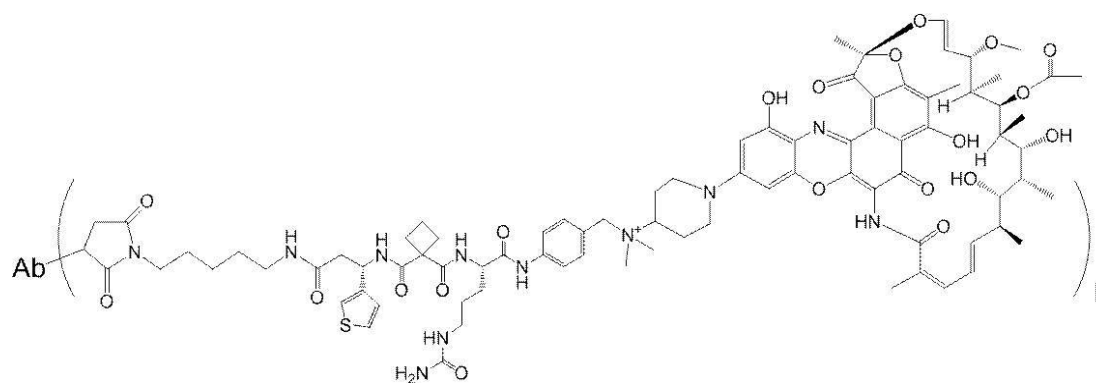
10



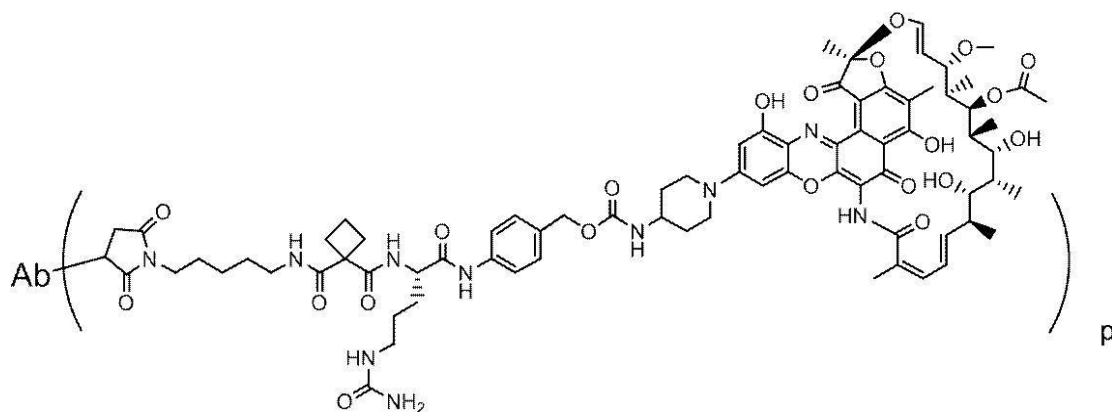
20



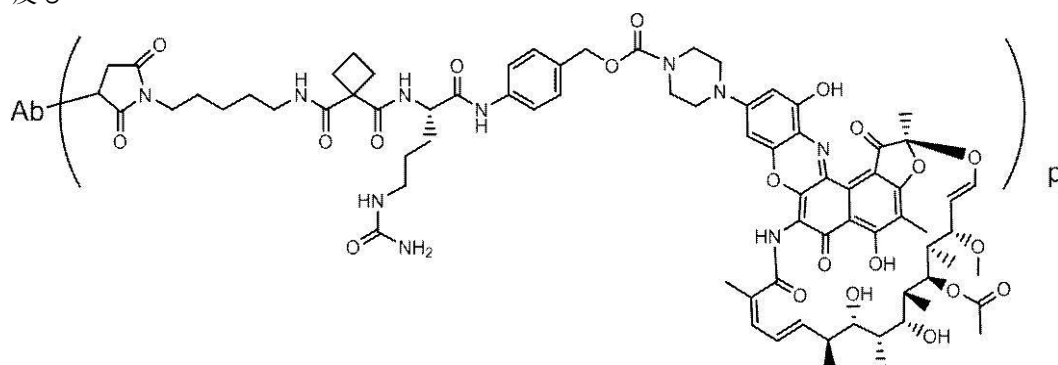
30



40



10

、
及び

20

を含む。

【0205】

A A Cの抗生物質負荷

抗生物質負荷は、式 I の分子中の抗体当たりの抗生物質部分 (a b x) の平均数である p によって表される。抗生物質負荷は、抗体当たり 1 ~ 20 の抗生物質部分 (D) の範囲であり得る。式 I の A A C は、1 ~ 20 の範囲の抗生物質部分と抱合する抗体の集まりまたはプールを含む。抱合反応からの A A C の調製物中の抗体当たりの抗生物質部分の平均数は、質量分析、E L I S A アッセイ、及び H P L C などの従来の手段によって特徴付けられても良い。また、p を単位として A A C の定量分布が決定されてもよい。いくつかの場合では、p がある特定の値である同種の A A C を他の抗生物質負荷を有する A A C から分離、精製、及び特徴付けることは、逆相 H P L C または電気泳動などの手段によって達成されても良い。

30

【0206】

いくつかの抗体-抗生物質抱合体に関して、p は、抗体上の結合部位の数によって制限され得る。例えば、上記の例示的な実施形態にあるように、結合がシステインチオール基である場合、抗体は、1 個のみまたはいくつかのシステインチオール基を有し得るか、またはリンカーが結合される 1 個のみまたはいくつかの十分に反応性のチオール基を有し得る。ある特定の実施形態では、より高い抗生物質負荷、例えば p > 5 は、ある特定の抗体-抗生物質抱合体の凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の損失をもたらす場合がある。ある特定の実施形態では、本発明の A A C の抗生物質負荷は、1 ~ 約 8、約 2 ~ 約 6、約 2 ~ 約 4、または約 3 ~ 約 5、約 4、または約 2 の範囲である。

40

【0207】

ある特定の実施形態では、理論上の最大数よりも少ない抗生物質部分が抱合反応中に抗体に抱合される。抗体は、以下に論じられるように、例えば、抗生物質-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含有し得る。一般に、抗体は、抗生物質部分に結合し得る多くの遊離及び反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体における大半のシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある特定の実施

50

形態において、抗体は、ジチオスレイトール（D T T）またはトリカルボニルエチルホスフィン（T C E P）などの還元剤により、部分または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基を生成し得る。ある特定の実施形態において、抗体は、リジンまたはシステインなどの反応性求核基を明らかにするために、変性条件に置かれる。

【0208】

A A Cの負荷（抗生物質／抗体比、「A A R」）は、異なる方法で、例えば、（i）抗体に対する抗生物質－リンカー中間体またはリンカー試薬のモル過剰を制限すること、（i i）抱合反応時間または温度を制限すること、及び（i i i）システインチオール修飾のための部分的または制限的還元条件により制御されても良い。本明細書において、または図において言及される場合、「D A R」は、「A A R」と同じ意味であるものとする。

10

【0209】

2個以上の求核基が抗生物質－リンカー中間体またはリンカー試薬、続いて抗生物質部分試薬と反応する場合、得られる産物は、抗体に結合した1つ以上の抗生物質部分が分布するA A C化合物の混合物であることを理解されたい。抗体当たりの抗生物質の平均数は、抗体特異的及び抗生物質特異的である2重E L I S A抗体アッセイにより混合物から計算され得る。個々のA A C分子は、質量分析によって混合物中で特定され、H P L C、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離されても良い（例えば、Mc D o n a g h e t a l（2006）P r o t . E n g r . D e s i g n & S e l e c t i o n 19（7）：299－307、H a m b l e t t e t a l（2004）C l i n . C a n c e r R e s . 10：7063－7070、H a m b l e t t , K . J . , e t a l . “ E f f e c t o f d r u g l o a d i n g o n t h e p h a r m a c o l o g y , p h a r m a c o k i n e t i c s , a n d t o x i c i t y o f a n a n t i - C D 3 0 a n t i b o d y - d r u g c o n j u g a t e , ” A b s t r a c t N o . 6 2 4 , A m e r i c a n A s s o c i a t i o n f o r C a n c e r R e s e a r c h , 2 0 0 4 A n n u a l M e e t i n g , M a r c h 2 7 - 3 1 , 2 0 0 4 , P r o c e e d i n g s o f t h e A A C R , V o l u m e 4 5 , M a r c h 2 0 0 4 , A l l e y , S . C . , e t a l . “ C o n t r o l l i n g t h e l o c a t i o n o f d r u g a t t a c h m e n t i n a n t i b o d y - d r u g c o n j u g a t e s , ” A b s t r a c t N o . 6 2 7 , A m e r i c a n A s s o c i a t i o n f o r C a n c e r R e s e a r c h , 2 0 0 4 A n n u a l M e e t i n g , M a r c h 2 7 - 3 1 , 2 0 0 4 , P r o c e e d i n g s o f t h e A A C R , V o l u m e 4 5 , M a r c h 2 0 0 4を参照されたい）。ある特定の実施形態では、単一の負荷値を有する同種のA A Cが、電気泳動またはクロマトグラフィーによって抱合混合物から単離されても良い。本発明のシステイン改変抗体は、抗体上の反応部位が主に改変されたシステインチオールに限定されるため、より均質な調製を可能にする。一実施形態では、抗体当たりの抗生物質部分の平均数は、約1～約20の範囲である。いくつかの実施形態では、この範囲は約1～4で選択され、制御される。

20

30

【0210】

抗体－抗生物質抱合体の調製方法

40

式IのA A Cは、（1）抗体の求核基と二価のリンカー試薬とを反応させて共有結合を介してA b－Lを形成し、続いて抗生物質部分（a b x）と反応させることと、（2）抗生物質部分の求核基と二価リンカー試薬とを反応させて、共有結合を介してL－a b xを形成し、続いて抗体の求核基と反応させることとを含む、当業者に既知の有機化学反応、条件、及び試薬を使用するいくつかの経路によって調製されても良い。後者の経路を介して式IのA A Cを調製するための例示的な方法は、U S 7 4 9 8 2 9 8に記載され、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0211】

抗体上の求核基には、（i）N末端アミン基、（i i）側鎖アミン基、例えば、リジン、（i i i）側鎖チオール基、例えば、システイン、及び（i v）抗体がグリコシル化さ

50

れる糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれるが、これらに限定されない。アミン、チオール、及びヒドロキシル基は、求核性であり、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート(haloformate)、及び酸ハロゲン化物などの活性エステル、(ii) ハロアセトアミドなどのアルキル及びベンジルハロゲン化物、(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能である。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体が完全にまたは部分的に還元されるように、DTT(ジチオスレイトール)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)などの還元剤での処理によって、リンカー試薬との抱合のために抗体を反応性にしても良い。よって、各システイン架橋は、理論上、2つの反応性のチオール求核剤を形成する。追加の求核基は、リジン残基の修飾を通して、例えば、リジン残基と2-イミノチオラン(トラウト試薬(Traut's reagent))とを反応させて、アミンをチオールへと変換させることによって抗体内に導入することができる。反応性チオール基は、1、2、3、4個以上のシステイン残基を導入することにより(例えば、1個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異形抗体を調製することにより)抗体内に導入され得る。

【0212】

本発明の抗体-抗生物質抱合体は、アルデヒドまたはケトンカルボニル基などの抗体上の求電子基と、リンカー試薬または抗生物質上の求核基との間の反応によって産生されても良い。リンカー試薬上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体は、リンカー試薬または抗生物質上の求核置換基と反応することが可能である求電子部分を導入するように修飾される。別の実施形態では、グリコシル化抗体の糖を、例えば過ヨウ素酸塩酸化試薬で酸化させて、リンカー試薬または抗生物質部分のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成しても良い。得られるイミンシッフ塩基群は、安定した結合を形成し得るか、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態では、グリコシル化抗体の炭水化物部分と、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとを反応させることにより、抗体において、抗生物質上の適切な基と反応することができるカルボニル(アルデヒド及びケトン)基がもたらされ得る(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の実施形態において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有する抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドが産生され得る(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146, US 5362852)。このようなアルデヒドは、抗生物質部分またはリンカー求核剤と反応し得る。

【0213】

抗生物質部分上の求核基には、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物などの活性エステル、(ii) ハロアセトアミドなどのアルキル及びベンジルハロゲン化物、(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能なアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されない。

【0214】

表3の抗体-抗生物質抱合体(AAC)は、実施例18に記載の方法に従い、記載のrF1抗体及び表2のリンカー-抗生物質中間体を抱合することにより調製された。インビトロマクロファージアッセイ(実施例19)及びインビボマウス腎臓モデル(実施例20)により、AACの有効性を試験した。

表3 rF1抗体-PM L-抗生物質抱合体(AAC)

A A C 番号	A A C の式	リンカー ー a b x P L A 番号	A A R *
1 0 1	チオー r F 1 - L C - V 2 0 5 C - M C - (C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル、フルオロピペ B O R)	P L A - 1	2 . 0
1 0 2	チオー r F 1 - H C - 1 2 1 C , L C - V 2 0 5 C - M C - (C B D K - c i t) - P A B - (ジメチルピペ B O R)	P L A - 2	3 . 9
1 0 3	チオー r F 1 - L C - V 2 0 5 C - M C - (C B D K - c i t) - P A B - (ジメチルピペ B O R)	P L A - 2	1 . 9
1 0 4	チオー r F 1 - H C - A 1 2 1 C , L C - V 2 0 5 C - M C - (C B D K - c i t) - P A B - (ジメチルピペ B O R)	P L A - 2	3 . 7

* A A R = 抗生物質／抗体比平均

野生型（「WT」）、システイン改変変異抗体（「チオ」）、軽鎖（「LC」）、重鎖（「HC」）、6-マレイミドカプロイル（「MC」）、マレイミドプロパノイル（「MP」）、シクロブチルジケト（「CBDK」）、シトルリン（「cit」）、システイン（「cys」）、p-アミノベンジル（「PAB」）、及びp-アミノベンジルオキシカルボニル（「PABC」）

【0215】

抗体－抗生物質抱合体を用いた感染症の治療及び阻止方法

本発明の r F 1 - A A C は、ヒト及び獣医 *Staphylococci*、例えば、*S. aureus*、腐生 *S. saprophyticus*、及び *S. simulans* に対して有効な抗菌剤として有用である。特定の態様では、本発明の A A C は、*S. aureus* 感染症を治療するのに有用である。

【0216】

血流に入った後、*S. aureus* はほぼ全ての臓器に転移性感染引き起こし得る。二次感染は、療法開始前の症例の約3分の1（Fowler et al., (2003) Arch. Intern. Med. 163:2066-2072）、及び療法の開始後の患者の10%に生じる（Khatib et al., (2006) Scand. J. Infect. Dis., 38:7-14）。感染の特徴は、大きな膿の蓄積、組織破壊、及び膿瘍の形成（その全てが大量の好中球を含む）である。菌血症が3日以上持続する場合、約40%の患者が合併症を発症する。

【0217】

A A C の提案される作用機構は上述された（抗体－抗生物質抱合体の小見出し下）。本発明の r F 1 抗体－抗生物質抱合体（A A C）は、細胞内病原体の治療に多大な治療利点を有する。A A C リンカーは、ファゴリソソーム酵素に曝すことによって切断され、活性抗生物質を放出する。閉鎖された空間及び比較的高い局所抗生物質濃度（細菌当たり約 10^4 ）により、ファゴリソソームがもはや細胞内病原体の生存を支持しないという結果になる。A A C は本質的に不活性プロドラッグであるため、抗生物質の治療指数は、遊離（非抱合）形態に対して拡大し得る。本抗体は病原体特異的標的を提供するが、切断可能な

10

20

30

40

50

リンカーは病原体の細胞内位置に特異的な条件下で切断される。この作用は、オプソニン化病原体ならびにファゴリソソーム内に共存する他の病原体の両方に対して直接的であり得る。抗生物質抵抗性は、疾患を引き起こす病原体が抗生物質及び他の抗菌剤による死滅に抵抗する能力であり、多剤耐性とは機構的に異なる (Lewis K (2007), 'Persister cells, dormancy and infectious disease'. Nature Reviews Microbiology 5 (1): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557)。むしろ、この抵抗性の形態は、生残菌と呼ばれる微生物細胞の小さな亜集団によって引き起こされる (Bigger JW (14 October 1944), 'Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization'. Lancet 244 (6320): 497-500)。これらの細胞は、古典的な意味では多剤耐性ではないが、むしろそれらの遺伝的に同型同胞を死滅させることができる抗生物質治療に対して耐性である休眠細胞である。この抗生物質抵抗性は、非分裂または非常に緩徐に分裂する生理学的状態により誘導される。抗菌治療がこれらの生残菌細胞を根絶できない場合、それらは再発する慢性感染の貯蔵所となる。本発明の抗体-抗生物質抱合体は、これらの生残菌細胞を死滅させるための独特な特性を有し、多剤耐性細菌集団の出現を抑制する。

【0218】

別の実施形態では、本発明の rF1-AAC は、病原体が生存する細胞内区画に関わらず感染症を治療するために使用され得る。

【0219】

別の実施形態では、本発明の rF1-AAC は、プランクトンまたはバイオフィルム形態の *Staphylococci* の細菌を標的とするためにも使用され得る。本発明の抗体-抗生物質抱合体 (AAC) で治療可能な細菌感染症は、*S. aureus* 肺炎などの細菌性肺感染症、骨髄炎、再発性副鼻腔炎、細菌性心内膜炎、細菌性眼感染症 (トラコーマ及び結膜炎など)、心臓、脳、または皮膚の感染症、旅行者下痢、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群 (IBS)、クローン病、及び一般的な IBD (炎症性腸疾患) などの消化管の感染症、細菌性髄膜炎、及び筋肉、肝臓、髄膜、または肺などの任意の臓器における膿瘍の治療を含む。細菌感染症は、尿路、血流、創傷、またはカテーテル挿入部位などの身体の他の部分であり得る。本発明の AAC は、バイオフィルム、インプラント、または聖域部位 (例えば、骨髄炎及び人工関節の感染)、ならびに院内感染の肺炎及び菌血症などの高死亡率感染症を伴う治療が困難な感染症に有用である。Staphylococcal aureus 感染を阻止するために治療され得る脆弱な患者群は、血液透析患者、免疫力が低下している患者、集中治療室にいる患者、及びある特定の手術患者を含む。別の態様では、本発明は、動物に rF1-AAC または本発明の AAC の薬学的製剤を投与することを含む、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおける微生物感染を死滅させる、治療する、または阻止する方法を提供する。本発明は、このような微生物感染に関連する疾患、またはそれに日和見的に起因する疾患を治療または阻止することをさらに特徴とする。このような治療または阻止方法は、本発明の組成物の経口、局所、静脈内、筋肉内、または皮下投与を含み得る。例えば、手術または IV カテーテルの挿入前、ICU において、移植医療において、癌化学療法と共に若しくはその後、または高い感染リスクを有する他の行為において、感染の発症または拡散を阻止するために本発明の AAC が投与されても良い。

【0220】

細菌感染症は、活性及び不活性形態の細菌によって引き起こされる場合があり、AAC は、活性及び不活性の両方の潜在型形態の細菌感染症を治療するのに十分な量及び期間投与され、この治療期間は、細菌感染症の活性形態を治療するのに必要な期間よりも長い。

【0221】

本発明の態様は、治療有効量の本発明の rF1-AAC を投与することによる、*S. a*

ureus及び／または*Listeria monocytogenes*に感染した患者の治療方法である。本発明は、手術、火傷患者、及び臓器移植などの病院環境において治療有効量の本発明のrF1-AACを投与することによって、*S. aureus*若しくは*S. Epidermidis*または*S. saprophyticus*若しくは*S. SIMULANS*のうちの1つ以上による感染を阻止する方法も想定する。

【0222】

当該技術分野の医師によって決定される細菌感染症の治療を必要とする患者は、患者が感染している細菌の種類を既に診断されていてもよいが、それと診断される必要はない。細菌感染症の患者は非常に急速に、ほんの数時間で急変する可能性があるため、病院に入院したときに患者は、バンコマイシンまたはシプロフロキサシンなどの1つ以上の標準的な治療Abxと共に、本発明のrF1-AACを投与され得る。診断結果が利用可能になり、感染において、例えば*S. aureus*の存在を示す場合、患者はrF1-AACを用いた治療を継続することができる。したがって、細菌感染症または具体的には*S. aureus*感染症の治療方法の一実施形態では、患者は、治療有効量のrF1-AACを投与される。本発明の治療または阻止方法において、本発明のAACは、唯一の治療薬として、または以下に記載される他の薬剤と共に投与され得る。本発明のAACは、前臨床モデルのMRSAの治療において、バンコマイシンよりも優れていることを示す。AACとSOCとの比較は、例えば、死亡率の減少により測定され得る。治療された患者は、様々な測定可能な因子によってAAC治療に対する応答性に関して評価されるだろう。臨床医が彼らの患者における改善を評価するために使用し得る徴候及び症状の例としては、診断時に上昇していた場合、白血球数の正常化、診断時に上昇していた場合（発熱）、体温の正常化、血液培養物のクリアランス、より少ない紅斑及び排膿を含む創傷における視覚的改善、酸素をあまり必要としない、または人工呼吸されている患者における人口呼吸速度減少などの人工呼吸器の必要性の減少、患者が診断時に人工呼吸されていた場合、人工呼吸器の完全な取り外し、安定した血圧を支持するための薬剤が診断時に必要であった場合、その薬剤の使用低下、診断時に異常であった場合、クレアチニンの上昇または肝臓機能試験などの末端臓器不全を示唆する検査異常の正常化、ならびに放射線画像における改善（例えば、消散を示す、以前に肺炎を示唆した胸部x線）が挙げられる。ICU中の患者において、これらの因子は少なくとも毎日測定され得る。発熱は、絶対好中球数ならびに「左方移動」（活性感染にตอบสนองして好中球産生の増加を示すブラストの出現）が消散したエビデンスを含む、白血球数と同様に厳密に監視される。

【0223】

本発明の治療方法の文脈において、細菌感染症の患者は、治療の開始前若しくは開始時、または診断時の値、徴候、若しくは症状と比較して、先行因子のうちの少なくとも2つ以上において、当該技術分野の医師によって評価されるときに大幅な測定可能な改善がある場合、治療されたと考えられる。いくつかの実施形態では、前述の因子のうちの3、4、5、6以上において、測定可能な改善がある。いくつかの実施形態では、測定可能な因子の改善は、治療前の値と比較して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%である。典型的には、患者の測定可能な改善が、i) 本来特定された細菌が成長しない再度の血液または組織培養物（典型的には数回）、ii) 発熱が正常化する、iii) WBCが正常化する、及びiv) 患者が有していた既存の共存症を所与として、末端臓器不全（心臓、肺、肝臓、腎臓、血管虚脱）が完全にまたは部分的のいずれかで消散したエビデンスを含む場合、患者は、細菌感染症（例えば*S. aureus*感染症）が完全に治療されたと考えられ得る。

【0224】

投薬。前述の態様のいずれかにおいて、感染患者を治療する際のAAC投薬量は通常約0.001~1000mg/kg/日である。一実施形態では、細菌感染症の患者は、約1mg/kg~約150mg/kg、典型的には約5mg/kg~約150mg/kg、より具体的には25mg/kg~125mg/kg、50mg/kg~125mg/kg、さらにより具体的には約50mg/kg~100mg/kgの範囲のAAC用量で治療

される。AACは、毎日（例えば、5～50mg/kg/日の単回量）または少ない頻度（例えば、5、10、25、または50mg/kg/週）で与えられても良い。1用量は、2日にわたって、例えば、1日目に25mg/kg、そして次の日に25mg/kgに分割されても良い。患者は、1～8週の期間の間、3日に1回（q3D）、1週間に1回から2週間に1回（qOW）、ある用量を投与され得る。一実施形態では、患者は、Staph A感染症などの細菌感染症を治療するために、標準的な治療（SOC）と共に、2～6週間の間、1週間に1回、IVを介して本発明のAACを投与される。治療の長さは、患者の状態または感染症の程度、例えば、無併発の菌血症に関しては2週間の期間、または心内膜炎を伴う菌血症に関しては6週間の期間指示されるだろう。

【0225】

10

一実施形態では、AACは、1～7日間連続で2.5～100mg/kgの初期用量で、続いて1ヶ月間1～7日に1回、0.005～10mg/kgの維持用量で投与された。

【0226】

投与経路。細菌感染症の治療に関して、本発明のAACは、先行の投薬量のいずれかで、静脈内（i.v.）または皮下投与され得る。一実施形態では、rF1-AACが静脈内投与される。特定の実施形態では、rF1-AACはi.v.を介して投与され、このrF1抗体は、SDR及びrF1Abならびに表4A及び4B下で開示されるアミノ酸配列を有するAb群から選択されたものである。

【0227】

20

併用療法。AACは、1つ以上の追加の、例えば、患者を治療する医師により判断されるとき、必要に応じて第2の治療薬または予防薬と共に投与されても良い。

【0228】

一実施形態では、本発明の抗体-抗生物質抱合体化合物と併用して投与される第2の抗生物質は、(i) アミノグリコシド、(ii) ベータラクタム、(iii) マクロライド/環状ペプチド、(iv) テトラサイクリン、(v) フルオロキノリン/フルオロキノロン、(vi) 及びオキサゾリジノンの構造クラスから選択される。Shaw, K. and Barbachyn, M. (2011) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1241: 48-70, Sutcliffe, J. (2011) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1241: 122-152を参照されたい。

30

【0229】

一実施形態では、本発明の抗体-抗生物質抱合体化合物と併用して投与される第2の抗生物質は、クリンダマイシン、ノボビオシン、レタパムリン、ダプトマイシン、GSK-2140944、CG-400549、シタフロキサシン、テイコプラニン、トリクロサン、ナフチリドン、ラデゾリド、ドキソルピシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタビン、ダルババンシン、及びアジスロマイシンから選択される。

【0230】

これらの追加の治療薬または予防薬のさらなる例は、抗炎症剤（例えば、非ステロイド系抗炎症剤（NSAID、例えば、デトプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナメエート（mefenamate）、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメオン（nabumetone）、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカム、スリンダック、トルメチン、セレコキシブ、ロフェコキシブ、アスピリン、サリチル酸コリン、サルサルテ（salsalte）、ならびにサリチル酸ナトリウム及びサリチル酸マグネシウム）及びステロイド（例えば、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン））抗菌剤（例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、アモキシシリン、メトロニダゾール、ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロ

40

50

キサシリン、ナフシリン、アンピシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリン、ピペラシリン、アゾシリン、テモシリン、セファロチン、セファピリン、セフラジン、セファロリジン、セファゾリン、セファマンドール、セフロキシム、セファレキシン、セフプロジル、セファクロル、ロラカルベフ、セフォキシチン、セフマトゾール (cefmatazole)、セフォタキシム、セフチドキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフトラジウム、セフィキシム、セフポドキシム、セフチブテン、セフジニル、セフピロム、セフェピム、BAL 5788、BAL 9141、イミペネム、エルタペネム、メロペネム、アストレオナム、クラブラネート、スルバクタム、タゾバクタム、ストレプトマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、パロマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ネチルマイシン、スペクチノマイシン、シソマイシン、ジベカリン、イセパマイシン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、テリスロマイシン、ABT-773、リンコマイシン、クリンダマイシン、バンコマイシン、オリタバンシン、ダルババンシン、テイコプラニン、キヌプリスチン、及びダルホプリスチン、スルファニルアミド、パラアミノ安息香酸、スルファジアジン、スルフィソキサゾール、スルファメトキサゾール、スルファサリディン、リネゾリド、ナリジクス酸、オキシソリニン酸、ノルフロキサシン、ペフロキサシン、エノキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、テマフロキサシン、ロメフロキサシン、フレロキサシン、グレパフロキサシン、スパルフロキサシン、トロバフロキサシン、クリナフロキサシン、モキシフロキサシン、ゲミフロキサシン、シタフロキサシン、ダプトマイシン、ガレノキサシン、ラモプラニン、ファロペネム、ポリミキシン、チゲサイクリン、AZD 2563、またはトリメトプリム)、AAC 標的 Ag からの同じ若しくは異なる抗原に対する抗体を含む抗菌抗体、血小板凝集阻害剤 (例えば、アブシキシマブ、アスピリン、シロスタゾール、クロピドグレル、ジピリダモール、エプチフィバチド、チクロピジン、またはチロフィバン) 抗凝固薬 (例えば、ダルテパリン、ダナパロイド、エノキサパリン、ヘパリン、チンザパリン、またはワルファリン)、解熱剤 (例えば、アセトアミノフェン)、または脂質低下薬 (例えば、コレステラミン、コレステポール、ニコチン酸、ゲムフィプロジル、プロブコール、エゼチミブ、またはアトルバスタチン、ロスバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、セリバスタチン、及びフルバスタチンなどのスタチン) である。一実施形態では、本発明の AAC は、S. aureus (メチシリン耐性及びメチシリン感受性株を含む) に対する標準的な治療 (SOC) と併用して投与される。MSSA は通常、典型的には、ナフシリンまたはオキサシリンを用いて治療され、MRSA は、典型的には、バンコマイシンまたはセファゾリンを用いて治療される。

【0231】

これらの追加の薬剤は、AAC の投与 14 日、7 日、1 日、12 時間、若しくは 1 時間以内、またはそれと同時に投与されても良い。追加の治療薬は、AAC と同じまたは異なる薬学的組成物中に存在しても良い。異なる薬学的組成物中に存在する場合、異なる投与経路が使用され得る。例えば、AAC は静脈内または皮下投与され得る一方で、第 2 の薬剤は経口投与され得る。

【0232】

薬学的製剤

本発明は、rF1-AAC を含有する薬学的組成物、及び AAC を含有する薬学的組成物を使用した細菌感染症の治療方法も提供する。このような組成物は、好適な賦形剤、例えば、当該技術分野において周知であり、本明細書に記載される緩衝剤、酸、塩基、糖、希釈剤、滑走剤、防腐剤などを含む、薬学的に許容される賦形剤 (担体) をさらに含み得る。本方法及び組成物は、単独で、または感染疾患の治療のための他の従来方法及び／若しくは薬剤と併用して使用されても良い。いくつかの実施形態では、薬学的製剤は、1) 本発明の rF1-AAC、及び 2) 薬学的に許容される担体を含む。いくつかの実施形態では、薬学的製剤は、1) 本発明の AAC、及び任意選択で、2) 少なくとも 1 つの追加の治療薬を含む。

【0233】

本発明のAACを含む薬学的製剤は、水溶液または凍結乾燥若しくは他の乾燥製剤の形態で、所望の純度を有するAACを、任意選択の生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することにより保管用に調製される。許容可能な担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量及び濃度でレシipientに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウムなど）；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。インビボ投与に使用される薬学的製剤は一般に、滅菌であり、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

10

20

【0234】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技法により、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封入されても良い。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

【0235】

徐放性調製物が調製されても良い。徐放性調製物の好適な例としては、抗体または本発明のAACを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、有形製品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間にわたって分子を放出できる一方で、ある特定のヒドロゲルは、より短い時間期間の間タンパク質を放出する。被包された抗体またはAACが長時間体内にとどまる場合、それらは37℃の水分に曝された結果として変性または凝集する場合があります、生物活性の喪失及び免疫原性の変更をもたらす可能性がある。合理的な戦略は、関わる機構により安定化のために考案され得る。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド相互交換による分子間S-S結合形成であることが分かった場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸溶液からの凍結乾燥、水含量の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマーマトリクス組成の開発により達成され得る。

40

【0236】

50

AACは、標的細胞／組織に送達するための、任意の好適な形態で製剤化され得る。例えば、AACは、薬物を哺乳動物に送達するのに有用である、様々な種類の脂質、リン脂質、及び／または界面活性剤から構成される小胞であるリポソームとして製剤化されても良い。リポソームの構成成分は一般に、生体膜の脂質配置に類似する二層構成に配置される。抗体を含有するリポソームは、Epstein et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688、Hwang et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030、US 4485045、US 4544545、WO 97/38731、US 5013556などに記載される、当該技術分野において既知の方法により調製される。

【0237】

10

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により生成され得る。画定された孔径のフィルタを通してリポソームを押出して、所望の直径を有するリポソームを得る。

【0238】

材料及び方法

細菌株及び培養物：

全ての実験は、別途記載されない限り、NARSA (<http://www.narsa.net/control/member/repositories>) から得たMRSA-USA300 NRS384を用いて行われた。

20

【0239】

5%ヒツジ血液で補足したトリプシンダイズ寒天プレート (TSAプレート) 上で、37℃で18時間、細胞を成長させた。液体培養に関して、TSAプレートからの単一コロニーを、トリプシンダイズブロス (TSB) 中に播種し、200 rpmで振盪させながら37℃で18時間インキュベートし、新しいTSB中でこれらの培養物の100倍希釈物を、様々な時間、さらに継代した。

【0240】

細胞外細菌のMICの決定

細胞外細菌のMICは、トリプシンダイズブロス中で抗生物質の段階2倍希釈物を調製することにより決定された。抗生物質の希釈物は、96ウェル培養皿中で4連で作製された。MRSA (USA300のNRS384株) を、指数関数的に成長する培養物から取り、 1×10^4 CFU/mLに希釈した。37℃で振盪しながら細菌を抗生物質の存在下で18~24時間培養し、630 nMで光学密度 (OD) を読み取ることにより細菌成長を決定した。MICは、細菌の成長を>90%阻害した抗生物質の用量であると決定された。

30

【0241】

細胞内細菌のMICの決定

細胞内MICは、マウスの腹膜マクロファージ内に隔離された細菌に対して決定された (マウス腹膜マクロファージの生成に関しては以下を参照されたい)。マクロファージを 4×10^5 細胞/mLの密度で24ウェル培養皿で平板培養し、マクロファージ当たり10~20細菌の割合でMRSAに感染させた。マクロファージ培養物を、細胞外細菌の成長を阻害するために50 µg/mLのゲンタマイシン (細胞外細菌上でのみ活性である抗生物質) で補足された成長培地中で維持し、感染の1日後に試験抗生物質を成長培地に添加した。細胞内細菌の生存は、抗生物質の添加24時間後に評価された。マクロファージを、0.1%ウシ血清アルブミン、及び0.1%トリトン-Xで補足されたハックス緩衝生理食塩溶液で溶解し、可溶化液の段階希釈物は、0.05% Tween-20を含有するリン酸緩衝生理食塩溶液中で作製された。生存細胞内細菌の数は、5%脱線維素ヒツジ血液を含むトリプシンダイズ寒天プレート上で平板培養することにより決定された。

40

【0242】

細菌細胞壁調製物 (CWP)、免疫ブロット、及びELISA

50

30%ラフィノース、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾスタフィン (Cell Science, Canton, MA)、及びEDTAを含まないプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche, Pleasanton, CA) で補足された、10mMトリス-HCl (pH7.4) の1mL当たり40mgのペレット化 *S. aureus* または *S. epidermidis* を、37℃で30分間インキュベートすることによりCWPを生成した。可溶化液を11, 600 $\times$ gで5分間遠心分離し、細胞壁構成成分を含有する上清を回収した。免疫沈降に関して、CWPを、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の示される一次抗体を含有するNP-40緩衝液 (120mM NaCl、50mMトリス-HCl (pH8.0)、1%NP-40、コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)、及び2mMジチオスレイトール) 中に4回希釈し、4℃で2時間インキュベートし、続いてプロテイン
10
A/Gアガロース (Thermo, Waltham, MA) と共に1時間インキュベートした。20mMトリス-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のリゾスタフィン、1%トリトン-X100 (Thermo)、及びEDTAを含まないプロテアーゼインヒビターカクテル中で、37℃で30分間インキュベートすることにより、全細胞可溶化液 (WCL) を生成した。免疫ブロット分析に関して、4~12%トリス-グリシゲル上でタンパク質を分離し、ニトロセルロース膜 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に移し、続いて示される一次抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でブロットした。使用された抗体は、表1に列挙される。レクチン研究は、0.1mM CaCl_2 及び0.01mM MnCl_2 で補足されたコンカナバリンA (ConA) -またはsWGA-アガロースビーズ (Vector Labs, Burlingame, CA)
20
で、一晚濾過した (0.2ミクロン) 培養上清を免疫沈降することによって行われた。

【0243】

ELISA実験は、標準的なプロトコルを用いて行われた。簡潔に、CWPで予めコーティングされたプレートを、ヒトIgG調製物、すなわち、精製したヒトIgG (Sigma)、静脈内免疫グロブリンGammagard Liquid (Baxter, Westlake Village, CA)、健康なドナーまたはMRSA患者からプールした血清 (両方とも社内で生成された) と反応させた。血清または精製したIgGに存在する抗Staphylococcal IgGの濃度は、ペプチドグリカンに対して既知の濃度のmAb 28.9.9で生成された校正曲線を用いて計算された。

【0244】

ヒト好中球プロテアーゼまたはヒト好中球及び培養した細胞からのリソソーム抽出物を用いた細菌の処理

Lysosome Enrichmentキット (Thermo) を使用して、リソソーム抽出物を、ヒト好中球、THP-1細胞、及びRAW細胞から単離した。合計5 $\times$ 10⁷細胞を使用して、リソソーム中300~500マイクログラムの総タンパク質を得た。リソソームにおけるプロテアーゼ活性を維持するために、プロテアーゼインヒビターは全ステップから省かれた。ダウンス型ホモジナイザー (Wheaton, Millville, NJ) を使用して30回ストロークすることにより細胞の形質膜を破壊した。破碎物を500 $\times$ gで5分間遠心分離して、核除去後上清を得、これを8%、20%、23%、27%、及び30% (上から下) のイオジキサノールの勾配の上に充填した。4℃で2
40
時間、145,000 $\times$ gで超遠心分離した後、8%と20%との間のイオジキサノールに層状に形成されたリソソームを得た。このリソソームの分画をPBS中に希釈し、4℃で30分間、18,000 $\times$ gで遠心分離してペレット化した。リソソームペレットをPBSで洗浄し、トリス緩衝生理食塩水と共に2%CHAPSに溶解して、リソソーム抽出物を得た。

【0245】

宿主プロテアーゼによるSDRタンパク質の切断を分析するために、*S. aureus* の細菌を、50nMの精製したヒト好中球セリンプロテアーゼ若しくは150mM NaCl及び2mM CaCl_2 を含む50mMトリス (pH8.0) 中の0.1mg/mlの好中球リソソーム抽出物、または0.1mg/mlのRAW若しくは100mM Na
50

C l及び2 mM D T T (p H 5. 5)を含む5 0 mM N a C i t r a t e中のT H P-1 リソソーム抽出物で処理した。カテプシンG阻害剤 (C a l b i o c h e m, B i l l e r i c a, M A)を1 0 0 g / m lで添加した。これらの混合物を3 7℃で、精製したプロテアーゼを使用したときには3 0分間、リソソーム可溶化物を使用したときには1時間インキュベートし、ペレット細菌に遠心分離した。切断産物を検出するために、免疫ブロットにより上清を分析した。いくつかの実験では、細胞壁調製物は残りの細菌ペレットから得て、同様に免疫ブロットにより分析された。

【実施例】

【0246】

実施例1 細胞内MRSAは従来の抗生物質から保護される

哺乳類細胞は抗生物質療法の存在下でS. aureusに保護的環境を提供するという仮説を確認するために、細胞外プランクトン細菌対マウスマクロファージ内に隔離された細菌に対する、侵襲性MRSA感染症の標準的な治療 (SOC)として現在使用されている3つの主要な抗生物質 (バンコマイシン、ダプトマイシン、及びリネゾリド)の有効性を比較した (表1)。

【0247】

細胞外細菌に関して、MRSAをトリプシンダイズブロス中で一晚培養し、MICが成長を阻止した最小抗生物質用量であることを決定した。細胞内細菌に関して、マウス腹膜マクロファージをMRSAに感染させ、細胞外細菌を死滅させるためにゲンタマイシンの存在下で培養した。感染1日後に試験抗生物質を培養培地に添加し、生存細胞内細菌の総数を24時間後に決定した。臨床上適切な抗生物質の予想された血清濃度はAntimicrobial Agents, Andre Bryskier. ASM Press, Washington DC (2005)に報告された。

表1：液体培養物中の細胞外細菌成長vs. マウスマクロファージ内に隔離された細胞内細菌に対するいくつかの抗生物質の最小阻害濃度 (MIC)

抗生物質 (A b x)	細胞外 MRSA MIC (μ g / m L)	細胞内 MRSA MIC (μ g / m L)	血清 C m a x (μ g / m L)
バンコシン	1	> 1 0 0	5 0
ダプトマイシン	4	> 1 0 0	6 0
リネゾリド	0. 3	> 2 0	2 0
アプテシン	0. 0 0 4	5 0	2 0

【0248】

非常に病原性の市中感染MRSA株USA300を用いたこの分析により、細胞外MRSAは液体培養物中で低濃度のバンコマイシン、ダプトマイシン、及びリネゾリドによる成長阻害に非常に感受性であるが、3つ全ての抗生物質が臨床的に達成可能な濃度の抗生物質に曝された、マクロファージ内に隔離された同じMRSA株を死滅させることができなかったことが明らかとなった。細胞内病原体の排除に比較的有效であると考えられるリファンピシンでさえ (Vandenbroek, P. V. (1989) Antimicrobial Drugs, Microorganisms, and Phagocytes. Reviews of Infectious Diseases 11, 213-245)、プランクトン細菌の成長を阻害するのに必要とされる用量 (MIC)と比較して、細胞内MRSAを排除するために6, 000倍高い用量を必要とし (表1)、大部分の既存の抗生物質がインビトロ及びインビボの両方において細胞内S. aureusの死

滅に不十分であることを示す他の研究と一致した (Sandberg, A., Hessler, J. H., Skov, R. L., Blom, J. & Frimodt-Møller, N. (2009) 'Intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model' Antimicrob Agents Chemother 53, 1874-1883)。

【0249】

実施例2 細胞内MRSAによる感染の拡散

これらの実験は、細胞内細菌の病原性対等用量の自由生活プランクトン細菌を比較し、細胞内細菌がインビボでバンコマイシンの存在下で感染を確立することができるかを決定した。4つのマウスのコホートを、静脈内注射により、ブロス培養物から直接採取した、ほぼ等用量の *S. aureus* の生存可能な遊離細菌 (2.9×10^6)、またはドナーマウスの腹膜感染により生成された宿主マクロファージ及び好中球内に隔離された細胞内細菌 (1.8×10^6) に感染させ (図1A)、選択群を、感染直後、次に、1日1回、バンコマイシンで処置した。マウスにおいて *S. aureus* が一貫してコロニー形成される臓器である腎臓における細菌のコロニー形成に関して、感染4日後にマウスを検査した²³。3つの独立した実験において、等用量のプランクトン細菌に感染させたものと比較して、細胞内細菌に感染させたマウスの腎臓において、当量またはより高い細菌負荷が観察された (図1B)。意外にも、細胞内細菌での感染は、このモデルにおいて、プランクトン細菌に感染させた後、効率的にコロニー形成されない臓器である脳により一貫したコロニー形成をもたらしたことが分かった (図1C)。さらに、このモデルにおいて、プランクトン細菌ではなく、細胞内細菌がバンコマイシン療法に対して感染を確立することができた (図1B、図1C)。

【0250】

さらにインビトロにおける分析は、細胞内生存が抗生物質の回避を容易にする程度をより定量的にすることに取り組んだ。この目的のために、MG63骨芽細胞を、バンコマイシンの存在下で、プランクトンMRSAまたは細胞内MRSAのいずれかに感染させた。

【0251】

骨芽細胞またはHBMECの感染。MG63細胞系をATCC (CRL-1427) から入手し、10mMヘプス及び10%ウシ胎仔血清 (RPMI-10) で補足されたRPMI 1640組織培養培地中で維持した。HBMEC細胞 (カタログ#1000) 及びECM培地 (カタログ#1001) をSciencell Research Labs (Carlsbad, CA) から入手した。細胞を24ウェル組織培養プレートで平板培養し、培養して融合層を得た。実験日に、細胞をRPMI (補足なし) で1回洗浄した。MRSAまたは感染腹膜細胞をコンプリートRPMI-10中に希釈し、感染直前にバンコマイシンを5ug/mLで添加した。 1×10^6 腹膜細胞/mLで腹膜細胞を骨芽細胞に添加した。細胞の試料を0.1%トリトン-Xで溶解し、感染時の生の細胞内細菌の実際の濃度を決定した。全ての感染に対する実際の力価は、細菌の段階希釈物を、5%脱線維素ヒツジ血液を含むトリプシンダイズ寒天プレート上で平板培養することにより決定された。

【0252】

MRSA (遊離細菌) を、培地、培地+バンコマイシン、または培地+バンコマイシンに播種し、MG63骨芽細胞 (図1E) またはヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC、図1F) の単層上で平板培養した。プレートを遠心分離して、細菌と単層の接触を促進した。各時間点で、培養上清を採取して細胞外細菌を回収するか、または付着細胞を溶解して細胞内細菌を開放した。

【0253】

バンコマイシン単独に曝されたプランクトン細菌は効率的に死滅した。生存細菌は、培養物において1日後に回収されなかった (図1D)。同様の数のプランクトン細菌をMG63骨芽細胞上で平板培養した際、感染1日後に、骨芽細胞の浸潤によりバンコマイシン

から保護された、MG63細胞と結合した少数の生存細菌（インプットの約0.06%）が回収された。

【0254】

腹膜細胞内に隔離されたMRSAは、バンコマイシンの存在下で、生存及び感染効率の両方で劇的な増加を示した。白血球中の約15%の細胞内MRSAが、バンコマイシンがプランクトン細菌の培養物を滅菌した同じ条件下で生存した。細胞内細菌はまた、バンコマイシンの存在下で、MG63骨芽細胞の単層をより良く感染させることができ、バンコマイシンに曝された1日後に回収された細菌を倍増した（図1D）。さらに、細胞内S. aureusは、遊離生細菌を死滅させたバンコマイシンの濃度に一定して曝された、MG63細胞（図1E）、一次ヒト脳内皮細胞（図1F）、及びA549気管支上皮細胞（図示せず）において、24時間の期間にわたってほぼ10倍増加することができた。抗生物質による死滅から保護されるが、感染腹膜マクロファージ及び好中球の培養物において細菌の成長は生じなかった（図示せず）。共にこれらのデータは、骨髄細胞におけるMRSAの細胞内貯蔵所が活性抗生物質治療の存在下でも感染の新しい部位への拡散を促進することができ、細胞内成長が定期的な抗生物質療法の条件下でも内皮及び上皮細胞において生じ得ることを支持する。

【0255】

実施例3 抗SDR及び他の抗体の生成

mAb rF1を生成するために、FACS Aria細胞選別機（BD, San Jose, CA）を使用して、CD19⁺CD3⁻CD27⁺IgD⁻IgA⁻メモリーB細胞をMRSA感染ドナーの末梢血から単離した。B細胞リンパ腫（Bcl）-xL及びBcl-6遺伝子によるウイルス形質導入前に、Kwakkenbos MJ, et al. (2010) Nat Med 16:123-128に前に記載されるように、インターロイキン21の存在下で、メモリー細胞をCD40L-発現マウスL線維芽細胞上で活性化した。形質導入したB細胞を同じ培養系中で維持した。ドナー血液の使用は、施設内審査委員会（institutional committee）により承認された。ELISAにより、モノクローナル抗体（mAb）rF1を、MSSA株Newmanの可溶化物との反応性により培養上清から選択し、陽性ウェルをサブクロニングし、ELISAにより2回再検査した。pCDNA3.1（Invitrogen）を使用して、ヒトIgG1カップ定常領域を有する重鎖及び軽鎖可変領域をクロニングすることにより、組換えrF1を生成し、293T細胞（ATCC）内に形質移入した。プロテインA結合SEPHAROSE（登録商標）（Invitrogen）を使用して、精製したIgGを培養上清から得た。mAb rF1及びその変異形の生成は、US8,617,556（Beaumont et al.）及びHazenbos et al. (2103) PLOS Pathogens 9(10):1-18（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0256】

抗体重鎖及び軽鎖の同族対合を保存するSymplex（商標）技術を用いて、ヒトIgG1 mAbs SD2、SD3、及びSD4（全てグリコシル化SDRタンパク質に対して）、ならびに4675（ヒトIgG1及び抗C1fA）を、S. aureus感染後患者からの末梢B細胞からクロニングした〔34〕。組換え完全長IgGレパートリーの遺伝源として、血漿及びメモリーB細胞の両方を使用した（投稿準備中）。個々の抗体クローンは哺乳類細胞の形質移入により発現された〔35〕。7日後に完全長IgG1抗体を含有する上清を採取し、ELISAによる抗原結合のスクリーニングに使用した。抗体4675、SD2、SD3、及びSD4は、USA300またはNewman S. aureus株からの細胞壁調製物への結合に陽性であった。その後、抗体を200-mlの一過性の形質移入物において産生し、さらなる試験のためにプロテインAクロマトグラフィー（MabSelect SuRe, GE Life Sciences, Piscataway, NJ）で精製した。これらの抗体の単離及び使用は倫理審査委員会（regional ethical review board）により承認された。rF

1 変異形を生成した。

【0257】

それぞれの組換えタンパク質でマウスを免疫化することにより、C l f A (9 E 1 0)、C l f B (1 0 D 2)、S d r D (1 7 H 4)、I s d A (2 D 3) 及び未修飾 S D R タンパク質 (9 G 4) に対するマウス m A b を生成し、これは、標準的なプロトコルを用いて大腸菌において発現した後に精製され、ハイブリドーマ上清はプロテイン A 親和性クロマトグラフィーにより精製された。ペプチドグリカン (P G N) 由来ペプチド C K K G G G - (L - A l a) - (D - ガンマ - G l u) - (L - L y s) - (D - A l a) - D - A l a) でウサギを免疫化することにより、ウサギ m A b 2 8 . 9 . 9 を生成し、続いて I g G をクローニングした。

10

【0258】

実施例 4 M R S A 感染ドナーから単離した非常にオプソニンのモノクローナル抗体 (r F 1) の特徴付け

上述のように、いくつかの S . a u r e u s 反応性モノクローナル抗体 (m A b) を M R S A 感染ドナーの末梢血からのメモリー B 細胞から単離した。これらの抗体を特徴付ける際、1 つの I g G 1 m A b (以後、r F 1 と称する) は、ヒト多形核白血球 (P M N) により強いオプソニン化死滅 (O P K) を誘発した S . a u r e u s 株のパネルに広く反応性であると特定された。

【0259】

m A b r F 1 の、臨床 M R S A 株 U S A 3 0 0 からの細菌に対する最大結合はアイソタイプ一致抗 C l f A m A b よりも約 1 0 倍高かった (図 5 A)。結合の増加と一致して、r F 1 によるオプソニン化により、P M N による U S A 3 0 0 の取り込み (図 5 B) 及び死滅 (図 5 C) が増加した。対照的に、ヒト抗 C l f A によるプレオプソニン化は、細菌の生存率に対して作用はなかった (図 5 C)。r F 1 抗体は、P M N の不在化で、U S A 3 0 0 の生存率に影響を及ぼさなかった。よって、r F 1 は、M R S A に結合する能力を有する m A b であり、P M N による M R S A の強力な死滅を誘発する。

20

【0260】

実施例 5 r F 1 の S t a p h y l o c o c c u s 株への結合

培養物または感染組織からの全細菌に対する r F 1 結合の F A C S 分析

全細菌を T S A プレートまたは T S B 培養物から採取し、0 . 1 % I g G 無 B S A (S i g m a) 及び 1 0 m M ヘセス (p H 7 . 4) (H B 緩衝剤) で補足されたフェノールレッドを含まない H B S S で洗浄した。細菌 (20×10^8 C F U / m L) を、H B 緩衝剤中の $300 \mu\text{g} / \text{mL}$ のウサギ I g G (S i g m a) と共に 1 時間室温 (R T) でインキュベートし、非特異的 I g G 結合を遮断した。細菌を、r F 1 またはアイソタイプ対照 I g G 1 m A b g D : 5 2 3 7 を含む $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ の一次抗体で染色し (N a k a m u r a G R, e t a l . (1993) J V i r o l 67:6179-6191)、次に、蛍光抗ヒト I g G 二次抗体で染色した (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h, W e s t G r o v e, P A)。細菌を洗浄し、F A C S C a l i b u r (登録商標) (B D) で分析した。

30

【0261】

感染マウス組織からの細菌の抗体染色に関して、6 ~ 8 週齢の雌の C 5 7 B 1 / 6 マウス (C h a r l e s R i v e r, W i l m i n g t o n, M A) に P B S 中 10^8 C F U の対数期成長 U S A 3 0 0 を静脈内注射した。マウスの臓器を感染 2 日後に採取した。ウサギ感染性心内膜炎 (I E) は、T a t t e v i n P, e t a l . (2010) A n t i m i c r o b i a l a g e n t s a n d c h e m o t h e r a p y 54:610-613 に記載されるように確立された。ウサギに 5×10^7 C F U の静止期成長 M R S A 株 C O L を静脈内注射し、心臓疣贅を 1 8 時間後に採取した。 $30 \text{mg} / \text{kg}$ のバンコマイシンでの治療は、 7×10^7 C F U の静止期 C O L で感染させた 1 8 時間後に b . i . d . で静脈内投与された。

40

【0262】

50

マウスまたはウサギの細胞を溶解するために、gentleMACS（登録商標）細胞分散装置（cell dissociator）（Miltenyi）を使用して、組織をMチューブ（Miltenyi, Auburn, CA）中で均質化し、続いて、0.1%トリトン-X100（Thermo）、10 μ g/mLのDNase I（Roche）、及びComplete Miniプロテアーゼインヒビターカクテル（Roche）を含有するPBS中で、室温で10分間インキュベートした。懸濁液を40ミクロンフィルタ（BD）に通し、上述のように細菌をmAbで染色した。20 μ g/mLのマウスmAb 702抗*S. aureus*ペプチドグリカン（abcam, Cambridge, MA）及び蛍光色素標識抗マウスIgG二次抗体（Jackson ImmunoResearch）で2重染色することにより、細菌をマウス臓器破片と区別した。フローサイトメトリー分析中に、2重蛍光プロットからのmAb 702を用いた陽性染色に対して細菌をゲーティングした。全ての動物実験は、Institutional Review Boards of Genentech及びUniversity of California, San Franciscoにより承認された。

【0263】

フローサイトメトリー（FCM）分析は、試験した15全ての*S. aureus*株に対するrF1の強い結合活性を示した（図7）。これらの株は*S. aureus*系統樹にわたって広く分布した〔8〕。細菌細胞表面抗原の発現レベルはインビトロとインビボ成長との間で異なる場合があるため、我々は、rF1が全身感染後の様々なマウス組織から単離したUSA300を認識する能力も試験した。rF1 mAbは、感染マウスの腎臓、肝臓、及び肺に由来するUSA300に強く結合した（図6）。マウスの腎臓からのUSA300に対するrF1の結合は、感染後少なくとも8日間持続し（図示せず）、感染中のrF1エピトープの強い長期発現を示唆する。加えて、rF1は、感染性心内膜炎のウサギモデルの心臓疣贅からのMRSA COL細菌に強く結合した。バンコマイシンでの治療は、rF1のMRSAとの反応性に影響を及ぼさなかった（図6）。よって、rF1により認識された抗原は、様々な株にわたって保存され、様々な成長及び感染条件において安定して発現された。

【0264】

全ての*S. aureus*株にわたるrF1反応性の遍在的性質を所与として、実験は、このような反応性が他のグラム陽性細菌に及ぶかを見るために行われた。とりわけ、rF1結合は、コアグラゼ陰性ヒト病原体の*S. epidermidis*に対してのみ検出可能であった（図7）。rF1 mAbは、*S. saprophyticus*、*S. lugdunensis*、*S. simulans*及び*S. carnosus*、または他のグラム陽性種、例えば、*Streptococcus pyogenes*、*Bacillus subtilis*、*Enterococcus faecalis*、及び*Listeria monocytogenes*を含む、試験した任意の他のStaphylococcal種に結合しなかった（図7）。よって、rF1は、ヒト適合Staphylococcal病原体上で安定して発現した表面抗原（複数可）に結合するヒト抗体であり、ヒトPMNによる細菌死滅を促進する。

【0265】

実施例6 rF1抗体のアミノ酸修飾

要約すると、rF1 Abの各々のVH領域が省かれ（cloned out）、ヒトH鎖ガンマ1定常領域に結合され、VLがカッパ定常領域に結合されて、IgG1としてAbを発現する。野生型配列はある特定の位置で変更され、以下に記載されるように抗原結合を維持しながら、抗体の安定性を改善する。次に、システイン改変Ab（ThioMab、THIOMAB（商標）とも称される）を生成した。

【0266】

i. 安定性変異形の生成

ある特定の特性を改善するためにrF1 Abを改変し（脱アミド化、アスパラギン酸異性化、酸化、またはN結合グリコシル化を回避するため）、アミノ酸置換後の抗原結合

10

20

30

40

50

ならびに化学安定性の維持に関して試験した。行われたアミノ酸改変はU S 8, 6 1 7, 5 5 6に記載される通りであった。

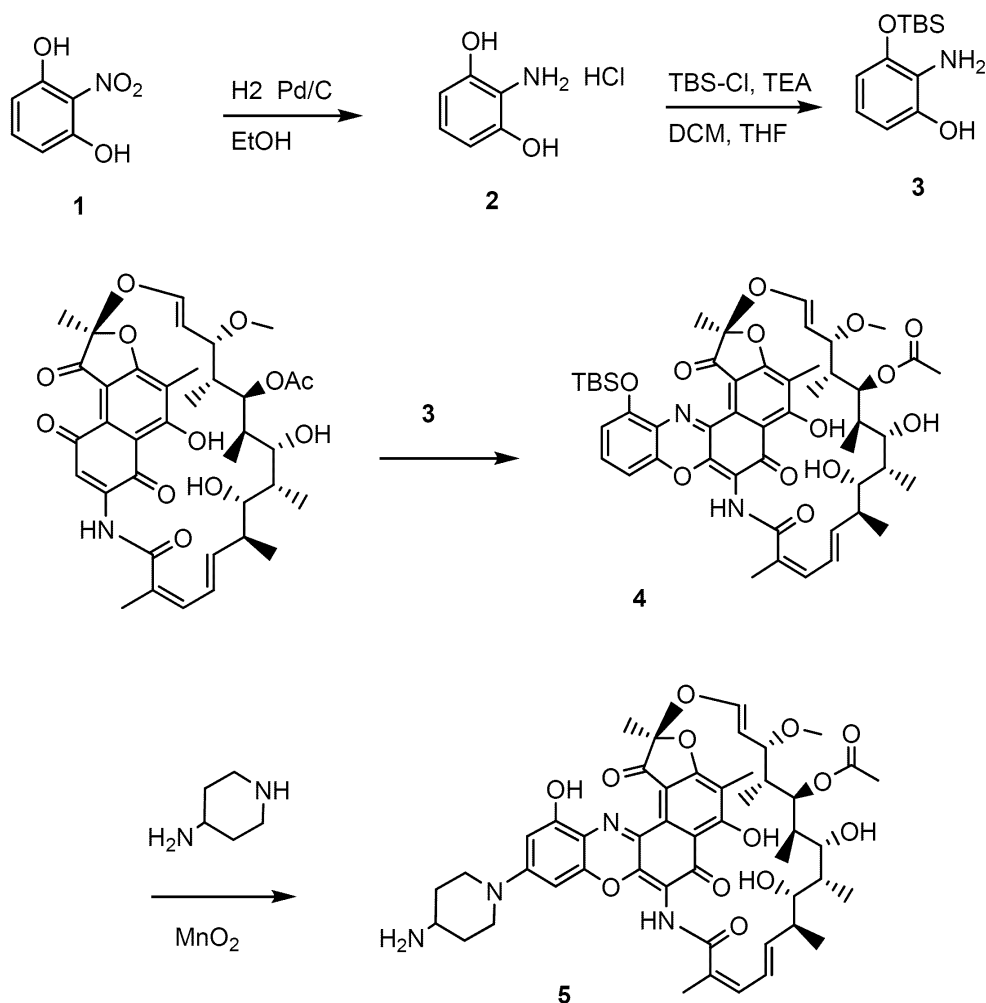
【0267】

i i i . C y s 改変変異体 (T h i o M a b) の生成

抗体をリンカー-抗生物質中間体に抱合させるために、前に教示されるように、既定の位置で、例えばL鎖のカッパ定常領域のV205で、及びヒトガンマ1H鎖のA118位で(Eu変換に従うアミノ酸位置番号)、システインをH鎖(CH1の)またはL鎖(Cκ)に導入することにより、完全長ThioMabを産生した。次に、H鎖及びL鎖を別個のプラスミドにクローニングし、H及びLコードプラスミドを293細胞内に同時導入し、そこで、それらが発現され、インタクトなAb内にアSEMBLされる。H鎖及びL鎖の両方とも同じ発現プラスミド内にクローニングされ得る。H鎖の各々に1つずつ、2つの改変Cys、またはL鎖の各々に1つずつ、2つの改変Cys、または抗体四量体当たり4つの改変CysをもたらすH鎖及びL鎖の各々における改変Cysの組み合わせ(HC-LC-Cys)を有するIgG1は、cys変異体鎖及び野生型鎖の所望の組み合わせを発現することにより生成された。

【0268】

実施例7 ピペリジルベンゾオキサジノリファマイシン(ピペBOR)5

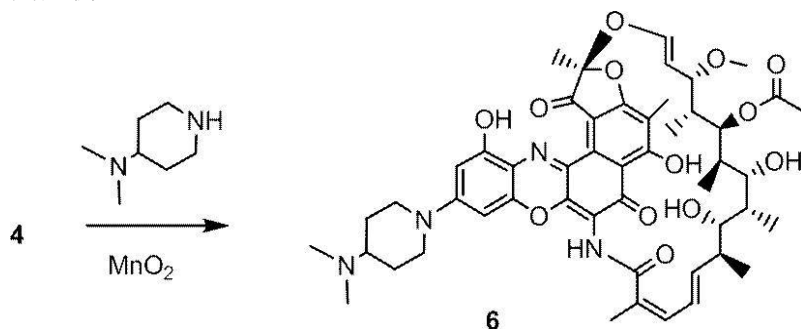


2-ニトロベンゼン-1, 3-ジオール1を、エタノール溶媒中のパラジウム/炭素触媒を含む水素ガス下で水素化し、塩酸塩として単離した2-アミノベンゼン-1, 3-ジオール2を得た。tert-ブチルジメチルシリルクロリド及びジクロロメタン/テトラヒドロフラン中のトリエチルアミンを用いた2の単一保護により、2-アミノ-3-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)フェノール3を得た。室温で、酸化マンガンまたはトルエン中の酸素ガスとの酸化縮合により、リファマイシンS (ChemShuttl

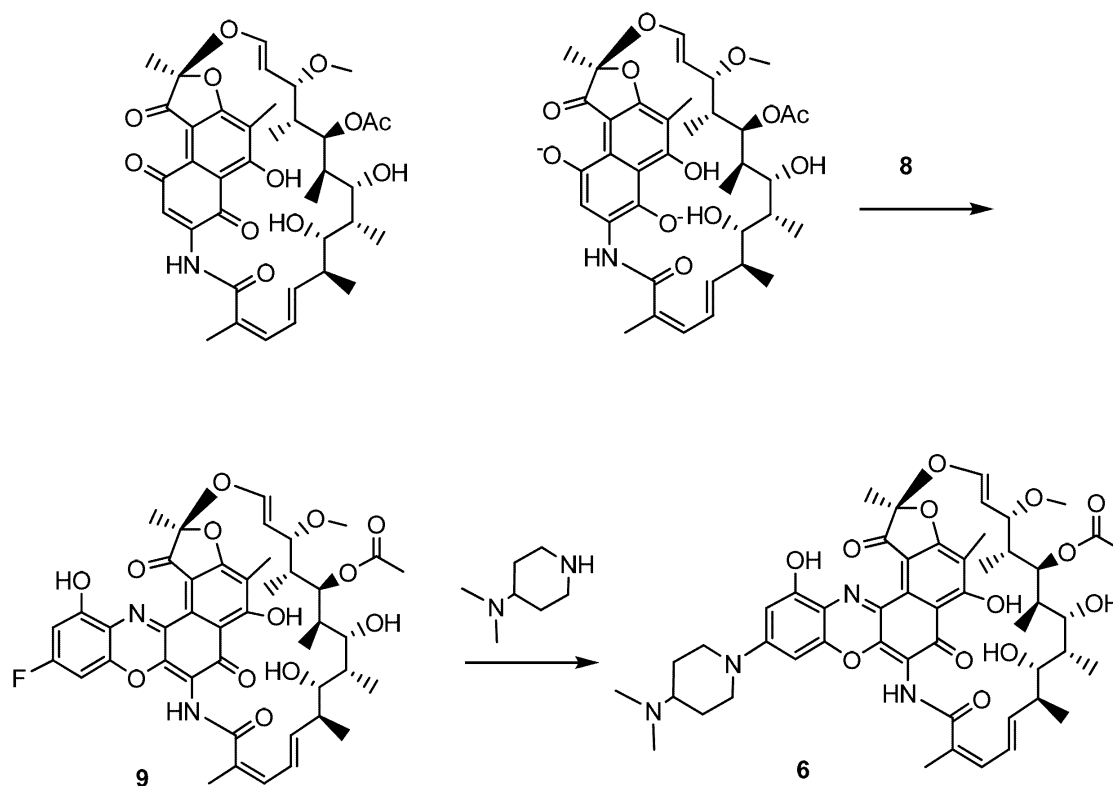
e Inc., Fremont, CA, US7342011、US7271165、US7547692)を3と反応させ、TBS保護されたベンゾオキサジノリファマイシン4を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 915.41$ 。4をピペリジン-4-アミン及び酸化マンガンと反応させて、ピペリジルベンゾオキサジノリファマイシン (ピペBOR) 5を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 899.40$

【0269】

実施例8 ジメチルピペBOR 6



N, N-ジメチルピペリジン-4-アミンをTBS保護されたベンゾオキサジノリファマイシン4と反応させて、ジメチルピペリジルベンゾオキサジノリファマイシン (ジメチルピペBOR) 6を得た。



【0270】

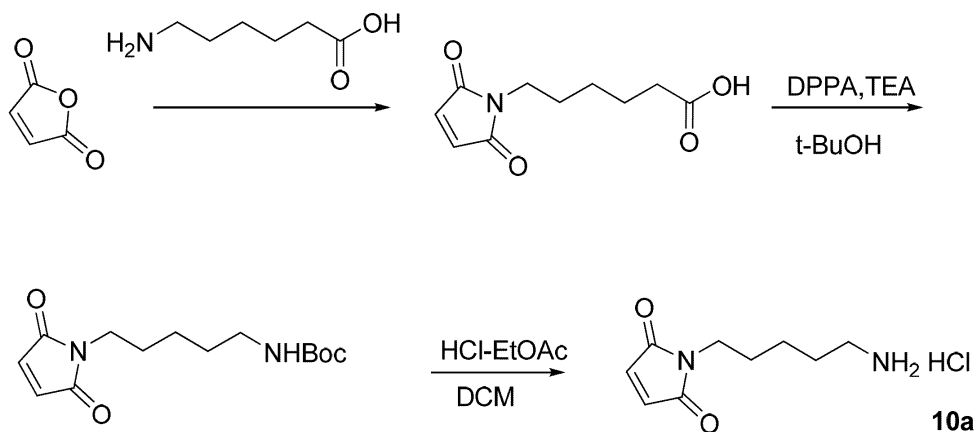
あるいは、(5-フルオロ-2-ニトロ-1,3-フェニレン)ビス(オキシ)ビス(メチレン)ジベンゼン7を、テトラヒドロフラン/メタノール溶媒中のパラジウム/炭素触媒を含む水素ガス下で水素化して、ベンジル基を除去し、2-アミノ-5-フルオロベンゼン-1,3-ジオール8を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 144.04$ 。60℃で、空气中または酢酸エチル中のフェリシアン化カリウム中での酸化縮合により、市販のリファマイシンSまたはリファマイシンSVナトリウム塩 (ChemShuttle Inc., Fremont, CA) を、2-アミノ-5-フルオロベンゼン-1,3-ジオール8と反応させて、フルオロベンゾオキサジノリファマイシン9を得た。フッ化物

をN, N-ジメチルピペリジン-4-アミンで置換することにより、ジメチルピペBOR 6を得た。LCMS (ESI) : $M+H^+ = 927.43$

【0271】

実施例9 (S)-N-(5-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1, 1-ジカルボキサミド 10

ステップ1: 1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン塩酸塩 10aの調製

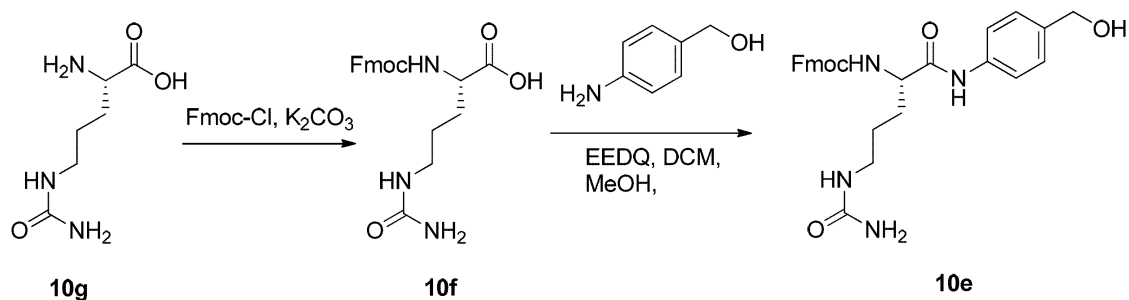


【0272】

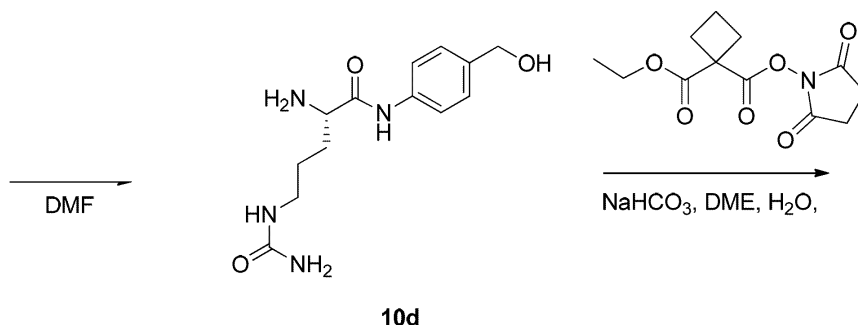
無水マレイン酸、フラン-2, 5-ジオン (150 g, 1.53 mol) を、HOAc (1000 mL) 中の6-アミノヘキサン酸 (201 g, 1.53 mol) の攪拌溶液に添加した。混合物を室温で2時間攪拌した後、還流で8時間加熱した。有機溶媒を減圧下で除去し、残渣をEtOAc (500 mL × 3) で抽出し、H₂Oで洗浄した。混合有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮して、粗産物を得た。これを石油エーテルで洗浄し、白色の固体として6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸を得た (250 g, 77.4%)。DPPA (130 g, 473 mmol) 及びTEA (47.9 g, 473 mmol) を、t-BuOH (200 mL) 中の6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサン酸 (100 g, 473 mmol) の溶液に添加した。混合物を、還流で8時間、N₂下で加熱した。混合物を濃縮し、残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (PE: EtOAc = 3:1) により精製し、tert-ブチル 5-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバメート (13 g, 10%) を得た。無水EtOAc (30 mL) 中のtert-ブチル 5-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバメート (28 g, 99.2 mmol) の溶液に、HCl/EtOAc (50 mL) を液滴添加した。混合物を室温で5時間攪拌した後、濾過し、固体を乾燥させて、1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン塩酸塩 10a (16 g, 73.7%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 8.02 (s, 2H), 6.99 (s, 2H), 3.37-3.34 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 2H), 1.56-1.43 (m, 4H), 1.23-1.20 (m, 2H)。

【0273】

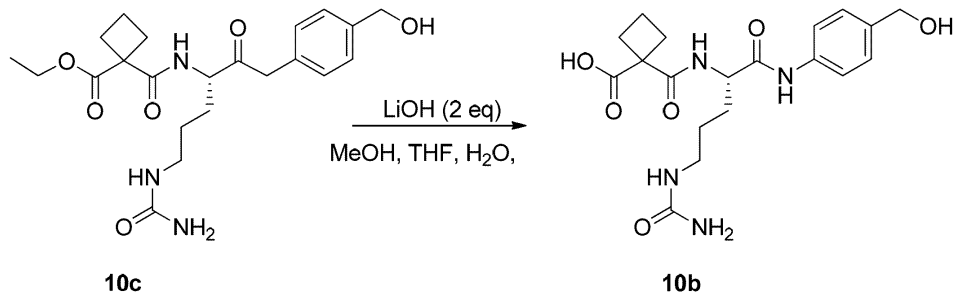
ステップ2: (S)-1-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバモイル)シクロブタンカルボン酸 10bの調製



10



20



【0274】

ジオキサン及び H_2O (50 mL / 75 mL) の混合物中の (S)-2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸 10g (17.50 g, 0.10 mol) の混合物に、 K_2CO_3 (34.55 g, 0.25 mol) を添加した。Fmoc-Cl (30.96 g, 0.12 mol) を 0℃ でゆっくり添加した。反応混合物を 2 時間にわたって室温に温めた。有機溶媒を減圧下で除去し、水スラリーを 6M HCl 溶液で pH=3 に調節し、EtOAc (100 mL × 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、(S)-2-((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-ウレイドペンタン酸 10f (38.0 g, 95.6%) を得た。10f は市販されている。

30

【0275】

DCM 及び MeOH (100 mL / 50 mL) の混合物中の 10f (4 g, 10 mmol) の溶液に、(4-アミノフェニル)メタノール (1.6 g, 13 mmol, 1.3 eq) 及び 2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン, EEDQ, Sigma-Aldrich CAS Reg. No. 16357-59-8 (3.2 g, 13 mmol, 1.3 eq) を添加した。混合物を室温で 16 時間、 N_2 下で攪拌した後、これを濃縮して、褐色の固体を得た。MTBE (200 mL) を添加し、15℃ で 2 時間攪拌した。濾過により固体を回収し、MTBE (50 mL × 2) で洗浄して、橙色の固体として (S)-(9H-フルオレン-9-イル)メチル(1-((4-(ヒドロキシメチル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)カルバメート 10e (4.2 g, 84%) を得た。LCMS (ESI): m/z 503.0 [M+1]。

40

50

【0276】

乾燥DMF (20 mL) 中の10e (4.2 g, 8.3 mmol) の攪拌溶液に、ピペリジン (1.65 mL, 17 mmol, 2 eq) を室温で液滴添加した。混合物を室温で30分間攪拌し、固体の沈殿物が形成された。乾燥DCM (50 mL) を添加し、混合物は直ぐに透明になった。混合物を室温でさらに30分間攪拌し、LCMSは10eが消費されたことを示した。これを、減圧下で乾燥状態まで濃縮し (ピペリジンが残っていないことを確実にする)、残渣をEtOAcとH₂O (50 mL / 20 mL) との間に分配した。水相をEtOAc (50 mL × 2) で洗浄し、濃縮して、油状の残留物として (S) -2-アミノ-N- (4- (ヒドロキシメチル) フェニル) -5-ウレイドペンタンアミド10d (2.2 g, 94%) (少量のDMFを含有した) を得た。

10

【0277】

市販の1, 1-シクロブタンジカルボン酸, 1, 1-ジエチル エステル (CAS Reg. No. 3779-29-1) を、水性塩基で半酸/エステル 1, 1-シクロブタンジカルボン酸, 1-エチルエステル (CAS Reg. No. 54450-84-9) にけん化を制限し、TBTU (O- (ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート、これはN, N, N', N'-テトラメチル-O- (ベンゾトリアゾール-1-イル) ウロニウムテトラフルオロボレート、CAS No. 125700-67-6, Sigma-Aldrich B-2903とも呼ばれる) などのカップリング試薬、及びN-ヒドロキシコハク酸イミドで活性化することにより、NHSエステル, 1- (2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) 1-エチル シクロブタン-1, 1-ジカルボキシレートに変換した。

20

【0278】

DME (50 mL) 中の1- (2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) 1-エチルシクロブタン-1, 1-ジカルボキシレート (8 g, 29.7 mmol) の溶液に、10d (6.0 g, 21.4 mmol) の溶液及び水 (30 mL) 中のNaHCO₃ (7.48 g, 89.0 mmol) を添加した。混合物を室温で16時間攪拌した後、減圧下で乾燥状態に濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (DCM: MeOH = 10:1) により精製して、白色の固体として (S) -エチル 1- ((1- (4- (ヒドロキシメチル) フェニル) -2-オキソ-6-ウレイドヘキサ-3-イル) カルバモイル) シクロブタンカルボキシレート10c (6.4 g, 68.7%) を得た。LCMS (ESI): m/z 435.0 [M+1]

30

【0279】

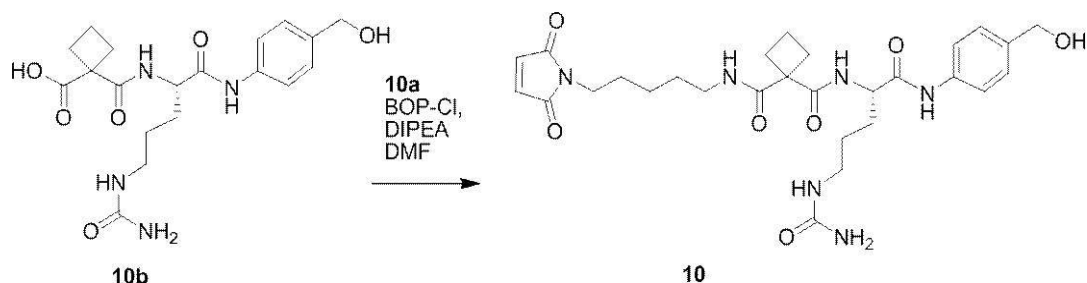
THF及びMeOH (20 mL / 10 mL) の混合物中の10c (6.4 g, 14.7 mmol) の攪拌溶液に、室温のH₂O (20 mL) 中のLiOH・H₂O (1.2 g, 28.6 mmol) の溶液を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した後、溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣をprep-HPLCで精製して、(S) -1- (1- (4- (ヒドロキシメチル) フェニルアミノ) -1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバモイル) シクロブタンカルボン酸10b (3.5 g、収率58.5%) を得た。LCMS (ESI): m/z 406.9 [M+1]。¹H NMR (400 MHz, メタノール-d₄) δ 8.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.88-5.85 (m, 1H), 5.78 (s, 2H), 4.54-4.49 (m, 3H), 4.38-4.32 (m, 1H), 3.86-3.75 (m, 1H), 3.84-3.80 (m, 2H), 3.28-3.21 (m, 1H), 3.30-3.24 (m, 1H), 3.00-2.80 (m, 1H), 2.37-2.28 (m, 2H)。

40

【0280】

ステップ3: (S) -N- (5- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ペンチル) -N- (1- (4- (ヒドロキシメチル) フェニルアミノ) -1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル) シクロブタン-1, 1-ジカルボキサミド10の調製

50

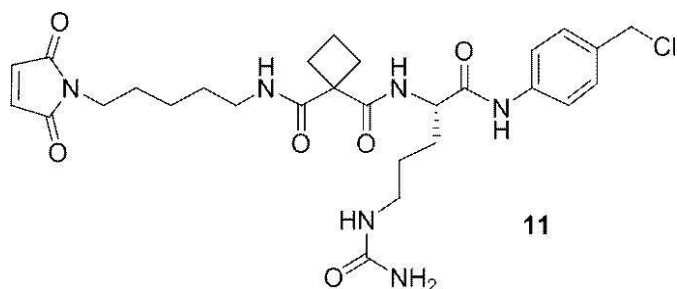


【0281】

ジイソプロピルエチルアミン、DIPEA (1.59 g, 12.3 mmol)、及びビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド、BOP-Cl (CAS Reg. No. 68641-49-6, Sigma-Aldrich, 692 mg, 2.71 mmol) を、0℃のDMF (10 mL) 中の(S)-1-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバモイル)シクロブタンカルボン酸10b (1 g, 2.46 mmol) の溶液、続いて1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン塩酸塩10a (592 mg, 2.71 mmol) に添加した。混合物を0℃で0.5時間攪拌した。反応混合物をクエン酸溶液(10 mL)でクエンチし、DCM/MeOH (10:1)で抽出した。有機層を乾燥させ、濃縮し、残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(DCM:MeOH = 10:1)により精製して、S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド10 (1.0 g, 71%)を得、これはMC-CBDK-cit-PAB-OHとも称される。LCMS (ESI): M+H⁺ = 571.28。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.00 (s, 1H), 7.82-7.77 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.96 (s, 2H), 5.95 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.08 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.40-4.35 (m, 3H), 4.09 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 3.01 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 3.05-2.72 (m, 4H), 2.68-2.58 (m, 3H), 2.40-2.36 (m, 4H), 1.72-1.70 (m, 3H), 1.44-1.42 (m, 1H), 1.40-1.23 (m, 6H), 1.21-1.16 (m, 4H)。

【0282】

実施例10 (S)-N-(1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド11

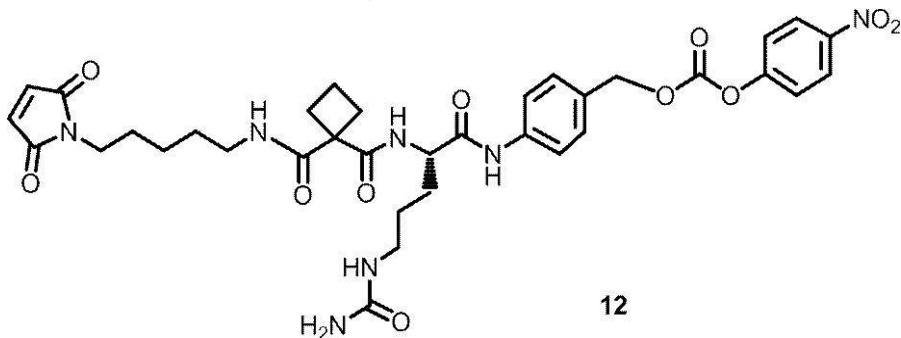


N,N-ジメチルホルムアミド中の(S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド10 (2.0 g, 3.5 mmol)、DMFまたはN-メチルピロリドン、NMP (50 mL) の溶液を、0℃で、滴下して少しずつ塩化チオニル、S

OC1₂ (1.25 g, 10.5 mmol) で処理した。反応物は黄色のままであった。反応物を >90% 変換を示す LC/MS により監視した。反応混合物を 20℃ で 30 分間または数時間攪拌した後、水 (50 mL) で希釈し、EtOAc (50 mL × 3) で抽出した。有機相を乾燥させ、濃縮し、フラッシュカラム (DCM:MeOH=20:1) により精製して、灰色の固体として 11 を形成し、これは MC-CBDK-cit-PAB-C1 と称される。LCMS: (5-95, AB, 1.5 min), 0.696 min, m/z = 589.0 [M+1]⁺。

【0283】

実施例 11 (S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル 4-ニトロフェニル カーボネート 12

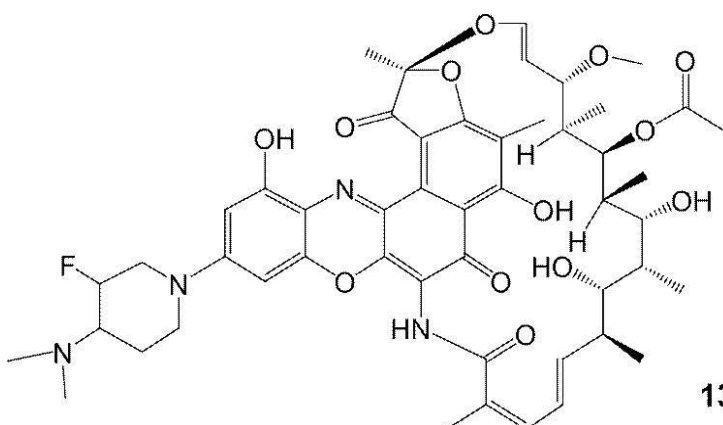


12

無水 DMF 中の (S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド 10 の溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、続いて PNP カーボネート (ビス(4-ニトロフェニル)カーボネート) を添加した。反応溶液を室温 (r.t.) で 4 時間攪拌し、混合物を prep-HPLC により精製して、12 を得た。LCMS (ESI): M+H⁺ = 736.29。

【0284】

実施例 12 MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチル,フルオロピペBOR)-PLA-1 の調製



13

PLA-2 の手順後、(S)-N-(1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド 11 及び フッ化リファマイシン誘導体のジメチルフルオロピペBOR 13 (LCMS (ESI): M+H⁺ = 945.43) を反応させて、MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチル,フルオロピペBOR)-PLA-1 を形成した (表 2)。LCMS (ESI): M+H⁺ = 1499.7

【0285】

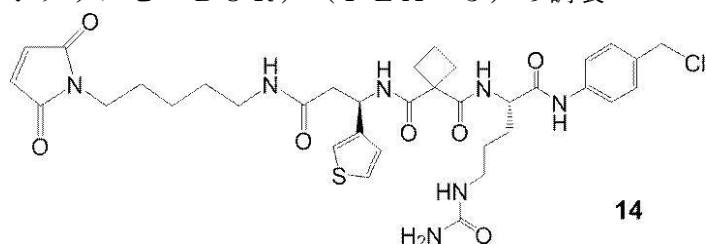
実施例 13 MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)-PLA-

2の調製

DMF中の(S)-N-(1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド11(0.035mmol)を0℃に冷却し、ジメチルピペBOR6(10mg, 0.011mmol)を添加した。混合物をさらに0.5mLのDMFで希釈した。空气中で30分間攪拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA, 10μL, 0.05mmol)を添加し、反応物を空气中で一晩攪拌した。LC/MSにより、50%の所望の産物が認められた。反応の進行が停止したと思われるまで、反応物を空气中でさらに6時間攪拌しながら、追加の0.2eq N,N-ジイソプロピルエチルアミン塩基を添加した。反応混合物をDMFで希釈し、HPLC(・H₂O中20~60%ACN/HCOOH)で精製して、MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)-PLA-2を得た(表2)。LCMS(ESI):M+H⁺=1481.8、収率31%。

【0286】

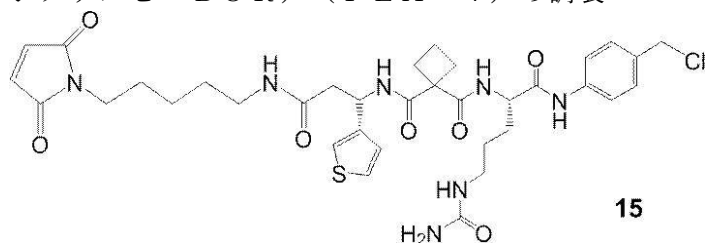
実施例14 MC-(R)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)(PLA-3)の調製



PLA-2の手順後、(N-(S)-1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(R)-3-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルアミノ)-3-オキソ-1-(チオフエン-3-イル)プロピル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド14(LCMS(ESI):M+H⁺=742.3)及びジメチルピペBOR6を反応させて、MC-(R)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)(PLA-3、表2)を得た。LCMS(ESI):M+H⁺=1633.9

【0287】

実施例15 MC-(S)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)(PLA-4)の調製



PLA-2の手順後、(N-(R)-1-(4-(クロロメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)-N-(R)-3-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルアミノ)-3-オキソ-1-(チオフエン-3-イル)プロピル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド15(LCMS(ESI):M+H⁺=742.3)及びジメチルピペBOR6を反応させて、MC-(R)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR)(PLA-4、表2)を得た。LCMS(ESI):M+H⁺=1633.9

【0288】

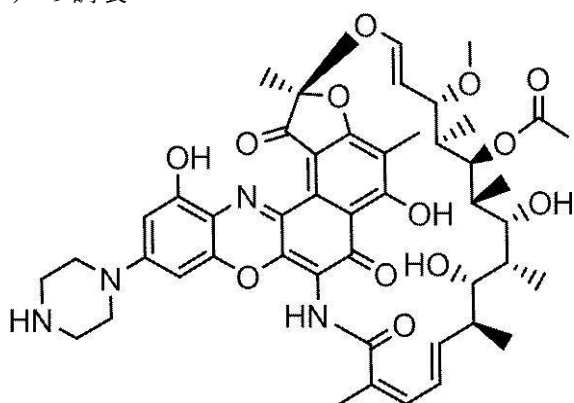
実施例 16 MC-(CBDK-cit)-PABC-(ピペBOR)(PLA-5)の調製

ピペリジルベンゾオキサジノリファマイシン(ピペBOR) 5 (15 mg, 0.0167 mmol)、そして次に(S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル 4-ニトロフェニル カーボネート 12 (12 mg, 0.0167 mmol)をバイアルに量り入れた。ジメチルホルムアミド(DMF) (0.3 mL)、続いてジイソプロピルエチルアミン(DIEA) (0.006 mL, 0.0334 mmol)を添加し、反応物を室温で2時間攪拌した。HPLC (30~70% MeCN/水+1%ギ酸)により、反応溶液を直接精製して、MC-(CBDK-cit)-PABC-(ピペBOR)(PLA-5、表2)を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 1496.5$

10

【0289】

実施例 17 MC-(CBDK-cit)-PABC-(ピペラジBTR)(PLA-6)の調製



16

20

PLA-5の手順後、ピペリジンリファマイシン誘導体、ピペラジBOR 16 (LCMS (ESI): $M+H^+ = 885.4$)、及び(S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル 4-ニトロフェニル カーボネート 12を反応させて、MC-(CBDK-cit)-PABC-(ピペラジBTR)(PLA-6、表2)を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 1482.5$

30

【0290】

実施例 18 rF1抗体-抗生物質抱合体の調製

表3の抗体-抗生物質抱合体(AAC)は、rF1抗体をPMLリンカー-抗生物質中間体(表2のものを含む)に抱合することにより調製された。抱合前に、WO2004/010957(その教示はこの目的のため参照により組み込まれる)に記載される方法論に従う標準的な方法を用いて、rF1抗体をTCEPで部分的に還元した。例えば、Dorronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784及びUS2005/0238649 A1に記載される方法論に従う標準的な方法を用いて、部分的に還元した抗体をリンカー-抗生物質中間体に抱合した。簡潔に、部分的に還元した抗体をリンカー-抗生物質中間体と組み合わせて、リンカー-抗生物質中間体を抗体の還元システイン残基に抱合させた。抱合反応をクエンチし、AACを精製した。各AACの抗生物質負荷(抗体当たりの抗生物質部分の平均数)が決定され、単一のシステイン変異部位で改変されたrF1抗体に関して約1~約2であった。

40

【0291】

抱合のためのThioMabの還元/酸化: CHO細胞において発現された完全長のシステイン改変モノクローナル抗体(ThioMabs-Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932、Dor

50

nan et al (2009) Blood 114 (13) : 2721-2729、US 7521541、US 7723485、WO 2009/052249、Shen et al (2012) Nature Biotech., 30 (2) : 184-191、Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332 : 41-52) を、37℃で3時間、または室温で一晩、約20~40倍過剰のTCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩または2mM EDTAを含む50mMトリス (pH 7.5) 中のDTT (ジチオスレイトール) で還元した (Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273 : 73-80、Soltec Ventures, Beverly, MA)。還元されたThioMabを希釈して、10mM酢酸ナトリウム (pH 5) でHiTrap Sカラムに充填し、0.3M塩化ナトリウムを含有するPBSで溶出した。あるいは、1/20の容積の10%酢酸を添加することにより、抗体を酸性化し、10mMスクシネート (pH 5) で希釈し、カラム上に充填し、次いで10カラム容積のスクシネート緩衝剤で洗浄した。カラムを50mMトリス (pH 7.5)、2mM EDTAで溶出した。

10

【0292】

溶出した還元ThioMabを15倍モル過剰のDHAA (デヒドロアスコルビン酸) または200nM水性硫酸銅 (CuSO₄) で処理した。鎖間ジスルフィド結合の酸化は、約3時間以上で完了した。周囲空気による酸化もまた有効である。再酸化された抗体を20mMコハク酸ナトリウム (pH 5)、150mM NaCl、2mM EDTAに透析し、-20℃で凍結保管した。

20

【0293】

リンカー-抗生物質中間体を用いたThioMabの抱合：反応混合物のLC-MS分析により決定される、反応が完了するまで (16~24時間)、脱遮断され、再酸化されたチオ-抗体 (ThioMab) を、50mMトリス (pH 8) 中6~8倍モル過剰の表2のリンカー-抗生物質中間体 (20mMの濃度のDMSOストックから) と反応させた。

【0294】

次に、20mMのコハク酸ナトリウム (pH 5) で希釈した後、粗抗体-抗生物質抱合体 (AAC) をカチオン交換カラムに適用した。このカラムを少なくとも10カラム容積の20mMコハク酸ナトリウム (pH 5) で洗浄し、抗体をPBSで溶出した。ゲル濾過カラムを使用して、240mMスクロースと共にAACを20mM His/アセテート (pH 5) に製剤化した。タンパク質濃度を決定するためにUV分光測定、凝集分析のために分析SEC (サイズ排除クロマトグラフィー)、ならびにリジンCエンドペプチダーゼを用いた処理前及び処理後のLC-MSにより、AACを特徴付けした。

30

【0295】

Shodex KW802.5カラムを使用して、0.75ml/分の流速で、0.25mM塩化カリウムを含む0.2Mリン酸カリウム (pH 6.2) 及び15% IPAにおいて、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。AACの凝集状態は、280nmでの溶出されたピーク面積吸光度の積分により決定された。

【0296】

Agilent QTOF 6520 ESI機器を使用してLC-MS分析を行った。例として、この化学を使用して生成されたAACを、37℃で30分間、トリス (pH 7.5) 中1:500w/wエンドプロテアーゼLysC (Promega) で処理した。得られた切断断片を、80℃に加熱した1000A、8um PLRP-Sカラム上に充填し、30%B~40%Bの勾配で5分で溶出した。移動相A: 0.05% TFAを含むH₂O。固定相B: 0.04% TFAを含むアセトニトリル。流速: 0.5ml/分。タンパク質の溶出は、エレクトロスプレーイオン化及びMS分析の前に、280nmでのUV吸光度検出により監視された。未抱合Fc断面、残留未抱合Fab、及び抗生物質-Fabのクロマトグラフ分解能が通常達成される。得られたm/zスペクトルは、抗体断片の質量を計算するために、Mass Hunter (商標) ソフトウェア (Agile

40

50

nt Technologies) を使用して解析 (deconvoluted) された。

【0297】

改変Cys205を含有する配列番号9のrF1L鎖及び配列番号10を含むrF1H鎖を使用して、AAC103 (AAR=1.9) チオ-rF1-HC-121C, LC-V205C-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR) を作製した。改変Cys205を含有する先行の配列番号9のrF1L鎖、及び改変Cys114 (114 Kabat 番付は118 Eu 番付及び121連番と同じである) を含有する配列番号12を含むrF1H鎖を使用して、AAC102 (AAR=3.9) チオ-rF1-HC-121C, LC-V205C-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR) を作製した。Cys改変L鎖及び/またはH鎖は、表2に示されるように、PMLリンカー及びリファマイシン型抗生物質に抱合された。

10

【0298】

実施例19 rF1-AACのインビトロでの有効性

様々な用量 (100 µg/mL、10 µg/mL、1 µg/mL、または0.1 µg/mL) の抗S. aureus 未抱合抗体である、抗体当たり平均1.9の抗生物質分子 (AAR2) を負荷した103 AAC、または抗体当たり平均3.9の抗生物質分子 (AAR4) を負荷した102 AACと共に、S. aureus (USA300 NRS384 株) を1時間インキュベートし、抗体を細菌に結合させた。得られたオプソニン化細菌をマウスマクロファージに与え、37°Cでインキュベートし、貪食作用を可能にした (インビトロマクロファージアッセイ)。2時間後、感染ミックスを除去し、任意の残留細胞外細菌を死滅させるために50 µg/mLのゲンタマイシンで補足された通常の成長培地と交換した。生存細胞内細菌の総数は、トリプシンダイズ寒天プレート上でマクロファージ可溶化液の段階希釈を平板培養することにより、2日後に決定された。

20

【0299】

結果は図10に示される。試験した両方のAAC (AAR2 vs. AAR4) は類似する用量応答を示し、10 µg/mL以上の用量で最大死滅をもたらし、1 µg/mL以下では一部の死滅から死滅がなく、AACの用量応答は細菌上の抗体結合部位の数により制限されることを示唆する。抗体当たり4つの抗生物質分子を負荷することにより、AACによる細菌死滅及び全体的な細菌の死滅は、試験した全用量でAAR4 AACで優れていた。試験した最高用量で、2 DAR AACは、細菌負荷を350倍減少させた一方で、4 AAR AACは、細菌負荷を4,000倍超減少させた (破線は示されるアッセイの検出限界を示す)。

30

【0300】

この例は、表3のrF1-AAC102 (AAR=3.9) 及び103 (AAR=1.9) チオ-rF1-HC-121C, LC-V205C-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルピペBOR) がインビトロマクロファージアッセイにおいて細胞内MRSAを死滅させたことを示す。結果は図10に示される。

【0301】

実施例20 rF1-AACのインビボでの有効性

40

この例は、rF1-AACがマウス静脈内感染モデルにおいて細胞内S. aureus 感染の大幅な減少または根絶に有効であったことを示す。

【0302】

腹膜炎モデル。7週齢の雌のA/Jマウス (Jackson Laboratories) を腹膜注射により 5×10^7 CFUのUSA300で感染させた。感染2日後にマウスを屠殺し、腹膜を5 mLの冷リン酸緩衝生理食塩溶液 (PBS) で洗い流した。静脈内感染モデル用に、以下に記載されるように、5 mLのPBS中で腎臓を均質化した。卓上遠心機で、4°Cで、1,000 rpmで5分間、腹膜洗浄物を遠心分離した。細胞外細菌として上清を回収し、細胞内分画として腹膜細胞を含有する細胞ペレットを回収した。37°Cで20分間、細胞を50 µg/mLのリゾスタフィンで処理して、混入細胞外細菌を

50

死滅させた。腹膜細胞を氷冷PBSで3×洗浄して、分析前にリゾスタフィンを除去した。細胞内CFUの数を計測するために、腹膜細胞を、0.1%トリトン-Xを含むHB(10mM HEPES及び0.1%ウシ血清アルブミンで補足されたハンクス平衡塩溶液)中に溶解し、0.05% tween-20を含むPBS中で可溶化液の段階希釈物を作製した。

【0303】

マウス静脈内感染モデル。競合ヒトIgG(SCID-IVIGモデル)に関する研究に関して、血清中少なくとも10mg/mLのヒトIgGの一定の血清レベルを達成するように最適化された投薬レジメンを使用して、CB17-SCIDマウス(Charles River Laboratories, Hollister, CA)をGamma Gard S/D IGIV Immune Globulin(ASD Health care, Brooks KY)で再調整した。マウス当たり30mgの初期静脈内投与量、続いて6時間後に腹腔内注射により15mg/マウスの第2投薬量、その後3日間連続して、腹腔内注射によりマウス当たり15mgの日用量で、IGIVを投与した。

10

【0304】

最初のIGIV投薬4時間後に、マウス(各抗体またはAACにn=8)を、静脈内注射によりリン酸緩衝生理食塩水で希釈した 1×10^7 CFUのMRSA(USA300 NRS384株)で感染させた。感染マウスを50mg/kgのrF1裸抗体103 AAC DAR2または102 AAC DAR4で処置した。静脈内注射により、感染26時間後に単回量のAACをマウスに与え、感染4日後に屠殺し、腎臓及び心臓を5mLのリン酸緩衝生理食塩水中に採取した。GentleMACS Dissociator(商標)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を使用して、組織試料を均質化した。臓器当たり回収された細菌の総数は、PBS 0.05% Tween中の組織破砕物の段階希釈物を、5%脱線維素ヒツジ血液を含むトリプシンダイズ寒天上で平板培養することにより決定された。

20

【0305】

図11Aは、感染マウスの腎臓における細菌負荷に対するAACでのインビボ処置の結果を示す。抗体当たり2つの抗生物質分子(DAR2)を含有するAACで処置することにより、細菌負荷が約30倍減少し、抗体当たり4つの抗生物質分子(AAR4)を含有するAACで処置することにより、細胞負荷が30,000倍超減少したことを示す。

30

【0306】

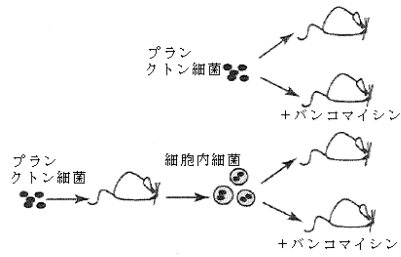
図11Bは、心臓における細菌数に対するAACでのインビボ処置の結果を示す。AAC AAR2で処置することにより、細菌負荷が約70倍減少し、8匹のマウス中6匹が心臓において検出不可能な細菌レベルを有し、AAC DAR4で処置することにより、心臓における感染を完全に根絶し、結果として8匹のマウス中8匹が検出不可能な細菌レベルを有した。

【0307】

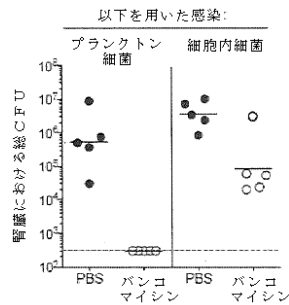
上述の発明は、明確な理解の目的のために図示説明及び例としてある程度詳細に記載されてきたが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書全体通して引用されている全ての特許、特許出願、及び参考文献は、参照により明示的に組み込まれる。

40

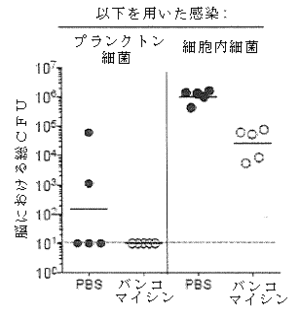
【図 1 A】



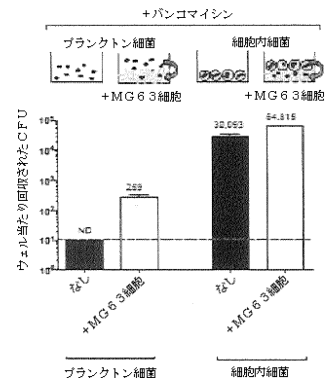
【図 1 B】



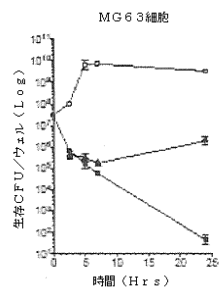
【図 1 C】



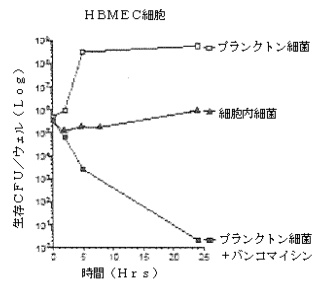
【図 1 D】



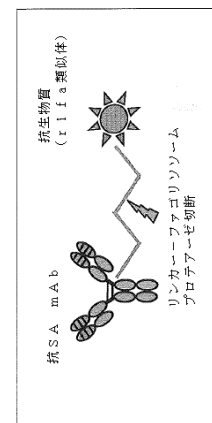
【図 1 E】



【図 1 F】

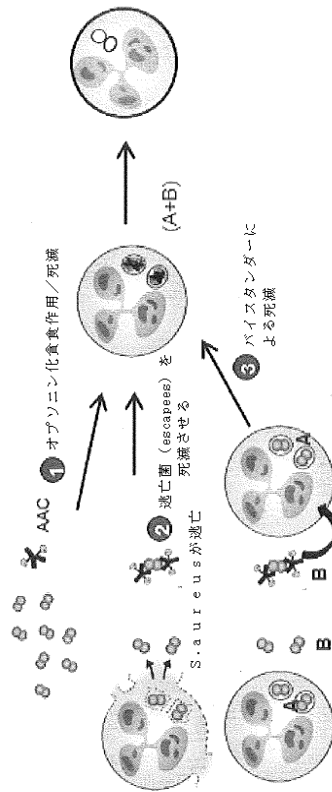


【図 2】

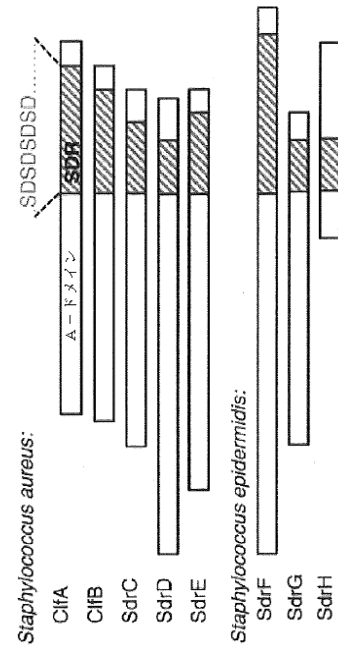


● TAC の概念:
抗生物質はファゴリソームプロテアーゼにより
TAC から放出される

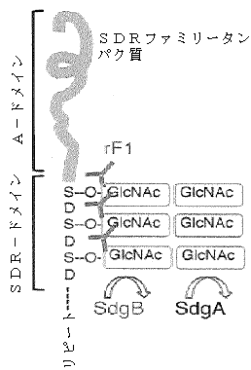
【図 3】



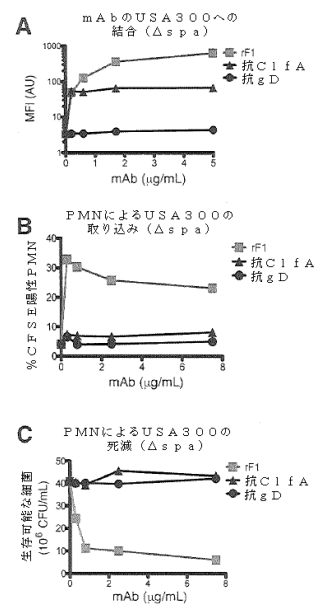
【図 4 A】



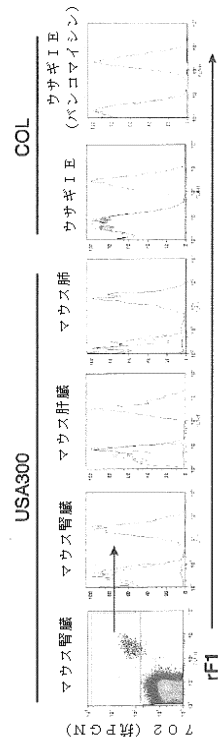
【図 4 B】



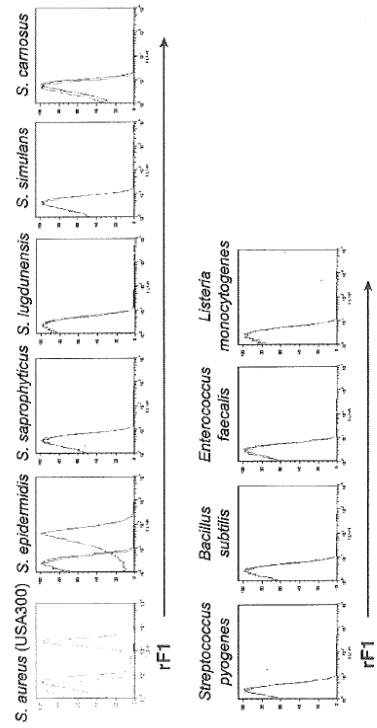
【図 5】



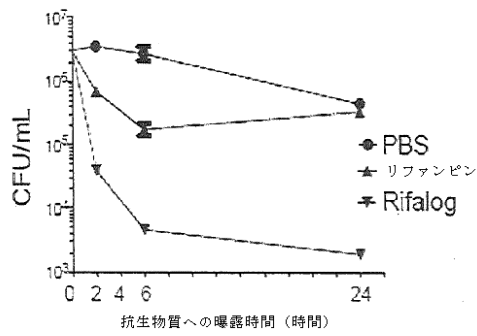
【図 6】



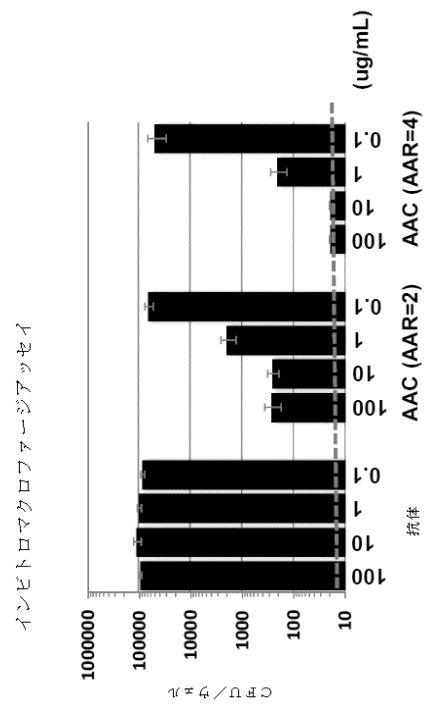
【図 7】



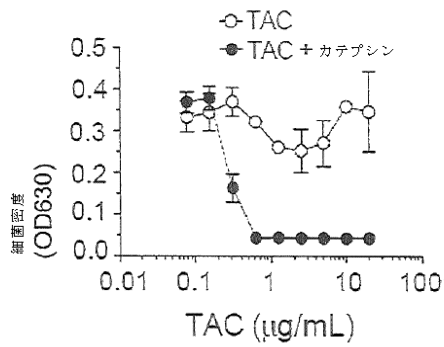
【図 8】



【図 10】

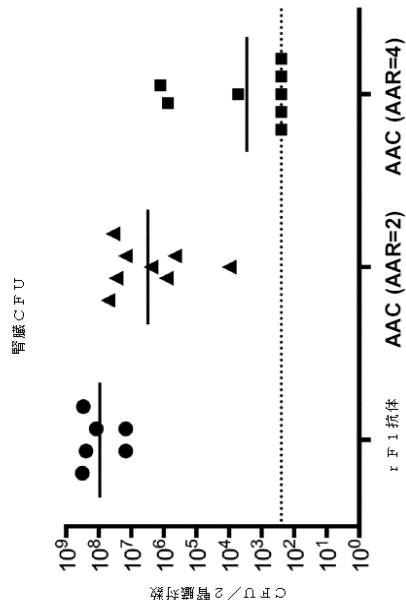


【図 9】

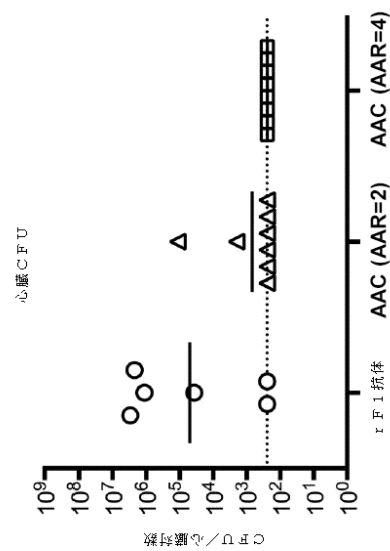


A

【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



【配列表】

[0006751393000001.app](#)

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 31/5386 (2006.01) A 6 1 K 47/56
A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 31/5386
- (72)発明者 ハゼンボス, ウーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ホツツェル, イシドロ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 カジハラ, キンバリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 レハール, ソフィー エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94037, モンタラ, アーヴィング ストリート 94
5
- (72)発明者 マリアザサン, サンジーヴ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ピロー, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 スターバン, レアンナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ヴァーマ, ヴィシャル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ウェイ, ビンチン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 シャ, ユイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 シュイ, ミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 長谷川 強

- (56)参考文献 国際公開第2011/008092 (WO, A1)
特表2003-503015 (JP, A)
特表2012-511559 (JP, A)
特表2005-510534 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/12
A61K 31/496
A61K 31/5386
A61K 39/395
A61K 47/56
A61K 47/68
A61P 31/04
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
WPIDS/WPIX (STN)
UniProt/GeneSeq