

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6742314号
(P6742314)

(45) 発行日 令和2年8月19日(2020.8.19)

(24) 登録日 令和2年7月30日(2020.7.30)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/12 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 31/395 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)

C O 7 K 16/12 Z N A
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 R
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 31/395

請求項の数 35 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-528894 (P2017-528894)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月2日(2015.12.2)
 (65) 公表番号 特表2018-503603 (P2018-503603A)
 (43) 公表日 平成30年2月8日(2018.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/063510
 (87) 国際公開番号 W02016/090038
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)
 審査請求日 平成30年12月3日(2018.12.3)
 (31) 優先権主張番号 62/087,184
 (32) 優先日 平成26年12月3日(2014.12.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 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
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ブラウン, エリック
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, 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
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗黄色ブドウ球菌抗体リファマイシン複合体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式、

A b - (P M L - a b x)_p、を有し、

式中、

A b が、抗壁テイコ酸 (W T A) 抗体であり、

P M L が、以下の式、

- S t r - P M - Y -

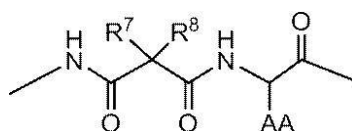
を有する、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカーであって、

式中、S t r がストレッチャー単位であり、P M がペプチドミメティック単位であり、
 Y がスパーサー単位であり、

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 が、式、

を有し、式中、R⁷ 及び R⁸ が合わせて、C₃ - C₇ シクロアルキル環を形成し、A A が、H、- C H₃、- C H₂ (C₆ H₅)、- C H₂ C H₂ C H₂ C H₂ N H₂、

20

- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、- $\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 、及び - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ から選択されるアミノ酸側鎖である

抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 2】

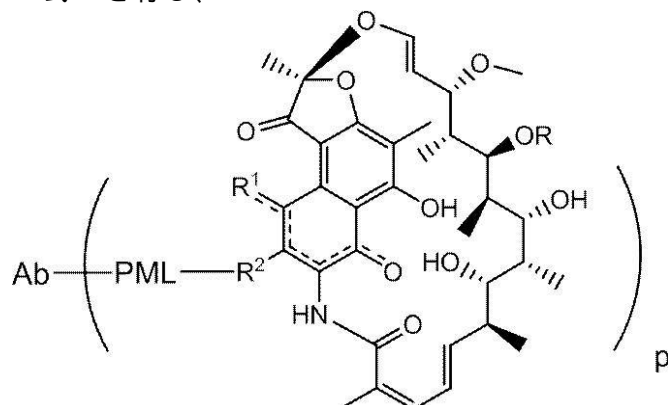
前記リファマイシン型抗生物質が、リファラジル型抗生物質である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【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リンカーに結合している第 4 級アミンを含む、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 4】

式 I を有し、



I

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、式中、前記ヘテロシクリルが、 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ 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 つ以上の基と任意に置換されるか、

または、 R^1 及び R^2 が、5 もしくは 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、任意に、スピロもしくは縮合 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、前記スピロもしくは縮合 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、任意に置換された H、F、Cl、Br、I、 $\text{C}_1 - \text{C}_{12}$ アルキル、または OH であり、

PML が、 R^2 と結合している前記プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカー、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もしくはヘテロシクリルであり、

Ab が、抗 WTA 抗体である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 5】

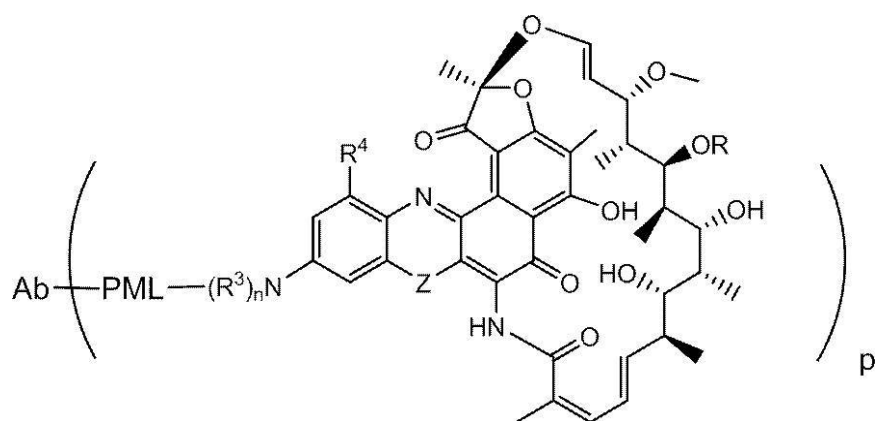
以下の式を有し、

10

20

30

40



10

式中、

R^3 が、独立して、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、

n が、1 または 2 であり、

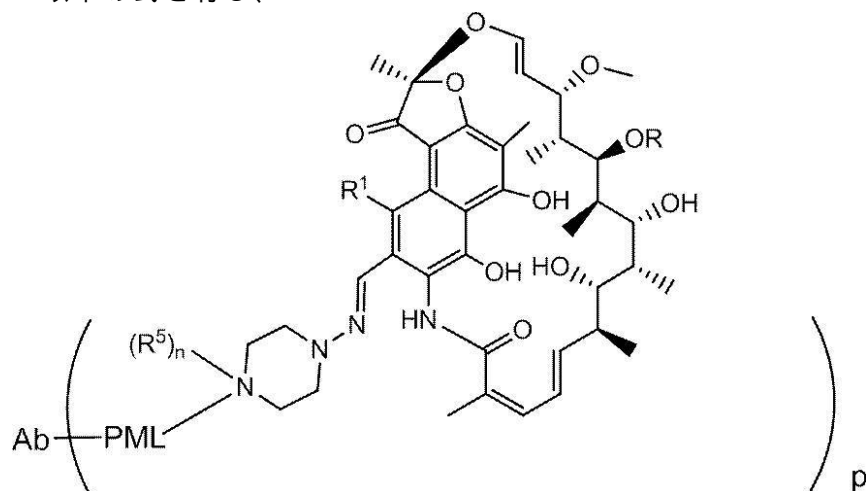
R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 C_{1-12} アルキル、及び OH から選択され、

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 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 6】

以下の式を有し、

20



30

式中、

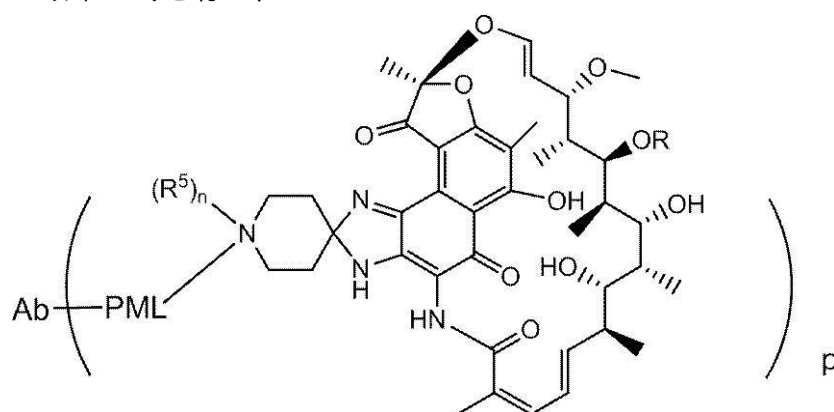
R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、

n は、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 7】

以下の式を有し、

40



式中、

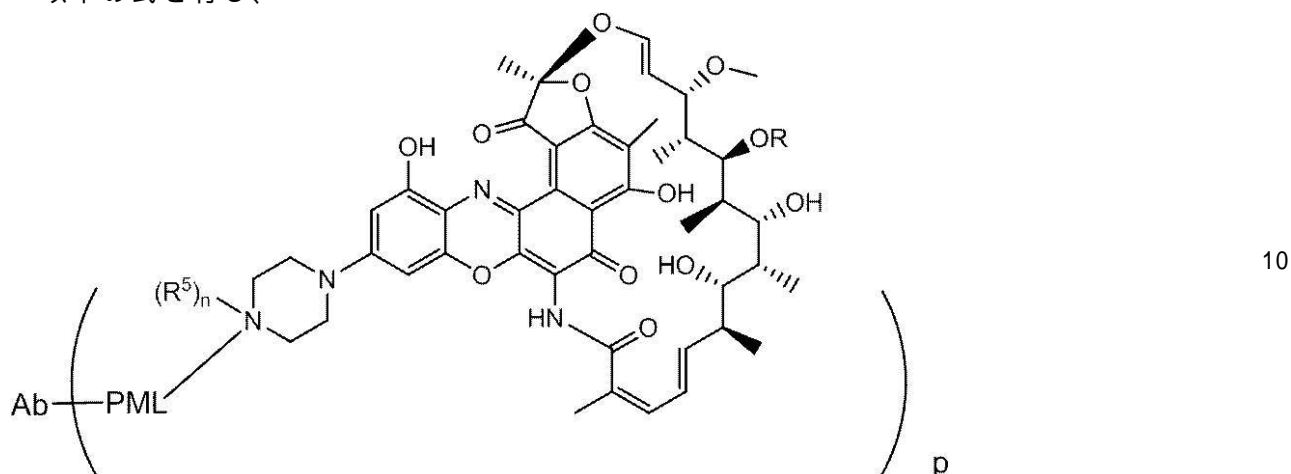
R^5 が、H 及び C_{1-12} アルキルから選択され、

50

n は、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 8】

以下の式を有し、



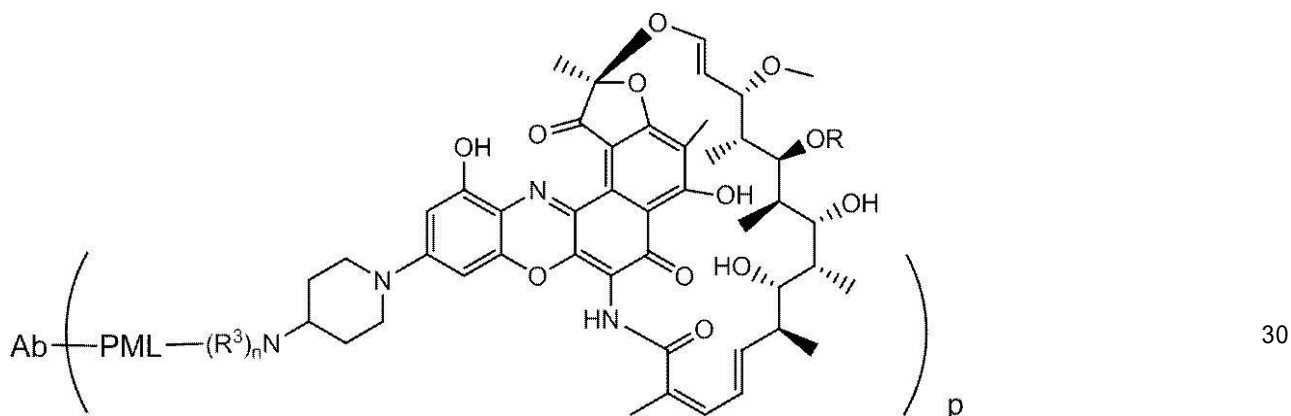
式中、

R^5 が、独立して、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、

n は、0 または 1 である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 9】

以下の式を有し、



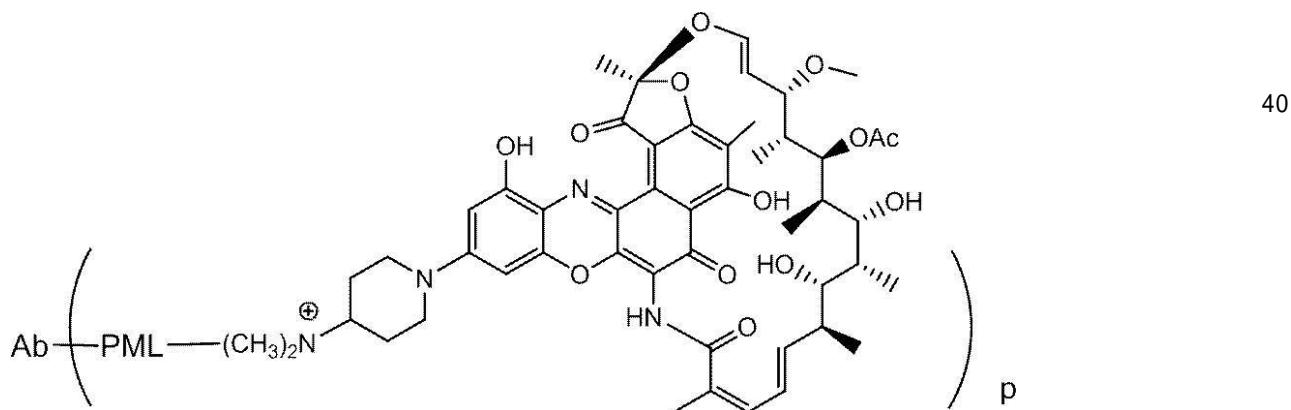
式中、

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

n が、1 または 2 である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

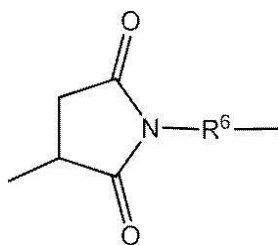
【請求項 10】

以下の式を有する、請求項 9 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。



【請求項 11】

Str が、以下の式を有し、



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 - $NHC(=O)CH_2CH$ (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 の範囲内の整数である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

10

【請求項 12】

R^6 が、 $(CH_2)_5$ である、請求項 11 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

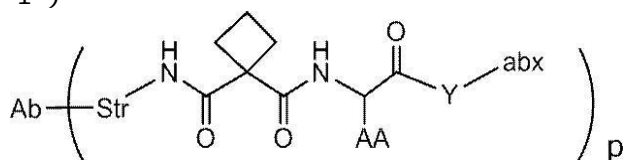
【請求項 13】

Y が、パラ - アミノベンジルまたはパラ - アミノベンジロキシカルボニルを含む、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 14】

以下の式：

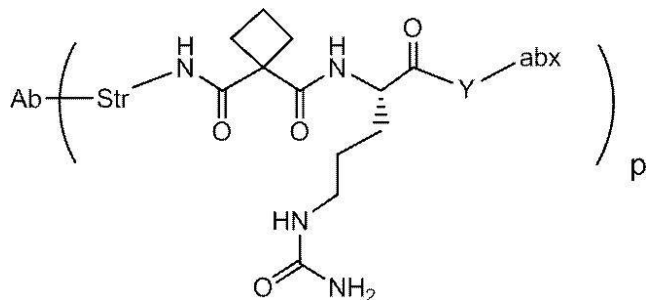
i)



20

;

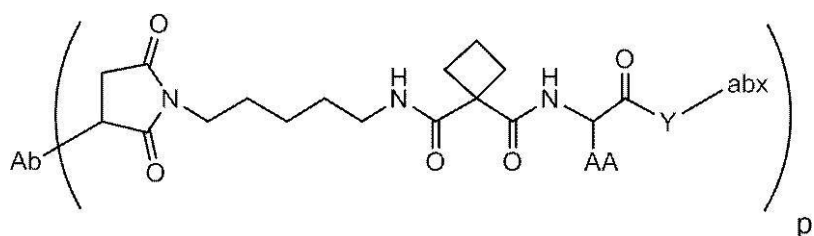
ii)



30

;

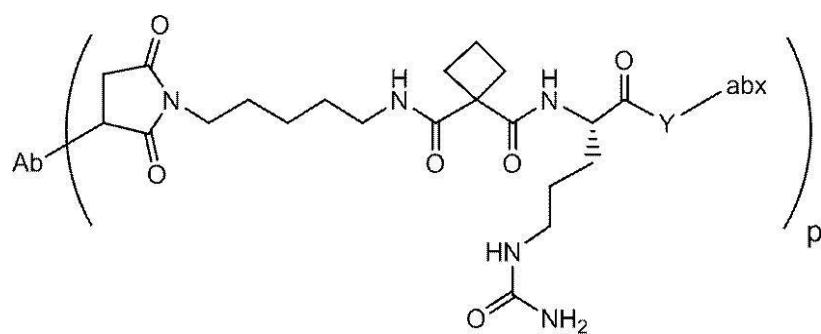
iii)



40

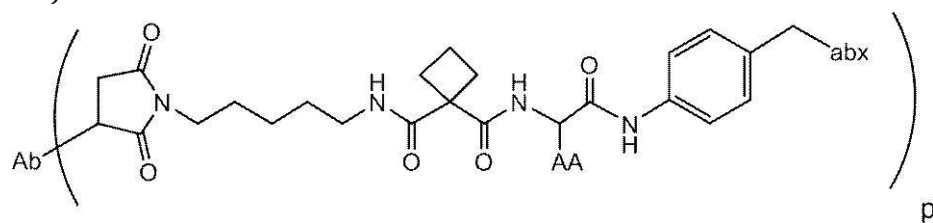
;

iv)



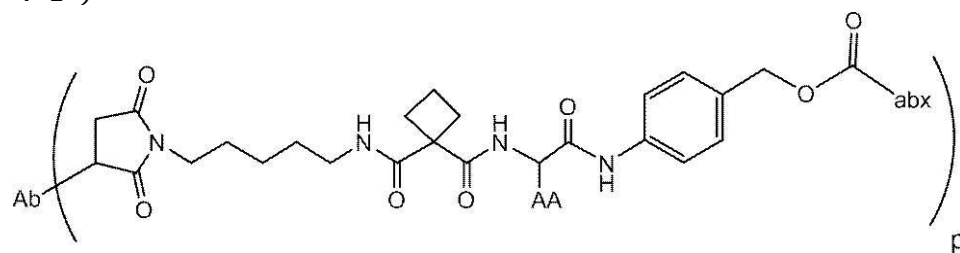
;
 v)

10



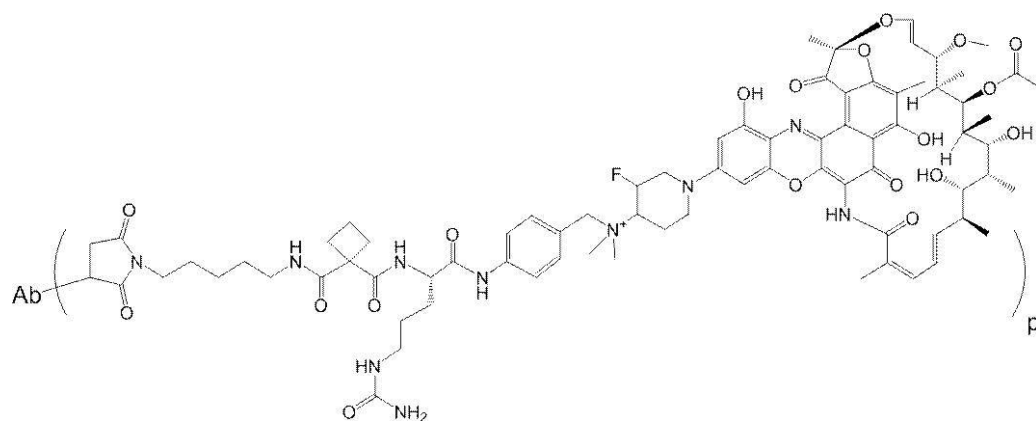
;
 v i)

20



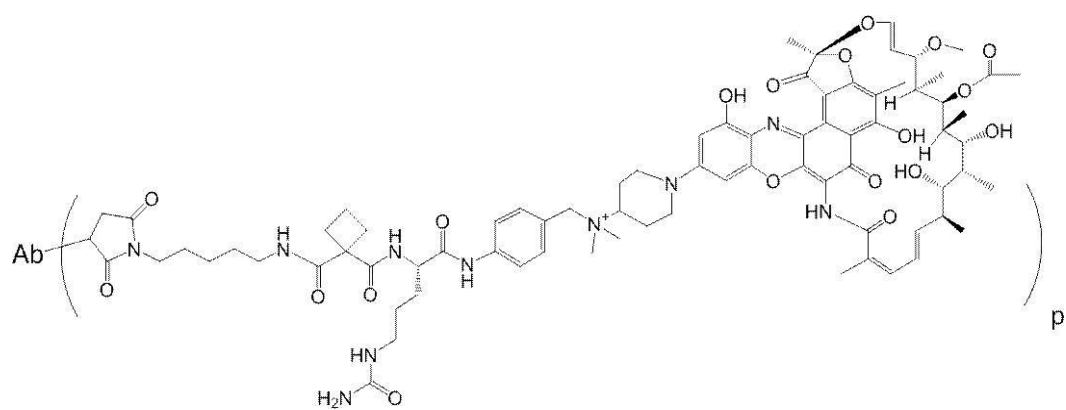
;
 v i i)

30



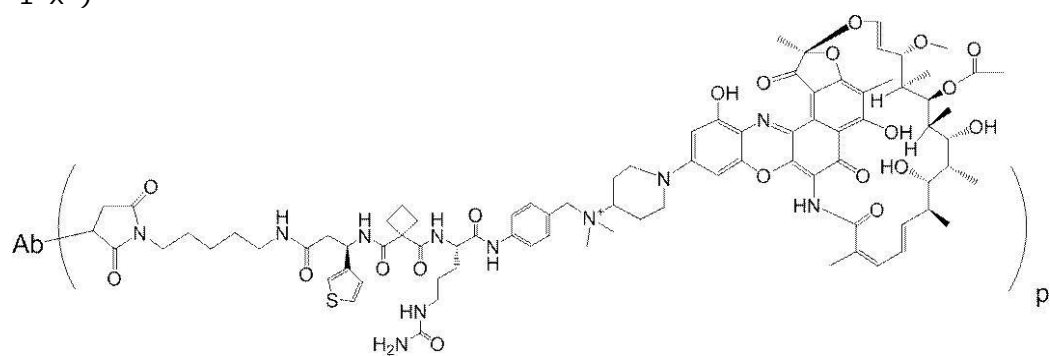
;
 v i i i)

40



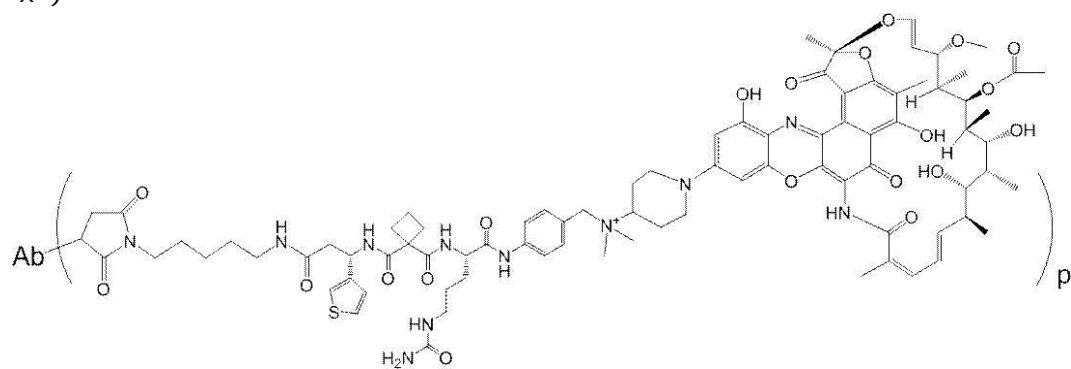
10

;
i x)



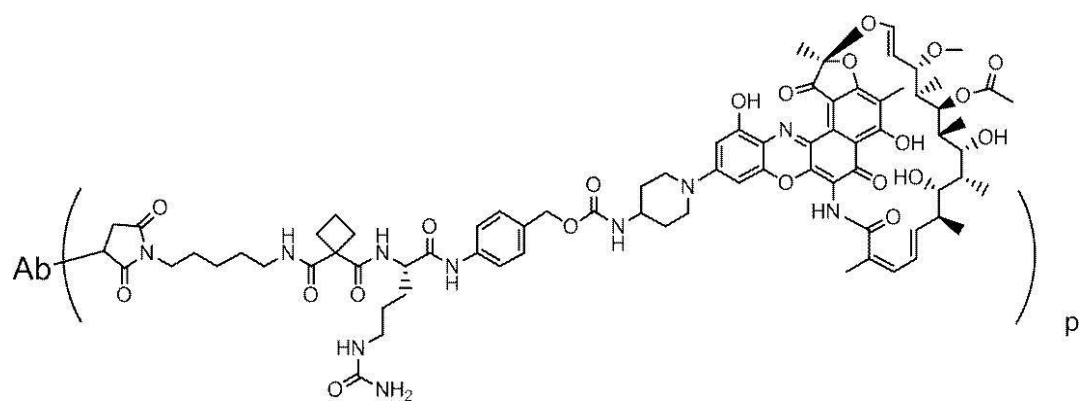
20

;
x)



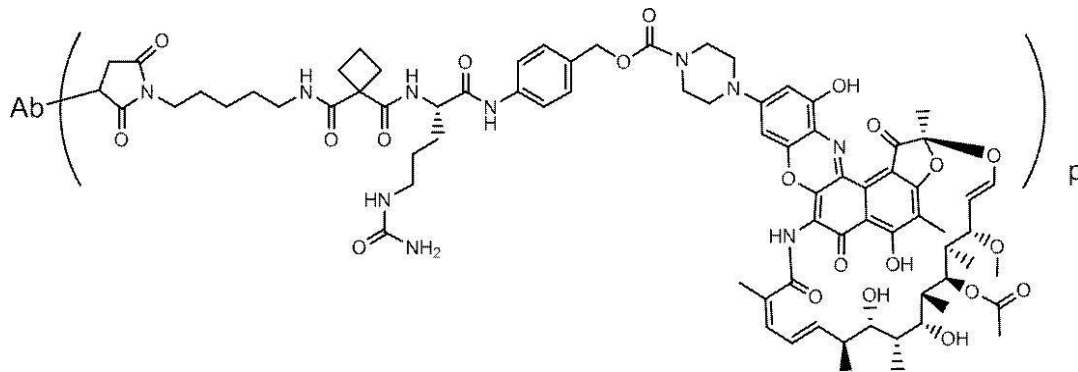
30

;
x i)



40

; 及び
x i i)



10

から選択される、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 15】

前記抗体が、抗 W T A モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 16】

前記抗 W T A 抗体が、軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を含み、前記 L 鎖が、K S S Q S I F R T S R N K N L L N (配列番号 99) の配列を含む C D R L 1、W A S T R K S (配列番号 100) の配列を含む C D R L 2、及び Q Q Y F S P P Y T (配列番号 101) の配列を含む C D R L 3 を含み、かつ前記 H 鎖が、S F W M H (配列番号 102) の配列を含む C D R H 1、F T N N E G T T T A Y A D S V R G (配列番号 103) の配列を含む C D R H 2、及び G E G G L D D (配列番号：118) の配列を含む C D R H 3 を含み、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

20

【請求項 17】

前記抗 W T A 抗体が：

(a) 重鎖可変領域 (V H) を含み、前記 V H が、配列番号 156 を有するアミノ酸配列含み；かつ / または

(b) 軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V L が、配列番号 119 を有するアミノ酸配列を含む

請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 18】

前記抗 W T A 抗体が、軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を含み、前記 L 鎖が、R A S Q T I S G W L A (配列番号：33) の配列を含む C D R L 1、K A S T L E S (配列番号：34) の配列を含む C D R L 2、及び Q Q Y K S Y S F N (配列番号：35) の配列を含む C D R L 3 を含み、かつ前記 H 鎖が、S Y D I N (配列番号：36) の配列を含む C D R H 1、W M N A N S G N T G Y A Q K F Q G (配列番号：37) の配列を含む C D R H 2、及び S S I L V R G A L G R Y F D L (配列番号：38) の配列を含む C D R H 3 を含み、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

30

【請求項 19】

前記抗 W T A 抗体が：

(a) 配列番号 112 を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H) ；及び / または (b) 配列番号 111 を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (L H)

を含む、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

40

【請求項 20】

前記抗 W T A 抗体が、軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を含み、

(a) 前記 L 鎖が、R A S Q T I S G W L A (配列番号：39) の配列を含む C D R L 1、K A S T L E S (配列番号：40) の配列を含む C D R L 2、及び Q Q Y K S Y S F N (配列番号：41) の配列を含む C D R L 3 を含み；かつ前記 H 鎖が、S Y D I N (配列番号：42) の配列を含む C D R H 1、W M N A N S G N T G Y A Q K F Q G (配列番号：43) の配列を含む C D R H 2、及び S S I L V R G A L G R Y F D L (配列番号：44) の配列を含む C D R H 3 を含む；

50

(b) 前記 L 鎖が、R A S Q F V S R T S L A (配列番号: 45) の配列を含む C D R L 1、E T S S R A T (配列番号: 46) の配列を含む C D R L 2、及び H K Y G S G P R T (配列番号: 47) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、N Y D F I (配列番号: 48) の配列を含む C D R H 1、W M N P N S Y N T G Y G Q K F Q G (配列番号: 49) の配列を含む C D R H 2、及び A V R G Q L L S E Y (配列番号: 50) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(c) 前記 L 鎖が、R A S Q S V S S S Y L A (配列番号: 51) の配列を含む C D R L 1、D A S S R A T (配列番号: 52) の配列を含む C D R L 2、及び Q K Y G S T P R P (配列番号: 53) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、S Y D I N (配列番号: 54) の配列を含む C D R H 1、W M N P N S G N T N Y A Q R F Q G (配列番号: 55) の配列を含む C D R H 2、及び E R W S K D T G H Y Y Y Y G M D V (配列番号: 56) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(d) 前記 L 鎖が、R A S L D I T N H L A (配列番号: 57) の配列を含む C D R L 1、E A S I L Q S (配列番号: 58) の配列を含む C D R L 2、及び E K C N S T P R T (配列番号: 59) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、N Y D I N (配列番号: NO: 60) の配列を含む C D R H 1、W M N P S S G R T G Y A P K F R G (配列番号: 61) の配列を含む C D R H 2、及び G G G Y Y D S S G N Y H I S G L D V (配列番号: NO: 62) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(e) 前記 L 鎖が、R A S Q S V G A I Y L A (配列番号: 63) の配列を含む C D R L 1、G V S N R A T (配列番号: 64) の配列を含む C D R L 2、及び Q L Y T S S R A L T (配列番号: 65) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、A Y A M N (配列番号: 66) の配列を含む C D R H 1、S I T K N S D S L Y Y A D S V K G (配列番号: 67) の配列を含む C D R H 2、及び L A A R I M A T D Y (配列番号: 68) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(f) 前記 L 鎖が、R A S Q G I R N G L G (配列番号: 69) の配列を含む C D R L 1、P A S T L E S (配列番号: 70) の配列を含む C D R L 2、及び L Q D H N Y P P T (配列番号: 71) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、Y Y S M I (配列番号: 72) の配列を含む C D R H 1、S I D S S S R Y L Y Y A D S V K G (配列番号: 73) の配列を含む C D R H 2、及び D G D D I L S V Y R G S G R P F D Y (配列番号: 74) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(g) 前記 L 鎖が、R A S Q G I R N G L G (配列番号: 75) の配列を含む C D R L 1、P A S T L E S (配列番号: 76) の配列を含む C D R L 2、及び L Q D H N Y P P S (配列番号: 77) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、Y Y S M I (配列番号: 78) の配列を含む C D R H 1、S I D S S S R Y R Y Y T D S V K G (配列番号: 79) の配列を含む C D R H 2、及び D G D D I L S V Y Q G S G R P F D Y (配列番号: 80) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(h) 前記 L 鎖が、R A S Q S V R T N V A (配列番号: 81) の配列を含む C D R L 1、G A S T R A S (配列番号: 82) の配列を含む C D R L 2、及び L Q Y N T W P R T (配列番号: 83) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、T N D M S (配列番号: 84) の配列を含む C D R H 1、T I I G I D D T T H Y A D S V R G (配列番号: 85) の配列を含む C D R H 2、及び N S G I Y S F (配列番号: 86) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(i) 前記 L 鎖が、R A S Q D I G S S L A (配列番号: 87) の配列を含む C D R L 1、A T S T L Q S (配列番号: 88) の配列を含む C D R L 2、及び Q Q L N N Y V H S (配列番号: 89) の配列を含む C D R L 3 を含み; かつ前記 H 鎖が、D Y A M G (配列番号: 90) の配列を含む C D R H 1、V V T G H S Y R T H Y A D S V K G (配列番号: 91) の配列を含む C D R H 2、及び R I W S Y G D D S F D V (配列番号: 92) の配列を含む C D R H 3 を含む;

(j) 前記 L 鎖が、R A S Q S I G D R L A (配列番号: 93) の配列を含む C D R L 1、W A S N L E G (配列番号: 94) の配列を含む C D R L 2、及び Q Q Y K S Q W

10

20

30

40

50

S (配列番号：95) の配列を含む CDR L3 を含み；かつ前記 H 鎖が、SYAMN (配列番号：96) の配列を含む CDR H1、YISSIETIYYADSVKG (配列番号：97) の配列を含む CDR H2、及び DRLVDVPLSSPNS (配列番号：98) の配列を含む CDR H3 を含み；または
 (k) 前記 L 鎖が、RASQFTNHLYLN (配列番号：105) の配列を含む CDR L1、VASNLQS (配列番号：106) の配列を含む CDR L2、及び QQSYRTPTYT (配列番号：107) の配列を含む CDR L3 を含み；かつ前記 H 鎖が、SGYYN (配列番号：108) の配列を含む CDR H1、YILSGAHTDIKASLG (配列番号：109) の配列を含む CDR H2、及び SGVYSKYSLDV (配列番号：110) の配列を含む CDR H3 を含み
 請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

10

【請求項 21】

前記抗 WTA 抗体が、黄色ブドウ球菌と結合する、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 22】

前記抗体が、F(ab) または F(ab')₂ である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物と、薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤、または賦形剤とを含む、薬学的組成物。

20

【請求項 24】

治療有効量の請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物を含む、患者における細菌感染症を治療するための医薬。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物を含む、宿主細胞を死滅させることなく、黄色ブドウ球菌に感染した患者の細胞内黄色ブドウ球菌を死滅させるための医薬。

【請求項 26】

リファマイシン型抗生物質を抗壁テイコ酸 (WTA) 抗体に結合させることを含む、請求項 1 に記載の抗体 - 抗生物質複合化合物を作製するためのプロセス。

【請求項 27】

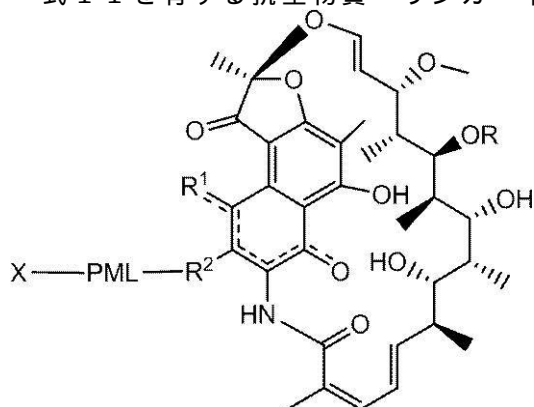
細菌感染症を治療するためのキットであって、

- a) 請求項 23 に記載の薬学的組成物と、
- b) 使用説明書と、を含む、キット。

30

【請求項 28】

式 II を有する抗生物質 - リンカー中間体であって、



40

II

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、

50

R¹ が OH であり、

R² が C₆H₅ = N - (ヘテロシクリル) であり、式中、前記ヘテロシクリルが、C (O) C₆H₃、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 つ以上の基と任意に置換されるか、

または、 R^1 及び R^2 が、5 もしくは 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、任意に、スピロもしくは縮合 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、前記スピロもしくは縮合 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、任意に置換された H、F、Cl、Br、I、 C_{1-12} アルキル、または OH であり、

PMLが、 R^2 、または R^1 及び R^2 によって形成される前記縮合ヘテロアリールまたはヘテロシクリルと結合し、式、

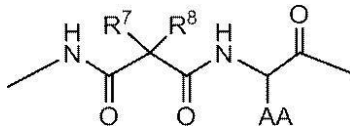
- S t r - P M - Y -

を有し、

式中、S t r がストレッチャー単位であり、P M がペプチドミメティック単位であり、Y がスペーサー単位であり、

X が、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p - トルエンスルホナート、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 - ヒドロキシスクシンイミドから選択される反応性官能基であり、

P M が、式、



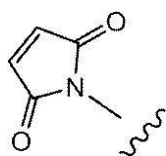
を有し、式中、 R^7 及び R^8 が合わせて、 $C_3 - C_7$ シクロアルキル環を形成し、

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

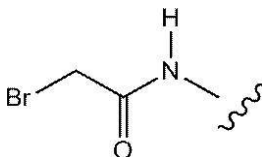
抗生物質 - リンカー中間体。

【請求項 29】

X が、



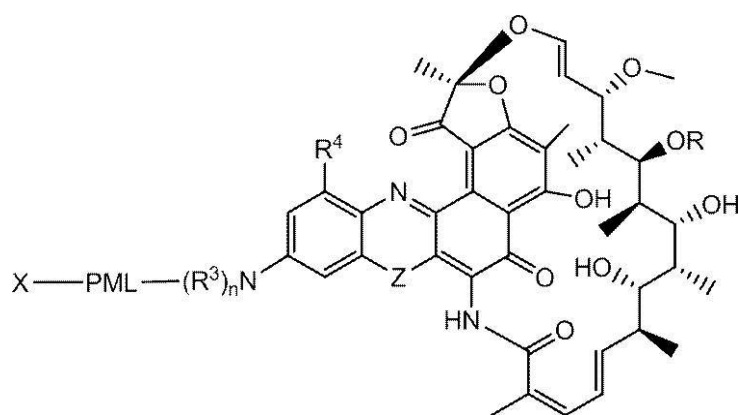
または



である、請求項 28 に記載の抗生物質 - リンカー中間体。

【請求項 30】

以下の式を有し、



10

式中、

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

n が、1 または 2 であり、

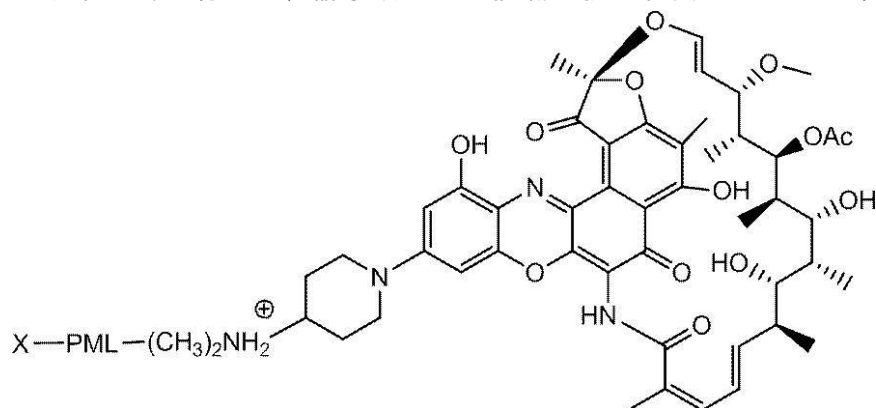
R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、及び OH から選択され、

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 28 に記載の抗生物質 - リンカー中間体。

【請求項 31】

以下の式を有する、請求項 28 に記載の抗生物質 - リンカー中間体。

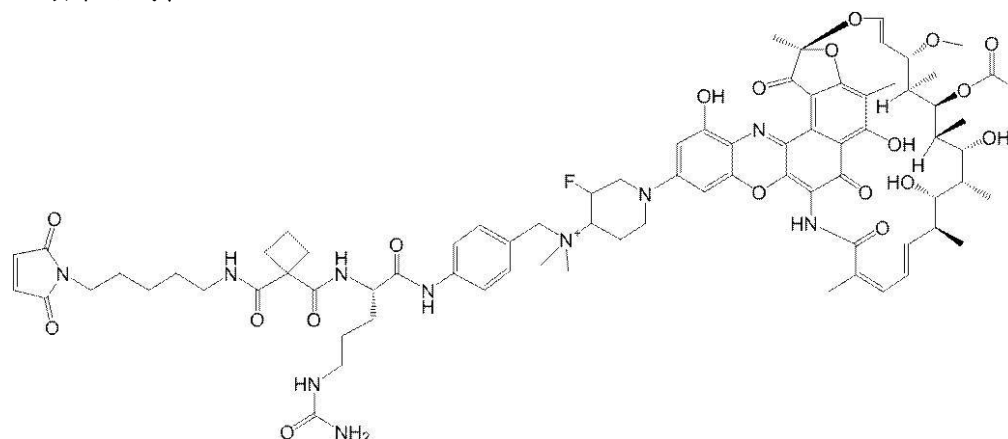
20



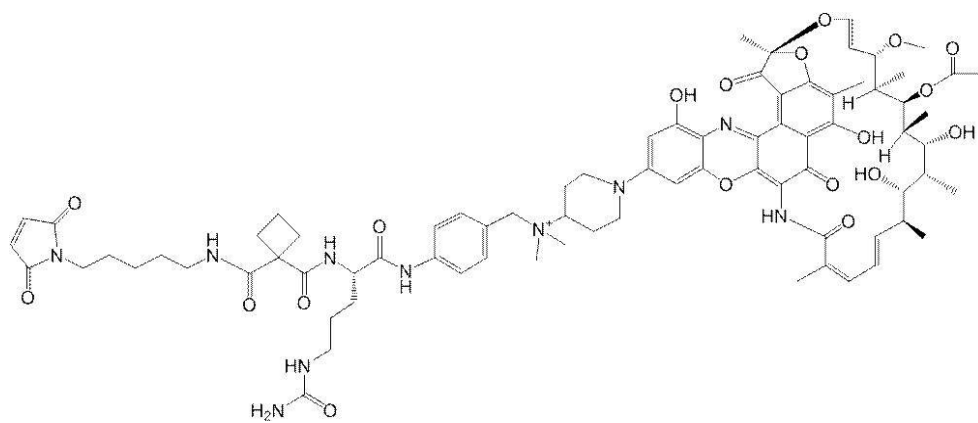
30

【請求項 32】

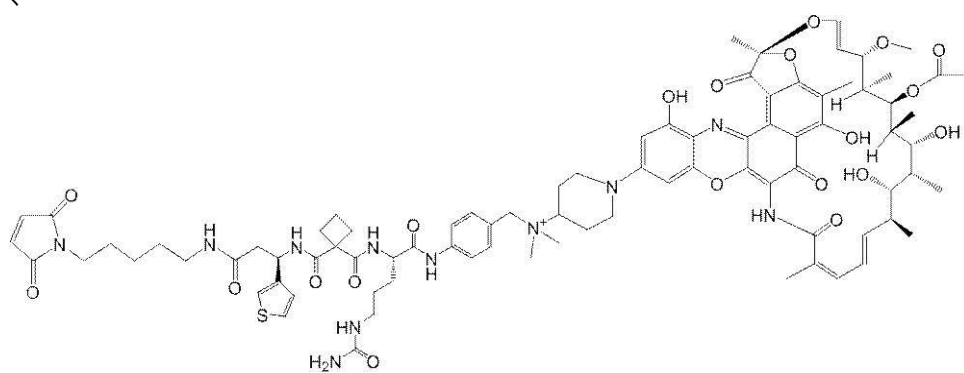
以下の式、



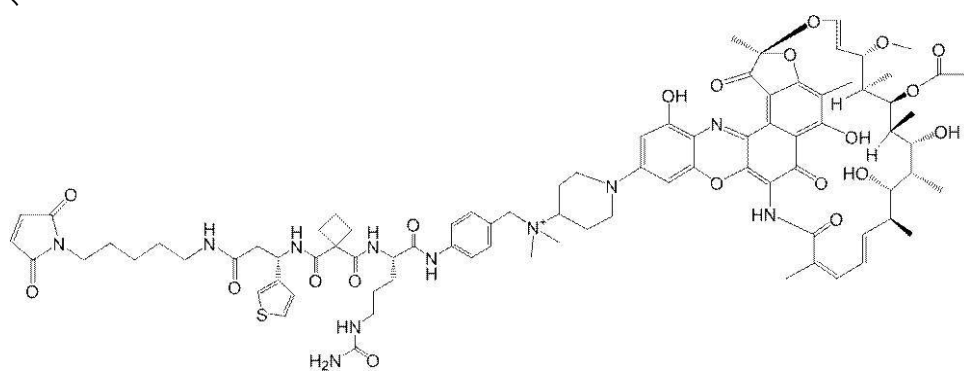
40



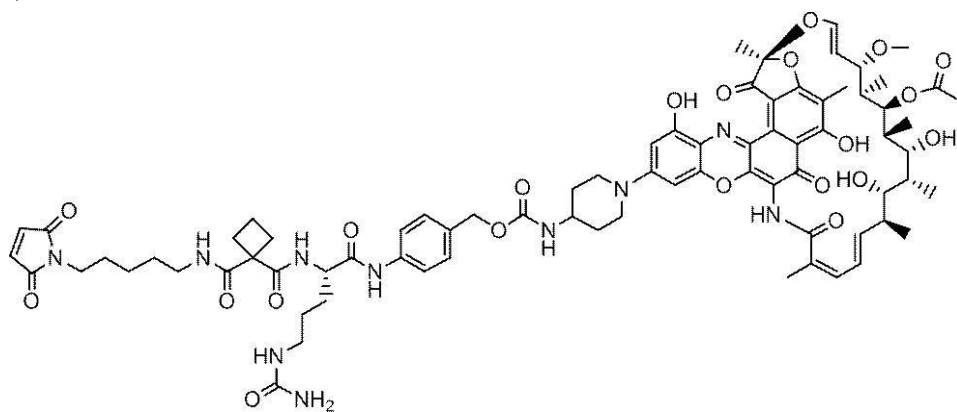
10



20

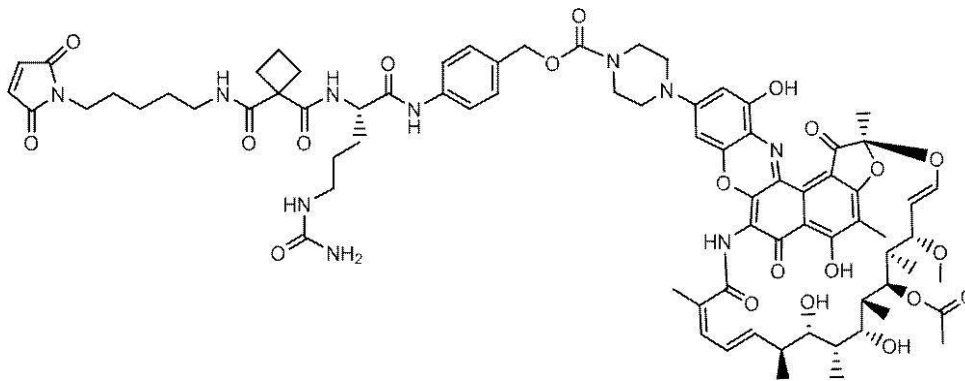


30



40

、及び



10

から選択される、請求項 28 に記載の抗生物質 - リンカー 中間体。

【請求項 33】

前記患者が、ブドウ球菌系細菌に感染する、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項 34】

前記患者が、黄色ブドウ球菌に感染する、請求項 33 に記載の医薬。

【請求項 35】

約 50 mg / kg ~ 100 mg / kg の範囲内の用量の前記抗体 - 抗生物質複合化合物を含む、請求項 24 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【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出願第 62 / 087,184 号の利益を主張し、これは、参照によりその全体が全ての目的のために組み込まれる。

【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。2015 年 11 月 20 日に作成された上記 ASCII コピーは、P32433 - WO__SL.txt という名称であり、190541 バイトのサイズである。

30

【0003】

本発明は、ブドウ球菌感染症の治療における、リファマイシン型抗生物質に複合された抗壁ペプチド酸（「抗 WTA」）抗体及びその結果として得られる抗体 - 抗生物質複合体の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

黄色ブドウ球菌（*S. aureus*、SA）は、世界的にヒトにおける細菌感染症の主な原因であり、病院及び社会環境の両方において主要な健康問題を提示する。しかしながら、黄色ブドウ球菌は、病原体に限らず、一般に、健康な個体の前鼻孔及び皮膚に定着する。感染症が発生する場合に、心内膜炎、骨髄炎、壊死性肺炎、及び敗血症のような最も重篤な感染症が発生し、その後に、血流への細菌の播種が続く（Lowy, F. D. (1998) "Staphylococcus aureus infections" N Engl J Med 339, 520 - 532）。過去数十年にわたって、黄色ブドウ球菌の感染症は、全ての既知のベータラクタム抗生物質に対して耐性であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の出現及び急激な蔓延により、治療するのがますます困難になってきている（Boucher, H. W., et al. (2009) "Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America" Clin Infect Dis 48, 1 - 12）。侵襲性 MRSA 感染症は、治療するのが困難であり、約 20% の死亡率を有し、米国では感染体による死亡の主な

40

50

原因である。そのため、バンコマイソン、リネゾリド、及びダプトマイシンは、侵襲性MRSA感染症を治療するために最適な数少ない抗生物質になっている(Boucher, H., Miller, L. G. & Razonable, R. R. (2010) "Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus" Clin Infect Dis 51 Suppl 2, S183-197)。しかしながら、バンコマイソンに対する感受性の低減、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も、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) "Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant Staphylococcus aureus" Curr Opin Pharmacol 10, 516-521)。経時的に、耐性を克服するために必要なバンコマイシンの用量は、神経毒性が生じるレベルまで徐々に上昇している。それ故に、侵襲性MRSA感染症による死亡率及び罹患率は、これらの抗生物質にも関わらず、高いままである。

【0005】

調査は、黄色ブドウ球菌が、細菌排除に関与する食細胞を含む哺乳動物細胞の内部に侵入し、生存することが可能であることを示している(Thwaites, G. E. & Gant, V. (2011) Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of Staphylococcus aureus? Nat Rev Microbiol 9, 215-222)、Rogers, D. E., Tompsett, R. (1952) "The survival of staphylococci within human leukocytes" J. Exp. Med 95, 209-230)、Gresham, H. D., et al. (2000) "Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection" J Immunol 164, 3713-3722)、Kapral, F. A. & Shayegani, M. G. (1959) "Intracellular survival of staphylococci" J Exp Med 110, 123-138、Anwar, S., et al. (2009) "The rise and rise of Staphylococcus aureus: laughing in the face of granulocytes" Clin Exp Immunol 157, 216-224)、Fraunholz, M. & Sinha, B. (2012) "Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die" Front Cell Infect Microbiol 2, 43)、Garzoni, C. & Kelley, W. L. (2011) "Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by Staphylococcus aureus" EMBO Mol Med 3, 115-117)。黄色ブドウ球菌は、宿主食細胞、主に好中球及びマクロファージによって、静脈内感染から数分以内に取り込まれる(Rogers, D. E. (1956) "Studies on Bacteremia: Mechanisms Relating to the Persistence of Bacteremia in Rabbits Following the Intravenous Injection of Staphylococci" JEM 103, 713)。細菌の大部分は、これらの細胞によって有効に死滅するが、血液感染性食細胞の内部の黄色ブドウ球菌の不完全な排除は、これらの感染した細胞を感染の原発部位から離れた細菌の播種のための「危険性をはらんだもの」としての役割を果たし得る。実際には、正常な好中球数を有する患者は、好中球

10

20

30

40

50

数が低減した患者よりも播種性疾患によりかかりやすい傾向がある (Thwaites, G. E. & Gant, V. (2011) 上記参照)。一旦組織に送達されると、黄色ブドウ球菌は、様々な非食細胞型に侵入し得、組織における細胞内黄色ブドウ球菌は、慢性または反復性感染症と関連がある。さらに、準最適な抗生物質濃度における細胞内細菌の曝露は、抗生物質耐性株の出現を促し、よって、この臨床的問題をさらに深刻にする場合がある。これらの観察と一致して、バンコマイソンまたはダプトマイシンによる菌血症または心内膜炎のような侵襲性MRSA感染症に罹患している患者の治療は、50%を超える失敗率と関連している (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 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、より良好な抗ブドウ球菌療法は、細胞内細菌の排除を含むべきである。

【0006】

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、リファペンチン、リファラジル、ABI-1657、及びそれらのアナログを含む抗生物質のクラスであり、これは、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並外れた効力を有する (Rothstein, D. M., et al (2003) Expert Opin. Invest. Drugs 12(2): 255 - 271、US7342011、US7271165)。

【0007】

黄色ブドウ球菌 (MRSAを含む) 感染症を予防及び治療するための免疫療法が報告されている。US2011/0262477は、MRSAに対する免疫応答を刺激するためのワクチンとして細菌接着タンパク質Eap、Emp、及びAdsAを使用することに関する。WO2000/071585は、特定の黄色ブドウ球菌単離株に対して反応性である単離モノクローナル抗体について記載している。US2011/0059085A1は、1つ以上のSA莢膜抗原に特異的なIgM Abを用いるAbベースの戦略を示唆しているが、実際の抗体は記載されなかった。

【0008】

免疫複合体としても知られている抗体薬物複合体 (ADC) は、強力な細胞毒性薬の標的を抗原発現腫瘍細胞に定め (Teicher, B. A. (2009) Curr. Cancer Drug Targets 9: 982 - 1004)、それによって、有効性を最大化して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、抗体と細胞毒性薬の両方の理想的な特性を組み合わせている、標的が定められた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. (200

10

20

30

40

50

8) Acc. Chem. Res. 41: 98 - 107。ADCは、リンカー単位を通して細胞毒性薬物部分に共有結合される標的抗体を含む。免疫複合体は、腫瘍への薬物部分の標的化された送達を可能にし、複合されていない薬物の全身投与が、正常な細胞、及び排除されることが求められる腫瘍細胞にとって許容できないレベルの毒性をもたらし得る場合に、腫瘍中の細胞内蓄積を可能にする (Polakis P. (2005) Curr. Opin. Pharmacol. 5: 382 - 387)。

【0009】

非特異的な免疫グロブリン - 抗生物質複合体は、敗血症を治療するために、抗生物質を介して標的細菌の表面に結合することが記載されている (US 5,545,721、US 6,660,267)。抗生物質複合抗体は、細菌性抗原 (SA 莢膜多糖類等) に特異的な抗原結合部分を有することが記載されているが、細菌性Fc結合タンパク質、例えば、ブドウ球菌タンパク質Aと反応する定常領域を欠いている (US 7569677)。

10

【0010】

従来の抗生物質に対するMRSAの驚くべき耐性率ならびに侵襲性MRSA感染症による結果として生じる死亡率及び罹患率を考慮して、黄色ブドウ球菌感染症を治療するために新しい治療薬の高い満たされていない要求がある。本発明は、この必要性を満たし、現在の治療組成物の限界を克服し、以下の詳細から明らかであろうさらなる利点を提供する組成物及び方法を提供する。

【発明の概要】

【0011】

20

本発明は、細胞内細菌の排除を含む特有の治療薬を提供する。本発明は、そのような治療薬がバンコマイソン等の従来の抗生物質が効かないインピボで有効であることを実証する。

【0012】

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って複合された抗体を含む「抗体 - 抗生物質複合体」または「AAC」と称される組成物を提供する。

【0013】

本発明の一態様は、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリinkerによって、リファマイシン型抗生物質に共有結合される、抗壁テイコ酸(WTA)抗体を含む抗体 - 抗生物質複合化合物である。

30

【0014】

本発明の例示的な実施形態は、式、

$$Ab - (PML - abx)_p$$
、
 を有する請求項1に記載の抗体 - 抗生物質複合体であって、
 式中、
 Abが、抗壁テイコ酸抗体であり、
 PMLが、式、

$$-Str - PM - Y -$$

 を有する、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリinkerであって、
 式中、Strがストレッチャー単位であり、PMがペプチドミメティック単位であり、
 Yがスペーサー単位であり、
 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。

40

【0015】

前述の実施形態のいずれかの抗体 - 抗生物質複合化合物は、本明細書に記載される抗壁テイコ酸(WTA)Abのうちのいずれか1つを含むことができる。これらの抗WTA抗体は、黄色ブドウ球菌に結合する。一実施形態では、抗体は、抗WTAモノクローナル抗体である。例示的な抗WTA抗体において、このAbは、軽(L)鎖及び重(H)鎖を含む単離モノクローナル抗体であり、L鎖は、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含み、H鎖は、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含み、CD

50

R L 1、C D R L 2、及びC D R L 3、ならびにC D R H 1、C D R H 2、及びC D R H 3は、表 1 A 及び 1 B 中に示されるように、それぞれ、A b s 4 4 6 1 (配列番号 1 ~ 6)、4 6 2 4 (配列番号 7 ~ 1 2)、4 3 9 9 (配列番号 1 3 ~ 1 8)、及び 6 2 6 7 (配列番号 1 9 - 2 4) 各々のC D R のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、抗W T A 抗体は、重鎖可変領域 (V H) を含み、V H は、それぞれ、抗体 4 4 6 1、4 6 2 4、4 3 9 9、及び 6 2 6 7 の配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2 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 9 5 % の配列同一性を含む。抗体は、L 鎖可変領域 (V L) をさらに含んでもよく、V L は、それぞれ、抗体 4 4 6 1、4 6 2 4、4 3 9 9、及び 6 2 6 7 の配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 2 9、配列番号 3 1 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 9 5 % の配列同一性を含む。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、本発明の抗体 - 抗生物質複合化合物は、抗W T A モノクローナル抗体を含む。例示的な抗W T A 抗体は、軽鎖及びH鎖を含み、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、C D R L 1、C D R L 2、及びC D R L 3、ならびにC D R H 1、C D R H 2、及びC D R H 3は、図 1 2 中に示されるA b s (配列番号 3 3 ~ 1 1 0) の各々の対応するC D R のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明のA A Cを作製するのに有用な別の抗W T A 抗体は、L鎖可変領域 (V L) を含み、V L は、図 1 5 A - 1、1 5 A - 2、1 5 A - 3 中に示されるように、K a b a t 位置 1 ~ 1 0 7 で、それぞれ、抗体 6 0 7 8、6 2 6 3、4 4 5 0、6 2 9 7、6 2 3 9、6 2 3 2、6 2 5 9、6 2 9 2、4 4 6 2、6 2 6 5、6 2 5 3、4 4 9 7、及び 4 4 8 7 の各々に対応する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 9 5 % の配列同一性を含む。この抗体は、重鎖可変領域 (V H) をさらに含み、V H は、図 1 5 B - 1 ~ 1 5 B - 6 中に示されるように、K a b a t 位置 1 ~ 1 1 3 で、それぞれ、抗体 6 0 7 8、6 2 6 3、4 4 5 0、6 2 9 7、6 2 3 9、6 2 3 2、6 2 5 9、6 2 9 2、4 4 6 2、6 2 6 5、6 2 5 3、4 4 9 7、及び 4 4 8 7 の各々に対応する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 9 5 % の配列同一性を含む。

【 0 0 1 9 】

別の抗W T A 抗体では、V L は、配列番号 1 1 1 の配列を含み、V H は、配列番号 1 1 2 の配列を含み、式中、X は、Q または E であり、X₁ は、M、I、または V である。

【 0 0 2 0 】

本発明は、本発明のA A Cを作製するのに有用な抗W T A を提供し、抗体軽鎖は、操作システインを含み、配列番号 1 1 5 の配列を含み、H鎖は、配列番号 1 1 6 を含み、式中、X は、M、I、または V である。L 及びH鎖が対合する代替例では、抗体軽鎖は、配列番号 1 1 3 の配列を含み、H鎖は、操作システインを含み、配列番号 1 1 7 を含み、式中、X は、M、I、または V である。C y s は、L 及びH鎖の各々に操作され得、かかるW T A 抗体の一例では、軽鎖は、操作システインを含み、配列番号 1 1 5 の配列を含み、H鎖は、操作システインを含み、配列番号 1 1 7 の配列を含み、式中、X は、M、I、または V である。

【 0 0 2 1 】

複合に有用な別の抗W T A 抗体は、V H 及びV L を含み、V H は、配列番号 1 5 6 のV H の長さにわたって少なくとも 9 5 % の配列同一性を含み、V L は、配列番号 1 1 9 のV L の長さにわたって少なくとも 9 5 % の配列同一性を含む。具体的な実施形態では、抗W T A 抗体は、配列番号 1 5 6 の配列を含むV H と、配列番号 1 1 9 の配列を含むV L とを含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の抗W T A 抗体は、配列番号 1 2 1 の配列を含むL鎖と、配列番号 1 2 4 の配

10

20

30

40

50

列を含むH鎖とを含む。別例では、抗W T A 抗体は、配列番号1 2 3の配列を含むL鎖と、配列番号1 5 7または配列番号1 2 4の配列を含むH鎖とを含む。

【0 0 2 3】

他の実施形態では、抗体は、i) 配列番号9 9 ~ 1 0 4のL鎖及びH鎖のC D R、もしくは配列番号3 3 ~ 3 8のL鎖及びH鎖のC D R、またはi i) 配列番号1 2 0もしくは配列番号1 5 6のV Hと対となる配列番号1 1 9もしくは配列番号1 2 3の前記V L、またはi i i) 配列番号1 1 2のV Hと対となる配列番号1 1 1のV L、を含む。

【0 0 2 4】

本発明のA A Cのいくつかの実施形態では、抗体は、前述の実施形態のうちのいずれか1つの抗体と同じエピトープに結合する。

【0 0 2 5】

前述の実施形態のうちのいずれか1つの抗体は、F c領域を欠く抗原結合断片であってもよい。いくつかの実施形態では、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、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、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A 1 1 8 C及び/もしくはS 4 0 0 Cを含み、かつ/または、軽鎖定常領域は、アミノ酸置換V 2 0 5 Cを含み、この付番方式は、E U付番方式によるものである。

【0 0 2 6】

上述の抗体のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗体は、I g Mのアイソタイプではない。上述の抗体のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗体は、I g G (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g E、I g D、またはI g A (例えば、I g A 1またはI g A 2)のアイソタイプである。

【0 0 2 7】

本発明の例示的な実施形態は、抗体 - 抗生物質複合化合物と、薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤、または賦形剤とを含む、薬学的組成物である。

【0 0 2 8】

本発明の抗W T A - A A Cは、ヒト及び獣医学的ブドウ球菌、例えば黄色ブドウ球菌、S . サプロフィチカス、及びS . シミュランス、ならびにリステリア、例えばリステリア・モノサイトゲネスを治療するために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、黄色ブドウ球菌感染症を治療するために有用である。それ故に、本発明はまた、ヒトまたは獣医学的患者におけるブドウ球菌感染症の治療方法も提供し、本方法は、患者に、治療有効量の前述の実施形態のうちのいずれか1つの抗体 - 抗生物質複合体を投与することを含む。一実施形態では、細菌感染症は、黄色ブドウ球菌感染症である。いくつかの実施形態では、患者は、黄色ブドウ球菌感染症であると診断されている。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低減することを含む。一実施形態では、治療方法は、黄色ブドウ球菌を含む細菌感染症が菌血症を引き起こす場合に、患者に施される。具体的な実施形態では、本方法は、ブドウ球菌性心内膜炎または骨髄炎を治療するために使用される。一実施形態では、抗体 - 抗生物質複合化合物は、感染患者に、約5 0 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k gの範囲内の用量で投与される。

【0 0 2 9】

上記の実施形態のうちのいずれかの抗W T A - 抗生物質複合化合物を投与することによって、宿主細胞を死滅させることなく、黄色ブドウ球菌に感染した患者のその細胞中の細胞内黄色ブドウ球菌を死滅させる方法もまた、提供される。別の方法は、生残菌を前述の実施形態のうちのいずれかのA A Cと接触させることによって、インピボで生残菌ブドウ球菌細菌細胞 (例えば黄色ブドウ球菌) を死滅させるために提供される。

【0 0 3 0】

別の実施形態では、治療方法は、第2の治療剤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の治療剤は、一般に、黄色ブドウ球菌または具体的には、M R S Aに対する抗生物質を含む抗生物質である。

10

20

30

40

50

【0031】

一実施形態では、本発明の抗体 - 抗生物質複合化合物と組み合わせて投与される第2の抗生物質は、構造的クラス：(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から選択される。

【0032】

一実施形態では、本発明の抗体 - 抗生物質複合化合物と組み合わせて投与される第2の抗生物質は、クリンダマイシン、ノボピオシン、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 (napt hyr id one)、ラデゾリド、ドキシソルピシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタピン、ダルババンシン、及びアジスロマイシンから選択される。

【0033】

本明細書においていくつかの実施形態では、感染患者における細菌負荷は、治療後に検出不能なレベルまで低減される。一実施形態では、患者の血液培養は、治療前の陽性血液培養物と比較して、治療後に陰性である。本明細書においていくつかの実施形態では、対象における細菌耐性は、検出不能または低い。本明細書においていくつかの実施形態では、対象は、メチシリンまたはバンコマイソンでの治療に対して応答しない。

【0034】

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抗壁テイコ酸 (WTA) 抗体に複合させることを含む、抗体 - 抗生物質複合体を作製するためのプロセスである。

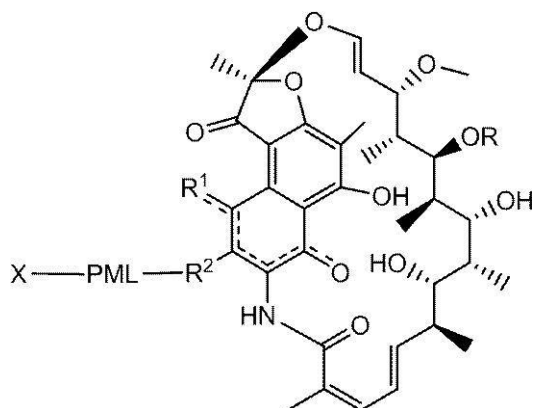
【0035】

本発明の例示的な実施形態は、細菌感染症を治療するためのキットであり、

- a) 抗体 - 抗生物質複合化合物と、薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤、または賦形剤とを含む、薬学的組成物と、
- b) 使用説明書と、を含む。

【0036】

本発明の態様は、式 I I、



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、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、式中、ヘテロシクリルが、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つ以上の基と任意に置換されるか、

または、R¹ 及び R² が、5 または 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、任意に、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を形成し、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が、任意に置換された H、F、Cl、Br、I、C₁-C₁₂ アルキル、または OH であり、

PML が、R²、または R¹ 及び R² によって形成される縮合ヘテロアリールもしくはヘテロシクリルと結合し、式、

- Str - PM - Y -

を有し、式中、Str がストレッチャー単位であり、PM がペプチドミメティック単位であり、Y が Spacer 単位である、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカーであり、

X が、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、p - トルエンスルホナート、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 - ヒドロキシスクシンイミドから選択される反応性官能基である。

【0037】

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、一部、または全てを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形成してもよ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】

【0038】

【図 1 A】MRSA の細胞内貯蔵は、インビボ及びインビトロでバンコマイソンから保護される。図 1 A は、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4 つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1 日 1 回、バンコマイソンで治療した（実施例 2 を参照されたい）。図 1 B 及び図 1 C は、それぞれ、感染から 4 日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図 1 D は、MRSA が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（ND = 検出されず）。図 1 E 及び図 1 F は、MRSA が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。MRSA（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG 63 骨芽細胞（図 1 E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC、図 1 F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの 8 時間、バンコマイソンから保護し、24 時間にわたって細胞内区画内に拡張することができた。エラーバーは、3 重のウェルに対する標準偏差を示す。

【図 1 B】MRSA の細胞内貯蔵は、インビボ及びインビトロでバンコマイソンから保護される。図 1 A は、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4 つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1 日 1 回、バンコマイソンで治療した（実施例 2 を参照されたい）。図 1 B 及び図 1 C は、それぞれ、感染から 4 日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図 1 D は、MRSA が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（ND = 検出されず）。図 1 E 及び図 1 F は、MRSA が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。MRSA（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG 63 骨芽細胞（図 1 E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC、図 1 F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの 8 時間、バンコマイソンから保護し、24 時間にわたって細胞内区画内に拡張すること

10

20

30

40

50

ができた。エラーバーは、3重のウェルに対する標準偏差を示す。

【図1C】MRSAの細胞内貯蔵は、インピボ及びインピトロでバンコマイソンから保護される。図1Aは、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1日1回、バンコマイソンで治療した（実施例2を参照されたい）。図1B及び図1Cは、それぞれ、感染から4日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図1Dは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（ND = 検出されず）。図1E及び図1Fは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。MRSA（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG63骨芽細胞（図1E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC、図1F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの8時間、バンコマイソンから保護し、24時間にわたって細胞内区画内に拡張することができた。エラーバーは、3重のウェルに対する標準偏差を示す。

10

【図1D】MRSAの細胞内貯蔵は、インピボ及びインピトロでバンコマイソンから保護される。図1Aは、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1日1回、バンコマイソンで治療した（実施例2を参照されたい）。図1B及び図1Cは、それぞれ、感染から4日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図1Dは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（ND = 検出されず）。図1E及び図1Fは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。MRSA（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG63骨芽細胞（図1E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC、図1F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの8時間、バンコマイソンから保護し、24時間にわたって細胞内区画内に拡張することができた。エラーバーは、3重のウェルに対する標準偏差を示す。

20

30

【図1E】MRSAの細胞内貯蔵は、インピボ及びインピトロでバンコマイソンから保護される。図1Aは、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1日1回、バンコマイソンで治療した（実施例2を参照されたい）。図1B及び図1Cは、それぞれ、感染から4日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図1Dは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（ND = 検出されず）。図1E及び図1Fは、MRSAが感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。MRSA（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG63骨芽細胞（図1E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC、図1F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの8時間、バンコマイソンから保護し、24時間にわたって細胞内区画内に拡張することができた。エラーバーは、3重のウェルに対する標準偏差を示す。

40

【図1F】MRSAの細胞内貯蔵は、インピボ及びインピトロでバンコマイソンから保護

50

される。図 1 A は、遊離細菌（浮遊性）対細胞内細菌を生成するための実験的設計の概略図を示す。4 つのコホートのマウスを、生存可能な遊離細菌または細胞内細菌のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ、選択された群を、感染直後、次いで、1 日 1 回、バンコマイソンで治療した（実施例 2 を参照されたい）。図 1 B 及び図 1 C は、それぞれ、感染から 4 日後に、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、アッセイのための検出の限界を示す。図 1 D は、M R S A が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンから保護される。（N D = 検出されず）。図 1 E 及び図 1 F は、M R S A が感染可能な細胞の単分子層上に培養された場合に、バンコマイソンの存在下で増殖することができることを示す。M R S A（遊離細菌）を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、M G 6 3 骨芽細胞（図 1 E）またはヒト脳微小血管内皮細胞（H B M E C、図 1 F）の単分子層上に播種した。細胞外細菌（遊離細菌）は、培地中に単独でよく増殖したが、バンコマイソンによって死滅した。哺乳動物細胞の単分子層を含むウェル（細胞内 + バンコ）において、細菌の画分を感染後の初めの 8 時間、バンコマイソンから保護し、24 時間にわたって細胞内区画内に拡張することができた。エラーバーは、3 重のウェルに対する標準偏差を示す。

10

【図 2】抗体 - 抗生物質複合体（A A C）の概念を示す。一例では、A A C 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（例えばリファログ）と結合する黄色ブドウ球菌の表面上のエピトープを対象とする抗体からなる。

【図 3】抗体 - 抗生物質複合体（A A C）についての薬物活性化の可能性のある機序を示す。A A C は、抗体の抗原結合ドメイン（F a b）を介して細胞外細菌と結合し、F c 媒介性ファゴサイトーシスを介して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 等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、加水分解し、ファゴリソソーム内で遊離抗生物質を放出する。遊離抗生物質は、同じ区画中に存在するあらゆる予め内在化した細菌と共にオプソニン化され、取り込まれた細菌を死滅させる。

20

【図 4】細胞膜を安定化し、結合部位を提供する、壁テイコ酸（W T A）、リポタイコ酸（L T A）、及びペプチドグリカン（P G N）の鞘の戯画図を用いて、黄色ブドウ球菌のようなグラム陽性細菌の細胞壁を示す。

【図 5】定義の下で詳細に記載される、壁テイコ酸（W T A）の化学構造及びグリコシル修飾を示す。

30

【図 6 A】図 6 A 及び 6 B は、実施例 3 に記載されるように、U S A 3 0 0 または W o o d 4 6 株の黄色ブドウ球菌からの細胞壁調製物との陽性 E L I S A 結合を示す m A b のライブラリーの一次スクリーニングからの A b の特徴を要約する。W T A と結合する A b のうち、4 個は、W T A アルファに特異的であり、13 個は、W T A ベータに特異的に結合する。

【図 6 B】図 6 A 及び 6 B は、実施例 3 に記載されるように、U S A 3 0 0 または W o o d 4 6 株の黄色ブドウ球菌からの細胞壁調製物との陽性 E L I S A 結合を示す m A b のライブラリーの一次スクリーニングからの A b の特徴を要約する。W T A と結合する A b のうち、4 個は、W T A アルファに特異的であり、13 個は、W T A ベータに特異的に結合する。

40

【図 7 A】感染したマウス腎臓から直接単離された M R S A における A l e x a - 4 8 8 で標識された抗 - G l c N A C W T A または抗 - G l c N A C W T A 抗体の滴定を示す。抗 - C M V - g D 抗体は、抗体アイソタイプ対照としての役割を果たした。

【図 7 B】A A C を生成するために使用された抗体がグリコシルトランスフェラーゼ T a r S によって媒介される壁テイコ酸におけるエピトープを認識することを示す。W t U S A 3 0 0、U S A 3 0 0 - T a r M、または U S A 3 0 0 - T a r S における抗 - G l c N A C W T A 抗体またはアイソタイプ対照を用いた F A C S 分析。

【図 8】複製しない M R S A 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（リファログ）ジメチルピブ B O R の選択を示す。

50

【図 9】無傷 T A C (A A C の形態) が、抗生物質をカテプシン B による処理により放出しない限り、浮遊性細菌を死滅させないことを実証する増殖阻害アッセイ。T A C を、緩衝液のみ (白抜き丸) でインキュベートするか、またはカテプシン B (黒丸) で処理した。無傷 T A C は、一晚インキュベーション後に細菌増殖を保護することができなかった。カテプシン B による T A C の前処理は、十分な抗生物質活性を放出し、 $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ の T A C で細菌成長を阻止し、これは、 $0.006 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗生物質を含有することが予測される。

【図 10 A】実施例 10 に記載される、裸抗体と比較して、感染した器官内の細菌数が大幅に低減または根絶した抗 W T A - P M L A A C による黄色ブドウ球菌に感染したマウスの処置を示す。図 10 A は、実施例 10 に記載される、実験及び注射時点のタイムラインを示す概略図である。図 10 B は、表 3 からの A A C (D A R 2) による処置が腎臓において細菌負荷を約 7,000 倍低減したことを示す。図 10 C は、A A C (D A R 2) による処理が心臓において細菌負荷を約 500 倍低減したことを示す。

10

【図 10 B - C】実施例 10 に記載される、裸抗体と比較して、感染した器官内の細菌数が大幅に低減または根絶した抗 W T A - P M L A A C による黄色ブドウ球菌に感染したマウスの処置を示す。図 10 A は、実施例 10 に記載される、実験及び注射時点のタイムラインを示す概略図である。図 10 B は、表 3 からの A A C (D A R 2) による処置が腎臓において細菌負荷を約 7,000 倍低減したことを示す。図 10 C は、A A C (D A R 2) による処理が心臓において細菌負荷を約 500 倍低減したことを示す。

【図 11 A】4 つのヒト抗 W T A アルファ抗体、4461、4624、4399、6267 (記載する順にそれぞれ配列番号 25、27、29、及び 31) の軽鎖可変領域 (V L) のアミノ酸配列アラインメントを提供する。K a b a t 番号付けに従う C D R 配列 C D R L 1、L 2、及び L 3 に下線を付す。

20

【図 11 B】図 11 A の 4 つのヒト抗 W T A アルファ抗体の重鎖可変領域 (V H) のアミノ酸配列アラインメントを示す。K a b a t 番号付けに従う C D R 配列 C D R H 1、H 2、及び H 3 に下線を付す (記載する順にそれぞれ配列番号 26、28、30、及び 32)。

【図 12】13 個のヒト抗 W T A ベータ抗体の L 及び H 鎖の C D R 配列 (配列番号 33 ~ 110) を示す。

【図 13 A - 1】図 13 A - 1 及び 13 A - 2 は、抗 W T A ベータ A b 6078 (非修飾) 及びその変異体 v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号 113、113、115、113、115、113、115、及び 115) の完全長 L 鎖 (軽鎖) のアラインメントを示す。K a b a t 番号付けに従う C D R 配列 C D R L 1、L 2、及び L 3 に下線を付す。箱は、K a b a t 及び C h o t h i a に従う接触残基及び C D R 残基を示す。操作された C y s を含む L 鎖変異体は、定常領域の端付近の黒い箱の中の C (この場合、E U 残基第 205 番) で示される。変異体の命名、例えば v 2 L C - C y s は、L 鎖中に操作された C y s を含む変異体 2 を意味する。H C L C - C y s は、H 及び L 鎖のそれぞれが操作された C y s を含むことを意味する。変異体 2、3、及び 4 は、図 13 B に示される、H 鎖の初めの変更を有する。

30

【図 13 A - 2】図 13 A - 1 及び 13 A - 2 は、抗 W T A ベータ A b 6078 (非修飾) 及びその変異体 v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号 113、113、115、113、115、113、115、及び 115) の完全長 L 鎖 (軽鎖) のアラインメントを示す。K a b a t 番号付けに従う C D R 配列 C D R L 1、L 2、及び L 3 に下線を付す。箱は、K a b a t 及び C h o t h i a に従う接触残基及び C D R 残基を示す。操作された C y s を含む L 鎖変異体は、定常領域の端付近の黒い箱の中の C (この場合、E U 残基第 205 番) で示される。変異体の命名、例えば v 2 L C - C y s は、L 鎖中に操作された C y s を含む変異体 2 を意味する。H C L C - C y s は、H 及び L 鎖のそれぞれが操作された C y s を含むことを意味する。変異体 2、3、及び 4 は、図 13 B に示される、H 鎖の初めの変更を有する。

40

【図 13 B - 1】図 13 B - 1、13 B - 2、13 B - 3、13 B - 4 は、H 鎖の初めの

50

変更を有する抗W T AベータA b 6 0 7 8 (非修飾)及びその変異体v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号1 1 4、1 3 9 ~ 1 4 4、及び1 4 3)の完全長H鎖(重鎖)のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 3 B - 2】図1 3 B - 1、1 3 B - 2、1 3 B - 3、1 3 B - 4は、H鎖の初めの変更を有する抗W T AベータA b 6 0 7 8 (非修飾)及びその変異体v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号1 1 4、1 3 9 ~ 1 4 4、及び1 4 3)の完全長H鎖(重鎖)のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 3 B - 3】図1 3 B - 1、1 3 B - 2、1 3 B - 3、1 3 B - 4は、H鎖の初めの変更を有する抗W T AベータA b 6 0 7 8 (非修飾)及びその変異体v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号1 1 4、1 3 9 ~ 1 4 4、及び1 4 3)の完全長H鎖(重鎖)のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 3 B - 4】図1 3 B - 1、1 3 B - 2、1 3 B - 3、1 3 B - 4は、H鎖の初めの変更を有する抗W T AベータA b 6 0 7 8 (非修飾)及びその変異体v 2、v 3、v 4 (記載する順にそれぞれ配列番号1 1 4、1 3 9 ~ 1 4 4、及び1 4 3)の完全長H鎖(重鎖)のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 4 A - 1】図1 4 A - 1及び1 4 A - 2は、抗W T AベータA b 4 4 9 7 (非修飾)及びC y s操作L鎖(表示の順にそれぞれ配列番号1 2 1、1 2 3、1 4 5、及び1 4 5)の完全長L鎖のアラインメントを示す。K a b a t番号付けに従うC D R配列C D R L 1、L 2、及びL 3に下線を付す。箱は、K a b a t及びC h o t h i aに従う接触残基及びC D R残基を示す。操作されたC y sを含むL鎖変異体は、定常領域の端付近の点線の箱の中のC(この場合、E U残基第2 0 5番)で示される。

【図1 4 A - 2】図1 4 A - 1及び1 4 A - 2は、抗W T AベータA b 4 4 9 7 (非修飾)及びC y s操作L鎖(表示の順にそれぞれ配列番号1 2 1、1 2 3、1 4 5、及び1 4 5)の完全長L鎖のアラインメントを示す。K a b a t番号付けに従うC D R配列C D R L 1、L 2、及びL 3に下線を付す。箱は、K a b a t及びC h o t h i aに従う接触残基及びC D R残基を示す。操作されたC y sを含むL鎖変異体は、定常領域の端付近の点線の箱の中のC(この場合、E U残基第2 0 5番)で示される。

【図1 4 B - 1】図1 4 B - 1、1 4 B - 2、1 4 B - 3は、抗W T AベータA b 4 4 9 7 (非修飾)及びC D R H 3の9 6位にてDがEに改変され、操作されたC y sを有するかまたは有さないそのv 8変異体(表示の順にそれぞれ配列番号1 4 6 ~ 1 4 7、1 5 7、及び1 4 7)の完全長H鎖のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 4 B - 2】図1 4 B - 1、1 4 B - 2、1 4 B - 3は、抗W T AベータA b 4 4 9 7 (非修飾)及びC D R H 3の9 6位にてDがEに改変され、操作されたC y sを有するかまたは有さないそのv 8変異体(表示の順にそれぞれ配列番号1 4 6 ~ 1 4 7、1 5 7、及び1 4 7)の完全長H鎖のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 4 B - 3】図1 4 B - 1、1 4 B - 2、1 4 B - 3は、抗W T AベータA b 4 4 9 7 (非修飾)及びC D R H 3の9 6位にてDがEに改変され、操作されたC y sを有するかまたは有さないそのv 8変異体(表示の順にそれぞれ配列番号1 4 6 ~ 1 4 7、1 5 7、及び1 4 7)の完全長H鎖のアラインメントを示す。操作されたC y sを含むH鎖変異体は、定常領域の開始の黒い箱の中のC(この場合、E U残基第1 1 8番)で示される。

【図1 5 A - 1】図1 5 A - 1、1 5 A - 2、1 5 A - 3は、1 3個のヒト抗W T Aベータ

10

20

30

40

50

タ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 113、158～167、121、及び 168）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VL）は、Kabat アミノ酸 1 位～107 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR L1、L2、及び L3 に下線を付す。

【図 15A-2】図 15A-1、15A-2、15A-3 は、13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 113、158～167、121、及び 168）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VL）は、Kabat アミノ酸 1 位～107 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR L1、L2、及び L3 に下線を付す。

【図 15A-3】図 15A-1、15A-2、15A-3 は、13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 113、158～167、121、及び 168）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VL）は、Kabat アミノ酸 1 位～107 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR L1、L2、及び L3 に下線を付す。

【図 15B-1】図 15B-1～15B-6 は、図 15A-1、15A-2、15A-3 の 13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 114、169～176、133～134、138、及び 127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabat アミノ酸 1 位～113 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR H1、H2、H3 に下線を付す。アスタリスクで印をつけた H 鎖 Eu118 位は、薬物複合のために Cys に変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化または N-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図 15B-2】図 15B-1～15B-6 は、図 15A-1、15A-2、15A-3 の 13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 114、169～176、133～134、138、及び 127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabat アミノ酸 1 位～113 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR H1、H2、H3 に下線を付す。アスタリスクで印をつけた H 鎖 Eu118 位は、薬物複合のために Cys に変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化または N-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図 15B-3】図 15B-1～15B-6 は、図 15A-1、15A-2、15A-3 の 13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 114、169～176、133～134、138、及び 127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabat アミノ酸 1 位～113 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR H1、H2、H3 に下線を付す。アスタリスクで印をつけた H 鎖 Eu118 位は、薬物複合のために Cys に変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化または N-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図 15B-4】図 15B-1～15B-6 は、図 15A-1、15A-2、15A-3 の 13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 114、169～176、133～134、138、及び 127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabat アミノ酸 1 位～113 位にわたる。Kabat 番号付けに従う CDR 配列 CDR H1、H2、H3 に下線を付す。アスタリスクで印をつけた H 鎖 Eu118 位は、薬物複合のために Cys に変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化または N-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図 15B-5】図 15B-1～15B-6 は、図 15A-1、15A-2、15A-3 の 13 個のヒト抗 WTA ベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号 114、169～176、133～134、138、及び 127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabat アミノ酸 1 位～113 位にわたる。Kabat

番号付けに従うCDR配列CDR H1、H2、H3に下線を付す。アスタリスクで印をつけたH鎖Eu118位は、薬物複合のためにCysに変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化またはN-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図15B-6】図15B-1～15B-6は、図15A-1、15A-2、15A-3の13個のヒト抗WTAベータ抗体（表示の順にそれぞれ配列番号114、169～176、133～134、138、及び127）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（VH）は、Kabataアミノ酸1位～113位にわたる。Kabata番号付けに従うCDR配列CDR H1、H2、H3に下線を付す。アスタリスクで印をつけたH鎖Eu118位は、薬物複合のためにCysに変更することができる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化またはN-結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

10

【図16】強調したアミノ酸位置におけるAb4497及びその突然変異体の比較、ならびにELISAにより試験されるそれらの相対的抗原結合強を示す。図16は、表示の順にそれぞれ配列番号177、177、177、178、178、179、179、180、180、及び180を開示している。

【図17】50mg/kgの遊離抗体での前処置が静脈内感染モデルにおいて有効でないことを示す。Balb/cマウスに、単回用量のビヒクル対照（PBS）または50mg/kgの抗体を静脈内注射により与えた30分後に、 2×10^7 CFUのUSA300に感染させた。処置群は、黄色ブドウ球菌と結合しないアイソタイプ対照抗体（gD）、細胞壁タイコ酸のベータ修飾に対する抗体（4497）、または細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対する抗体（7578）を含んだ。対照マウスに、110mg/kgのバンコマイシンでの処置を腹腔内注射により（Vanco）1日2回与えた。

20

【発明を実施するための形態】

【0039】

これより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ている。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ともに説明されているが、かかる説明は、非限定なものであり、それらが一般的に知られている、または本明細書に組み込まれているかどうかにかかわらず、本発明は、全ての代替物、改変物、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理解するであろう。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。

30

【0040】

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援用される。

40

【0041】

I. 一般的技法

本明細書において記載されるか、または参照される技法及び手順は、当業者によって一般に十分に理解され、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)), the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2

50

: 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. Miller 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等を使用して、一般的に用いられる。

【0042】

本出願で用いる命名法は、そうでないと示さない限り、IUPAC系統的命名法に基づく。そうでないと定義しない限り、本明細書で用いる技術的及び科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有し、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と一貫している。

【0043】

II. 定義

「抗体抗生物質複合体」またはAACは、リンカーによって抗生物質に化学的に結合し

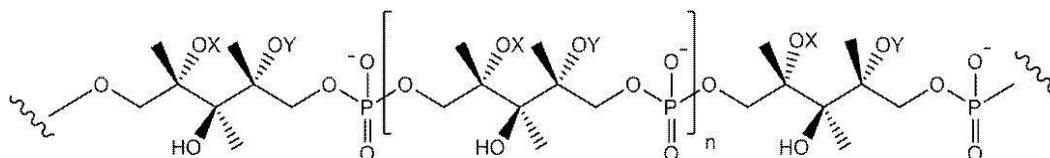
た抗体からなる化合物である。抗体は、細菌表面上の抗原またはエピトープ、例えば、細菌性細胞壁構成成分と結合する。本発明に使用される場合、リンカーは、ほとんどの哺乳動物の細胞タイプに見出される、カテプシンB、リソソームプロテアーゼを含む、プロテアーゼによって切断されるように設計されるプロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカーである (Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13 : 855 - 869)。その3構成成分を用いたAACのダイアグラムを図2に示す。「THIOMAB (商標) 抗生物質複合体」または「TAC」は、抗体が1つ以上のシステイン、概して、抗原結合機能を妨げない抗体上の特異的部位 (複数を含む) で抗体に組み換え操作されたシステインを介してリンカー - 抗生物質単位に化学的に共役されるAACの形態である。

10

【0044】

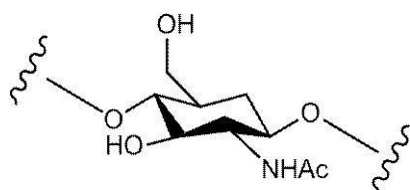
「壁テイコ酸」(WTA)は、ペプチドグリカンに、ホスホジエステル結合を介して、N - アセチルムラミン酸糖のC6ヒドロキシルに共有結合しているアニオン性糖重合体を意味する。厳密な化学構造は生物体間で変動することができるが、一実施形態では、WTAは、2位のD - リビトール及びD - アラニルエステルと4位のグリコシル置換基との1, 5 - ホスホジエステル結合の反復単位を有するリビトールタイコ酸である。グリコシル基は、黄色ブドウ球菌株に存在するような、N - アセチルグリコサミニル (アルファ) または (ベータ) であってもよい。アルジトール / 糖アルコールリン酸反復上のヒドロキシルは、カチオン性D - アラニンエステル及び単糖類、例えば、N - アセチルグルコサミンで置換される。一態様では、ヒドロキシル置換基は、D - アラニル及びアルファ () またはベータ () GlcNAcを含む。ある特定の態様では、WTAは、式：

20



(式中、波線は、反復結合単位またはポリアルジトール - Pもしくはペプチドグリカンの結合部位を示し、XはD - アラニルまたは - Hであり、Yは (アルファ) - GlcNAcまたは (ベータ) - GlcNAcである) の化合物を含む。

【0045】



GlcNAc

黄色ブドウ球菌株では、WTAは、N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) - 1 - P及びN - アセチルマンノースアミン (ManNAc) からなる二糖類を介してN - アセチルムラミン酸 (MurNAc) の6 - OHと共有結合し、その後に2または3単位のグリセロール - リン酸塩が続く。次いで、実際のWTAポリマーは、11 - 40のリビトール - リン酸塩 (Rbo - P) 反復単位からなる。WTAの段階的合成は、まず、TagOと呼ばれる酵素によって開始され、(遺伝子の人工的欠失により) TagO遺伝子を欠く黄色ブドウ球菌株は、いかなるWTAも作らない。反復単位は、C2 - OHにてD - アラニン (D - Ala) 及び / またはC4 - OH位にてN - アセチルグルコサミン (GlcNAc) で、 - (アルファ) または - (ベータ) グリコシド結合を介してさらに調整することができる。黄色ブドウ球菌株または細菌の成長期に応じて、グリコシド結合は、 - 、 - 、または2つのアノマーの混合物であり得る。

40

【0046】

本明細書で使用される場合、「WTA抗体」という用語は、WTAアルファであろうとWTAベータであろうとWTAと結合する任意の抗体を指す。「抗壁テイコ酸アルファ抗体」または「抗WTAアルファ抗体」または「抗 WTA」または「抗 GlcNAc

50

「W T A 抗体」は、壁テイコ酸 (W T A) アルファと特異的に結合する抗体を指すように同義で使用される。同様に、「抗壁テイコ酸ベータ抗体」または「抗 W T A ベータ抗体」または「抗 W T A 」または「抗 G l c N a c W T A 抗体」という用語は、壁テイコ酸 (W T A) ベータと特異的に結合する抗体を指すように同義で使用される。

【 0 0 4 7 】

「抗生物質」 (a b x または A b x) は、細菌のような微生物の成長を特異的に阻害または死滅させるが、投与される濃度及び投与間隔で宿主にとって致死的でない任意の分子を含む。ある特定の態様では、抗生物質は、投与される濃度及び投与間隔で宿主にとって毒性でない。細菌に対して効果的な抗生物質は、殺菌性 (すなわち直接死滅させる) または静菌性 (すなわち分裂を妨げる) のいずれかに広く分類することができる。抗殺菌性抗生物質は、狭域スペクトルまたは広域スペクトルとしてさらに再分類することができる。より小さい範囲または特定の細菌のファミリーに対して効果的である狭域スペクトル抗生物質とは対照的に、広域スペクトル抗生物質は、グラム陽性及びグラム陰性細菌を含む広い範囲の細菌に対して効果的であるものである。抗生物質の例としては、例えば (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、 (i i) 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、 (i i i) カルバセフェム、例えばロラカルベフ、 (i v) 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、 (v i) セファロスポリン (第 2 世代) 、例えばセフラクロール、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、 (v i i) 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、セフトジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、 (v i i i) セファロスポリン (第 4 世代) 、例えばセフェピム、 (v i i i i) セファロスポリン (第 5 世代) 、例えばセフトビプロール、 (i x) 糖ペプチド、例えばテイコブラニン、バンコマイシン、 (x) マクロライド、例えばアジスロマイシン、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、 (x i) モノバクタム、例えばアズトレオナム、 (x i i) ペニシリン、例えばアモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、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、ピペラシリン、チカルシリン、 (x i i i) 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 、 (x i v) 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、 (x v) スルホンアミド、例えばマフェニド、プロントシル、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、スルファイソキサゾール、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 (T M P - S M X) 、 (x v i) 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、ならびに (x v i i) その他のもの、例えばアルスフェナミン、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が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

一言でいえば、黄色ブドウ球菌は、本明細書では、 S t a p h A または S . アウレウスとも称される。あるいは、多剤耐性黄色ブドウ球菌またはオキサシリン耐性黄色ブドウ球菌 (O R S A) としても知られる「メチシリン耐性黄色ブドウ球菌」 (M R S A) という用語は、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

10

20

30

40

50

ン等)及びセファロスポリンを含むベータラクタム抗生物質に対して耐性である黄色ブドウ球菌の任意の株を指す。「メチシリン感受性黄色ブドウ球菌」(MSSA)は、ベータラクタム抗生物質に感受性である黄色ブドウ球菌の任意の株を指す。

【0049】

「抗Staph a抗体」及び「Staph aに結合する抗体」という用語は、抗体が診断剤及び/または治療剤としてS. aureusを標的とすることに有用となるような十分な親和性で黄色ブドウ球菌(「S. アウレウス」)における抗原と結合することができる抗体を指す。一実施形態では、無関係の非Staph aタンパク質との抗Staph a抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される場合に、MRSAとの抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、Staph aに結合する抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、4 nM以下、3 nM以下、2 nM以下、1 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、または0.001 nM以下(例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M ~ 10^{-13} M、例えば 10^{-9} M ~ 10^{-13} M)の解離定数(Kd)を有する。ある特定の実施形態では、抗Staph a抗体は、異なる種に由来するStaph間で保存されているStaph aのエピトープに結合する。

【0050】

「最小阻止濃度」(「MIC」)という用語は、終夜のインキュベーションの後に微生物の目視可能な成長を阻害するであろう抗生物質の最低濃度のことを指す。MICを決定するためのアッセイは、知られている。1つの方法は以下の実施例の項に記載される通りである。

【0051】

本明細書における「抗体」という用語は、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、多重特異的抗体(例えば、二重特異的抗体)、及びその抗原結合抗体断片を対象としている(Miller et al (2003) J. of Immunology 170: 4854-4861)。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラであってもよいが、または他の種に由来するものであってもよい。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、免疫系によって作製されるタンパク質である(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エピトープとも呼ばれる多数の結合部位を有する。異なるエピトープに特異的に結合するそれぞれの抗体は、異なる構造を有する。したがって、1つの抗原は、1つより多い対応する抗体によって認識され、結合することができる。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、目的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、そのような標的としては、癌細胞、または自己免疫疾患と関連する自己免疫抗体を生成する細胞、感染細胞、もしくは細菌等の微生物が含まれるが、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以外の任意のアイソタイプ(例えばIgG、IgE、IgD、及びIgA)ならびにサブクラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)のものであり得る。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、またはウサギの起源のものである。具体的な実施形態では、Igは、ヒト起源のものである。

【0052】

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。5つの主要なクラスの抗体(IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM)が存在し、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にさらに分けることができる。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、

、及び μ と呼ばれる。

【0053】

「天然抗体」は、様々な構造を有する、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然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)と、その後に3つの定常ドメイン(CH1、CH2、及びCH3)とを有する。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)と、その後に定常軽(CL)ドメインと

10

【0054】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書で、天然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同義に使用される。

【0055】

抗体の「抗原結合断片」は、無傷抗体が結合する抗原に結合する、無傷抗体の一部を含む無傷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、直鎖抗体、単鎖抗体分子(例えばscFv)、及び抗体断片から形成される多特異的抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0056】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を含む個々の抗体は、例えば、天然に存在する突然変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の生成中に生じる(例えばグリコシル化における天然の変動)可能性のある変異体抗体(このような変異体は一般に少量で存在する)を除いて、同一であり、かつ/または同じエпитープに結合する。IgG1抗体についての1つのこのような可能性のある変異体は、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питープ)に対す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の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って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有する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、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載されている。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。

30

【0057】

「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、重鎖及び/または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

40

【0058】

「ヒト抗体」は、ヒトも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を利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。このヒト抗体の定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0059】

「ヒト化抗体」は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来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、

50

典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、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、任意に、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よい。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。

【0060】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然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、K 10
indt et al. Kuby Immunology, 6th ed. T^H, W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。単一のVHまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のVHまたはVLドメインを使用し、それぞれ、相補的VLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングして、単離してもよい。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150: 880 - 887 (1993)、Clarkson et al., Nature 352: 624 - 628 (1991)を参照されたい。

【0061】

「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列が超可変であり（「相補性決定領域」または「CDR」）、かつ／または構造的に規定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）を含む、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（H 20
1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。天然抗体では、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、抗体への好適な特異性を与え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、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ抗体は、軽鎖の不在下で機能的かつ安定である（Hamers - Casterman et al., (1993) Nature 363: 446 - 448、Sheriff et al., (1996) Nature Struct. Biol. 3: 733 - 736)。

【0062】

ある数のHVR描写が本明細書で使用され、ここに含まれる。Kabatt相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づき、最も一般的に使用されているものである（Kab 40
at 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、構造ループの場所を指す（Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196: 901 - 917）。抗原接触については、MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)を参照されたい。AbM HVRは、Kabatt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の各々に由来する残基を以下に記載する。

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 付番)
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 付番)
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

【 0 0 6 3 】

H V R は、次のような「延長 H V R」を含み得る。V L における 2 4 - 3 6 または 2 4 - 3 4 (L 1)、4 6 - 5 6 または 5 0 - 5 6 (L 2)、及び 8 9 - 9 7 または 8 9 - 9 6 (L 3)、ならびに V H における 2 6 - 3 5 (H 1)、5 0 - 6 5 または 4 9 - 6 5 (H 2)、及び 9 3 - 1 0 2、9 4 - 1 0 2、または 9 5 - 1 0 2 (H 3)。別途指定されない限り、可変ドメインにおける H V R 残基、C D R 残基、及び他の残基（例えば、F R 残基）は、本明細書において上記の K a b a t らに従って付番される。

【 0 0 6 4 】

「K a b a t にあるような可変ドメイン残基付番」または「K a b a t にあるようなアミノ酸位置付番」という表現、及びそれらの変形形態は、K a b a t 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付番方式を指す。この付番システムを使用して、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインの F R または H V R の短縮またはそれへの挿入に対応するより少ないアミノ酸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、H 2 の残基 5 2 後に単一のアミノ酸挿入（K a b a t に従って残基 5 2 a）を、そして重鎖 F R 残基 8 2 後に挿入された残基（例えば、K a b a t に従って残基 8 2 a、8 2 b、及び 8 2 c 等）を含んでもよい。残基の K a b a t 付番は、所与の抗体について、抗体の配列の相同性の領域を「標準」の K a b a t によって付番される配列とアラインメントすることによって決定してもよい。

【 0 0 6 5 】

「フレームワーク」または「F R」は、超可変領域（H V R）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインの F R は、一般に、4 つの F R ドメイン：F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4 からなる。したがって、H V R 及び F R 配列は、一般に、V H（または V L）において次の配列、F R 1 - H 1 (L 1) - F R 2 - H 2 (L 2) - F R 3 - H 3 (L 3) - F R 4 で出現する。

【 0 0 6 6 】

本明細書の目的のための「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（V L）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（V H）フレ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んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、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において

10

20

30

40

50

、V Lアクセプターヒトフレームワークの配列は、V L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同一である。

【0067】

「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V LまたはV H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V LまたはV H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列の下位群は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3におけるようなサブグループである。一実施形態において、V Lについて、サブグループは、上記のKabatらにあるようなサブグループカッパIである。一実施形態において、V Hについて、サブグループは、上記のKabatらにあるようなサブグループI I Iである。

【0068】

本明細書における「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異体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びると定義される。Fc領域のC末端リジン(EUインデックスとも呼ばれる、EU付番方式によると残基447、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載される通り)は、例えば、抗体の産生もしくは精製の際に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え操作することによって、除去されてもよい。したがって、無傷抗体の組成物は、全K447残基が除去された抗体集団、除去されたK447残基がない抗体集団、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んでもよい。「Fc受容体」または「FcR」という用語にはまた、胎児への母体IgGの移入を担う、新生児型受容体であるFcRnも含まれる。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)、WO2004/92219(Hintonら)を参照されたい)。ヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドのインビボでのFcRnへの結合及び血清中半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトヒト細胞株において、または変異体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体を記載している。また、例えば、Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい。

【0069】

「親和性成熟」抗体は、変化を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、かかる変化によって抗原に対する抗体の親和性を改善する、抗体を指す。

【0070】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

【0071】

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、参照抗体が

10

20

30

40

50

その抗原に結合するのを50%以上遮断する抗体、及び逆に、競合アッセイにおいて、抗体がその抗原に結合するのを50%以上遮断する参照抗体を指す。例示的な競合アッセイが本明細書に提供される。

【0072】

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識に複合されていない抗体を指す。裸の抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0073】

「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(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、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。

【0074】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」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）上に存在するFc受容体(FcR)と結合した分泌Igが、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と特異的に結合して、続いて細胞毒を用いて標的細胞を死滅させることができるようにする細胞傷害性の形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞で「武装」し、この機序により標的細胞を死滅させるために必要である。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fc(ガンマ)RIIIのみを発現するが、単球は、Fc(ガンマ)RI、Fc(ガンマ)RII、及びFc(ガンマ)RIIIを発現する。造血細胞上のFc発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、US5,500,362またはUS5,821,337に記載されるようなインビトロADCCアッセイを行ってもよい。このようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al., *PNAS USA* 95: 652-656 (1998)に開示されるような、動物モデルで評価してもよい。

【0075】

「食作用」は、宿主細胞（例えばマクロファージまたは好中球）により病原体が飲み込まれるか、または内部移行されるプロセスを指す。食細胞は、3つの経路により食作用を媒介する：(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)補体増強 - 補体でオプソニン化した病原体と結合してそれを摂食する補体受容体(C3b、CR3及びCR4についての受容体CRIを含む)を用いる、及び(iii)抗体増強 - 抗体でオプソニン化した粒子（これは、次いで内部移行され、リソソームと融合してファゴリソソームになる）と結合するFc受容体(FcガンマRI、FcガンマRIIA、及びFcガンマRIIIAを含む)を用いる。本発明では、経路(iii)が感染白血球、例えば好中球及びマクロファージへの抗MRSA AAC治療剤の送達において重要な役割を果たすと考えられる(Phagocytosis of Microbes: complexity in Action by D. Underhill and A. Ozinsky, (2002) *Annual Review of Immunology*, Vol 20: 825)。

【0076】

「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系の第1成分(C1q)が(適当なサブクラスの)抗体と結合することにより開始され、該抗体にはそれらの同族抗原が結合する。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)に記載されるような、CDCアッセイを行ってもよい。

【0077】

Fc領域と結合している炭水化物は、改変してもよい。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、分岐した二分岐オリゴ糖を含み、これは、概して、N-結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される。例えば、Wrightら(1997) TIBTECH 15:26-32を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、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「幹」中のGlcNAcと結合したフコースを含んでもよい。いくつかの実施形態では、IgG中のオリゴ糖の修飾は、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てもよい。例えば、Fc領域と(直接的または間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体修飾をもたらす。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., J. Mol. 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株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損した13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986)、米国特許出願公開番号2003/0157108 Al、Presta, L、及びWO2004/056312 Al、Adams et al., 特に実施例11における)、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細胞等のノックアウト細胞株(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。

【0078】

「単離抗体」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(例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動法(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、イオン交換もしくは逆相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。抗体純度の評価のための方法の概説に関して、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87(2007)を参照されたい。

【0079】

「単離核酸」は、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子であるが、その核酸分子が、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【0080】

「抗WTAベータ抗体をコードする単離核酸」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けるかかる核酸分子(複数可)が含まれ、かかる核酸分子(複数可)は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0081】

本明細書で使用されるとき、「に特異的に結合する」または「に対して特異的」である

という用語は、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ものである、標的と抗体との間の結合等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、W T A - ベータと無関係の標的との結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（R I A）により測定される、標的との抗体の結合の約 10 % 未満である。ある特定の実施形態では、W T A ベータと特異的に結合する抗体は、1 μ M 以下、100 nM 以下、10 nM 以下、1 nM 以下、または 0.1 nM 以下の解離定数（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たエピトープと特異的に結合する。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、それを必要とはしない。

10

【0082】

「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば抗体）の単一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的相互作用の合計の強度を指す。別途指定されない限り、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、抗体及び抗原）間の 1 : 1 の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子 X の、そのパートナー Y についての親和性は、一般的に、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、一般的に、抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向にあるが、高親和性抗体は、一般的に、抗原と迅速に結合し、より長く結合したままの傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法が当該技術分野で知られており、本発明の目的のためにこれらのいずれも用いることができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的説明及び例示的な実施形態が、以下に記載される。

20

【0083】

一実施形態では、本発明に従う「K d」または「K d 値」は、以下のアッセイにより説明されるように、目的の抗体の F a b バージョンとその抗原とを用いて行われる放射性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、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の（ 125 I）標識抗原と F a b を平衡化し、次いで、抗 F a b 抗体コーティングプレートで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., (1999) J. Mol. Biol. 293 : 865 - 881）。アッセイのため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）中の 5 μ g / ml の捕捉抗 F a b 抗体（Cappel Labs）で終夜コーティングし、その後、P B S 中の 2 %（w / v）ウシ血清アルブミンで 2 ~ 5 時間室温（約 23 °C）でブロックする。非吸着プレート（Nunc # 269620）中に、100 pM または 26 pM の [125 I] - 抗原を、目的の F a b の系列希釈（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57 : 4593 - 4599 (1997)）における、抗 V E G F 抗体 F a b - 12 の評価と一致）と混合する。目的の F a b を次いで一晚インキュベートするが、インキュベーションは、確実に平衡に到達させるために、より長い期間（例えば、約 65 時間）継続してもよい。その後、混合物を、室温での（例えば、1 時間にわたる）インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、P B S 中 0.1 % の T W E E N - 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 μ l / ウェルの閃光物質（M I C R O S C I N T - 20（商標）、Packard）を添加し、プレートを T O P C O U N T（商標）ガンマカウンタ（Packard）により 10 分間計数する。最大結合の 20 % 以下をもたらす各 F a b の濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。

30

40

【0084】

別の実施形態によれば、K d は、B I A C O R E（登録商標）2000 または B I A C O R E（登録商標）3000 装置（B I A c o r e, Inc., Piscataway, NJ）を用いる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（R

50

U)で固定化された抗原CM5チップを用いて測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ(CM5、BIAcore Inc.)を、供給業者の指示に従って、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-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を用いて活性化させる。抗原を10 mMの酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/mL(約0.2 µM)まで希釈した後、カップリングされたタンパク質のおよそ10 応答単位(RU)を達成するように、5 µL/分の流速で注射する。抗原の注射後、1 Mのエタノールアミンを注射して、未反応の基をブロックする。動態測定については、Fabの2 倍段階希釈液(0.78 nM~500 nM)を、0.05%TWEEN-20(商標)界面活性剤を含むPBS(PBST)に、25 で、およそ25 µL/分の流速で注射する。会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})は、会合及び解離のセンサーグラムを同時に適合させることにより、単純一対一ラングミュア結合モデル(BIAcore(登録商標)評価ソフトウェアバージョン3.2)を使用して計算される。平衡状態解離定数(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り結合速度が $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、結合速度は、ストップフローを備えた分光光度計(Aviv Instruments)または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO(商標)分光光度計(Thermo Spectronic)等の分光計で測定される、増加濃度の抗原の存在下で、pH 7.2のPBS中、25 における、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光発光強度(励起=295 nM、発光=340 nM、16 nMの帯域通過)における増加または減少を測定する蛍光消光技術を使用することにより、決定され得る。

【0085】

本発明による「結合速度(on-rate)」、「会合の速度」、「会合速度」、または「 k_{on} 」はまた、BIACORE(登録商標)2000またはBIACORE(登録商標)3000システム(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いて上記のように決定することもできる。

【0086】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、同義に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、親細胞と完全に同一の核酸含量でない場合があるが、突然変異を含んでもよい。元の形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【0087】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結し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及び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、動作可能に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

【0088】

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のに必要な場合はギャップを導入した後に、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、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等の、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、当該技術分野における技術の範囲内の種々の方式で達成することができる。当業者は、比較する配列の完全長にわたる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、

10

20

30

40

50

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に、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.により著され、ソースコードは、米国著作権局、Washington D.C.、20559においてユーザ文書と共にファイルされており、U.S.著作権第TXU510087号の下で登録されている。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、変更されない。

10

【0089】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が用いられる場合、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比した、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%（代替的に、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比したある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、またはそれを含む、所与のアミノ酸配列Aと表現され得る）は、次のように算出される。分数 X/Y の100倍（式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのA及びBのアライメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%とは等しくはならないことが理解されよう。特に別途定めのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、記載されるように得られる。

20

【0090】

「リファマイシン型抗生物質」という用語は、リファマイシンの構造またはリファマイシン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】

「リファラジル型抗生物質」という用語は、リファラジルの構造またはリファラジル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。

【0092】

置換基の数を示す場合、「1つ以上」という用語は、1つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち1つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲を指す。「置換基」という用語は、親分子の水素原子を置き換える原子または原子団を示す。「置換された」という用語は、明記された基が1つ以上の置換基を担持することを示す。いずれの基も複数の置換基を有することができ、多様な可能性のある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。「非置換の」という用語は、明記された基が置換基を担持しないことを意味する。「任意に置換された」という用語は、明記された基が置換されていないか、または可能性のある置換基の群から独立して選択される1つ以上の置換基で置換されることを意味する。置換基の数を示す場合、「1つ以上」という用語は、1つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち1つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲を意味する。

30

40

【0093】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、1～12個の炭素原子($C_1 - C_{12}$)の飽和した直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルキルラジカルは、以下に記載する1つ以上の置換基で、独立して置換されていてもよい。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

50

- 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 - オクチル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

本明細書で使用される「アルキレン」という用語は、1 ~ 12 個の炭素原子 ($C_1 - C_{12}$) の飽和した直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルキレンラジカルは、任意に、以下に記載する 1 つ以上の置換基で、独立して置換されていてもよい。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 ($-CH_2CH_2CH_2-$) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

「アルケニル」という用語は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素 sp^2 二重結合を有する 2 ~ 8 個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルケニルラジカルは、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、またはあるいは「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 ($-CH_2CH=CH_2$) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

「アルケニレン」という用語は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素 sp^2 二重結合を有する 2 ~ 8 個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルケニレンラジカルは、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、またはあるいは「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 ($-CH_2CH=CH-$) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0097】

「アルキニル」という用語は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素 sp 三重結合を有する 2 ~ 8 個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖または分岐鎖の一価の炭化水素ラジカルを指し、アルキニルラジカルは、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換されていてもよい。例としては、エチニル ($-C\equiv CH$)、プロピニル (プロパルギル、 $-CH_2C\equiv CH$) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0098】

「アルキニレン」という用語は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素 sp 三重結合を有する 2 ~ 8 個の炭素原子 ($C_2 - C_8$) の直鎖または分岐鎖の二価の炭化水素ラジカルを指し、アルキニレンラジカルは、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上

10

20

30

40

50

の置換基で、独立して置換されていてもよい。例としては、エチニレン (- C ≡ C -)、プロピニレン (プロパルギレン、 - C H₂ C ≡ C -) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 9 】

「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式環」、及び「シクロアルキル」という用語は、単環式環として 3 ~ 12 個の炭素原子 (C₃ - C₁₂) 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したまたは部分的に不飽和の環を指す。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]、もしくは [6 , 6] 系として配置することができ、9 または 10 個の原子を有する二環式炭素環は、ビスクロ [5 , 6] または [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] ノナン等の架橋系として配置することができる。スピロ部分も本定義の範囲に含まれる。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 - シクロヘキシ - 1 - エニル、1 - シクロヘキシ - 2 - エニル、1 - シクロヘキシ - 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、シクロドデシル等が挙げられるが、これらに限定されない。カルボシクリル基は、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換される。

【 0 1 0 0 】

「アリール」は、親の芳香環系の単一炭素原子から 1 つの水素原子を除去することにより導かれる 6 ~ 20 個の炭素原子 (C₆ - C₂₀) 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としては、例示的構造において「Ar」と表される。アリールは、飽和、部分的に不飽和の環、または芳香族炭素環式環と縮合した芳香環を含む二環式ラジカルを含む。典型的なアリール基としては、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等に由来するラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。アリール基は、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換される。

【 0 1 0 1 】

「アリーレン」は、親の芳香環系の 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り導かれる 6 ~ 20 個の炭素原子 (C₆ - C₂₀) 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としては、例示的構造において「Ar」と表される。アリーレンは、飽和、部分的に不飽和の環、または芳香族炭素環式環と縮合した芳香環を含む二環式ラジカルを含む。典型的なアリーレン基としては、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等に由来するラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。アリーレン基は、任意に、本明細書に記載される 1 つ以上の置換基で置換される。

【 0 1 0 2 】

「複素環」、「ヘテロシクリル」、及び「複素環式環」という用語は、本明細書において同義で用いられ、3 ~ 約 20 個の環原子の飽和または部分的に不飽和 (すなわち 1 つ以上の二重及び/または三重結合を環の中に有する) の炭素環式ラジカルを指し、少なくとも 1 つの環原子は、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、残りの環原子は C であり、1 つ以上の環原子は、任意に、以下に記載される 1 つ以上の置換基で、独立して置換される。複素環は、3 ~ 7 員環 (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) の単環または 7 ~ 10 員環 (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) の二環、例えば、ビスクロ [4 , 5]、[5 , 5]、[5 , 6]、または [6 , 6] 系であってよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Mo

der n Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1、3、4、6、7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950~現在)、特に第13巻、第14巻、第16巻、第19巻、及び第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、部分的に不飽和の環、または芳香族炭素環式もしくは複素環式環と縮合したラジカルも含む。複素環式環としては、例えば、モルホリン-4-イル、ピペリジン-1-イル、ピペラジニル、ピペラジン-4-イル-2-オン、ピペラジン-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、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、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、ピラゾリニルイミダゾリニル、イミダゾリニル、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-ピリジルウレアが挙げられるが、これらに限定されない。スピロ部分も本定義の範囲に含まれる。2つの環原子がオキソ(=O)部分で置換された複素環式基の例は、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。本明細書における複素環基は、任意に、本明細書に記載される1つ以上の置換基で、独立して置換される。

【0103】

「ヘテロアリール」という用語は、5、6、または7員環の一価の芳香族基を指し、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む5~20個の原子の縮合環系(その少なくとも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を含む)、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、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、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、任意に、本明細書に記載される1つ以上の置換基で、独立して置換される。

【0104】

複素環またはヘテロアリール基は、可能であれば、炭素(炭素結合した)または窒素(窒素結合した)結合してもよい。例として、限定されないが、炭素結合した複素環またはヘテロアリールは、ピリジンの2、3、4、5、もしくは6位、ピリダジンの3、4、5、もしくは6位、ピリミジンの2、4、5、もしくは6位、ピラジンの2、3、5、もしくは6位、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、もしくはテトラヒドロピロールの2、3、4、もしくは5位、オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの2、4、もしくは5位、イソキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの3、4、もしくは5位、アジリジンの2もしくは3位、アゼチジンの2、3、

もしくは4位、キノリンの2、3、4、5、6、7、もしくは8位、またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、もしくは8位で結合される。

【0105】

例として、限定されないが、窒素結合した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、イソインドールまたはイソインドリンの2位、モルホリンの4位、及びカルバゾールまたはカルボリンの9位で結合される。

【0106】

「代謝産物」は、特定の化合物またはその塩の体内での代謝により生成される生成物である。化合物の代謝産物は、当該技術分野で既知の日常的な技術を用いて同定することができる。それらの活性は、本明細書に記載されるもののような試験を用いて決定することができる。かかる生成物は、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、酵素的切断等から生じることができる。したがって、本発明は、本発明の式Iの化合物を、その代謝生成物を生じるのに十分な期間、哺乳動物と接触させることを含む、プロセスにより生成される化合物を含む、本発明の化合物の代謝産物を含む。

【0107】

「薬学的製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与され得る対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない調製物を指す。

【0108】

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

【0109】

「安定」製剤は、含まれるタンパク質が貯蔵中に物理的及び化学的安定性及び完全性を本質的に保持するものである。タンパク質安定性を測定するための様々な分析技術が当該技術分野で利用可能であり、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993) に概説がある。安定性は、選択された温度にて選択された期間測定することができる。迅速スクリーニングのために、製剤を40℃に2週間から1カ月間保存することができる。その時に安定性を測定する。製剤が2～8℃で貯蔵されるものである場合、一般的に、製剤は、30℃もしくは40℃にて少なくとも1カ月間安定であり、かつ/または2～8℃にて少なくとも2年間安定である。製剤が30℃で貯蔵されるものである場合、一般的に、製剤は、30℃にて少なくとも2年間安定であり、かつ/または40℃にて少なくとも6カ月間安定である。例えば、貯蔵中の凝集の程度は、タンパク質安定性の指標として用いることができる。よって、「安定」製剤は、タンパク質の約10%未満及び好ましくは約5%未満が製剤中に凝集物として存在するものであってよい。他の実施形態では、製剤の貯蔵中の凝集物形成のいずれの増加も決定することができる。

【0110】

「等張」製剤は、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有するものである。等張製剤は、一般的に、約250～350mOsmの浸透圧を有する。「低張」という用語は、ヒト血液のものより低い浸透圧を有する製剤を説明する。同様に、「高張」という用語は、ヒト血液のものより高い浸透圧を有する製剤を説明するために用いられる。等張性は、例えば蒸気圧浸透圧計または氷結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/または緩衝液の添加の結果として高張である。

【0111】

本明細書で使用する「担体」には、用いられる投与量及び濃度でそれに曝露されている細胞または哺乳動物にとって無毒である、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤が含まれる。多くの場合、生理的に許容される担体は、pH緩衝水溶液である。生理的に許容される担体の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；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、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトールもしくはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；ならびにノまたはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商標）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

10

【0112】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、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、緩衝液、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、処方される濃度及び様式にて非毒性である無機及び有機酸を含む。例えば、適切な無機酸としては、塩化水素酸、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、炭酸等が挙げられる。適切な有機酸としては、直鎖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、不飽和のモノ、ジ、及びトリカルボン酸（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、t-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、グリコン酸、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、パルモ酸、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、カンファスルホン酸、4-メチルピシクロ[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）が挙げられる。

20

30

【0113】

「薬学的に許容される塩基」は、製剤中で処方される濃度及び様式にて非毒性である無機及び有機塩基を含む。例えば、適切な塩基としては、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、マンガン、アルミニウム、N-メチルグルカミン、モルホリン、ピペリジンのような無機塩基形成性金属から形成されるもの、ならびに第一級、第二級、及び第三級アミン、置換アミン、環状アミン、ならびに塩基性イオン交換樹脂[例えばN(R')₄⁺（式中、R'は、独立して、HまたはC₁₋₄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、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミン樹脂等を含む有機非毒性塩基が挙げられる。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

40

50

ンである。

【0114】

本発明で用いることができるさらなる薬学的に許容される酸及び塩基としては、アミノ酸、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、及びアスパラギンに由来するものが挙げられる。

【0115】

「薬学的に許容される」緩衝液及び塩としては、上記の酸及び塩基の酸及び塩基付加塩の両方に由来するものが挙げられる。具体的な緩衝液及び／または塩としては、ヒスチジン、コハク酸塩、及び酢酸塩が挙げられる。

【0116】

「薬学的に許容される糖」は、目的のタンパク質と混合した場合に、貯蔵の際のタンパク質の化学的及び／または物理的不安定性を著しく妨げるかまたは低減する分子である。製剤を凍結乾燥させ、次いで再構成することを目的とする場合、「薬学的に許容される糖類」は、「凍結乾燥保護剤」としても知られる。例示的な糖類及び対応する糖アルコールとしては、グルタミン酸1ナトリウムまたはヒスチジン等のアミノ酸；ベタイン等のメチルアミン；硫酸マグネシウム等のリオトロピックな塩；三価またはそれより高い分子量の糖アルコール等のポリオール、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；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）；及びそれらの混合物が挙げられる。さらなる例示的な凍結乾燥保護剤としては、グリセリン及びゼラチン、ならびに糖類メリピオース、メレジトース、ラフィノース、マンノトリオース、及びスタキオースが挙げられる。還元糖類の例としては、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、及びラクツースが挙げられる。非還元糖類の例としては、糖アルコール及び他の直鎖多価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、及びマルツロース等の二糖類の還元により得られる化合物である。グリコシド側鎖は、グルコシドまたはガラクトシドのいずれかであり得る。糖アルコールのさらなる例は、グルシトール、マルチトール、ラクチトール、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類は、非還元糖類トレハロースまたはショ糖である。薬学的に許容される糖類は、タンパク質がその物理的及び化学的な安定性及び完全性を貯蔵中（例えば再構成及び貯蔵の後）に本質的に保持することを意味する「保護量」（例えば凍結乾燥前）で製剤に加えられる。

【0117】

目的の「希釈剤」は、本明細書において、薬学的に許容され（ヒトへの投与について安全かつ非毒性である）、液体製剤の調製物、例えば凍結乾燥後に再構成される製剤のために有用であるものである。例示的な希釈剤は、滅菌水、静菌性の注射用水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）、滅菌食塩水溶液、リンゲル液、またはデキストロース溶液を含む。代替の実施態様では、希釈剤は、塩の水性溶液、及び／または緩衝液を含み得る。

【0118】

「保存剤」は、細菌の活性を低減するために本明細書における製剤に加えることができる化合物である。保存剤の添加は、例えば、複数使用（複数回用量）製剤の製造を容易にすることができる。可能性のある保存剤としては、例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロライド、ベンザルコニウムクロライド（アルキル基が長鎖化合物であるアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロライドの混合物）及びベンゼトニウムクロライドが挙げられる。他の型の保存剤としては、芳香族アルコール、例えばフェノール、ブチル、及びベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン、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-クレゾールが挙げられる。本明細書において最も好ましい保存剤は、ベンジルアルコールである。

【 0 1 1 9 】

「個体」または「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、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、及び齧歯類（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では、個体または対象は、ヒトである。

【 0 1 2 0 】

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」等のその文法上の変形形態）は、臨床病理学の経過中に治療される個体、組織、または細胞の自然の経過を改変するように設計された臨床的介入を指す。治療の望ましい効果としては、疾患進行の速度の減少、病態の改善または緩和、及び寛解または予後の改善が挙げられ、全ては医師等の当業者により測定可能であるが、これらに限定されない。一実施態様では、治療は、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の漸減、感染性疾患の進行速度の減少、病態の改善または緩和、及び寛解または予後の改善を意味し得る。いくつかの実施態様では、本発明のAAC、TACを用いて、疾患の発生を遅らせるか、または感染性疾患の進行を遅くする、または血液中ならびに/もしくは感染組織及び器官中の細菌負荷を低減する。

10

【 0 1 2 1 】

本明細書で使用されるとき、「と併せて」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。したがって、「と併せて」は、1つの治療様式を、他方の治療様式を施す前に、その間に、またはその後、個体に施すことを指す。

20

【 0 1 2 2 】

「菌血症」という用語は、血流中の細菌の存在を指し、これは、血液培養により最も一般的に検出される。細菌は、感染症（例えば肺炎または髄膜炎）の重度の合併症として、手術中（特に消化管等の粘膜が関与する場合）、または動脈もしくは静脈に侵入するカテーテル及びその他の外来物体を原因として血流中に侵入することができる。菌血症は、いくつかの帰結をもたらす得る。細菌への免疫応答は、敗血症及び敗血症性ショックを引き起こすことができ、これらは比較的高い死亡率を有する。細菌は、体の他の部分に広がるために血液を用いることもでき、感染症が元の感染部位から離れることを引き起こす。例としては、心内膜炎または骨髄炎が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

「治療有効量」は、特定の障害の測定可能な改善をもたらすために必要な最小限の濃度である。治療有効量は、本明細書において、患者の病状、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を引き起こすための抗体の能力のような因子によって変動し得る。治療有効量は、抗体の任意の毒性または有害な影響よりも治療的に有益な効果が勝ることでもある。一実施態様では、治療有効量は、インビボ感染症において菌血症を低減するために有効な量である。一態様では、「治療有効量」は、少なくとも、血液等の患者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、薬物投与の前と比べて少なくとも1 log低減するのに有効な量である。より具体的な態様では、低減は、少なくとも2 logである。別の態様では、低減は、少なくとも3、4、5 logである。さらに別の態様では、低減は、本明細書に例示されたアッセイを含む、当該技術分野で既知のアッセイを用いる検出可能なレベルより低い。別の実施態様では、治療有効量は、治療期間にわたって与えられる1回以上の投与におけるAACの量であって、感染した患者の治療の前または治療の開始時の血液培養陽性と比較して、血液培養陰性（すなわちAACの標的である細菌が成長しない）を達成する量である。

30

40

【 0 1 2 4 】

「予防有効量」は、必要な投与量及び投与期間にて、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を指す。必ずではないが、通常、予防的用量は疾患の前、疾患の早期段階または感染症の危険性が上昇する状態への曝露の前にさえ対象において用いられるため、予防有効量は、治療有効量未満であり得る。一実施態様では、予防有効量は、少なくとも、感染症の出現またはある細胞から別の細胞への感染症の広がりを低減し、妨げるのに有効な量

50

である。

【0125】

「慢性」投与は、急性の形態に対して、初期の治療効果（活性）を長期間維持するような連続的な薬剤（複数を含む）の投与を指す。「間欠的」投与は、中断なく連続的に行うのではなく、むしろ周期的な治療である。

【0126】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、及び／またはその使用に関する警告を含有する、治療剤製品のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0127】

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

【0128】

「立体異性体」という用語は、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。

【0129】

「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等の高分解能分析手順の下で分離されてもよい。

【0130】

「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。

【0131】

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 Eliel, 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、光学的に活性な形態で存在する、すなわち、それらは、平面偏光の面を回転させる能力を有する。光学活性化合物について説明する際、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）を中心とした分子の絶対配置を表すために使用される。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表示を指定するために用いられ、(-) または l は、化合物が左旋性であることを意味する。接頭辞が (+) または d の化合物は、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、互いに鏡像であることを除き、同一である。特定の立体異性体はまた、エナンチオマーとも称され、そのような異性体の混合物は、エナンチオマー混合物と呼ばれることがある。エナンチオマーの 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、これらは、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。「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」は、光学活性がない2つの光学異性体種の等モル混合物を指す。

【0132】

「保護基」という用語は、他の官能基が化合物と反応する間に、特定の官能性をブロックまたは保護するために一般的に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性をブロックまたは保護する、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

10

20

30

40

50

シカルボニル (fluorenylmethylenoxycarbonyl) (Fmoc) が含まれるが、これらに限定されない。保護基及びその使用の一般的な説明については、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。

【0133】

本明細書で使用される「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。本明細書における「約」の値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。

【0134】

本明細書及び添付の特許請求の範囲に使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数形を含む。例えば、「抗体」への言及は、モル量のような1から多くの抗体までに対する言及であり、当業者に知られているその等価物を含む、等である。

【0135】

III. 組成物及び方法

抗体 - 抗生物質複合体 (AAC)

本明細書において実験結果は、細胞内細菌を排除することを目的とする治療法が臨床的効果を改善するという強力な指標である。このような目的で、本発明は、宿主細胞の細胞内区画に侵入する黄色ブドウ球菌生物体を選択的に死滅させる独自の治療剤を提供する。本発明は、そのような治療剤がバンコマイソン等の従来の抗生物質が効かないインピボモデルで有効であることを実証する。

【0136】

本発明は、従来の抗生物質療法を回避する細菌の集団を標的とすることによって抗生物質の回避を防ぐことを目的とする抗菌療法を提供する。新規の抗生物質療法は、黄色ブドウ球菌 (MRSAを含む) に見出される細胞壁成分に特異的な抗体が、強力な抗生物質 (リファマイシンの誘導体) と化学結合した抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) を用いて達成される。抗生物質は、抗体に、ほとんどの哺乳動物の細胞型に見出される、カテプシンB、リソソームプロテアーゼ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ているプロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカーを介してつながれる (Dubowchik et al. (2002) Bioconj. Chem. 13: 855 - 869)。

その3構成成分を用いたAACのダイアグラムを図2に示す。いずれの1つの理論にも限定されないが、AACの作用の1つの機序を図3に図式化する。AACは、リンカーが切断されるまで抗生物質が不活性である (抗体のサイズが大きいことによる) プロドラッグとして作用する。自然の感染において見出される著しい割合の黄色ブドウ球菌が宿主における感染症の経過中のある時点にて宿主細胞、主に好中球及びマクロファージにより取り込まれるため、宿主細胞内で費やされる時間は、細菌が抗生物質活性を逃れる著しい機会を提供する。本発明のAACは、黄色ブドウ球菌と結合し、細菌が宿主細胞により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ている。この機序により、AACは、活性な抗生物質を、黄色ブドウ球菌が従来の抗生物質によりうまく治療されない場所において特異的に濃縮することができる。本発明は、特定の作用機序によっても限定または定義されないが、AACは、3つの可能性のある機序により抗生物質活性を改善する。(1) AACは、抗生物質を、細菌を取り込む哺乳動物細胞の内部に送達し、それによって、細菌が隔離されるファゴリソソーム内にあまり拡散しない抗生物質の力価を増加する。(2) AACは細菌をオプソニン化し、それによって、食細胞による遊離細菌の取り込みが増加し、抗生物質を局所的に放出して、細菌がファゴリソソームに隔離されている間に細菌を死滅させる。何千ものAACが、単一細菌と結合することができるため、このプラットフォームは、最大の抗菌の死滅を持続させるようなこれらの細胞内生態的地位において十分な抗生物質を放出する。さらに、より多くの細菌が前から存在する細胞内保有宿主から放出されるため、この抗体をベースとする療法の迅速な結合速度は

10

20

30

40

50

、細菌が近隣または遠隔の細胞へと逃避し得る前に、これらの細菌の即時の「タギング」を確実にし、そのため、感染症のさらなる蔓延を軽減する。(3) AACは、血清から急速に除外される抗生物質と比較して、抗生物質を抗体と結合させることにより、抗生物質のインビボ半減期を改善する(改善された薬物動態)。AACの改善された薬物動態は、全身投与する必要がある抗生物質の全体的な用量を制限しながら、黄色ブドウ球菌が濃縮された領域に十分な抗生物質を送達することができる。この特性は、最小限の抗生物質副作用で、持続的な感染症を標的にするAACを用いる長期療法を可能にする。

【0137】

プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリinkerによって、リファマイシン型抗生物質に共有結合される、抗壁テイコ酸(WTA)抗体を含む、抗体-抗生物質複合化合物。

10

【0138】

例示的な実施形態は、式、

$Ab - (PML - abx)_p$ 、

を有する抗体-抗生物質複合体であって、

式中、

Abが、抗壁テイコ酸抗体であり、

PMLが、式、

$-Str - PM - Y -$

を有する、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリinkerであって、

式中、Strがストレッチャー単位であり、PMがペプチドミメティック単位であり、Yがスペーサー単位であり、

20

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。

【0139】

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ってもよい。

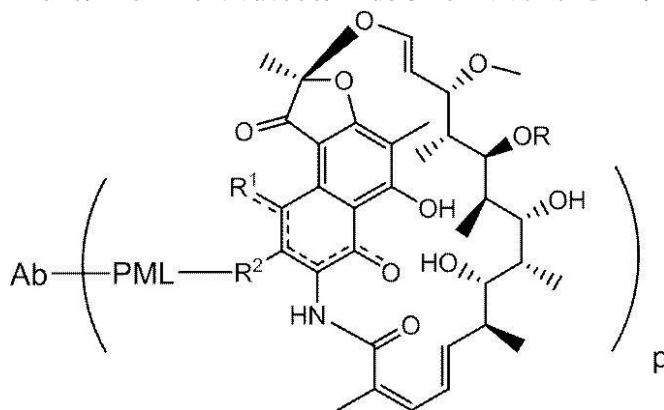
【0140】

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リinkerに結合している第4級アミンを含んでもよい。

【0141】

抗体-抗生物質複合体の例示的な実施形態は、式I、

30



40

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、式中、ヘテロシクリルが、 $C(O)CH_3$ 、 $C_1 - C_{12}$ 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

50

以上の基と任意に置換されるか、

または、 R^1 及び R^2 が、5 または 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、任意に、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を形成し、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が、任意に置換された H、F、Cl、Br、I、 C_{1-2} アルキル、または OH であり、

PML が、 R^2 と結合しているプロテアーゼ切断可能な非ペプチドリinker、または R^1 及び R^2 によって形成された縮合ヘテロアリールもしくはヘテロシクリルであり、

Ab が、抗壁テイコ酸 (WTA) 抗体である。

【0142】

10

反応性リンカー部分を介して抗体分子に複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得る。例示的な AAC は、1、2、3、または 4 個の操作システインアミノ酸を有する抗体を含む (Lyons, R. et al (2012) Methods in Enzymol. 502: 123-138)。

【0143】

抗壁テイコ酸 (WTA) 抗体

黄色ブドウ球菌を含む多くの Gm⁺ 細菌上で発現される WTA と結合するある特定の抗 WTA Ab 及び複合した抗 WTA 抗体が、本明細書に開示される。抗 WTA 抗体は、US 8283294、Meijer P J et al (2006) J Mol Biol 358 (3): 764-72、Lantto J, et al (2011) J Virol 85 (4): 1820-33、及び以下の実施例 3~4 において教示される方法によって選択し、生成することができる。

20

【0144】

グラム陽性細菌の細胞壁は、細胞膜を安定化するだけでなく、他の分子が結合できる多くの部位も提供する複数のペプチドグリカン (PGN) の鞘の厚い層から構成される (図 4)。これらの細胞表面糖タンパク質の主なクラスは、タイコ酸 (「TA」) であり、これは、多くのグリカン結合タンパク質 (GPB) 上で見出されるホスフェートに富む分子である。TA には 2 種類ある: (1) 原形質膜に係留され、細胞表面からペプチドグリカン層まで延びるリポタイコ酸 (「LTA」)、及び (2) ペプチドグリカンと共有結合し、細胞壁全体及び細胞壁を超えて延びる壁 TA (WTA) (図 4)。WTA は、GPB における全細胞壁質量の 60% ほどを占めることができる。結果として、これは、高度に発現される細胞表面抗原を提示する。

30

【0145】

WTA の化学構造は、生物体の中で変動する。黄色ブドウ球菌では、WTA は、N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) - 1 - P 及び N - アセチルマンノースアミン (ManNAc) から構成される二糖を介して N - アセチルムラミン酸 (MurNAc) の 6 - OH と共有結合し、その後約 2 または 3 単位のグリセロールリン酸が続く (図 5) 実際の WTA ポリマーは、次いで、約 11 ~ 40 のリビトールリン酸 (Rbo - P) 反復単位から構成される。WTA の段階的合成は、まず、TagO と呼ばれる酵素により開始され、(遺伝子の欠失により) TagO 遺伝子を欠く黄色ブドウ球菌株は、いかなる WTA も作らない。反復単位は、C2 - OH にて D - アラニン (D - Ala) 及び / または C4 - OH 位にて N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) で、 α - (アルファ) または β - (ベータ) グリコシド結合を介してさらに調整することができる。黄色ブドウ球菌株または細菌の成長期に応じて、グリコシド結合は、 α - 、 β - 、または 2 つのアノマーの混合物であり得る。これらの GlcNAc 糖修飾は、2 つの特異的な黄色ブドウ球菌由来グリコシルトランスフェラーゼ (Gtf) により調整され、TarM Gtf は α - グリコシド結合を媒介し、TarS Gtf は、 β - (ベータ) グリコシド結合を媒介する。

40

【0146】

MRSA の細胞内貯蔵物が抗生物質から保護されることを示す著しい証拠があることに

50

鑑みて、本発明の新規な治療組成物は、黄色ブドウ球菌特異的抗体を用いて、細菌が宿主細胞によりインピボで飲み込まれるかまたは内部移行された場合に抗生物質と一緒に宿主細胞内に持ち込むように抗生物質を細菌につなぎとめることによりこの方法での抗生物質回避を妨げるように開発された。

【0147】

本発明のAACの抗WTA抗体は、抗WTA または抗WTA 抗体であり得る。本明細書を通して提供される例示的な抗WTA Abは、黄色ブドウ球菌感染患者からのB細胞からクローニングされた（以下の実施例において教示されるように）。一実施形態では、抗WTA及び抗黄色ブドウ球菌Abは、ヒトモノクローナル抗体である。本発明のAACまたはTACは、本発明のWTA AbのCDRを含むキメラAb及びヒト化Abを包

10

【0148】

本発明の治療的使用のために、抗生物質に複合してAACを作製するためのWTA Abは、IgM以外の任意のアイソタイプのものであり得る。一実施形態では、WTA Abは、ヒトIgGアイソタイプのものである。より具体的な実施態様では、WTA Abは、ヒトIgG1である。

【0149】

本明細書及び図を通して、4桁の数字（例えば4497）で示すAbは、先行する「S」とともに例えばS4497とも称され得、両方の名称は、抗体の野生型（WT）の非修飾の配列である同じ抗体と称される。抗体の変異体は、抗体番号の後に「v」で例えば4497v8と示す。特に明記しない限り（例えば変異体番号によるような）、示すアミノ酸配列は、元の非修飾/未改変の配列である。これらのAbは、野生型で非修飾の抗体と比較して、抗原との結合親和性を実質的にほぼ同じに保つかまたは改善しながら、例えばpK、安定性、発現、製造しやすさ（例えば以下の実施例に記載されるように）を改善するために、1つ以上の残基にて改変することができる。保存的アミノ酸置換を有する本発明のWTA抗体の変異体は、本発明に包含される。以下、そうでないと明記しない限り、CDR番号付けは、Kabataに従い、定常ドメイン番号付けは、EU番号付けに従う。

20

【0150】

TAC化合物を生成するための複合のために、本発明の抗WTA抗体は、以下に教示されるように、リンカー-抗生物質中間体への複合のためのL鎖及びH鎖のうち的一方またはその両方において操作されたCysを含み得る。

30

【0151】

図11A及び図11Bは、4つのヒト抗WTAアルファ抗体のそれぞれ軽鎖可変領域（VL）及び重鎖可変領域（VH）のアミノ酸配列アラインメントを提供する。Kabata番号付けに従うCDR配列CDRL1、L2、L3及びCDRH1、H2、H3に下線を付す。

【0152】

表1A：抗WTA の軽鎖CDR配列

抗体	CDR L 1	CDR L 2	CDR L 3
4 4 6 1	KSSQSVLSRANN NYYVA (配列番号 1)	WASTREF (配列番号 2)	QQYYTSRR T (配列番号 3)
4 6 2 4	RSNQNLSSSNN NYLA (配列番号 7)	WASTRES (配列番号 8)	QQYYANPR T (配列番号 9)
4 3 9 9	KSNQNVLA SSND KNYLA (配列番号 13)	WASIRES (配列番号 14)	QQYYTNPR T (配列番号 15)
6 2 6 7	KSSQNVLYSSNN KNYLA (配列番号 19)	WASTRES (配列番号 20)	QQYYTSPP YT (配列番号 21)

10

表 1 B : 抗 W T A の重鎖 C D R 配列

抗体	CDR H 1	CDR H 2	CDR H 3
4 4 6 1	DYYMH (配列番号 4)	WINPKSGGTNYA QRFQG (配列番号 5)	DCGSGGLR DF (配列番号 6)
4 6 2 4	DYYIH (配列番号 10)	WINPNTGGTYA QKFRD (配列番号 11)	DCGRGGLR DI (配列番号 12)
4 3 9 9	DYYIH (配列番号 16)	WINPNTGGTNYA QKFGG (配列番号 17)	DCGNAGLR DI (配列番号 18)
6 2 6 7	SYWIG (配列番号 22)	I IHPGDSKTRY S PSFQG (配列番号 23)	LYCSGGSC YSDRAFSS LGAGGY Y YGMGV (配列番号 24)

20

30

【 0 1 5 3 】

V L 及び V H のそれぞれの対の配列は、以下の通りである。

4 4 6 1 軽鎖可変領域

40

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSRANNYYVAWYQHKPGQPPKLLIYW
ASTREFGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYYCQQYYTSRRITFGQGTKVEIK
(配列番号 25)

4 4 6 1 重鎖可変領域

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPK
SGGTNYAQRFGQGRVTMTGDTSSIAAYMDLASLTSDDTAVYYCVKDCGSGGLRDFW
GQGTTVTVSS (配列番号 26)

4 6 2 4 軽鎖可変領域

50

DIQMTQSPDLSVSLGERATINCRSNQNLLSSSNNNYLAWYQQKPGQPLKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYANPRTFGQGTKVEIK

(配列番号 27)

4 6 2 4 重鎖可変領域

QVQLQQSRVEVKRPGTSVKVSKTSGYTFSDYYIHVWRLAPGQGLELMGWINPNTG
GTYYAQKFRDRVTMTRDTSIATAYLEMSSLTSDDTAVYYCAKDCGRGGLRDIWPG
TMVTVSS (配列番号 28)

10

4 3 9 9 軽鎖可変領域

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQNVLASSNDKNYLAWFQHKPGQPLKLLIYWA
SIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLRAEDVAVYYCQQYYTNPRTFGQGTKVEFN
(配列番号 29)

4 3 9 9 重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSKKASGYTFTDYYIHVWRLAPGQGLELMGWINPNTG
GTNYAQKFQGRVTMTRDTSIATAYMELSSLTSDDTAVYYCAKDCGNAGLRDIWGQ
GTTVTVSS (配列番号 30)

20

6 2 6 7 軽鎖可変領域

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTSPPYTFGQGTKLEIE
(配列番号 31)

6 2 6 7 重鎖可変領域

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIHPGDS
KTRYSPSFQGVVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYICARLYCSGGSCYSDFRAFS
SLGAGGYYYYGMGVWGQGTITVTVSS (配列番号 32)

30

【 0 1 5 4 】

AAC化合物の生成のために、本発明は、軽鎖及びH鎖を含む壁テイコ酸アルファ(WTA)と結合する単離モノクローナル抗体を提供し、L鎖は、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含み、H鎖は、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含み、CDRL1、L2、L3及びH1、H2、H3は、上の表1A及び1B中に示されるように、それぞれ、Ab4461(配列番号1~6)、4624(配列番号7~12)、4399(配列番号13~18)、及び6267(配列番号19~24)の各々のCDRのアミノ酸配列を含む。

【 0 1 5 5 】

別の実施形態では、WTAと結合する単離モノクローナルAbは、H鎖可変領域(VH)及びL鎖可変領域(VL)を含み、VHは、それぞれ、抗体4461、4624、4399、及び6267の各々のVH領域配列の長さにわたって少なくとも95%の配列同一性を有する。さらに別の特定の態様では、配列同一性は、96%、97%、98%、99%、または100%である。

40

【 0 1 5 6 】

本発明は、図12に例示されるAbの一覧からの抗WTAベータ抗体を含むAACも提供する。一実施形態では、単離抗WTAベータモノクローナルAbは、図12中の13個のAbの各々のCDRからなる群から選択されるCDRL1、L2、L3及びH1、H2、H3を含む。別の実施形態では、本発明は、13個の抗体の各々のV領域ドメインの長さにわたって少なくとも95%の配列同一性を有する単離抗WTAベータAbを提供す

50

る。さらに別の特定の態様では、配列同一性は、96%、97%、98%、99%、または100%である。

【0157】

13個の抗WTA ベータAbのうち、6078及び4497は、i)リンカー-抗生物質中間体への複合のためにL及びH鎖の一方または両方に操作されたCysを有し、ii)H鎖の最初の残基QがE(v2)に、または最初の2残基QMがEIまたはEV(v3及びv4)に変更された変異体を創出するように修飾された。

【0158】

図13A-1及び13A-2は、抗WTAベータAb6078(非修飾)及びその変異体v2、v3、v4の完全長L鎖のアミノ酸配列を提供する。操作されたCysを含むL鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のC(この場合、EU残基第205番)で示される。変異体の命名、例えばv2LC-Cysは、L鎖中に操作されたCysを含む変異体2を意味する。HCLC-Cysは、抗体のH及びL鎖の両方が操作されたCysを含むことを意味する。図13B-1~13B-4は、抗WTAベータAb6078(非修飾)及びH鎖の最初の残基または最初の2残基に変更を有するその変異体v2、v3、v4の完全長H鎖のアラインメントを示す。操作されたCysを含むH鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のC(EU残基第118番)で示される。

【0159】

6078軽鎖可変領域(VL)

DIVMTQSPSILSASVGDRVITICRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIK

(配列番号111)

6078重鎖可変領域(VH)

XX₁QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNA
NSGNTGYAQKFQGRVTLTGDTISITAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGALGRY
FDLWGRGTLVTVSS (配列番号112)

式中、Xは、QまたはEであり、X₁は、M、I、またはVである。

6078軽鎖

DIVMTQSPSILSASVGDRVITICRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号113)

6078システイン操作軽鎖

DIVMTQSPSILSASVGDRVITICRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (配列番号115)

6078 WT完全長重鎖

10

20

30

40

QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNAN
 SGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYF
 DLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 G (配列番号 1 1 4)

10

6 0 7 8 変異体 (v 2 、 v 3 、 または v 4) 完全長重鎖

EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNAN
 SGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYF
 DLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 G (配列番号 1 1 6)

20

式中、Xは、M、I、またはVであり得る。

6 0 7 8 変異体 (v 2 、 v 3 、 または v 4) 、 C y s 操作された重鎖

EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNAN
 SGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYF
 DLWGRGTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 G (配列番号 1 1 7)

30

式中、Xは、M、I、またはVである。

【 0 1 6 0 】

40

一実施形態では、本発明は、重鎖及び軽を含む単離抗W T A ベータ抗体を提供し、重鎖は、配列番号 1 1 2 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H を含む。さらなる実施形態では、この抗体は、配列番号 1 1 1 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L を含む。具体的な実施形態では、抗 W T A ベータ抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、L鎖は、配列番号 1 1 1 の V L を含む、H鎖は、配列番号 1 1 2 の V H を含む。さらにより具体的な実施形態では、単離抗 W T A ベータ抗体は、配列番号 1 1 3 の L 鎖及び配列番号 1 1 4 の H 鎖を含む。

【 0 1 6 1 】

6 0 7 8 C y s 操作された H 及び L 鎖変異体を以下の組み合わせのいずれかでペアリングして、リンカー A b x 中間体に複合して本発明の抗 W T A A A C を作製するための

50

全長 A b を形成することができる。非修飾の L 鎖（配列番号 1 1 3）は、配列番号 1 1 7 の C y s 操作された H 鎖変異体とペアリングすることができ、変異体は、X が M、I、または V であるものであり得る。配列番号 1 1 5 の C y s 操作された L 鎖は、配列番号 1 1 4 の H 鎖、配列番号 1 1 6 の H 鎖変異体または配列番号 1 1 7 の C y s 操作された H 鎖変異体（このバージョンでは、H 及び L 鎖の両方が C y s 操作されている）とペアリングすることができる。特定の実施態様では、本発明の抗 W T A ベータ抗体及び抗 W T A ベータ A A C は、配列番号 1 1 5 の L 鎖及び配列番号 1 1 6 の H 鎖を含む。

【 0 1 6 2 】

図 1 4 A - 1 及び 1 4 A - 2 は、抗 W T A ベータ A b 4 4 9 7（非修飾）及びその v 8 変異体の完全長 L 鎖を提供する。操作された C y s を含む L 鎖変異体は、定常領域の端付近の黒い箱の中の C（E U 残基第 2 0 5 番）で示される。図 1 4 B - 1、1 4 B - 2、1 4 B - 3 は、抗 W T A ベータ A b 4 4 9 7（非修飾）及び C D R H 3 の 9 6 位にて D が E に改変され、操作された C y s を有するかまたは有さないその v 8 変異体の完全長 H 鎖のアラインメントを示す。操作された C y s を含む H 鎖変異体は、定常領域 C_H 1 の開始時に黒い箱の中の C（E U 残基第 1 1 8 番）で示される。非修飾 C D R H 3 は、G D G G L D D（配列番号 1 0 4）であり、4 4 9 7 v 8 C D R H 3 は、G E G G L D D（配列番号 1 1 8）である。

【 0 1 6 3 】

4 4 9 7 軽鎖可変領域

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWKYQQRPGQPPRLLIHWAS
TRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIK
（配列番号 1 1 9）

4 4 9 7 重鎖可変領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEG
TTAYADSVRGRFIISRDNKNTLYLEMNNLRGEDTAVYYCARGDGGGLDDWGQGT
LVTSS （配列番号 1 2 0）

4 4 9 7 . v 8 重鎖可変領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEG
TTAYADSVRGRFIISRDNKNTLYLEMNNLRGEDTAVYYCARGEGGLDDWGQGT
LVTSS （配列番号 1 5 6）

4 4 9 7 軽鎖

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWKYQQRPGQPPRLLIHWAS
TRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号 1 2 1）

4 4 9 7 v . 8 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEG
 TTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 1 2 2)

10

4 4 9 7 - C y s 軽鎖

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWLWYQQRPGQPPRLLIHWAS
 TRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 1 2 3)

4 4 9 7 . v 8 - 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEG
 TTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 1 5 7、配列番号 1 2 2 と同じ)。

20

30

【 0 1 6 4 】

4 4 9 7 . v 8 - C y s 重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEG
 TTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGT
 LTVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 1 2 4)

40

【 0 1 6 5 】

本発明により提供される別の単離抗 W T A ベータ抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号 1 2 0 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H を含む。さらなる実施形態では、この抗体は、配列番号 1 1 9 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L をさらに含む。具体的な実施形態では、抗 W T A ベータ抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、L 鎖は、配列番号 1 1 9 の V L を含む、H 鎖は、配列番号 1 2 0 の V H を含む。さらにより具体

50

的な実施形態では、単離抗W T A ベータ抗体は、配列番号 1 2 1 の L 鎖配列番号 1 2 2 の H 鎖を含む。

【 0 1 6 6 】

4 4 9 7 C y s 操作された H 及び L 鎖変異体を以下の組み合わせのいずれかでペアリングして、リンカー - A b x 中間体に複合して本発明の抗 W T A A A C を作製するための全長 A b を形成することができる。非修飾の L 鎖 (配列番号 1 2 1) は、配列番号 1 2 4 の C y s 操作された H 鎖変異体とペアリングすることができる。配列番号 1 2 3 の C y s 操作された L 鎖は、配列番号 1 5 7 の H 鎖変異体または配列番号 1 2 4 の C y s 操作された H 鎖変異体 (このバージョンでは、H 及び L 鎖の両方が C y s 操作されている) とペアリングすることができる。特定の実施態様では、本発明の抗 W T A ベータ抗体及び抗 W T A ベータ A A C は、配列番号 1 2 3 の L 鎖を含む。

10

【 0 1 6 7 】

さらに別の実施形態は、図 1 1 A 及び図 1 1 B の抗 W T A アルファ A b の各々と同じエピトープに結合する抗体である。図 1 2、図 1 3 A 及び 1 3 B、ならびに図 1 4 A 及び 1 4 B の抗 W T A ベータ A b の各々と同じエピトープに結合する抗体も提供される。

【 0 1 6 8 】

W T A との抗 W T A 抗体の結合は、W T A 上の G l c N A c - 糖修飾のアノマーの向きに影響される。W T A は、それぞれ、T a r M グリコシルトランスフェラーゼまたは T a r S グリコシルトランスフェラーゼにより、 - または - グリコシド結合を介して C 4 - O H 位にて N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) 糖修飾により修飾される。したがって、T a r M (T a r M)、T a r S (T a r S)、または T a r M 及び T a r S の両方 (T a r M / T a r S) を欠くグリコシルトランスフェラーゼ突然変異体株からの細胞壁調製物を、W T A に対する抗体を用いるイムノプロットング分析に供した。W T A 上の - G l c N A c 修飾に特異的な W T A 抗体 (S 7 5 7 4) は、T a r M 株からの細胞壁調製物と結合しない (M e i j e r , P . J . , e t a l . (2 0 0 6) “ I s o l a t i o n o f h u m a n a n t i b o d y r e p e r t o i r e s w i t h p r e s e r v a t i o n o f t h e n a t u r a l h e a v y a n d l i g h t c h a i n p a i r i n g . ” J o u r n a l o f m o l e c u l a r b i o l o g y 3 5 8 , 7 6 4 - 7 7 2) 。逆に、W T A 上の - G l c N A c 修飾に特異的な W T A 抗体 (S 4 4 6 2) は、T a r S 株からの細胞壁調製物と結合しない。予期されたように、これらの抗体はともに、両方のグリコシルトランスフェラーゼを欠く欠失株 (T a r M / T a r S) 及びいずれの W T A も欠く株 (T a g O) からの細胞壁調製物と結合しない。このような分析に従って、抗体は、図 6 A 及び 6 B の表に列挙する抗 - G l c N A c W T A m A b または抗 - G l c N A c W T A m A b と特徴付けられている。

20

30

【 0 1 6 9 】

システインアミノ酸は、鎖内または分子間ジスルフィド結合を形成しない抗体の反応部位にて操作してもよい (J u n u t u l a , e t a l . , 2 0 0 8 b N a t u r e B i o t e c h . , 2 6 (8) : 9 2 5 - 9 3 2、D o r n a n e t a l (2 0 0 9) B l o o d 1 1 4 (1 3) : 2 7 2 1 - 2 7 2 9、U S 7 5 2 1 5 4 1、U S 7 7 2 3 4 8 5、W O 2 0 0 9 / 0 5 2 2 4 9、S h e n e t a l (2 0 1 2) N a t u r e B i o t e c h . , 3 0 (2) : 1 8 4 - 1 9 1、J u n u t u l a e t a l (2 0 0 8) J o u r o f I m m u n . M e t h o d s 3 3 2 : 4 1 - 5 2) 。操作されたシステインチオールは、マレイミドまたはアルファ - ハロアミドのようなチオール反応性で求電子性の基を有する本発明のリンカー試薬またはリンカー - 抗生物質中間体と反応して、システイン操作抗体 (T H I O M A B (商標) または t h i o M a b) 及び抗生物質 (a b x) 部分を有する A A C を形成することができる。それ故に、抗生物質部分の場所は、設計され、制御され、既知であり得る。抗生物質の負荷量は、操作されたシステインチオール基が、典型的に、チオール反応性リンカー試薬またはリンカー - 抗生物質中間体と高い収率で反応するため、制御され得る。重鎖または軽鎖の単一部位にて

40

50

置換によりシステインアミノ酸を導入するために抗W T A抗体を操作することにより、対称のテトラマー抗体上に2つの新しいシステインが得られる。2に近い抗生物質の負荷量を達成することができ、複合生成物A A Cのほぼ均一性を達成することができる。

【0170】

ある特定の実施形態では、抗体の1個以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作抗W T A抗体、例えば、「チオM A b」を創出することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基がそれにより抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、抗生物質部分またはリンカー - 抗生物質部分等の他の部分に抗体を複合して、本明細書にさらに記載される免疫複合体を作り出してよい。ある特定の実施形態では、次の残基のうちの任意の1個以上が、軽鎖のV 2 0 5 (K a b a t 付番)、重鎖のA 1 1 8 (E U 付番)、及び重鎖F c領域のS 4 0 0 (E U 付番)を含む、システインで置換されてもよい。抗W T A抗体の非限定的で例示的なシステイン操作重鎖A 1 1 8 C (配列番号149)及び軽鎖V 2 0 5 C (配列番号151)突然変異体を示す。システイン操作抗W T A抗体は、記載されるようにして作製してよい (J u n u t u l a , e t a l . , 2 0 0 8 b N a t u r e B i o t e c h . , 2 6 (8) : 9 2 5 - 9 3 2、U S 7 5 2 1 5 4 1、U S - 2 0 1 1 / 0 3 0 1 3 3 4 号)。

【0171】

別の実施形態では、本発明は、A A Cを作製するための複合のための単離抗W T A抗体を提供し、該抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、野生型重鎖定常領域配列またはシステイン操作突然変異体 (チオM a b) を含み、軽鎖は、野生型軽鎖定常領域配列またはシステイン操作突然変異体 (チオM a b) を含む。一態様では、重鎖は、以下のものに対して少なくとも95%の配列同一性を有し、

重鎖 (I g G 1) 定常領域、野生型

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK
```

(配列番号148)

重鎖 (I g G 1) 定常領域、A 1 1 8 C 「チオM a b」

```
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK
```

(配列番号149)

軽鎖は、以下のものに対して少なくとも95%の配列同一性を有する。

軽鎖 (カッパ) 定常領域、野生型

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

(配列番号150)

軽鎖(カップ)定常領域、V205C「チオMab」

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRG
EC

(配列番号151)

10

【0172】

本発明のAACは、野生型または親抗WTA抗体の1つ以上のアミノ酸がシステインアミノ酸で置き換えられた、システイン操作抗WTA抗体を含む。抗体のいずれの形態も、そのように操作、すなわち変異させることができる。例えば、親Fab抗体断片を操作して、本明細書において「チオFab」というシステイン操作Fabを形成してもよい。同様に、親のモノクローナル抗体を操作して、「チオMab」を形成してもよい。単一部位の突然変異は、チオFabにおいて単一の操作されたシステイン残基を生じるが、単一部位変異は、IgG抗体のダイマーの性質により、チオMabにおいて2つの操作されたシステイン残基を生じることに注意すべきである。置き換えられた(「操作された」)システイン(Cys)残基を有する突然変異体は、新しく導入された、操作されたシステインチオール基の反応性について評価される。

20

【0173】

本明細書に記載される抗体は、培養において宿主細胞を用いて生成してもよい。宿主細胞は、本明細書に記載される抗体をコードする1つ以上の核酸を含むベクター(発現またはクローニングベクター)で形質転換してもよい。細胞を、抗体を生成するために適切な条件下で培養し、細胞により生成される抗体をさらに精製してもよい。抗体を生成するために適切な細胞は、原核生物、酵母、または高等真核生物(例えば哺乳動物)細胞を含んでもよい。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(ヒトまたは非ヒト哺乳動物細胞)を用いる。いくつかの実施形態では、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いる。

30

【0174】

哺乳動物細胞を培養してもよく、培養(組織培養)における哺乳動物細胞の増殖は、常套的手段になっている。哺乳動物宿主細胞株の例としては、SV40(COS-7、ATCC CRL 1651)によって形質転換されたサル腎臓CV1株;ヒト胚腎臓株(293または懸濁培養における増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59(1977));ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5細胞;FS4細胞;及びヒト肝癌系列(Hep G2)が挙げられ得るが、これらに限定されない。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、NS0及びSp2/0等の

40

50

骨髓腫細胞株が挙げられる。抗体産生のために適切なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説について、例えばYazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 255 - 268を参照されたい。

【0175】

綿花、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、ウキクサ (*Leninaceae*)、アルファルファ (*Medicago truncatula*)、及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用することができる。

【0176】

この目的のために適切な原核細胞としては、グラム陰性またはグラム陽性生物体のような真正細菌、例えば腸内細菌科、例えばエシェリキア (*Escherichia*)、例えば大腸菌、エンテロバクター属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば、サルモネラ・チフィウム、セラチア属、例えば、セラチア・マルセッセンス、及び赤痢菌属、ならびにバシラス・サブチリス及びバシラス・リケニフォルミス等のバシラス (例えば、1989年4月12日出版のDD 266, 710に開示されているバシラス・リケニフォルミス41P)、緑膿菌及びストレプトミセス等のシュードモナス属が挙げられる。1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は大腸菌294 (ATCC 31, 446) であるが、大腸菌B、大腸菌X1776 (ATCC 31, 537)、及び大腸菌W3110 (ATCC 27, 325) 等の他の株が好適である。これらの例は、限定的なものではなく例示的なものである。

【0177】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体をコードするベクターに好適なクローニングまたは発現宿主である。出芽酵母または一般的なパン酵母は、下等真核生物宿主微生物のうちで最も一般的に用いられる。しかしながら、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 宿主、例えばK. ラクチス、K. フラギリス (ATCC 12, 424)、K. プルガリカス (ATCC 16, 045)、K ウィカラミイ (ATCC 24, 178)、K. ワルティイ (ATCC 56, 500)、K. ドロソフィラルム (ATCC 36, 906)、K. サーモトレランス、及びK. マーキシアヌス; ヤロウィニア (EP 402, 226); ピキア・パストリス (EP 183, 070); カンジダ; トリコデルマ・リーシア (EP 244, 234); アカパンカビ; シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセス・オキシデンタリス; ならびに糸状菌、例えばニューロスボラ、ペニシリカム、トリボクラジウム、及びアスペルギルス宿主、例えば偽巢性コウジ菌及びクロコウジカビのような多くの他の属、種、及び株が通常利用可能であり、本明細書において有用である。

【0178】

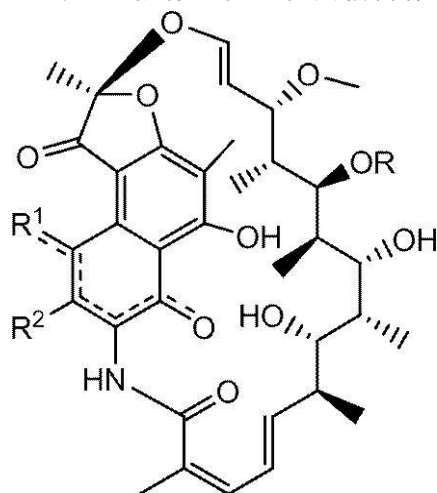
リファマイシン型抗生物質部分

本発明の抗体-抗生物質複合体 (AAC) の抗生物質部分 (abx) は、細胞毒性効果または細胞静止効果を有するリファマイシン型抗生物質または基である。リファマイシンは、細菌、ノカルジアメディターラネイ、アミコラトプシスメディターラネイによって天然に、または人工的に得られる抗生物質の群である。これらは、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り、細菌RNAポリメラーゼ (Fujii et al (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1489 - 1492、Feklistov, et al (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (39): 14820 - 5) 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効力を有する。リファマイシンは、マイコバクテリアに対して特に効果的であり、そのため、結核、癩病、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用いられる。リファマイシン型の基としては、「古典的」リファマイシン薬物、ならびにリファマイシン誘導体リファンピシン (リフ

アンピシリン、CA Reg. 番号13292-46-1)、リファブチン(CA Reg. 番号72559-06-9、2011/0178001号)、リファペンチン、及びリファジリン(CA Reg. 番号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が挙げられる。多くのリファマイシン型抗生物質は、耐性の発展という有害な特性を共有する(Wichelhaus et al(2001) Antimicrob. Chemother. 47:153-156)。リファマイシンは、ストレプトマイセスメディターラネイ(*Streptomyces mediterranei*)の発酵培養物から1957年に最初に単離された。約7種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と命名された(US3150046)。リファマイシンBは、最初に商業的に導入され、1960年代に薬物耐性結核の治療において有用であった。リファマイシンは、多くの疾患の治療のために用いられ、最も重要なものはHIV関連結核である。多数の利用可能なアナログ及び誘導体のために、リファマイシンは、通常用いられる抗生物質に対して耐性になった病原性細菌の排除に広く利用されている。例えば、リファンピシリンは、薬物耐性を妨げる有効な効果及び能力があることが知られている。これは、迅速に分裂する桿菌株とともに、生物学的に不活性なまま長期間残っているため抗生物質活性を逃れることができる「生残菌」細胞を迅速に死滅させる。さらに、リファブチン及びリファペンチンは両方とも、HIV陽性患者で獲得された結核に対して用いられている。

【0179】

式Iの抗体-抗生物質複合体の抗生物質部分(a b x)は、構造、



を有するリファマイシン型部分であって、

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、式中、ヘテロシクリルが、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つ以上の基と任意に置換されるか、

または、R¹及びR²が、5または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、任意に、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を形成し、当該スピロまたは縮合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が、任意に置換されたH、F、Cl、Br、I、C₁-C₁₂アルキル、またはOHであり、

非ペプチドリinker PMLが、R²と共有結合する。

リファマイシン型部分の一実施形態は、



式中、 R^3 が、独立して、H 及び $C_{11} - C_{12}$ アルキルから選択され、 R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 $C_{11} - C_{12}$ アルキル、及び OH から選択され、Z が、NH、N($C_{11} - C_{12}$ アルキル)、O、及び S から選択され、非ペプチドリンカー PML が、N(R^3)₂ の窒素原子と共有結合する。

リファンピシン型部分の一実施形態は、



R⁵ が、H 及び C₁ - C₁₂ アルキルから選択され、非ペプチドリナー PML が、NR⁵ の窒素原子と共有結合する。

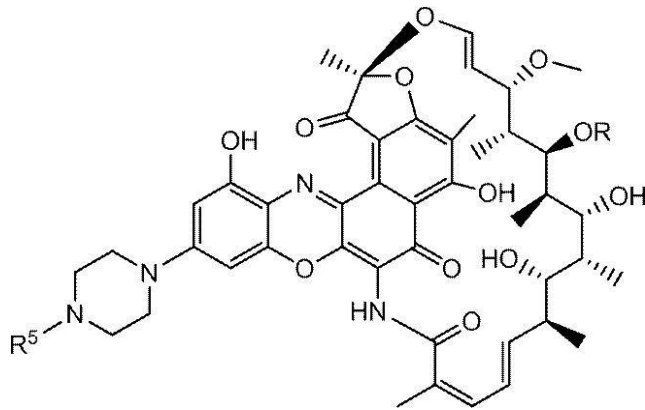
リファブチン型部分の一実施形態は、



であり、式中、R⁵が、H及びC₁-C₁₂アルキルから選択され、非ペプチドリノール-PM₁Lが、NR⁵の窒素原子と共有結合する。

50

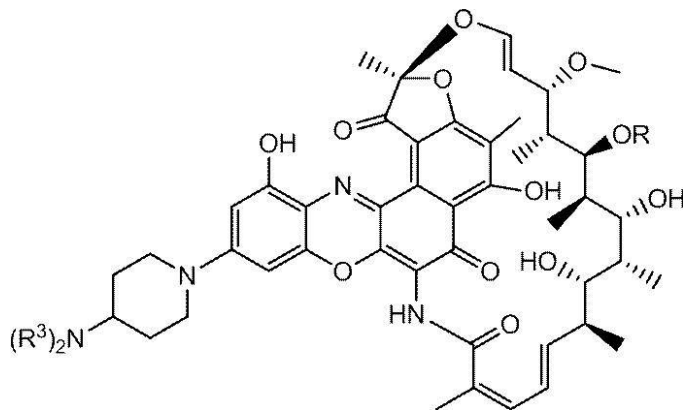
ベンゾキサジノリファマイシン型部分の一実施形態は、



であり、式中、 R^5 が、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、非ペプチドリンカー PML が、 NR^5 の窒素原子と共有結合する。

【0184】

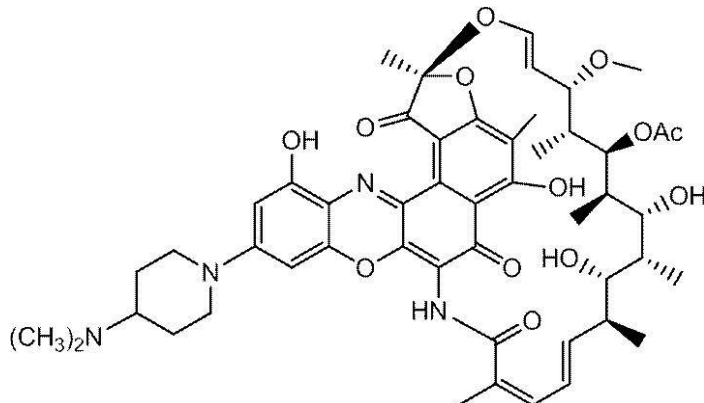
本明細書において pipBOR と称される、ベンゾキサジノリファマイシン型部分の一実施形態は、



であり、式中、 R^3 が、独立して、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、非ペプチドリンカー PML が、 $N(R^3)_2$ の窒素原子と共有結合する。

【0185】

本明細書においてジメチル pipBOR と称される、ベンゾキサジノリファマイシン型部分の一実施形態は、



であり、式中、非ペプチドリンカー PML が、ジメチルアミノ窒素原子と共有結合する。

【0186】

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でリファラジル型抗生物質に変換することができ、式中、 R が、H または Ac であり、 R^3 が、独立して、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、 R^4 が

10

20

30

40

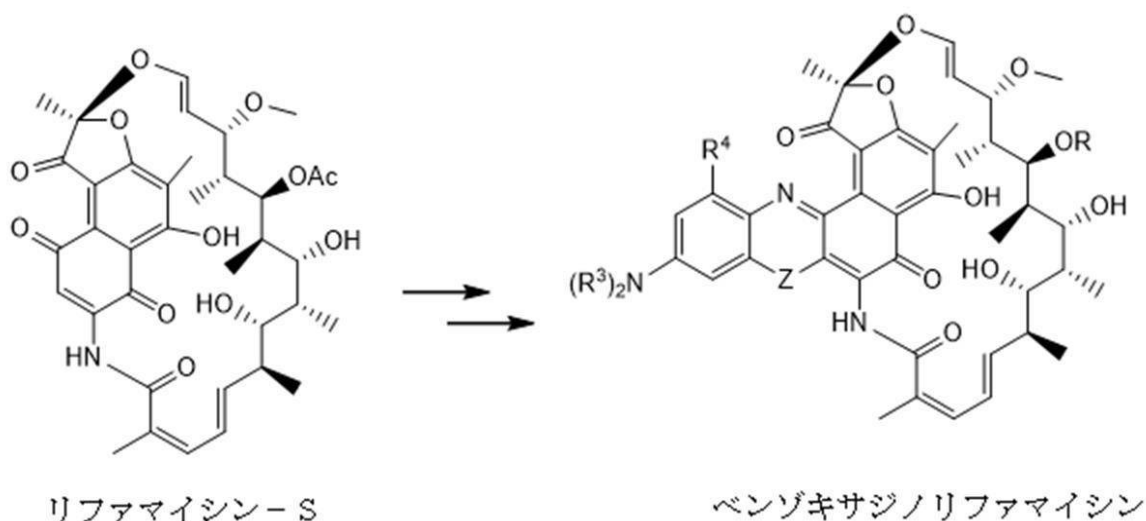
50

、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、WO 2014/194247の図23A及びB、ならびに図25A及びBを参照のこと）。ベンゾキサジノ（ $Z = O$ ）、ペンズチアジノ（ $Z = S$ ）、ペンズジアジノ（ $Z = NH$ 、 $N(C_1 - C_{12}$ アルキル））リファマイシンを調製してもよい（US 7271165号）。置換基を含む、ベンゾキサジノリファマイシン（BOR）、ペンズチアジノリファマイシン（BTR）、及びペンズジアジノリファマイシン（BDR）アナログは、US 7271165（この目的のために、参照により組み込まれる）の第28欄の式Aに提供される番号付けスキームに従って番号付けされる。「25-O-デアセチル」リファマイシンは、25位のアセチル基が除去されたリファマイシンアナログを意味する。この位置がさらに誘導体化されたアナログは、「25-O-デアセチル-25-（置換基）リファマイシン」と称され、完全な化合物名では誘導体化する基の名称が「置換基」を置き換える。

【0187】

リファマイシン型抗生物質部分は、US 4610919、US 4983602、US 5786349、US 5981522、US 4859661、US 7271165、US 2011/0178001、Seligson, et al., (2001) Anti-Cancer Drugs 12:305-13、Chem. Pharm. Bull., (1993) 41:148、及びWO 2014/194247（これらの各々は、参照により組み込まれる）に開示されるものと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用いてそれらの最小阻止濃度（MIC）を測定することによって抗微生物活性についてスクリーニングすることができる（Tomiooka et al., (1993) Antimicrob. Agents Chemother. 37:67）。

【0188】



【0189】

プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカー

「プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカー」（PML）は、1つ以上の抗生物質部分（ abx ）及び抗体単位（Ab）と共有結合して、式Iの抗体-抗生物質複合体（AAC）を形成する二官能性または多官能性部分である。AAC中のプロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカーは、リソソーム条件下を含む細胞内プロテアーゼによる切断についての基質である。プロテアーゼとしては、様々なカテプシン及びカスパーゼが挙げられる。細胞内部でのAACの非ペプチドリンカーの切断は、抗菌効果を有するリファマイシン型抗生物質を放出することができる。

【0190】

抗体-抗生物質複合体（AAC）は、簡便には、抗生物質（ abx ）及び抗体（Ab）との結合のための反応性機能性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

用いて調製することができる。ある例示的な実施形態では、システイン改変抗体 (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の結合を形成することができる。

【0191】

AACのPML部分は、1つのアミノ酸残基を含んでもよい。

【0192】

AACのPML部分は、ペプチドミメティック単位を含む。

【0193】

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システインと反応性である求電子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基と反応性であり、共有結合を形成する。有用な求電子基としては、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。

10

【0194】

システイン改変抗体は、K l u s s m a n , e t a l (2 0 0 4) , B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1 5 (4) : 7 6 5 - 7 7 3 の 7 6 6 頁の複合法、及び実施例19のプロトコルに従って、リンカー試薬またはリンカー - 抗生物質中間体、マレイミドもしくは - ハロカルボニル等の求電子官能基と反応する。

【0195】

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 - 反応性官能基を含む。チオール反応性官能基の例としては、マレイミド、 - 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、塩化スルホニル、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。

20

【0196】

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と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としては、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挙げられるが、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て、抗体単位との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としては、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、及びアリアルヒドラジドが挙げられるが、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 - リンカー中間体との結合のための簡便な部位を提供する。

30

【0197】

PML部位は、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。例示的なリンカー構成要素としては、シトルリン (「cit」)、6 - マレイミドカプロイル (「MC」)、マレイミドプロパノイル (「MP」)、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) ペンタン酸塩 (「SPP」)、及び 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 カルボン酸塩 (「MCC」) 等の単一アミノ酸が含まれる。様々なリンカー構成要素が当該技術分野で知られており、このうちのいくつかを下に記載する。

40

【0198】

別の実施形態では、リンカーは、溶解度または反応性が調節する基で置換してもよい。例えば、スルホネート (-SO₃⁻) またはアンモニウム等の荷電置換基は、試薬の水溶性を増加して、リンカー試薬と抗体もしくは抗生物質部分とのカップリング反応を促すか、またはAACの調製に用いる合成経路に応じて、リンカー試薬の水溶性を向上させ、リンカー試薬と抗体もしくは薬物部分とのカップリング反応を促すか、またはAACの調製

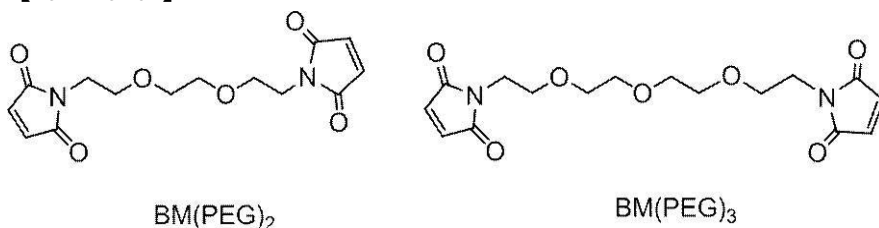
50

に用いる合成経路に応じてA b - L (抗体 - リンカー中間体) とa b x、もしくはa b x - L (抗生物質 - リンカー中間体) とA bとのカップリング反応を促すことができる。

【0199】

本発明のA A Cは、リンカー試薬：B M P E O、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ - E M C S、スルホ - G M B S、スルホ - K M U S、スルホ - M B S、スルホ - S I A B、スルホ - S M C C、スルホ - S M P B、S V S B (スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン) ベンゾエート)、ならびにビス - マレイミド試薬、例えば、D T M E、B M B、B M D B、B M H、B M O E、B M (P E G)₂、及びB M (P E G)₃を用いて調製されたものを明示的に企図するが、これらに限定されない。ビス - マレイミド試薬は、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システイン改変抗体のチオール基の結合を、逐次的または収斂的な様式で可能にする。システイン改変抗体のチオール基、抗生物質部分、またはリンカー - 抗生物質中間体と反応するマレイミド以外の他の官能基としては、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、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挙げられる。

【0200】



有用なリンカー試薬はまた、M o l e c u l a r B i o s c i e n c e s I n c . (B o u l d e r , C O)のような他の市販の供給源から得ることもできるか、またはT o k i e t a l (2002) J . O r g . C h e m . 67 : 1866 - 1872、D u b o w c h i k , e t a l . (1997) T e t r a h e d r o n L e t t e r s , 38 : 5257 - 60、W a l k e r , M . A . (1995) J . O r g . C h e m . 60 : 5352 - 5355、F r i s c h e t a l (1996) B i o c o n j u g a t e C h e m . 7 : 180 - 186、6214345、W O 02 / 088172、2003130189、2003096743、W O 03 / 026577、W O 03 / 043583、及びW O 04 / 032828に記載される手順に従って合成することができる。

【0201】

別の実施形態では、A A CのP M L部分は、分岐した多機能性リンカー部分を介して1つより多い抗生物質部分を抗体と共有結合させるための樹状型リンカーを含む (S u n e t a l (2002) B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y L e t t e r s 12 : 2213 - 2215、S u n e t a l (2003) B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y 11 : 1761 - 1768)。樹状リンカーは、抗体に対する抗生物質のモル比、すなわちA A Cの力価と関係する負荷量を増加させることができる。したがって、システイン改変抗体が反応性システインチオール基を1つだけ有する場合、樹状リンカーを介して多数の抗生物質部分を結合することができる。

【0202】

式IのA A C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リリンカーP M Lは、式、

- S t r - P M - Y -

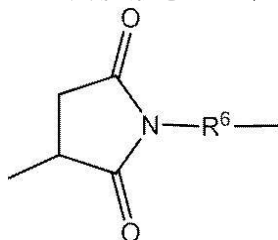
を有し、

式中、S t r がストレッチャー単位であり、P M がペプチドミメティック単位であり、Y がスペーサー単位であり、

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。

【0203】

一実施形態では、ストレッチャー単位「Str」は、式、

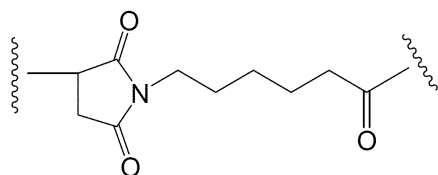


10

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 - $NHC(=O)CH_2CH$ (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 の範囲内の整数である。

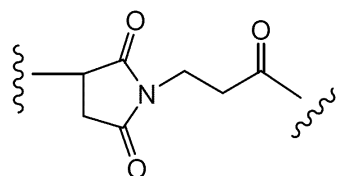
【0204】

例示的なストレッチャー単位を、以下に示す(式中、波線は、抗体への共有結合の部位を示す)：



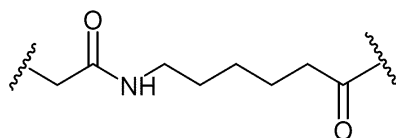
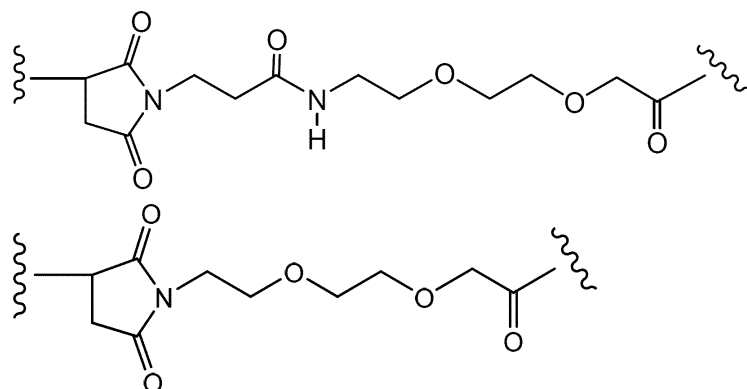
MC

20



MP

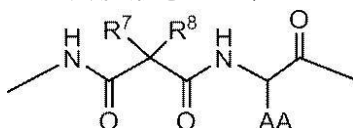
30



40

【0205】

一実施形態では、PMは、式、



を有し、式中、 R^7 及び R^8 が合わせて、 $C_3 - C_7$ シクロアルキル環を形成し、

50

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。

【0206】

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-アミノベンジロキシカルボニル(PABC)を含む。

【0207】

スペーサー単位は、別の加水分解ステップを用いずに抗生物質部分の放出を可能にする。スペーサー単位は、「自壊性」であっても、「非自壊性」であってもよい。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と結合する(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-アミノベンジロキシカルボニル(PAB)である。

【0208】

一実施形態では、抗生物質は、非ペプチドリinker PMLのPABスペーサー単位と結合する場合に、ジメチルアミノピペリジル基のような第4級アミンを形成する。このような第4級アミンの例は、表2からのPLA-1~4であるリンカー-抗生物質中間体(PLA)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の抗菌効果を最適化することができる。別の実施形態では、抗生物質は、非ペプチドリinker PMLのPABCスペーサー単位と結合して、AAC中に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もまた、AACの抗菌効果を最適化することができる。PABCカルバメートリンカー-抗生物質中間体(PLA)の例は、表2からのPLA-5及びPLA-6である。

【0209】

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含まれるが、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)及び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)等、アミド結合加水分解により環化されるスペーサーが用いられ得る。グリシンで置換された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。

【0210】

AACの切断により放出される活性抗生物質の量は、実施例8のカスパーゼ放出アッセイによって測定することができる。

【0211】

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、実施例11~21の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。リンカー試薬は、WO2012/113847、US7659241、同第US7498298、同第US20090111756、同第US2009/0018086、同第US6214345、Dubowchik et al (2002) Biocon

10

20

30

40

50

j u g a t e C h e m . 1 3 (4) : 8 5 5 - 8 6 9 に記載される方法によって調製された。

表 2 P M L リンカー-抗生物質中間体

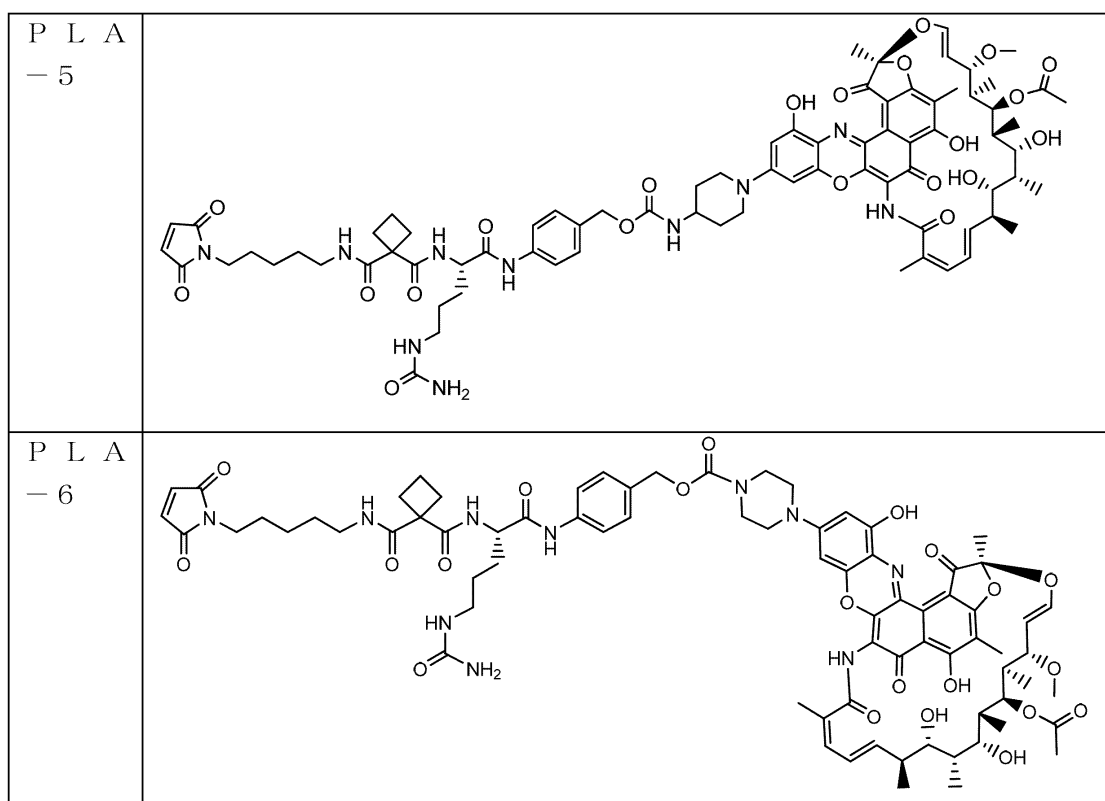
L A 番号	構造
P L A - 1	
P L A - 2	
P L A - 3	
P L A - 4	

10

20

30

40



【 0 2 1 2 】

抗体 - 抗生物質複合体の実施形態

システイン操作抗WTA抗体は、遊離システインチオール基を介して、pipBORと称されるリファマイシンの誘導体等に結合し、プロテアーゼ切断可能な非ペプチドリナーを介して、表3中の抗体 - 抗生物質複合化合物(AAC)を形成した。リンカーは、カテプシンB、D等を含むリソソームプロテアーゼによって切断されるように設計され抗生物質及びPMLリンカー等からなるリンカー - 抗生物質中間体の作製は、実施例11～21において詳細に記載されている。リンカーは、PAB部分でのアミド結合の切断が活性状態の抗生物質から抗体を分離するように設計されている。

【 0 2 1 3 】

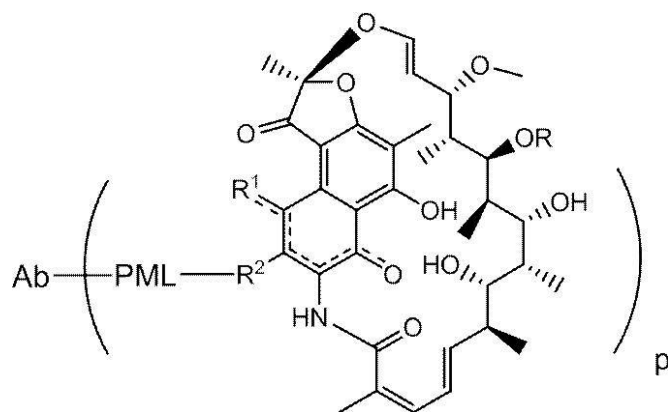
「ジメチルpipBOR」と呼ばれるAACは、抗生物質上のジメチル化アミノ及びリンカー上のオキシカルボニル基以外は、「pipBOR」AACと同一である。

【 0 2 1 4 】

図3は、抗体 - 抗生物質複合体(AAC)についての薬物活性化の可能性のある機序を示す。活性抗生物質(Ab)は、哺乳動物細胞の内部へのAACの内部移行の後にのみ放出される。AAC中の抗体のFab部分は、好中球及びマクロファージを含む食細胞とのFc - 受容体が媒介する結合によって細菌の取り込みを増強する一方で、黄色ブドウ球菌と結合する。ファゴリソームへの内部移行の後に、リンカーは、リソソームプロテアーゼにより切断され、活性な抗生物質をファゴリソームの内部に放出する。

【 0 2 1 5 】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体(AAC)化合物の一実施形態は、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、 $C_1 - C_{12}$ 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、式中、ヘテロシクリルが、 $C(O)CH_3$ 、 $C_1 - C_{12}$ 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 つ以上の基と任意に置換されるか、

20

または、 R^1 及び R^2 が、5 または 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、任意に、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を形成し、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が、任意に置換された H、F、Cl、Br、I、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、または OH であり、

PML が、 R^2 と結合しているプロテアーゼ切断可能な非ペプチドリンカー、または R^1 及び R^2 によって形成された縮合ヘテロアリールもしくはヘテロシクリルであり、

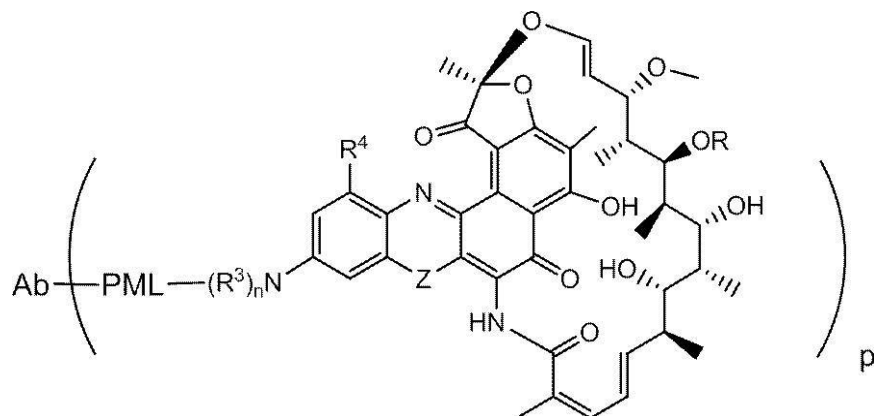
Ab が、抗壁テイコ酸 (WTA) 抗体であり、

p が、1 ~ 8 の整数である。

【0216】

30

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



40

を含み、

式中、

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

n が、1 または 2 であり、

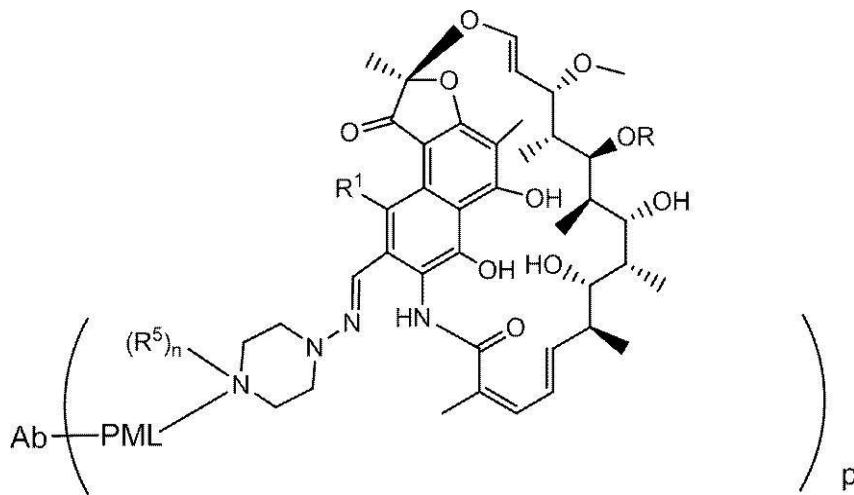
R^4 が、H、F、Cl、Br、I、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、及び OH から選択され、

Z が、NH、 $N(C_1 - C_{12}$ アルキル)、O、及び S から選択される。

【0217】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、

50



10

を含み、

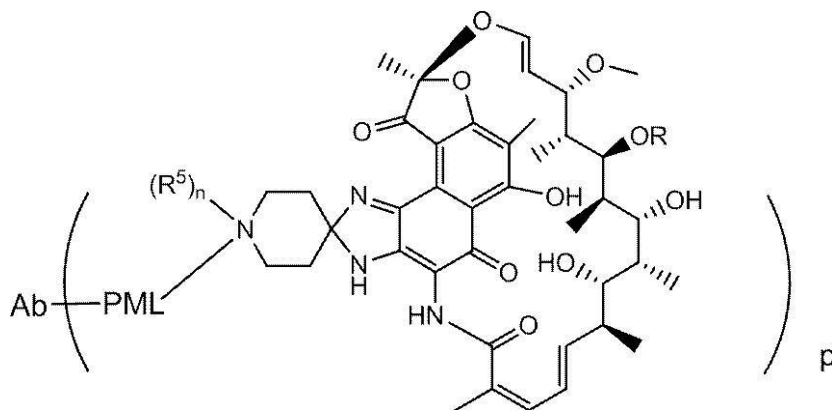
式中、

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

【0218】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、

20



30

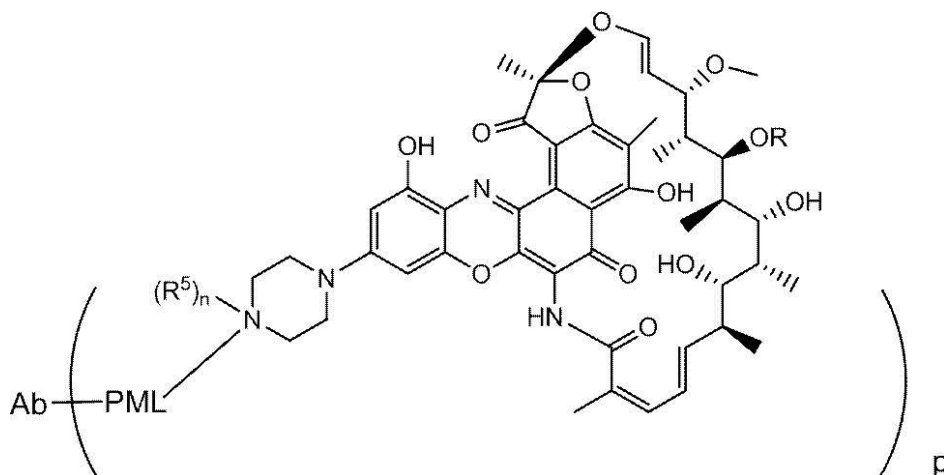
を含み、

式中、

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

【0219】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



40

を含み、

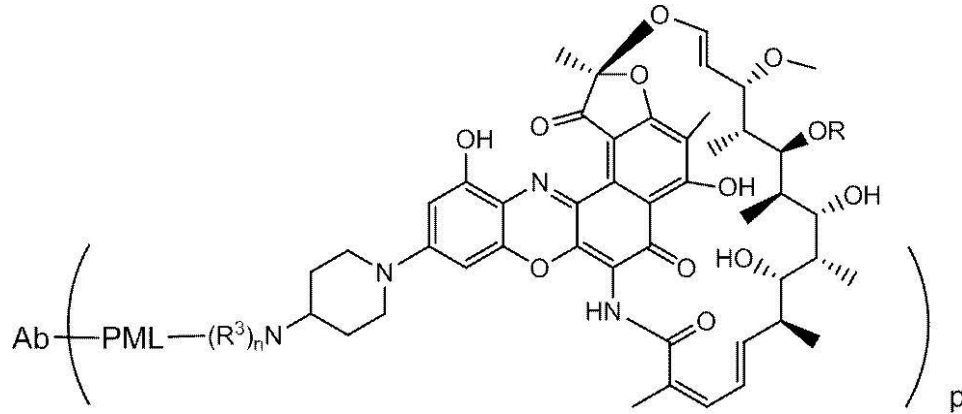
50

式中、

R^5 が、独立して、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、
 n は、0 または 1 である。

【0220】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



10

を含み、

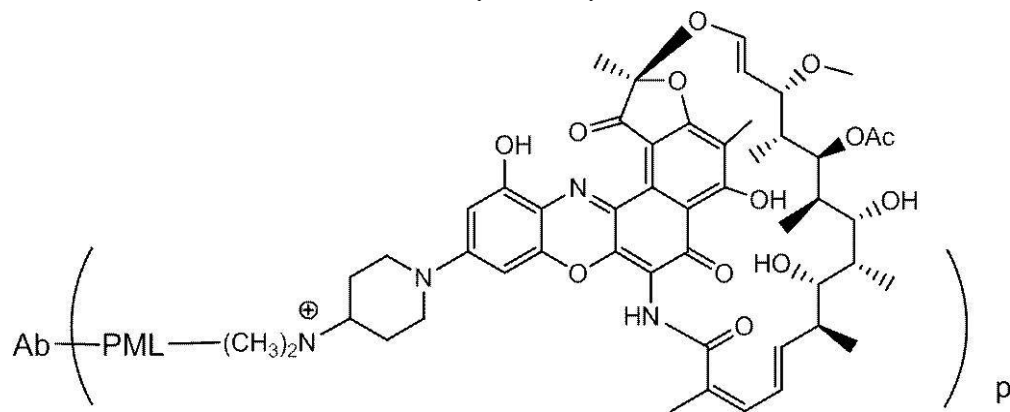
式中、

R^3 が、独立して、H 及び $C_1 - C_{12}$ アルキルから選択され、
 n が、1 または 2 である。

20

【0221】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、

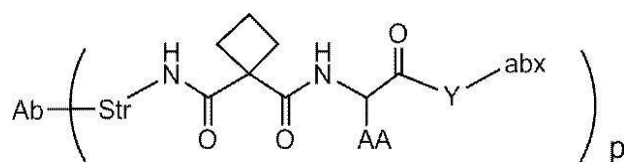


30

を含む。

【0222】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、

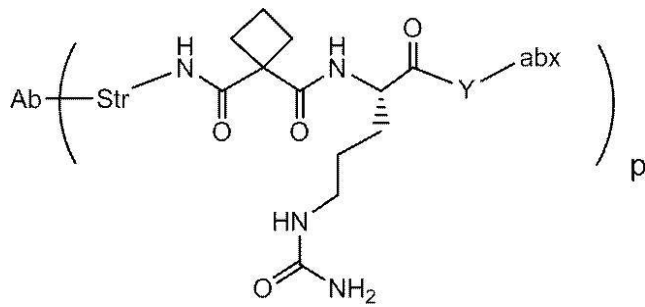


40

を含む。

【0223】

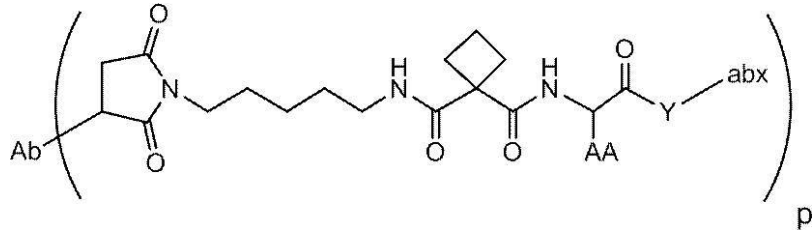
本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



を含む。

【0224】

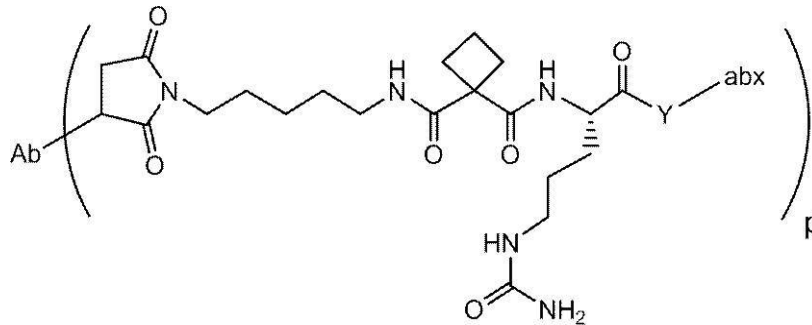
本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



を含む。

【0225】

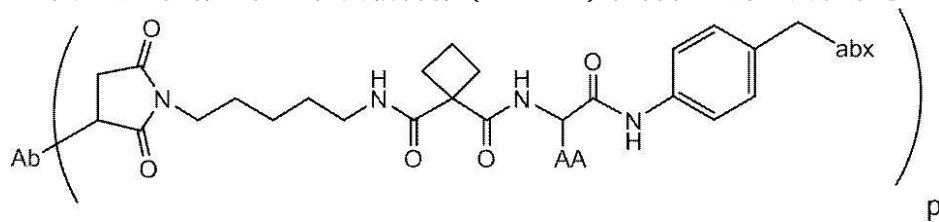
本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



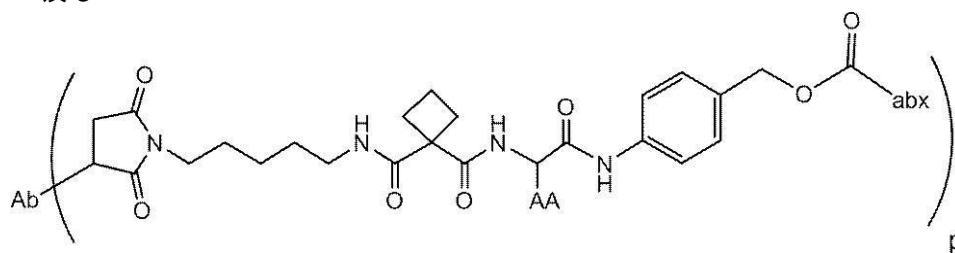
を含む。

【0226】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、



及び



を含む。

【0227】

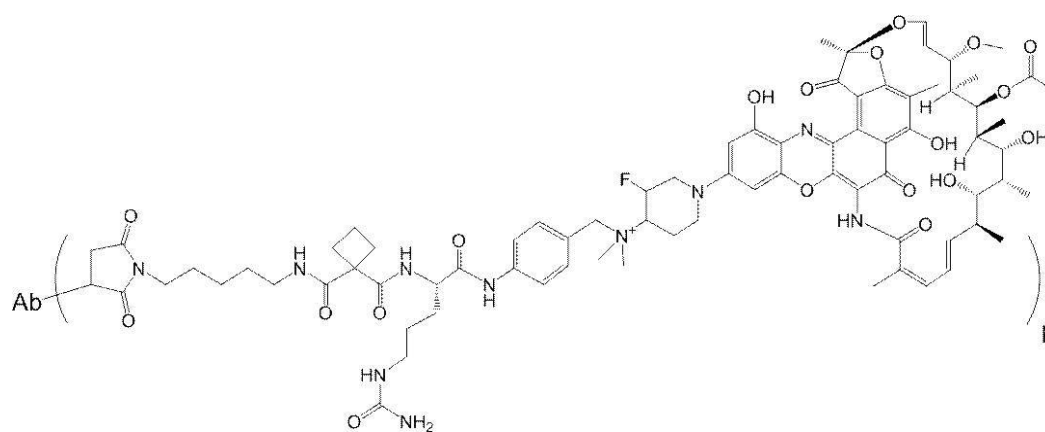
本発明の抗体 - 抗生物質複合体 (AAC) 化合物の別の実施形態は、式、

10

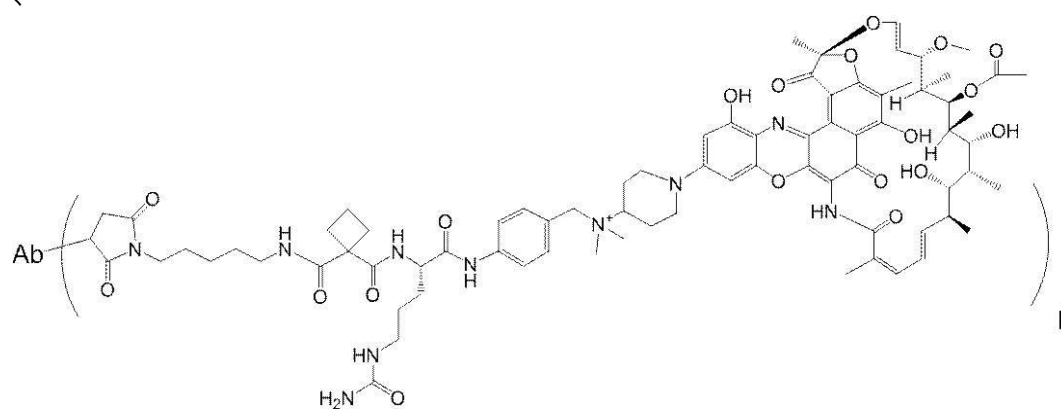
20

30

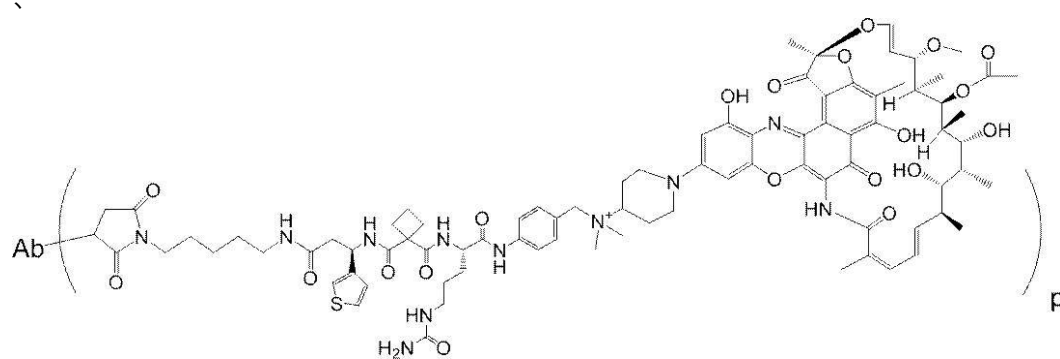
40



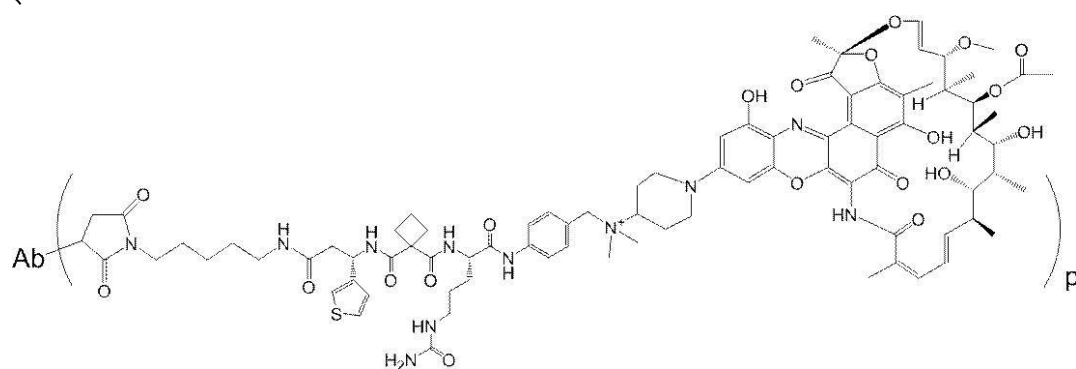
10



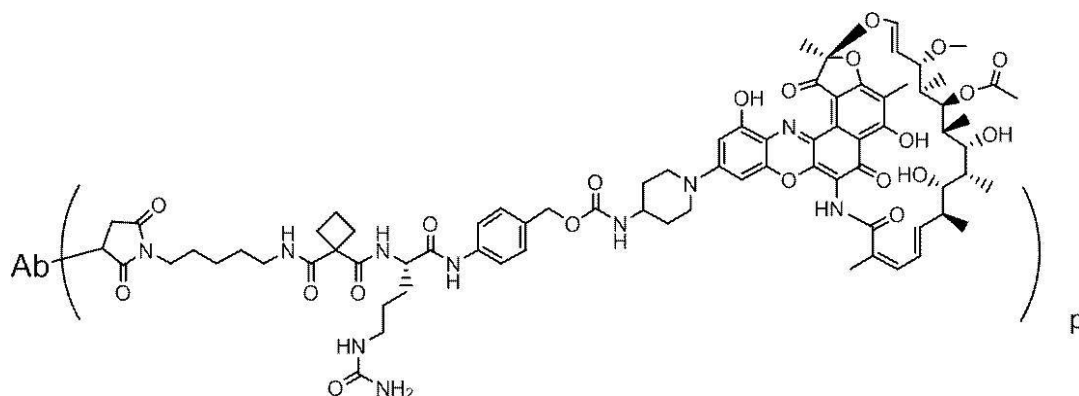
20



30

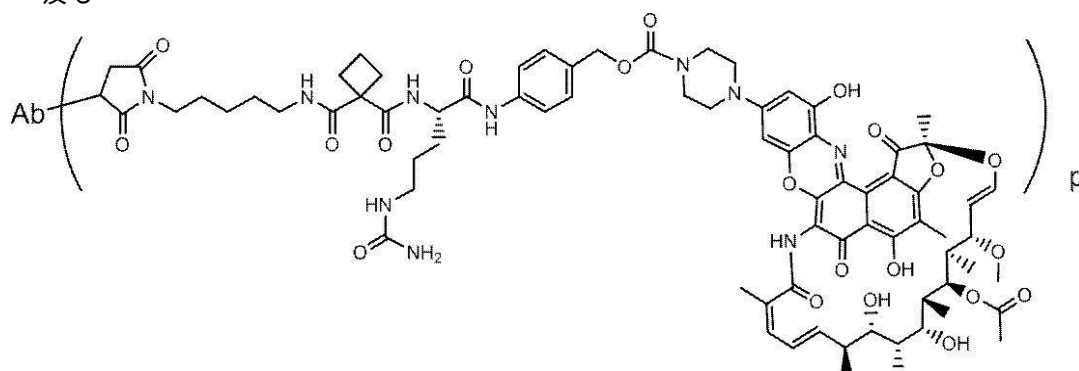


40



10

、及び



20

を含む。

【0228】

A A Cの抗生物質負荷量

抗生物質負荷量は、式Iの分子における1抗体当たりの抗生物質(a b x)部分の数であるpで表す。抗生物質負荷量は、1抗体当たり1~20個の抗生物質部分(D)の範囲であり得る。式IのA A Cは、1~20個の範囲の抗生物質部分と複合された抗体の集団またはプールを含む。複合反応からA A Cを調製する際の1抗体当たりの抗生物質部分の平均数は、質量分析法、E L I S Aアッセイ、及びH P L C等の従来の手段によって特徴付けられてもよい。また、pの単位でのA A Cの定量分布が決定されてもよい。いくつかの事例において、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から分離し、精製し、かつ特徴付けることは、逆相H P L Cまたは電気泳動等の手段によって達成されてもよい。

30

【0229】

いくつかの抗体-抗生物質複合体では、pは、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、上記の例示的な実施形態のように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1個のみもしく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、1個のみもしくはいくつかの十分に反応性のチオール基を有し得、それによって、リンカーが結合され得る。ある特定の実施形態では、抗生物質負荷がより高くなると、例えば、pが5超になると、ある特定の抗体-抗生物質複合体は凝集し、不溶性となり、毒性となるか、または細胞透過性が喪失し得る。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

【0230】

ある特定の実施形態では、理論上の最大値よりも少ない抗生物質部分が、複合反応中に抗体に複合される。抗体は、以下に考察されるように、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、抗生物質部分に連結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、抗体におけるほとんど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

50

定の実施形態では、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）等の還元剤により、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が生成され得る。ある特定の実施形態では、本抗体は、リジンまたはシステイン等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。

【0231】

A A Cの負荷（抗生物質／抗体比、「A A R」）はまた、薬物抗体比（D A R）とも呼ばれ、異なる様式で、例えば（i）抗体と比較してモル過剰の抗生物質 - リンカー中間体またはリンカー試薬を限定すること、（ii）複合反応時間または温度を限定すること、及び（iii）システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件によって制御されてもよい。

10

【0232】

1つを上回る求核性基を、抗生物質 - リンカー中間体またはリンカー試薬と反応させ、続いて、抗生物質部分試薬と反応させる場合、結果として得られる生成物は、1つ以上の抗生物質部分が分散して抗体に結合したA A C化合物の混合物であることが理解される。

1抗体当たりの抗生物質の平均数は、抗体に特異的でありかつ抗生物質に特異的である二重E L I S A抗体アッセイによって混合物から算出されてもよい。個々のA A C分子は、質量分析法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することができる（例えばMcDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307、Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070、Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004, Alley, S. C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004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を、電気泳動またはクロマトグラフィーによって複合混合物から単離してもよい。本発明のシステイン操作抗体は、抗体上の反応部位は、操作されたシステインチオールにまず制限されるため、より均一な調製物を可能にする。一実施形態では、1抗体当たりの抗生物質部分の平均数は、約1～約20の範囲内であった。いくつかの実施形態では、範囲は、約1から4まで選択され、制御される。

20

30

【0233】

抗体 - 抗生物質複合体の調製方法

式IのA A Cは、（1）共有結合によりA b - Lを形成するための抗体の求核基と二価リンカー試薬との反応と、その後の抗生物質部分（a b x）との反応、及び（2）共有結合によりL - a b xを形成するための抗生物質部分の求核基と二価リンカー試薬との反応と、その後の抗体の求核基との反応を含む、当業者に知られる有機化学反応、条件、及び試薬を用いるいくつかの経路により調製してよい。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、米国特許第U S 7 4 9 8 2 9 8号に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【0234】

抗体上の求核基としては、（i）N末端アミン基、（ii）側鎖アミン基、例えば、リ

50

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) 活性エステル、例えば N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物、(i i) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、(i i i) 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できる。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。抗体は、完全にまたは部分的に還元されるように、D T T (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 (T C E P) 等の還元剤での処理によって、リンカー試薬との複合に対して反応し得る。したがって、各システイン架橋は、理論上、2 つの反応性チオール求核試薬を形成するであろう。追加の求核基は、リジン残基の修飾によって、例えば、リジン残基と 2 - イミノチオラン (トラウト試薬 (T r a u t ' s r e a g e n t)) 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中に導入することができる。反応性チオール基もまた、1 個、2 個、3 個、4 個、またはそれ以上のシステイン残基を導入することによって (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って) 抗体中に導入され得る。

【 0 2 3 5 】

本発明の抗体 - 抗生物質複合体はまた、アルデヒドまたはケトンカルボニル基等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產生されてもよい。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、ヒドラジンカルボン酸塩、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でき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基またはケトン基を形成してもよい。結果として生じ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、グリコシル化された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反応させると、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 (H e r m a n s o n , B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s) 。別の実施形態では、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、それによって第 1 のアミノ酸の代わりにアルデヒドが產生され得る (G e o g h e g a n & S t r o h , (1 9 9 2) B i o c o n j u g a t e C h e m . 3 : 1 3 8 - 1 4 6 , U S 5 3 6 2 8 5 2) 。かかるアルデヒドと、抗生物質部分またはリンカー求核試薬とを反応させることができる。

【 0 2 3 6 】

抗生物質部分上の求核基としては、(i) 活性エステル、例えば N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物、(i i) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、(i i i) 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できる、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挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 2 3 7 】

表 3 の抗体 - 抗生物質複合体 (A A C) を、実施例 7 において記載される方法に従って、表 2 の記載される抗 W T A 抗体及びリンカー - 抗生物質中間体の複合によって調製した。インビトロマクロファージアッセイ (実施例 9) 及びインビボマウス腎臓モデル (実施例 1 0) による有効性について、A A C を試験した。

【0238】

表3 WTA抗体 - PML - 抗生物質複合体 (AAC)

AAC番号	AAC式	リンカー - a b x P L A 番号	A A R *
101	チオ-S6060-HC-WT/LC-cys-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)	P L A - 2	1 . 9
102	チオ-S4497-LC-cys-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)	P L A - 2	1 . 8
103	チオ-S4497-LC-V205C-MC-(R)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)	P L A - 3	1 . 8
104	チオ-S4497-LC-V205C-MC-(S)-チオフエン-3-イル-CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)	P L A - 4	1 . 5
105	チオ-S4497-LC-MC-(CBDK-cit)-PABC-(ピペラズBTR)	P L A - 6	-
106	チオ-S4497-HC-A118C-MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)	P L A - 2	1 . 8
107	チオ-S4497-HC-A118C-MC-(CBDK-cit)-PABC-(pipBOR)	P L A - 5	2 . 0

* AAR = 抗生物質 / 抗体比の平均

野生型 (「WT」)、システイン操作突然変異抗体 (「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」)

【0239】

抗体 - 抗生物質複合体による感染症の治療及び予防方法

本発明の抗WTA - AACは、ヒト及び獣医学的ブドウ球菌、例えば黄色ブドウ球菌、S . サプロフィチカス、及びS . シミュランズに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AACは、黄色ブドウ球菌感染症を治療するために有用である。

【0240】

血流への侵入の後に、黄色ブドウ球菌は、ほぼ全ての器官において転移性感染を引き起こす可能性がある。二次感染は、治療の開始前の約三分の一の症例で (Fowler et al . , (2003) Arch . Intern . Med . 163 : 2066 - 2072)、患者の10%においてさえ治療の開始後に生じる (Khatib et al . , (2006) Scand . J . Infect . Dis . , 38 : 7 - 14)。感染の顕著な特徴は、膿の大きな貯蔵、組織破壊、及び膿瘍の形成 (これらは全て、大量の好中

10

20

30

40

50

球を含む)である。菌血症が3日を超えて持続する場合、約40%の患者が合併症を発生する。

【0241】

提案されるAACの作用の機序が、上述されている(副題の抗体-抗生物質複合体)。本発明の抗WTA抗体-抗生物質複合体(AAC)は、細胞内病原体を治療するための著しい治療上の利点を有する。AACリンカーは、ファゴリソソーム酵素への曝露によって切断され、活性抗生物質を放出する。隔離された空間及び比較的高い局所(1細菌当たり約 10^4)のために、ファゴリソソームは細胞内病原体の生存をもはや支持しない結果となる。AACは本質的に不活性なプロドラッグであるため、抗生物質の治療指数は、遊離(非複合)形と比べて拡大することができる。抗体は、病原体特異的標的化をもたらし、切断可能なリンカーは、病原体の細胞内の場所に特異的な条件下で切断される。効果は、オプソニン化した病原体及びファゴリソソームに共限局性の他の病原体の両方に対して直接的であり得る。抗生物質耐性は、抗生物質及び他の抗微生物剤による死滅に耐える疾患の原因となる病原体の能力であり、多剤耐性とは機序が異なる(Lewis K(2007). "Persister cells, dormancy and infectious disease". *Nature Reviews Microbiology* 5(1): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557)。むしろ、この形の耐性は、生残菌と呼ばれる微生物細胞の小さい部分集団により引き起こされる(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、古典的な意味で多剤耐性ではないが、むしろ、それらの遺伝子的に同一の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がある休眠細胞である。この抗生物質耐性は、非分裂または分裂が非常に遅い生理学的状態により誘導される。これらの生残菌細胞を根絶させる抗微生物治療が効かない場合に、生残菌細胞は、再発性の慢性感染の貯蔵所となる。本発明の抗体-抗生物質複合体は、これらの生残菌細胞を死滅させ、多剤耐性のある細菌集団の出現を抑制する独特の特性を有する。

【0242】

別の実施形態では、本発明の抗WTA-AACを用いて、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ことができる

【0243】

別の実施形態では、本発明の抗WTA-AACを用いて、浮遊状態またはバイオフィルムの形のブドウ球菌細菌を標的にすることもできる。本発明の抗体-抗生物質複合体(AAC)で治療可能な細菌感染症は、細菌肺感染症、例えば黄色ブドウ球菌肺炎、骨髄炎、再発性鼻副鼻腔炎、細菌性心内膜炎、細菌性眼感染症、例えばトラコーマ及び結膜炎、心臓、脳、または皮膚の感染症、消化管の感染症、例えば旅行者の下痢、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群(IBS)、クローン病、及び全般的にIBD(炎症性腸疾患)、細菌性髄膜炎、ならびに任意の器官、例えば筋肉、肝臓、髄膜、または肺での膿瘍を治療することを含む。細菌感染症は、尿道、血流、創傷、またはカテーテル挿入部位のような体の他の部分におけるものであり得る。本発明のAACは、バイオフィルム、インプラント、または力の及ばない部位に関与する治療が困難な感染症(例えば骨髄炎及び人工関節感染症)、ならびに死亡率が高い感染症、例えば院内感染肺炎及び菌血症のために有用である。黄色ブドウ球菌感染症を予防するために処置することができる弱い患者の群としては、血液透析患者、免疫低下患者、集中治療室にいる患者、及びある特定の手術を受ける患者が挙げられる。別の態様では、本発明は、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症を死滅、治療、または予防する方法を提供し、本方法は、動物に本発明の抗WTA-AACまたはAACの医薬製剤を投与することを含む。本発明は、このような微生物感染症に関連するか、またはこのような微生物感染症から日和見的にもたらされる疾患を治療または予防することをさらに特徴とする。このような治療または予防の方

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んでもよい。例えば、手術またはＩＶカテーテルの挿入前に、ＩＣＵケアにおいて、移植医薬中に、癌化学療法とともにもしくはその後に、または感染症の高い危険性を有する他の活動において、本発明のＡＡＣを投与して、感染症の発症または広がりを妨げることができる。

【０２４４】

細菌感染症は、活性及び不活性形の細菌により引き起こされることがあり、ＡＡＣは、活性及び不活性の両方で、潜在的な形の細菌感染を治療するために十分な量及び期間投与され、この期間は、活性な形の細菌感染を治療するために必要なものよりも長い。

【０２４５】

様々なグラム＋細菌の分析により、ＷＴＡベータがＭＲＳＡ及びＭＳＳＡ株、ならびにブドウ球菌株、例えばＳ．サブロフィチカス及びＳ．シミュランスを含む全ての黄色ブドウ球菌で発現されることがわかった。ＷＴＡアルファ（アルファ－ＧＬｃＮＡｃリビトールＷＴＡ）は、全てではないが、ほとんどの黄色ブドウ球菌上に存在し、リステリア・モノサイトゲネス上にも存在する。ＷＴＡは、グラム－細菌上に存在しない。したがって、本発明の一態様は、黄色ブドウ球菌、Ｓ．サブロフィチカス、またはＳ．シミュランスのうちの１つ以上に感染した患者を、治療有効量の本発明の抗ＷＴＡベータ－ＡＡＣを投与することによって治療する方法である。本発明の別の態様は、黄色ブドウ球菌及び／またはリステリア・モノサイトゲネスに感染した患者を、治療有効量の本発明の抗ＷＴＡアルファ－ＡＡＣを投与することによって治療する方法である。本発明は、黄色ブドウ球菌またはＳ．サブロフィチカスまたはＳ．シミュランスのうちの１つ以上による感染を、病院の背景、例えば手術、熱傷患者、及び臓器移植において治療有効量の本発明の抗ＷＴＡベータ－ＡＡＣを投与することによって予防する方法も企図する。

【０２４６】

当該技術分野の医師により決定される、細菌感染症のための治療を必要とする患者は、必要ではないが、患者が感染した細菌の種類について既に診断されていてよい。細菌感染症を患っている患者は、ほんの数時間で非常に迅速に悪化し得るため、バンコマイシンまたはシプロフロキサシンのような１つ以上の標準治療Ａｂｘとともに本発明の抗ＷＴＡ－ＡＡＣを入院時の患者に投与することができる。診断結果が入手可能になり、感染における例えば黄色ブドウ球菌の存在が示された場合、患者は、抗ＷＴＡ－ＡＡＣでの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黄色ブドウ球菌感染症の治療方法の一実施形態では、患者に治療有効量の抗ＷＴＡベータＡＡＣを投与する。本発明の治療または予防方法では、本発明のＡＡＣは、単独治療剤として、または以下に記載するもののような他の薬剤とともに投与することができる。本発明のＡＡＣは、前臨床モデルにおけるＭＲＳＡの治療において、バンコマイシンよりも優越性を示す。ＳＯＣに対するＡＡＣの比較は、例えば死亡率の低減により測定することができる。治療される患者は、様々な測定可能な因子によりＡＡＣ治療に対する応答性について評価され得る。臨床医が患者における改善を評価するために用いる可能性がある兆候及び症状の例としては、例えば、以下のものが挙げられる：診断時に上昇しているならば白血球細胞計数の正常化、診断時に上昇（発熱）しているならば体温の正常化、血液培養のクリアランス、紅斑及び膿の排出がより少ないことを含む創傷の目視による改善、人工呼吸器をつけている患者における酸素の要求の低減または換気速度の低減のような人工呼吸器の要求の低減、診断時に患者が人工呼吸器をつけているならば人工呼吸器を完全に外すこと、診断時にこれらの薬物が必要であれば安定した血圧を補助するために使用する薬物がより少なくなること、診断時に異常であるならばクレアチニンまたは肝臓機能試験の上昇のような末端器官不全を示唆する実験室値の異常の正常化、ならびに放射線画像化の改善（例えば以前に肺炎を示唆した胸部ｘ線が消散を示す）。ＩＣＵでの患者では、これらの因子は少なくとも毎日測定され得る。発熱は、絶対好中球計数を含む白血球計数及び「左方移動」（活性感染に应答して増加した好中球の生成を示す芽球の出現）が消散したという証拠とともに厳密にモニタリングされる。

【０２４７】

本発明の治療の方法の文脈では、細菌感染症を患っている患者は、当該技術分野の医師が評価して、治療の開始もしくは診断の前または治療の開始もしくは診断時の値、兆候、または症状と比較して、先行する因子の少なくとも2つ以上において、著しく測定可能な改善があるならば、治療されるべきと見なされる。いくつかの実施形態では、上記の因子のうちの3、4、5、6つ、またはそれ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、測定される因子における改善は、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、患者の測定可能な改善が以下のものを含む場合に、患者は細菌感染症（例えば黄色ブドウ球菌感染症）が完全に治療されたと見なすことができる：i）元々同定された細菌が成長しない、反復した血液または組織培養（典型的には数回）、ii）発熱が正常化される、iii）WBCが正常化される、及びiv）患者が有していた既存の合併性に鑑みて末端器官不全（肺、肝臓、腎臓、血管虚脱）が部分的または完全に消散したという証拠。

10

【0248】

投薬

前述の態様のうちのいずれかでは、感染患者の治療において、AACの投与量は、通常、約0.001~1000mg/kg/日である。一実施形態では、細菌感染症を患っている患者は、約1mg/kg~約150mg/kg、典型的に約5mg/kg~約150mg/kg、より具体的には約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の用量で治療される。AACは、毎日（例えば5~50mg/kg/日の単回用量）またはより少ない頻度（例えば5、10、25、または50mg/kg/週）で与えることができる。1用量は、2日にわたって、例えばある日に25mg/kg及び次の日に25mg/kgに分けることができる。患者は、1~8週間の期間にわたって3日毎（q3D）、週1回~隔週（qOW）で投与を受けることができる。一実施形態では、患者に、本発明のAACを、静脈注射を介して週1回、2~6週間にわたって標準治療（SOC）とともに投与して、staph A感染症のような細菌感染症を治療する。治療の長さは、患者の状態または感染の程度により、例えば合併症を伴わない菌血症について2週間または心内膜炎を併発する菌血症について6週間要求され得る。

20

【0249】

一実施形態では、AACは、2.5~100mg/kgの初期用量で1~7日間連続、その後、0.005~10mg/kgの維持用量で1カ月間1~7日毎に1回投与した。

30

【0250】

投与経路

細菌感染症を治療するために、本発明のAACは、上記の投与量のいずれかで、静脈内に（i.v.）または皮下投与することができる。一実施形態では、WTA-AACは、静脈内投与される。具体的な実施形態では、静脈内により投与されるWTA-AACは、WTA-ベータAACであり、より具体的には、WTA-ベータ抗体は、図12、図13A1及びA2及び図13B1~B4、図14A1~A2及び図14B1~B3、ならびに図15A1~A3及び図15B1~B6に開示される、アミノ酸配列を有するAbの群から選択されるものである。

40

【0251】

併用療法

AACは、患者を治療する医師によって決定されるように、必要に応じて1つ以上のさらなる、例えば第2の治療剤または予防剤とともに投与してもよい。

【0252】

一実施形態では、本発明の抗体-抗生物質複合化合物と組み合わせて投与される第2の抗生物質は、構造的クラス：（i）アミノ配糖体、（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から選択される。Shaw, K. and Barbachyn, M. (2011) Ann. N. Y. Acad. Sci. 124

50

1 : 48 - 70、Sutcliffe, J. (2011) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1241: 122 - 152を参照されたい。

【0253】

一実施形態では、本発明の抗体 - 抗生物質複合化合物と組み合わせて投与される第2の抗生物質は、クリンダマイシン、ノボピオシン、レタパムリン、ダブトマイシン、GSK - 2140944、CG - 400549、シタフロキサシン、テイコブラニン、トリクロサン、ナフチリドン (naphthyridone)、ラデゾリド、ドキシソルピシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタピン、ダルババンシン、及びアジスロマイシンから選択される。

【0254】

これらのさらなる治療剤または予防剤のさらなる例は、抗炎症薬（例えば非ステロイド系抗炎症薬 (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、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメオン、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、サルサレート、ならびにサリチル酸ナトリウム及びマグネシウム）、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、アズロシリン、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、セファクロール、ロラカルベフ、セフォキシチン、セフメタゾール、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフトジジム、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、BAL5788、BAL9141、イミペネム、エルタペネム、メロペネム、アズトレオナム、クラブラン酸、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、ジベカシン、イセパマイシン、テトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、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、テイコブラニン、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、スルファタリジン、リネゾリド、ナリジキシン酸、オキシリニン酸、ノルフロキサシン、ペルフロキサシン、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、ダブトマイシン、ガレノキサシン、ラモブラニン、ファロペネム、ポリミキシン、チゲサイクリン、AZD2563、またはトリメトプリム）、AACが標的にするAgと同じまたは異なる抗原に対する抗体を含む抗菌抗体、血液凝固阻害剤（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）、抗凝固剤（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）、または脂質低下剤（例えばコレステラミン、コレステポール、ニコチン酸、ゲムフィブロジル、プロブコール、エゼチミブ、またはスタチン、例えばアトルバスタチン、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）である。一実施形態では、本発明のAACは、黄色ブ

10

20

30

40

50

ドウ球菌（メチシリン耐性及びメチシリン感受性株を含む）に対する標準治療（SOC）と組み合わせて投与される。MSSAは、通常、典型的に、ナフシリンまたはオキサシリンで治療され、MRSAは、典型的に、バンコマイシンまたはセファゾリンで治療される。

【0255】

これらのさらなる薬剤は、AACの投与の14日、7日、1日、12時間、もしくは1時間以内、またはAACと同時に投与してもよい。さらなる治療剤は、AACと同じまたは異なる薬学的組成物に存在してもよい。異なる薬学的組成物に存在する場合、異なる投与の経路を用いてもよい。例えば、AACを静脈内または皮下投与し、第2の薬剤を経口投与してもよい。

10

【0256】

薬学的製剤

本発明は、WTA - AACを含む薬学的組成物、及びAACを含む薬学的組成物を用いる細菌感染症の治療方法も提供する。このような組成物は、適切な賦形剤、例えば、緩衝液、酸、塩基、糖類、希釈剤、流動促進剤、保存剤等を含む、当該技術分野で公知であり、本明細書に記載される薬学的に許容される賦形剤（担体）をさらに含んでもよい。本発明の方法及び組成物は、単独または感染性疾患を治療するための他の従来方法及び/または薬剤と組み合わせて用いてもよい。いくつかの実施形態では、薬学的製剤は、1) 本発明の抗WTA - AACと、2) 薬学的に許容される担体とを含む。いくつかの実施形態では、薬学的製剤は、1) 本発明のAACと、任意選択的に2) 少なくとも1種のさらなる治療剤とを含む。

20

【0257】

本発明のAACを含む薬学的製剤は、所望の純度を有するAACを、水性溶液または凍結乾燥もしくはその他の乾燥製剤の形で、任意選択的な生理的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することにより、貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、使用される投与量及び濃度でレシipientに対して非毒性であり、緩衝液、例えばリン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、及び他の有機酸、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、保存剤（例えば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、塩化ベンゼトニウム）、フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン、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）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、ショ糖、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール等の糖類、塩形成対イオン、例えばナトリウム、金属錯体（例えばZn - タンパク質錯体）ならびに/あるいは非イオン性界面活性剤、例えばZn - タンパク質錯体）、ならびに/あるいは非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）である。インビボ投与のために用いられる薬学的製剤は、一般的に、滅菌されており、これは、滅菌濾過膜による濾過により容易に達成される。

30

40

【0258】

活性成分はまた、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって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もしくはゼラチン - 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、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロ乳濁液中に取り込まれてもよい。かかる技術は、

50

Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0259】

徐放性調製物が調製されてもよい。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性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形品、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（米国特許番号3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-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、例えばLUPRON DEPOSIT（商標）等の分解性の乳酸-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-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-ビニル酢酸及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは100日を超えて分子の放出が可能であるが、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。カプセルに封入された抗体またはAACが体内に長期間残存する場合、これらは、37℃にて水分への曝露の結果として変性または凝集して、生物学的活性の喪失及び免疫原性の変化の可能性がある。関与する機序に応じて、安定化のために合理的な方策を講じることができる。例えば、凝集機序がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であると見出されたならば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含量を制御し、適当な添加剤を使用し、特定のポリマーマトリクス組成物を開発することにより達成してもよい。

【0260】

AACは、標的細胞/組織への送達のために任意の適切な形に製剤化してよい。例えば、AACは、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よく、リポソームは、哺乳動物に薬物を送達するために有用である。リポソームの成分は、通常、生体膜での脂質構成と同様の二重膜形成で配置される。抗体を含むリポソームは、Epstein et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688、Hwang et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030、US4485045、US4544545、WO97/38731、US5013556号に記載される、当該技術分野で知られる方法によって調製される。

【0261】

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リエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いる逆相エバポレーション法によって作製することができる。リポソームを、規定された孔サイズのフィルタを通して押し出すことにより、所望の直径を有するリポソームを得る。

【0262】

材料及び方法

細菌の菌株：

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

【0263】

細胞外細菌についてのMIC決定

細胞外細菌についてのMICを、トリプシン大豆ブロス中で抗生物質の2倍系列希釈を調製することによって決定した。抗生物質の希釈物は、96ウェル培養皿にて4重に作製された。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。細菌を、抗生物質の存在下で18~24時間37℃で振盪しながら培養し、細菌増殖を、光学濃度(OD)を630nmにて読み取ることによって決定した。MICは、細菌増殖を90%超阻害する抗生物質の用量であると

決定した。

【0264】

細胞内細菌についてのMIC決定

細胞内MICは、マウス腹腔マクロファージの内部に隔離された細菌について決定した（下記、マウス腹腔マクロファージの作製を参照）。マクロファージを24ウェル培養皿に 4×10^5 細胞/mLの密度で播種し、1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、50 µg/mLのゲンタマイシン（細胞外細菌においてのみ活性である抗生物質）を補った成長培地で維持し、細胞外細菌の増殖を阻害し、試験抗生物質を感染から1日後に成長培地に加えた。細胞内細菌の生存を、抗生物質の添加から24時間後に評価した。0.1%ウシ血清アルブミン及び0.1% Triton-Xを補ったHanks緩衝生理食塩水溶液でマクロファージを溶解し、0.05% Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水溶液中で溶解物の系列希釈を作製した。生存細胞内細菌の数を、5%ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天プレート上に播種することによって決定した。

10

【0265】

腹腔マクロファージの単離：

腹腔マクロファージを、6～8週齢のBalb/cマウス（Charles River Laboratories, Hollister, CA）の腹膜から単離した。マクロファージの収率を増やすために、1mLのチオグリコール酸塩培地（Becton Dickinson）の腹腔内注射によりマウスを前処理した。チオグリコール酸塩培地を、水中で4%の濃度で調製し、オートクレーブにより滅菌し、使用前に20日～6カ月間熟成させた。腹腔マクロファージは、チオグリコール酸塩での処置から4日後に、腹腔を冷リン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより採集した。マクロファージを、10%胎児ウシ血清及び10 mM HEPESを補った、抗生物質を含まないダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に 4×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェル培養皿に播種した。マクロファージを終夜培養して、プレートに接着させた。このアッセイは、非食細胞型における細胞内死滅を試験するためにも利用した。MG63（CRL-1427）及びA549（CCL185）細胞株をATCCから得て、10 mM Hepes及び10%胎児ウシ血清を補ったRPMI 1640組織培養培地（RPMI-10）で維持した。HUV EC細胞を、Lonzaから得て、EGM内皮細胞完全培地（Lonza, Walker

20

30

【0266】

オプソニン化したMRSAへのマクロファージの感染：

MRSAのUSA300株（NRS384）を、NARSAレボジトリ（Chantilly, Virginia）から得た。いくつかの実験は、黄色ブドウ球菌のNewman株（ATCC25904）を用いた。全ての実験において、細菌をトリプシン大豆ブロスで培養した。AACでの細胞内死滅を評価するために、USA300を指数関数的に成長する培養物から取り、HB（10 mM HEPES及び0.1%ウシ血清アルブミンを補ったHanks平衡塩類溶液）で洗浄した。AACまたは抗体をHBで希釈し、細菌と1時間インキュベートして、細菌との抗体の結合を可能にし（オプソニン化）、オプソニン化した細菌を用いて、1マクロファージ当たり10～20細菌の割合で（1ウェル当たり250 µLのHB中に 4×10^6 細菌）でマクロファージに感染させた。マクロファージを感染の直前に無血清DMEM培地で予備洗浄し、5% CO₂の湿潤組織培養インキュベータ中で37 °Cでのインキュベーションによって感染させて、細菌の食作用を可能にした。2時間後に、感染ミックスを除去し、通常増殖培地（10%胎児ウシ血清、10 mM HEPESを補ったDMEM）に置き換え、ゲンタマイシンを50 µg/mLに加えて、細胞外細菌の成長を妨げた。インキュベーション期間の終わりに、マクロファージを無血清培地で洗浄し、0.1% triton-X（細胞内細菌に損傷を与えることなくマクロファージを溶解する）を補ったHBで細胞を溶解した。いくつかの実験では、培養上清への細胞質乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の放出を、LDH細胞傷害性検出キット（製

40

50

品 1 1 6 4 4 7 9 3 0 0 1 , R o c h e D i a g n o s t i c s C o r p , I n d i a n a p o l i s , I N) を用いて検出することによって、マクロファージの生存率を培養期間の最後に評価した。上清を回収し、製造者の使用説明書に従って直ちに分析した。0.05% Tween-20 (細菌の凝集を阻害するため) を補ったリン酸緩衝生理食塩水溶液中で溶解物の系列希釈を作製し、生存細胞内細菌の総数を、5% ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に播種することによって決定した。

【0267】

M R S A 感染腹膜細胞の作製。

6 ~ 8 週齢の雌 A / J マウス (J A X (商標) マウス、J a c k s o n L a b o r a t o r i e s) を、 1×10^8 C F U の U S A 3 0 0 の N R S 3 8 4 株に腹腔注射により感染させた。腹腔洗浄液を感染から 1 日後に採集し、感染腹膜細胞を、0.1% B S A を補った H e p e s 緩衝液 (H B 緩衝液) で希釈した $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリゾスタフィンで 30 分間、37 °C で処理した。次いで、腹膜細胞を、2 回、氷冷 H B 緩衝液で洗浄した。腹膜細胞を、10 mM H e p e s 及び 10% 胎児ウシ血清、及び $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のバンコマイソンを補った R P M I 1 6 4 0 組織培養培地で 1×10^6 細胞 / mL に希釈した。好中球死滅に供していない細胞外細菌についての対照として、一次感染からの遊離 M R S A を終夜、4 °C にてリン酸緩衝生理食塩水溶液中に貯蔵した。

【0268】

腹膜細胞から骨芽細胞への感染の移動：

M G 6 3 骨芽細胞株を A T C C (C R L - 1 4 2 7) から得て、10 mM H e p e s 及び 10% 胎児ウシ血清を補った R P M I 1 6 4 0 組織培養培地 (R P M I - 1 0) で維持した。骨芽細胞を 24 ウェル組織培養プレートに播種し、培養して、コンフルエントな層を得た。実験の日に、骨芽細胞を R P M I (補充物なし) で 1 回洗浄した。M R S A または感染腹膜細胞を完全 R P M I - 1 0 で希釈し、感染の直前にバンコマイシンを $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ で加えた。腹膜細胞を骨芽細胞に 1×10^6 腹膜細胞 / mL で加えた。細胞の試料を 0.1% t r i t o n - x で溶解して、感染時の細胞内生細菌の実際の濃度を決定した。全ての感染についての実際の力価を、5% ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に細菌の系列希釈を播種することによって決定した。

【0269】

M G 6 3 骨芽細胞を、4 ウェルガラスチャンバスライドに播種し、10 mM H e p e s 及び 10% 胎児ウシ血清を補った R P M I 1 6 4 0 組織培養培地 (R P M I - 1 0) で、コンフルエントな層を形成するまで培養した。感染の日に、ウェルを無血清培地で洗浄し、感染腹膜細胞の懸濁液または $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のバンコマイシンを補った完全 R P M I - 1 0 で希釈した M R S A の U S A 3 0 0 株に感染させた。感染から 1 日後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で洗浄し、2% パラホルムアルデヒドを用いて P B S 中で室温にて 30 分間固定した。ウェルを 3 回 P B S で洗浄し、0.1% サポニンを含む P B S で 30 分間、室温にて透過にした。

【0270】

感染モデルのインビボ移入：

U S A 3 0 0 原液を、トリプシン大豆ブロス中で活発に増殖する培地からの感染について調製した。細菌を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 3 回洗浄し、アリコート、P B S 25% グリセロール中で - 80 °C で冷凍した。細胞内細菌感染症：A / J マウスを、M R S A の比較的低い用量 (2×10^6 C F U / マウス) で容易に感染したため、これらの実験のために選択した。7 週齢の雌 A / J マウスを、J a c k s o n L a b から得、 5×10^7 C F U の U S A 3 0 0 により腹腔注射によって感染させた。マウスを感染から 1 日後に殺処分し、腹腔を、5 mL の冷 P B S でさっと流した。腹腔洗浄液を 5 分間、1,000 rpm、4 °C にて卓上遠心分離機で遠心分離した。腹腔細胞を含む細胞ペレットを回収し、細胞を、 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリゾスタフィン (C e l l S c i e n c e s I n c . C a n t o n M A , C R L 3 0 9 C) で 37 °C で 20 分間処理して、夾雑細胞外細菌を死滅させた。腹腔細胞を氷冷 P B S で 3 回洗浄して、リゾスタフィンを除去

10

20

30

40

50

した。ドナーマウスからの腹腔細胞をプールし、レシピエントマウスに、尾静脈への静脈内注射によって各レシピエント当たり5匹のドナーから得られた細胞を注射した。生細胞内CFUの数を決定するために、腹腔細胞のサンプルを、0.1% Triton-Xを含むHB(10mM HEPES及び0.1%ウシ血清アルブミンを補ったHanks平衡塩類溶液)中で溶解し、0.05% tween-20を含むPBS中で溶解物の系列希釈を作製した。遊離細菌感染症：A/Jマウスに、腹腔注射のために使用されるグリセロール原液の新鮮なアリコートを用いて様々な用量の遊離細菌を注射した。実際の感染用量を、CFUプレーティングによって確認した。図1Aに示されるデータについては、細胞内細菌における実際の感染用量は、 1.8×10^6 CFU/マウスであり、遊離細菌における実際の感染用量は、 2.9×10^6 CFU/マウスであった。選択されたマウスに、感染直後に静脈内注射によって、単回用量の100mg/Kgのバンコマイソンで処置した。

10

【0271】

非食細胞への感染のインビトロ移入。

MRSA感染腹膜細胞の作製：6～8週齢の雌A/Jマウス(Jackson Lab)を、 1×10^8 CFUのUSA300のNRS384株に腹腔注射により感染させた。腹腔洗浄液を感染から1日後に採集し腹腔洗浄液を感染から1日後に採集し、感染腹膜細胞を、0.1%BSAを補ったHepes緩衝液(HB緩衝液)で希釈した50ug/mLのリゾスタフィンで30分間、37℃で処理した。次いで、腹膜細胞を、2回、氷冷HB緩衝液で洗浄した。腹膜細胞を、10mM Hepes及び10%胎児ウシ血清、及び5ug/mLのバンコマイソンを補ったRPMI 1640組織培養培地で 1×10^6 細胞/mLに希釈した。好中球死滅に供していない細胞外細菌についての対照として、一次感染からの遊離MRSAを終夜、4℃にてリン酸緩衝生理食塩水溶液中に貯蔵した。

20

【0272】

骨芽細胞またはHBMECの感染。MG63細胞株をATCC(CRL-1427)から得て、10mM Hepes及び10%胎児ウシ血清を補ったRPMI 1640組織培養培地(RPMI-10)で維持した。HBMEC細胞(カタログ番号#1000)及びECM培地(カタログ番号#1001)を、SciencCell Research Labs(Carlsbad, CA)から得た。細胞を24ウェル組織培養プレートに播種し、培養して、コンフルエントな層を得た。実験の日に、細胞をRPMI(補充物なし)で1回洗浄した。MRSAまたは感染腹膜細胞を完全RPMI-10で希釈し、感染の直前にバンコマイシンを5ug/mLで加えた。腹膜細胞を骨芽細胞に 1×10^6 腹膜細胞/mLで加えた。細胞の試料を0.1% triton-xで溶解して、感染時の細胞内生細菌の実際の濃度を決定した。全ての感染についての実際の力価を、5%ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に細菌の系列希釈を播種することによって決定した。

30

【0273】

抗黄色ブドウ球菌抗体の作製。

抗ペータ-GlcNAc WTA mAbに対するヒトIgG抗体を、抗体の重及び軽鎖の同族のペアリングを保存するモノクローナル抗体回復技術を用いて、黄色ブドウ球菌感染後の患者からの末梢B細胞からクローニングした。個別の抗体クローンは、哺乳動物細胞のトランスフェクションによって発現させた(Meijer, P. J., Nielsen, L. S., Lantto, J. & Jensen, A. (2009) Human antibody repertoires. Methods Mol Biol 525, 261-277, xiv; Meijer, P. J., et al. (2006) "Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing." Journal of molecular biology 358, 764-772)。完全長IgG1抗体を含む上清を7日後に採集し、ELISAにより抗原結合についてスクリーニングするために用

40

50

いた。これらの抗体は、U S A 3 0 0 から細胞壁調製物との結合については陽性であった。抗体を、その後、2 0 0 m l の一過性トランスフェクションで生成し、プロテインAクロマトグラフィー (M a b S e l e c t S u R e , G E L i f e S c i e n c e s , P i s c a t a w a y , N J) を用いてさらなる試験のために精製した。これらの抗体の単離及び使用法は、地域倫理審査委員会によって承認された。

【 0 2 7 4 】

リンカー薬物の抗体への複合。

抗W T A 抗体 (A b) の T H I O M A B 変異体の構造及び生成を以下のように行った。システイン残基を、抗W T A A b 軽鎖の V a l 2 0 5 位で操作して、その T H I O M A B (商標) システイン操作抗体変異体を生成した。このチオ抗体W T A を、表 2 からの P M L リンカー - 抗生物質中間体に複合した。この抗体は、5 0 倍モル過剰量の D T T の存在下で終夜還元させた。還元剤及びシステインまたはグルタチオンブロックを、H i T r a p S P - H P カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いて精製除去した。この抗体を、5 0 倍モル過剰量のデヒドロアスコルビン酸 (M P B i o m e d i c a l) の存在下で、2 . 5 時間再酸化させた。鎖間ジスルフィド結合の形成を、L C / M S によってモニタリングした。タンパク質にわたって3 倍モル過剰量の P M L リンカー抗生物質中間体を、T H I O M A B で1 時間インキュベートした。抗体薬物複合体は、0 . 2 μ m S F C A フィルター (M i l l i p o r e) を通す濾過によって精製した。過剰な遊離リンカー薬物を、濾過によって除去した。複合体を、透析によって、2 0 m M ヒスチジン酢酸塩 p H 5 . 5 / 2 4 0 m M スクロースに緩衝液交換した。m A b 1 つ当たりの複合したリファマイシン型抗生物質の数を抗生物質 / 抗体比 (A A R) として L C / M S 分析によって定量化した。精製もまた、サイズ排除クロマトグラフィーによって評価した。

【 0 2 7 5 】

質量分光分析

L C / M S 分析を、6 5 3 0 A c c u r a t e - M a s s Q u a d r u p o l e T i m e - o f - F l i g h t (Q - T O F) L C / M S (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) で行った。8 0 に加熱した P R L P - S カラム、1 0 0 0 、8 μ m (5 0 m m \times 2 . 1 m m 、 A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) で試料をクロマトグラフィーに供した。4 . 3 分間で3 0 ~ 6 0 % の B という線形勾配 (溶媒 A 、水中 0 . 0 5 % T F A 、溶媒 B 、アセトニトリル中 0 . 0 4 % T F A) を使用し、溶離液を、エレクトロスプレー源を用いて直接イオン化させた。データを収集し、A g i l e n t M a s s H u n t e r 定性分析ソフトウェアを用いてデコンボリューションした。L C / M S 分析前に、抗体薬物複合体を、リジルエンドペプチダーゼ (W a k o) で、1 : 1 0 0 w / w の酵素対抗体比、p H 8 . 0 で、3 0 分間 3 7 で処理して、分析の容易さのために F a b 及び F c 部分を生成した。抗体に対する抗生物質の比 (A A R) (本明細書においては、抗体に対する薬物の比 (D A R) と同義に使用される) は、M a s s H u n t e r ソフトウェアによって計算された多数の F a b 及び F a b + 1 を用いて計算された。

【 0 2 7 6 】

感染マウスから単離された細菌の分析 : B a l b / c マウスを、静脈内注射によって 1×10^7 C F U の M R S A (U S A 3 0 0) に感染させ、腎臓を感染後 3 日目に採取した。腎臓を、M チューブ及びプログラム R N A 0 1 . 0 1 (M i l t e n y i B i o t e c , A u b u r n , C A) を用いて、2 つの腎臓当たり 5 m L の体積で G e n t l e M A C S 細胞解離器を用いてホモジナイズした。均質化緩衝液は、P B S + 0 . 1 % T r i t o n - X 1 0 0 、1 0 μ g / m L の D N A アーゼ (ウシ脾臓グレード I I 、R o c h e) 、及びプロテアーゼ阻害剤 (完全プロテアーゼ阻害剤カクテル、R o c h e 1 1 - 8 3 6 - 1 5 3 0 0 1) であった。ホモジナイズした後に、試料を室温で 1 0 分間インキュベートし、次いで、氷冷 P B S で希釈し、4 0 μ M の細胞濾過器を通して濾過した。組織均質物を、氷冷 P B S 中で 2 回洗浄し、次いで、H B 緩衝液 (1 0 m M H E P E S 及び 0 . 1 % ウシ血清アルブミンを補った H a n k s 平衡塩類溶液) で 2 つの腎臓当たり 0 .

5 mLの体積で懸濁した。細胞懸濁液を再度濾過し、25 μ Lの細胞懸濁液を各染色反応のために得た。

【0277】

抗MRSA抗体の発現を比較するためのフローサイトメトリー：フローサイトメトリー細菌（ 1×10^7 のインピトロ増殖細菌、または25 μ Lの上述の組織均質物）のために染色する抗体を、HB（上記）で懸濁させ、マウスIgG（SIGMA, I5381）の400 μ g/mL（マイクログラム/ミリリットル）によるインキュベーションによって1時間ブロックした。蛍光標識抗体を、ブロッキング反応物に直接添加し、室温でさらに10～20分間インキュベートした。細菌を、HB緩衝液中で3回洗浄し、次いで、FACS分析の前にPBS 2%パラホルムアルデヒド中で固定した。試験抗体（抗WTA：4497、抗WTA：7578、またはアイソタイプ対照：gD）を、アミン反応試薬（Invitrogen、Alexa Fluor 488のスクシンイミジルエステル、NHS-A488）を用いてAlexa-488で複合した。50 mMのリン酸ナトリウム中の抗体を、5～10倍モル過剰量のNHS-A488で、暗室中で、室温で2～3時間反応させた。標的混合物を、PBS中で平衡化したGE Sepharose S200カラムに適用して、複合抗体から過剰な反応物を除去した。A488分子/抗体の数は、製造業者によって記載されるUV方法を用いて決定した。

10

【0278】

組織均質物における細菌の分析については、非競合抗黄色ブドウ球菌抗体（rF1-Hazenbos, W.L., et al. (2013) Novel staphylococcal glycosyltransferases SdgA and SdgB mediate immunogenicity and protection of virulence-associated cell wall proteins. PLoS Pathog 9, e1003653を、Alexa-647に複合して、同様の大きさの粒子の黄色ブドウ球菌と区別した。試験抗体は、80 ng/mL～50 μ g/mLの用量の範囲で試験された。Beckton Dickinson FACSARIA（BD Biosciences, San Jose CA）を使用してフローサイトメトリーを行い、FlowJo分析ソフトウェア（Flow Jo LLC, Ashland OR）を使用して分析を行った。

20

【0279】

非複製細菌における遊離抗生物質における死滅時間：黄色ブドウ球菌（USA300）は、終夜静止期培養から得られ、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1回洗浄し、50 mLのポリプロピレン遠心分離管中に抗生物質を含まないまたは10 mLの体積で 1×10^{-6} Mの抗生物質を含む、PBS中の 1×10^7 CFU/mLで懸濁させた。細菌を、振盪しながら37℃でインキュベートした。各時点で、3つの1 mLの試料を各培地から除去し、遠心分離して、細菌を回収した。細菌をPBSで1回洗浄して、抗生物質を除去し、生存細菌の総数を、寒天プレート上に系列希釈の細菌を播種することによって決定した。

30

【0280】

遊離抗生物質による生残菌細胞の死滅：黄色ブドウ球菌（USA300）は、終夜静止期培養から得られ、トリプシン大豆ブロス（TSB）中で1回洗浄し、次いで、TSBまたはシプロフロキシシン（0.05 mM）を含むTSBのいずれかを総体積10 mLで、 1×10^7 CFU/mLの最終濃度まで調節した。培養物を、振盪しながら37℃で6時間インキュベートし、次いで、第2の抗生物質であるリファンピシン（1 μ g/mL）または別のリファマイシン型抗生物質（1 μ g/mL）のいずれかを添加した。指示された時間に、試料を各培養から取り出し、PBSで1回洗浄して、抗生物質を除去し、PBS中で再懸濁した。生存細菌の総数を、寒天プレート上に系列希釈の細菌を播種することによって決定した。最終時点で、各培養の残りを回収し、播種した。

40

【0281】

AACについてのカテブシン放出アッセイ：カテブシンBで処理した後、AACから放

50

出された活性抗生物質の量を定量化するために、AACを、カテブシン緩衝液（20 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA、5 mM L-システイン pH 5）中で200 ug/mLまで希釈した。カテブシンB（ウシ膵臓から、SIGMA C7800）を10 ug/mLで添加し、試料を37℃で1時間インキュベートした。対照として、AACを緩衝液のみでインキュベートした。9体積の細菌増殖培地であるトリプシン大豆ブロス pH 7.4（TSB）を添加することによって反応を停止した。活性抗生物質の総放出量を見積もるために、反応混合物の系列希釈を、96ウェルプレートにおいてTSB中で4重に作製し、MRSA（USA300）を、 2×10^3 CFU/mLの最終濃度で各ウェルに添加した。培養物を終夜、振盪しながら37℃でインキュベートし、プレートリーダーを用いて630 nmにて吸光度を読み取ることによって、細菌増殖を測定した。

10

【0282】

ファゴリソソーム処理のためのS4497抗体FRET複合体の合成。

マレイミドFRETペプチドを合成し、S4497システイン操作されたTHIOMAB（商標）抗体に複合した。FRET対は、テトラメチルローダミン（TAMRA）及びフルオレセイン（Fischer, R., et al (2010) Bioconjug Chem 21, 64-73）を使用した。マレイミドFRETペプチドは、PS3ペプチド合成機（Protein Technologies, Inc）を用いて標準的なFmoc固相化学によって合成した。簡潔に言えば、0.1 mmolのRinkアミド樹脂を使用して、C末端カルボキサミドを作製した。N及びC末端基でFmoc-Lys(Mtt)-OHを使用して、樹脂上のMtt（モノメトキシトリチル）基を除去し、TAMRA及びフルオレセインを結合して、さらなる側鎖化学を行った。CBDK-citペプチド模倣薬単位を、カテブシン切断可能なスペーサーとしてFRET対の間に添加した。樹脂から切断された粗マレイミドFRETペプチドまたはマレイミドカプロイル-K（TAMRA）-G-CBDK-cit-K（フルオレセイン）を、Jupiter 5 µm C4カラム（5 µm、10 mm x 250 mm、Phenomenex）を用いて逆相HPLCによってさらなる精製に供した。我々のFRETプローブは、抗体複合体の細胞内トラフィックだけでなく、ファゴリソソーム中のリンカーの処理をモニタリングすることが可能である。無傷抗体複合体は、ドナーからの蛍光共鳴エネルギー移動により赤色のみが蛍光を発する。しかしながら、ファゴリソソーム中のFRET ペプチドの基質切断時、ドナーからの緑色蛍光が出現することが予想される。

20

30

【0283】

マクロファージの内部でリンカーの切断を検出するためのビデオ顕微鏡法

マウス腹腔マクロファージを、マクロファージ細胞内死滅アッセイにおいて記載されるように、完全培地中でチャンバースライド（Ibidi, Verona, WI. カタログ80826）上に播種した。USA300は、37℃で30分間のインキュベーションによって、PBS 0.1% BSA中の100 ug/mLでCell Tracker Violet（Invitrogen C10094）を標識した。標識細菌を、HB緩衝液中で1時間のインキュベーションによって、4497-FRETプローブでオプソニン化した。オプソニン化した細菌を加える直前に、マクロファージを1回洗浄し、細菌を 1×10^7 細菌/mLで細胞に加えた。ファゴサイトーシスのない対照については、マクロファージを、ファゴサイトーシス前及びその間に、60 nMのLatrunculin A（Calbiochem）で30分間前処理した。スライドを、細菌の細胞への添加直後に、顕微鏡上に載せ、ムービーが、CO₂が入った環境チャンバー及びLudixからの温度調節器を装備したLeica SP5共焦点顕微鏡により得られた。Plan Apo CS 40X、N.A.: 1.25、油浸レンズ、ならびにalex 488及びTAMRAをそれぞれ励起するために、488 nm及び543 nmのレーザー線を用いて、画像を合計30分間毎分キャプチャーした。位相画像もまた、543 nmのレーザー線を用いて記録した。

40

【0284】

質量分析法によってマクロファージの内部に放出された抗生物質の定量化。

50

マウス腹腔マクロファージを、HB中の100 µg/mLでAACでオプソニン化したMRSAを用いる細胞内死滅アッセイのために以下に記載される24ウェル組織培養皿中で感染させた。ファゴサイトーシスが完了した後、細胞を洗浄し、250 µLの完全培地+ゲンタマイシンをウェルに加え、この細胞を1時間または3時間インキュベートした。各時点で、上清及び細胞分画を回収し、アセトニトリル(ACN)を75%の最終濃度になるまで添加し、30分間インキュベートした。細胞及び上清抽出物を、N₂(TurboVap)下での蒸発によって凍結乾燥させ、100 µLの50% ACN中で再構成し、濾過し、Ab Sciex QTRAP 6500 LC/MS/MSシステムにおいて分析した。

【0285】

インビトロでの細胞内死滅アッセイ。

非食細胞型：MG63(CRL-1427)及びA549(CCL185)細胞株をATCCから得て、10 mM HEPES及び10%胎児ウシ血清を補ったRPMI 1640組織培養培地(RPMI-10)で維持した。HUVEC細胞を、Lonzaから得て、EGM内皮細胞完全培地(Lonza, Walkersville, MD)で維持した。HBMEC細胞(カタログ番号#1000)及びECM培地(カタログ番号#1001)を、SciencCell Research Labs(Carlsbad, CA)から得た。

【0286】

マウスマクロファージ：腹腔マクロファージを、6~8週齢のBalb/cマウス(Charles River Laboratories, Hollister, CA)の腹膜から単離した。マクロファージの収率を増やすために、1 mLのチオグリコール酸塩培地(Becton Dickinson)の腹腔内注射によりマウスを前処理した。チオグリコール酸塩培地を、水中で4%の濃度で調製し、オートクレーブにより滅菌し、使用前に20日~6カ月間熟成させた。腹腔マクロファージは、チオグリコール酸塩での処置から4日後に、腹腔を冷リン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより採集した。マクロファージを、10%胎児ウシ血清及び10 mM HEPESを補った、抗生物質を含まないダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)に4 × 10⁵細胞/ウェルの密度で24ウェル培養皿に播種した。マクロファージを終夜培養して、プレートに接着させた。

【0287】

ヒトM2マクロファージ：CD14⁺単球を、単球単離キットII(Miltenyi, Cat 130-091-153)を用いて正常ヒト血から精製し、ウシ胎仔血清(FCS)で予めコーティングされた組織培養皿上に1.5 × 10⁵細胞/cm²で播種し、20% FCS + 100 ng/mLのrhM-CSFを含むRPMI 1640培地中で培養した。培地を1日目と7日目に取り替え、培地を5%血清 + 20 ng/mLのIL-4に変更した。マクロファージは、18時間後に使用した。

【0288】

アッセイプロトコル：全ての実験において、細菌をトリプシン大豆ブロスで培養した。抗体抗生物質複合体(AAC)での細胞内死滅を評価するために、USA300を指数関数的に成長する培養物から取り、HB(10 mM HEPES及び0.1%ウシ血清アルブミンを補ったHanks平衡塩類溶液)で洗浄した。AACまたは抗体をHBで希釈し、細菌と1時間インキュベートして、細菌との抗体の結合を可能にし(オプソニン化)、オプソニン化した細菌を用いて、1マクロファージ当たり10~20細菌の割合で(1ウェル当たり250 µLのHB中に4 × 10⁶細菌でマクロファージに感染させた。マクロファージを感染の直前に無血清DMEM培地で予備洗浄し、5% CO₂の湿潤組織培養インキュベータ中で37°Cでのインキュベーションによって感染させて、細菌の食作用を可能にした。2時間後に、感染ミックスを除去し、通常増殖培地(10%胎児ウシ血清、10 mM HEPESを補ったDMEM)に置き換え、ゲンタマイシンを50 µg/mLに加えて、細胞外細菌の成長を妨げた。インキュベーション期間の終わりに、マクロファージを無血清培地で洗浄し、0.1% triton-X(細胞内細菌に損傷を与えることな

10

20

30

40

50

くマクロファージを溶解する)を補ったHBで細胞を溶解した。0.05% Tween-20 (細菌の凝集を阻害するため)を補ったリン酸緩衝生理食塩水溶液中で溶解物の系列希釈を作製し、生存細胞内細菌の総数を、5%ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に播種することによって決定した。

【実施例】

【0289】

実施例1 細胞内MRSAは、従来の抗生物質から保護される

哺乳動物細胞が、抗生物質療法の存在下で、黄色ブドウ球菌に対する保護ニッチを提供するという仮説を確認するために、有効性は、侵襲性MRSA感染症に対する標準治療(SOC)として現在使用されている3つの主要な抗生物質(バンコマイソン、ダプトマイシン、及びリネゾリド)が比較された(表4)。

【0290】

細胞外細菌については、MRSAをトリプシン大豆ブロス中で終夜培養し、MICが増殖を阻止した最小の抗生物質の用量であることを決定した。細胞内細菌については、マウス腹腔マクロファージを、MRSAで感染させ、ゲンタマイシンの存在下で培養して、細胞外細菌を死滅させた。試験抗生物質を、感染してから1日後に、培養培地に加え、生存細胞細菌の総数を24時間後に決定した。臨床的に関連する抗生物質に対して予想された血清濃度が、Antimicrobial Agents, Andre Bryskier, ASM Press, Washington DC (2005)において報告された。

【0291】

表4：液体培養中の細胞外細菌対マウスマクロファージの内部に隔離されている細胞内細菌におけるいくつかの抗生物質での最小阻止濃度(MIC)

抗生物質 (Abx)	細胞外MRSA MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞内MRSA MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	血清Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
バンコシン	1	>100	50
ダプトマイシン	4	>100	60
リネゾリド	0.3	>20	20
アプテシン	0.004	50	20

【0292】

強毒性地域感染型MRSA株USA300を用いたこの分析は、細胞外MRSAが液体培地中の低濃度のバンコマイソン、ダプトマイシン、及びリネゾリドによる増殖阻害に対して高度の感受性を示すが、全ての3つの抗生物質は、臨床的に達成可能な濃度の抗生物質に曝露されたマクロファージの内部に隔離されていた同じMRSA株を死滅させることができなかったことを示した。細胞内病原体を排除する際に比較的効果的であると考えられた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)、浮遊性細菌の増殖(MIC)を阻害するために必要とされる用量と比較して細胞内MRSAを排除するためには6,000倍高い用量を必要とし(表1)、このことは既存の抗生物質の大部分がインピトロ及びインピボの両方で細胞内黄色ブドウ球菌を死滅させる際に効果がない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-Moller, N. (2009) "Intracellular activity

of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model” *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1874 - 1883)。

【0293】

実施例2 細胞内MRSAによる感染の播種

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型浮遊性細菌を比較し、細胞内細菌がインピボでバンコマイソンの存在下で感染を確定することができるかどうかを決定した。4つのコホートのマウスを、ブロス培養から直接得られた黄色ブドウ球菌の生存可能な遊離細菌 (2.9×10^6)、または宿主マクロファージの内部に隔離されていた細胞内細菌 (1.8×10^6) 及びドナーマウスの腹腔感染によって生成された好中球のほぼ当量の用量で静脈注射により感染させ (図1A)、選択された群を、感染直後、次いで、1日1回、バンコマイソンで治療した。マウスを、マウスにおいて黄色ブドウ球菌によって常に定着される器官である腎臓における細菌定着に感染してから4日後に試験した。3つの独立した実験において、浮遊性細菌の当量で感染させたものと比較した細胞内細菌で感染させたマウスの腎臓における同等またはより高い細菌負荷が観察された (図1B)。驚くべきことには、細胞内細菌での感染がこのモデルにおいて浮遊性細菌で感染させた後に十分に定着しない器官である脳のより一貫した定着をもたらすことが見出された (図1C)。さらに、細胞内細菌が、このモデルにおけるバンコマイソン療法にもかかわらず、感染を確定することができたが、浮遊性細菌は確定することができなかった (図1B、図1C)

【0294】

インピトロでのさらなる分析は、細胞内生存が抗生物質回避を促す程度をより定量的に対応した。このために、MG63骨芽細胞を、バンコマイソンの存在下で、浮遊性MRSAまたは細胞内MRSAのいずれかで感染させた。

【0295】

骨芽細胞またはHBMECの感染。MG63細胞株をATCC (CRL - 1427) から得て、10mM Hepes 及び10%胎児ウシ血清を補ったRPMI 1640組織培養培地 (RPMI - 10) で維持した。HBMEC細胞 (カタログ番号#1000) 及びECM培地 (カタログ番号#1001) を、SciencCell Research Labs (Carlsbad, CA) から得た。細胞を24ウェル組織培養プレートに播種し、培養して、コンフルエントな層を得た。実験の日に、細胞をRPMI (補充物なし) で1回洗浄した。MRSAまたは感染腹膜細胞を完全RPMI - 10で希釈し、感染の直前にバンコマイシンを5ug/mLで加えた。腹膜細胞を骨芽細胞に 1×10^6 腹膜細胞/mLで加えた。細胞の試料を0.1% triton-xで溶解して、感染時の細胞内生細菌の実際の濃度を決定した。全ての感染についての実験の力価を、5%ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に細菌の系列希釈を播種することによって決定した。

【0296】

MRSA (遊離細菌) を、培地、培地 + バンコマイソン、または培地 + バンコマイソン中に作付けし、MG63骨芽細胞 (図1E) またはヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC、図1F) の単分子層上に播種した。プレートを遠心分離し、細菌と単分子層との接触を促進した。各時点で、培養上清を回収し、細胞外細菌を回復させるか、または接着細胞を溶解して、細胞内細菌を放出した。

【0297】

バンコマイソンのみに曝露された浮遊性細菌を有効に死滅させた。生存細菌は、培養から1日後には回収されなかった (図1D)。同様の数の浮遊性細菌をMG63骨芽細胞上に播種した場合に、骨芽細胞の侵襲によってバンコマイソンから保護されていた、感染から1日後にMG63細胞と関連する少数の生存細菌 (約0.06%のインプット) が回収された。

【0298】

腹腔細胞の内部に隔離されていたMRSAは、バンコマイソンの存在下で、生存及び感染の効率の両方において劇的な増加を示した。白血病において、約15%の細胞内のMRSAが、バンコマイソンが浮遊性細菌の培養を滅菌した同一の条件下で生存した。細胞内細菌はまた、バンコマイソンの存在下で、MG63骨芽細胞の単分子層を感染させることがより可能であり、バンコマイソンに曝露してから1日後に、2倍の細菌の回収をもたらした(図1D)。さらに、細胞内黄色ブドウ球菌は、遊離生細菌を死滅させたバンコマイソンの濃度への一定の曝露下で、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(示さず)において、24時間の期間にわたってほぼ10倍で増加することが可能であった。抗生物質から死滅するのを防いだ、細胞増殖は、感染した腹腔マクロファージ及び好中球の培養において生じなかった(示さず)。同時に、これらのデータは、骨髄性細胞におけるMRSAの細胞内保有宿主が、活性な抗生物質による治療の存在下でさえ、新たな部位への感染の播種を促進させることができ、細胞内増殖が、絶え間ない抗生物質療法の条件下でさえ、内皮及び上皮細胞において生じ得ることを支持している。

10

【0299】

細胞内黄色ブドウ球菌を特異的に死滅させる試薬を開発するために、抗体及び抗生物質成分は、最大効果のために慎重に選択され、最適化された。以下の実施例は、複合されて、AACを形成する、抗壁テイコ酸ベータ(抗WTA)抗体の選択及びある特定のリファマイシン型抗生物質をもたらす実験及び結果を示す。

20

【0300】

実施例3 抗黄色ブドウ球菌モノクローナル抗体の選択

AACによって送達される抗生物質の量、よってその最終的な有効性は、細菌の表面上の抗体結合部位の数によって限定される。それ故に、インピボでの感染の全ての段階時にMRSAにおいて安定的に発現される高度に豊富な抗原に結合する抗体を選択することは不可欠であった。初期ステップとして、40個の抗黄色ブドウ球菌抗体のパネルを、様々な黄色ブドウ球菌感染症から回復する患者の末梢血から得られるB細胞からクローニングし、精製し、感染したマウスの腎臓から直接単離されたMRSAとの結合についてスクリーニングした。

【0301】

抗体作製、スクリーニング、及び選択

30

略記: MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)、MSSA(メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)、VISA(バンコマイソン中間体耐性黄色ブドウ球菌)、LTA(リポテイコ酸)、TSB(トリプシン大豆ブロス)、CWP(細胞壁調製物)。

【0302】

ヒトIgG抗体を、US8,283,294: "Method for cloning cognate antibodies", Meijer PJ et al. Journal of Molecular Biology 358:764-772(2006)、及びLantto J et al. J Virol. 85(4):1820-33(Feb 2011)に記載されるように、抗体の重及び軽鎖の同族のペアリングを保存するSymplex(商標)技術(Symphogen, Lyngby, Denmark)を用いて黄色ブドウ球菌感染後の患者から末梢B細胞からクローニングし、血漿及びメモリー細胞を、組換え完全長IgGレパートリーのための遺伝子的供給源として用いた。個別の抗体クローンは、Meijer PJ, et al. Methods in Molecular Biology 525:261-277, xiv.(2009)に記載される、哺乳動物細胞のトランスフェクションにより発現させた。完全長IgG1抗体を含む上清を7日後に採集し、一次スクリーニングにおいて、間接的ELISAにより抗原結合についてスクリーニングするために用いた。USA300またはWood46株の黄色ブドウ球菌からの細胞壁調製物との陽性ELISA結合を示すmAbのライブラリーを作製した。抗体を、その後、200mlの一過性トランスフェクションで生成し、プロテインAクロマトグラフィー(MabSelect SuRe, GE Life

40

50

Sciences, Piscataway, NJ)を用いてさらなる試験のために精製した。抗体を大量に産生する場合、抗体は、CHO細胞内で産生された。VL及びVHをコードするベクターを、CHO細胞中にトランスフェクトし、IgGを、プロテインAプロテインA親和性クロマトグラフィーによって細胞培養培地から精製した。

表5：Abを単離するために使用された抗原の一覧

抗原	説明	製造供給元／源	コーティング
WTA	Staph Aからの壁テイコ酸(WTA) カタログ番号R84500 (2mg/バイアル)、ロット番号5E14909.	Meridian Life Sciences	2 μ g/ml
PGN	黄色ブドウ球菌からのペプチドグリカン; カタログ番号77140、ロット番号1396845	Sigma	2 μ g/ml
CW #1	CW USA300、RPMI、鉄除去。静止期	Genentech, 100x	
CW #3	CW USA300, TSB. 静止期	Genentech, 500X	
CW #4	CW Wood46, TSB. 静止期	Genentech, 500X	

CW #1及びCW #3は、常に、ELISAコーティングを作製するために一緒に混合された：

図6は、ELISAによる抗体の一次スクリーニングを要約する。全て(4569を除く)は、USA300細胞壁調製混合物(鉄除去：TSBを96：4の比で)でスクリーニングされる場合に単離された。全てのGlcNAcベータ(6259を除く)、SDR、及びPGN(4479)のmAbはまた、一次スクリーニングにおいてPGN及びWTAが陽性であった。全てのGlcNAcアルファは、USA300 CW混合との混合に対するスクリーニングによってのみ見出された。4569(LTA特異的)は、Wood46 CWPにおけるスクリーニングによって見出された。

【0303】

最高レベルの抗体結合は、WTA上の-O-結合型GlcNAc糖修飾を認識するヒトIgG₁で見出された(表6)。
-O-結合型GlcNAcを認識するモノクローナル抗体による結合はあまり達成しなかった；サイトメガロウイルス(CMV)gDタンパク質に対するアイソタイプ対照抗体は、インビボ由来の黄色ブドウ球菌において発現されたタンパク質Aによりいくつかの最小反応性を示した(図7A)。抗体の抗原特異性は、遺伝学的手段によって決定され、そのため、WTA上の-O-または-O-GlcNAc糖修飾に対する抗体は、それらのそれぞれのグリコシルトランスフェラーゼを欠いている黄色ブドウ球菌株と結合することができなかった(図7Bに例示されるように)。インビボ由来のMRSAに結合する抗体の及ぶ範囲と一致して、抗-O-GlcNAc WTA抗体で作製されたAACは、抗-O-GlcNAc WTA抗体で作製されたものに対して優れた有効性を示した。

【0304】

エクスピボフローサイトメトリーを用いるライブラリーからの抗WTA mAbの選択

このライブラリー内の各mAbを3つの選択基準について検索した：(1)高い抗生物質送達に好ましい可能性がある、対応する同族抗原の高い発現を示す、MRSA表面とのmAb結合の相対的強度、(2)感染中のインビボでのMRSA表面での同族抗原の安定発現を示す、多様な感染組織から単離されたMRSAとのmAb結合の一貫性、及び(3)同族表面抗原の発現の保存を示す、臨床的黄色ブドウ球菌株のパネルとのmAb結合能力。このために、フローサイトメトリーを用いて、様々な感染組織から及び異なる黄色ブドウ球菌株からの黄色ブドウ球菌との反応性について、ライブラリー中のmAbのこれらの予め選択された培養上清の全てを試験した。

【0305】

ライブラリー中の全てのmAbを、MRSA USA300に感染させたマウスからの感染腎臓、脾臓、肝臓、及び肺から、ならびにウサギ心内膜炎モデルにおいてUSA300 COLに感染させたウサギからの心臓または腎臓内のMRSAと結合する能力について分析した。様々な感染組織からの黄色ブドウ球菌を認識する抗体の能力は、黄色ブドウ球菌による広い多様性の異なる臨床感染において治療抗体が活性である可能性を上昇させる。細菌を、器官の採集の際に直ちに、すなわち継代培養なしで分析して、インビトロ培養条件により引き起こされる表現型の変化を妨げた。いくつかの黄色ブドウ球菌表面抗原が、インビトロ培養中に発現されながら、感染組織において発現を喪失した。このような抗原に対する抗体は、感染を治療するために有用である可能性が低い。様々な感染組織におけるこのmAbライブラリーの分析時に、著しい数の抗体についてこの観察が確認され、これらの抗体は、培養からの黄色ブドウ球菌細菌との著しい結合を示したが、試験した感染組織の全てからの細菌との結合がなかった。いくつかの抗体は、全てではないがいくつかの試験した感染組織からの細菌と結合した。したがって、本発明では、我々は、試験した全ての感染条件からの細菌を認識することができる抗体を選択した。評価したパラメータは、(1)抗原存在量の尺度としての相対的蛍光強度、(2)抗原発現の安定性の尺度としての陽性に染色された器官の数、及び(3)同族表面抗原の発現の保存を示す、臨床黄色ブドウ球菌株のパネルとのmAb結合能力であった。試験抗体の蛍光強度は、無関係の抗原、例えばIgG1 mAb抗ヘルペスウイルスgD：5237(以下で参照する)に対するアイソタイプ対照抗体と比べて決定した。WTA-ベータに対するmAbは、最高の抗原存在量を示しただけでなく、試験し、上に明記した全ての感染組織からのMRSAとの非常に一貫した結合も示した。

【0306】

さらに、TSB中でインビトロで培養した以下の黄色ブドウ球菌株：USA300(MRSA)、USA400(MRSA)、COL(MRSA)、MRSA252(MRSA)、Wood46(MSSA)、Rosenbach(MSSA)、Newman(MSSA)、及びMu50(VISA)と結合するこれらのmAbの能力を評価した。抗WTAアルファmAbはそうではないが、抗WTA-ベータmAbは、これらの株の全てと反応性であることが見出された。異なる株との結合の分析は、WTAベータがWTAアルファよりも保存され、よって、AACのために適切であることを示した。

【0307】

実施例4 壁テイコ酸に対する特異性を有する抗体の特徴付け AbのWTA特異性の確認

40mgのペレットにした黄色ブドウ球菌株を、30%ラフィノース、100µg/mlのリゾスタフィン(Cell Sciences, Canton, MA)、及びEDTAフリープロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche, Pleasanton, CA)を補った1mLの10mM Tris-HCl(pH7.4)と37で30分間インキュベートすることにより、黄色ブドウ球菌野生型(WT)株及びWTAを欠く黄色ブドウ球菌突然変異株(TagO; WTA-ヌル株)からの細胞壁調製物(CWP)を作製した。溶解物を11,600×gで5分間遠心分離し、細胞壁成分を含む上清を回収した。免疫ブロット分析のために、タンパク質を4~12%トリス-グリシンゲルで分離し、ニトロセルロース膜(Invitrogen, Carlsbad, CA)に移し、続いて、W

T Aに対する記載する試験抗体またはP G N及びL T Aに対する対照抗体を用いてブロッキングした。

【0308】

免疫プロット法は、W T Aに対する抗体がW T黄色ブドウ球菌からのW T細胞壁調製物と結合したが、W T Aを欠く T a g O株からの細胞壁調製物と結合しなかったことを示す。ペプチドグリカン（抗P G N）及びリポテイコ酸（抗L T A）に対する対照抗体は、両方の細胞壁調製物とよく結合する。これらのデータは、W T Aに対する試験抗体の特異性を示す。

【0309】

i) M R S A表面とのm A b結合の程度を決定するためのフローサイトメトリー

10

感染組織からの全細菌上の表面抗原発現を、以下のプロトコルを用いるフローサイトメトリーにより分析した。感染マウス組織からの細菌の抗体染色のために、6～8週齢の雌C 5 7 B l / 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中の 10^8 C F Uの対数期増殖U S A 3 0 0を静脈内注射した。マウス器官を感染してから2日後に採集した。ウサギ感染性心内膜炎（I E）を、T a t t e v i n P . e t a l . 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 5 4 : 6 1 0 - 6 1 3（2010）に以前に記載されたように確立した。ウサギに、 5×10^7 のC F Uの静止期増殖M R S A株C O Lを静脈内注射し、心臓疣贅を18時間後に採集した。30mg / kgのバンコマイソンでの処置は、 7×10^7 C F Uの静止期での感染から18時間後に、1日2回静脈内で与えた。

20

【0310】

マウスまたはウサギ細胞を溶解するために、g e n t l e M A C S細胞解離器（M i l t e n y i）を用いてMチューブ（M i l t e n y i , A u b u r n , C A）中で組織をホモジナイズし、続いて、0.1% T r i t o n - X 1 0 0（T h e r m o）、10μg / mLのD N A s e I（R o c h e）及びC o m p l e t e M i n iプロテアーゼ阻害剤カクテル（R o c h e）を含むP B S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（B D）に通し、0.1% I g GフリーB S A（S i g m a）及び10mM H e p e s、pH 7.4（H B緩衝液）を補った、フェノールレッドを含まないH B S Sで洗浄した。細菌懸濁液を、次いで、H B緩衝液中で300μg / mLのウサギI g G（S i g m a）と室温（R T）で1時間インキュベートし、非特異的I g G結合をブロックした。細菌を、r F 1またはアイソタイプ対照I g G 1 m A b抗ヘルペス対g D : 5 2 3 7（N a k a m u r a G R e t a l . , J V i r o l 6 7 : 6 1 7 9 - 6 1 9 1（1993））を含む2μg / mLの一次抗体で染色し、次いで、蛍光抗ヒトI g G二次抗体（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）で染色した。マウスまたはウサギの器官デブリからの細菌の分化を可能にするために、20μg / mLのマウスm A b 7 0 2抗黄色ブドウ球菌ペプチドグリカン（A b c a m , C a m b r i d g e , M A）及び蛍光色素標識された抗マウスI g G二次抗体（J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h）を用いて二重染色を行った。細菌を洗浄し、F A C S C a l i b u r（B D）により分析した。フローサイトメトリー分析中に、細菌は、二重蛍光プロットからのm A b 7 0 2でのポジティブ染色についてゲートで制御した。

30

40

【0311】

i i) 黄色ブドウ球菌との結合親和性及びM R S A上の抗原密度の測定

表6は、N e w m a n - S P A株と結合するM R S A抗体の平衡結合分析、及び細菌上の抗原密度を示す。

表6

MRSA抗体	特異性	平均 K_D 、nM (n=2)	抗原密度、平均部位／細菌
4497	b-WTA	2.5	50,000
4462	b-WTA	3.1	43,000
6263	b-WTA	1.4	22,000
6297	b-WTA	1.1	21,000
7578	a-WTA	0.4	16,000
rF1	SDR-glyco	0.3	1600

10

K_D 及び抗原密度は、以下のアッセイ条件下で放射性リガンド細胞結合アッセイを用いることにより導いた：DMEM + 2.5% マウス血清結合緩衝液、室温 (RT) で2時間の溶液結合、及び400,000個の細菌／ウェル。

Ab 6263は、配列が非常に類似するという点において、6078のようである。CDRH3中の2番目の残基 (Gに対してR)を除いて、その他のL及びH鎖CDR配列は全て同一である。

【0312】

実施例5 抗WTA抗体のアミノ酸修飾

要約すると、抗WTAベータAbのそれぞれのVH領域をクローニングし、ヒトH鎖ガンマ1定常領域と結合させ、VLをカッパ定常領域と結合させて、IgG1としてAbを発現させた。以下に記載されるように、抗原結合を維持しながら、野生型配列を、ある特定の位置で改変して、抗体安定性を改善した。次いで、システイン操作Ab (チオMab、THIOMAB (商標)とも称される)を作製した。

20

【0313】

i. 可変領域と定常領域との結合

上記のヒト抗体ライブラリーから同定されたWTAベータAbのVH領域をヒト1定常領域に結合させて、完全長IgG1 Abを作製した。L鎖は、カッパL鎖であった。

【0314】

ii. 安定性変異体の作製

図12 (具体的には、図13A、13B、14A、14Bを参照されたい)中のWTA Abを操作して、ある特定の特性 (脱アミド化、アスパラギン酸異性化、酸化、またはN結合型グリコシル化を回避する)を改善し、アミノ酸置き換え後の抗原結合の保持及び化学安定性について試験した。重鎖または軽鎖をコードするクローンの一本鎖DNAを、QIAprep Spin M13キット (Qiagen)を用いて、大腸菌CJ236細胞中で成長させたM13KO7ファージ粒子から精製した。配列：

5' - CCCAGACTGCACCAGCTGGATCTCTGAATGTACTCCAGTTTGC - 3' (配列番号152)

5' - CCAGACTGCACCAGCTGCACCTCTGAATGTACTCCAGTTTGC - 3' (配列番号153)

5' CCAAGGGTTCCCTGGCCCCAWTMGTCAAGTCCASCWKCA CCTCTTGCACAGTAATAGACAGC - 3' (配列番号154)、及び

5' - CCTGGCCCCAGTCGTCAAGTCCCTCTTCACTCTTGCACAGTAATAGACAGC - 3' (配列番号155) (IUPACコード)を有する5'リン酸化合成オリゴヌクレオチドを用いて、

Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82 (2): 488 - 492に記載される方法に従って、部位特異的突然変異誘発により記載されるようなオリゴヌクレオ

30

40

50

チド特異的部位突然変異誘発により、抗体をコードするクローンを突然変異させた。突然変異DNAを用いて、大腸菌X L 1 - Blue細胞 (Agilent Technologies) を形質転換し、50 µg / ml のカルベニシリンを含むルリアブロスプレート上に播種した。コロニーを個別に採取し、50 µg / ml のカルベニシリンを含むルリアブロスプレート上で成長させた。ミニプレップDNAを配列決定して、突然変異の存在を確認した。

【0315】

Ab 6078について、VH中の2番目のアミノ酸met (met - 2) は、酸化されやすい。したがって、met - 2を、IleまたはValに突然変異させて、残基の酸化を回避した。met - 2の改変は結合親和性に影響する可能性があるため、ELISAによりStaph CWPとの結合について突然変異体を試験した。

10

【0316】

CDR H3「DG」または「DD」モチーフがイソアスパラギン酸に変換されやすいことが見出された。Ab 4497は、CDR H3の96及び97位にDGを含み (図16を参照されたい)、安定性のために改変した。CDR H3は、一般的に、抗原結合のために重要であるため、抗原結合及び化学安定性についていくつかの突然変異体を試験した。突然変異体D96E (v8) は、野生型Ab 4497 (図16) と同様に抗原との結合を保持し、安定であり、イソアスパラギン酸を形成しない。

【0317】

Staph CWP ELISA

20

6078抗体突然変異体の分析のために、 1×10^9 微生物 / ml からなるリゾスタフィン処理USA300 SPA黄色ブドウ球菌細胞調製物 (WT) を0.05炭酸ナトリウムpH9.6中で1/100に希釈し、384ウェルELISAプレート (Nunc; Neptune, NJ) を4で終夜のインキュベーション中にコーティングした。プレートをPBS + 0.05% Tween - 20で洗浄し、PBS + 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) での2時間のインキュベーション中にブロックした。この及びその後の全てのインキュベーションは、穏やかに攪拌しながら室温で行った。抗体試料を試料 / 標準物質希釈緩衝液 (PBS、0.5% BSA、0.05% Tween 20、0.25% CHAPS、5mM EDTA、0.35M NaCl、15ppm プロクリン (pH 7.4)) で希釈し、洗浄したプレートに加え、1.5 ~ 2時間インキュベートした。プレートと結合した抗黄色ブドウ球菌抗体を、アッセイ緩衝液 (PBS、0.5% BSA、15ppm プロクリン、0.05% Tween 20) で40ng / mLに希釈したペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ヒトIgG (Fc) F (ab') 2断片 (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) との1時間のインキュベーション中に検出した。最終洗浄の後に、テトラメチルベンジジン (KPL, Gaithersburg, MD) を加え、5 ~ 10分間発色させ、1Mリン酸を用いて反応を停止した。マイクロプレートリーダーを用いて、プレートを620nmの参照とともに450nmで読み取った。

30

【0318】

iii. Cys操作突然変異体 (チオMab) の作製

40

システインを以前に教示され、以下に記載されるように、H鎖 (CH1において) またはL鎖 (C) に所定の位置にてシステインを導入することにより完全長チオMabを生成して、抗体のリンカー-抗生物質中間体への複合を可能にした (システインアミノ酸は、抗体の重鎖 (HC) または軽鎖 (LC) 中の、鎖内または分子間のジスルフィド結合を形成しない反応部位で操作してもよい (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26 (8): 925 - 932、Dornan et al (2009) Blood 114 (13): 2721 - 2729、US7521541、US7723485、WO2011/156328、WO2009/052249、Shen et al (2012) Nature Biotech., 30 (2): 184 - 191、Junutula et al (2008) Jour of Immu

50

n . Methods 332 : 41 - 52)。次いで、H及びL鎖を、別々のプラスミドにクローニングし、H及びLをコードするプラスミドを293細胞にコトランスフェクトし、それらを発現して、無傷Abを組み立てた。H及びL鎖はともに、同じ発現プラスミドにクローニングすることもできる。H鎖のそれぞれに1つずつ2つの操作されたCys、もしくはL鎖のそれぞれに1つずつ2つの操作されたCysを有するIgG1、または抗体4量体につき4つの操作されたCysをもたらしH鎖及びL鎖のそれぞれにおいて操作されたCysの組み合わせ(HCLCCys)を、cys突然変異鎖と野生型鎖の所望の組み合わせを発現させることにより作製した。

【0319】

図13A及び13Bは、6078 WT、及びHC CysとLC Cysとの組み合わせを有する突然変異体Abを示す。6078突然変異体は、終夜培養物からのプロテインA欠損USA300 Staph Aと結合するそれらの能力についても試験した。FACS分析の結果(データは示さず)から、突然変異体Abは、6078 WT(未改変)抗体と同様に、USA300と結合し、突然変異体におけるアミノ酸の改変は、Staph Aとの結合を損なわなかった。gDは、非特異的陰性対照抗体として使用された。

【0320】

実施例6：抗生物質の選択

リファマイシン型抗生物質は、低ファゴリソソームのpHにおける強力な非改変殺菌活性、細胞内損傷に抵抗する能力、及び抗WTA抗体への複合に適しているプロテアーゼ切断可能な非ペプチド(PML)リンカー試薬にカップリングさせることができる容易さのために選択された。食細胞内細菌が最もゆっくりと複製したため、抗生物質の最適化もまた、AACから放出される場合に、複製しないMRSAを死滅させることが可能であることが必要とされた。

【0321】

MRSAは、静止期の培養物から回収され、抗生物質を含まないまたは 1×10^{-6} Mのリファンピシンまたはリファマイシン誘導体(Rifalog)を含むリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、37でインキュベートした。指定された時点で、培養物の試料を回収し、遠心分離して、抗生物質を除去し、生存細菌の総数を播種することによって決定した。

【0322】

興味深いことに、リファンピシンではなく、リファマイシン型(rifalog)抗生物質の添加により、生存能力があるが、最小のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の終夜インキュベーション後に、非複製の細菌の数の1,000倍を超える減少をもたらした(図8)。同様に、リファマイシン型抗生物質は、古典的に定義された生残菌細胞を死滅させるための能力については、恐らく、休眠状態に入り、成長する培地の抗生物質処理(例えば、シプロフロキサシン)を生き延びる細菌であった(データは示さず)。リファンピシンの添加は、前述の観察に一致して、それらの生存率に影響を及ぼさなかった(Conlon, B. P., et al. (2013) Nature 503, 365 - 370)。それに反して、リファマイシン型抗生物質(rifalog)の添加は、検出の限界を下回る生残菌細胞の根絶をもたらした。これらの結果は、リファマイシン型抗生物質が休眠の非分割細胞を死滅させる驚くべき能力を有する。

【0323】

実施例7：抗WTA抗体 - 抗生物質複合体の調製

抗壁テイコ酸 抗体 - 抗生物質複合体(AAC) 表3を、抗WTA抗体を、表2からのものを含むPMLリンカー - 抗生物質中間体に複合させることによって調製した。複合前に、抗WTA抗体を、WO2004/010957(その教示は、この目的のために参照により組み込まれる)に記載される方法に従う標準的な方法を用いて、TCEPで部分的に還元した。部分的に還元した抗体を、例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 784及びUS2005/0238649 A1に記載される方法に従う標準的な方法を用いて、リンカー抗生物質中間

10

20

30

40

50

体に複合した。簡潔に述べると、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、抗体の還元されたシステイン残基へのリンカー - 抗生物質中間体の複合を可能にした。複合反応を反応停止処理し、A A Cを精製した。各A A Cの抗生物質負荷（1抗体当たりの抗生物質部分の平均数）を決定し、これは、単一システイン突然変異部位で操作された抗細胞壁テイコ酸抗体について、約1から約2の間であった。

【0324】

複合のためのチオM a bの還元/酸化：C H O細胞で発現させた完全長システイン操作モノクローナル抗体（チオM a b - J u n u t u l a , e t a l . , 2 0 0 8 b N a t u r e B i o t e c h . , 2 6 (8) : 9 2 5 - 9 3 2、D o r n a n e t a l (2 0 0 9) B l o o d 1 1 4 (1 3) : 2 7 2 1 - 2 7 2 9、U S 7 5 2 1 5 4 1、U S 7 7 2 3 4 8 5、W O 2 0 0 9 / 0 5 2 2 4 9、S h e n e t a l (2 0 1 2) N a t u r e B i o t e c h . , 3 0 (2) : 1 8 4 - 1 9 1、J u n u t u l a e t a l (2 0 0 8) J o u r o f I m m u n . M e t h o d s 3 3 2 : 4 1 - 5 2) を、約20~40倍過剰のT C E P（トリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩またはD T T（ジチオスレイトール）を用いて、2 m M E D T Aを含む50 m M トリスp H 7 . 5 中で3時間、37℃、または終夜、室温にて還元した（G e t z e t a l (1 9 9 9) A n a l . B i o c h e m . V o l 2 7 3 : 7 3 - 8 0、S o l t e c V e n t u r e s , B e v e r l y , M A)。還元したチオM a bを希釈し、10 m M 酢酸ナトリウム、p H 5 中でH i T r a p S カラムに載せ、0 . 3 M 塩化ナトリウムを含むP B Sで溶出した。あるいは、1 / 20 体積の10 % 酢酸を加えることにより抗体を酸性にし、10 m M コハク酸塩p H 5 で希釈し、カラムに載せ、次いで、10 カラム体積のコハク酸塩緩衝液で洗浄した。カラムは、50 m M トリスp H 7 . 5、2 m M E D T Aで溶出した。

【0325】

溶出した還元チオM a bを、15倍過剰モルのD H A A（デヒドロアスコルビン酸）または200 n M 硫酸銅（C u S O₄）水溶液で処理した。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。周囲空気酸化も効果的であった。再酸化した抗体を20 m M コハク酸ナトリウムp H 5、150 m M N a C l、2 m M E D T A中で透析し、-20℃にて凍結貯蔵した。

【0326】

リンカー - 抗生物質中間体とのチオ - M a bの複合：脱ブロック化し、再酸化したチオ - 抗体（チオM a b）を、50 m M トリス、p H 8 中で6~8倍過剰モルの表2のリンカー - 抗生物質中間体（20 m M の濃度にてD M S Oストックから）と、反応混合物のL C - M S分析により決定される反応が完了するまで（16~24時間）反応させた。

【0327】

次いで、粗抗体 - 抗生物質複合体（A A C）を、20 m M コハク酸ナトリウム、p H 5 で希釈した後にカチオン交換カラムに適用した。カラムを少なくとも10カラム体積の20 m M コハク酸ナトリウム、p H 5 で洗浄し、抗体をP B Sで溶出した。ゲル濾過カラムを用いて、20 m M H i s / 酢酸塩、p H 5 中にA A Cを240 m M スクロースとともに製剤化した。A A Cは、タンパク質濃度を決定するためのU V分光法、凝集分析のための分析S E C（サイズ排除クロマトグラフィー）、及びL C - M Sにより、リジンCエンドペプチダーゼでの処理の前後に特徴付けた。

【0328】

サイズ排除クロマトグラフィーは、0 . 25 m M 塩化カリウム及び15 % I P Aを含む0 . 2 M リン酸カリウム p H 6 . 2 中、0 . 75 m l / 分の流速でS h o d e x K W 8 0 2 . 5 カラムを用いて行った。A A Cの凝集状態は、280 n mでの溶出ピーク面積吸光度の積分により決定した。

【0329】

L C - M S分析を、A g i l e n t Q T O F 6 5 2 0 E S I 装置を用いて行った。例として、この化学を用いて作製したA A Cを、トリス、p H 7 . 5 中の1 : 500 w

10

20

30

40

50

/wエンドプロテイナーゼLys C (Promega)で37℃で30分間処理した。得られた切断断片を、80℃に加熱した1000Å、8µm PLRP-Sカラムに載せ、5分間で30% B ~ 40% Bまでの勾配を用いて溶出した。移動相A: 0.05% TFAを含むH₂O。移動相B: 0.04% TFAを含むアセトニトリル。流速: 0.5 ml / 分。タンパク質溶出は、280 nmでのUV吸光度検出により、エレクトロスプレーイオン化及びMS分析の前にモニタリングした。非複合Fc断片、残存非複合Fab、及び抗生物質-Fabのクロマトグラフィー分解が、通常、達成された。得られたm/zスペクトルを、Mass Hunter (商標)ソフトウェア(Agilent Technologies)を用いてデコンボリューションして、抗体断片の質量を算出した。

10

【0330】

実施例8: 抗生物質の切断及び放出

リファマイシン型抗生物質は、AAC形式で抗WTAmAbと結合した場合に、細胞外細菌を直接死滅させる能力について試験した。AACは、緩衝液のみでインキュベートするか、またはカテプシンBで処理した。得られた反応物の系列希釈を、トリプシン大豆ブロス中のMRSAを含有するウェルに添加し、終夜培養して、十分な活性抗生物質を含有するウェルを同定して、成長を阻止した。

【0331】

予測したように、AACがカテプシンBで前処理して、活性抗生物質を放出しない場合、成長する浮遊性細菌を、無傷抗MRSA AACによる終夜インキュベーションによって損なわれなかった(図9)。AACのカテプシンBによる前処理は、十分な抗生物質活性を放出し、0.6 µg / mLのAACで細菌成長を阻止し、これは、0.006 µg / mLの抗生物質を含有することが予測される。

20

【0332】

抗生物質が細胞へのAACでオプソニン化した細菌の内面化後のみAACから放出されるかどうかを試験するために、リンカーの切断は、AACと同じリンカーを用いて、2つの色素分子に複合されて同じ抗MRSA抗体からなる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)系プローブで試験することができる。MRSAを、FRET複合体でオプソニン化し、マクロファージ培養に添加する。細菌の取り込み及びプローブの切断は、ビデオ顕微鏡によってモニタリングする。AAC上のリファマイシン型抗生物質の放出に類似して、A488プローブの放出によって視覚化されるように、マクロファージによって細菌の取り込み後に、リンカーを、数分以内に切断する。一方、細菌がファゴサイトーシスの阻害剤であるラトランクリンAによるマクロファージの処理により内面化されない場合に、リンカーは無傷のままであった。質量分光分析はまた、遊離抗生物質が実際のAACでコーティングされたMRSAの取り込み後にマクロファージの内部で実際に放出されることを確認するために使用することもできる。

30

【0333】

実施例9 抗WTAPML AACのインビトロの有効性

抗WTACBDK AACは、一次ヒト及びマウスマクロファージによって内在化される場合の黄色ブドウ球菌、及びインビトロでいくつかのヒト細胞株を有効に死滅させる。

40

【0334】

インビトロマクロファージアッセイ。

黄色ブドウ球菌(USA300 NRS384株)を、様々な用量(100 u / mL、10 µg / mL、1 µg / mL、または0.1 µg / mL)の抗WTAAntibody 4497、1抗体当たり2つの抗生物質分子(DAR2)で充填されたAb4497-CBDK-ジメチルpipBOR AAC、または1抗体当たり4つの抗生物質分子(DAR4)で充填された抗WTACBDK-ジメチルpipBOR AACで1時間インキュベートして、抗体の細菌への結合を可能にした。得られたオプソニン化細菌をマウスマクロファージに供給し、37℃でインキュベートして、ファゴサイトーシスを可能にした。2時間後

50

に、感染ミックスを除去し、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシンを補った通常増殖培地に置き換え、あらゆる残りの細胞外細菌を死滅させた。生存細胞内細菌の総数を、トリプシン大豆寒天プレート上に系列希釈のマクロファージ溶解物を播種することによって決定した。

【0335】

実施例10 抗WTA - PML AACのインビボ有効性

マウスにおける黄色ブドウ球菌感染症の治療は、器官内の細胞負荷を数桁低減する。

【0336】

細胞内黄色ブドウ球菌に特異的に向けられている治療薬が感染時に有効であり得るかどうかを決定するために、WTA - PML AACを、マウス静脈内感染モデルにおいて試験した。この実施例は、WTA - PML AACが、マウス静脈内感染モデルにおいて細胞内黄色ブドウ球菌感染症を大いに低減するまたは根絶するのに有効であったことを実証する。

【0337】

腹膜炎モデル。7週齢の雌A/Jマウス(Jackson Laboratories)を、 5×10^7 CFUのUSA300により腹腔注射によって感染させる。マウスを感染から2日後に殺処分し、腹腔を、5 mLの冷リン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS)でさっと流す。腎臓を、静脈内感染モデルについて以下に記載されるように、5 mLのPBS中でホモジナイズする。腹腔洗浄液を5分間、 $1,000 \text{ rpm}$ 、4 にて卓上遠心分離機で遠心分離する。上清を細胞外細菌として回収し、腹膜細胞を含む細胞ペレットを細胞内画分として回収する。細胞を $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のリゾスタフィンで37 で20分間処理して、夾雑細胞外細菌を死滅させる。腹腔細胞を氷冷PBSで3回洗浄して、分析前にリゾスタフィンを除去する。細胞内CFUの数を計数するために、腹腔細胞を0.1% Triton-Xを含むHB(10 mM HEPES及び0.1%ウシ血清アルブミンを補ったHanks平衡塩類溶液)中で溶解し、0.05% tween-20を含むPBS中で溶解物の系列希釈を作製する。

【0338】

マウス静脈内感染モデル

臨床的に関連するためには、AACは、既に確立した細胞内感染症を排除することが可能である必要がある。これを評価するために、治療は、菌血症の発症から24時間後まで遅延させ、この時点でバンコマイソン治療は、最小限に有効である。好中球中の細胞内感染症は急速に確立され、菌血症の少なくとも1つのモデルにおいて、血液中の95%の細菌が、15分以内に好中球の内部にあり⁷、恐らく、バンコマイソンの有効性の減少の主な原因となる。これらの条件下で、単一用量のAACによる治療は、有効であり、等用量の遊離のリファマイシン型抗生物質による治療よりも優れていることが証明された。

【0339】

黄色ブドウ球菌は、ヒト皮膚及び粘膜面の一般的なコロナイザーである。IGIV-ガンマGuard、約10,000人のヒトからプールした免疫グロブリン調製物を含む複数の源のヒト血清の予備分析は、ヒト血清が約 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗黄色ブドウ球菌を含有し、このうちの約70%がWTAのGlcNAc修飾に向けられることを実証した。マウス血清は、かなりのレベルの抗黄色ブドウ球菌抗体を有しない。正常ヒト血清に見出される内因性抗WTA抗体がAACとの結合のために競合され得るかどうかを決定するために、CB17.SCIDマウス(Charles River Laboratories, Hollister, CA)を、血清中の少なくとも $10 \text{ mg}/\text{mL}$ のヒトIgGの一定血清レベルを達成するように最適化された投与レジメンを用いて、ガンマGuard S/D IGIV免疫グロブリン(ASD Healthcare, Brooks KY)で再構成した。IGIVをマウス当たり30 mgの初期静脈内投与用量で投与し、続いて、6時間後に腹腔内(i.p.)注射により15 mg/マウスの第2の用量を投与し、その後、3日連続で腹腔内注射によりマウスあたり15 mgの1日用量を投与した。これらのマウスは、同様に、未処置対照と比較して、MRSAによる感染にかかりやすかった

。

【0340】

マウス（抗体またはAACのそれぞれにおいて $n = 8$ ）を、 1×10^7 CFUのリン酸緩衝生理食塩水中で希釈されたMRSA（USA300 NRS384株）を含むIGIVの初期投与から4時間後に静脈内注射により感染させた。感染したマウスを、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ のS4497裸抗体、または表3からのS4497 AACで処置した。マウスを、静脈内注射による感染から24時間後に、単一用量のAACを与え、感染から4日後に殺処分し、腎臓及び心臓を、5 mLのリン酸緩衝生理食塩水中に採取した。組織試料を、GentleMACS Dissociator（商標）（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を用いてホモジナイズした。1器官当たり回収した細菌の総数は、5% 脱線維素ヒツジ血液を含むトリプシン大豆寒天上にPBS 0.05% Tween中の組織ホモジネートの系列希釈を播種することによって決定した。

10

【0341】

図10中の結果が示すように、潜在的に競合する抗体の存在にかかわらず、単一用量の抗-GlcNAc WTA AAC（S4497-AAC）は、裸抗体と比較して感染した器官内の細菌計数を大幅に低減または根絶した。図10Bは、AAC（DAR2）による処置が腎臓において細菌負荷を約7,000倍低減したことを示す。図10Cは、表3からのAAC（DAR2）による処置が心臓において細菌負荷を約500倍低減したことを示す。インビボ感染モデルにおける裸抗生物質、ジメチルpipBORのみ（AAC中のジメチルpipBORに対して同等のモル濃度で）による処置は、AACとして抗WTA抗体に複合されたジメチルpipBORと比較して有効でなかった。

20

【0342】

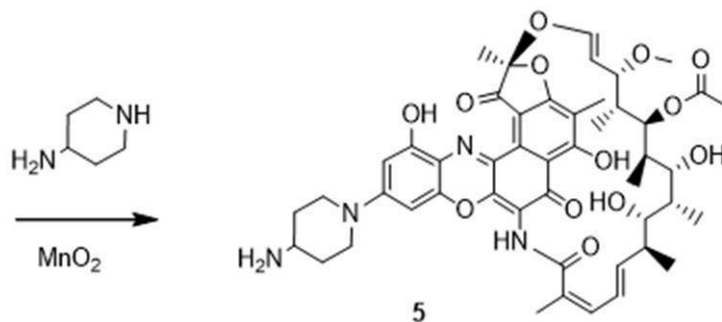
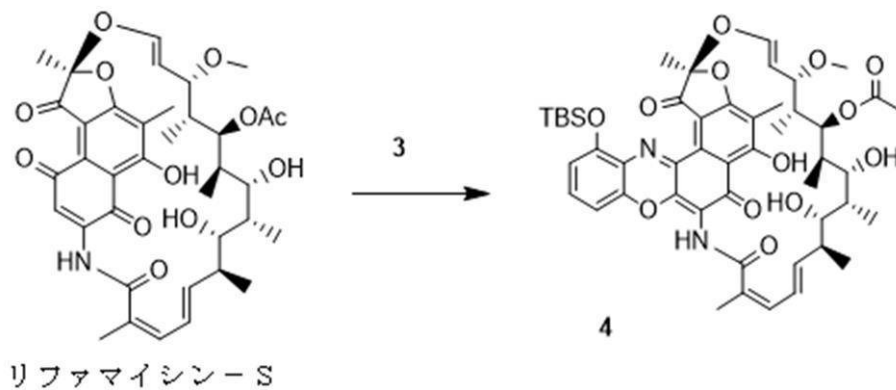
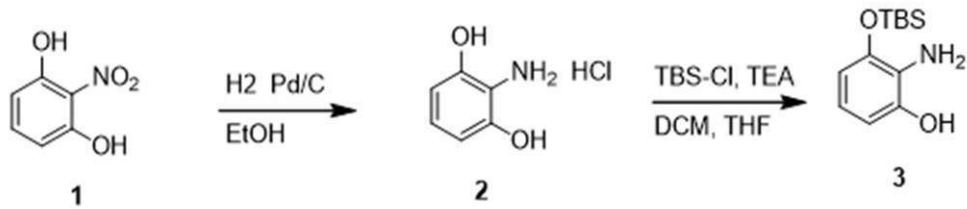
未複合（遊離）の抗WTA抗体は、インビボで有効ではない

図17は、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ の遊離抗体での前処置が静脈内感染モデルにおいて有効でないことを示す。Balb/cマウスに、単回用量のビヒクル対照（PBS）または $50 \text{ mg} / \text{kg}$ の抗体を静脈内注射により与えた30分後に、 2×10^7 CFUのUSA300に感染させた。処置群は、黄色ブドウ球菌と結合しないアイソタイプ対照抗体（gD）、細胞壁タイコ酸のペータ修飾に対する抗体（4497）、または細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対する抗体（7578）を含んだ。対照マウスに、 $110 \text{ mg} / \text{kg}$ のバンコマイシンでの処置を腹腔内注射により（Vanco）1日2回与えた。

30

【0343】

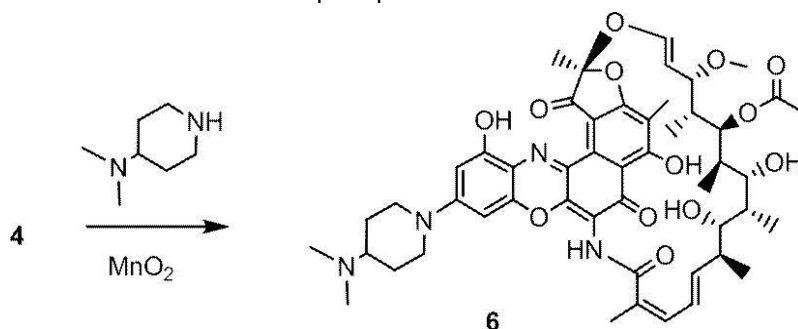
実施例11 ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（pipBOR）5



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 / 炭素触媒を用いて水素ガス下で水素化して、塩酸塩として単離される 2 - アミノベンゼン - 1 , 3 - ジオール 2 を得た。ジクロロメタン / テトラヒドロフラン中の *tert* - ブチルジメチルシリルクロリド及びトリエチルアミンによる 2 のモノ保護により、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。リファマイシン S (ChemShuttle Inc. , Fremont , CA、US 7 3 4 2 0 1 1、US 7 2 7 1 1 6 5、US 7 5 4 7 6 9 2) を、室温でトルエン中の酸化マンガンまたは酸化ガスと酸化縮合によって、3 と反応させて、TBS 保護ベンゾキサジノリファマイシン 4 を得た。LCMS (ESI) : $M + H^+ = 915.41$ 。4 とピペラジン - 4 - アミン及び酸化マンガンとの反応により、ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン (pipBOR) 5 を得た。LCMS (ESI) : $M + H^+ = 899.40$

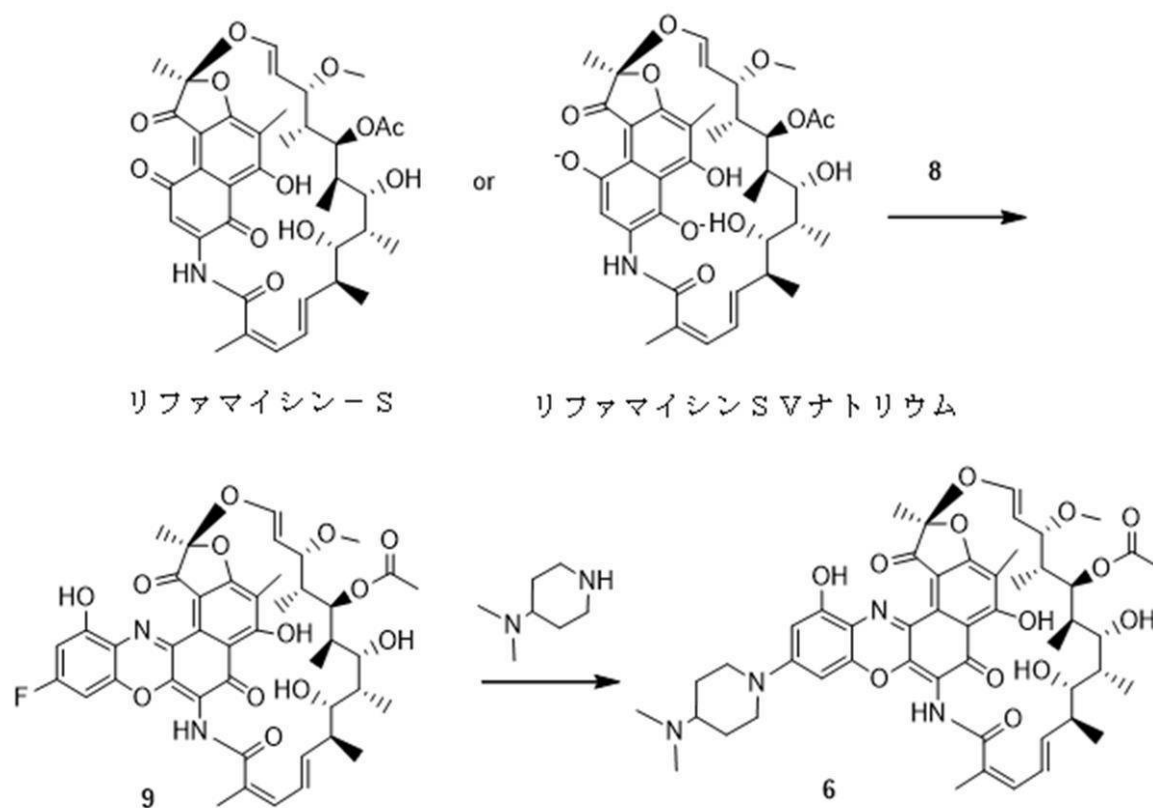
【 0 3 4 4 】

実施例 1 2 ジメチル pipBOR 6



N , N - ジメチルピペラジン - 4 - アミンと TBS 保護ベンゾキサジノリファマイシン 4 との反応により、ジメチルピペリジルベンゾキサジノリファマイシン (ジメチル pipBOR 6) を得た。

B O R) 6 を得た。



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/炭素触媒を用いて水素ガス下で水素化して、ベンジル基を除去して、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): $M + H^+ = 144.04$ 。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、エチルアセテート中の空気またはフェリックス化カリウム中の酸化縮合によって2-アミノ-5-フルオロベンゼン-1,3-ジオール8と60 で反応させて、フルオロベンゾジサジノリファマイシン9を得た。フルオロのN,N-ジメチルピペラジン-4-アミンとの置換により、ジメチルpipBOR 6を得た。LCMS(ESI): $M + H^+ = 927.43$

【0345】

実施例13 (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

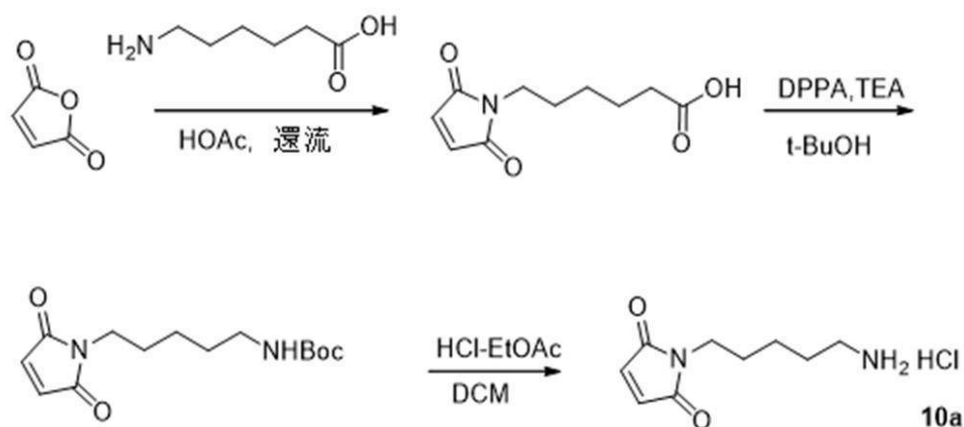
ステップ1: 1-(5-アミノペンチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン塩酸塩10aの調製

10

20

30

40



10

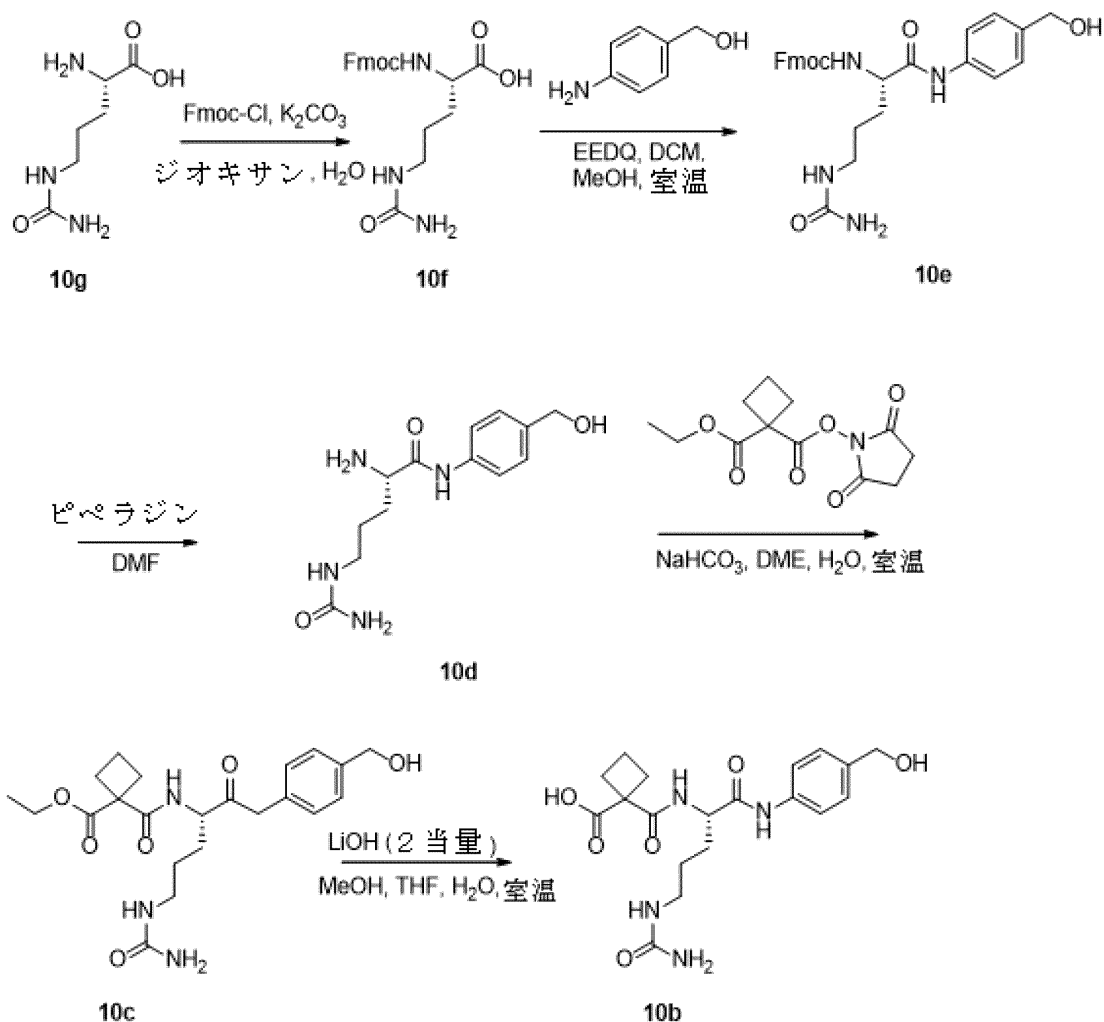
無水マレイン酸、フラン - 2, 5 - ジオン (150 g、1.53 mol) を、HOAc (1000 mL) 中の 6 - アミノヘキサン酸 (201 g、1.53 mol) の攪拌溶液に添加した。混合物を室温で 2 時間攪拌した後に、それを還流で 8 時間加熱した。有機溶媒を、減圧下で除去し、残渣を EtOAc (500 mL × 3) で抽出し、H₂O で洗浄した。合わせた有機層を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濃縮して、粗生成物を得た。それを石油エーテルで洗浄して、白色固体として 6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ヘキサン酸 (250 g、77.4%) を得た、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、N₂ 下で、還流で 8 時間加熱した。混合物を濃縮し、残渣をシリカゲル (PE : EtOAc = 3 : 1) 上のカラムクロマトグラフィーによって精製して、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) を滴加した。混合物を室温で 5 時間攪拌した後に、それを濾過し、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) : 8.02 (s, 2H), 6.99 (s, H), 3.37 - 3.34 (m, 2H), 2.71 - 2.64 (m, 2H), 1.56 - 1.43 (m, 4H), 1.23 - 1.20 (m, 2H)。

20

30

【0346】

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

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 でゆっくりと添加した。反応混合物を2時間にわたって室温まで加温した。有機溶媒を減圧下で除去し、水スラリーを6M HCl 溶液で $\text{pH} = 3$ に調整し、 EtOAc (100 mL \times 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

【0347】

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当量) 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. 番号 16357-59-8 (3.2 g、13 mmol、1.3当量) を添加した。混合物を N_2 下、室温で16時間攪拌した後に、それを濃縮して、茶色固体を得た。MTBE (200 mL) を添加し、それを15で2時間攪拌した。固体を濾過によって回収し、MTBE (50 mL \times 2) で洗浄して、橙色固体として(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

【0348】

50

乾燥DMF (20 mL) 中の10e (4.2 g、8.3 mmol) の攪拌溶液に、ピペラジン (1.65 mL、17 mmol、2 当量) を室温で滴加した。混合物を室温で30分間攪拌し、固体沈殿物を形成した。乾燥DCM (50 mL) を添加し、混合物がすぐに透明になった。混合物を室温でさらに30分間攪拌し、LCMSは10eが消費したことを示した。減圧下で乾燥するまで濃縮し (ピペラジンが残留しないことを確実にし)、残渣を、EtOAcとH₂O (50 mL / 20 mL) とに分けた。水相をEtOAc (50 mL × 2) で洗浄し、濃縮して、油性残余として (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) を得た。

【0349】

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. 番号3779 - 29 - 1) を、塩基水溶液で、半酸ノエステル1, 1 - シクロブタンジカルボン酸、1 - エチルエステル (CAS Reg. 番号54450 - 84 - 9) に限定された鹼化し、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ラート、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ラートとも呼ばれる、CAS 番号125700 - 67 - 6, Sigma - Aldrich B - 2903) 、及びN - ヒドロキシスクシンイミド等のカップリング試薬で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活性化によって変換した。

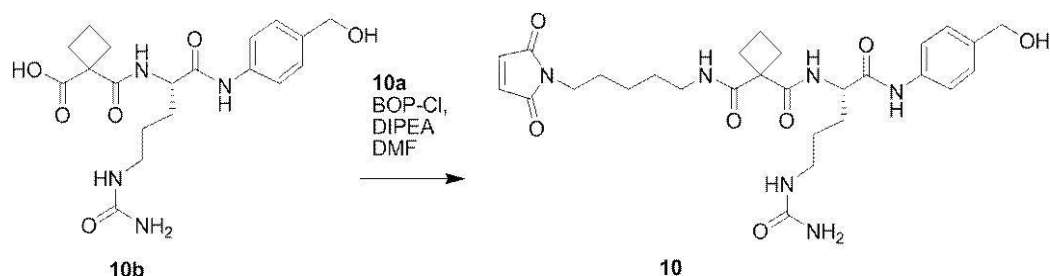
【0350】

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、水 (30 mL) 中の10d (6.0 g、21.4 mmol) 及びNaHCO₃ (7.48 g、89.0 mmol) の溶液を添加した。混合物を室温で16時間攪拌した後、それを減圧下で乾燥するまで濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (DCM : MeOH = 10 : 1) によって精製して、白色固体として (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]

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、H₂O (20 mL) 中のLiOH · H₂O (1.2 g、28.6 mmol) の溶液を室温で添加した。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、得られた残渣を分取HPLCによって精製して、(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) 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)。

【0351】

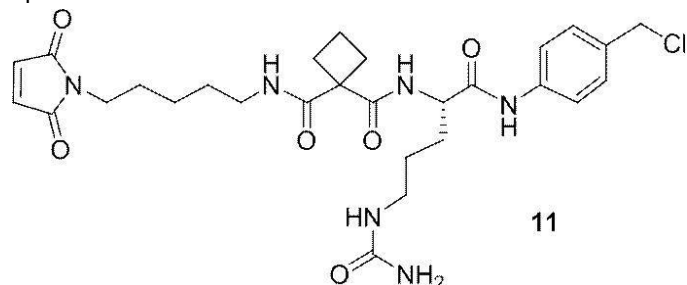
ステップ3 : (S) - N - (5 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) ペンチル) - N - (1 - (4 - (ヒドロキシメチル) フェニルアミノ) - 1 - オキソ - 5 - ウレイドペンタン - 2 - イル) シクロブタン - 1, 1 - ジカルボキサミド10の調製



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. 番号 68641-49-6, Sigma-Aldrich, 692 mg、2.71 mmol) を、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) の溶液に 0 で添加し、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 時間撹拌した。反応混合物をクエン酸溶液 (10 mL) で反応停止し、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 (DCM:MeOH = 10:1) 上のカラムクロマトグラフィーによって精製して、MC-CBDK-cit-PAB-OH としても称される、(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%) を得た。LCMS (ESI): $M+H^+ = 571.28$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 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)。

【0352】

実施例 14 (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

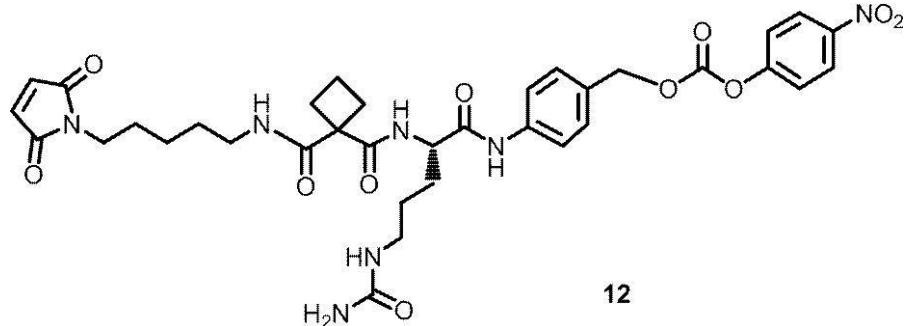


N,N-ジメチルホルムアミド、DMF、またはN-メチルピロリドン、NMP (50 mL) 中の (S)-N-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチル)-N-(1-(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)シクロブタン-1,1-ジカルボキサミド 10 (2.0 g、3.5 mmol) の溶液を、塩化チオニル、 SOCl_2 (1.25 g、10.5 mmol) で 0 で少量ずつ滴加した。反応物は、黄色のままであった。反応物を、90%超の変換を示す LC/MS によってモニタリングした。反応混合物を 20

で30分間または数時間攪拌した後、それを水(50 mL)で希釈し、EtOAc(50 mL × 3)で抽出した。有機層を乾燥させ、濃縮し、フラッシュカラム(DCM: MeOH = 20:1)によって精製して、灰色固体としてMC-CBDK-cit-PAB-C1とも称される、11を形成した。LCMS: (5-95、AB、1.5分)、0.696分、 $m/z = 589.0 [M+1]^+$ 。

【0353】

実施例15 (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-ニトロフェニル炭酸塩12

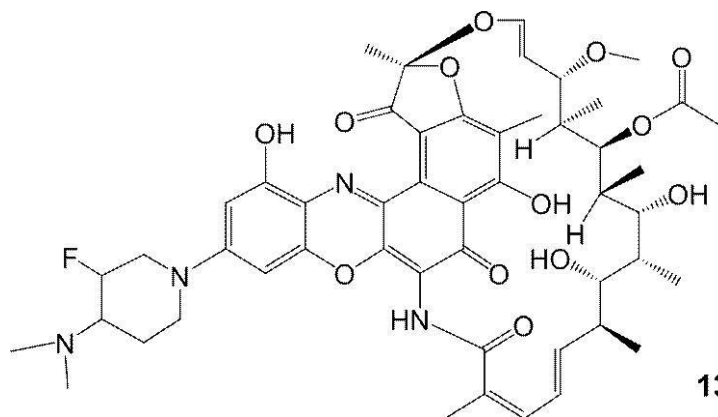


12

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)を添加し、続いて、PNP炭酸塩(ビス(4-ニトロフェニル)炭酸塩)を添加した。反応溶液を室温(r.t.)で4時間攪拌し、混合物を分取HPLCによって精製して、12を得た。LCMS(ESI): $M+H^+ = 736.29$ 。

【0354】

実施例16 MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチル、フルオロpipBOR)-PLA-1の調製



13

PLA-2における手順後、(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及びフッ素化リファマイシン誘導体、ジメチルフルオロpipBOR13(LCMS(ESI): $M+H^+ = 945.43$)を反応させて、MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチル、フルオロpipBOR)-PLA-1、表2を形成した。LCMS(ESI): $M+H^+ = 1499.7$

【0355】

実施例17 MC-(CBDK-cit)-PAB-(ジメチルpipBOR)-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

10

20

30

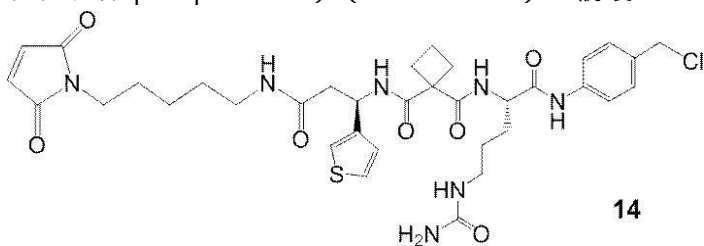
40

50

- 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 - 1 H - 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 1 1 (0 . 0 3 5 m m o l) を 0 に冷却し、ジメチル p i p B O R 6 (1 0 m g 、 0 . 0 1 1 m m o l) を添加した。混合物をさらに 0 . 5 m L の D M F で希釈した。空気に開放し、3 0 分間撹拌した。N , N - ジイソプロピルエチルアミン (D I E A 、 1 0 μ L 、 0 . 0 5 m m o l) を添加し、反応物を空気に開放し、終夜撹拌した。L C / M S により、5 0 % の所望の生成物を観察した。さらに 0 . 2 当量の N , N - ジイソプロピルエチルアミン塩基を添加したが、反応物が処理を停止すると思われるまで、空気に開放し、さらに 6 時間撹拌した。反応混合物を、D M F で希釈し、H P L C (H ₂ O 中 2 0 ~ 6 0 % A C N / H C O O H) 上に精製して、M C - (C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル p i p B O R) - P L A - 2 、表 2 を得た。L C M S (E S I) : M + H ⁺ = 1 4 8 1 . 8 、収率 3 1 % 。

【 0 3 5 6 】

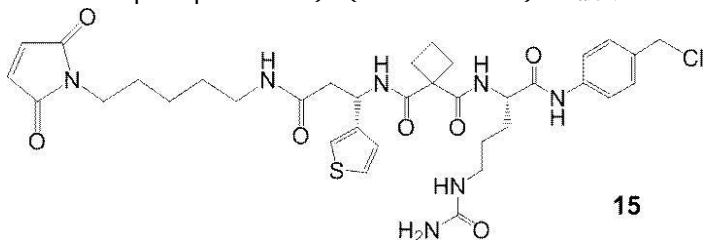
実施例 1 8 M C - ((R) - チオフェン - 3 - イル - C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル p i p B O R) (P L A - 3) の調製



P L A - 2 における手順後、(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 - 1 H - ピロール - 1 - イル)ペンチルアミノ) - 3 - オキソ - 1 - (チオフェン - 3 - イル)プロピル)シクロブタン - 1 , 1 - ジカルボキサミド 1 4 (L C M S (E S I) : M + H ⁺ = 7 4 2 . 3) 及びジメチル p i p B O R 6 を反応させて、M C - ((R) - チオフェン - 3 - イル - C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル p i p B O R) (P L A - 3 、表 2) を得た。L C M S (E S I) : M + H ⁺ = 1 6 3 3 . 9

【 0 3 5 7 】

実施例 1 9 M C - ((S) - チオフェン - 3 - イル - C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル p i p B O R) (P L A - 4) の調製



P L A - 2 における手順後、(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 - 1 H - ピロール - 1 - イル)ペンチルアミノ) - 3 - オキソ - 1 - (チオフェン - 3 - イル)プロピル)シクロブタン - 1 , 1 - ジカルボキサミド 1 5 (L C M S (E S I) : M + H ⁺ = 7 4 2 . 3) 及びジメチル p i p B O R 6 を反応させて、M C - ((R) - チオフェン - 3 - イル - C B D K - c i t) - P A B - (ジメチル p i p B O R) (P L A - 4 、表 2) を得た。L C M S (E S I) : M + H ⁺ = 1 6 3 3 . 9

【 0 3 5 8 】

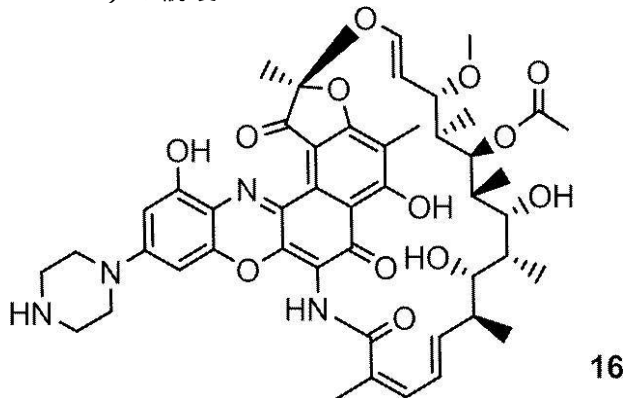
実施例 2 0 M C - (C B D K - c i t) - P A B C - (p i p B O R) (P L A - 5)

の調製

ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン (pipBOR) 5 (15 mg、0.0167 mmol)、次いで、(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-ニトロフェニル炭酸塩 12 (12 mg、0.0167 mmol) をバイアル中で重さを量った。ジメチルホルムアミド、DMF (0.3 mL) を添加し、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 時間撹拌した。反応溶液を、HPLC (30 ~ 70 % MeCN / 水 + 1 % ギ酸) によって直接精製して、MC-(CBDK-cit)-PABC-(pipBOR) (PLA-5、表 2) を得た。LCMS (ESI): $M + H^+ = 1496.5$

10

実施例 21 MC-(CBDK-cit)-PABC-(piperazBTR) (PLA-6) の調製



20

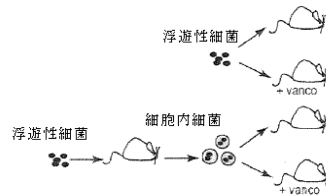
PLA-5 における手順後、ピペラジンリファマイシン誘導体、piperazBOR 16 (LCMS (ESI): $M + H^+ = 885.4$) 及び (S)-4-(2-(1-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ペンチルカルバモイル)シクロブタンカルボキサミド)-5-ウレイドペンタンアミド)ベンジル 4-ニトロフェニル炭酸塩 12 を反応させて、MC-(CBDK-cit)-PABC-(piperazBTR) (PLA-6、表 2) を得た。LCMS (ESI): $M + H^+ = 1482.5$

30

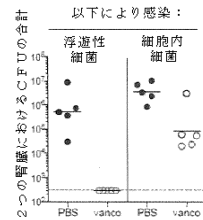
【0359】

上述の発明は、明確な理解を目的として、例示説明及び例により、ある程度詳細に記載されたが、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。本明細書を通じ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。

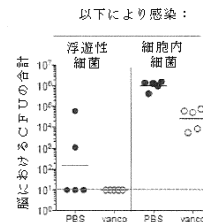
【図 1 A】



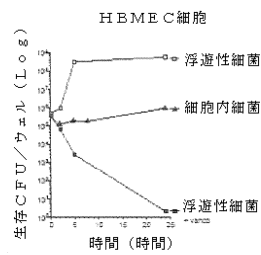
【図 1 B】



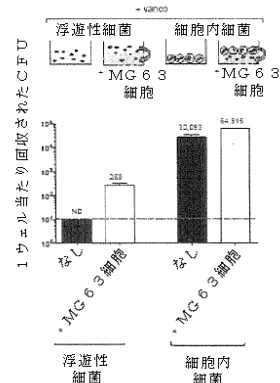
【図 1 C】



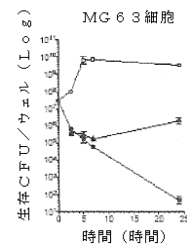
【図 1 F】



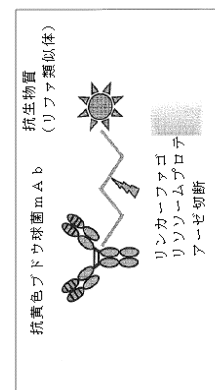
【図 1 D】



【図 1 E】

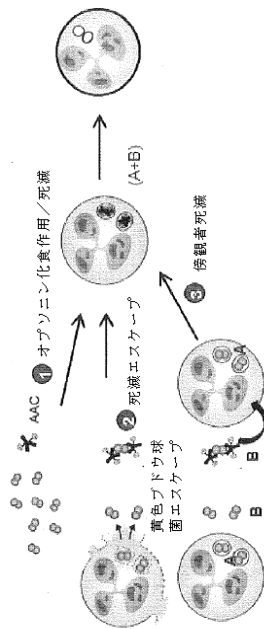


【図 2】

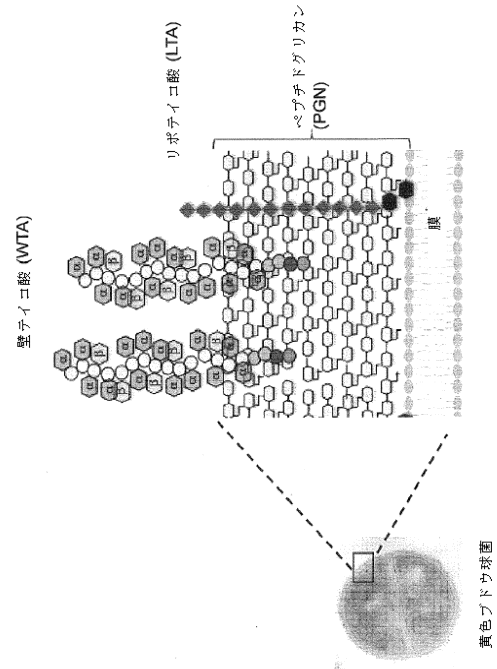


● TAC の概念：
抗生物質は、ファゴリソソームプロテアーゼによって TAC から放出される

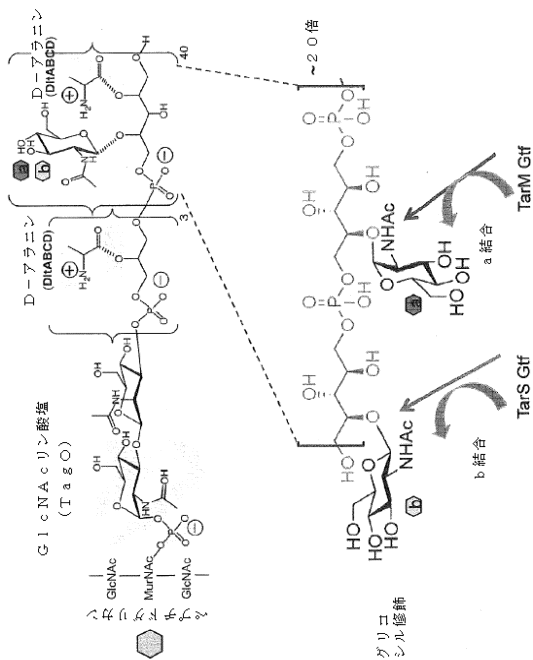
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A 】

抗体	抗原	GlueMac	KD(nM)	抗原密度 平均部位 細菌	トナ ー	源細胞	一次スクリーニング A 5 におけるユー ティンク (複数を告む) への結合 (EU/SA)
4487	WTA	ベータ	2.5	50	327	PBPC	WTA: FGN CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
4482	WTA	ベータ	3.1	43	326	sMBC	WTA: FGN CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
4450	WTA	ベータ			326	sMBC	WTA: FGN CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
4487	WTA	ベータ			327	PBPC	WTA: FGN CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6078	WTA	ベータ	346		346	sMBC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
5293	WTA	ベータ	1.4	22,000	350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6287	WTA	ベータ	1.1	21,000	350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6238	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6292	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6232	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6259	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
5293	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)
6255	WTA	ベータ			350	PBPC	PGN-WTA (1:1), CW USA300 sdel (棄除去: TSB が 96.4 の比で)

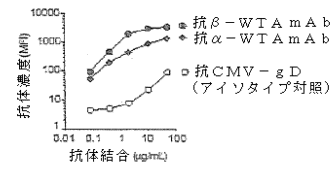
6 A

6 B

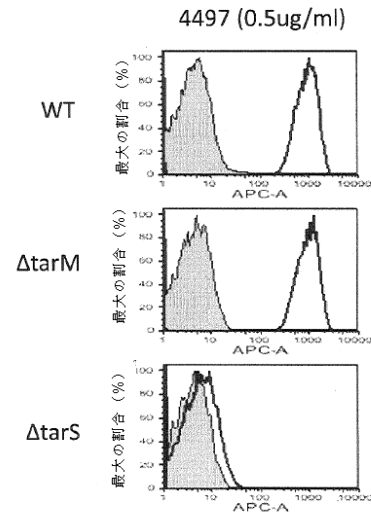
【図 6 B】

446(7574)	WTA	アルブ				CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
4624(7575)	WTA	アルブ	0.4	16		CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
4589	WTA	アルブ				CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
6267	WTA	アルブ				CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
4516(7577)	SDR タンパク質	?	0.3	1800		
8234	SDR タンパク質	?				WTA PGN; CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
8380	SDR タンパク質	?				PGN+WTA (1:1); CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
4589	LTA	?				PGN+WTA (1:1); CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)
4479	PGN					CW Woc448 sHd TSB
						WTA PGN; CW USA300 sHd (精除去:TSBが96:4の比で)

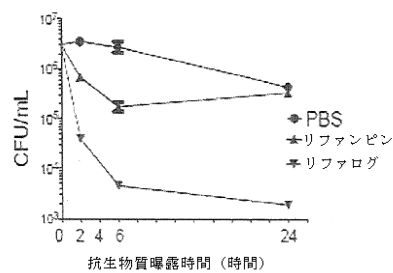
【図 7 A】



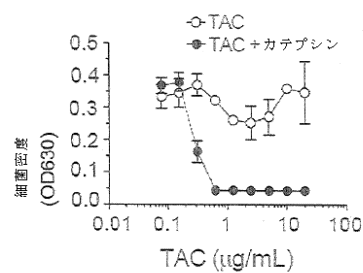
【図 7 B】



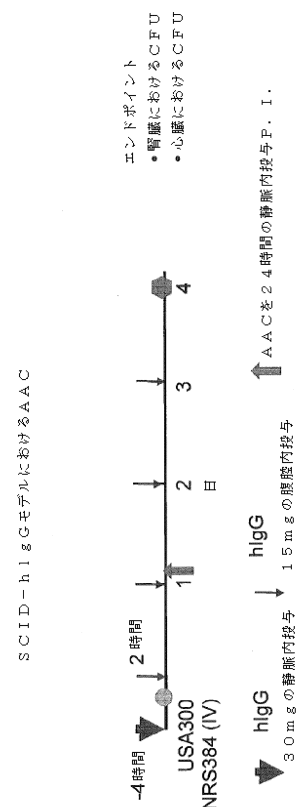
【図 8】



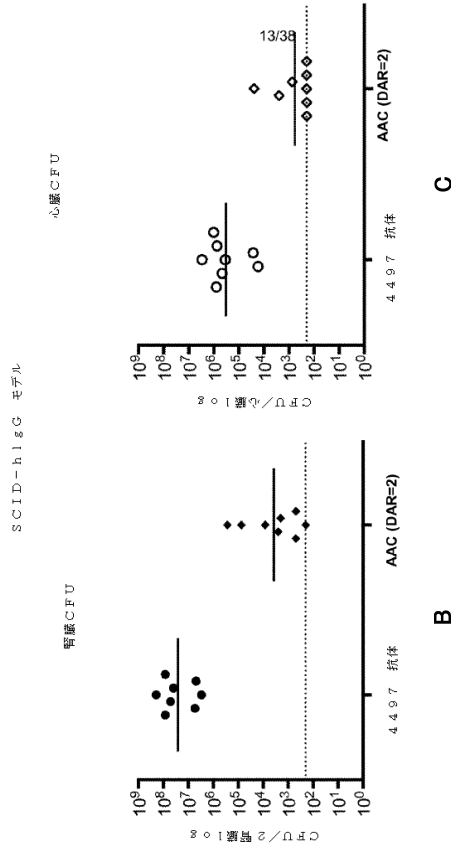
【図 9】



【図 10 A】



【図 10B - C】



【図 11A】

Kabaat定義に従うCDR配列に下線を付す
軽鎖可変領域

Kabaat番号	CDR1-H3	CDR2-Kabat	CDR3-Kabat
4461	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
4624	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
4399	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
6267	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL

【図 11B】

Kabaat定義に従うCDR配列に下線を付す
重鎖可変領域

Kabaat番号	CDR1-H3	CDR2-Kabat	CDR3-Kabat
4461	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
4624	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
4399	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL
6267	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL	SSLVKGAIGRYFDL

【図 12】

抗体	CDR1-L	CDR1-2	CDR1-3	CDR1-H	CDR1-2	CDR1-3
6078	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6263	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
4450	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6297	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6239	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6232	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6259	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6292	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
4462	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6265	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
6233	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
4497	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)
4487	RASQINAWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QNTYSYIN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNSNGTGYAQKFG (配列番号37)	CDR1-3 (配列番号38)

6263は、6078と同じCDR配列を有する

【図 13 A - 1】

Kabat 定義に従う CDR 配列に下線を付す

軽鎖

CDR L1 - 接頭	
CDR L1 - Chothia	CDR L1 - Kabat
Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR L2 - 接頭	
CDR L2 - Chothia	CDR L2 - Kabat
Kabat 番号 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR L3 - 接頭	
CDR L3 - Chothia	CDR L3 - Kabat
Kabat 番号 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078

【図 13 A - 2】

Kabat 定義に従う CDR 配列に下線を付す

重鎖

CDR H1 - 接頭	
CDR H1 - Chothia	CDR H1 - Kabat
Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H2 - 接頭	
CDR H2 - Chothia	CDR H2 - Kabat
Kabat 番号 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H3 - 接頭	
CDR H3 - Chothia	CDR H3 - Kabat
Kabat 番号 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078

【図 13 B - 1】

重鎖

CDR H1 - 接頭	
CDR H1 - Chothia	CDR H1 - Kabat
Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H2 - 接頭	
CDR H2 - Chothia	CDR H2 - Kabat
Kabat 番号 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H3 - 接頭	
CDR H3 - Chothia	CDR H3 - Kabat
Kabat 番号 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078

【図 13 B - 2】

軽鎖

CDR H1 - 接頭	
CDR H1 - Chothia	CDR H1 - Kabat
Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H2 - 接頭	
CDR H2 - Chothia	CDR H2 - Kabat
Kabat 番号 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078
CDR H3 - 接頭	
CDR H3 - Chothia	CDR H3 - Kabat
Kabat 番号 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126	
6078.v2HC-Os	6078
6078.v2LC-Os	6078
6078.v3HC-Os	6078
6078.v3LC-Os	6078
6078.v4HC-Os	6078
6078.v4LC-Os	6078
6078.v4HLC-Os	6078

【 図 1 3 B - 3 】

[illegible]

【 図 1 3 B - 4 】

王 王 番号	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

【 図 1 4 A - 1 】

[illegible]

【 図 1 4 A - 2 】

[illegible]

Kabat 定義に従うCDR配列に下線を付す

【 図 1 4 B - 1 】

[illegible]

【 図 1 4 B - 3 】

[illegible]

【 図 1 4 B - 2 】

[illegible]

【 図 1 5 A - 1 】

Kabat定義に従うCDR配列に下線を付す

[illegible]

【図 15 A - 2】

		CDR L3 - 情報		CDR L3 - Chothia		CDR L3 - Kabat		定常領域		E u 番号	
Kabat 番号	E u 番号	6078	6263	4450	6297	6239	6232	6259	4462	6265	4487
6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078
6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263
4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450
6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297
6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239
6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232
6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259
4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462
6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265
4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487

【図 15 B - 1】

		CDR H1 - 情報		CDR H1 - Chothia		CDR H1 - Kabat		定常領域		E u 番号	
Kabat 番号	E u 番号	6078	6263	4450	6297	6239	6232	6259	4462	6265	4487
6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078
6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263
4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450
6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297
6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239
6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232
6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259
4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462
6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265
4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487

【図 15 A - 3】

		CDR H3 - 情報		CDR H3 - Chothia		CDR H3 - Kabat		定常領域		E u 番号	
Kabat 番号	E u 番号	6078	6263	4450	6297	6239	6232	6259	4462	6265	4487
6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078
6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263
4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450
6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297
6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239
6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232
6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259
4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462
6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265
4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487

【図 15 B - 2】

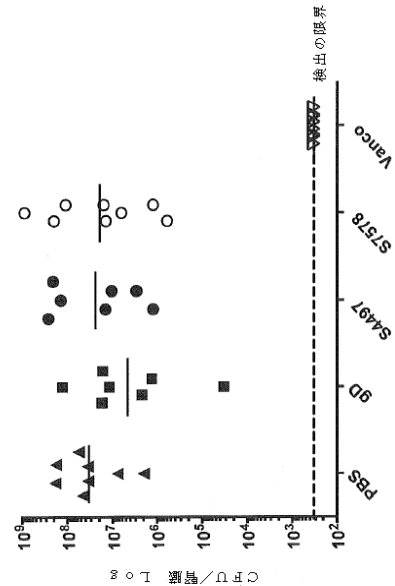
		CDR H2 - 情報		CDR H2 - Chothia		CDR H2 - Kabat		定常領域		E u 番号	
Kabat 番号	E u 番号	6078	6263	4450	6297	6239	6232	6259	4462	6265	4487
6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078	6078
6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263	6263
4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450	4450
6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297	6297
6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239	6239
6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232	6232
6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259	6259
4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462	4462
6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265	6265
4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487	4487

・アスタリスクによって印を付けた軽鎖 Eu205位は、薬物模合のためにCy8に変更するトリプルである。

【図 16】

	WT (v1)	A	R	G	95	96	97	98	99	100	101	102	ELISA
				D	D	D	G	G	L	D	D	D	+++
	v7			D	D	D	G	G		E	E	E	+
	v2			D	D	D	G	G		Y	Y	Y	+
	v4			D	D	D	A	A		D	D	D	+
	v19			D	D	D	A	A		E	E	E	+/-
	v8			E	E	E	G	G		D	D	D	+++
	v20			E	E	E	G	G		E	E	E	+/-
	v5			A	A	A	G	G		D	D	D	+++
	v11			A	A	A	G	G		E	E	E	+
	v18			A	A	A	G	G		Y	Y	Y	+

【図 17】



【配列表】

0006742314000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 D 498/18 (2006.01) A 6 1 P 31/04
 C 1 2 N 1/20 (2006.01) C 0 7 D 498/18 3 0 1
 C 1 2 N 15/13 (2006.01) C 0 7 D 498/18 C S P
 C 1 2 N 1/20 A
 C 1 2 N 15/13

- (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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 3 7, モンタラ, アーヴィング ストリート 9 4
 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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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, ピンチン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, 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 9 4 0 8 0, 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 金田 康平

- (56)参考文献 特表2012-533293(JP,A)
 特表2009-505974(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)